

ESCHERICHIA COLI utare-epiteelisoluviljelmässä

– Persistoivien ja transienttien kantojen adheesio, invaasio ja elinkykyisyys

Riikka Frilander-Keinänen

Pro gradu -tutkielma

Ravitsemus- ja elintarvikebiotekniikka

Biotiede

Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Itä-Suomen yliopisto

Maaliskuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Biotiede

Ravitsemus- ja elintarvikebiotekniikka

FRILANDER-KEINÄNEN, RIIKKA K.: *Escherichia coli* utare-epiteelisoluviiljelmässä -

Persistoivien ja transienttien kantojen adheesio, invaasio ja elinkykyisyys

Pro gradu, 69 sivua

Ohjaajat: ELT Paula Hyvönen, Itä-Suomen yliopisto ja Prof. Atte von Wright, Itä-Suomen yliopisto

Maaliskuu 2012

Avainsanat: Utaretulehdus, *Escherichia coli*, utare-epiteelisolut, *in vitro* -solumalli, persistoivuus

Utaretulehdus on lypsykarjan yleisin sairaus ja se aiheuttaa maitotiloille suuria kustannuksia. Ympäristöperäisten *Escherichia coli* -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten esiintyvyys vaihtelee paljon eri maiden välillä. Suomessa kliinisistä utaretulehduksista *E. coli* -utaretulehduksia on alle 12 %, mutta esimerkiksi Israelissa niitä on noin 60 %. *E. coli* -bakteereiden aiheuttamat utaretulehdukset ovat hyvin ongelmallisia, koska tulehdusten vakavuus vaihtelee suuresti ja voi johtaa jopa lehmän menehtymiseen.

E. coli - bakteerin aiheuttamia utaretulehduksia on pitkään pidetty akuutteina kliinisinä tulehduksina. *E. coli* -utaretulehduksessa opportunistit bakteerit pääsevät utareeseen, lisääntyvät ja aiheuttavat taudin. Tämän jälkeen lehmän puolustusjärjestelmä joko eliminoi bakteerit tai lehmä kuolee. Myöhemmin on kuitenkin havaittu, että *E. coli* -bakteerit pystyvät aiheuttamaan myös kroonisia utaretulehduksia eli bakteerit jäävät persistoimaan lehmän utareeseen. Näiden persistoivien utaretulehdusten osuus on kasvanut ja selityksenä sille pidetään *E. coli* -bakteereiden sopeutumista uuteen ympäristöön.

Tämän pro gradu -työn tarkoituksena oli selvittää, onko kroonisia eli persistoivia utaretulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla eroja verrattuna akuutteja tulehduksia aiheuttaviin eli transientteihin *E. coli* -kantoihin. Kantojen vertailu suoritettiin tekemällä bakteeritaltustuskokeita utare-epiteelisoluille. Tutkimuksessa käytettiin 19 eri *E. coli* -bakteerin kantaa, joista 7 kantaa oli eristetty akuuteista utaretulehduksista ja 12 kantaa persistoivista tulehduksista. Solumallina työssä käytettiin primaarista naudan utare-epiteeli -solulinjaa (pBMEC).

Kaikki bakteerikannat kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin, mutta adheesioprosentit vaihtelivat välillä 0,1 – 4,9 %. Bakteerikantojen invasoitumisessa oli huomattavan suurta vaihtelua, suuri osa kannoista ei invasoitunut lainkaan. Kolme persistoivaa kantaa ja yksi transientti kanta invasoituivat hyvin. Bakteereiden solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen olivat kytköksissä invaasioon ja kaksi persistoivaa ja yksi transientti kanta pystyivät lisääntymään utare-epiteelisoluissa 48 tunnin ajan.

Tilastollisesti merkitsevää eroa näiden persistoivien ja transienttien *E. coli* -kantojen välille ei saatu tässä tutkimuksessa adheesiossa, invaasiossa eikä solunsisäisessä lisääntymisessä. Bakteerikannat erosivat toisistaan ryhmien sisällä niin paljon, että tilastollisilla analyyseillä ei saatu eroa ryhmien välille.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Science and Forestry
Department of Biosciences
Degree Programme in Nutrition and Food Biotechnology
FRILANDER-KEINÄNEN, RIIKKA K.: *Escherichia coli* in bovine mammary epithelial cell culture – Adhesion, invasion and survival of persistent and transient strains
Master Thesis, 69 pages
Supervisors: DVM, PhD Paula Hyvönen, University of Eastern Finland and Prof. Atte von Wright, University of Eastern Finland
March 2012

Keywords: Mastitis, *Escherichia coli*, bovine mammary epithelial cells, *in vitro* cell model, persistence

Mastitis is the most common disease in dairy cows and it causes very high economic losses. Incidence of mastitis caused by environmental *Escherichia coli* is relatively low in many countries, but it fluctuates a lot between different countries. In Finland, of all the clinical mastitis less than 12 % is caused by *E. coli*, but for example in Israel the portion is 60 %. *E. coli* mastitis is a very serious problem, because it could lead to death.

Mastitis caused by *E. coli* is typically associated with rapid onset of clinical signs followed by spontaneous recovery within several days. *E. coli* bacteria invade to mammary gland, multiply and cause disease, then cow's immune defense system eliminates bacteria or cow passes away. However, it has been reported that some *E. coli* strains can also cause chronic mastitis also known as persistent intramammary infections.

The aim of this study was to examine, whether there is any differences between *E. coli* strains from persistent and transient mastitis. The main object of this study was to solve out if the persistent strains are better invaders and survivors in mammary epithelial cells than strains from transient mastitis, using primary bovine mammary epithelial cell -model (pBMEC). In this study, we used 19 different *E. coli* strains. Seven strains were isolated from the transient mastitis and 12 strains from the persistent intramammary infection.

All strains adhered to bovine mammary epithelial cells, but the adherence percent varied between 0,1 – 4,9 %. The invasion fluctuated exceedingly between these strains and most of the studied strains invaded very little or not at all. However, three persistent strains and one transient strain invaded quite well. Intracellular survival of bacteria was highly related to invasion and two persistent strains and one transient strain multiplied in epithelial cells.

In this study there was not any statistical difference between these transient and persistent strains. There was no difference seen between the studied groups, because of the variation inside the groups.

LYHENTEET

APP, Acute Phase Proteins, akuutin faasin proteiinit
APR, Acute Phase Response, akuutin faasin reaktio
ATCC, American Type Culture Collection
BME-UV, Bovine Mammary Epithelial-UV cell line
BSA, Bovine Serum Albumin
CME, Calveolae-Mediated Endocytosis, kalveoli välitteinen endosytoosi
EGF, Epidermal Growth Factor, epidermaalinen kasvutekijä
ERIC-PCR, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences -PCR
Hp, Haptoglobin, haptoglobiini
IGF-1, Insulinlike Growth Factor 1, insuliinin kaltainen kasvutekijä 1
KNS, Koagulaasi Negatiivinen Stafylokokki
LBP, Lipopolysaccharide Binding Protein, lipopolysakkarideja sitova proteiini
LPS, Lipopolysaccharide, lipopolysakkaridi
MH, Müller-Hinton
MOI, Multiplicity of Infection, infektoivaa bakteeria solua kohden
MPEC, Mammary Pathogenic *Escherichia coli*, utarepatogeeninen *E. coli*
PCR, Polymerase Chain Reaction, polymeraasiketjureaktio
PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, pulssikenttäelektroforeesi
PGE2, ProstaGlandin E2, prostaglandiini E2
PMN, PolyMorphoNuclear cells, Polymorfonukleaariset neutrofiilit
RME, Receptor Mediated Endocytosis, reseptori välitteinen endosytoosi
RPM, Rounds Per Minute, kierrosta minuutissa
PAIs, Pathogenicity Islands, patogeeniset saarekkeet
pBMEC, primary Bovine Mammary Epithelial Cells, primääriset naudan utare-epiteelisolut
PBS, Phosphate-Buffered Saline, fosfaatti puskuroitu fysiologinen suolaliuos
SAA, Serum Amyloid A, seerumin amyloidi A
SCC, Somatic Cell Count, somaattisten solujen lukumäärä
TSA, Tryptone Soy Agar, tryptonsoija-agar
TBS, Tryptone Soy Broth, tryptonsoijaliemi
TLR-4, Toll-Like Receptor 4
TNF- α , Tumor Necrosis Factor - α , tuumori nekroosi tekijä - α

Sisällysluettelo

JOHDANTO	7
KIRJALLISUUS	10
1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	10
1.1 Patogeeniset <i>E. coli</i> -kannat	11
2. <i>E. COLI</i> -UTARETULEHDUS	13
2.1 <i>E. coli</i> -bakteerit utaretulehduksessa	13
2.2 Yleisyys Suomessa ja muualla maailmassa.....	14
2.3 <i>E. coli</i> -utaretulehduksen vakavuus.....	15
2.4 Epidemiologia	17
2.5 Krooniset eli persistoivat <i>E. coli</i> -bakteereiden aiheuttamat utaretulehdukset.....	18
2.6 Taudinaiheuttamiskyky	20
2.6.1 Virulenssitekijät ja virulenssigeenit.....	20
2.6.2 Vedinkanavan läpäiseminen	24
2.6.3 Lisääntyminen utarerauhasessa.....	25
2.6.4 Naudan puolustusjärjestelmältä suojautuminen.....	25
2.6.5 Utarekudoksen vaurioituminen.....	26
3 LEHMÄN PUOLUSTUSJÄRJESTELMÄN TOIMINTA <i>E. COLI</i> - UTARETULEHDUKSESSA.....	27
3.1 Immuunipuolustusreaktiot.....	27
3.2 Tutkimuksia <i>E. coli</i> -utaretulehduksen immuunipuolustuksesta.....	28
3.2.1 <i>In vivo</i> -tutkimuksia	29
3.2.2 <i>In vitro</i> -tutkimuksia	29
4 SOLUMALLIEN KÄYTTÖ JA SOVELTUVUUS	30
4.1 Primaariset solulinjat.....	31
4.2 Klonaaliset solulinjat.....	32
4.2.1 MACT-T -solulinja.....	32
4.2.2 BME-UV -solulinjat	33
4.4 Adheesio	34
4.5 Invaasio	35
4.6 Solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen	36
5 PERSISTOIVAT <i>E. COLI</i> -KANNAT SOLUMALLISSA	37
KOKEELLINEN TUTKIMUS	40
6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	41
6.1 Bakteerikannat.....	41
6.1.1 Bakteerien käsittely ennen altistuskoetta.....	42
6.1.2 Bakteerikantojen antibioottiherkkyyden määrittäminen.....	43
6.2 Utare-epiteelisolut	43

6.3	Altistuskokeet	45
6.3.1	Adheesio	45
6.3.2	Invaasio	46
6.3.3	Lisääntyminen ja selviytyminen 24 ja 48 tunnin ajan	46
6.4	Bakteeripesäkkeiden laskeminen maljoilta	47
6.5	Tulosten laskeminen	47
6.6	Tilastolliset menetelmät	47
7	TULOKSET	48
7.1	Adheesio	49
7.2	Invaasio	50
7.3	Solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen	51
8	POHDINTA	54
	LÄHTEET	60

JOHDANTO

Lypsykarjan utaretulehdukset ovat hyvin yleisiä ja noin 30 % kaikista lehmistä sairastuu siihen kerran vuodessa (Seegers ym. 2003; Hortet & Seegers 1998). Lypsytiloille utaretulehduksista aiheutuu hyvin suuret taloudelliset tappiot (Yancey ym. 1999). Utaretulehdusten aiheuttamista kustannuksista noin 70 % johtuu vähentyneestä maidontuotannosta ja maidontuotannon pienentyminen on seurausta tulehduksen aiheuttamasta utarekudoksen tuhoutumisesta ja aktiivisuuden alentumisesta (Zhao & Lacasse 2008). Lisäksi kustannuksia aiheuttavat muun muassa antibiootihoidot ja eläinten poistot (Esslemont & Kossaibati 1997).

Utaretulehdukset heikentävät maidon laatua ja muuttavat maidon koostumusta (Pyörälä 2003; Hortet & Seegers 1998). Utaretulehduksessa maidossa olevien somaattisten solujen lukumäärä (SCC, Somatic Cell Count) nousee ja siitä johtuen maidon proteiinien suhteelliset osuudet muuttuvat, esimerkiksi immunoglobuliini G:n (IgG) ja naudan seerumin albumiinin (BSA, Bovine Serum Albumin) konsentraatiot kasvavat ja kaseiinipitoisuus pienenee (Coulon ym. 2002). Utaretulehdukset muuttavat maidon rasvahappokoostumusta, laktoosin, raudan ja muiden mineraalien määrää ja lisäksi maidon entsyymiaktiivisuus ja pH kasvavat (Ogola ym. 2007). Utaretulehdukset vaikuttavat myös suuresti lypsykarjan hyvinvointiin ja voivat aiheuttaa terveystriskejä kuluttajille (Günther ym. 2010).

Tulehduksen utareessa voi aiheuttaa hyvin useat erilaiset mikro-organismit, mutta bakteerit ovat yleisimpiä utaretulehduksen aiheuttajia (Yancey ym. 1999). Suurin osa nautojen utaretulehduksia aiheuttavista bakteereista on ympäristöstä peräisin olevia bakteereita kuten, *Streptococcus uberis* ja *Escherichia coli* tai lehmästä toiseen tarttuvia bakteereita kuten *Staphylococcus aureus*, *Str. agalactiae* ja *Str. dysgalactiae*. (Bradley 2002; Lammers ym. 2001.)

Lehmästä toiseen tarttuvat bakteerit ovat sopeutuneet elämään ja lisääntymään utarerauhasessa ja aiheuttavat usein piileviä kroonisia utaretulehduksia (Passey ym. 2008). Tällöin lehmä voi olla oireeton ja tavallisesti vain somaattisten solujen lukumäärä maidossa nousee (Bradley 2002), mutta maidon laatu kuitenkin heikkenee suuresti (Ogola ym. 2007). Sen sijaan utaretulehduksia aiheuttavia ympäristöperäisiä patogeenejä pidetään opportunistisina tunkeutujina, jotka invasoituvat, lisääntyvät, aktivoivat isännän puolustusjärjestelmän ja eliminoituvat nopeasti utareesta (Bradley 2002).

Suomessa yleisimmät utaretulehduksia aiheuttavat bakteerit ovat *Staphylococcus aureus* ja koagulaasi-negatiiviset stafylokokit (KNS) (Koivula ym. 2007). Suomessa koliformisten eli lähinnä *E. coli* -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten osuus on alle 12 % (Nevala ym. 2004). Monissa muissa maissa on kuitenkin suurimmaksi ongelmaksi tullut *E. coli* -bakteereiden aiheuttamat utaretulehdukset, vaikka lehmien tuotanto- ja elinolot ovat merkittävästi parantuneet (Suojala 2010; Bradley & Green 2001). Maailmanlaajuisesti *E. coli* -bakteeria pidetään yhtenä merkittävimpänä utaretulehdusten aiheuttajana (Hogan & Smith 2002; Bradley 2002; Shpigel ym. 1998).

E. coli -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten vakavuus vaihtelee pienistä utarerauhasen muutoksista hyvin vakaviin systeemiin muutoksiin, jopa kuolemaan (Wenz ym. 2006; Kaipainen ym. 2001). Utaretulehduksen taudinkuvaan vaikuttavat kolme osatekijää: bakteeri, lehmä itse ja ympäristötekijät (Burvenich ym. 2003). Useat tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että *E. coli* -bakteerin aiheuttaman utaretulehduksen vakavuus määräytyy enemmän lehmän omasta tilasta kuin bakteerin patogeenisyydestä (Burvenich ym. 2003; Hirvonen ym. 1999). Todennäköisesti myös bakteerikannan taudinaiheuttamiskyky, joka perustuu muun muassa virulenssitekijöihin, vaikuttaa taudin syntyyn (Lehtolainen ym. 2003a). Monista tutkimuksista huolimatta sellaista merkittävää virulenssitekijää, joka olisi kaikilla utaretulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla, ei ole vielä löydetty (Gonen ym. 2007; Kaipainen ym. 2002).

E. coli -bakteeri aiheuttaa lypsykarjalle tavallisesti akuutteja kliinisiä utaretulehduksia (Shpigel ym. 2008; Dogan ym. 2006). Osalle infektiosta parantuneille naudoille *E. coli* -utaretulehdus voi kuitenkin jäädä krooniseksi eli persistoimaan (Hogan & Smith 2003). Nämä persistoivat utaretulehdukset ovat usein oireiltaan lievempiä, mutta heikentävät lehmien utareterveyttä (White ym. 2010). Tutkimuksissa on havaittu, että keskimäärin 5-24 % *E. coli* -utaretulehduksista jää persistoimaan (Bradley & Green 2001; Döpfer ym. 1999). Persistoivien *E. coli* -utaretulehdusten osuus näyttäisi kuitenkin lisääntyvän koko ajan, koska bakteerit ovat ilmeisesti kehittäneet itselleen mekanismeja, joilla ne pystyvät lisääntymään ja selviytymään hengissä lehmän utareen soluissa (Passey ym. 2008).

Dogan ym. (2006) tutkivat persistoivista ja akuuteista utaretulehduksista eristettyjä *E. coli* -kantoja MAC-T -solumallilla. Heidän tutkimuksessaan persistoivia utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -kannat invasoituivat utare-epiteelisoluihin ja säilyivät hengissä solujen sisällä paremmin kuin transientit *E. coli* -kannat. Heidän tutkimuksessa erityyppisiä

utaretulehduksia aiheuttavien *E. coli* -kantojen erot olivat tilastollisesti merkitseviä. Tutkimuksensa perusteella he uskovat, että *E. coli* -bakteereiden invaasio ja solunsisäinen selviytyminen ovat keskeisiä tekijöitä persistoivan *E. coli* -utaretulehduksen patogeenisissa. (Dogan ym. 2006.)

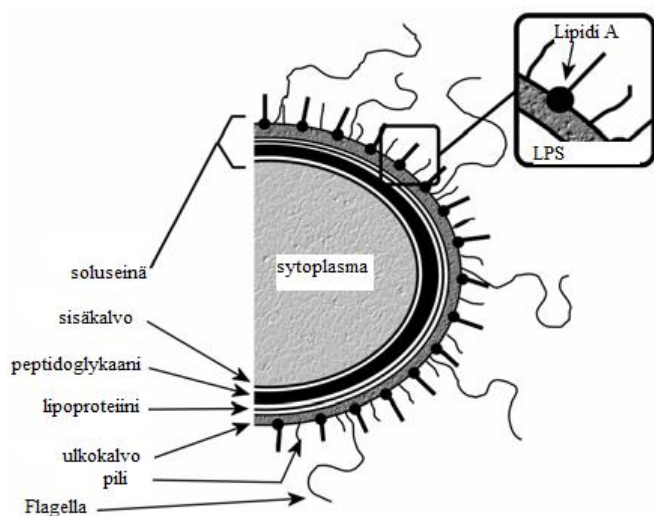
Tämän pro gradu -tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää persistoivista ja akuuteista *E. coli* -utaretulehduksista eristettyjen kantojen eroja utare-epiteelisolumallilla. Bakterikannat oli eristetty suomalaisilla lypsytiloilla esiintyneistä kliinisistä utaretulehduksista ja kantojen persistoivuus oli määritetty pulssikenttäelektroforeesilla (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Lisäksi tutkimuksessa oli mukana neljä Yhdysvalloista peräisin olevaa Dogan ym. (2006) tutkimuksessa käyttämää *E. coli* -kantaa.

Altistuskokeissa käytettiin solumallina primaarista Bovine Mammary Epithelial Cell -solulinjaa (pBMEC), joka mallintaa hyvin naudun utare-epiteeliä. Tutkimuksessa selvitettiin yhteensä 19 *E. coli* -kannan adheesio- ja invaasio-ominaisuuksia sekä bakteereiden selviytymistä ja lisääntymistä utare-epiteelisoluissa 24 ja 48 tunnin ajan. Tutkimuksen päätavoitteena oli selvittää, kykenevätkö persistoivia utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -kannat invasoitumaan ja selviytymään paremmin utare-epiteelisoluissa kuin transientit kannat.

KIRJALLISUUS

1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli on *Escherichia*-suvun, joka kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon, tyypillinen gram-negatiivinen sauvabakteeri (Stenutz ym. 2006). Gram-negatiivisten bakteereiden soluseinä koostuu kolmesta osasta; sytoplasmisesta sisäkalvosta, peptidoglykaanikerroksesta ja ulkokalvosta (Kuva 1.). Uloin kalvokerros sisältää fosfolipidejä, kalvoproteiineja ja lipopolysakkarideja (LPS, Lipopolysaccharide). Lipopolysakkaridit koostuvat lipidi-A:sta, lipopolysakkaridikuoresta ja toistuvista polysakkaridiyksiköistä, joita kutsutaan O-antigeeneiksi. *E. coli* -bakteerin uloimmalla pinnalla voi olla fimbria eli pili, joka menee soluseinän läpi. Bakteerisolu voi myös olla ohuen polysakkaridikerroksen eli kapselin ympäröimä. (Cullor ym. 1996.) *E. coli* -bakteerit voidaan luokitella seroryhmiin näiden erilaisten O- ja H-antigeenien (flagella) ja joskus myös K-antigeenin (kapseli) perusteella (Liu ym. 2010).



Kuva 1. *E. coli* -bakteerin soluseinän rakenne (Lehtolainen 2004; Cullor 1996)

E. coli luokitellaan fakultatiivisesti anaerobiseksi normaalin suolistoflooran bakteeriksi ihmisillä ja muilla nisäkkäillä, ja tavallisesti se ei ole patogeeninen. Heti syntymän jälkeen *E. coli* -bakteeri kolonisoituu mahasuolikanavaan ja jää isännän normaaliflooran bakteeriksi. (Kaper ym. 2004.) Yleensä *E. coli* on harmiton suolistossa oleva ei-patogeeninen bakteeri, mutta se voi kuitenkin aiheuttaa infektioita, jos isännän immuunipuolustus on heikentynyt tai mahasuolikanavaan on tullut vaurio, jolloin bakteeri pääsee siirtymään muualle elimistöön (Nataro & Kaper 1998).

Fylogeneettisen analyysin avulla *E. coli* -bakteerit on voitu jakaa neljään pääryhmään: A, B1, B2 ja D (Escobar-Paramo ym. 2006; Clermont ym. 2000). Yleensä suoliston ulkopuoleisia infektioita aiheuttavat patogeeniset *E. coli* -kannat kuuluvat fylogeniaryhmään B2 ja pieni osa kuuluu ryhmään D (Escobar-Paramo ym. 2006; Girardeau ym. 2003; Picard ym. 1999). Ei-patogeeniset *E. coli* -bakteerit kuuluvat pääosin fylogeniaryhmään A ja samaan ryhmään kuuluvat yleensä myös utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit (Suojala ym. 2011; Dogan ym. 2006; Picard ym. 1999). Fylogeneettisessä ryhmittelyssä voidaan käyttää apuna monipaikkaentsyymielektroforeesia (MLEE, Multilocus Enzyme Electrophoresis) tai ribotyypitystä (ribotyping), jotka molemmat ovat hyväksytyjä referenssimenetelmiä (Clermont ym. 2000). Clermont ym. (2000) kehittivät uuden polymeraasiketjureaktioon perustuvan Triplex PCR:n (PCR, Polymerase Chain Reaction), joka todettiin nopeaksi, helpoksi ja luotettavaksi menetelmäksi fylogeneettiseen analyysiin.

1.1 Patogeeniset *E. coli* -kannat

E. coli -kannat voivat vaihdella täysin vaarattomista bakteereista hyvin vaarallisiin, jopa kuoleman aiheuttaviin patogeenisiin bakteereihin (Kaper ym. 2004). Nämä patogeeniset bakteerikannat luokitellaan yleensä kahteen suureen ryhmään, suolistossa infektioita aiheuttaviin ja suoliston ulkopuolella (verenkierrassa ja virtsateissä) tauteja aiheuttaviin bakteerikantoihin (Croxen & Finlay 2010; Shpigel ym. 2008).

Suolen sisäiset patogeenit voidaan jakaa kuuteen luokkaan: enteropatogeeninen *E. coli* (EPEC), enterohemolyttinen *E. coli* (EHEC), enterotoksinen *E. coli* (ETEC), enteroaggregatiivinen *E. coli* (EAEC), enteroinvasiivinen *E. coli* (EIEC), diffuusisti adhesoituva *E. coli* (DAEC) (Croxen & Finlay 2010). Suolen ulkopuolisia patogeeneja (ExPEC, Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) ovat esimerkiksi uropatogeeninen *E. coli* (UPEC, Uropathogenic *E. coli*), linnuilla esiintyvä patogeeninen *E. coli* (APEC, Avian Pathogenic *E. coli*), meningiitteihin ja sepsiksiin liittyvä *E. coli* (MNEC, Meningitis-associated *E. coli*) (Kaper ym. 2004) ja utarepatogeeninen *E. coli* (MPEC, Mammary Pathogenic *E. coli*) (Shpigel ym. 2008).

Patogeeniset *E. coli* -kannat ovat hankkineet itselleen spesifisiä virulenssitekijöitä, joiden avulla ne pystyvät sopeutumaan erilaisiin ympäristöolosuhteisiin ja aiheuttamaan monia erilaisia infektioita (Kaper ym. 2004). Nämä virulenssitekijät voivat olla esimerkiksi bakteerin pintarakenteita, joiden avulla ne voivat kiinnittyä nisäkässoluihin, toksineja tai isännän

puolustusjärjestelmää hämääviä tekijöitä (Stenutz ym. 2006). Tutkimuksissa patogeenisilla *E. coli* -kannoilla on todettu olevan 25 % enemmän genomista DNA:ta kuin ei-patogeenisella kannalla (*E. coli* K-12 kanta). Virulenssitekijöitä koodaavat geenialueet voivat siirtyä bakteerikannasta toiseen ja muodostua uudenlaiseksi virulenssitekijöiden yhdistelmäksi. (Kaper ym. 2004.) Tästä johtuen on selvää, että *E. coli* -bakteerit muodostavat hyvin monimuotoisen bakteerijoukon.

2. *E. COLI* -UTARETULEHDUS

2.1 *E. coli* -bakteerit utaretulehduksessa

Utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit luokitellaan ympäristöperäisiksi ja niillä pitää olla virulenssitekijöitä, jotka mahdollistavat bakteerin taistelun elintilasta, lisääntymisestä ja selviytymisestä utareessa (Kaipainen ym. 2002). Myös harmittomana pidetyt ei-patogeeniset *E. coli* -bakteerikannat voivat aiheuttaa utaretulehduksia ja voidaan olettaa, että niilläkin on joitakin virulenssitekijöitä, jotka auttavat niitä kolonisoitumisessa ja vuorovaikutuksessa isännän kanssa (Shpigel ym. 2008).

Utaretulehduksiin liittyvät patogeeniset bakteerikannat (MPEC, Mammary Pathogenic *E. coli*) eivät muodosta yhtä yhtenäistä ryhmää kuten muut patogeeniset kannat (Shpigel ym. 2008), vaan utaretulehduksia aiheuttavien kantojen on todettu kuuluvan moniin eri serologisiin ryhmiin (Burvenich ym. 2003). Shpigel ym. (2008) mukaan epidemiologisissa tutkimuksissa ei ole saatu todisteita siitä, että jotkut tietyt *E. coli* -kantojen serotyypit aiheuttaisivat utaretulehduksia. Utaretulehduksista eristettyjen *E. coli* -kantojen genotyypit vaihtelevat paljon (Lipman ym. 1995), eikä tutkimusten mukaan mikään tietty virulenssigeenien yhdistelmä liity selvästi utaretulehduksiin (Shpigel ym. 2008). Utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit muodostavat siis hyvin heterogeenisen ryhmän.

Nemeth ym. (1994) vertailivat tutkimuksessaan utaretulehduksia aiheuttavia *E. coli* -kantoja ja nautojen ulosteesta eristettyjä kantoja ja totesivat, että ne eivät eroa biokemiallisesti merkittävästi toisistaan. Utaretulehduksista eristetyt *E. coli* -kannat kuitenkin pystyivät fermentoimaan adonitolia, tuottamaan aerobaktiinia ja kasvamaan paremmin utaretulehdusmaidossa kuin ulosteesta eristetyt kannat. Tutkimustulostensa perusteella he kuitenkin päätyivät tulokseen, että utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit eivät muodosta yhtä yhtenäistä ryhmää, joilla olisi jotkin tietyt spesifiset virulenssitekijät. (Nemeth ym. 1994.)

Blum ym. (2008) tutkivat sekä utaretulehduksista että lehmien elinympäristöstä eristettyjä *E. coli* -kantoja. Näitä ympäristö- ja mastiittikantoja ei voitu erottaa toisistaan O-antigeenin eikä antibioottilherkkyyden suhteen. He olivat kuitenkin tutkimuksensa perusteella sitä mieltä, että kliinisiä *E. coli* -utaretulehduksia aiheuttavat kannat muodostavat jonkinlaisen oman alaryhmän, joka eroaa ympäristökannoista siten, että ne pystyvät paremmin lisääntymään

maidossa ja käyttämään tehokkaammin laktoosia hyväkseen. Lisäksi polymorfonukleaariset neutrofiilit (PMN, PolyMorphoNuclear cells) fagosytoivat mastiittikantoja huonommin kuin ympäristökantoja, joten mastiittikannat pystyvät paremmin suojautumaan isännän puolustusjärjestelmältä. (Blum ym. 2008.)

Utaretulehduksia aiheuttavien *E. coli* -kantojen genotyypeissä on havaittu hyvin suuri vaihtelevuus (Wenz ym. 2006), mutta Bradley ym. (2001) tutkimus osoitti, että *E. coli* -bakteerin ympäristökantojen genotyyppien vaihtelu oli kuitenkin suurempaa kuin utaretulehduksista eristetyillä kannoilla. Tämä voisi viitata utaretulehduksia aiheuttavien *E. coli* -kantojen luonnolliseen valintaan ja valikoituvuuteen (Blum ym. 2008).

2.2 Yleisyys Suomessa ja muualla maailmassa

Suomessa on jo 1940-luvulta lähtien toimittu utaretulehdusten vähentämiseksi ja maidon laadun parantamiseksi (Pitkälä ym. 2004; Mylly ym. 1994). Vuosina 1988 ja 1995 Suomessa tehtiin kattavat kartoitukset utaretulehdusten esiintyvyydestä ja aiheuttajabakteereista. Silloin todettiin, että utaretulehdusten määrää oli vähentynyt 10 %. (Mylly ym. 1998.) Utaretulehdusten esiintyvyys laski Suomessa 7 % vuodesta 1995 vuoteen 2001 mennessä (Pitkälä ym. 2004). Myös vuosina 2004 ja 2006 Suomessa kerättiin tietoa utaretulehdusten aiheuttajista ja silloin todettiin, että Suomessa yleisimmät utaretulehdusten aiheuttajat olivat *S. aureus* (18,3 % ja 17,7 %) ja koagulaasi-negatiiviset stafylokokit (17,6 % ja 23,5 %). Tällöin todettiin myös, että utaretulehduksia aiheuttavien patogeenien osuudet vaihtelivat Suomessa paikan ja vuodenajan mukaan. (Koivula ym. 2007.)

Koliformisten bakteereiden eli lähinnä *E. coli* -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten määrät ovat lisääntyneet monissa maissa, mutta niiden osuudet vaihtelevat hyvin paljon eri maiden välillä. Suomessa *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia utaretulehduksia on alle 12 % kaikista utaretulehduksista (Nevala ym. 2004). Virossa vuosina 2007 - 2009 kliinisistä utaretulehduksista 15,9 % oli *E. coli* -bakteerin aiheuttamia (Kalmus ym. 2011). Sen sijaan esimerkiksi Israelissa yli 60 % utaretulehduksista on koliformisten bakteereiden aiheuttamia (Shpigel ym. 1998).

Englannissa tehdyssä tutkimuksessa, jossa oli mukana kuusi lypsykarjatilaa, 34,7 % kliinisistä utaretulehduksista oli *E. coli* -bakteerin aiheuttamia (Bradley & Green 2001). Englannissa ja

Walesissa tehdyssä tutkimuksessa 19,8 % kliinisistä utaretulehduksista oli *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia. Tässä tutkimuksessa *E. coli* -bakteerit yhdessä muiden enterobakteereiden kanssa olivat toiseksi yleisimpiä kliinisten utaretulehdusten aiheuttajia. (Bradley 2007.) Alankomaissa 300 lypsytilalla 18 kuukauden aikana esiintyneistä kliinisistä utaretulehduksista 13,0 % oli *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia (Döpfer ym. 1999). Uudessa-Seelannissa sen sijaan *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia utaretulehduksia esiintyy hyvin vähän ja myös Norjassa *E. coli* osoittautuu hyvin harvoin utaretulehduksen aiheuttajaksi (Zadoks & Fitzpatrick 2009).

Eri maiden välillä olevat suuret vaihtelut *E. coli* -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten esiintyvyydessä selittyvät suurimmaksi osaksi sillä, että eri mailla on erilainen lainsäädäntö, erilaiset eläinlääkintä- ja laboratoriopalvelut (Zadoks & Fitzpatrick 2009) sekä lypsykarjan ympäristöolosuhteet ja hoitomenetelmät ovat erilaisia. Esimerkiksi Suomessa lypsykarjan koot ovat suhteellisen pieniä ja lehmät ovat suurimman osan vuodesta sisällä navetoissa. Sen sijaan Israelissa lypsykarjan koot ovat suuremmat kuin Suomessa ja lehmät ovat paljon lämpimässä ulkoilmassa. (Lehtolainen ym. 2003b.)

2.3 *E. coli* -utaretulehduksen vakavuus

E. coli -utaretulehdusten esiintyvyys on useassa maassa suhteellisen alhainen, mutta taudin tekee hyvin ongelmalliseksi sen vakavuus (Burvenich ym. 2003). *E. coli* -bakteereiden aiheuttamat kliiniset utaretulehdukset voivat olla pieniä paikallisia tulehdusreaktioita utarekudoksessa tai ne voivat aiheuttaa hyvin merkittäviä systeemisiä oireita, kuten kuivumista, ruuansulatuksen pysähtymistä, shokkia ja kuolemaa (Wenz ym. 2006). Jopa 23 % kliinisissä *E. coli* -utaretulehduksissa taudinkuvaan kuuluu vakavia systeemisiä oireita (Smith ym. 1985). *E. coli* -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten takia joudutaan myös lopettamaan lehmiä (Seegers ym. 2003) ja esimerkiksi Englannissa utaretulehdus on toiseksi yleisin lypsylehmien kuolinsyy (Esslemont & Kossaibati 1997). Kuolemaan johtaneista utaretulehduksista suurin osa on *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia (Bannerman ym. 2009).

Matala somaattisten solujen lukumäärä, vähäinen basofiilien lukumäärä verenkierrossa, lisääntynyt tuumorinekroositekijä- α (TNF- α , Tumor Necrosis Factor - α) -ja prostaglandiini E2 (PGE2) -pitoisuus, maidon korkea natriumpitoisuus ja matala kalsiumpitoisuus ennustavat vakavaa *E. coli* -utaretulehdusta (Pezeshki ym. 2011). Suojala ym. (2008) osoittivat tutkimuksellaan, että myös akuutin faasin proteiinit (APP Acute Phase Proteins) ennustavat

hyvin utaretulehdusta ja niiden määritystä voidaan käyttää *E. coli* -utaretulehduksen vakavuuden arvioinnissa (Suojala ym. 2008).

E. coli -utaretulehduksen vakavuus on läheisesti yhteydessä lehmän poikimiseen ja maidontuotannon käynnistymisvaiheeseen (Pezeshki ym. 2011). Maidontuotannon käynnistysvaiheessa *E. coli* -utaretulehdus aiheuttaa lehmille usein hyvin vakavan taudinkuvan ja vain 30 - 50 %:lla maidontuotanto palautuu normaaliksi (Kuttila ym. 2004). Maidontuotannon keski- ja loppuvaiheessa sen sijaan *E. coli* -mastiitti aiheuttaa usein vain lievän tulehduksen. Tämä ero selittyy lehmän tiineyteen ja poikimiseen liittyvillä hormonaalisilla, metabolisilla ja ravitsemuksellisilla muutoksilla, jotka vaikuttavat lehmän immuunijärjestelmän toimintaan. (Pezeshki ym. 2011.) Lisäksi koliformisen utaretulehduksen vakavuuteen vaikuttaa, onko lehmä poikanut yhden vai useamman kerran (Vangroenweghe ym. 2004). Kliinisiä vakavia utaretulehduksia tavataan enemmän useita kertoja poikineilla lehmillä kuin ensimmäistä kertaa poikivalla lehmällä (Pezeshki ym. 2011).

E. coli -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten vakavuus vaihtelee hyvin suuresti eri lehmien välillä sekä *in vivo* -utaretulehduksissa että kokeellisissa mastiiteissa (Kornalijnslipjer ym. 2004). Merkittävimpänä tekijänä taudinkuvan vakavuuden synnylle pidetään sitä, kuinka nopeasti PMN-solut pystyvät tulemaan verenkierrosta utaretiehyisiin ja maitoon ja kuinka tehokkaasti ne kykenevät tappamaan *E. coli* -bakteereita (Grinberg ym. 2008; Burvenich ym. 1999; Shuster ym. 1996). Koliformisten bakteereiden aiheuttaman utaretulehduksen oireiden vakavuuden uskotaan selittyvän suurimmaksi osaksi lehmän kyvyllä puolustautua taudinaiheuttajaa vastaan (Burvenich ym. 2003).

Kokeellisissa utaretulehduksissa on todettu, että PMN-solujen lukumäärä maidossa kasvaa vasta noin 7-9 tunnin kuluttua bakteeri-infuusion jälkeen (Van Werven 1999, Kornalijnslipjer ym. 2002 mukaan). Riollet ym. (2000) tutkimus osoitti, että kokeellisessa *E. coli* -utaretulehduksessa bakteereiden lukumäärä kasvaa eksponentiaalisesti siihen asti (10 tuntia) kun PMN-solut alkavat saapua utareeseen. Utaretulehduksen kehittymisen edellytyksenä on se, miten tässä alkuvaiheessa *E. coli* -bakteerit pystyvät sopeutumaan uuteen elinympäristöön ja lisääntymään utareessa (maidossa) (Kornalijnslipjer ym. 2004; Kornalijnslipjer ym. 2002).

E. coli -bakteereiden lukumäärä on vahvasti yhteydessä taudin vakavuuteen (Hogan & Smith 2003). Kornalijnslipjer ym. (2002) osoittivat tutkimuksessaan, että *E. coli* -bakteereiden *in vitro* -kasvu vaihteli suuresti eri lehmistä eristetyissä maidoissa. Tämä eri lehmien erilainen

maidon koostumus voi myös olla merkittävä tekijä *E. coli* -utaretulehduksen patogeneesissa ja taudin vakavuudessa (Kornalijnslijper ym. 2002).

2.4 Epidemiologia

Gram-negatiiviset bakteerit (*E. coli*, *Str. uberis* ja *Klebsiella pneumoniae*) aiheuttavat usein kliinisiä utaretulehduksia hyvin hoidetulle, pienen somaattisen soluluvun (SCC, Somatic Cell Count) lypsykarjalle (Hogan & Smith 2003). *E. coli* -bakteereiden aiheuttama utaretulehdus ei yleensä lisää somaattisten solujen lukumäärää maidossa merkittävästi, verrattuna *S. aureus* -bakteereiden aiheuttamaan tulehdukseen (Bannerman ym. 2004). Green ym. (2004) tutkimuksen mukaan somaattisten solujen lukumäärän lisääntyminen maidontuotannon käynnistyttyä voi vähentää *E. coli* -utaretulehdusten riskiä, sen sijaan *S. aureus* -mastiitin riski kasvaa. *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia utaretulehduksia ilmaantuu eniten silloin, kun lehmän synnyntäisen puolustusjärjestelmän toiminta on heikentynyt esimerkiksi poikimisen tai maidontuotannon käynnistymisen takia (De Schepper ym. 2008).

Tutkimusten avulla on todettu, että koliformisten bakteereiden aiheuttamista utaretulehduksista 65 %:ssa tartunta on tapahtunut lehmän ummessa olon aikana ja kliininen infektio ilmaantunut heti maidontuotannon käynnistyttyä. (Smith ym. 1985.) Koliformisten bakteereiden aiheuttamia utaretulehduksia esiintyy eniten kesäkuukausina (Todhunter ym. 1991), koska tällöin myös bakteereiden määrät ovat suurimmillaan (Smith ym. 1985). Vanhemmilla ja useammin poikineilla lehmillä on yleisemmin *E. coli* -bakteerin aiheuttamia utaretulehduksia kuin yhden kerran poikineella lehmällä (Smith ym. 1985).

Lypsykarjan utaretulehdusten esiintyvyyden pienentäminen on hyvin tärkeää, koska ne vähentävät maidon määrää ja laatua. Lisäksi tulehdusten takia joudutaan käyttämään hyvin paljon antibiootteja, joiden käyttö vaikuttaa myös elintarvikkeiden laatuun ja turvallisuuteen. (Seegers ym. 2003.) Utaretulehdusriskin pienentämiseksi on yritetty vahvistaa lehmän omaa puolustusjärjestelmää (Yang ym. 2006). Koliformisten utaretulehdusten esiintyvyyden vähentäminen perustuu hygienian parantamiseen ja joissakin maissa käytettyyn lehmien profylaktiseen immunisaatioon (Suojala ym. 2008), optimaaliseen ravintoon ja jalostukseen (Green ym. 2004).

Koska *E. coli* -mastiitin vakavuus vaihtelee hyvin paljon eri lehmien välillä ja tämä vaihtelu perustuu osin lehmien erilaiseen geneettiseen taustaan, niin *E. coli* -mastiitin vähentäminen

jalostuksen kautta on perusteltua (Mitterhuemer ym. 2010). Alain ym. (2009) tutkimuksessa kokeellisen *E. coli* -altistuksen jälkeen nautojen somaattisista soluista löydettiin geenialleeleja, jotka liittyivät kykyyn vastustaa utaretulehdusta. Tällaisten alleelien lisääntyminen jalostuksen kautta lypsykarjoissa olisi erittäin hyödyllistä, ja vähentäisi antibioottien käyttöä (Alain ym. 2009) ja taloudellisia menetyksiä.

E. coli -utaretulehdusten esiintyvyyttä ja vakavuutta on saatu pienennettyä käyttämällä *E. coli* -bakteerin pinta-antigeenista valmistettua rokotetta (J5) (Wilson ym. 2009; Suojala ym. 2008; Wilson ym. 2007). Wilson ym. (2009) tutkimuksessa J5-rokotteen saaneet lehmät saivat rokotuksen jälkeisessä *E. coli* -utaretulehduksessa vähemmän vakavia taudinmuotoja kuin ilman rokotusta olleet lehmät. Lisäksi rokotettujen lehmien maidontuotanto ei pienentynyt yhtä paljon kuin rokottamattomien lehmien. (Wilson ym. 2009.)

2.5 Krooniset eli persistoivat *E. coli* -bakteereiden aiheuttamat utaretulehdukset

E. coli -bakteerit aiheuttavat yleensä lypsykarjalle akuutteja utaretulehduksia, jotka kestävät noin kymmenen vuorokautta tai vähemmän. *E. coli* -bakteerit voivat myös aiheuttaa kroonisia eli persistoivia utaretulehduksia, jotka kestävät yli kaksi kuukautta. (White ym. 2010.) Näiden persistoivien tulehdusten osuus vaikuttaisi olevan kasvussa (Taulukko 1.), mikä johtuu todennäköisesti *E. coli* -bakteereiden hankitusta kyvystä sopeutua ja lisääntyä utareessa (Passey ym. 2008). Tavallisesti persistoivat utaretulehdukset ovat oireiltaan lievempiä kuin akuutit tulehdukset (Dogan ym. 2006; Bradley & Green 2001; Döpfer ym. 1999), mutta Lehtolainen ym. (2003a) tutkimuksen mukaan akuuttien ja kroonisten *E. coli* -utaretulehdusten välillä ei ollut merkittävää eroa oireiden vakavuudessa.

TAULUKKO 1. Persistoivien *E. coli* -utaretulehdusten osuus kliinisistä utaretulehduksista.

Tutkimus	Persistoivien osuus	Genotyyppitys	Maa
Bradley & Green 2001	20,2 %	+	Englanti
Hogan ym. 1989	7,5 %	-	Englanti
Wilesmith ym. 1986	5,5 %	-	Englanti
Döpfer ym. 1999	4,8 %	+	Alankomaat
Lam ym. 1996	9,1 %	+	Yhdysvallat
Suojala ym. 2011	11,8 %	+	Suomi

Bradley & Green (2001) mukaan useat tutkimukset osoittavat *E. coli* -bakteereiden kyvyn jäädä persistoimaan naudan utarekudokseen, mutta tätä ilmiötä on kuitenkin pidetty melko harvinaisena ja kliinisesti merkityksettömänä. Heidän omat tutkimuksensa ovat osoittaneet, että *E. coli* -bakteerikannat voivat säilyä hengissä utareessa jopa yli 100 vuorokautta. Bradley & Green (2001) selvittivät 12 kuukauden ajan kuudella lypsytilalla esiintyneet kliiniset mastiitit. Heidän tutkimuksessa selvisi, että *E. coli* aiheutti 34,7 % utaretulehduksista ja 23,9 % infektioista uusiutui ja 85,7 % tapauksista infektion aiheuttajaksi todettiin genotyypiltään sama *E. coli* -kanta. Persistoivia utaretulehduksia oli siis 20,2 % kliinisistä *E. coli* -utaretulehduksista. (Bradley & Green 2001.)

Döpfer ym. (1999) tutkivat 300 hollantilaisen lypsytilan lehmien *E. coli* -bakteereiden aiheuttamat utaretulehdukset. Kaikille bakteerikannoille määritettiin genotyypit ERIC-PCR:n (ERIC-PCR, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences -PCR) avulla ja jos genotyypit olivat samat ensimmäisessä ja toisessa utaretulehduksessa, niin utaretulehdus luokiteltiin persistoivaksi. Tutkimuksessa havaittiin, että 13 % kaikista kliinisistä utaretulehduksista oli *E. coli* -bakteereiden aiheuttamia ja 4,8 % näistä tulehduksista todettiin persistoiviksi. (Döpfer ym. 1999.) Bradley & Green (2001) ja Döpfer ym. (1999) olettavat tutkimustensa perusteella, että toiset *E. coli* -kannat aiheuttavat todennäköisemmin persistoivia infektioita kuin toiset kannat.

Lipman ym. (1995a) tutkivat 30 utaretulehduksista eristettyjen *E. coli* -kannan serotyypit ja genotyypit. Tässä tutkimuksessa neljällä lehmällä utaretulehdus uusiutui ja sama bakteerikanta varmennettiin sero- ja genotyypityksellä. Tutkimuksensa perusteella he pystyivät todistamaan, että *E. coli* -bakteerit voivat jäädä persistoimaan naudan utarekudokseen.

Suojala ym. (2011) tutkimuksessa 11,8 % *E. coli* -mastiiteista oli persistoivia (n=144). Bean ym. (2004) tutkimuksessa havaittiin, että 68,8 % lehmistä (n=34) saivat uuden *E. coli* -bakteerin aiheuttaman utaretulehduksen. Suurimmassa osassa uusintainfektioissa aiheuttajaksi todettiin kuitenkin eri genotyyppi, joten bakteerit eivät jääneet persistoimaan vaan lehmä sairastui uudestaan (Bean ym. 2004).

Almeida ym. (2011) mukaan tutkimuksissa on havaittu, että osa utaretulehduksia aiheuttavista *E. coli* -kannoista pystyy paremmin aiheuttamaan persistoivia infektioita kuin toiset kannat.

Näiden kantojen on todettu kiinnittyvän paremmin utare-epiteelisoluihin ja pääsevän paremmin solujen sisään kuin kantojen, jotka on eristetty akuuteista mastiiteista. (Almeida ym. 2011.) Tutkimuksissa ei ole kuitenkaan löydetty mitään yhtä tekijää, joka selittäisi sen, miksi *E. coli* -bakteerin aiheuttama utaretulehdus jää joskus krooniseksi (Bean ym. 2004; Kaipainen ym. 2002).

Tutkijat ovat hyvin kiinnostuneita siitä, minkälaiset prosessit *E. coli* -utaretulehduksissa johtavat persistoiviin infektioihin ja mitkä bakteereiden eliminoitumiseen utareesta, koska persistoivien utaretulehdusten patogeneesin parempi tuntemus on ainoa mahdollisuus ehkäistä ja vähentää näitä lypsykarjan kiusallisia tulehduksia (White ym. 2010). Lypsytiloilla esiintyvien persistoivien *E. coli* -utaretulehdusten varmentaminen ja määrittäminen genotyyppityksellä on tärkeää, koska nämä tulehdukset eivät todennäköisesti reagoi tavallisiin hoitoihin ja aiheuttavat toistuvia utaretulehduksia naudoille (Döpfer ym. 2001).

2.6 Taudinaiheuttamiskyky

Patogeneesi on monivaiheinen prosessi, joka alkaa bakteerin kolonisoitumisella. Sen jälkeen bakteerin pitää selviytyä isännän immuunipuolustuksesta, lisääntyä ja aiheuttaa infektio (Kaper ym. 2004). Tavallisesti koliformiset bakteerit eivät pysty helposti kolonisoitumaan naudan vedinkanavaan, joten utaretulehduksia aiheuttavilla kannoilla täytyy olla tekijöitä, jotka avustavat niitä tässä invaasiossa (Hogan & Smith 2003). Lisäksi bakteereiden pitää selviytyä maidossa ja epiteelin pinnalla olevilta antimikrobisilta yhdisteiltä (Shpigel ym. 2008).

2.6.1 Virulenssitekijät ja virulenssigeenit

Lähes kaikki bakteereiden virulenssitekijät ovat bakteerin ulkopinnan rakenteita tai bakteerisolun erittämiä yhdisteitä (Finlay & Falkow 1997). *E. coli* -bakteerin virulenssitekijöitä on tutkittu melko laajasti ja utaretulehduksista eristetyillä *E. coli* -kannoilla on todettu olevan useita virulenssitekijöitä, mutta osalla kannoista ei ole löytynyt yhtään tunnettua virulenssigeeniä tai virulenssitekijää (Suojala ym. 2011; Ghanbarpour & Oswald 2010; Wenz ym. 2006; Bean ym. 2004; Nemeth ym. 2004; Kaipainen ym. 2002).

Virulenssitekijöiden avulla nämä opportunisteina pidetyt bakteerit voivat selviytyä ja lisääntyä utarerauhasessa. Utarerauhanen ei ole *E. coli* -bakteereiden luonnollinen elinympäristö, joten tulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla pitää esimerkiksi olla virulenssitekijöitä, joiden avulla ne voivat käyttää laktoosia energian lähteenä ja selviytyä anaerobisissa olosuhteissa, koska pääasiallinen hiilihydraatin lähde maidossa on laktoosi ja hapen osapaine utarerauhasessa on hyvin pieni. (Hogan & Smith 2003.)

Utaretulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kantojen patogeenisyyden on ajateltu perustuvan pääosin spesifisiin virulenssitekijöihin (Bean ym. 2004), joita ovat esimerkiksi adhesiinit (F17-, S- ja P-fimbria), invasiinit, toksiinit (ST, LT, STX, CNF1, CNF2), kolkisiini, V-antigeeni, K-antigeeni, kapseli, aerobaktiini, TraT, kyky tarttua soluihin (*eae*) (Vangroenweghe 2004), seerumiresistenssi ja kyky hankkia tarvitsemansa raudan (Lehtolainen ym. 2003a). Kuitenkin virulenssitekijöistä vain mastiittikantojen seerumiresistenssiä voidaan pitää merkittävänä (Nemeth ym. 1994) koska tutkimuksissa on todettu, että suurimmalla osalla (64 - 100 %) utaretulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla on seerumiresistenssi (Kaipainen ym. 2002). Taulukossa 2. esitetään utaretulehduksia aiheuttavien *E. coli* -bakteereiden tunnettuja ja mahdollisia virulenssitekijöitä ja niiden vaikutuskohteita.

Spesifiset virulenssitekijöitä koodittavat geenit kulkeutuvat *E. coli* -bakteereihin plasmidien, bakteriofaagien tai suurten DNA-segmenttien, joita kutsutaan patogeenisiksi saarekkeiksi (PAIs, Pathogenicity Islands), välityksellä (Dozois & Curtiss 1999). Näiden patogeenisten saarekkeiden avulla bakteerit voivat siirtää geneettistä materiaalia horisontaalisesti eri kantojen ja jopa eri lajien välillä (Girardeau ym. 2003). Dufour ym. (2011) vertailivat tutkimuksessaan vakavia utaretulehduksia aiheuttavaa *E. coli* P4 -kantaa ja ei-patogeenista *E. coli* K-12 -kantaa. Tutkijat havaitsivat, että molempien kantojen kuoreen liittyvät geenit olivat hyvin samanlaisia, mutta patogeenisen *E. coli* P4 -kannan genomisissa saarekkeissa havaittiin muuntuneita rakenteita (Dufour ym. 2011).

TAULUKKO 2. MPEC-bakteereiden mahdollisia virulenssitekijöitä ja vaikutuskohteita.

Virulenssitekijä	vaikutuskohde	viite
Adhesiinit		
F17-fimbriat (f17A)	Kiinnittymistekijä eli adhesiini	Lehtolainen ym. 2003a; Le Bouguenec & Bertin 1999
P-fimbria (<i>pap</i>)	Kiinnittymistekijä, indusoi sytokiinien ilmentymistä	Kaper ym. 2004
S-fimbria (<i>sfa</i>)	Kiinnittymistekijä	Ghanbarpour & Oswald 2010; Kaipainen ym. 2002
AfaE-8 (<i>afa-8</i>)	Afimbriaalinen kiinnittymistekijä, joka kohdistuu useisiin eri soluihin	Girardeau ym. 2003; Kaipainen ym. 2002
CS31A (<i>clpG</i>)	Kiinnittymistekijä	Ghanbarpour & Oswald 2010
Intimin (<i>eaeA</i>)	Proteiini, joka avustaa kiinnittymisessä soluihin	Wenz ym. 2006; Correa ja Marin 2002
Saa	Kiinnittymistekijä	Kaper ym. 2004
Curli	Kiinnittymistekijä, joka kiinnittyy fibronektiiniin	Kaper ym. 2004
Kapseli		
K (kapseliantigeenit)	Fagosytoosin esto	Kaper ym. 2004
Invasiinit		
IbeA,B,C (<i>Ibe10</i> ja <i>afaD</i>)	Invaasio	Kaper ym. 2004
Toksiinit		
LPS (Lipopolysakkaridit)	Endotoksiini, sytokiinien tuotto TLR4-reseptorin välityksellä	Kaper ym. 2004; Shuster ym.1993
ST1(heat-stable toxin, <i>east1</i>)	Enterotoksiini	Girardeau ym. 2003
LT (heat-labile toxin)	Enterotoksiini	
CNF1 ja CNF2 (cytotoxic necrotising factors)	Sytotoksiini, joka kohdistuu endoteelisoluihin	Wenz ym. 2006
Stx (Shiga toxin <i>slt1</i> ja <i>slt2</i>)	Toksiini, joka estää proteiinisynteesiä ja indusoi apoptoosia	Kaper ym. 2004
<i>HlyA</i>	Toksiini, joka hajottaa puna- ja valkosoluja	Kaper ym. 2004
Hemoglobiinia sitova proteiini (<i>Tsh</i>)	Hajottaa hemoglobiinia vapauttaakseen rautaa	Kaper ym. 2004
Sideroforit		
aerobaktiini(<i>iucA</i> , <i>iucB</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i>)	Raudansitomiskyky	Ghanbarpour & Oswald 2010; Nemeth ym. 1994
yersiniabaktiini	Raudansitomiskyky	Girardeau ym. 2003
Seerumiresistenssitekijät		
TraT (ulkomembraanin lipoproteiini, <i>TraT</i>)	Kyky vastustaa seerumin komplementti proteiineja	Kaipainen ym. 2002; Nemeth ym. 1994;1991

Kaipainen ym. (2002) tutkivat Suomesta (160 kantaa) ja Israelista (113 kantaa) *E. coli* -utaretulehduksista eristettyjen kantojen virulenssitekijöitä. Vähintään yksi virulenssigeeni löytyi 49 %:ssa suomalaisista ja 42 %:ssa israelilaisista kannoista. Yleisin virulenssigeeni oli *traT*, joka esiintyi Suomessa 37 %:ssa kannoista ja 41 %:ssa Israelilaisista kannoista, kaikki muut määritetyt virulenssigeenit olivat paljon harvinaisempia. Suuri osa suomalaisista *E. coli* -kannoista oli vastustuskykyisiä seerumille sen sijaan israelilaiset kannat olivat vähemmän vastustuskykyisiä seerumille. (Kaipainen ym. 2002.)

Lehtolainen ym. (2003a) tutkivat *E. coli* -utaretulehduksista eristettyjen bakteerikantojen virulenssitekijöitä ja utaretulehduksen kulkua. Suurimmalla osalla tutkituista bakteerikannoista oli useita virulenssitekijöitä, mutta tutkimuksessa havaittiin, että yksikään virulenssitekijä ei ollut suoraan yhteydessä utaretulehduksen vakavuuteen. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että persistoivia infektioita aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla oli yleensä S- ja P-fimbria, CNF1 tai CNF2.

Bean ym. (2004) tutkivat utaretulehdusmaidosta eristettyjen *E. coli* -bakteereiden (80 kantaa) virulenssigeenejä. Toksiinin muodostukseen liittyvä virulenssigeeni löytyi 30 kannalta ja yleisin havaittu virulenssigeeni oli *stx1* (31 %). Toiseksi yleisin virulenssigeeni oli *cnf2* (7,5 %) ja kolmanneksi yleisin *vt2e* (6,3 %). Tutkimuksessa ei kuitenkaan löytynyt mitään selvää yhteyttä tiettyjen virulenssigeenien ja lehmän kliinisten oireiden kanssa. Tutkimuksessa ei myöskään havaittu korrelaatiota *E. coli* -kantojen toksiininmuodostuskyvyn ja isännän taudinkuvan kanssa. Utarepatogeenisten *E. coli* -kantojen toksiinien muodostuskyky on ongelmallista, koska maito voi kontaminoitua toksiineilla ja sillä voi olla vaikutuksia kansanterveyteen. (Bean ym. 2004.)

Wenz ym. (2006) tutkimuksessa yritettiin selvittää oliko *E. coli* -kantojen (n=123) serotyypin sekä virulenssigeenien ja utaretulehduksen vakavuuden ja lypsytilan välillä korrelaatiota. Tutkimuksessa ei havaittu yhteyttä virulenssigeenien ja utaretulehduksen vakavuuden kanssa. Tutkimuksensa perusteella Wenz ym. (2006) uskovat, että utare-tulehduksia aiheuttaville *E. coli* -kannoille on tyypillistä suuri genotyyppien vaihtelu ja lehmään liittyvät tekijät määräävät utaretulehduksen vakavuuden.

Suojala ym. (2011) tutkivat utaretulehduksia aiheuttavien *E. coli* -kantojen virulenssitekijöitä, fylogeniaryhmiä ja antibioottiherkkyksiä. Heidän tutkimuksessa oli 144 bakteerikantaa, joista 10 kantaa oli persistoivia. Fylogeniaryhmään A kuului 119 kantaa ja 56 kannalla

havaittiin vähintään yksi virulenssigeeni. Tutkimuksessa todettiin, että bakteerikantojen fylogeniaryhmä, virulenssigeenit tai antibioottiresistenssi eivät ole yhteydessä lehmän utaretulehduksen vakavuuteen, persistoivuuteen tai taudista parantumiseen. (Suojala ym. 2011.)

Ghanbarpour & Oswald (2010) selvittivät 127 utaretulehduksista eristetyn *E. coli* -kannan fylogeniaryhmän ja virulenssigeenit. Heidän tutkimuksissaan selvisi, että 37 %:lla tutkituista kannoista oli vähintään yksi virulenssigeeni ja yleisin (20,47 %) virulenssigeeni oli *f17A*. Kahdella kolmasosalla *E. coli* -kannoista ei kuitenkaan ollut yhtään tutkituista virulenssigeeneistä. Fylogeniaryhmään A kuului 44,9 % *E. coli* -kannoista. B1 ryhmään kuului 38,6 % kannoista ja 16,5 % ryhmään D. Fylogeniaryhmään B2 ei kuulunut yhtään bakteerikantaa.

Lipman ym. (1995b) selvittivät Alankomaissa tehdyssä tutkimuksessa 20 utaretulehduksista eristetyn *E. coli* -kannan virulenssitekijöitä. F17 fimbria ja F17 adhesiini oli 11 kannalla, yksi kanta tuotti CNF-toksiinia, mutta yksikään tutkituista kannoista ei ilmentänyt LT, ST1 eikä verotoksiinigeenejä. Vaikka tutkimuksessa 55 %:lla kannoista löydettiin F17-fimbria, niin Lipman ym. (1995b) olivat kuitenkin sitä mieltä, että fimbriian tuotto ei välttämättä ole tärkeä virulenssitekijä *E. coli* -utaretulehduksen patogeenisissa.

2.6.2 Vedinkanavan läpäiseminen

E. coli -bakteereita esiintyy lypsykarjan elinympäristössä kaikkialla. Utaretulehduksen aiheuttava bakteeri voi olla peräisin maaperästä, kuivikkeista, lannasta tai mistä tahansa lehmää ympäröivästä orgaanisesta materiaalista (Hogan & Smith 2003). Kun lehmän vedinten pinnalle pääsee utarepatogeenisiä *E. coli* -bakteereita, niiden täytyy päästä vedinkanavaa pitkin maitotiehyisiin ja kiinnittyä tiehyiden epiteelisoluihin (Shpigel ym. 2008).

Naudan vedinkanava on kehittynyt rakenteeksi, joka estää tehokkaasti sekä maidon tihkumisen ja bakteerien sisäänpääsyn (Paulrud 2005). Vedinkanavan pintaa peittää ihoa muistuttava epiteeli (Paulrud 2005), jonka keratiinikerros toimii sekä kemiallisena että fysikaalisena esteenä bakteereiden utarekudokseen pääsyssä (Capuco ym. 1992, Zhao & Lacasse 2008 mukaan). Vedinkanavan epiteelisolut havaitsevat nopeasti ja tehokkaasti tunkeutujan ja alkavat tuottamaan sytokiinejä ja antimikrobisia peptidejä ja siksi

vedinkanavaa voidaankin pitää yhtenä merkittävimpänä infektiota suojaavana rakenteena (Rinaldi ym. 2010).

2.6.3 Lisääntyminen utarerauhasessa

Jos bakteerit onnistuvat lisääntymään ja välttämään isännän puolustusjärjestelmän toiminnot vedinkanavassa, ne voivat sen jälkeen kulkeutua vedinkanavaa pitkin utarerauhaseseen. Näiden anatomisten esteiden jälkeen bakteereiden pitää selviytyä myös utarerauhasen humoraalisesta ja soluvälitteisestä puolustusjärjestelmästä ja aiheuttaa utaretulehdus. (Sordillo & Streicher 2002, Zhao & Lacasse 2008 mukaan.)

E. coli -bakteereiden kiinnittymistä utarerauhasen epiteelikudokseen ei pidetä kovin merkittävänä *E. coli* -utaretulehduksen patogeenisissä, koska bakteerit pystyvät lisääntymään maidossa ilman, että ne ovat kiinnittyneet epiteelisoluihin. Mitä nopeammin *E. coli* -bakteerit pystyvät sopeutumaan uuteen ympäristöön utarerauhasessa, sitä nopeammin ne lisääntyvät ja voivat aiheuttaa tulehduksen. Tämä bakteereiden lisääntymiskyky utareessa on hyvin merkittävä tekijä *E. coli* -bakteereiden aiheuttamassa utaretulehduksessa. (Hogan & Smith 2003.)

E. coli -utaretulehduksen syntyyn ja lehmän puolustusjärjestelmän aktivointiin voi riittää vain noin 50 bakteeria (Shpigel ym. 2008). Kornalijnslijper ym. (2004) tutkimuksessa kaikki 36 lehmää sairastuivat utaretulehdukseen, kun utareeseen infusoitiin vain 30 - 50 *E. coli* -bakteeria. Tässä tutkimuksessa lehmillä havaittiin hyvin eriasteisia paikallisia ja systeemisiä oireita (Kornalijnslijper ym. 2004). Kaikki altistetut neljännekset tulehtuivat tutkimuksissa, joissa lehmille aiheutettiin kokeellinen *E. coli* -utaretulehdus 50 - 1500 *E. coli* -bakteerilla. (Rinaldi ym. 2010; Petzl ym. 2008; Suojala ym. 2008; Yang ym. 2008; Bannerman ym. 2004; Kornalijnslijper ym. 2004; Kutila ym. 2004; Shpigel ym. 1997.) Kokeellisten *E. coli* -utaretulehdusten on todettu vastaavan luonnollisesti lehmillä esiintyviä infektiota (Shpigel ym. 1997).

2.6.4 Naudan puolustusjärjestelmältä suojautuminen

Lehmän tärkein puolustusreaktio *E. coli* -utaretulehduksessa on bakteereiden eliminointi PMN-solujen fagosytoosin avulla (Smits ym. 2000). Joillakin *E. coli* -bakteereilla näyttäisi

olevan sellaisia virulenssitekijöitä (kapseli), joiden avulla ne voivat selviytyä PMN-solujen vaikutuksilta. Lisäksi osalla bakteereista on sellaisia pinta-antigenejä, jotka estävät fagosytoosia. (Hogan & Smith 2003.) Hill ym. (1983) tutkimuksen mukaan *E. coli* -kannat, jotka muodostavat ympärilleen kapselin, pystyvät tehokkaasti vastustamaan fagosytoosia. Nämä kannat aiheuttavat myös todennäköisemmin pitkäkestoisempia utaretulehduksia kuin kannat, jotka eivät muodosta kapselia (Hogan & Smith 2003).

2.6.5 Utarekudoksen vaurioituminen

Vakavissa kliinisissä *E. coli* -utaretulehduksissa esiintyy nekroosia utarerauhastiehyiden epiteelissä ja lievempien tulehdusten yhteydessä havaitaan usein pienempiä alveolaarisen kudoksen tuhoutumista (Zhao & Lacasse 2008). Frost ym. (1980) mukaan utarerauhasen muutokset olivat pinnallisia, eikä havaittu vakavia muutoksia erittävässä kudoksessa (Zhao & Lacasse 2008). Hyvin vakavissa *E. coli* -utaretulehduksissa rauhaskudoksen tuhoutuminen voi olla niin suurta, että lehmä kuolee muutamassa tunnissa verenmyrkytykseen (sepsis) (Burvenich ym. 2003).

3 LEHMÄN PUOLUSTUSJÄRJESTELMÄN TOIMINTA *E. COLI* -UTARETULEHDUKSESSA

Taudinaiheuttajabakteereiden invaasio laukaisee isännässä sekä synnynnäisen että hankitun puolustusjärjestelmän toiminnan, mutta taistelusta tautia vastaan vastaa aluksi synnynnäinen puolustusjärjestelmä. Tämän tehtävänä on havaita taudinaiheuttajat ja käynnistää nopeasti puolustustoiminnot. Tärkeimpiä soluja luontaisessa puolustuksessa ovat veren valkosolut kuten PMN-solut ja makrofaagit. Näiden solujen tarkoituksena on fagosytoida ja tuhota patogeeniset bakteerit. (Aderem & Ulevitch 2000.)

PMN-solut vastaavat lopullisesta bakteereiden eliminoinnista ja jos niiden toiminta on tehotonta, tulehdus voi muuttua hyvin vakavaksi (Burvenich ym. 2003). Normaalisti PMN-solujen lukumäärä maidossa on melko vähäinen, joten solujen tehokas siirtyminen verenkierrosta tulehduspaikalle on hyvin tärkeää (Smits ym. 2000). Tiedonsiirto solujen välillä tapahtuu tulehdusta välittävien sytokiinien ja kemokiinien avustuksella (Aderem & Ulevitch 2000).

Utare-epiteelisolut ovat myös hyvin keskeisessä asemassa synnynnäisessä puolustautumisessa mikro-organismeja vastaan (Wellnitz ym. 2006). Epiteelisolut havaitsevat ja tunnistavat spesifisten reseptoreidensa avulla tunkeutujat (Ibeagha-Awemu ym. 2008) ja käynnistävät tarkoituksenmukaisen sytokiinien ja akuutin faasin proteiinien valmistuksen, joiden tarkoituksena on välittää ja säädellä immuunipuolustusreaktioita (Wellnitz ym. 2006). Rinaldi ym. (2010) mukaan *E. coli* -utaretulehduksessa keskeisiä puolustusjärjestelmän soluja ovat sekä verenkierrossa olevat immuunijärjestelmän solut että utarekudoksen solut, koska kaikki nämä solut tunnistavat utareeseen tunkeutuvia patogeeneja, tuottavat tulehdusta välittäviä yhdisteitä ja vaikuttavat taudinkulkuun.

3.1 Immuunipuolustusreaktiot

E. coli -bakteerin uloimman solukalvon endotoksiinien eli LPS:n (LPS, LipoPolySaccharide) (Stenutz ym. 2006) ajatellaan aiheuttavan lähes kaikki lehmässä tapahtuvat patofysiologiset reaktiot *E. coli* -mastiitissa (Burvenich ym. 2003). Lipopolysakkaridit saavat aikaan tulehdusreaktiota välittävien sytokiinien tuotannon monosyyteissä ja makrofaageissa. Sytokiinit aiheuttavat akuutin faasin proteiinien valmistuksen ja akuutin faasin reaktion (APR Acute Phase Response). (Suojala ym. 2008.) Näiden proteiinien tehtävänä on sitoa

kudosvauriossa syntyneitä haitallisia molekyyliä ja näin vähentää kudostuhon etenemistä. Lisäksi akuutin faasin proteiinien tehtävänä on avustaa taudinaiheuttajan eliminoinnissa. (Baumann & Gauldie 1994, Salonen ym. 1996 mukaan.) Tulehdusreaktiota ilmentäviä akuutin faasin proteiineja ovat esimerkiksi haptoglobiini (Hp, Haptoglobin), seerumin amyloidi A (SAA, Serum Amyloid A) ja lipopolysakkarideja sitova proteiini (LBP, Lipopolysaccharide Binding Protein) (Suojala ym. 2008).

Gram-negatiivisten (*E. coli*) bakteereiden lipopolysakkaridit sitoutuvat ja aktivoivat utareepiteelisolujen TL-reseptoreita, joista tärkein on Toll-like receptor 4 (TLR-4) (Ibeagha-Awemu ym. 2008). Lipopolysakkaridien Lipoteiini-A on luonnollinen ligandi TLR-4 -reseptorille (Yang ym. 2006). Utareepiteelisolujen lisäksi TL-reseptoreita ilmennetään myös monissa puolustusjärjestelmän soluissa esimerkiksi makrofaageissa ja neutrofiileissa (Takeda & Akira 2005). Utareepiteelisolujen läheisyyteen päässeet LPS:t havaitaan lipopolysakkarideja sitovan proteiinin avulla, joka kuljettaa LPS:t reseptorikompleksiin, joka koostuu kolmesta osasta: CD14/MD-2/TLR-4. Kun LPS sitoutuu tähän reseptorikompleksiin, käynnistyy signaalinvälitysketju, jonka tuloksena erittyy soluista tulehdusreaktiota välittäviä sytokiineja ja kemokiineja. (Ibeagha-Awemu ym. 2008; Takeda & Akira 2005.)

Sytokiinit vaikuttavat PMN-soluihin aktivoimalla niitä ja houkuttelemalla niitä paikalle. Näiden solujen tehtävänä on fagosytoida ja tappaa tunkeutujat (White ym. 2010). Utarekudoksessa tulehdusreaktiota välittäviä tunnettuja sytokiineja ovat esimerkiksi interleukiinit ja TNF- α (Waller ym. 2003). TNF- α :aa pidetään hyvin merkittävänä sytokiinina ja se on vastuussa akuutin faasin reaktiosta (Riollet ym. 2000). Toisena tärkeänä sytokiinina pidetään interleukiini-8:aa (IL-8), joka vastaa pääasiallisesti PMN-solujen saapumisesta tulehduspaikalle (Shuster ym. 1997). Muita PMN-soluja tulehduspaikalle houkuttelevia välittäjä-aineita ovat interleukiini-1 β (IL-1 β) (Riollet ym. 2000) ja komplementti tekijä C5a (Complement fragment), joka voi olla jopa tärkeämpi solujen houkuttelija kuin IL-8 (Shuster ym. 1997).

3.2 Tutkimuksia *E. coli* -utaretulehduksen immuunipuolustuksesta

E. coli -bakteereiden aiheuttamia immuunipuolustusreaktioita on tutkittu suhteellisen paljon. Lehmän immuunipuolustuksen toimintaa on tutkittu sekä *in vivo*- että *in vitro* -tutkimuksissa. Tutkimustulokset ovat olleet osin samanlaisia, mutta myös erilaisia tuloksia on saatu.

3.2.1 *In vivo* -tutkimuksia

Petzl ym. (2008) selvittivät tutkimuksessaan, että *E. coli* -utaretulehduksessa TLR2, TLR4 ja β -defensiinien ilmentyminen lisääntyi utareessa ja utarekudoksen imusolmukkeissa. Yang ym. (2008) tutkimuksessa todettiin, että *E. coli* altistus aktivoi utare-epiteelisolujen TLR2- ja TLR4-reseptoreita ja lisäsi IL-8, TNF- α ja NF κ B -tuotantoa.

Waller ym. (2003) mukaan useissa eri tutkimuksissa, joissa kokeellinen utaretulehdus oli aiheutettu *E. coli* -bakteerin endotoksiinilla (LPS), sytokiinien luokat vaihtelivat paljon. Heidän oma tutkimus osoitti, että IL-8 on keskeinen välittäjämolekyylit neutrofiilien houkuttelussa utareeseen. Mutta tässä tutkimuksessa IL-1 β ja TNF- α eivät vaikuttaneet olevan kovin merkittävässä roolissa.

3.2.2 *In vitro* -tutkimuksia

Wellnitz ym. (2006) käyttivät maidosta eristetyistä epiteelisoluista tehtyä primaarista utare-epiteelisoluviljelmää, kun he tutkivat epiteelisolujen immuunivastetta eri utaretulehduspatogeeneille. *E. coli* -altistuksen jälkeen utare-epiteelisolut ilmensivät lisääntyneitä määriä IL-8, IL-6, TNF- α ja SAA-mRNA:ta. IL-8 -mRNA -pitoisuus nousi jo hyvin pian (1h) altistuksen jälkeen.

Strandberg ym. (2005) tutkivat synnynnäisen puolustusjärjestelmän vastetta altistamalla sekä primaarisia utare-epiteelisoluja että MAC-T -soluja LPS:lla. Jo 2-4 tunnin päästä altistuksesta solut ilmensivät lisääntyneitä määriä IL-1 β , IL-8, TNF- α , CXCL6 ja β -defensiinin -mRNA:ta, mutta ilmentyminen lisääntyi huomattavasti enemmän primaarisissa utare-epiteelisoluissa kuin MAC-T -soluissa (Strandberg ym. 2005).

Lahouassa ym. (2007) tekivät *in vitro* utare-epiteelisolujen *E. coli* altistuskokeita, joissa todettiin, että sytokiinien IL-1 β , TNF- α , IL-8 ja GRO- α (Growth Related Oncogene alpha) geenien ilmentyminen ja proteiinien tuotto lisääntyi verrattaessa käsittelemättömiin soluihin. Tutkimuksessa havaittiin myös, että utare-epiteelisolut tuottivat neutrofiilejä houkuttelevia kemokiineja ja tulehdusreaktiota välittäviä sytokiineja. Heidän tutkimuksensa osoitti selvästi, että utare-epiteelisolut osallistuvat aktiivisesti immuunipuolustukseen. (Lahouassa ym. 2007.)

4 SOLUMALLIEN KÄYTTÖ JA SOVELTUVUUS

Utare-epiteelisolumalleja hyödynnetään paljon utaretulehduksia aiheuttavien bakteereiden virulenssin ja patogeenesisen tutkimisessa. *In vitro* -tutkimuksissa käytetään sekä primaarisia että klonaalaisia solulinjoja, ja tämä vaikeuttaa merkittävästi tutkimustulosten vertailua. Solumalleilla on tutkittu useiden lehmästä toiseen tarttuvien bakteereiden (*S. aureus*, KNS, *Str. dysgalactiae*) ja ympäristöperäisten bakteereiden (*Str. uberis*, *E. coli*) patogeenisia.

Utare-epiteelisolut ovat paras ja soveltuvin solumalli, kun halutaan mallintaa naudan terveeseen utareen epiteelisoluja (Yang ym. 2008). Solut edustavat hyvin lehmän immuunipuolustusjärjestelmän toimintaa ja ne pystyvät ilmentämään bakteeristimulaation jälkeen esimerkiksi antibakteerista β -defensiiniä (Yang ym. 2008; Yang ym. 2006). Yang ym. (2008, 2006) tutkivat tulehdusreaktiota välittävien sytokiinien ilmentymistä sekä utare-epiteelisolumallilla (pbMEC) että aiheuttamalla lehmille kokeellisia utaretulehduksia. Näiden tutkimustensa perusteella he havaitsivat, että utare-epiteelisolumalli oli sopiva näihin tutkimuksiin ja tutkimusten tulokset olivat samankaltaiset. (Yang ym. 2008; Yang ym. 2006.)

Tamilselvam ym. (2006) tutkivat *Str. uberis* -bakteereiden invaasiota utare-epiteelisoluihin (MAC-T) ja bakteereiden solunsisäistä selviytymistä. Bakterikannat (n=2) invasoituivat ja selviytyivät hengissä utare-epiteelisolujen sisällä 120 tuntia (Tamilselvam ym. 2006). Almeida ym. (1999) tutkivat glykosaminoglykaanien (GAG, glycosaminoglycans) vaikutusta *S. uberis* -bakteereiden utare-epiteelisoluihin (MAC-T) adheesitumiseen ja invasoitumiseen. Tutkimus osoitti selvästi, että jos epiteelisolujen pinnan GAG:it poistetaan tai niiden toiminta estetään, niin *S. uberis* -bakteereiden adheesio ja invaasio soluihin vähenee merkittävästi (Almeida ym. 1999).

Song ym. (2004) tutkivat *Str. dysgalactiae* -bakteereiden Mig-proteiinin vaikutusta kiinnittymiseen ja invasoitumiseen utare-epiteelisoluihin (MAC-T). Mig-proteiini ei vaikuttanut bakteereiden adheesioon, mutta sen läsnäolo lisäsi bakterikannan invaasiota (Song ym. 2004). Calvinho & Oliver (1998) tutkivat *Str. dysgalactiae* -bakteereiden adheesiota sekä primaarisiin naudan utare-epiteelisoluihin että transformoituun utare-epiteelisolulinjaan. Bakteerit kiinnittyivät paremmin transformoituun solulinjaan kuin primaarisiin utare-epiteelisoluihin (Calvinho & Oliver 1998).

Takamatsu ym. (2008) selvittivät tutkimuksellaan SraP:n eli *Staphylococcus aureus* -bakteerin pintaproteiinin merkitystä bakteereiden kiinnittymiseen utare-epiteelisoluihin (BMEC) ja he totesivat, että SraP ei ollut merkittävä tekijä adheesiossa. Hensen ym. (2000) tutkivat *S. aureus* -bakteereiden adheesiota ja invaasiota primaarisiin naudan utare-epiteelisoluihin. Tutkimuksessa käytettiin 20 eri *S. aureus* -kanta ja todettiin, että adheesio ja invaasio vaihtelivat kantojen välillä (Hensen ym. 2000).

Hyvönen ym. (2009) tutkivat koagulaasi-negatiivisten stafylokokkien adheesiota ja invaasiota utare-epiteelisoluihin (BMEC). Lisäksi he tutkivat bakteereiden lisääntymistä utare-epiteelisoluissa ja laktoferriinin vaikutusta patogeneesin vaiheisiin. Tutkimuksen mukaan KNS-kannat kiinnittyivät soluihin samankaltaisesti, mutta invaasio vaihteli paljon kantojen välillä. Laktoferriini ei juuri vaikuttanut adheesioon ja invaasioon, mutta bakteerikantojen solun sisäinen lisääntyminen vähentyi laktoferriinin vaikutuksesta merkittävästi. (Hyvönen ym. 2009.)

E. coli -utaretulehduksen *in vitro* -tutkimuksissa on käytetty paljon sekä primaarisia naudan utare-epiteelisoluja (pbMEC, primary bovine Mammary Epithelial Cell) (Günther ym. 2011; Günther ym. 2010; Günther ym. 2009; Yang ym. 2008; Lahouassa ym. 2007; Yang ym. 2006; Wellnitz ym. 2006; Strandberg ym. 2005; Döpfer ym. 2001; Lammers ym. 2001; Harper ym. 1978), MAC-T -solulinjaa (Almeida ym 2011; Ibeagha-Awemu ym. 2008; Strandberg ym. 2005; Döpfer ym. 2000) ja BME-UV -solulinjaa (Pecorini ym. 2010).

4.1 Primaariset solulinjat

Tutkimuksissa käytettyjä primaarisia solulinjoja on valmistettu monella eri tavalla. Döpfer ym. (2001) käyttivät solulinjaa, joka oli valmistettu persistoivasta utaretulehduksesta eristetystä utarekudoksesta. Passey ym. (2008) sen sijaan valmistivat käyttämänsä primaarisen utare-epiteelisolulinjan terveiden nautojen utarekudoksesta. Wellnitz ym. (2006) valmistivat primaarisen utare-epiteelisolulinjan siten, että epiteelisolut eristettiin terveiden nautojen maidosta.

Strandberg ym. (2005) valmistivat primaarisen utare-epiteelisolulinjan utarebiopsioista nautojen maidontuotannon aikana. Epiteelisolut eristettiin biopsioista kollagenaasidigestion avulla. Aluksi solut muodostivat yksikerroksisen soluviljelmän, joka näytti

mukulakivimäiseltä ja kolmen vuorokauden päästä solut muodostivat epiteelisolusaarekkeita. Kun soluja kasvatettiin vielä neljä vuorokautta, viljelmän keskelle muodostui tiheä solumassa. (Strandberg ym. 2005.) Nämä solulinjan morfologiset piirteet vastasivat hyvin aikaisempia kokemuksia utare-epiteelisolujen kasvusta kollageenipinnalla (Cifrian ym. 1994).

Primaaristen utare-epiteelisolulinjojen on todettu olevan hyviä solumalleja, kun tutkitaan solujen immuunivastetta eri utaretulehduspatogeenille (Wellnitz ym. 2006). Strandberg ym. (2005) tutkimus osoitti, että primaariset utare-epiteelisolut reagoivat tehokkaasti ja ilmentävät lisääntyneitä määriä muun muassa sytokiineja ja β -defensiiniä LPS-altistuksen jälkeen. Tässä tutkimuksessa klonaalisten MAC-T -solujen vaste oli huomattavasti heikompi (Strandberg ym. 2005). Günther ym. (2011, 2010) mukaan primaarisia naudan utare-epiteelisoluja voidaan pitää käyttökelpoisena solumallina, kun tutkitaan utareen immuunipuolustusjärjestelmän molekulaarisia perusteita. Günther ym. (2009) tutkimus osoitti, että naudan primaariset utare-epiteelisolut kykenevät ilmentämään puolustusjärjestelmän sekä puolustavia että toiminnallisia geenejä LPS-stimulaation jälkeen.

4.2 Klonaaliset solulinjat

Klonaalisten solulinjojen käytön etuja on se, että solulinjat pysyvät pitkiä aikoja muuttumattomina ja ne ovat hyvin karakterisoituja. Lisäksi tutkimustulosten vertailu on helpompaa, jos eri tutkimuksissa on käytetty samaa alkuperää olevaa klonaalista solulinjaa.

4.2.1 MACT-T -solulinja

MAC-T -solulinjaa pidetään solulinjana, joka vastaa hyvin naudan utareen soluja (Wang & Baumrucker 2010; Zhou ym. 2008; Huynh ym. 1991). MAC-T -solut ovat hyvin erikoistuneita utare-epiteelisoluja ja niille on tyypillistä, että ne tuottavat maidon proteiineja ja laktoosia. Nämä solut reagoivat hyvin laktogeenisiin hormoneihin (Huynh ym. 1991) ja insuliinin kaltaiseen kasvutekijä 1:een (IGF-1, Insulin like Growth Factor -1) (Zhou ym. 2008).

Huynh ym. (1991) tekivät naudan utare-epiteeli solulinjan (MAC-T), joka valmistettiin kloonaamalla primaarisia naudan utare-alveolien epiteelisoluja. Solut transfektoitiin pysyvästi simian virus 40:en (SV40) suurella T-antigeenilla. Nämä MAC-T -solut jakaantuivat

keskimäärin 17 tunnissa ja niitä voitiin jakaa yli 350 kertaa ilman, että niissä huomattiin mitään muutoksia. Kun soluja kasvatettiin muovisella alustalla, ne muodostivat tunnusomaisia ”mukulakivi”-muodostelmia. Solujen erilaistuminen saatiin aikaiseksi kasvattamalla soluja prolaktiinia sisältävässä kollageenigeelissä, jolloin solujen väliset vuorovaikutukset kasvoivat. Erilaistuneet solut karakterisoitiin tutkimalla, oliko niissä lisääntyneitä määriä β -kaseiinin lähetti-RNA:ta, suurentuneita kaseiinia erittäviä vesikkeleitä sekä α_s - ja β -kaseiinin eritystä. Tämän MAC-T -solulinjan tekee ainutlaatuisiksi solujen kuolemattomuus, kyky erilaistua ja tuottaa kaseiinia. (Huynh ym. 1991.)

4.2.2 BME-UV -solulinjat

BME-UV -solulinjat on johdettu MAC-T -solulinjasta (Wang & Baumrucker 2010) ja nämä solulinjat ovat käyttökelpoisia solumalleja tutkittaessa naudan utare-epiteelin kasvua, erilaistumista ja solujen välisiä viestejä (Zavizion ym. 1996).

Klonaalinen utare-epiteelisolulinja BME-UV on tehty transfektoimalla primaarisia epiteelisoluja pysyvästi plasmidilla, jossa on simian virus 40:n varhainen mutaatio *tsA58* joka koodittaa lämpölabiilia suurta T-antigeeniä. BME-UV soluissa on tyypillisesti mikrovilluksia, desmosomeja ja monia biokemiallisia utare-epiteelisoluille tyypillisiä yhdisteitä kuten useita erilaisia keratiineja. Nämä solut pystyvät valmistamaan pieniä määriä maidossa olevia proteiineja kuten α -lactalbumiinia ja α S1-kaseiinia. Kun BME-UV -solut kasvavat harvana kasvustona kollageenin päällä, ne voivat kasvattaa pitkiä projektioita, joiden avulla myös kaukana toisistaan olevat solut voivat olla keskenään vuorovaikutuksessa. (Zavizion ym. 1996.)

BME-UV1, yksi näistä BME-UV -solulinjoista on osoittautunut erityisen vakaaksi ja se pysyy samanlaisena useiden solunjakautumisten ajan, kun läsnä on epidermaalaisia kasvutekijöitä (EGF, Epidermal Growth Factor) ja IGF-1:tä. Tämä solulinja on ainut naudan utare-epiteelisolulinja, joka reagoi EGF:iin (Zavizion ym. 1996), mutta useat utare-epiteelisolulinjat reagoivat IGF-1:een (Zhou ym. 2008).

Wang & Baumrucker (2010) käyttivät BME-UV1 -solulinjaa, kun he tutkivat ja vertailivat retinoidien, retinoidianalogien ja naudan laktoferrinin vaikutusta soluihin ja solujen elinkykyisyyteen. Pecorini ym. (2010) käyttivät solumallina BME-UV1 -solulinjaa, kun he

tutkivat naudan laktoferriinin ehkäisevää vaikutusta gram-negatiivisten bakteereiden lipopolysakkarideja vastaan. Caruso ym. (2009) Käyttivät BME-UV1 -solulinjaa, kun he tutkivat naudan utare-epiteelin biotransformaatiokykyä.

4.4 Adheesio

Bakteereiden kiinnittymistä isännän solujen pintaan pidetään yhtenä merkittävimpänä vaiheena taudin syntymiselle (Döpfer ym. 2000; Finlay & Falkow 1997) ja siksi patogeenisten bakteereiden adheesiota kohdesoluihin on tutkittu hyvin paljon. Tutkimusten avulla on selvitetty, että merkittäviä molekyylejä kiinnittymisessä ovat kiinnittymistekijät eli adhesiinit. Kaikki adhesiinit eivät kuitenkaan ole aina bakteerin tärkeitä virulenssitekijöitä ja adhesiinien spesifistä roolia adheesiossa on vaikea määrittää, koska yleensä patogeenisilla bakteereilla on useita tekijöitä, jotka avustavat bakteerin adheesiossa. (Finlay & Falkow 1997.) *E. coli* -kannoilta, jotka aiheuttavat tauteja naudoille, on löydetty useita eri adhesiineja (Ghanbarpour & Oswald 2010), esimerkiksi F17-fimbria -perhe, johon kuuluvat F17a-A, F17b-A, F17c-A ja F17d-A (Le Bouguenec & Bertin 1999) ja P- ja S-fimbriat sekä afimbriaalisia adhesiineja (afaE-8) (Girardeau ym. 2003).

Useissa *in vitro* -tutkimuksissa utarepatogeenit ovat kiinnittyneet utare-epiteelisoluihin (Lammers ym. 2001) ja sen takia on ajateltu, että bakteereiden pitää kiinnittyä epiteelisoluihin, jotta ne voivat kolonisoitua utareeseen (Sutra & Poutrel 1994). Myös *E. coli* -bakteerit kiinnittyvät *in vitro* utare-epiteelisoluihin, mutta adheesio ei kuitenkaan ajatella olevan tärkeä tekijä kliinisen *E. coli* -utaretulehduksen patogeenisyydessä (Opdebeeck ym. 1988). Sen sijaan suolistotulehduksia aiheuttaville EPEC-kannoille adheesio isäntäsoluun mahdollistaa taudin syntymisen (Döpfer ym. 2000). Myös *S. aureus* -bakteereiden aiheuttamissa utaretulehduksissa adheesio on todettu olevan hyvin tärkeä virulenssitekijä (Hill 1994, Riollet ym. 2000 mukaan), mutta *E. coli* -bakteerit voivat lisääntyä hyvin myös maidossa ilman, että ne kiinnittyvät epiteelisoluihin ja aiheuttavat utaretulehduksen.

Döpfer ym. (2000) selvittivät, että utaretulehduksista eristetyt *E. coli* -kannat adheesioituivat hyvin epätasaisesti utare-epiteelisoluihin (MAC-T) ja osaan soluista ei kiinnittynyt lainkaan bakteereita. Lammers ym. (2001) tutkimuksessa selvisi, että *E. coli* -kantojen adheesio tehokkuus ja spesifisyys vaihtelee paljon kantojen välillä ja kiinnittyminen ei liity fibronectiiniin.

4.5 Invaasio

Useat patogeeniset bakteerit pystyvät tunkeutumaan eukaryoottisolujen sisään ja selviytymään hengissä solun sisällä. Bakteerit käyttävät invaasioon yleensä suoraa solun sisäänmenoa tai fagosytoosia. Fagosytoosissa bakteerit menevät aktiivisesti monimutkaisten mekanismien avustamana esimerkiksi makrofaagien sisään, selviytyvät solun sisällä hengissä ja pystyvät lisääntymään ja aiheuttamaan taudin. Sen sijaan osa patogeeneista tunkeutuu suoraan kohdesoluun esimerkiksi limakalvon epiteelisoluihin tai verisuonen endoteelisoluihin. Tällainen invaasiomekanismi mahdollistaa sen, että patogeeni on heti suojassa isännän puolustusmekanismeilta ja voi tällöin lisääntyä ja jäädä persistoimaan. (Finlay & Falkow 1997.)

Bakteerit, jotka kykenevät tunkeutumaan eukaryoottisolujen sisään, kiinnittyvät adhesiinien avulla soluihin. Tämä bakteereiden kiinnittyminen yleensä aktivoi myös isäntäsolun siten, että bakteereiden sisäänpääsy helpottuu. Invaasio on aktiivinen tapahtuma, jossa bakteerit hyödyntävät solun normaaleja toimintoja ja pääsevät isäntäsolun sisään solutukirangan osasten (aktiinifilamentit, mikrotubulukset) avulla. Sisäänpääsyn jälkeen bakteerit menevät kalvon muodostaman vakuolin sisään, ja pysyvät sen sisällä tai poistuvat vakuolista, riippuen kunkin bakteerin selviytymisstrategiasta. (Finlay & Falkow 1997.)

Eukaryoottisolulinjoja käytetään paljon bakteereiden invaasiotutkimuksissa, koska ne ovat suhteellisen yksinkertaisia malleja infektion tutkimiseen. Kuitenkin vain muutama solulinja vastaa hyvin lähtökudosta. Polarisoituja solulinjoja on käytetty kuvaamaan paremmin luonnollisia epiteelin peittämiä pintoja, koska niissä on apikaalinen ja basolateraalinen solupinta tiiviillä liitoksella erotettuna. Kaikilla solumalleilla on kuitenkin rajoituksensa ja polarisoiduistakin soluviljelmistä puuttuu monia isännän tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa invaasioon, esimerkiksi limakalvo, vasta-aineet, sytokiinit ja puolustusjärjestelmän solut. Rajoituksista huolimatta solumallien avulla saadaan paljon hyödyllistä tietoa bakteereiden invasoitumisesta isäntäsoluihin. (Finlay & Falkow 1997.)

Utaretulehduksia aiheuttavia *E. coli* -kantoja on pidetty kykenemättöminä menemään utareepiteelisolujen sisään (Döpfer ym. 1999), myöhemmin kantojen invaasio utaresoluihin on todistettu *in vitro* -tutkimuksissa, mutta invaasiomekanismeja ja solunsisäisiä prosesseja on tutkittu hyvin vähän (Passey ym. 2008). Passey ym. (2008) totesivat *in vitro* -solumallilla, että *E. coli* -bakteereiden invaasio solujen sisään ei vaadi solun tukirangan aktiinifilamenttien

uudelleen järjestäytymistä, vaan solunsisäiset bakteerit ovat endosomaalisen solukalvon ympäröimiä. *E. coli* -bakteereiden solun sisäänkäynti perustuu siis endosytoosiin (Passey ym. 2008). Sen sijaan Dogan ym. (2006) tutkimus osoitti, että *E. coli* -bakteereiden invaasio utare-epiteelisoluihin estyy hyvin merkittävästi kun läsnä on solun tukirankaa häiritseviä yhdisteitä kuten sytokalaniini D:tä ja kolkisiinia.

4.6 Solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen

Bakteereiden tehokas lisääntyminen on yleensä keskeinen tekijä tulehduksen synnylle. Useat patogeeniset bakteerit ovat kehittäneet hyviä menetelmiä, joiden avulla ne voivat selviytyä ja lisääntyä esimerkiksi isännän fagosytoivissa soluissa. Joidenkin patogeenisten bakteereiden solunsisäiset selviytymisstrategiat on selvitetty hyvin tarkasti, mutta useiden bakteereiden selviytymismekanismeja ei vielä tunneta tarpeeksi hyvin. (Finlay & Falkow 1997.)

E. coli -bakteereiden selviytymistä ja lisääntymistä utare-epiteelisoluissa on tutkittu melko vähän. Dogan ym. (2006) tutkivat bakteerikantojen solun sisäistä selviytymistä 24 ja 48 tunnin ajan. Heidän tutkimuksessa kaikki persistoivista utaretulehduksista eristetyt kannat ja yksi transientti kanta säilyivät hengissä 48 tunnin ajan ja bakteereiden lukumäärät kaksinkertaistuivat. Almeida ym. (2011) tutkivat *E. coli* -kantojen (2 kpl) kykyä selviytyä utare-epiteelisoluissa 24, 48, 72, 96 ja 120 tuntia. Persistoivan *E. coli* -kannan eläviä bakteereita löydettiin utare-epiteelisoluissa vielä 120 tunnin päästä altistuksesta. Transientin *E. coli* -kannan bakteereita havaittiin soluissa vielä 72 tunnin jälkeen, mutta 96 tunnin jälkeen soluissa ei ollut enää lainkaan bakteereita.

5 PERSISTOIVAT *E. COLI* -KANNAT SOLUMALLISSA

Kroonisia eli persistoivia *E. coli* -bakteerin aiheuttamia utaretulehduksia on tutkittu suhteellisen vähän. Muutamien epidemiologisten utaretulehduspatogeenien kartoitustutkimusten yhteydessä on selvitetty *E. coli* -utaretulehdusten persistoivuutta. Akuuteista ja persistoivista utaretulehduksia eristettyjen *E. coli* -bakteereiden adheesiota utare-epiteelisoluihin on vertailtu *in vitro* -tutkimuksissa. Lisäksi on tutkittu *E. coli* -bakteereiden invaasiota, invaasiomekanismeja ja solunsisäisiä prosesseja. Taulukossa 3. esitellään *in vitro* -tutkimuksia, jotka on tehty persistoivista utaretulehduksista eristetyillä *E. coli* -kannoilla.

TAULUKKO 3. Persistoivilla *E. coli* -kannoilla tehtyjä *in vitro* -tutkimuksia.

Tutkimuksen tekijät	Mitä tutkittiin	Solulinja	Bakteerikannat (persistoiva/transientti)
Almeida ym. 2011	Invaasio, solunsisäinen selviytyminen	MAC-T	3 / 2
Passey ym. 2008	Invaasio	pBMEC	1 / 0
Dogan ym. 2006	Adheesio, invaasio	MAC-T	3 / 3
Döpfer ym. 2001	Adheesio, invaasio, selviytyminen	pBMEC	2 / 0
Döpfer ym. 2000	Adheesio, invaasio	MAC-T	4 / 3
Dego ym. 2011	Geenien ilmentyminen	pBMEC	1 / 1

Hollantilaisessa tutkimuksessa (Döpfer ym. 2000) tutkittiin transienttien ja persistoivien *E. coli* -kantojen kykyä kiinnittyä utare-epiteelisoluihin (MAC-T) ja kykyä tunkeutua solujen sisään. Tässä tutkimuksessa saatiin selville, että sekä bakteereiden soluihin kiinnittyminen että invasoituminen olivat riippuvaisia ajasta ja bakteereiden lukumäärästä. Kroonisista utaretulehduksista eristetyt *E. coli* -kannat menivät utare-epiteelisolujen sisään nopeammin ja tehokkaammin kuin transientit kannat. Sen sijaan soluihin kiinnittyminen oli samanlaista persistoivilla ja transienteilla kannoilla. (Döpfer ym. 2000.)

Döpfer ym. (2001) tutkivat kroonisista *E. coli* -utaretulehdusta sairastavien nautojen utarebiopsioista valmistettujen primaaristen solulinjojen vuorovaikutusta *E. coli* -bakteereiden kanssa. Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri solulinjaa, jotka oli eristetty kahden lehmän tulehtuneesta utareesta ja kahta *E. coli* -kanta, jotka oli eristetty persistoivista utaretulehduksista. Molemmat kannat kiinnittyivät ja invasoituivat kaikkiin tutkimuksessa käytettyihin solulinjoihin. Toinen *E. coli* -kanta kiinnittyi huonommin epiteelisoluihin, mutta se kanta kuitenkin invasoitui paremmin. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan ajatella, että persistoivien *E. coli* -bakteerin kantojen adheesio utare-epiteelisoluihin ei korreloi invaasion kanssa. Molemmat *E. coli* -kannat selviytyivät utare-epiteelisoluisissa viisi vuorokautta. PCR-

analyysillä todettiin, että kummallakaan kannalla ei ollut enteropatogeenisille *E. coli* -kannoille tyypillisiä virulenssigeenejä (*bfpA*, *eae* ja *tir*). (Döpfer ym. 2001.)

Dogan ym. (2006) tutkivat pystyvätkö *E. coli* -kannat, jotka oli eristetty persistoivista utaretulehduksista paremmin kiinnittymään ja invasoitumaan naudan utare-epiteelisoluihin (MAC-T) kuin transientit *E. coli* -kannat. He halusivat myös selvittää selviytyvätkö ja lisääntyvätkö persistoivat kannat paremmin solujen sisällä kuin transientit kannat. Lisäksi he tutkivat adheesioon ja invasioon vaikuttavia prosesseja. Tutkimuksessa määritettiin *E. coli* -kantojen serotyypit, genotyypit, fylogeneettiset ryhmät ja tunnetut virulenssigeenit. (Dogan ym. 2006.)

Dogan ym. (2006) tulokset osoittivat, että persistoivat *E. coli* -kannat pystyivät menemään paremmin utare-epiteelisolujen (MAC-T) sisään ja lisääntymään soluissa kuin transientit kannat. Tämän tuloksen perusteella he uskovat, että lehmien persistoivien *E. coli* -utaretulehdusten patogeneesin keskeisenä tekijänä on *E. coli* -bakteereiden kyky invasoitua ja lisääntyä utare-epiteelisoluissa. (Dogan ym. 2006.)

Almeida ym. (2011) selvittivät tutkimuksessaan kroonisista ja akuuteista utaretulehduksista eristettyjen *E. coli* -kantojen invaasiota utare-epiteelisoluihin. Tutkimuksessa käytettiin samoja *E. coli* -kantoja kuin Dogan ym. (2006) käyttivät omassa tutkimuksessaan. Tutkimuksessa selvitettiin invaasiomekanismeja käyttämällä inhibiittoreita, jotka estivät kalveolivälitteistä endosytoosia (CME, Calveolae-Mediated Endocytosis) ja reseptorivälitteistä endosytoosia (RME, Receptor Mediated Endocytosis). Tutkimuksessa selvisi, että persistoivat kannat pysyivät hengissä solujen sisällä kauemmin ja kroonisista utaretulehduksista eristetyt kannat invasoituivat soluihin lähinnä kalveolivälitteisen endosytoosin avulla. (Almeida ym. 2011.)

Almeida ym. (2011) ja Dogan ym. (2006) saivat samankaltaiset tulokset tutkimuksissaan. Näiden tutkimusten perusteella he uskovat, että persistoivia utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -kannat ovat onnistuneet kehittämään itselleen mekanismeja, joilla ne voivat vältellä lehmän immuunipuolustusjärjestelmää ja lisäksi nämä kannat kykenevät selviytymään hengissä utare-epiteelisoluissa. Kalveolivälitteisen endosytoosin avulla persistoivat *E. coli* -kannat voivat selviytyvät solun sytoplasmassa ja vältellä bakteereita tuhoavia mekanismeja (Almeida ym. 2011).

White ym. (2010) tutkimuksen tarkoituksena oli parantaa sekä persistoivien että transienttien *E. coli* -utaretulehdusten patogeneesin ymmärrystä. Tutkimusryhmä kehitti tähän tarkoitukseen matemaattisen mallin, jolla pystyttäisiin selvittämään, mikä osuus epiteelisolujen sisällä olevilla bakteereilla on utaretulehduksen dynamiikkaan. Tässä mallissa käytettiin hyväksi sekä tietoja naudan immuunivasteesta että *E. coli* -bakteereiden lukumäärää maidossa ja utare-epiteelisoluissa. Tämän tutkimuksen perusteella White ym. (2010) uskovat, että *E. coli* -utaretulehduksen persistoivuuden keskeisin syy on bakteereiden selviytyminen epiteelisolujen sisällä.

DeGo ym. (2011) tutkivat primaaristen utare-epiteelisolujen geenien ilmentymistä *E. coli* -altistusten jälkeen. Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla persistoivista ja akuuteista utaretulehduksista eristettyjen *E. coli* -kantojen aiheuttamia geenien ilmentymisprofiileja. Tutkimuksessa kaikki kannat aiheuttivat sytokiineihin, kemokiineihin, välittömään immuunipuolustukseen ja apoptoosiin liittyvien geenien suuremman ilmentymisen, mutta näiden geenien ilmentyminen oli paljon suurempaa akuutista utaretulehduksesta eristetyn *E. coli* -kannan altistuksen jälkeen kuin persistoivan kannan altistuksen jälkeen. DeGo ym. (2011) pitivät tutkimuksensa tärkeimpänä havaintona, että persistoiva *E. coli* -kanta aiheutti muutoksen 43 utare-epiteelisolun geeniin, ilmentyminen joko väheni tai lisääntyi verrattuna akuuttiin kantaan. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että utare-epiteelisolut, jotka oli altistettu persistoivalla *E. coli* -kannalla, ilmensivät merkittävästi enemmän virulenssigeenejä: *ler*, *eae*, *lic* ja *iutA*. Näiden virulenssigeenien tiedetään liittyvän adheesioon eli isäntäsoluun kiinnittymiseen. (DeGo ym. 2011.)

KOKEELLINEN TUTKIMUS

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää persistoivista ja akuuteista *Escherichia coli* -bakteerin aiheuttamista utaretulehduksista eristettyjen kantojen kykyä adheesoitua, invasoitua, selvitä hengissä ja lisääntyä naudan utare-epiteelisoluissa. Tutkimuksen päätavoitteena oli selvittää pystyykö persistoivat *E. coli* -kannat invasoitumaan ja lisääntymään utare-epiteelisoluissa paremmin kuin transientit kannat.

Solumallina tutkimuksessa käytettiin naudan primaarista utare-epiteelisolulinjaa (pBMEC) ja kokeellinen tutkimus koostui neljästä erilaisesta bakteerialtistuskokeesta: adheesiokokeesta, invaasiokokeesta, bakteereiden selviytymisestä hengissä solujen sisällä 24 ja 48 tunnin ajan.

Altistuskokeiden suunnittelussa käytettiin apuna Dogan ym. (2006) tutkimuksessaan käyttämää menetelmäohjetta. Tässä pro gradu -työssä käytettiin primaarista utare-epiteelisolulinjaa, sen sijaan Dogan ym. (2006) käyttivät tutkimuksessaan klonaalista, kaupallista MAC-T -solulinjaa. Lisäksi tässä työssä bakteerikantoja kasvatettiin erilaisessa kasvatusliemessä ja altistuskokeiden jälkeen bakteerisuspensiot viljeltiin erilaisille kasvatusalustoille. Muilta osin koejärjestelyt vastasivat melko tarkasti Dogan ym. (2006) tutkimusta, esimerkiksi solujen altistuksessa molemmissa tutkimuksissa käytettiin samaa bakteeripitoisuutta (MOI = 10).

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Bakterikannat

Tutkimuksessa käytettiin kliinisistä utaretulehduksista eristettyjä *Escherichia coli* -bakteereita. Persistoivista utaretulehduksista oli eristetty 12 *E. coli* -kanta (9 kantaa Suomesta ja 3 kantaa USA:sta) ja 7 *E. coli* -kanta oli eristetty akuuteista eli transienteista utaretulehduksista (6 kantaa Suomesta ja 1 kanta USA:sta) (Taulukko 4). Suomalaisten lypsytilojen lehmien utaretulehduksista eristetyt kannat oli luokiteltu persistoiviin ja transientteihin PFGE:n avulla. Persistoivilla kannoilla oli siis identtiset pulssityypit sekä infektion aikaan otetussa ja 3 viikkoa hoidon jälkeen otetussa näytteessä. Myös Yhdysvalloista saadut persistoivat *E. coli* -kannat oli todettu persistoiviksi PFGE:llä (Dogan ym. 2006).

Tässä tutkimuksessa käytetyt suomalaiset bakterikannat ovat osa suurempaa suomalaista *E. coli* -utaretulehdustutkimusta ja kannat oli otettu talteen hankkeeseen liittyneestä lehmien hoitokokeesta (Suojala 2010). Kantakokoelmassa oli 280 *E. coli* -bakterikantaa, joista tässä pro gradu -tutkielmassa käytettiin 15 kantaa. Bakterikannat tähän tutkimukseen saatiin elintarviketurvallisuusviraston (Evira) Kuopion yksiköstä.

Negatiivisena kontrollikantana tutkimuksessa käytettiin ei-invasiivista *E. coli* ATCC 25922 -kanta ja positiivisena kontrollikantana oli kliinisestä utaretulehduksesta eristetty *S. aureus* 298 -kanta. *E. coli* ATCC 25922 -kanta on yleisesti käytetty ei-patogeeninen amerikkalaisen soluviljelykantakokoelman bakterikanta. *S. aureus* 298 oli saatu Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisestä tiedekunnasta. Tämä *S. aureus* -kanta oli aikaisemmissa utareepiteelisolualtistuskokeissa, biotieteiden laitoksen ravitsemus- ja elintarvikebiotekniikan laboratoriossa, todettu hyvin invasiiviseksi ja tehokkaaksi lisääntymään utare-epiteelisoluissa (Käyhkö 2008).

Tutkimuksessa käytetyistä suomalaisista *E. coli* -kannoista oli tutkittu 26 virulenssigeeniä ERIC-PCR:llä (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences ERIC -primers). Tutkitut geenit olivat: *cva*, *vat*, *tsh*, *iucD*, *papC*, *irp2*, *iss*, *astA*, *svg*, *chuA*, *yjaA*, *uidA*, *TspE4.C2*, *A*, *B1*, *D*, *B2*, *F17*, *AFA8*, *sfaD*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA* ja *saa*. (Suojala ym. 2011.) Yhdysvalloista peräisin olevilta *E. coli* -kannoilta oli tutkittu RAPD-PCR:llä (Random Amplified Polymorphic DNA -PCR) geenit, jotka koodittavat fimbrioita (K99, F1845,

CS31A) ja toksiineja (LT, STa, STb), kannoilta oli määritetty myös seuraavat geenit: *stx1*, *stx2*, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *pap*, *sfa*, *afaI*, *hly* ja *ipaH* (Dogan ym. 2006). Virulenssigeenianalyysien tulokset on esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat ja niiden persistoivuus, alkuperämaa, virulenssigeenit ja fylogeniaryhmä.

Bakteerikannan tunnus	Persistoivuus (+/-)	Alkuperämaa	Virulenssigeenit	Fylogeniaryhmä
Transientit				
<i>E. coli</i> 33A	-	Suomi	<i>uidA</i> , <i>F17</i> , <i>AFA8</i> , <i>papC</i>	A
<i>E. coli</i> 34A	-	Suomi	<i>uidA</i> , <i>TspE4.C2</i> , <i>papC</i>	B1
<i>E. coli</i> 122	-	Suomi	<i>uidA</i> , <i>eaeA</i>	A
<i>E. coli</i> 97A	-	Suomi	<i>uidA</i> , <i>chuA</i> , <i>TspE4.C2</i>	D
<i>E. coli</i> 103A	-	Suomi	<i>uidA</i> , <i>AFA8</i> , <i>Saa</i>	A
<i>E. coli</i> 46A	-	Suomi	<i>uidA</i> , <i>chuA</i> , <i>AFA8</i> , <i>papC</i>	D
<i>E. coli</i> ECA-O157	-	Yhdysvallat	<i>fimH</i> (A119V mutaatio)	A
Persistoivat				
<i>E. coli</i> 42 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>yjaA</i>	A
<i>E. coli</i> 55 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>eaeA</i>	A
<i>E. coli</i> 63 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>papC</i>	A
<i>E. coli</i> 68 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>papC</i>	A
<i>E. coli</i> 74 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>yjaA</i>	A
<i>E. coli</i> 111 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>yjaA</i>	A
<i>E. coli</i> 120 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>chuA</i>	D
<i>E. coli</i> 152 C	+	Suomi	<i>uidA</i> , <i>AFA8</i> , <i>papC</i>	A
<i>E. coli</i> 170 C	+	Suomi	<i>uidA</i>	A
<i>E. coli</i> ECC-Z	+	Yhdysvallat	<i>fimH</i> (P12S ja A27V mutaatio)	A
<i>E. coli</i> ECC-1470	+	Yhdysvallat	<i>fimH</i>	A
<i>E. coli</i> ECC-M	+	Yhdysvallat	<i>fimH</i>	A
Kontrollikannat				
<i>E. coli</i> ATCC		Yhdysvallat		
<i>S. aureus</i> 298		Suomi		

6.1.1 Bakteerien käsittely ennen altistuskoetta

Bakteerikannat säilytettiin -70 °C:ssa pakastettuina 20 % glyserolia sisältävässä tryptonisoijaliemessä (Tryptone Soy Broth, Lab M, Englanti). Tutkimusta varten pakastetut bakteerikannat viljeltiin verimaljoille ja tarkastettiin, että kannat kasvoivat puhtaina. Verimaljoilta kannat uudistettiin aina 2 vuorokautta ennen altistuskoetta. Altistuskoetta edeltävänä päivänä uudistetulta verimaljalta otettiin yksi pesäke, joka lietettiin TSB-liemeen ja bakteereja kasvatettiin 18 tuntia +37 °C:ssa ennen altistuksen aloittamista.

Bakteeriliemi sentrifugoitiin (Jouan SA, Br4i) 10 minuuttia 3000 rpm (rounds per minute) ja pestiin kaksi kertaa 1 x PBS (Phosphate-buffered Saline, Euroclone). Pesujen jälkeen

bakteerisaostuma liuotettiin 5 ml:aan RPMI 1640 (Invitrogen) -kasvatusliuokseen. Tämän jälkeen liuosten bakteeripitoisuudet määritettiin spektrofotometrisesti (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation). Mittaus tehtiin aallonpituudella 600 nm ja lopullisen altistuksessa käytettävän bakteerisuspension absorbanssiarvoksi yritettiin saada noin 0,040-0,030. Lopuksi tämä suspensio laimennettiin 1:10 RPMI-liuoksella.

6.1.2 Bakteerikantojen antibioottiherkkyuden määrittäminen

Altistuskokeissa bakteereiden invaasion ja solun sisäisen lisääntymisen selvittämisessä käytettiin solujen ulkopuolelle ja kuoppalevyn kuoppien reunalle jääneiden bakteereiden tuhoamiseksi 0,1 mg/ml gentamysiini-liuosta (Gentamycin Sulfate, Sigma), joten kaikille tutkimuksessa käytetyille bakteerikannoille tehtiin gentamysiiniherkkyysmääritys.

Antibioottiherkkyystestissä käytettiin Müller-Hinton (MH) -maljoja (Merck, KGaA, Saksa). Verimaljoilla kasvatetut tuoret *E. coli* -kannat siirrostettiin steriilillä pumpulipuikolla 2 ml:aan 0,9 % NaCl:a siten, että suspension vahvuudeksi saatiin noin McFarland 1. Tämän jälkeen suspensiota levitettiin MH-maljalle hyvin tiheäksi verkoksi ja laitettiin viisi steriiliä paperikiekkoa steriileillä pinseteillä maljalle. Sitten paperikiekkoihin pipetoitiin 10 µl:aa gentamysiini-liuosta viittä eri pitoisuutta (50 mg/ml, 25 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml ja 0,5 mg/ml). Maljoja inkuboitiin +37 °C:ssa yhden vuorokauden ajan ja mitattiin viivoittimella antibiootin aiheuttaman estorenkään halkaisijan pituus.

6.2 Utare-epiteelisolut

Tässä tutkimuksessa käytettiin solumallina Bovine Mammary Epithelial -solulinjaa (pBMEC). Utare-epiteeli -solulinja oli peräisin Belgiasta Professori Christian Burvenichilta. Solulinja oli valmistettu siten, että epiteelisolut oli eristetty kollageenaasin avulla lehmän utaretiehyiden epiteelistä, jonka jälkeen ne oli puhdistettu Cifrian ym. (1994) ohjeen mukaan (Van Oostveldt ym. 2002). Altistuskokeissa käytettiin 5 - 7 jakokerran soluja. Soluja ei käytetty kokeisiin heti sulatuksen jälkeen, vaan pakastettuja soluja kasvatettiin ja jaettiin muutamia kertoja ennen käyttöä. Tällä tavalla solulinja stabiloitiin ja vähennettiin pakastuksen aiheuttamia vaikutuksia soluihin. Tässä työssä haluttiin, että solulinja olisi mahdollisimman samankaltainen jokaisella koekerralla ja siksi kokeisiin käytettiin vain kolmen eri jakokerran soluja.

Utare-epiteelisoluja kasvatettiin kasvatusliuoksessa, joka sisälsi 40 % Ham's F12 (Gibco), 23 % RPMI 1640 (Gibco), 20 % NCTC 135 (Gibco), 10 % inaktivoitua Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma), 1 % laktoosia (α -Lactose monohydrate, Sigma), 1 % laktalbumiini hydrolysaattia (Lactalbumin Enzymatic Hydrolysate, Sigma), 0,3 % GSH (L-Glutathione reduced, Sigma), 0,2 % L-askorbiinihappoa (Ascorbic Acid, Sigma), 2 % hydrocortisonia (Hydrocortisone, Sigma), 0,01 % insuliinia (Insulin, Sigma) ja 2 % antibioottia (Antibiotic-Antimycotic Mix, Gibco Invitrogen corporation).

Kasvatukseen käytettiin 25 cm² ja 75 cm² soluviljelypulloja (Tissue Culture Flask, Sarstedt, USA) ja soluille vaihdettiin tuore kasvatusliuos 2-3 vuorokauden välein. Soluja kasvatettiin inkubaattorissa (Heraeus, Hera Cell) +37 °C:ssa 5 % CO₂:ssa. Solutiheyttä, solujen kasvua ja kuntoa seurattiin mikroskoopilla 1-2 vuorokauden välein. Kun solut peittivät noin 80 - 90 % soluviljelypullon pohjan pinta-alasta (80 - 90 % konfluenssi), ne jaettiin uusiin soluviljelypulloihin.

Soluilla ollut kasvatusliuos poistettiin ja soluja pestiin 1 x PBS-liuoksella (PBS:ää inkuboitiin noin 5 minuuttia inkubaatiokaapissa ja poistettiin tämä liuos solumaton päältä). Tämän jälkeen pulloon laitettiin solujen irrottamiseksi 0,05 % Trypsin-EDTA -liuosta ja pulloa inkuboitiin noin 10 minuuttia lämpökaapissa. Inkuboinnin jälkeen solususpensiota pipetoitiin muutaman kerran edestakaisin, jotta solut saatiin mahdollisimman irrallisiksi. Sitten solususpensio siirrettiin kasvatusliuosta sisältävään putkeen. Kasvatusliuos sisälsi seerumia, joka inaktivoi trypsiinin vaikutuksen. Putkea sentrifugoitiin (Heraeus, Biofuge, Primo) 5 minuuttia 1100 rpm ja poistettiin supernatantti solupelletin yläpuolelta.

Solupelletti suspensoitiin kasvatusliuokseen ja sen jälkeen siitä otettiin näyte mikrosentrifugiputkeen solujen laskemista varten. Solut värjättiin 0,1 % Erytrosiini-B -väriliuoksella (Sigma, Englanti), joka värjäsi punaiseksi kuolleet solut ja solujen palaset. Elävät eli värjäytymättömät solut laskettiin hemosytometrillä (Bürker, Marienfeld, Saksa) ja solujen lopullinen lukumäärä saatiin selville huomioimalla laimennuskerroin ja lasketun nestemäärän tilavuus. Solujen lukumäärän selvittämisen avulla voitiin uuteen soluviljelypulloon laittaa kasvamaan haluttu määrä soluja.

Altistuskoe edeltävällä jakokerralla utare-epiteelisoluja laitettiin 24-kuoppalevyn (Sarstedt, Englanti) kuoppiin siten, että jokaisessa kokeeseen tarvittavassa kuopassa oli noin 200 000 solua/kuoppa. Soluja kasvatettiin kaksi vuorokautta inkubaattorissa +37 °C:ssa 5 % CO₂:ssa,

ennen jokaista altistuskoe kertaa. Ensimmäisen vuorokauden inkubaation jälkeen soluille vaihdettiin antibiootiton kasvatusliuos, jolloin solut kasvoivat paremmin ja koetta häiritsevää antibiootti saatiin poistettua. Noin kaksi tuntia ennen altistuskokeen aloittamista kuoppalevyn kuopille vaihdettiin 1 x PBS-liuos. Tällä tavalla solujen päältä saatiin huuhdeltua pois solujen kasvatusliuoksessa olevat yhdisteet, jotka voisivat vaikuttaa kokeiden tuloksiin.

6.3 Altistuskokeet

Menetelmän suunnittelussa ja validoinnissa käytettiin apuna ravitsemus- ja elintarvikebiotekniikan laitoksella kehitettyä altistusohjetta ja Dogan ym. (2006) tutkimuksessaan käyttämää menetelmää. Altistuskokeissa käytettäväksi bakteeripitoisuudeksi valittiin 2×10^6 pmy/ 2×10^5 solua/kuoppa. Tällöin altistuksessa oli noin kymmenen infektoivaa bakteeria jokaista utare-epiteelisolua kohden (Multiplicity Of Infection, MOI=10). Myös Dogan ym. (2006) ja Almeida ym. (2011) käyttivät *E. coli* -kantojen adheesio ja invaasiokokeissa samaa bakteeri-solu -suhdetta. Altistuskokeet suoritettiin neljänä eri koekertana ja jokaisessa kokeessa määritettiin 5 testikantaa ja kontrollikannat sekä nollanäyte. Testi- ja kontrollikannat määritettiin kolmena rinnakkaisena. Kaikki altistuskokeet tehtiin testikannoille 2-4 kertaa.

6.3.1 Adheesio

Adheesiokokeessa määritettiin *E. coli* -bakteerin eri kantojen kykyä kiinnittyä eli adhesoitua utare-epiteelisolujen pintaan. Tässä kokeessa soluja inkuboitettiin bakteereiden kanssa ja sitten kiinnittymättömät bakteerit pestiin pois. Tämän jälkeen kiinnittyneiden bakteerien osuus määritettiin irrottamalla ja hajottamalla solut ja viljelemällä sopivat laimennokset maljoille.

Adheesiokokeessa kuopista poistettiin PBS-liuos ja tilalle pipetoitiin 0,5 ml:aa bakteerisuspensiota (noin 2×10^7 pmy). Tämän jälkeen kuoppalevyä inkuboitettiin 30 minuuttia +37 °C:ssa 5 % CO₂:ssa. Sitten kuopat pestiin viisi kertaa 1 x PBS-liuoksella. Viimeisen pesun jälkeen solujen päälle lisättiin 0,5 ml:aa 0,1 % Triton-X-PBS -liuosta ja kuoppalevyä inkuboitettiin 10 minuuttia jäiden päällä. Seuraavaksi solujen irrottamiseksi kuopan pohjasta ja hajottamiseksi kuopissa olevaa liuosta pipetoitiin voimakkaasti edestakaisin. Lopuksi solu-bakteerisuspensio -liuos pipetoitiin 4,5 ml:aan 0,1 % peptoni-suola-laimennusveteen. Tehtiin 1:10 laimennossarja ja sopivat laimennokset viljeltiin rinnakkaisina TSA (Tryptone Soy Agar,

Lab M) -maljoille. Maljoja inkuboitiin noin 24 h +37 °C:ssa, jonka jälkeen laskettiin maljoilla olevat bakteeripesäkemäärät.

6.3.2 Invaasio

Invaasiokokeessa selvitettiin *E. coli* -bakteerin eri kantojen kykyä tunkeutua utare-epiteelisolujen sisään. Invaasion määrittämiseksi soluja inkuboitiin bakteereiden kanssa kaksi tuntia, että bakteerit ennättivät tunkeutua soluihin. Kiinnittymättömät bakteerit pestiin pois ja antibiootikkäsittelyllä tapettiin solun ulkopuolelle jääneet bakteerit.

Invaasiokokeessa kuopista poistettiin PBS-liuos ja tilalle pipetoitiin 0,5 ml:aa bakteerisuspensiota (noin 2×10^7 pmy) ja kuoppalevyä inkuboitiin 2 tuntia. Sitten kuopat pestiin kolme kertaa 1 x PBS:llä ja kuoppiin lisättiin 0,5 ml:aa 0,1 mg/ml gentamysiini-RPMI-1640 -liuosta, jonka oli tarkoitus tuhota kaikki solun ulkopuolella olevat *E. coli* -bakteerit. Sen jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin 1,5 tuntia +37 °C:ssa ja sitten kuopat pestiin yhden kerran 1 x PBS:llä. Sitten solut irrotettiin ja hajotettiin kuten adheesiokokeessa ja jatkettiin koe loppuun asti samalla tavalla kuin edellä kuvatussa adheesiokokeessa.

6.3.3 Lisääntyminen ja selviytyminen 24 ja 48 tunnin ajan

E. coli -bakteereiden kykyä selviytyä hengissä ja lisääntyä utare-epiteelisoluissa tutkittiin siten, että inkuboitiin soluja bakteereiden kanssa, pestiin kiinnittymättömät bakteerit pois ja tuhottiin antibiootilla solun ulkopuolelle jääneet bakteerit. Tämän jälkeen soluja inkuboitiin noin 20 ja 44 tuntia.

Bakteereiden selviytymiskokeessa kuopista poistettiin PBS-liuos ja tilalle pipetoitiin 0,5 ml:aa bakteerisuspensiota (noin 2×10^7 pmy) ja kuoppalevyä inkuboitiin 2 tuntia. Sitten kuopat pestiin kolme kertaa 1 x PBS:llä ja kuoppiin lisättiin 0,5 ml:aa 0,1 mg/ml gentamysiini-RPMI-1640 -liuosta, jonka oli tarkoitus tuhota kaikki solun ulkopuolella olevat *E. coli* -bakteerit. Sen jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin 1,5 tuntia +37 °C:ssa ja sitten kuoppiin vaihdettiin RPMI-1640-kasvatusliuos, joka sisälsi gentamysiiniä 5 µg/ml. Kun levyjä oli inkuboitu 24h ja 48h altistuksen aloituksesta solut irrotettiin ja hajotettiin samalla tavalla kuin adheesiokokeessa ja jatkettiin koe loppuun asti samalla tavalla kuin edellä kuvatussa adheesiokokeessa.

6.4 Bakteripesäkkeiden laskeminen maljoilta

Bakteripesäkkeiden lukumäärät laskettiin noin 24 tunnin kasvatuksen jälkeen suurennuslasi/valo-laitetta apuna käyttäen. Bakteerien toisen solunsisäisen selviytymisen kokeen bakteripesäkkeet laskettiin noin 48 tunnin inkubaation jälkeen. Jos maljoilla nähtiin epätyypillisen värisiä tai näköisiä pesäkkeitä, niistä otettiin näyte, joka värjättiin Gram-värjäyksellä. Gram-värjyksen avulla voitiin tutkimuksesta poistaa kaikki kontaminoituneiden ja virheellisten näytteiden tulokset.

6.5 Tulosten laskeminen

Aluksi kaikkien neljän eri kokeen tulokset laskettiin painotetun keskiarvon avulla, jolloin saatiin tulokseksi pmy/ml. Tämän jälkeen adheesio- ja invaasioprosentit laskettiin vertaamalla saatuja bakteripitoisuuksia lähtöpitoisuuksiin eli kuoppiin laitettuihin bakterimääriin. Solujen sisäinen selviytyminen laskettiin siten, että verrattiin invasoituneiden bakteerien määriä 24 tunnin ja 48 tunnin ajan utare-epiteelisoluissa hengissä selviytyneiden bakteerien määriin.

6.6 Tilastolliset menetelmät

Tulosten tilastolliseen käsittelyyn käytettiin SPSS for Windows versio 17.0.1-ohjelmistoa. Adheesiokokeiden tulokset analysoitiin lineaarisella sekamallilla, jossa ”dependent” muuttujana käytettiin adheesiota ja kiinteänä selittäjänä oli ryhmä (transientti=1, persistoiva=2 negatiivinen kontrolli=3 tai positiivinen kontrolli=4) ja sattumanvaraisuuden selittäjänä käytettiin bakterikantaa. Invaasiokokeiden ja bakteereiden solun sisäisen selviytymisen kokeiden tulokset analysoitiin epäparametrisillä Kruskal-Wallis -ja Mann-Whitney -testeillä. Nämä epäparametriset testit ovat keskiarvotestejä, joten niissä käytettiin jokaisen kannan kaikkien tulosten keskiarvoa.

Lineaarinen sekamalli oli hyvä menetelmä tämän aineiston tilastolliseen käsittelyyn, mutta menetelmän soveltuvuuden vaatimuksena on se, että aineiston tulosten tulee asettua normaalijakaumalle. Invaasio ja solunsisäisen selviytymisen kokeiden tulokset eivät olleet normaalijakautuneita, sen takia tulosten analysointiin käytettiin epäparametrisia analyysimenetelmiä, jotka eivät vaadi normaalijakautuneisuutta luotettavan tuloksen saamiseksi.

7 TULOKSET

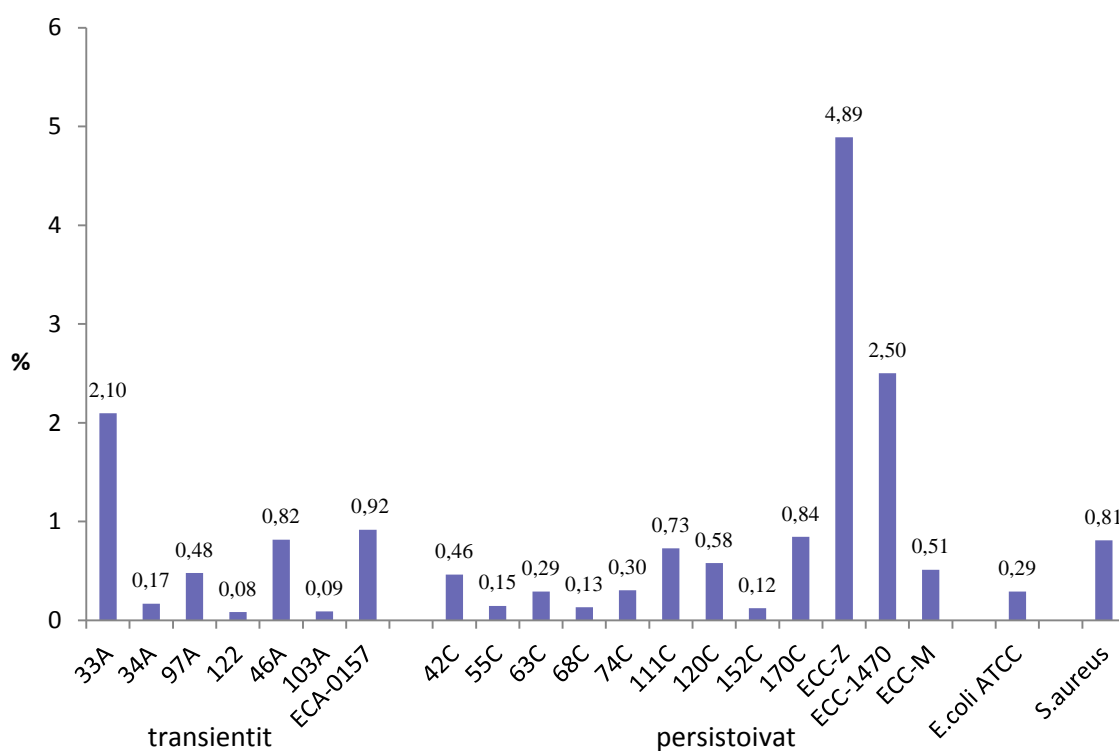
Kaikki tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat ja kontrollikannat kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin, mutta kantojen kiinnittyminen vaihteli melko paljon. Persistoivien ja transienttien kantojen välillä ei adheesiossa ollut merkittävää eroa, yksi transientti kanta (33A) ja kaksi persistoivaa kantaa (ECC-Z ja ECC-1470) kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin selvästi kaikkia muita kantoja paremmin. Lähes kaikki bakteerikannat invasoituivat heikosti utare-epiteelisoluihin. Persistoivista *E. coli* -kannoista kaksi kantaa (ECC-Z ja ECC-1470) invasoitui kohtalaisesti, mutta huomattavasti heikommin kuin positiivinen *S. aureus* 298 -kontrollikanta. Bakteereiden hengissä selviytyminen ja lisääntyminen solujen sisällä vaihtelivat suuresti. Persistoivat kannat lisääntyivät utare-epiteelisoluissa hieman paremmin kuin transientit kannat, mutta vain yksi persistoiva kanta (ECC-Z) lisääntyi kunnolla. *S. aureus* 298 -kontrollikanta lisääntyi utare-epiteelisolujen sisällä paljon tehokkaammin kuin persistoiva ECC-Z -kanta. (Taulukko 5.)

TAULUKKO 5. *E. coli* -kantojen adheesio ja invaasio utare-epiteelisoluihin (pBMEC) sekä kantojen solun sisäinen lisääntyminen 24h ja 48h.

Kanta-tunnus	AD (pmy/ml)	AD %	IN (pmy/ml)	IN %	24h (pmy/ml)	24h %	48h (pmy/ml)	48h %
Transientit								
33A	66697	2,10	336	0,01	23	18	67	36
34A	6227	0,17	144	0,00	8	4	25	21
97A	21186	0,48	501	0,01	8901	4159	4057	1565
122	4856	0,08	122	0,00	1124	714	25	14
46A	37561	0,82	128	0,00	340	310	63	49
103A	4121	0,09	151	0,00	130	86	33	22
ECA-0157	28692	0,92	929	0,03	1657	92	425	65
Persistoivat								
42C	28611	0,46	1140	0,02	1389	274	599	67
55C	4811	0,15	205	0,01	254	144	50	25
63C	14051	0,29	480	0,01	660	141	306	60
68C	5311	0,13	72	0,00	30	50	25	30
74C	11823	0,30	45	0,00	182	193	17	16
111C	29920	0,73	1553	0,04	467	48	333	28
120C	22250	0,58	104	0,00	163	145	2183	1912
152C	4545	0,12	55	0,00	100	165	50	93
170C	37890	0,84	4287	0,10	21617	1843	5434	206
ECC-Z	110142	4,89	33545	1,60	107844	341	69504006	200933
ECC-1470	51947	2,50	11129	0,54	12924	116	4652	42
ECC-M	13667	0,51	4144	0,17	5159	133	2404	60
Kontrollit								
<i>E.coli</i> ATCC	16452	0,29	373	0,01	150	57	85	46
<i>S. aureus</i> 298	23658	0,81	102007	4,24	458148541	400778	659963441	622771

7.1 Adheesio

E. coli -bakteerikannat kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin, mutta adheesoituneiden bakteereiden lukumäärät vaihtelivat välillä 4×10^3 ja $1,1 \times 10^5$ pmy/ml (Taulukko 5.). Sekä negatiivinen kontrollikanta *E. coli* ATCC 25922 että positiivinen kontrollikanta *S. aureus* 298 adheesoiutuivat kohtalaisesti utare-epiteelisoluihin ($1,6 \times 10^4$ ja $2,3 \times 10^4$). Kuvassa 2. on esitetty kaikki käytettyjen bakteerikantojen adheesioprosentit. Adheesioprosentti kuvastaa bakteereiden kiinnittymistä paremmin kuin pelkkä pmy/ml-arvo, koska siinä on otettu huomioon altistuskokeessa solujen päälle laitettu bakteerimäärä. Transientti *E. coli* 122 -kanta kiinnittyi heikoimmin ja sen adheesioprosentti oli vain 0,08 %, sen sijaan parhaiten adheesoiutu persistoiva ECC-Z -kanta, jonka adheesioprosentti oli 4,89 %. Tutkimuksessa oli mukana 21 bakteerikantaa, joista 18 kannan adheesioprosentti oli alle 1 %:n. Erityisen hyvin utare-epiteelisoluihin kiinnittyi kolme *E. coli* -kantaa, yksi transienttikanta (33A 2,10 %) ja kaksi persistoivaa kantaa (ECC-1470 2,50 % ja ECC-Z 4,89 %).



KUVA 2. *E. coli* -bakteerin persistoivien ja transienttien kantojen adheesio utare-epiteelisoluihin (adheesioprosentit).

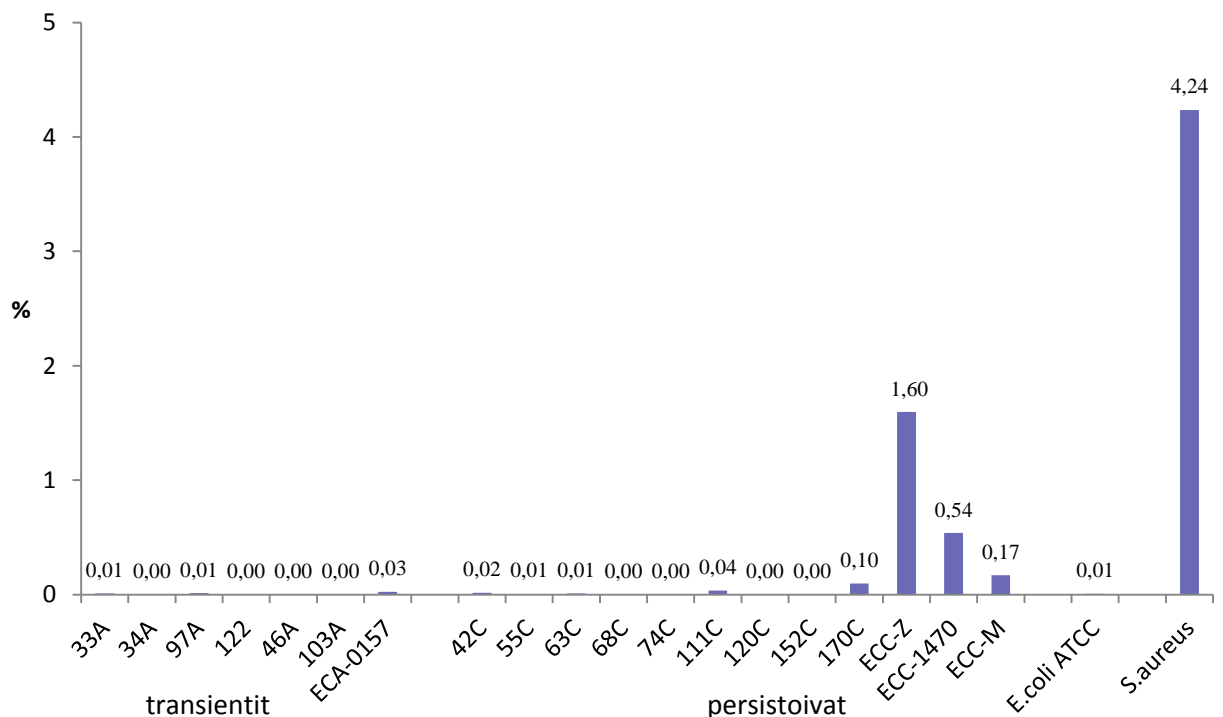
Adheesiokokeiden tulokset analysoitiin lineaarisella sekamallilla ja valittu analyysimenetelmä soveltui tarkoitukseen hyvin. Koko testin p-arvoksi saatiin 0,813, mikä tarkoittaa sitä, että mikään neljästä ryhmästä (1=transientit, 2=persistoivat, 3=negatiivinen kontrolli, 4=positiivinen kontrolli) ei eronnut merkitsevästi toisistaan. Transienttien ja persistoivien

kantojen vertailussa p-arvoksi saatiin 0,821 eli kannat eivät eronneet toisistaan adheesion suhteen. Tässä tilastollisessa analyysimenetelmässä p-arvot, jotka ovat pienempiä kuin 0,05 ovat tilastollisesti merkitseviä tuloksia.

7.2 Invaasio

Suurin osa tutkimuksessa käytetyistä *E. coli* -kannoista invasoitui utare-epiteelisoluihin huonosti tai ei lainkaan. (Taulukko 4.) Invasoituneiden bakteereiden määrät vaihtelivat 40 ja $3,3 \times 10^4$ pmy/ml välillä. Negatiivinen kontrollikanta *E. coli* ATCC invasoitui hyvin heikosti ($3,7 \times 10^2$) ja positiivinen kontrollikanta *S. aureus* 298 invasoitui tehokkaasti ($1,0 \times 10^5$). Kuvassa 3. kaikkien bakteerikantojen tulokset esitetään invaasioprosentteina. *E. coli* -bakteerin transientit kannat invasoituivat hyvin huonosti, mutta persistoivista kannoista 170C (0,1 %), ECC-1470 (0,5 %) ja ECC-M (0,2 %) invasoituivat kohtalaisesti ja ECC-Z (1,6 %) kanta invasoitui melko hyvin (Kuva 3.).

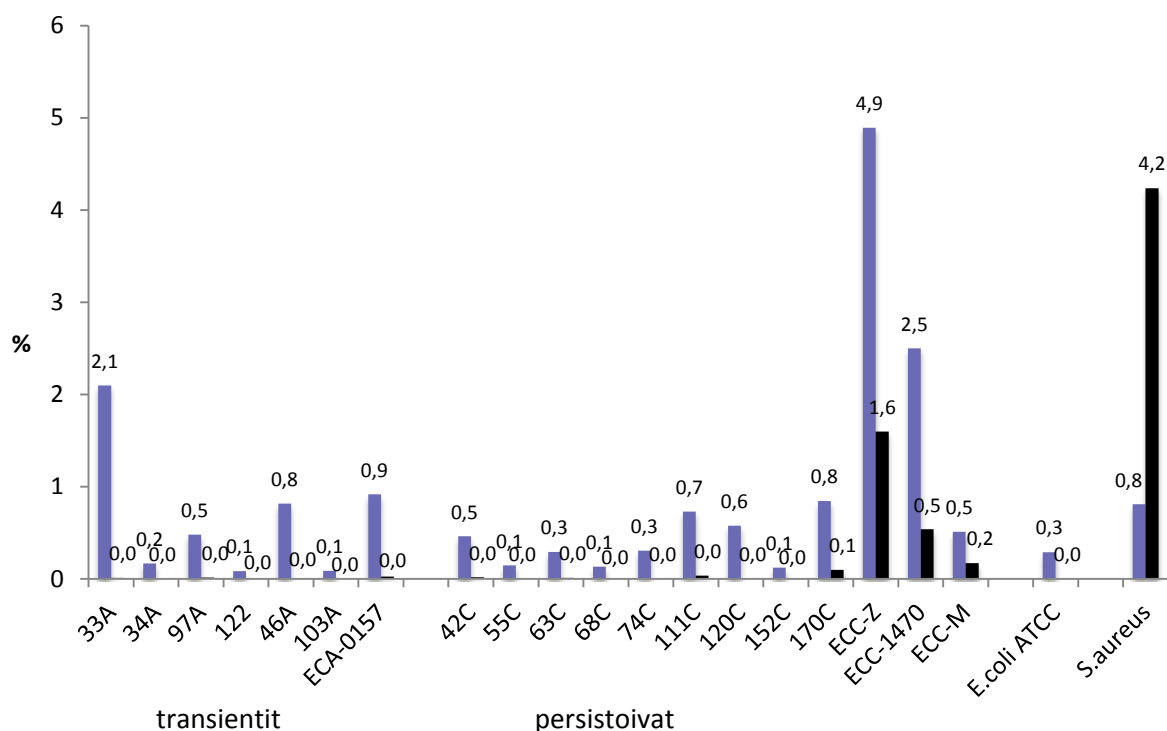
Tässä työssä negatiivisena kontrollina käytetyn ei-patogeenisen *E. coli* ATCC 25922 -kannan invaasioprosentti oli 0,01 % ja jos kaikki muut kannat normalisoidaan tällä negatiivisella kontrollilla (tulokset, jotka ovat suurempia kuin 0,01 % ovat merkittäviä), niin transienttien kantojen ryhmästä (n=7) invasoituvia kantoja on vain yksi kanta (14 % kannoista), sen sijaan persistoivista kannoista (n=12) invasoituvia kantoja on 6 (50 % kannoista).



KUVA 3. Tutkimuksessa käytettyjen *E. coli* -kantojen invaasio utare-epiteelisoluihin (invaasioprosentit).

Invaasiokokeiden tulokset analysoitiin aluksi myös lineaarisella sekamallilla, mutta aineiston tulokset eivät olleet normaalijakautuneita ja siitä johtuen tuloksia ei voitu pitää luotettavina. Tästä johtuen invaasiotulokset analysoitiin epäparametrisilla keskiarvotesteillä (Kruskal-Wallis ja Mann-Whitney). Kun kaikkia ryhmiä vertailtiin keskenään, p-arvoksi saatiin 0,339 ja transienttien ja persistoivien kantojen välillä p-arvo oli 0,447. Invaasiokokeiden tulokset ryhmien välillä eivät siis eronneet tilastollisesti.

Kuvassa 4. esitetään sekä adheesio- että invaasioprosentit. Kuvasta nähdään, että adheesio ja invaasio eivät korreloi toistensa kanssa eli sama kanta voi kiinnittyä hyvin utare-epiteelisoluihin, mutta ei mene tehokkaasti solujen sisään. Sen sijaan huonosti soluihin kiinnittyvä kanta voi invasoitua tehokkaasti. Tässä työssä kaikki tutkitut kannat kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin paremmin kuin invasoituivat, paitsi positiivinen kontrollikanta *S. aureus* 298, joka adheesoi kohtalaisesti, mutta invasoitui hyvin tehokkaasti. (Kuva 4.)



KUVA 4. Tutkimuksessa käytettyjen bakteerikantojen adheesio ■ ja invaasioprosentit ■.

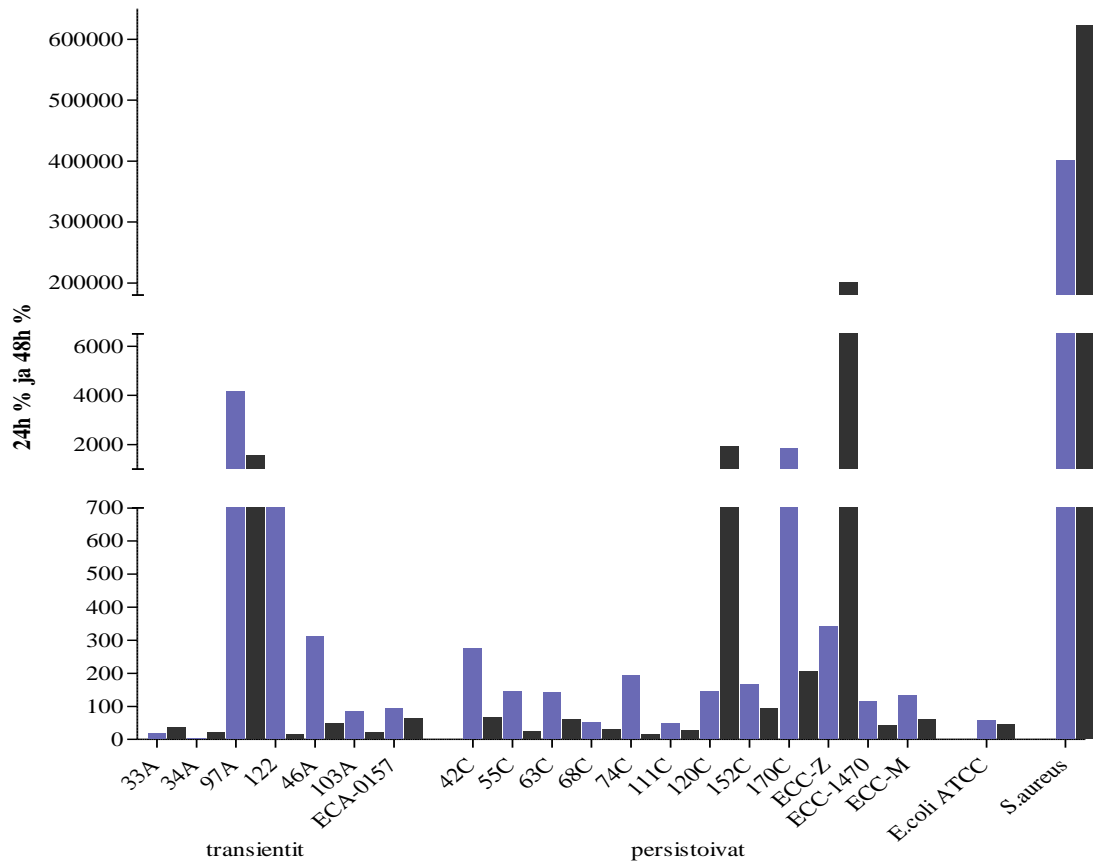
7.3 Solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen

Suuri osa *E. coli* -bakteereista ei selviytynyt hengissä utare-epiteelisolujen sisällä. 24 tunnin inkubaation jälkeen bakteerimäärät vaihtelivat välillä $8 - 1,1 \times 10^5$ pmy/ml ja 48 tunnin

jälkeen bakteeripitoisuudet olivat $25 - 7 \times 10^7$ pmy/ml. Negatiivisen kontrollin bakteerimäärä 24 tunnin jälkeen oli 150 pmy/ml ja 48 tunnin jälkeen 85 pmy/ml. Positiivinen kontrolli lisääntyi hyvin epiteelisoluissa ja sen pitoisuudet olivat 24 tunnin jälkeen $4,6 \times 10^8$ pmy/ml ja 48 tunnin jälkeen $6,6 \times 10^8$ pmy/ml. (Taulukko 5.)

Bakteereiden solunsisäinen lisääntyminen ja selviytyminen laskettiin prosentteina suhteessa invasoituneiden bakteereiden määrään. Bakteereiden selviytymisprosentit esitetään kuvassa 5. Arvot, jotka ovat alle 100 % tarkoittavat, että bakteerit eivät ole selvinneet hengissä utare-epiteelisolujen sisällä ja yli 100 %:n arvot voidaan tulkita bakteereiden lisääntymiseksi. *E. coli* ATCC ei lisääntynyt utare-epiteelisoluissa ja sen hengissä selviytymisprosentit olivat 57 % (24h) ja 46 % (48h) Positiivinen kontrolli *S. aureus* lisääntyi utare-epiteelisoluissa hyvin tehokkaasti sekä 24 tunnin että 48 tunnin jälkeen (400 778 % ja 622 771 %) (Taulukko 5.; Kuva 5.)

Transientit *E. coli* -kannat lisääntyivät utare-epiteelisoluissa huonosti, vain yksi (14 %) kanta, 97A osoitti selvästi solunsisäistä lisääntymiskykyä. Transientti 122-kanta lisääntyi utare-epiteelisoluissa 24 tunnin inkubaation jälkeen, mutta ei säilynyt hengissä utare-epiteelisoluissa enää 48 tunnin inkubaation jälkeen. Persistoivien kantojen ryhmästä kolme (25 %) kantaa lisääntyivät hyvin utare-epiteelisoluissa. Näistä kolmesta kannasta ECC-Z ja 120C lisääntyivät melko huonosti 24 tunnin jälkeen, mutta 48 tunnin jälkeen lisääntyminen oli 120C kannalla kohtalaista (1 912 %) ja erittäin voimakasta (200 933 %) ECC-Z kannalla. Sen sijaan 170C kanta lisääntyi hyvin 24 tunnin jälkeen, mutta lisääntyi huonosti 48 tunnin jälkeen.



KUVA 5. Tutkimuksessa käytettyjen *E. coli* -kantojen selviytyminen ja lisääntyminen utareepiteelisoluissa (pBMEC) 24 ■ ja 48 ■ tunnin ajan.

Myös solunsisäisen selviytymisen ja lisääntymisen (24h ja 48h) kokeiden tulokset analysoitiin lineaarisella sekamallilla, mutta nämä tulokset eivät olleet normaalijakautuneita, ja sen takia tulosten analysointiin käytettiin Kruskal-Wallis -ja Mann-Whitney -testejä. 24 tunnin kokeiden tulosten koko testin p-arvo oli tilastollisesti merkitsevä (p-arvo = 0,000), koska positiivinen kontrollikanta *S. aureus* 298 erosi tilastollisesti kaikista ryhmistä. Transienttien ja persistoivien kantojen välinen p-arvo oli 0,323 eli tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä. 48 tunnin kokeiden tulokset olivat samankaltaisia, koko testin p-arvo oli 0,000 ja transienttien ja persistoivien kantojen välille saatiin p-arvoksi 0,227.

8 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla persistoivien ja transienttien *Escherichia coli* -kantojen ominaisuuksia utare-epiteelisoluviljelmässä. Bakterikannat kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin, mutta adheesio vaihteli melko paljon kantojen välillä. Kantojen invaasio epiteelisoluihin oli melko vähäistä, kuten myös solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen. Vain yksi Yhdysvalloista peräisin oleva persistoiva *E. coli* -kanta osoittautui vahvasti invasiiviseksi ja kykeneväksi lisääntymään utare-epiteelisoluissa. Tutkimuksessa ei saatu tilastollisesti merkitsevää eroa persistoivien ja transienttien *E. coli* -kantojen välille adheesiossa, invaasiossa eikä solunsisäisessä selviytymisessä.

Työssä käytetty utare-epiteelisolumalli (pBMEC) toimi hyvin eikä solumallin käytössä ilmennyt suuria ongelmia. Myös käytetty solujen altistusmenetelmä vaikutti soveltuvan tutkimukseen hyvin. Menetelmän luonteesta ja bakteereiden monimuotoisuudesta johtuen rinnakkaisnäytteiden tulokset vaihtelivat paljon ja keskihajonta oli usein jopa suurempi kuin rinnakkaisnäytteiden keskiarvo. Suuren hajonnan vuoksi luotettavamman tuloksen saamiseksi altistuskokeita tulisi vielä toistaa useita kertoja.

Kaikki tutkimuksessa käytetyt bakterikannat kiinnittyivät utare-epiteelisoluihin, mutta adheesioprosentit vaihtelivat välillä 0,1 - 4,9 %. Adheesiokokeiden tulokset vastasivat hyvin aikaisempia tutkimustuloksia (Dogan ym. 2006; Döpfer ym. 2000) ja *E. coli* -bakterikantojen adheesion spesifisyyden ja tehokkuuden on aiemmin todettu vaihtelevan suuresti (Lammers ym. 2001). Döpfer ym. (2000) tutkimuksessa *E. coli* -kantojen adheesio utare-epiteelisoluihin oli riippuvainen bakteereiden lukumäärästä ja ajasta, jonka bakteerit olivat vuorovaikutuksessa solujen kanssa. Lisäksi tässä tutkimuksessa havaittiin, että *E. coli* -bakteerit kiinnittyivät epätasaisesti soluihin. (Döpfer ym. 2000.) Tällaista paikoitellen esiintyvää kiinnittymistä soluihin on aikaisemmin kuvattu esimerkiksi EPEC-kannoilla (Stone ym. 1996).

Lammers ym. (2001) tutkimuksessa todettiin, että suuri osa *E. coli* -kannoista kiinnittyivät tehokkaasti muovisiin solukasvatusalustoihin. Bakteereiden epäspesifinen kiinnittyminen kuoppalevyn pohjaan ja reunoille on voinut vaikuttaa tässä pro gradu -tutkimuksessa adheesiokokeiden tuloksiin. Adheesiokokeessa epiteelisoluihin kiinnittymättömät bakteerit yritettiin huuhtoa pois mahdollisimman hyvin toistamalla pesu viisi kertaa. Tehokkaista pesuista huolimatta bakteereita on kuitenkin voinut jäädä kuoppalevyn kuoppien reunoille,

mutta virhe on ollut systemaattinen, eli se on toistunut kaikissa näytteissä samankaltaisena. Kuitenkin Lammers ym. (2001) tutkimuksessa eri *E. coli* -kannoilla oli erilainen kyky kiinnittyä muoviin, joten epäspesifinen sitoutuminen on voinut olla joidenkin kantojen kohdalla suurempaa. Altistuskokeeseen olisi voinut lisätä ns. nollakontrollikuopan, johon olisi laitettu bakteereita ilman epiteelisoluja ja sen avulla olisi voinut parantaa tulosten luotettavuutta. Döpfer ym. (2000) käyttivät tutkimuksessaan kontrollikuoppaa, jonka avulla he pystyivät korjaamaan adheesiokokeen tulokset, poistamalla epäspesifisesti sitoutuneiden bakteereiden lukumäärän tuloksista.

Lisäksi adheesio-, invaasio ja selviytymiskokeiden tuloksia on voinut hieman vääristää se, että utare-epiteelisolut eivät kasvaneet koko kuopan pohjan pinta-alalla yksikerroksisena solumattona, vaan solut muodostivat solusaarekkeita ja osa kuopan pohjasta oli paljaana (kts. Strandberg ym. 2005). Kokeen tuloksiin ovat voineet vaikuttaa monenlaiset satunnaiset ja systemaattiset virheet ja joidenkin bakteerikantojen kohdalla virheet ovat voineet kumuloitua ja näin ollen vääristää tuloksia.

Tutkimuksessa käytetyt *E. coli* -kannat invasoituivat huonosti utare-epiteelisoluihin ja invaasioprosentit vaihtelivat välillä 0 – 1,6 %. Tehokkaasti invasoitui vain yksi persistoiva *E. coli* -kanta, joka oli Yhdysvalloista saatu bakteerikanta -ECC-Z. Positiivinen kontrollikanta *S. aureus* invasoitui kuitenkin kolme kertaa paremmin kuin *E. coli* -kanta. Tämän pro gradu -tutkimuksen tulokset ovat osin samansuuntaisia kuin muiden tutkimusten tulokset. Invaasiokokeiden tulosten suora vertailu aikaisempiin tutkimuksiin (Almeida ym. 2011; Dogan ym. 2006) on kuitenkin hankalaa, koska tulokset on esitetty eri tavalla ja koejärjestelyt ovat hieman erilaiset.

Dogan ym. (2006) tutkimuksessa kaikki transientit *E. coli* -kannat invasoituivat epiteelisoluihin huonommin kuin persistoivat kannat. Passey ym. (2008) ja Döpfer ym. (2001) tutkimuksissa osoitettiin, että persistoivat *E. coli* -kannat pystyivät invasoitumaan primaarisiin utare-epiteelisoluihin. Döpfer ym. (2000) tutkimuksessa selvisi, että persistoivat kannat invasoituivat kaksi kertaa paremmin ja kolme kertaa nopeammin utare-epiteelisoluihin kuin transientit kannat.

Solunsisäinen selviytyminen ja lisääntyminen olivat suhteellisen huonoa useimmilla *E. coli* -kannoilla. Transienteista kannoista yksi kanta selviytyi hengissä ja lisääntyi jonkin verran vielä 48 tunnin jälkeen ja yksi kanta lisääntyi 24 tunnin jälkeen, mutta ei enää 48 tunnin

inkubaation jälkeen. Persistoivista kannoista viisi kantaa lisääntyi 24 tunnin jälkeen, mutta näistä kannoista vain yksi kanta (ECC-Z) lisääntyi tehokkaasti vielä 48 tunnin jälkeen. Persistoivat *E. coli* -kannat selviytyivät ja lisääntyivät utare-epiteelisoluissa hieman paremmin kuin transientit kannat. Myös nämä solunsisäisen selviytymisen ja lisääntymisen tulokset ovat samansuuntaisia kuin muissa tutkimuksissa. Almeida ym. (2011) tutkimuksessa persistoiva *E. coli* -kanta (ECC-1470) selviytyi MAC-T soluissa 120 tuntia ja transientin *E. coli* -kannan bakteereita oli solujen sisällä 72 tunnin jälkeen enää hyvin niukasti. Döpfer ym. (2001) tutkimuksessa persistoivat *E. coli* -kannat (n=2) selviytyivät hengissä utare-epiteelisoluissa 5 päivää. Dogan ym. (2006) tutkimuksessa kaikki persistoivat kannat ja vain yksi transientti kanta lisääntyivät ja selvisivät hengissä utare-epiteelisolujen sisällä 48 tunnin ajan.

Invaasiokokeissa ja solunsisäisessä selviytymiskokeissa solun ulkopuolisten bakteereiden eliminointiin käytettiin gentamysiiniä. Kaikki tutkimuksessa käytetyt *E. coli* -kannat todettiin olevan herkkiä gentamysiinille eli gentamysiini esti bakteerikasvua vaaditulla tavalla. Myös kaikki Yhdysvalloista saadut *E. coli* -kannat olivat herkkiä gentamysiinille (Dogan ym. 2006). Tämän herkkyysmäärittäytystestin tulokset olivat samankaltaisia kuin aikaisemmissa tutkimuksissa saadut tulokset. Lehtolainen ym. (2003b) selvittivät utaretulehduksista eristettyjen *E. coli* -kantojen herkkyksiä antimikrobilääkkeille. Tässä tutkimuksessa kaikki käytetyt bakteerikannat olivat herkkiä gentamysiinille. Myös Kalmus ym. (2011) totesivat tutkimuksessaan, että 161 *E. coli* -kannasta 94,3 % oli herkkiä gentamysiinille. Tämän perusteella voidaan ajatella, että altistuskokeissa käytetty gentamysiini tuhosi solun ulkopuolella olleet bakteerit, eivätkä ne vaikuttaneet virheellisesti tuloksiin.

Tähän pro gradu -tutkimukseen haluttiin ottaa mukaan aiemmin tutkimuksissa (Dogan ym. 2006) käytettyjä persistoivia ja transientteja *E. coli* -kantoja, koska näiden persistoivien kantojen oli todettu kykenevän invasoitumaan epiteelisoluihin (MAC-T) ja selviytymään hengissä solujen sisällä. Lisäksi näin voitiin verrata keskenään eri maista alkuperää olevia kantoja samalla solumallilla. Tutkimuksessa havaittiin, että eri maista olevat kannat käyttäytyivät eri tavalla utare-epiteelisoluviivelmässä. Yhdysvalloista peräisin olevat persistoivat kannat invasoituivat huomattavasti paremmin kuin suomalaiset kannat, ja yksi persistoiva yhdysvaltalainen *E. coli* -kanta lisääntyi hyvin tehokkaasti utare-epiteelisoluissa.

Eri maista alkuperää olevien persistoivien *E. coli* -kantojen tehokkaampi invasoituminen ja solunsisäinen lisääntyminen voi johtua siitä, että Yhdysvalloissa *E. coli* on yleinen utaretulehdusten aiheuttaja ja bakteerit ovat kilpailutilanteessa joutuneet kehittämään itselleen

uusia virulenssitekijöitä ja -mekanismeja. Toinen mahdollinen selitys on se, että näissä tutkimuksissa käytetyt persistoivat ja transientit *E. coli* -kannat oli valikoitu tutkimuksiin niiden erikoisten ominaisuuksien vuoksi, eivätkä ne silloin edusta monimuotoista utaretulehduksia aiheuttavien *E. coli* -kantojen ryhmää.

Tässä pro gradu -tutkimuksessa persistoivien ja transienttien *E. coli* -kantojen välille ei saatu tilastollisesti merkitsevää eroa. Persistoivat kannat invasoituivat ja lisääntyivät utare-epiteelisoluissa hieman paremmin kuin transientit kannat, mutta ryhmien sisäkorrelaatio oli suuri eli kannat poikkesivat toisistaan hyvin paljon ryhmien sisällä. Tämä vaikutti siihen, että ryhmien väliset erot eivät tulleet esiin tilastollisissa analyyseissä. Muissa tutkimuksissa (Almeida ym. 2011; Dogan ym. 2006) persistoivien ja transienttien *E. coli* -kantojen välille oli saatu tilastollisesti merkitseviä eroja bakteereiden invaasioissa ja selviytymisessä. Dogan ym. (2006) tekivät tutkimustulosten tilastollisen analyysin eri tavalla. He vertailivat jokaista bakteerikantaa erikseen ja tällöin heidän tuloksiin ei vaikuttanut kantojen variaatio. Se, että ovatko persistoivat kannat parempia invasoitumaan ja lisääntymään solujen sisällä, vaatisi laajempaa tutkimusta suuremmalla aineistolla.

Aikaisemmin ajateltiin, että utaretulehduksia aiheuttavat *E. coli* -kannat ovat opportunistisia ympäristöstä peräisin olevia bakteereita, jotka eivät kykene invasoitumaan soluihin (Nemeth ym. 1994). Useat tutkimukset ovat myöhemmin osoittaneet sen, että *E. coli* -bakteerit, jotka voivat aiheuttaa persistoivia utaretulehduksia kykenevät invasoitumaan, elämään ja lisääntymään utare-epiteelisolujen sisällä (Almeida ym. 2011; Dogan ym. 2006; Döpfer ym. 1999). Vahvoja todisteita ei kuitenkaan ole siitä, että tämä kantojen kyky lisääntyä utare-epiteelisoluissa olisi persistoivien *E. coli* utaretulehdusten keskeinen syy. Persistoivista utaretulehduksista eristettyjen *E. coli* -kantojen adheesio- ja invaasiomekanismeja utare-epiteelisoluihin on tutkittu melko vähän ja tutkimuksissa käytettyjen bakteerikantojen lukumäärät ovat olleet todella pieniä (Döpfer ym. 2001; Döpfer ym. 2000).

Yksi todennäköinen syy siihen miksi toiset *E. coli* -kannat aiheuttavat kroonisia utaretulehduksia ja toiset akuutteja infektiota voi olla se, että persistoivat kannat ovat tehokkaammin sopeutuneet selviytymään utare-epiteelisoluissa (White ym. 2010). Näillä persistoivia utaretulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla on havaittu olevan sellaisia selviytymismekanismeja, joita ne voivat käyttää hyväkseen biofilmin muodostuksessa (Berry ym. 2009).

Tässä tutkimuksessa *E. coli* -bakteerin kantoja kasvatettiin laboratorioskasvatusliuoksessa (TSB). Luonnollisessa utaretulehduksessa bakteerit joutuvat kuitenkin lisääntymään ja säilymään hengissä maidossa. Lippolis ym. (2008) tutkimuksessa osoitettiin, että kliinisistä *E. coli* -utaretulehduksista eristetyt kannat ilmensivät eri geenejä, kun niitä kasvatettiin maidossa tai kasvatusliuoksessa. Jos tässä pro gradu -tutkimuksessa *E. coli* -kantoja olisi kasvatettu maidossa, niin solumalli olisi mallintanut paremmin luonnollisia olosuhteita.

Useissa *in vivo* -ja *in vitro* - utaretulehdustutkimuksissa on todettu, että *E. coli* saa aikaan hyvin vahvoja reaktioita lehmän immuunijärjestelmässä ja utare-epiteelisoluissa. Usein *E. coli* -utaretulehdus johtaa akuuttiin kliiniseen infektiin. Sen sijaan on osoitettu, että yleisesti kroonisia subkliinisiä eli piileviä utaretulehduksia aiheuttava *S. aureus* ei aiheuta lehmässä tai utare-epiteelisoluissa kovin vahvoja tulehdusreaktioita. (Yang ym. 2008; Petzl ym. 2008.) *S. aureus* voi elää utarerauhasessa hyvin pitkään, jopa koko naudan eliniän ajan (Yang ym. 2008). Yang ym. (2008) tutkimus osoitti, että *S. aureus* aiheutti utare-epiteelisoluissa alle 5 % siitä sytokiinien (IL-8 ja TNF- α) ilmentymisen määrästä, mitä *E. coli* aiheutti. Persistivät *E. coli* -utaretulehdukset ovat usein lievempiä kuin akuutit infektiot, joten olisi mielenkiintoista tutkia lehmän immuunijärjestelmän biokemiaa sekä *in vivo* että *in vitro* persistoivilla ja transienteilla *E. coli* -kannoilla.

E. coli -utaretulehduksen patogeenin tuntemus on lisääntynyt suuresti viimeisten kahden vuosikymmenen aikana. *E. coli* -bakteereiden aiheuttamien utaretulehdusten esiintyvyys ja vakavuus vaikuttaa liittyvän suurelta osin lehmään ja bakteerikannan virulenssitekijöillä on vain pieni merkitys taudin synnyssä (Bean ym. 2004; Burvenich ym. 2003). Useat tutkijat uskovat, että lehmän oman puolustusjärjestelmän nopeus ja tehokkuus ovat pääasiallisesti vastuussa siitä, syntyykö utaretulehdus ja kuinka vakava se on tai jääkö se persistoimaan (Bannerman ym. 2009).

Osa tutkijoista kuitenkin uskoo, että utaretulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -kannoilla on joitakin tekijöitä, jotka mahdollistavat niiden tunkeutumisen naudan utarekudokseen (Blum ym. 2008; Shpigel ym. 2008; Bradley & Green 2001). *E. coli* -bakteerit ovat osoittautuneet hyvin sopeutuvaisiksi erilaisiin ympäristöihin ja niiden kyky hankkia itselleen geneettistä materiaalia ja virulenssigeenejä tunnetaan hyvin (Dozois & Curtiss 1999). *E. coli* -bakteereiden taitavan virulenssigeenien hankintakyvyn uskotaan mahdollistavan niiden patogeenisyyden kehityksen (Chapman ym. 2006).

Utaretulehduksia aiheuttavat hyvin monet virulenssiltaan erilaiset bakteerilajit ja -kannat, joista osa on kehittynyt antibioottiresistenteiksi. Taudinaiheuttajan lisäksi utaretulehduksien syntyyn vaikuttavat useat ympäristö- ja lehmästä itsestään johtuvat tekijät. Lehmästä johtuvia tekijöitä ovat esimerkiksi lehmän poikimiskerrat, puolustusjärjestelmän toiminta ja se onko lehmä lypsävä vai ummessa. Ympäristötekijöillä kuten lypsy- ja navettahygienialla on myös suuri merkitys utaretulehdusten syntyyn.

Utaretulehdukset ovat maailmanlaajuisesti karjatalouden merkittävin ongelma, ja ne aiheuttavat paljon taloudellisia ja terveydellisiä vaikutuksia. Tämän takia on hyvin tärkeä tutkia kaikkia utaretulehduksiin liittyviä tekijöitä. *In vivo* -ja *in vitro* -utaretulehdustutkimuksilla saadaan tärkeää tietoa utaretulehdusten patogeneesista. Solumalleihin perustuvien menetelmien käyttö on hyvin perusteltua, koska niiden avulla saadaan helposti suuntaa antavaa tietoa esimerkiksi bakteereiden taudinaiheuttamiskyvystä. Utaretulehdusten riskien mallintamisen, arvioimisen, kohdennettujen ennaltaehkäisyohjelmien ja hyvin suunniteltujen hoitotoimenpiteiden avulla pystytään tulevaisuudessa todennäköisesti vähentämään utaretulehduksia. (Schukken ym. 2010.)

LÄHTEET

Aderem A & Ulevitch RJ, 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.

Alain KK, Niel AK, Thibault C, Jessika St-Pierre, Lessard M & Bissonnette N, 2009. Osteopontin: an early innate immune marker of *Escherichia coli* mastitis harbors genetic polymorphisms with possible links with resistance to mastitis. *BMC Genomics* 10: 444-461.

Almeida RA, Dogan B, Klaessing S, Schukken YH & Oliver SP, 2011. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Vet.Res.Commun.* 35: 89-101.

Almeida RA, Fang W & Oliver S, 1999. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. *FEMS Microbiol.Lett.* 177: 313-317.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee J, Zhao X, Hope JC & Rainard P, 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 11: 463-472.

Bannerman D, Rinaldi M, Vinyard B, Laihia J & Leino L, 2009. Effects of intramammary infusion of cis-urocanic acid on mastitis-associated inflammation and tissue injury in dairy cows. *Am.J.Vet.Res.* 70: 373-382.

Bean A, Williamson J & Cursons RT, 2004. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J.Vet.Med.* 51: 285-287.

Berry RE, Klumpp DJ & Schaeffer AJ, 2009. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 77: 2762-2772.

Blum S, Heller ED, Krifucks O, Sela S, Hammer-Muntz O & Leitner G, 2008. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Vet.Microbiol.* 132: 135-148.

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE & Green MJ, 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet.Rec.* 160: 253-257.

Bradley AJ, 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet J.* 164: 116-128.

Bradley A & Green M, 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J.Clin.Microbiol.* 39: 1845-1849.

Buitenhuis B, Rontved CM, Edwards SM, Ingvarsen KL & Sorensen P, 2011. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. *BMC Genomics* 12: 130-140.

Burvenich C, Paape MJ, Hoeben D, Dosogne H, Massart-Leen AM & Blum J, 1999. Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domest.Anim.Endocrinol.* 17: 149-159.

- Burvenich C, 2003. Severity of *E-coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet.Res.* 34: 521-564.
- Calvinho LF & Oliver SP, 1998. Factors influencing adherence of *Streptococcus dysgalactiae* to bovine mammary epithelial cell monolayers. *J Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 45: 161-170.
- Caruso M, Mariotti A, Zizzadoro C, Zaghini A, Ormas P, Altafini A & Belloli C, 2009. A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicon* 53: 400-408.
- Chapman TA, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M & Chin J, 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl.Environ.Microbiol.* 72: 4782-4795.
- Cifrian E & Marquardt WW, 1994. Adherence of *Staphylococcus-aureus* to cultured bovine mammary epithelial-cells. *J.Dairy Sci.* 77: 970-983.
- Clermont O, Bonacorsi S & Bingen E, 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl.Environ.Microbiol.* 66: 4555-4558.
- Correa MGP & Marin JM, 2002. O-serogroups, eae-gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet.Microbiol.* 85: 125-132.
- Coulon JB, Gasqui P, Barnouin J, Ollier A, Pradel P & Pomies D, 2002. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research* 51: 383-393.
- Croxen MA & Finlay B, 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat.Rev. Microb.* 8: 26-38.
- Cullor JS & Smith W, 1996. Endotoxin and disease in food animals. *Compedium on continuing education for the practicing veterenarian* 18: 31-39
- De Schepper S,S., De Ketelaere AA, Bannerman DD, Paape MJ, Peelman LL & Burvenich CC, 2008. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet.Res.* 39: 5-28.
- Dego KO, Oliver SP & Almeida RA, 2011. Host - Pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. *Vet.Microbiol.* 8: 16-23
- Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP, Simpson K & Schukken YH, 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet.Microbiol.* 116: 270-282.
- Döpfer D, Almeida R, Lam T, Nederbragt H, Oliver S & Gaastra W, 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis *in vitro*. *Vet.Microbiol.* 74: 331-343.
- Döpfer D, Barkema H, Lam T, Schukken Y & Gaastra W, 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J.Dairy Sci.* 82: 80-85.

Döpfer D, Nederbragt H, Almeida RA & Gaastra W, 2001. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet.Microbiol.* 80: 285-296.

Dozois CM & Curtiss R, 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet.Res.* 30: 157-179.

Dufour D, Germon P, Brusseau E, Le Roux Y & Dray A, 2011. First evidence of the presence of genomic islands in *Escherichia coli* P4, a mammary pathogen frequently used to induce experimental mastitis. *J.Dairy Sci.* 94: 2779-2793.

Escobar-Paramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D & Denamur E, 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ.Microbiol.* 8: 1975-1984.

Esslemont RJ & Kossaibati M, 1997. Culling in 50 dairy herds in England. *Vet.Rec.* 140: 36-39.

Finlay BB & Falkow S, 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136-169.

Ghanbarpour R & Oswald E, 2010. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Res.Vet.Sci.* 88: 6-10.

Girardeau JP, Lalioui LL, Said AMO, De Champs CC & Le Bouguéneq CC, 2003. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the afa-8 operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J.Clin.Microbiol.* 41: 218-226.

Gonen E, Vallon-Eberhard A, Elazar S, Harmelin A, Brenner O, Rosenshine I, Jung S & Shpigel N, 2007. Toll-like receptor 4 is needed to restrict the invasion of *Escherichia coli* P4 into mammary gland epithelial cells in a murine model of acute mastitis. *Cell.Microbiol.* 9: 2826-2838.

Green MJ, Green LE, Schukken YH, Bradley AJ, Peeler EJ, Barkema HW, de Haas Y, Collis VJ & Medley GF, 2004. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J.Dairy Sci.* 87: 1256-1264.

Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I & Shpigel NY, 2008. beta -Hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 76: 2802-2807.

Günther J, Liu S, Esch K, Schuberth H & Seyfert H, 2010. Stimulated expression of TNF-alpha and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 135: 152-157.

Günther J & Seyfert H, 2011. Comparative Kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-Specific Activation of Key Immune Pathways in Mammary Epithelial Cells Demonstrates That *S. aureus* Elicits a Delayed Response Dominated by Interleukin-6 (IL-6) but Not by IL-1A or Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infect.Immun.* 79: 695-707.

- Günther J & Seyfert H, 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet.Res.* 40: 31-44.
- Harper M, Turvey A & Bramley A, 1978. Adhesion of fimbriate *Escherichia-coli* to bovine mammary-gland epithelial-cells *in vitro*. *J.Med.Microbiol.* 11: 117-125.
- Hensen SM, Pavicic M, Lohuis J & Poutrel B, 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J.Dairy Sci.* 83: 418-429.
- Hill AW, Heneghan DJS & Williams MR, 1983. The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated *Escherichia coli*. *Vet.Microbiol.* 8: 293-300.
- Hogan J & Smith KL, 2003. Coliform mastitis. *Vet.Res.* 34: 507-519.
- Hortet P & Seegers H, 1998. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev.Vet.Med.* 37: 1-20.
- Huynh HT, Robitaille G & Turner JD, 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an *in vitro* model for bovine lactation. *Exp.Cell Res.* 197: 191-199.
- Hyvönen P, Käyhkö S, Taponen S, von Wright A & Pyörälä S, 2009. Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative staphylococci into bovine mammary epithelial cells under *in-vitro* conditions. *J.Dairy Res.* 76: 144-151.
- Ibeagha-Awemu E, Lee J, Ibeagha A, Bannerman D, Paape M & Zhao X, 2008. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet.Res.* 39: 11-23.
- Kaipainen T, Pohjanvirta T, Shpigel NY, Shwimmer A, Pyörälä S & Pelkonen S, 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet.Microbiol.* 85: 37-46.
- Kalmus P & Kask K, 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet.Scand.* 53: 4-11.
- Kaper JB, 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140.
- Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S & Mäntysaari E, 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* 57: 89-96.
- Kornalijnslijper JE, Daemen A, Van Werven T, Niewold T, Rutten V & Noordhuizen-Stassen E, 2004. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. *Vet.Microbiol.* 101: 177-186.
- Kornalijnslijper JE, Van Werven T, Daemen A, Van Den Broek J, Niewold T, Rutten V & Noordhuizen-Stassen E, 2003. *In vitro* growth of mastitis-inducing *Escherichia coli* in milk and milk fractions of dairy cows. *Vet.Microbiol.* 91: 125-134.

- Kossaibati MA & Esslemont RJ, 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* 154: 41-51.
- Kozłowski M, Gajewska M, Majewska A, Jank M & Motyl T, 2009. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *J. Physiol. Pharmacol.* 60: 5-14.
- Kutilla T, Suojala L, Lehtolainen T, Saloniemi H, Kaartinen L, Tahti M, Seppälä K & Pyörälä S, 2004. The efficacy of bovine lactoferrin in the treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J.Vet.Pharmacol.Ther.* 27: 197-202.
- Käyhkö S, 2008. Koagulaasi-negatiivisten stafylokokkien adheesio, invaasio ja lisääntyminen sekä laktoferriniin vaikutus *in vitro* utare-epiteelisoluilla. Pro gradu -tutkielma. 60 s. Biotieteiden laitos, Kuopion yliopisto, Kuopio. Suomi
- Lahouassa H, Moussay E, Rainard P & Riollet C, 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 38: 12-21.
- Lam T & Brand A, 1996. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am.J.Vet.Res.* 57: 39-42.
- Lammers A, van Vorstenbosch C, Erkens J & Smith H, 2001. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Vet.Microbiol.* 80: 255-265.
- Le Bouguenec C & Bertin Y, 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet.Res.* 30: 317-342.
- Lehtolainen T, Pohjanvirta T, Pyörälä S & Pelkonen S, 2003a. Association Between Virulence Factors and Clinical Course of *Escherichia coli* Mastitis. *Acta Vet.Scand.* 44: 203-205
- Lehtolainen T & Pyörälä S, 2003b. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. *J.Dairy Sci.* 86: 3927-3932.
- Lehtolainen T, 2004. *Escherichia coli* mastitis: bacterial factors and host response. 62 s. PhD-thesis. Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi.
- Lipman L, de Nijs A & Gaastra W, 1995b. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Vet.Microbiol.* 47: 1-7.
- Lipman L, Denijs A, Lam T & Gaastra W, 1995a. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet.Microbiol.* 43: 13-19.
- Lippolis JD & Reinhardt T, 2009. Proteomic Changes in *Escherichia coli* when grown in fresh milk versus laboratory media. *J. Proteome Res.* 8: 149-158.

- Liu B, Perepelov A, Guo D, Shevelev S, Senchenkova S, Feng L, Shashkov A, Wang L & Knirel Y, 2010. Structural and genetic relationships between the O-antigens of *Escherichia coli* O118 and O151. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 60: 199-207.
- Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, Zerbe H & Blum H, 2010. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 11: 138-154
- Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirvelä-Koski V, Honkanen-Buzalski T, Junttila J, Kulkas L, Myllykangas O, Niskanen M, Saloniemi H, Sandholm M & Saranpää T, 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 - Changes in Prevalence and Antimicrobial Resistance. *Acta Vet.Scand.* 39: 119-126.
- Myllys V, Honkanen-Buzalski T, Huovinen P, Sandholm M & Nurmi IE, 1994. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Vet.Scand.* 35: 363-369.
- Nataro J & Kaper J, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* 11: 142-201.
- Nemeth J, Muckle C & Gyles C, 1994. *In vitro* comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet.Microbiol.* 40: 231-238.
- Nemeth J, Muckle C & Lo R, 1991. Serum resistance and the *traT* gene in bovine mastitis-causing *Escherichia coli*. *Vet.Microbiol.* 28: 343-351.
- Nevala M, Taponen S & Pyörälä S, 2004. Naudan kliinisen utaretulehduksen bakteerietiologia Saaren ambulatoirisen klinikan aineisto vuosilta 2002-2003. *Suomen eläinlääkärilehti* 110: 363-366
- Ogola H, Shitandi A & Nanua J, 2007. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci.* 8: 237-242.
- Opdebeeck J, Frost A & O'Boyle D, 1988. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet.Microbiol.* 16: 77-86.
- Passey S, Bradley A & Mellor H, 2008. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Vet.Microbiol.* 130: 151-164.
- Paulrud C, 2005. Basic Concepts of the Bovine Teat Canal. *Vet.Res.Comm.* 29: 215-245.
- Pecorini C, Sassera D, Rebucci R, Saccone F, Bandi C & Baldi A, 2010. Evaluation of the protective effect of bovine lactoferrin against lipopolysaccharides in a bovine mammary epithelial cell line. *Vet.Res.Comm.* 34: 267-276.
- Waller PK, Colditz IG, Lun S & Östensson K, 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res.Vet.Sci.* 74: 31-36.
- Petzl WW, Zerbe HH, Günther JJ, Yang WW, Seyfert HH, Nürnberg GG & Schuberth HH, 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet.Res.* 39: 18.

- Pezeshki AA, Stordeur PP, Wallemacq HH, Schynts FF, Stevens MM, Boutet PP, Peelman LJ, De Spiegeleer BB, Duchateau LL, Bureau FF & Burvenich CC, 2011. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. *Vet.Res.* 42: 15-25
- Picard B, Garcia J, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J & Denamur E, 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect.Immun.* 67: 546-553.
- Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V & Honkanen-Buzalski T, 2004. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J.Dairy Sci.* 87: 2433-2441.
- Pyörälä S, 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet.Res.* 34: 565-578
- Rinaldi M, Robert WL, Bannerman DD, Daniels KM, Christina Evock-Clover, Marcos VBS, Paape MJ, Bernadette VR, Burvenich C & Capuco AV, 2010. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct. Integr. Genomics* 10: 21-38
- Riollet C, Rainard P & Poutrel B, 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 7: 161-167.
- Salonen M, Hirvonen J, Pyörälä S, Sankari S & Sandholm M, 1996. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Res.Vet.Sci.* 60: 88-91.
- Schukken YH, Bar D, Hertl J & Gröhn YT, 2010. Correlated time to event data: Modeling repeated clinical mastitis data from dairy cattle in New York State. *Prev.Vet.Med.* 97: 150-156.
- Seegers H, Fourichon C & Beaudeau F, 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet.Res.* 34: 475-491.
- Shpigel NY, Winkler M, Ziv G & Saran A, 1998. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Prev.Vet.Med.* 35: 1-9.
- Shpigel NY & Rosenshine I, 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Microbiol.* 11: 60-65.
- Shuster DE, Kehrli ME, Rainard P & Paape M, 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 65: 3286-3292.
- Shuster DE, Kehrli ME & Stevens MG, 1993. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 54: 80-85.
- Shuster DE, Lee E & Kehrli MJ, 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1569-1575.

- Smith K & Hogan J, 1993. Environmental mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* 9: 489-498.
- Smith KL, Todhunter DA & Schoenberger P, 1985. Environmental mastitis - cause, prevalence, prevention. *J.Dairy Sci.* 68: 1531-1553.
- Smits E, Burvenich C, Guidry A & Massart-Leen A, 2000. Adhesion receptor CD11b/CD18 contributes to neutrophil diapedesis across the bovine blood-milk barrier. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 73: 255-265.
- Smits E & Paape M, 1996. Cell culture system for studying bovine neutrophil diapedesis. *J.Dairy Sci.* 79: 1353-1360.
- Song XM, Perez-Casal J & Potter A, 2004. The Mig protein of *Streptococcus dysgalactiae* inhibits bacterial internalization into bovine mammary gland epithelial cells. *FEMS Microbiol.Lett.* 231: 33-38.
- Stenutz R, Weintraub A & Widmalm G, 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol.Rev.* 30: 382-403.
- Stone K, Zhang H, Carlson L & Donnenberg M, 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol.Microbiol.* 20: 325-337.
- Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M & Tellam R, 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31: 72-86.
- Suojala L, 2010. Bovine mastitis caused by *Escherichia coli*: clinical, bacteriological and therapeutic aspects. 60 s. PhD -thesis. Helsingin Yliopisto, Helsinki, Suomi.
- Suojala L, Orro T, Hanna Järvinen, Saatsi J & Satu Pyörälä, 2008. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet.Scand.* 50: 18-28.
- Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, Myllyniemi A, Pitkälä A, Pelkonen S & Pyörälä S, 2011. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet.Microbiol.* 147: 383-384.
- Sutra L & Poutrel B, 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J.Med.Microbiol.* 40: 79-89.
- Takamatsu D, Hata E, Osaki M, Aso H, Kobayashi S & Sekizaki T, 2008. Role of SraP in adherence of *Staphylococcus aureus* to the bovine mammary epithelia. *J.Vet. Med. Sci* 70: 735-738.
- Takeda K & Akira S, 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 17: 1-14.
- Tamilselvam B, Almeida R, Dunlap J & Oliver S, 2006. *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microb.Pathog.* 40: 279-285.

- Todhunter DA, Smith K, Hogan J & Schoenberger P, 1991. Gram-negative bacterial-infections of the mammary-gland in cows Am.J.Vet.Res. 52: 184-188.
- Vangroenweghe F, 2004. Experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in lactating primiparous cows. 243 s. PhD -thesis. Ghent University, Belgium.
- Vangroenweghe F, Duchateau L & Burvenich C, 2004. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. J.Dairy Sci. 87: 886-895
- Van Oostveldt K, Paape M & Burvenich C, 2002. Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells. J.Dairy Sci. 85: 139-147.
- Wang Y & Baumrucker CR, 2010. Retinoids, retinoid analogs, and lactoferrin interact and differentially affect cell viability of 2 bovine mammary cell types *in vitro*. Domest. Anim. Endocrinol. 39: 10-20.
- Wellnitz O & Kerr D, 2004. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. Vet.Immunol.Immunopathol. 101: 191-202.
- Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP & Magnuson RJ, 2006. *Escherichia coli* isolates, serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. J.Dairy Sci. 89: 3408-3412.
- White LJ & Medley G, 2010. Modelling the dynamics of intramammary *E. coli* infections in dairy cows: understanding mechanisms that distinguish transient from persistent infections. Vet.Res. 41: 13-29.
- Wilesmith JW, Francis PG & Wilson CD, 1986. Incidence of clinical mastitis in a cohort of British dairy herds. Vet.Rec. 118: 199-204.
- Wilson DJ, Mallard BA, Burton JL, Schukken YH & Gröhn YT, 2009. Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. Clin. Vaccine Immunol. 16: 209-217.
- Wilson DJ, Mallard BA, Burton JL, Schukken YH & Gröhn YT, 2007. Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccinate and control cows. Clin. Vaccine Immunol. 14: 693-699.
- Yancey RJR, 1999. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. Adv.Vet. Med. 41: 257-273.
- Yang W & Seyfert H, 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E-coli*, but *S-aureus* fails to both activate NF-kappa B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF alpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. Mol.Immunol. 45: 1385-1397.
- Yang W, Molenaar A, Kurts-Ebert B & Seyfert H, 2006. NF-κB factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine β-defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. Mol.Immunol. 43: 210-225.

Zadoks RR & Fitzpatrick JJ, 2009. Changing trends in mastitis. *Ir.Vet.J.* 62: 59-70.

Zavizion B, Van Duffelen M, Schaeffer W & Politis I, 1996. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 32: 138-148.

Zhao X & Lacasse P, 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J.Anim.Sci.* 86: 57-65.

Zhou Y, Capuco AV & Jiang H, 2008. Involvement of connective tissue growth factor (CTGF) in insulin-like growth factor-I (IGF1) stimulation of proliferation of a bovine mammary epithelial cell line. *Domest. Anim.Endocrinol.* 35: 180-189.