

**SEEPRAKALA PNEUMOKOKKI-INFEKTION  
TUTKIMUSMALLINA**

Lilli Rantala

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteellisen teknologian instituutti

Kokeellisen immunologian tutkimusryhmä

10/2010

Tampereen yliopisto  
Lääketieteellisen teknologian instituutti  
Kokeellisen immunologian tutkimusryhmä

RANTALA LILLI: SEEPRAKALA PNEUMOKOKKI-INFEKTION  
TUTKIMUSMALLINA

Kirjallinen työ, 18 s.

Ohjaajat: professori Mikä Rämetsä ja lääketieteen tohtori Samuli Rounioja

Lokakuu 2010

---

Avainsanat: *Streptococcus pneumoniae*, infektiomalli, *Danio rerio*

*Streptococcus pneumoniae* on merkittävä taudinaiheuttaja ihmisessä; vuosittain yli miljoona lasta, pääasiassa kehitysmaissa, kuolee pneumokokki-infektioihin. Serotyypispesifiset pneumokokkirokotukset ovat vähentäneet invasiivisia tautimuotoja, mutta toisaalta korvautumisilmiön myötä muiden serotyypien aiheuttamat taudit ovat lisääntyneet. Myös pneumokokin antibioottiresistenssi lisääntyy uhkaavasti.

Pneumokokin ja sen virulenssitekijöiden tarkemman tutkimisen myötä voitaisiin löytää parempia hoitomuotoja ja ennaltaehkäisy menetelmiä. Seeprakala on monien edullisten ominaisuuksiensa vuoksi noussut suosituksi tutkimusmalliksi. Viime vuosien aikana sitä on käytetty onnistuneesti myös infektiomallina useille ihmisen patogeeneille.

Tässä tutkimuksessa todettiin, että pneumokokin injektio seeprakalan alkion verenkiertoon aiheuttaa kalojen bakteeriannoksen suuruudesta riippuvaisen kuolleisuuden. Pneumokokki pystyy aiheuttamaan tappavan taudin seeprakalan alkioiden selviytyminen on riippuvaista niiden immuunipuolustuksen kyvystä eliminoida bakteeri verenkierrostaan. Seeprakala pystyy siis puolustautumaan pneumokokkia vastaan. Pneumokokin mutanttikannat, esimerkiksi kapseliton muoto, osoittavat heikentynyttä virulenssia. Injektoituna kalan alkioiden verenkiertoon pneumokokin mutanttikannat aiheuttavat suuremman eloonjäämisasteen kuin pneumokokin villikanta. Seeprakalassa voidaan siis tutkia myös pneumokokin virulenssitekijöitä.

# SISÄLLYS

## 1 JOHDANTO

- 1.1 Pneumokokki taudinaiheuttajana
- 1.2 Seeprakala tutkimusmallina
- 1.3 Seeprakalan immuunipuolustus

## 2 TUTKIMUSMETODIT

- 2.1 Bakterikanta ja kasvuolosuhteet
- 2.2 Kalakannat ja alkioiden valmistelu
- 2.3 Injektointi
- 2.4 Alkioiden seuranta
- 2.5 Bakteerimäärien laskenta kaloista
- 2.6 Tilastolliset menetelmät

## 3 TULOKSET

- 3.1 Pneumokokin aiheuttama infektio seeprakalassa
- 3.2 Bakteerien ominaisuudet, jotka vaikuttavat virulenssiin kalassa

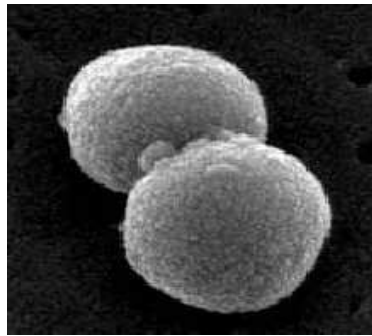
## 4 POHDINTA

## LÄHTEET

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Pneumokokki taudinaiheuttajana

Pneumokokki (*Streptococcus pneumoniae*) on Gram-positiivinen, pareittain esiintyvä kokkibakteeri (kuva 1). Pneumokokin virulenssi aiheutuu pääosin sen pinnan polysakkaridikapselin kyvystä vastustaa fagosytoosia. Polysakkarideja tunnetaan 90 erilaista, joista kuitenkin vain 23:a pidetään yleisinä taudinaiheuttajina. [1]

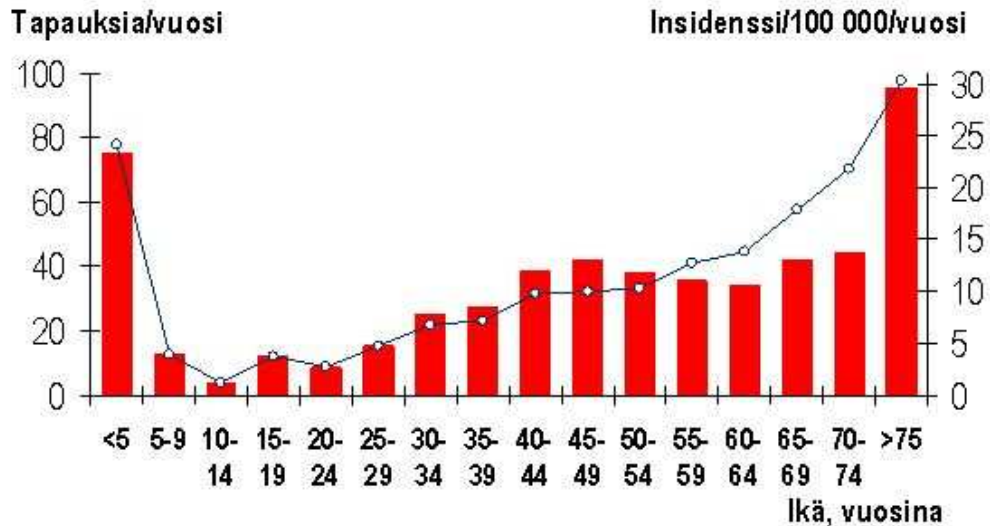


*Kuva 1. Streptococcus pneumoniae [2]*

Pneumokokki leviää pisaratartuntana. Usein pneumokokin aiheuttamissa hengitystieinfektioissa virusinfektio on ensin vaurioittanut limakalvoa, jolloin pneumokokki pääsee helpommin tunkeutumaan ympäröiviin kudoksiin. Tätä kokkibakteeria esiintyykin nielun normaalifloorassa; jopa 5–10 % terveistä aikuisista on oireettomia kantajia. [1]

Pneumokokki on merkittävä taudinaiheuttaja ihmisessä. Rokotteista ja antibiooteista huolimatta yli miljoona lasta kuolee pneumokokki-infektioihin vuosittain, suurin osa heistä kehitysmaissa. Pneumokokki on yleisin hengitystieinfektioita ja lasten välikorvatulehduksia aiheuttava bakteeri. Se aiheuttaa myös vakavampia infektioita, kuten verenmyrkytystä ja aivokalvotulehdusta. Aivokalvotulehduksessa ennuste on edelleen varsin synkkä. Harvinaisempia pneumokokin aiheuttamia tauteja ovat sydämen sisäkalvon tulehdus, märkäinen niveltulehdus ja vatsakalvotulehdus. [1]

Vakavien pneumokokki-infektioiden ilmaantuvuus on suurin lapsilla ja vanhuksilla (kuva 2). Lasten alttius infektioille selittyy anatomisilla seikoilla sekä immuunijärjestelmän kypsyttömyydellä. Vanhukset puolestaan sairastavat infektioita immuunijärjestelmän heikkenemisen ja runsaiden perustautien altistamana. [1]



**Kuva 2.** *Pneumokokkitautien keskimääräinen ilmaantuvuus ikäryhmittäin Suomessa vuosina 1995–2004. [3]*

Pneumokokkirokotteiden teho perustuu siihen, että bakteerin kapselia vastaan syntyneet vasta-aineet suojaavat vakavilta infektioilta [4]. Suomessa aikuisille on käytössä pneumokokkipolysakkaridirokote, joka sisältää 23 yleisintä kapselityyppiä. Polysakkaridirokotteen on todettu ehkäisevän 50–80 % vakavista pneumokokin aiheuttamista infektioista terveillä aikuisilla. [5]

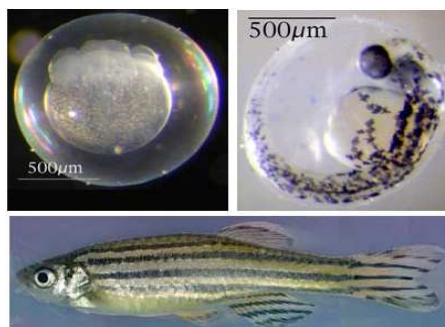
Alle 2-vuotiaiden elimistö ei muodosta vasta-aineita pneumokokin kapselirakenteita vastaan. Lapsille tarkoitettussa pneumokokki-konjugaattirokotteessa polysakkaridit onkin liitetty kantajaproteiiniin. Kantajaproteiini lisää rokotteen tehoa huomattavasti alle 2-vuotiailla. 1.9.2010 Suomen kansalliseen rokotusohjelmaan lisättiin lasten 10-valenttinen pneumokokki-konjugaattirokote [6]. Rokote antaa suojaa kymmentä yleisintä pneumokokki serotyyppiä vastaan. Yhdysvaltalaisen tutkimuksen mukaan konjugaattirokote estää 97 % yleistyneistä pneumokokkitaudeista. Toisaalta rokotteeseen kuulumattomien serotyyppien aiheuttamat tautimuodot saattavat

lisääntyä. Ilmiötä kutsutaan korvautumisilmiöksi (serotype replacement) [7]. Konjugaattirokotteen suojateho lieviä tulehduksia vastaan ei ole yhtä hyvä. Tampereen seudulla vuonna 2001 tehdyssä tutkimuksessa rokotteen suojateho pneumokokista johtuvia korvatulehduksia vastaan oli 34 %. [5]

Penisilliini on edelleen ensisijainen lääke pneumokokki-infektioiden hoidossa. Antibioottiresistenssi on viime aikoina lisääntynyt huolestuttavasti, ja se tekee pneumokokista entistä tärkeemmän tutkimuskohteen. Pneumokokin penisilliiniresistenssi perustuu muutoksiin bakteerin penisilliiniä sitovissa proteiineissa [1]. Bakteerin solukalvolla sijaitseva pumppumeکانismi pumppaa lääkettä aktiivisesti ulos ja näin lisää resistenssiä [8]. Suurin osa penisilliinille resistenteistä pneumokokeista on resistenttejä myös muille mikrobilääkkeille, kuten makrolideille, tetrasykliineille, sulfatrimetopriimille ja kloramfenikolille [1].

## 1.2 Seeprakala tutkimusmallina

Seeprakala (*Danio rerio*) kuuluu leukakaloihin (kuva 3). Sillä on sekä synnynnäinen että hankinnainen immunitetti, joiden mekanismit ovat säilyneet evoluution aikana lähes muuttumattomina kaloista ihmiseen saakka. Seeprakalalla on myös useita muita edullisia ominaisuuksia, joiden ansiosta se on viime aikoina noussut suosituksi mallieläimeksi. Seeprakalan alkionkehitystä on helppo seurata, sillä kalanpoikanen kehittyy kohdun ulkopuolella ja on kehityksen alkuvaiheessa läpinäkyvä. Lisäksi kehitys etenee nopeasti; kaikki elimet ovat kehittyneet 48 tunnin kuluttua hedelmöityksestä. [9]



**Kuva 3.** Seeprakala ylhäällä vasemmalla 90 minuutin ikäisenä, ylhäällä oikealla kahden päivän ikäisenä, alhaalla aikuisena [10]

Seeprakala on kooltaan pieni ( $\leq 5$  cm). Se tulee sukukypsäksi kolmen kuukauden iässä, ja sen jälkeläisten tuotto on nopeaa: 200–300 poikasta viikossa. Edellä mainitut asiat mahdollistavat helpommin laajemmat tutkimukset seeprakalalla kuin useimmilla muilla selkärangkaisilla eläimillä, kuten esimerkiksi hiirellä. Lisää mielenkiintoa seeprakalatutkimuksiin tuo se, että seeprakalan geneettinen manipulointi on suhteellisen helppoa. Myös eettiset syyt puoltavat seeprakalan käyttöä tutkimusmallina. Yleisenä periaatteena tulee olla, että tutkimuksen mallieläimeksi valitaan neurofysiologiselta kehitykseltään mahdollisimman alkeellinen laji. [9]

Seeprakalaa on jo aiemmin käytetty kehitysbiologisena sekä biolääketieteellisenä tutkimusmallina. Viime aikoina seeprakalan käyttö myös immunologisessa tutkimuksessa on lisääntynyt. Seeprakalaa on jo käytetty infektiomallina esimerkiksi seuraaville ihmisessä tautia aiheuttaville mikrobeille: *Pseudomonas aeruginosa* [11], *Staphylococcus aureus* [12], *Salmonella typhimurium* [13].

### 1.3 Seeprakalan immuunipuolustus

Seeprakalalla on sekä synnynnäinen että hankinnainen immunitetti. Hahmontunnistusreseptorit kuuluvat synnynnäiseen immunitettiin ja ne havaitsevat kalan elimistöön päässeän patogeenin ensimmäiseksi. Seeprakalan genomissa on vastine jokaiselle ihmisen hahmontunnistusreseptorille sekä lisäksi kaksi kalaspesifistä reseptoria. Patogeenin sitoutuminen reseptoriin käynnistää tulehdusvälittäjäaineiden tuotannon. Tulehdusvälittäjäaineet saavat aikaan akuutin vaiheen proteiinien tuotannon lisääntymisen. Seeprakalalta on löydetty vastineita ihmisen akuutin vaiheen proteiineille, esimerkiksi CRP ja seerumin amyloidi A. Kuten ihmisellä myös seeprakalalla synnynnäisen immunitetin välittämään tulehdusreaktioon sisältyy komplementin aktivaatio. Komplementin aktivaation tavoite on rikkoa patogeenin solukalvo tai opsonisoida patogeeni fagosytoosin helpottamiseksi. Lisäksi seeprakalalla on ihmisen makrofageja ja granulosyyttejä vastaavia soluja. [9]

Hankinnaisen immunitetin soluista antigeenia esittelevät solut, kaloilla monosyytit, makrofagit ja dendriittisolut [14], kohtaavat patogeenin

ensimmäiseksi. Antigeenia esittelevien solujen tehtävänä on fagosytoida patogeeni ja hajottaa se peptideiksi. Patogeenin peptidit kulkeutuvat sitten antigeenia esittelevien solujen pinnalle ja sitoutuvat MHC-molekyyleihin. Seeprakalan hankinnaiseen immuniteettiin kuuluvat T- ja B-solut, joiden toiminta muistuttaa ihmisen T- ja B-solujen toimintaa. [9]

Seeprakalan T-solut kypsyvät ja B-solut alkavat erittää immunoglobuliineja vasta neljän viikon kuluttua hedelmöityksestä. Siihen asti toiminnassa on vain synnynnäinen immuniteetti, joten seeprakalan immuunipuolustus tarjoaa mahdollisuuden tutkia synnynnäisen ja hankinnaisen immuniteetin mekanismeja erikseen. Nisäkäsmalleissa synnynnäistä ja hankinnaista immuniteettia ei päästä tarkastelemaan erikseen, sillä alkioit kehittyvät kohdun sisällä. [9]



## 2 TUTKIMUSMETODIT

### 2.1 Bakterikanta ja kasvuolosuhteet

Tutkimuksessa käytettiin *Streptococcus pneumoniae* T4 (TIGR4) kantaa ja sen isogeenisiä mutanteja. Bakteereja kasvatettiin lampaan verimaljalla yön yli + 37 °C:ssa ja CO<sub>2</sub>:ssa (kuva 4).

Lampaan verimaljalla kasvaneet bakteerit liuotettiin 10 ml THY:tä (Todd–Hewitt medium with 0.5 % yeast extract). Bakterisuspensiota kasvatettiin lämpöhuoneessa (+ 37 °C:ssa) kunnes suspension absorbanssi aallonpituudella 620 nanometriä oli 0.4. Bakteerien erottelemiseksi suspensiota sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 4 000 rpm. THY:stä erottunut bakteerimassa liuotettiin 0.2-molaariseen kaliumkloridiin halutun laimennoksen aikaansaamiseksi.



*Kuva 4 Pneumokokkia elatusmaljalla [15]*

### 2.2 Kalakannat ja alkioiden valmistelu

Jokaista tutkimuskertaa varten villityypin (AB) aikuisia seeprakaloja kudetettiin, ja syntyneet alkiot kerättiin talteen kudetustankkien pohjalta. Tutkimusten aikana seeprakalan alkiota säilytettiin E3-kasvatusliuoksessa lämpötilassa 28,5 °C (kuva 5).



*Kuva 5. Kalanpoikasia petriimaljalla [16]*

## 2.3 Injektointi

Injektointia varten 48–50 tunnin ikäiset kalanpoikaset kuorittiin pinsettien avulla mekaanisesti pois korionkalvon sisältä, elleivät ne olleet jo itsestään kuoriutuneet. Kalanpoikaset nukutettiin puskuroidulla 0,02 % Tricainella. Ennen injektointia bakteeriliuokseen lisättiin 70 kilodaltonin rhodamin dextran merkkiainetta värillisen liuoksen aikaansaamiseksi. Jokaisen poikasen verenkiertoon injektointiin 1 nl bakteeriliuosta niin, että noin 24 poikasen ryhmä injektointiin samaa bakteeriliuosta sisältävällä lasisella mikrokapillaarineulalla. Poikasiin injektoidun bakteerin määrää kontrolloitiin injektioimalla sama määrä bakteeria 100 µl:aan kaliumkloridia, joka sitten laitettiin kasvamaan elatusmaljalle. Yön yli kasvaneet bakteerit voitiin laskea elatusmaljoilta.

## 2.4 Alkioiden seuranta

Injektoinnin jälkeen kalanpoikaset laitettiin E3-vedellä täytetyille kuoppalevyille 28,5 °C:seen, kukin omaan kuoppaansa. Kalanpoikasia seurattiin kahdesti päivässä neljän vuorokauden ajan. Joka seurantakerralla kuolleiden poikasten määrä kirjattiin ylös. Kalanpoikanen merkittiin kuolleeksi, mikäli sen sydän ei mikroskoopilla katsottuna enää lyönyt eikä se reagoanut kosketukseen.

## 2.5 Bakteerimäärien laskenta infektoiduista kaloista

Kustakin ryhmästä kerättiin talteen viisi kalanpoikasta säännöllisin aikaväleihin: 2, 7, 20 ja 48 tunnin kuluttua injektioista. Keräämisen jälkeen kalanpoikaset

nukutettiin tricainella. Yksittäiset poikaset homogenisoitiin pipetoimalla liuosta, joka sisälsi 200 µl PBS:ää ja 1 % triton-X:ää, ylös alas. Homogenisoinnin jälkeen liuksesta tehtiin sarjalaimennos PBS:ään ja laimennokset maljattiin verimaljoille. Verimaljoja inkuboitiin yön yli + 37 °C:ssa ja CO<sub>2</sub>:ssa, jonka jälkeen bakteerimäärät laskettiin maljoilta.

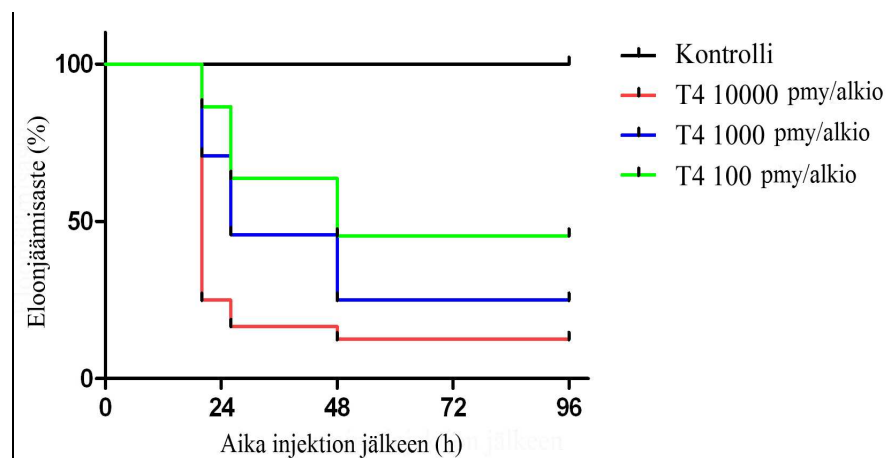
## **2.6 Tilastolliset menetelmät**

Tulokset analysoitiin käyttäen yleisiä tilastollisia menetelmiä. Kuolleisuuden analysointiin käytettiin ns. logrank-testiä. Bakteerimäärien eroja testattiin varianssianalyysillä. P-arvoa alle 0,05 pidettiin tilastollisesti merkittävänä. Kaikki data analysoitiin käyttäen Graph Pad Prism 5,0-ohjelmistoa.

## 3 TULOKSET

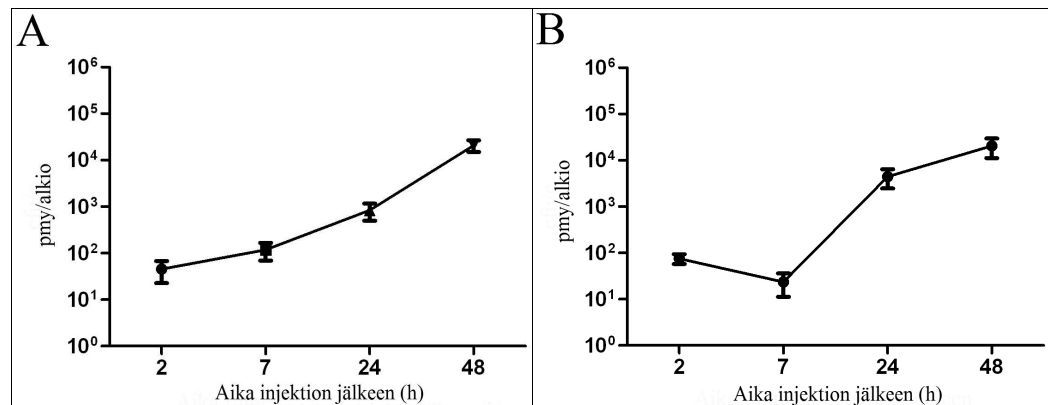
### 3.1 Pneumokokin aiheuttama infektio seeprakalassa

Pneumokokki ei ole seeprakalalle luontainen patogeeni, sillä esimerkiksi seeprakalan kasvulämpötila ei ole pneumokokille optimaalinen. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää pneumokokin taudinaiheuttamiskykyä seeprakalassa. Erisuuruisia annoksia pneumokokin T4-kantaa injektoidiin kahden päivän ikäisten alkoiden verenkiertoon. Kaliumkloridia käytettiin kontrolliliuoksena. Injektion jälkeen kalan alkioita seurattiin eloonjäämisasteen selvittämiseksi. Tutkimuksessa havaittiin eloonjäämisasteen riippuvan injektoidun bakteeriannoksen suuruudesta (kuva 6). Useiden tutkimusten perusteella havaittu keskimääräinen eloonjääneiden osuus kaikista tutkituista kaloista 100 pmy (pesäketä muodostavaa yksikköä)/alkio annoksella oli 49 %, 1 000 pmy/alkio annoksella 15 % ja 10 000 pmy/alkio annoksella 3 % ( $p < 0,0001$ ). Kontrolliryhmässä eloonjäämisaste oli 100 %. Näiden tulosten perusteella voidaan todeta, että pneumokokki pystyy aiheuttamaan invasiivisen ja tappavan infektion seeprakalassa.



**Kuva 6.** *Streptococcus Pneumoniaen* injektointi seeprakalan alkion verenkiertoon aiheuttaa tappavan infektion. Seeprakalan alkoiden eloonjäämisaste eri suuruisia bakteeriannoksia sekä kontrolliliuosta käytettäessä. Kuva on havainnollistava esimerkki yksittäisen tutkimuksen tuloksista.

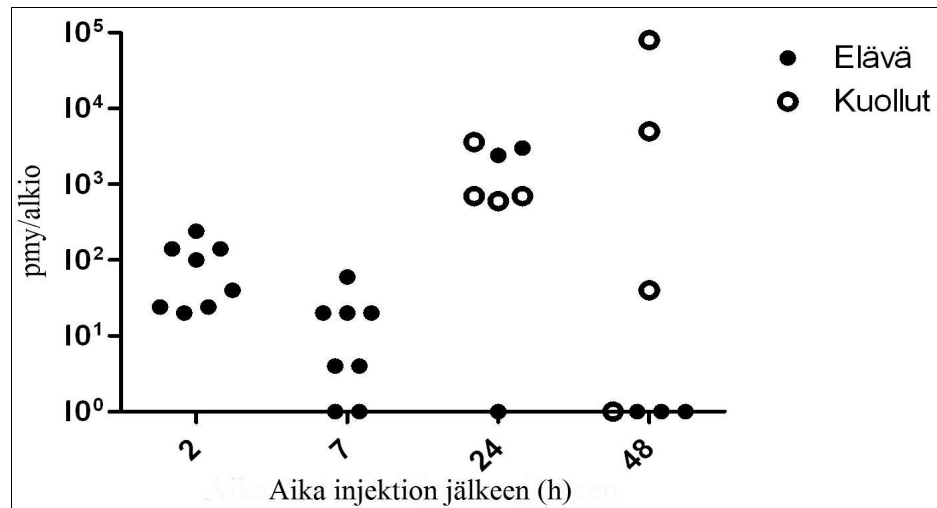
Bakteerimäärän mahdollisen lisääntymisen selvittämiseksi injektoidut kalat homogenisoitiin ja bakteerin määrät laskettiin neljässä aikapisteessä. Sekä 100 pmy/alkio annoksella että 1 000 pmy/alkio annoksella havaittiin bakteerimäärän logaritminen kasvu seeprakalan alkiossa (kuva 7). Pneumokokki pystyy siis lisääntymään seeprakalan alkiossa.



**Kuva 7.** *Streptococcus Pneumoniae* pystyy lisääntymään seeprakalan alkiossa.

Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä ajan funktiona injektioannoksilla 100 pmy/alkio (A) ja 1 000 pmy/alkio (B).

Yksittäisistä seeprakalan alkioista laskettiin bakteerimääriä myös tutkittaessa, pystyykö seeprakala puolustautumaan pneumokokkia vastaan. Sekä kuolleita että eläviä kalan alkioita käytettiin. Alkoiden eloonjääminen on riippuvaista niiden immuunipuolustuksen kyvystä hävittää bakteeri elimistöstään. 48 tunnin kuluttua injektioista kalan alkiot olivat jakautuneet kahteen ryhmään; ne olivat joko hävittäneet bakteerin elimistöstään tai kuolleet (kuva 8). Injektion jälkeen bakteerimäärät kasvavat selvästi kuolevissa kaloissa ja pienenevät eloonjäävissä kaloissa ( $p < 0,001$ ).



**Kuva 8.** Seeprakalan alkioiden selviytyminen infektiosta riippuu niiden kyvystä hävittää bakteeri elimistöstään. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä ajan funktiona. 48 tunnin kohdalla kalat ovat jakautuneet kahteen ryhmään; ne ovat joko kuolleita tai hävittäneet bakteerin elimistöstään ja hengissä. Kuva on havainnollistava esimerkki yksittäisen tutkimuksen tuloksista.

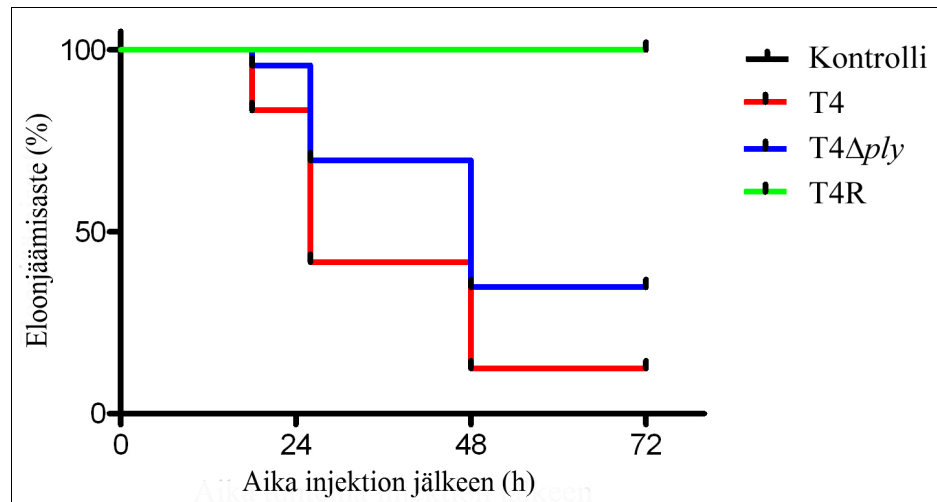
### 3.2 Bakteerien ominaisuudet, jotka vaikuttavat virulenssiin kalassa

Tämän tutkimuksen aikaisemmat tulokset osoittavat, että pneumokokki pystyy kasvamaan ja lisääntymään sekä aiheuttamaan tappavan taudin seeprakalan alkioiden. Taudinaiheuttamiskykyyn osallistuvien virulenssitekijöiden selvittämiseksi tässä mallissa tutkimuksen alku toistettiin *Streptococcus Pneumoniaen* mutanttikannoilla.

Pneumokokille tyypillinen polysakkaridikapseli estää tehokkaasti fagosytoosia. Se on pneumokokin tärkein virulenssitekijä ihmisessä. Kapselittomia pneumokokkeja pidetään avirulentteina [1]. Kapselin tärkeyden selvittämiseksi tässä mallissa seeprakalan alkioiden injektioitiin pneumokokin kapselitonta mutanttia, T4R:ää. T4R:llä injektioitujen kalan alkioiden eloonjäämisaste vastasi kontrolliryhmän eloonjäämisastetta (kuva 9). Pneumokokin kapseliton muoto osoittautui siis avirulentiksi myös seeprakalassa.

Myös pneumokokin erittämällä toksiinilla, pneumolysiinillä, on havaittu olevan merkitystä pneumokokin taudinaiheuttamiskyvyssä. T4Δply on pneumokokin

mutantti, jolta puuttuu kyky erittää pneumolysiiniä.  $T4\Delta ply$ -bakteerilla injektoidujen kalan alkioiden eloonjäämisaste oli korkeampi kuin villillä bakteerilla injektoidujen kalan alkioiden (kuva 9). Tämän perusteella voidaan sanoa, että pneumolysiini on merkittävä virulenssitekijä myös seeprakalassa.



**Kuva 9.**  $T4R$ - ja  $T4\Delta ply$ -pneumokokkimutanttien aiheuttamat infektiot ovat lievempiä kuin villin kannan aiheuttamat infektiot.  $T4R$ :llä sekä kontrolliliuoksella injektoidujen kalojen eloonjäämisaste on 100 %, joten käyrät menevät kuvassa päällekkäin. Kuva on havainnollistava esimerkki yksittäisen tutkimuksen tuloksista.

## 4 POHDINTA

Seeprakala on melko uusi tutkimusmalli infektibiologian ja immunologian osa-alueilla. Sitä on kuitenkin jo käytetty tutkimusmallina seuraaville ihmisessä tautia aiheuttaville mikrobeille: *Pseudomonas aeruginosa* [11], *Staphylococcus aureus* [12], *Salmonella typhimurium* [13]. Tärkeää ihmispatogeenia *Streptococcus pneumoniae* ei ole seeprakalamallissa kuitenkaan vielä tutkittu. Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että seeprakalan alkioita voidaan käyttää tutkittaessa sekä luonnollisen immuunipuolustuksen mekanismeja pneumokokkia vastaan että pneumokokin virulenssitekijöitä.

Pneumokokki on kasvuolosuhteiltaan herkkä bakteeri. Se tarvitsee oikeanlaisen kasvualustan ja -lämpötilan. Tästä huolimatta pneumokokki kasvoi hyvin THY-kasvualustalla 28,5 °C:n lämpötilassa. Lisäksi pneumokokki lisääntyi seeprakalan alkioissa.

Tämä tutkimus osoittaa bakteeriannoksen suuruudesta riippuvaisen kuolleisuuden seeprakalojen keskuudessa. Annoksella 100 pmy/alkio kuolleisuus oli suunnilleen 50 %, kun taas annoksella 10 000 pmy/alkio kuolleisuus oli suunnilleen 100 % 48 tunnin sisällä.

Seeprakalan immuunipuolustus on hyvin samankaltainen ihmisen immuunipuolustuksen kanssa. Tässä tutkimuksessa käytimme kahden päivän ikäisiä seeprakalan alkioita. Kahden päivän iässä seeprakaloilla on käytössään ainoastaan luonnollinen immuunipuolustus, jonka granulosyytit ja makrofagit ovat toiminnassa. Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että seeprakalan selviytyminen systeemisistä infektiosta riippuu fagosytoivista soluista. Tässä tutkimuksessa bakteerimäärät kasvoivat kuolevissa kalan alkioissa, kun taas eloonjäävissä kalan alkioissa ne laskivat. Tämän perusteella voi olettaa, että seeprakalan luonnollisen immunitetin fagosytoivat solut pystyvät eliminoimaan bakteeria kalan verenkierrosta.

Aikaisempien tutkimusten perusteella seeprakalamallia voidaan käyttää myös arvioimaan patogeenin virulenssitekijöiden merkitystä. Tässä tutkimuksessa



osoitettiin, että pneumokokin mutanttikannoilla injektoiduilla kaloilla on suurempi eloonjäämisaste kuin villin kannan bakteereilla injektoiduilla kaloilla.

Pneumokokin kapseliton muoto osoittautui avirulentiksi. Myös pneumokokin mutantti, jolta puuttui pneumolysiini, osoitti heikentyntä virulenssia. Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että seeprakalamallia voidaan käyttää *Streptococcus Pneumoniaen* virulenssitekijöiden tutkimiseen.

Seeprakalan helpon geneettisen manipuloinnin vuoksi immuunipuolustuksen mekanismeja voidaan jatkossa tutkia tarkemmin tässä mallissa. Esimerkiksi geenihiljennystekniikalla voitaisiin hiljentää joitain immuunipuolustuksen kannalta keskeisiä geenejä ja tutkia näiden geenien merkitystä immuunipuolustukselle.

## LÄHTEET

1. Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A, Valtonen V. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2003.
2. Facklam R. 2000. Scanning Electron Micrograph of *Streptococcus pneumoniae*. Courtesy of the Centers for Disease Control and Prevention. viitattu: 29.9.2010, saatavissa: <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/shape/empneumo.html>
3. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2009. Pneumokokkitautien keskimääräinen ilmaantuvuus ikäryhmittäin Suomessa vuosina 1995–2004. viitattu 29.9.2010, saatavissa: <http://www.ktl.fi/portal/8228>
4. Ruutu P. 2009. Pneumokokki-infektiot. Kustannus Oy Duodecim. viitattu: 29.9.2010, saatavissa: [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=seh00034](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=seh00034)
5. Rokotetutkimuskeskus. 2009. Pneumokokkirokote. viitattu 29.9.2010, saatavissa: <http://www.uta.fi/roketetutkimuskeskus/pneumokokkirokote.html>
6. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2010. Kansallinen rokotusohjelma. viitattu: 29.9.2010, saatavissa: [http://www.ktl.fi/portal/suomi/terveyden\\_ammattilaisille/rokottaminen/rokotusohjelma/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/terveyden_ammattilaisille/rokottaminen/rokotusohjelma/)
7. Kansanterveyslaitos. 2008. Kansanterveyslaitoksen asettaman lasten pneumokokkirokotus–työryhmän selvitys. viitattu: 29.9.2010, saatavissa: [http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja\\_b/2008/2008b12.pdf](http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_b/2008/2008b12.pdf)
8. Pihlajamäki M. *Streptococcus pneumoniae* – bakteerin mikrobilääkeresistenssi. Lääkärilehti, 2003;58(3):322
9. Parikka M, Vanha-aho L, Kukkola S, Rämetsä M. Seeprakala immunologisena tutkimusmallina. Aikakauskirja Duodecim. 2008;124(24):2817-24
10. Lewis K, University of Cambridge. Different stages of zebrafish development. viitattu: 29.9.2010, saatavissa: <http://www.pdn.cam.ac.uk/groups/lewislab/index.html>
11. Brannon MK, Davis JM, Mathias JR, Hall CJ, Emerson JC, Crosier PS, Huttenlocher A, Ramakrishnan L, Moskowitz SM. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cellular Microbiol* 2009;11(5):755-768
12. Prajsnar TK, Cunliffe VT, Foster SJ, Renshaw SA. 2008. A novel vertebrate model of staphylococcus aureus infection reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. *Cellular Microbiol*. 2008;10(11):2312-2325
13. van der Sar AM, Musters RJ, van Eeden FJ, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Bitter W. 2003. Zebrafish embryos as a model host for the real time

analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cellular Microbiol.* 2003;5(9):601–611

14. Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Bañuelos K, Werneck MB, Traver D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(36):15850-5

15. Buxton R. University of Utah. Blood Agar Plates and Hemolysis: Streptococcus and Other Catalase Negative Gram-Positive Cocci. viitattu: 29.9.2010, saatavissa:  
<https://www.microbelibrary.org/index.php/component/resource/laboratory-test/2881-blood-agar-plates-and-hemolysis-streptococcus-and-other-catalase-negative-gram-positive-cocci>

16. Latvala, A. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. 2009. In situ hybridisaatio -menetelmän pystyttäminen Rämetin tutkimusryhmän käyttöön Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa.