

NEISSERIA MENINGITIDIS B JA KOMPLEMENTTIREAKTION VÄISTÖ
IHMISSERUMISSA *IN VITRO*

Noora Härkönen
Tutkielma
Lääketieteen koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopisto
Terveystieteiden tiedekunta
Lääketieteen laitos / mikrobiologia
Toukokuu 2015

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos, lääketieteen koulutusohjelma

Haartman-instituutti, Bakteriologian ja immunologian osasto, Helsingin yliopisto

Noora Härkönen

NEISSERIA MENINGITIDIS B JA KOMPLEMENTTIREAKTION VÄISTÖ
IHMISSERUMISSA *IN VITRO*

Opinnäytetutkielma, 32 sivua

Tutkielman ohjaajat: dosentti Hanna Jarva (Helsingin yliopisto), dosentti Tuomas Virtanen (Itä-Suomen yliopisto)

Toukokuu 2014

Asiasanat: komplementti, komplementin säätely, meningokokki B, meningokokki B -rokote, pintaproteiinit

Neisseria meningitidis (meningokokki) on ihmisen nenänielun normaalifloorassa elävä bakteeri, joka kykenee tuntemattomasta syystä joillakin ihmisillä tunkeutumaan verenkiertoon ja aiheuttamaan vakavia, henkeä uhkaavia tauteja, kuten verenmyrkytyksen (sepsis) tai aivokalvontulehduksen (meningiitti). Tauti kohdistuu yleisimmin pikkulapsiin ja alle 20-vuotiaisiin nuoriin. Veressä toimiva, luontaiseen immuunijärjestelmään kuuluva komplementtijärjestelmä ei aina kykene tuhoamaan tätä bakteeria. Tämän arvellaan johtuvan meningokokin kyvystä sitoa pinnalleen veriseerumista samoja tekijöitä, joita elimistön omat solut sitovat, jotta komplementti ei tuhoaisi niitä. Tässä työssä on tutkittu *in vitro*, kuinka meningokokin esikasvattaminen seerumissa, josta komplementti on kuumentamalla inaktivoitu, vaikuttaa sen kykyyn selvittää normaaliseerumissa.

Rokotetta meningokokki B:tä vastaan on kehitetty useita vuosia eri puolilla maailmaa. Tällä hetkellä lupaavimmat ehdokkaat perustuvat meningokokin pintaproteiineihin. Tästä työstä saadut tulokset tukevat sitä käsitystä, että meningokokki saa lämpöinaktivoidusta veriseerumista tekijöitä, jotka parantavat sen selviytymiskykyä normaaliseerumissa. Lisäksi havaittiin, että eri kantojen välillä voi olla suuriakin eroja selviytymisessä. Tämä vahvistaa teoriaa meningokokin faasivaihtelusta eli kyvystä muuttaa pinta-antigeenejään.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Faculty of Health Sciences, School of Medicine

Haartman Institute, Department of Bacteriology and Immunology, University of Helsinki

Noora Härkönen

NEISSERIA MENINGITIDIS B AND EVASION OF COMPLEMENT IN HUMAN SERUM *IN VITRO*

Thesis 32 pages

Tutors: Docent Hanna Jarva University of Helsinki, docent Tuomas Virtanen University of Eastern Finland

May 2014

Keywords: complement, regulation of complement, meningococcus B, meningococcus B vaccine, surface proteins

Neisseria meningitidis (meningococcus) is a normal flora bacterium which lives in human nasopharynx. It can cause an invasive meningococcal disease the most serious forms of which are sepsis and meningitis. The highest incidence of meningococcal disease occurs in infants and young adults. The Complement system is part of the human innate immune system which helps to eliminate infectious microorganisms. In a case of meningococcal disease the complement system can't destroy meningococcal bacteria in a way it normally does because meningococci have an ability to bind complement system inhibiting factors on its surface. The aim of this study was to examine *in vitro* whether the survival ability of meningococci improves in normal human serum if the bacteria are first cultivated in heat inactivated serum which lacks active complement system.

Vaccine development against serogroup B is a widely studied subject because so far there hasn't been success in developing an adequate vaccine. In this study, we got results that supports the perception that meningococcus gets some components from the heat-inactivated serum which improve its survival in a normal serum. In addition to this we also discovered that there can be wide differences in survival between different strains. This is in accordance with the phase variation of meningococci that is its ability to change its surface antigens.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO 5
2. KOMPLEMENTTIREAKTIO 7
 - 2.1. Yleistä 7
 - 2.2. Komplementtireitit 7
 - 2.2.1 Klassinen tie 7
 - 2.2.2 Vaihtoehtoinen tie 8
 - 2.2.3 Lektiinitie 8
 - 2.3 Komplementtikaskadin loppupään toiminta 9
 - 2.4 Komplementin säätely 10
 - 2.5 Komplementin väistö 13
3. NEISSERIA MENINGIDITIS 15
 - 3.1 Yleistä 15
 - 3.2 Epidemiologia 16
 - 3.3 Rokotteet 17
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT 20
 - 4.1 Tappotestiin sopivan seerumipitoisuuden ja ajan määrittäminen 20
 - 4.2 Kuuden kannan vertailu 21
 - 4.3 Seerumiesikasvatuksen vaikutus bakteerien selviytymiskykyyn tappotestissä 21
5. TULOKSET 22
 - 5.1 Tappotestiin sopivan seerumipitoisuuden ja ajan määrittäminen 22
 - 5.2 Kuuden kannan vertailu 22
 - 5.3 Seerumiesikasvatuksen vaikutus bakteerien selviytymiskykyyn tappotestissä 24
6. POHDINTA 26
7. LÄHTEET 29

1. JOHDANTO

Neisseria meningitidis, eli meningokokki, on tärkeä taudinaiheuttajabakteeri, joka aiheuttaa maailmanlaajuisesti vuosittain noin puoli miljoonaa aivokalvontulehdusta ja verenmyrkytystä. Noin 10 % taudin saaneista kuolee siihen. (Sadarangani ym.2012.) Tautia esiintyy pääasiallisesti lapsilla, ja esim. Isossa-Britanniassa ja Walesissa tehdyn tutkimuksen mukaan suurin osa meningokokin aiheuttamista kuolemista kohdistui alle 5-vuotiaisiin (Ladhani ym.2012). Meningokokin seroryhmistä kuusi, A, B, C, W135, X ja Y, aiheuttavat suurimman osan meningokokkitaudeista, ja WHO onkin luokitellut ne epidemiologisesti tärkeimmiksi meningokokki-seroryhmiksi (Bottomley ym. 2012). Länsimaissa seroryhmät C, Y ja B ovat pääasialliset taudinaiheuttajat. Meningokokki ei kuitenkaan ole ehdottoman patogeeninen, vaan iso osa ihmisistä kantaa sitä ajoittain myös nenänielunsa normaalifloorassa täysin oireettomana. Syytä siihen, miksi joillain ihmisillä kantajuus muuttuu meningokokkitaudiksi eli bakteeri pääsee verenkiertoon, ei tiedetä. (Chang ym. 2012.)

Verenkierrossa meningokokki kykenee väistämään veren komplementtiproteiinien tuho vaikutusta sitomalla pinnalleen mm. tekijä H:ta, jota myös elimistön omat solut käyttävät komplementilta suojautumiseen (Schneider ym.2009). Tekijä H:n sitominen ei luultavasti ole kuitenkaan ainoa selittävä tekijä meningokokin taudinaiheuttamiskyvylle, vaan siihen uskotaan liittyvän myös muun muassa bakteerin pintaproteiinien geenien vaihtelua (Seib ym.2011). Lisäksi on huomattu, että ihmiset, joilla komplementtireaktio on jollakin tapaa vaillinainen, etenkin komplementtireaktion loppupään suhteen, ovat alttiimpia meningokokkitaudille (Welsch, Ram 2008).

Tällä hetkellä meningokokin seroryhmiä A, C, W135 ja Y vastaan on kehitetty sekä polysakkaridi- että konjugaattirokotteita. Sen sijaan seroryhmä B:tä vastaan ei toistaiseksi ole tehokasta rokotetta, koska meningokokki B:n polysakkaridikapseli on muista ryhmistä poikkeava ja muistuttaa enemmän ihmissolujen omia rakenteita. Tämä aiheuttaa sen, että meningokokki B:n kapseli on muiden ryhmien kapseleita vähemmän immunogeeninen. (Bona, Guidi, 2012; Ladhani ym. 2012.)

Tässä työssä on haluttu selvittää, paraneeko meningokokin selviytymiskyky normaaliseerumissa *in vitro*, jos sitä ensin siedätetään lämpöinaktivoidussa seerumissa

(seerumissa, josta on kuumennuksella inaktivoitu komplementtireaktion proteiinit). Ajatuksena on, että mikäli selviytymiskyky paranee, voidaan olettaa seerumissa olevan ainesosia, joita meningokokki kykenee sitomaan pinnalleen ja hyödyntämään komplementin väistössä. Työssä tutkittiin kuutta eri kantaa ja samalla tutkittiin, onko eri kantojen välillä eroja selviytymiskyvyssä.

2. KOMPLEMENTTIREAKTIO

2.1 Yleistä

Komplementti tarkoittaa yli 30 veren plasmaproteiinin muodostamaa systeemiä. Systeemillä on merkittävä rooli tulehduksen ja immuniteetin synnyssä, ja sen ensisijaisena tehtävänä on pidetty puolustautumista elimistöön tunkeutuvia patogeenejä vastaan. Tätä nykyä komplementin tiedetään osallistuvan myös moniin muihin elimistön toimintoihin, kuten kudosten ja verisuonten uudismuodostukseen. (Gao, Yan 2012; Lewis, Ram 2013.)

Komplementin proteiinit ovat plasmassa inaktiivisessa muodossa, ja ne on numeroitu C1:stä C9:ään. Komplementin ensimmäisten osien aktivaatio saa aikaan kaskadimaisen reaktion, joka aktivoi numerojärjestyksessä muita komplementin proteiineja. (Abbas ym. 2005.) Monet komplementin proteiineista ovat siis zymogeenejä eli inaktiivisia entsyymejä, jotka aktivoituvat aiempien komplementtiproteiinien pilkkoutumistuotteista (Janeway ym 2001).

Komplementin proteiinit vaikuttavat immuunipuolustukseen monella eri tapaa. Toiminnan kannalta kriittinen vaihe on C3-konvertaasin muodostuminen infektion alkuvaiheissa, mikä voi tapahtua kolmella eri tavalla (ks. kuva 1 ja 2.2). Muodostunut C3-konvertaasi pilkkoo C3-proteiinin C3a:ksi ja C3b:ksi. C3b muodostaa C5-konvertaasin, jonka pilkkoutumistuote C5b puolestaan aktivoi muut komplementin proteiinit C6–C9. (Abbas ym. 2005.)

2.2 Komplementtireitit

2.2.1 Klassinen tie

Klassinen tie käynnistyy IgG- tai IgM-luokan vasta-aineiden sitoutuessa antigeeniin ja muodostaessa immunokompleksin, jonka veressä oleva C1-proteiini tunnistaa. C1 aktivoi C2:n ja C4:n muodostaen C4bC2a-kompleksin, joka toimii C3-konvertaasina. (Abbas ym.2005.) Myös C-reaktiivinen proteiini tai DNA-histonikompleksi voivat aktivoida C1:n ja tuottaa C3-konvertaasin (Jarva, Meri 2000). Klassisen tien etuna muihin reitteihin nähden on tunnistuksen tarkkuus, koska vasta-aineet huolehtivat kohderakenteiden tunnistamisesta. Toisaalta vasta-ainemuodostus on hidasta, jos kyse on primaarivasteesta.

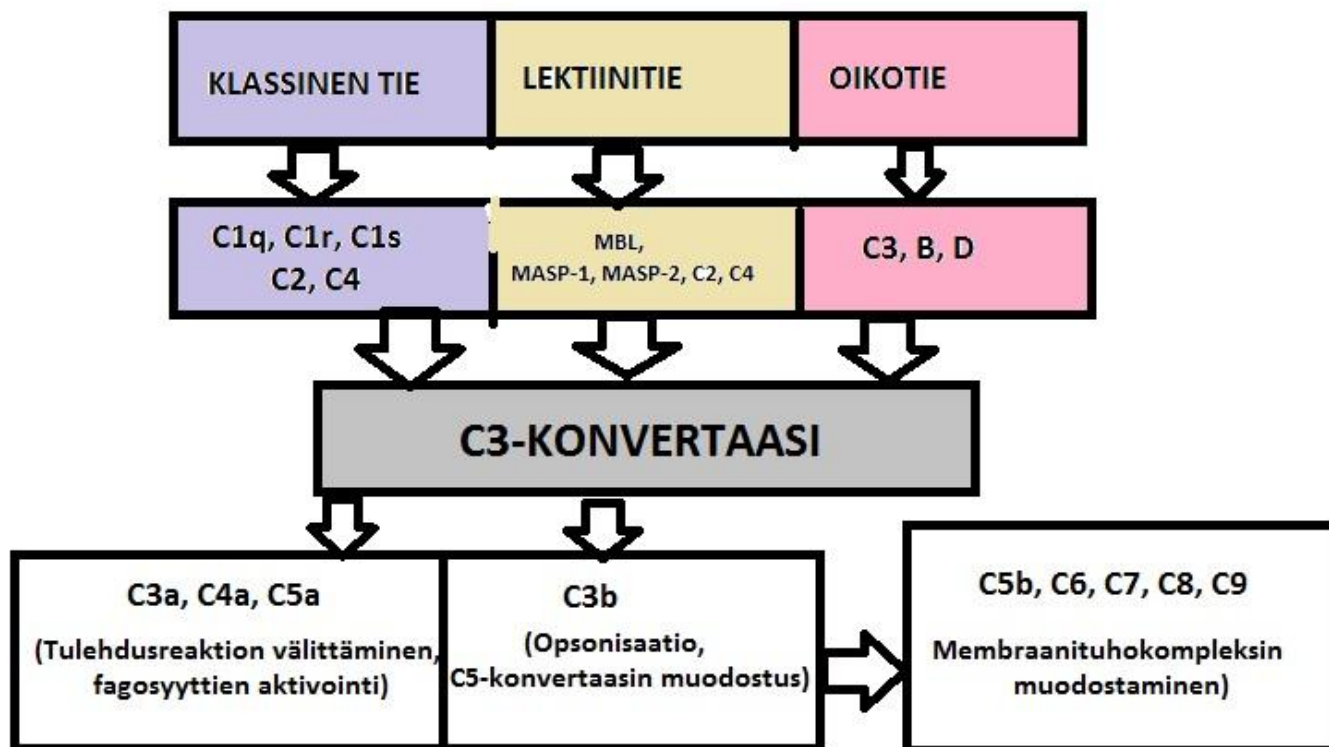
Olemassa olevat vasta-aineet (eli ns. sekundaarivaste) sen sijaan aktivoivat komplementin yhtä nopeasti kuin oikotieaktivaatio. (Meri 2011a.)

2.2.2 Vaihtoehtoinen tie eli oikotieaktivaatio

C3-proteiini hydrolysoituu veressä myös jatkuvasti itsekseen, eli se on koko ajan valmiina reagoimaan antigeenien kanssa. Antigeeninä voivat toimia esimerkiksi useiden mikrobien polysakkaridit, immunoglobuliinien muodostamat aggregaatit ja keinotekoiset pinnat, kuten munuaisdialyysatorikalvot. Veriplasman proteiineihin kuuluva tekijä B kykenee sitoutumaan hydrolysoituneeseen C3:een ja tekijä D (joka myös on veriplasman ainesosa) taas kykenee aktivoimaan sitoutuneen tekijä B:n. Tämän aktivaation seurauksena muodostuu C3bBb. Kyseessä on samanlainen C3-konvertaasi kuin klassisessa tiessä muodostuva C4bC2a. Kun tämä C3bBb-kompleksi pilkkoo C3-molekyylejä, se saa aikaan siis uusien C3-konvertaasien muodostumisen. Oikotien tehokkuus perustuu tähän kykyyn vahvistaa omaa aktivaatiotaan. (Jarva, Meri 2000; Lewis, Ram 2014; Meri 2011a.)

2.2.3 Lektiinitie

Lektiinitie käynnistyy, kun mannaania sitova lektiini (MBL) sitoutuu solujen pinnalla olevaan mannosiin ja muihin sokeriosiin. Näitä sokeriosia esiintyy runsaasti eri patogeenisolujen pinnalla, mutta ei nisäkkäillä. Patogeeniin sitoutunut MBL muistuttaa klassisen tien aktivoijaa ja voi näin ollen aktivoida C2:n ja C4:n (ks. luku 2.2.1 klassinen tie). (Janeway ym.2001.)



KUVA 1. Komplementtireittien aktivoituminen ja komplementtituotteiden tehtävät.

2.3 Komplementtikaskadin loppupään toiminta

Komplementti aktivoituu siis edellä kuvatuilla tavoilla, kun elimistöön tulee vieras organismi ja kaikki kolme reittiä päätyvät aktivoimaan C3-proteiinia. Aktivoituminen tapahtuu paikallisesti ja saa aikaan elimistössä useita tulehduksellisia vasteita aktivaatiotuotteiden välityksellä (ks. kuva 1). (Janeway ym.2001, Lewis, Ray 2013.)

Tällaisia aktivaatiotuotteita ovat esimerkiksi C1q, C3b ja C4b, jotka opsonoivat eli ikään kuin päällystävät vieraita kohteita, jotta fagosyytit, eli syöjäsolut, voivat helpommin tunnistaa ja fagosytoida ne. Esim. oikotieaktivaatio pyrkii tuottamaan mahdollisimman runsaasti C3b-molekyylejä, jotta ne voisivat päällystää kohdepinnan ja edistää näin kohteen fagosytoosia. Nykytiedon valossa opsonisaatio on komplementin tärkein tehtävä. (Jarva, Meri 2000, Meri 2011b.)

C3a, C4a ja C5a ovat anafylatoksiineja eli tulehdusreaktion välittäjäaineita. Ne vapauttavat syöttösoluista histamiinia ja muita välittäjäaineita. Lisäksi ne lisäävät verisuonten läpäisevyyttä ja supistavat sileitä lihaksia. C5a on tehokkain anafylatoksiini, ja se voi

aiheuttaa pieninäkin määrinä kuolemaan johtavan sokin. (Meri 2011b.)

C5b-, C6-, C7-, C8- sekä useat C9-molekyylit ovat komplementin loppupään proteiineja, jotka fuusioituvat C3b:hen ja muodostavat komplementtireaktion lopputuotteen, membraanituhokompleksin (MAC). Tämä kompleksi näkyy elektronimikroskoopissa halkaisijaltaan n. 10 nm:n reikänä solukalvossa. Reikä hajottaa solukalvon lipidikerroksen ja säännöllinen solukalvorakenne hajoaa. Tämän seurauksena soluun pääsee hallitsemattomasti mm. vettä, elektrolyyttejä ja lyyttisiä entsyymejä, jotka lopulta tuhoavat solun. MAC:lla on merkitystä etenkin gramnegatiivisten bakteerien (kuten neisseriat) tuhoamisessa. (Janeway ym.2001; Jarva, Meri 2000; Lewis, Ray 2013; Meri 2011c.)

Tulehdusreaktion välittämisen ja antigeenien tuhoamisen lisäksi komplementtireaktion yksi tärkeimmistä tehtävistä on immunokompleksien eli vasta-aineiden ja antigeenien muodostamien aggregaattien hienontaminen. Lisäksi komplementti osallistuu apoptoottisten solujen tuhoamiseen. (Jarva, Meri 2000.)

2.4 Komplementin säätely

Komplementti voi vahingoittaa ja tuhota myös elimistön omia soluja ja kudoksia, jos sen toimintaa ei mitenkään säädeltäisi. Kuvaavaa onkin, että komplementtia sääteleviä ja inhiboivia proteiineja tunnetaan nykyään jo lähes yhtä monta kuin komplementtireaktioon osallistuvia proteiineja. Suurin osa komplementtia estävistä proteiineista pyrkii vaikuttamaan konvertaasien muodostumiseen tai toimintaan eli kohtaan, joka on kriittinen komplementin etenemiselle. Pienikin häiriö näiden säätelyproteiinien toiminnassa altistaa ihmisen erilaiselle infektiolle ja autoimmuunisairauksille. (Okroj ym.2012.) Kuvassa 2 on esitelty eri vaiheissa toimivia komplementin säätelytekijöitä.

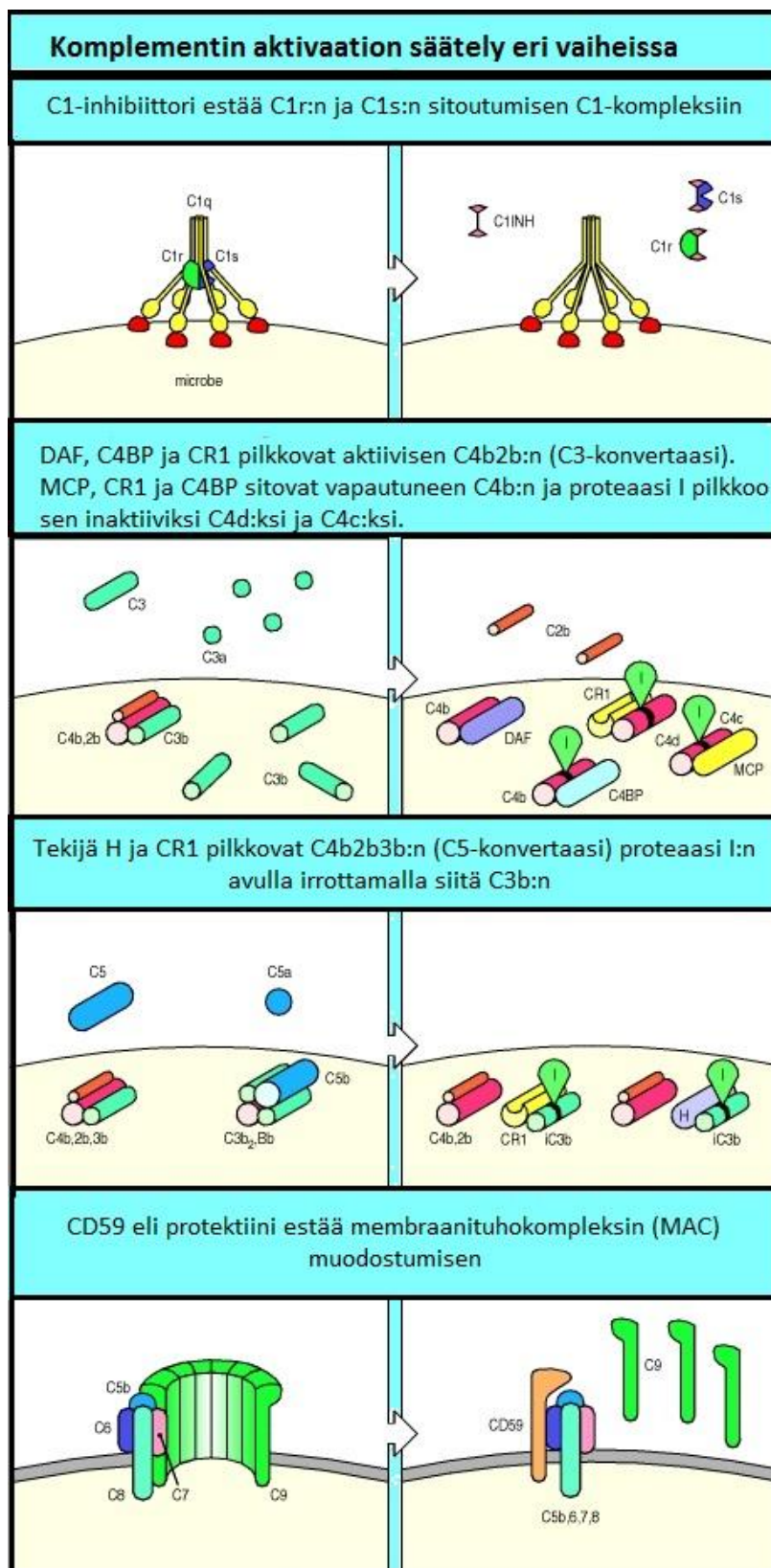
C1-estäjä (C1inh) on seriini proteaasi-inhibiittori, joka estää klassisen tien aktivoitumisen sitomalla C1r- ja C1s-proteiineja. Tällöin ne eivät kykene sitoutumaan C1q-proteiiniin, mikä on edellytys klassisen tien etenemiselle. Lisäksi C1-estäjä estää lektiinitietä pitämällä kurissa sen toiminnalle olennaisia esteraasientsyymejä MASP1 ja MASP2. C1-estäjän puuttuminen aiheuttaa liiallista klassisen tien aktivaatiota, mikä ilmenee esimerkiksi eri puolille kehoa ilmaantuvina turvotustiloina. Tila tunnetaan perinnöllisenä angioödeemana eli HAE-tautina. (Haapasalo-Tuomainen 2012; Meri 2011d.)

C1-estäjän lisäksi klassista tietä säädellään C4b-tasolla. C4b:tä sitova proteiini (C4BP) ja komplementtireseptori 1 (CR1) ovat proteiineja, jotka lisäävät muodostuneen C3-konvertaasin C4b2b:n hajoamista. Lisäksi ne sitoutuvat C4b:hen ja pilkkovat sen tekijä I:n avulla inaktiiviseksi C4c:ksi ja C4d:ksi. (Janeway ym.2001; Haapasalo-Tuomainen 2012.)

Tekijä H:n (fH) tehtävä on analoginen C4BP:n kanssa, mutta vaikutus kohdistuu C3bBb-konvertaasiin eli oikotien etenemiseen. Lisäksi fH estää myös suoraan C3-konvertaasien muodostusta estämällä tekijä B:n sitoutumista C3b:hen. FH:n tehtävänä on estää komplementin liiallista kulutusta liuostilassa ja suojata omia kudokset ja solupintoja oikotieaktivaatiolta. Mikäli C3b on vahingossa sitoutunut omien terveiden kudosten pintaan, tunnistaa fH solujen pinnalla olevia glykosaminoglykaani- ja siaalihapporakenteita ja sitoutuu solujen pinnalle. Tämän seurauksena C3b inaktivoituu ja omille soluille tuhoisa kaskadi pysähtyy. Monilta patogeeneiltä nämä suojaavat solurakenteet puuttuvat. Toisaalta monet patogeenit (mm. pneumokokki ja meningokokki) kykenevät sitomaan pinnalleen fH:ta (ks. luku 2.4 komplementin väistö). (Haapasalo-Tuomainen 2012; Meri 2011d.)

CD59 eli protektiini on tärkein MAC:n muodostumista estävä proteiini. Se on pienikokoinen molekyyli, joka tarttuu C5b-C8 ja C5b-C9 kompleksien C8- ja C9-molekyyleihin ja estää C9-molekyyliden polymerisoitumista ja täten MAC-kompleksien muodostumista. (Janeway ym. taulukko 2.25, 2001; Meri 2011d.)

Plasman liukoisten komponenttien lisäksi solujen pinnalla on erilaisia reseptoreja komplementin aktivaatiotuotteille. CR1 on fagosytoosiin, immunokompleksien kuljetukseen ja C3- ja C5-konvertaasien säätelyyn osallistuva reseptori, johon C3b ja C4b kiinnittyvät. CR2-reseptori puolestaan vastaa synnynnäisen ja hankinnaisen immunitetin linkittämisestä toisiinsa aktivoimalla B-soluja C3b:n pilkkoutumistuotteen C3dg:n välityksellä. CR3 ja CR4 ovat monosyyttien, makrofagien, neutrofiilien ja lymfosyyttien pinnallaan ilmentämiä reseptoreja ja ne ovat tärkeitä onnistuneelle fagosytoosille. (Haapasalo-Tuomainen 2012; Meri 2011d.)



KUVA 2. Komplementin säätely (Janeway ym.2011).

2.5 Komplementin väistö

Vaikka komplementti tunnistaa ja tuhoaa veren vieraita mikro-organismeja tehokkaasti, on monilla mikrobeilla mekanismeja, joiden avulla ne kykenevät väistämään komplementin ja jäämään henkiin veressä. Tällaisia mekanismeja ovat esim. komplementin aktivoitumisen häiritseminen bakteerituotteilla tai komplementin komponenttien (usein merkittävien sellaisien, eli esim. C3 tai C5) hajottaminen entsyymeillä, jolloin komplementtireaktion eteneminen estyy. Esimerkiksi *S. pyogenes*in proteaasi SpeB, tietyt *Pseudomonas aeruginosa*n entsyymit sekä *S. aureuksen* aureolysiini kykenevät pilkkomaan C3:sta. Jotkin bakteerit ja virukset pystyvät myös tuottamaan inhiboivia proteiineja, jotka estävät esim. MAC:n muodostumisen (Haapasalo-Tuomainen 2012; Lambris ym.2008.)

Toinen tapa, jolla patogeenit väistävät komplementtia, on esittää niiden olevan normaali isännän plasman osanen. Luvussa 2.3 on kuvattu säätelymekanismeja, joilla omat solut välttävät komplementin tuho vaikutuksen. Monet patogeenit kykenevät ilmentämään pintaproteiineja, ligandeja, jotka sitovat näitä komplementin säätelyproteiineja. Näin ne harhauttavat immuunipuolusta luulemaan, että kyseessä on isännän oma solu. (Haapasalo-Tuomainen 2012; Lambris ym. 2008.)

C4BP:n sitominen suojaa patogeenia sekä klassisen tien että lektiinitien kautta tapahtuvalta komplementtiaktivaatiolta ja fH:n sitominen puolestaan suojaa oikotien kautta tapahtuvalta komplementtiaktivaatiolta. Koska tämä suojaaminen kohdistuu komplementtireaktion etenemisen kannalta hyvin kriittiseen vaiheeseen, eli C3-konvertaasin muodostumisen ja toiminnan estoon, on luonnollista, että hyvin monet bakteerit ilmentävät C4BP:tä ja fH:ta sitovia ligandeja. (Haapasalo-Tuomainen 2012; Lambris ym.2008; Zipfel ym. 2013.)

Mikrobeja, jotka pystyvät sitomaan pinnalleen C4BP:tä, ovat mm. *Bordetella pertussis* (ligandina FHA), *Candida albicans* (Pra1), *Moraxella catarrhalis* (UspA) ja *Salmonella enterica* (Rck). FH:ta kykenevät sitomaan mm. *Streptococcus pneumoniae* (Hic, PspC), *Pseudomonas aeruginosa* (Tuf) ja *Borrelia burgdorferi* (BbCRASP, OspE). (Haapasalo-Tuomainen taulukko 1, 2012.)

Monet bakteerit ilmentävät useita eri ligandeja ja kykenevät siis sitomaan useita eri

säätelyproteiineja. Esim. meningokokki ilmentää ulkokalvollaan sekä PorA:ta, johon C4BP sitoutuu, että Fhbp:tä ja NspA:ta, joihin fH voi sitoutua. Näin meningokokki kykenee suojautumaan kaikilta kolmelta aktivaatiotieltä. (Haapasalo-Tuomainen taulukko 2, 2012; Jarva ym. 2005.)

C4BP:n ja fH:n lisäksi patogeeneit kykenevät sitomaan myös muita komplementin säätelijöitä. Esim. *Bordetella pertussis* kykenee sitomaan C1-inhibiittoria Vag8-ligandinsa avulla ja *S. aureus* tekijä I:tä ClfA-ligandinsa avulla. (Haapasalo-Tuomainen 2012.)

Koska komplementti muodostaa hyvin merkittävän osan synnynnäistä immuniteettia ja osallistuu myös hankinnaisen immuniteetin syntyyn, on ymmärrettävää, että luonnonvalinta on suosinut patogeenisillä mikrobeilla tällaisia komplementtia estäviä virulenssitekijöitä, kuten komplementtirakenteita hajottavia entsyymejä ja säätelytekijöitä sitovia ligandeja. Nykyteknologia on mahdollistanut näiden väistömekanismien tarkastelun molekyyllitasolla ja hyvin monet uudet rokote-ehdokkaat ja muut hoitomuodot käyttävätkin hyväkseen tietoa näistä väistömekanismeista. Esim. meningokokki b:tä vastaan suunnatut rokotteet perustuvat tällä hetkellä yksinomaan näiden tunnettujen ligandien ja niitä koodaavien geenien hyödyntämiseen (ks. luku 3.3 rokotteet). (Blom ym. 2009; Haapasalo-Tuomainen 2012.)

3. NEISSERIA MENINGITIDIS

3.1 Yleistä

Neisseria meningitidis eli meningokokki on gramnegatiivinen bakteeri, joka kasvaa noin kymmenellä prosentilla ihmisistä oireita aiheuttamattomana mikrobina ylähengitysteissä. Nämä ihmiset ovat ns. bakteerin kantajia. Kantajuus voi olla kroonista, useita kuukausia kestävä, tai tilapäistä. Kantajuutta tavataan eniten suljetuissa tai osittain suljetuissa ihmisryhmissä, kuten armeijassa, opiskelijoiden keskuudessa tai perheen jäsenten välillä. (Yazdankhah, Caugant 2004.) Tartunta tapahtuu hengitysteiden eritteiden tai syljen välityksellä, ja se saadaan yleisimmin oireettomalta kantajalta, ei niinkään varsinaista invasiivista tautia sairastavalta (Strelow, Vidal 2013).

Mikäli meningokokki pääsee tunkeutumaan ylähengitysteiden limakalvon läpi vereen, se pystyy aiheuttamaan ns. invasiivisen meningokokkitaudin (IMD), joka voi ilmetä monella eri tapaa, kuten konjunktiviittina, otiittina, ylähengitystieoireina, keuhkokuumeena, septisenä nivel tulehduksena ja perikardiittina. Pelätyimpiä IMD:n ilmenemismuotoja ovat meningiitti eli aivokalvontulehdus ja sepsis eli verenmyrkytys, jotka ovat usein vakavia, henkeä uhkaavia infektoita. (Yazdankhah, Caugant 2004; Huovinen ym. 2010; Racloz, Luiz 2010.) Mekanismi, jolla oireeton kolonisaatio muuttuu invasiiviseksi oireilevaksi taudiksi, on edelleen epäselvä. Tällä hetkellä invaasion uskotaan liittyvän moneen eri tekijään, kuten kyseisen meningokokkikannan virulenssitekijöihin, ympäristötekijöihin sekä isännän yksilölliseen alttiuteen. (Strelow, Vidal 2013.)

Meningokokin tärkein virulenssitekijä on sen ympärillä oleva polysakkaridikapseli, joka suojaa bakteeria fagosytoosilta, opsonisaatiolta ja komplementtivälitteiseltä tapolta veressä. Myös kapselin alla oleva ulkokalvo ja sen proteiinit vaikuttavat suuresti meningokokin taudinaiheuttamiskykyyn mm. häiritsemällä komplementin aktivoitumista. Meningokokki vapauttaa vereen myös lipopolysakkaridia (LPS), joka indusoi elimistössä tulehdusvälittäjäaineiden tuotantoa ja aiheuttaa siten meningokokkisepsikselle tyypillisen shokin. (Huovinen ym. 2010; Yazdankhah, Caugant 2004.)

Meningokokeille on tyypillistä myös ns. faasivaihtelu, eli edellä kuvattujen virulenssitekijöiden rakenteen ja ilmentymisen muuntelu. Tämä tarkoittaa sitä, että

esimerkiksi meningokokin pintaproteiinit voivat olla eri kannoissa hyvin erilaiset. (Käyhty 2000.) Meningokokki kykenee myös ottamaan geenejä muilta bakteereilta, mikä lisää ulkokalvon rakenteiden vaihtelevuutta (Huovinen ym. 2001). Tämä muuntautumiskyky vaikeuttaa meningokokkia vastaan suunnattujen rokotteiden kehittämistä riittävän kattaviksi (Käyhty 2000).

Meningokokit voidaan jakaa kapselipolysakkaridiensa rakenteen mukaan 13 eri seroryhmään. Näistä ryhmistä kuusi (A, B, C, W135 ja Y ja nykytiedon mukaan myös X) aiheuttavat yli 90 % IMD tapauksista eli ovat tärkeimpiä taudinaiheuttajia. (Kaaijk ym.2013.) Seroryhmällä ei ole merkitystä taudin hoitamisessa, mutta rokotteita ajatellen sillä on väliä, koska kapselipolysakkaridirakenteet ovat hyvin ryhmäspesifisiä (Peltola 2012).

Suurin osa (90–95%) IMD:hen sairastuvista on sairastumishetkellä muuten täysin terveitä. Tiettyjen geneettisten muutosten tiedetään kuitenkin altistavan meningokokkitaudille tai huonontavan taudin ennustetta. (Strelow, Vidal 2013.) Myös isännän komplementtipuutokset ovat yksi taudin riskitekijä. Etenkin komplementin loppupään C5–C9 (MAC:n muodostamiseen osallistuvien proteiinien) puutokset altistavat taudille. (Sim ym.2013.)

3.2 Epidemiologia

Meningokokkiseroryhmien esiintyvyys vaihtelee eri maanosissa. Seroryhmä A on aiheuttanut laajoja epidemioita pääosin Afrikassa, Aasiassa ja Etelä-Amerikassa 1900-luvun alusta tähän päivään asti. Ryhmän esiintyvyys on voinut olla jopa 1000 tapaus 100 000 ihmistä kohden. Seroryhmät W135 ja X ovat olleet meningokokkitaudin aiheuttajia Saharan eteläpuolisessa Afrikassa (jossa esiintyy paljon myös seroryhmä A:ta) ja ryhmät B, C ja Y puolestaan Euroopassa, Pohjois-Amerikassa ja Oseaniassa. (Chang ym.2012; Racloz, Luiz 2010.) Maailmanlaajuisesti IMD:tä todetaan vuosittain n.1,2 miljoonaa tapaus, joista 135 000 menehtyy. (Jafri ym.2013.)

Länsimaissa meningokokkitaudit ovat kuitenkin tätä nykyä harvinaisempia. Ilmaantuvuus 100 000 asukasta kohti on noin 1 tapaus vuodessa, joka esim. Suomessa tarkoittaa noin 50 tautitapausta vuodessa. (Peltola 2012.)

Rokotekehittely on osaltaan ollut myötävaikuttamassa meningokokkitautien vähenemiseen länsimaissa. Se on myös vaikuttanut siihen, mikä seroryhmä on milloinkin ollut pääasiallinen taudinaiheuttaja. 1990-luvulla meningokokkitauti oli esimerkiksi Yhdysvalloissa pääosin ryhmän C aiheuttama, mutta ryhmän esiintyvyys on laskenut huomattavasti vuoden 1999 jälkeen, jolloin konjugaattirokote kyseistä seroryhmää vastaan tuotiin markkinoille. Tätä nykyä ryhmä B aiheuttaa suurimman osan meningokokkitaudeista länsimaissa, joskin senkin aiheuttamien tautien esiintyvyys on laskenut vuoden 2001 jälkeen. (Chang ym. 2012.) Suomessa meningokokkitaudit ovat nykyään 60–70-prosenttisesti seroryhmä B:n aiheuttama (Peltola, 2012).

Vaikka IMD:n ilmaantuvuus koko väestöä tarkasteltaessa ei olekaan kovin suuri, kohdistuu tauti erityisesti pikkulapsiin ja alle 20-vuotiaisiin nuoriin. Meningokokkitaudin vaikeimmassa muodossa sepsiksessä kuolleisuus on antibioottihoidoista huolimatta korkea, 15–80 %, ja henkiinjääneillekin jää usein vaikeita jälkitauteja. (Huovinen ym 2010; Peltola 2012.) Komplikaation vakavuudesta riippuen meningokokkitaudin hoitaminen maksaa yhteiskunnalle paljon. Englannissa tehdyn arvion mukaan esim. vaikeasti komplisoituneen meningokokin aiheuttaman aivokalvontulehduksen kokonaiskustannukset olivat noin 1,7 miljoonaa euroa, mikäli potilas elää 50-vuotiaaksi. Meninkokkisepsiksen kokonaiskustannukset olivat tutkimuksen mukaan n.1,5 miljoonaa euroa. (Glennie ym 2011.)

3.3 Rokotteet

Rokotteita meningokokin seroryhmiä A, C, Y ja W135 vastaan on ollut saatavilla 1970-luvulta lähtien (Chang ym. 2012). Ensimmäiset rokotteet olivat polysakkaridirokotteita: niissä on vain sitä bakteerin polysakkaridia, joka stimuloi elimistössä vasta-aineiden muodostuksen (Huovinen ym.2010). Polysakkaridirokotteiden hyviä puolia ovat niiden edullisuus ja valmistamisen helppous. Ne myös aiheuttavat suhteellisen vähän haittavaikutuksia. (Peltola 2012.) Valitettavasti ne tuottavat pikkulapsilla melko heikon immunologisen vasteen ja vasta-aineet myös häviävät verestä varsin nopeasti (Chang ym. 2012). Aikuisilla polysakkaridirokotteet toimivat paremmin, ja niitä käytetäänkin tehosterokotteina (Peltola 2012).

Konjugaattirokote on uudempi, polysakkaridirokotteita immunogeenisempi rokotetyyppi

(Huovinen ym.2010). Siinä polysakkaridi liitetään kantajaproteiiniin (esim. kurkkumätätai jäykkäkouristustoksoidiin), joka laukaisee elimistössä T-soluvasteen ja näin aikaansaa tehokkaamman ja spesifisemmän immuunivasteen jo vauvaikäisille (Chang ym.2012; Bona, Guidi 2012). Syntyvät vasta-aineet ovat kohtalaisen pitkäikäisiä, ja ne myös vaikeuttavat tartunnan leviämistä vähentämällä nielukantajuutta rokotetuilla (Peltola 2012). Ensimmäinen käyttöön otettu konjugaattirokote kehitettiin 1990-luvun loppupuolella Isossa-Britanniassa, ja se oli seroryhmä C:tä vastaan. Rokote sai aikaan dramaattisen laskun ryhmä C:n aiheuttamissa tautitapausmäärissä ja sen menestyksen innoittamana alettiin vastaavia rokotteita kehittää myös muita seroryhmiä vastaan. Nykyisin käytössä on neljä seroryhmää kattava ACYW135-rokote (Chang ym.2012).

Konjugaattirokotteiden haittapuolia on niiden kalleus, koska polysakkaridien liittäminen valkuaisaineisiin on työlästä. Tämän vuoksi niiden käyttö esim. kehitysmaissa ei ole yleistynyt. Konjugaattirokotteet aiheuttavat myös huomattavasti enemmän sivuvaikutuksia kuin polysakkaridirokotteet. Meningokokkitaudin harvinaisuuden vuoksi on tosin vaikea järjestää koetta, jossa konjugaattirokotteiden saaneita voidaan verrata toisenlaisen rokotteen saaneisiin tai lumeryhmään (Chang ym. 2012; Peltola 2012).

Länsimaita yleisimmin piinaavaa seroryhmä B:tä vastaan ei ole onnistuttu kehittämään toimivaa rokotetta. Syynä on ryhmän kapselipolysakkaridi, joka muistuttaa hyvin läheisesti ihmisten omien solujen pinnalla olevaa polysakkaridirakennetta. Elimistö ei siis tunnista sitä vieraaksi rakenteeksi, eikä sen vuoksi aiheuta immuunivastetta. (Major ym.2011.) Autoimmuunitaudin riskin vuoksi ei ole ehkä edes turvallista yrittää saada immuunipuolustusta tuottamaan vasta-aineita kyseistä polysakkaridia kohtaan (Käyhtö 2000).

Nykyään onkin kehitetty rokotteita, jotka suuntautuvat kapselin sijaan meningokokin muihin rakenteisiin, kuten sen ilmentämiin ulkokalvon valkuaisaineisiin (outer-membrane vesicle, OMV) (Granoff 2010). Lupaavin lähestymistapa tähän asti on ollut avata meningokokin genomisekvenssi ja tunnistaa siitä sen koodittamia antigeenejä (proteiineja), joita voitaisiin käyttää rokotteen kohteena. Menetelmästä käytetään nimitystä reverse vaccinology. Ensimmäisenä tällaisia ulkokalvorakenteisiin kohdistuvia rokotteita on kehitetty mm. Kuubassa ja Uudessa-Seelannissa hyvällä menestyksellä, mutta ne ovat tehonneet lähinnä paikallisiin kantoihin. Maailmanlaajuisesti toimivan rokotteen kehittelyn

haasteena on ollut saada siitä riittävän kattava. Rokotteen pitäisi paitsi sisältää tarpeeksi laaja antigeenivalikoima erilaisten kantojen vuoksi ja myös kyetä ennakoimaan niiden ilmentymistä ja mahdollisia mutaatioita. (English 2013; O'Ryan ym.2014; Peltola 2012.)

Lääkeyhtiö Novartis on äskettäin tuonut Euroopan ja Australian markkinoille tällaisen reverse vaccinology-menetelmällä kehitetyn rokotteen, 4CMenB:n (Bexsero®). Se sai Euroopassa myyntiluvan vuoden 2012 lopulla. Rokote sisältää neljä pääkomponenttia: tekijä H:ta sitovan proteiinin (fHbp), neisseriabakteerien hepariinia sitovan antigeenin (NHBA), neisserioiden adhesiini A:n (NadA) ja porA-geenin koodittaman ulkokalvoproteiinin. Myös Pfizerilla on tällä hetkellä vaiheen III kokeissa reverse vaccinology -rokote, joka sisältää kahta fHbp:n alaluokkaan kuuluvaa, toisistaan immunologisesti eroavaa proteiinia A ja B. (English 2013; O'Ryan ym.2014.)

Huolimatta siitä, että meningokokki-tauti voi olla tappava ja kohdistuu etenkin lapsiin, liittyy rokotteisiin ja niiden käyttöön paljon eettistä ja terveystaloudellista pohdintaa. Tauti on vakavista seurauksistaan huolimatta melko harvinainen. Kuinka pitkäaikaisen suojan rokotteet tarjoavat ja kuinka hyvä niiden hinta-tehokkuussuhde lopulta on? Bexseron® tiedetään kattavan vain n. 80 % tämänhetkisistä meningokokki b -kannoista eli noin 20 % kiertävistä kannoista jää rokotteen ulkopuolelle. Lisäksi mm. porA-geenin tiedetään olevan hyvin muuntautumiskykyinen mikä saattaa vaikuttaa rokotteen kattavuuteen, jos rokote-resistanttiyttä edesauttavia mutaatioita alkaa ajan myötä syntyä. (English 2013; Espocito S, Principi N 2014.)

Nyt odotetaan väestötasoisia tutkimuksia rokotteen vaikutuksista ja kustannus-tehokkuudesta, samoin kuin tietoja rokotteen pitkäaikaissuojasta (English 2013).

4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työssä tutkittiin kuutta eri *Neisseria meningitidis b* -kantaa. Neljä kannosta (kannat nro 3–6) olivat niin kutsuttuja tuoreita eli ne saatiin HUSLAB:n kliinisen mikrobiologian yksiköstä, jossa ne on eristetty meningokokkitautiin sairastuneiden potilaiden verestä. Kaksi muuta kantaa, H44/76 (kanta nro 1) ja MC58 (kanta nro 2), ovat vanhempia, yleisesti maailmalla tutkittuja *N.meningiditi*-kantoja. Kaikkia kantoja säilytettiin pakastettuna (-70 °C).

Seerumitappotesteissä käytetty seerumi (NHS, normal human serum) on kerätty terveiden laboratorion työntekijöiden verestä. Siitä valmistettiin lämpöinaktivoitua seerumia eli HIS:ä (heat in -activated serum) vertailunäytteisiin kuumentamalla NHS:ää 56 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan. Tällä käsittelyllä saatiin aktiiviset komplementtireaktion proteiinit tuhottua seerumista. Laimennoksissa käytettiin fysiologista VBS (veronal buffer saline) -liuosta. Sitä käytettiin myös viimeisessä testissä vertailunäytteenä. Kasvatusliemenä käytettiin BHI (brain heart infusion) -lientä. Kaikki maljakasvatukset tehtiin suklaamaljoilla yön yli + 37 °C:n lämpötilassa, 5-prosenttisessä CO₂-pitoisuudessa. Myös kaikissa testeissä käytettiin +37 °C:n lämpötilaa. Kasvatustestit toistettiin vähintään kaksi kertaa rinnakkaisille maljoille.

4.1. Tappotestiin sopivan seerumipitoisuuden ja ajan määrittäminen

Kanta numero kolme nostettiin koetta edeltävänä päivänä pakastimesta suklaamaljalle kasvamaan yön yli. Koepäivänä sitä kasvatettiin BHI-lientä sisältävässä muoviputkessa n. 3,5 tunnin ajan sekoittimessa (250 rpm). Sitten kasvatuslientä sentrifugoitiin kahdesti (3100 rpm, 8 min ja 8000 rpm, 1,5 min) minkä jälkeen liemen bakteeripitoisuus säädettiin absorptiospektrometrin (OD; 600 nm) avulla pitoisuuteen $2,5 \cdot 10^7$ bakteeria/ml. Määrittämisen jälkeen liemi laimennettiin 1:1000 kahdessa erässä siten, että lopullisessa tappotesteihin käytettävässä liemessä bakteeripitoisuus oli $2,5 \cdot 10^4$ bakteeria/ml.

Sopivia tappotestiolosuhteita testattiin 20 %, 10 %, 5 % ja 0 % normaaliseerumipitoisuuksilla 10 ja 30 minuutin ajan sekoittimessa (800 rpm). Vertailunäytteissä käytettiin vastaavia pitoisuuksia lämpöinaktivoitua seerumia eli HIS:ä. Testiliemestä tehtiin tämän jälkeen 1:2 laimennos VBS:ään, jotta lopullinen maljoille

tuleva bakteeripitoisuus ei olisi liian suuri laskettavaksi. 20 µl tätä laimennoslientä laitettiin suklaamaljoille kasvamaan yön yli.

4.2 Kuuden eri kannan vertailu

Tappotesti tehtiin tässä kokeessa kaikille kuudelle tutkimuksen kohteena olevalle kannalle. Sitä ennen kaikki kannat käsiteltiin samalla tavalla kuin edellisessä testissä niin, että tappotestiliemen bakteeripitoisuudeksi saatiin jälleen $2,5 \cdot 10^4$ bakteeria/ml. Tappotesteissä seerumipitoisuus oli 5 % ja aika 10 min. Nämä arvot perustuivat edellisen testin tuloksiin (ks. luku 5.1). Maljaus tehtiin kuten edellisessä testissä ja maljoja kasvatettiin yön yli.

4.3 Seerumiesikasvatuksen vaikutus bakteerien selviytymiskykyyn tappotestissä

Tässä testissä kantojen 3 ja 4 annettiin ensin kasvaa yön BHI-liemessä (+ 37 °C, 250 rpm) (kun ne sitä ennen oli jälleen nostettu pakastimesta suklaamaljoille kasvamaan yön yli). Sitten tätä yön yli kasvanutta lientä lisättiin 40 µl uuteen BHI-liemeen, jonka tilavuus oli 910 µl. Mukaan lisättiin 50 µl joko HIS:ä tai VBS:ä (vertailunäyte).

Näytteiden annettiin kasvaa yhteensä 3 h (800 rpm) (tästä 3 h kasvatuksesta käytetään työssä nimeä esikasvatus). Tämän jälkeen liemet laimennettiin ja tappotestattiin kuten aiemminkin (5-prosenttisessä seerumipitoisuudessa 10 min ajan.). Maljauksessa käytettiin nyt laimennossuhdetta 1:10, koska aiemmissa testeissä käytetty suhde 1:2 laimensi bakteerilientä niin vähän, että pesäkkeiden laskeminen maljalta oli vaikeaa.

Vastaava testi tehtiin kannalle 4 myös siten, että esikasvatukseen laitettiin HIS:in ja VBS:n lisäksi myös kolmas näyte, johon oli lisätty normaalia seerumia (NHS) 50 µl.

5. TULOKSET

5.1 Sopivan seerumipitoisuuden ja ajan määrittäminen

Tässä testissä oli tarkoitus määrittää optimaalinen seerumipitoisuus ja tappotestausaika muita kokeita varten. Yön yli suklaamaljoilla tapahtuneen kasvatuksen jälkeen tutkittiin, oliko maljoilla kasvustoa ja kuinka paljon sitä oli. Tulokset on esitetty taulukossa 1. (Pmy = pesäkkeitä muodostava yksikkö).

TAULUKKO 1. Kannan 3 kasvu eri seerumipitoisuuksissa (0–20 %) ja eri kasvatusajoilla (10 ja 30 min.)

	20 % 10 min.	20 % 30 min.	10 % 10 min.	10 % 30 min.	5 % 10 min.	5 % 30 min.	0 % 30 min.
NHS	+	-	+	-	++	+	+++
HIS	+++	+	+++	++	+++	+++	+++

+ = $< 2.5 \cdot 10^6$ pmy/ml ++ = $2.5 \cdot 10^6$ — $7.5 \cdot 10^6$ +++ = $> 7.5 \cdot 10^6$ pmy/ml - = ei kasvua

Eniten kasvua oli maljalla, jonka bakteerien tappotestissä oli käytetty 5-prosenttista NHS:sää 10 minuutin ajan ($2,5$ – $7,5 \cdot 10^6$ pmy/ml). Muissa pitoisuuksissa ja tappotestausajoilla kasvua ei joko ollut ollenkaan (NHS 20 % 30 min ja 10 % 30 min) tai sitä oli vain hyvin vähän (NHS 10 % 10 min ja 5 % 30 min). Pesäkkeiden vähyys ($< 2,5 \cdot 10^6$ pmy/ml) heikentää tulosten luotettavaa arviointia jatkotestejä ajatellen. Tämän vuoksi jatkotesteissä päädyttiin käyttämään 5 % NHS-pitoisuutta ja 10 minuutin testausaika. Kaikissa vertailunäytteissä (HIS) näkyi kasvua, kuten oli tarkoituskin.

5.2 Kuuden eri kannan vertailu

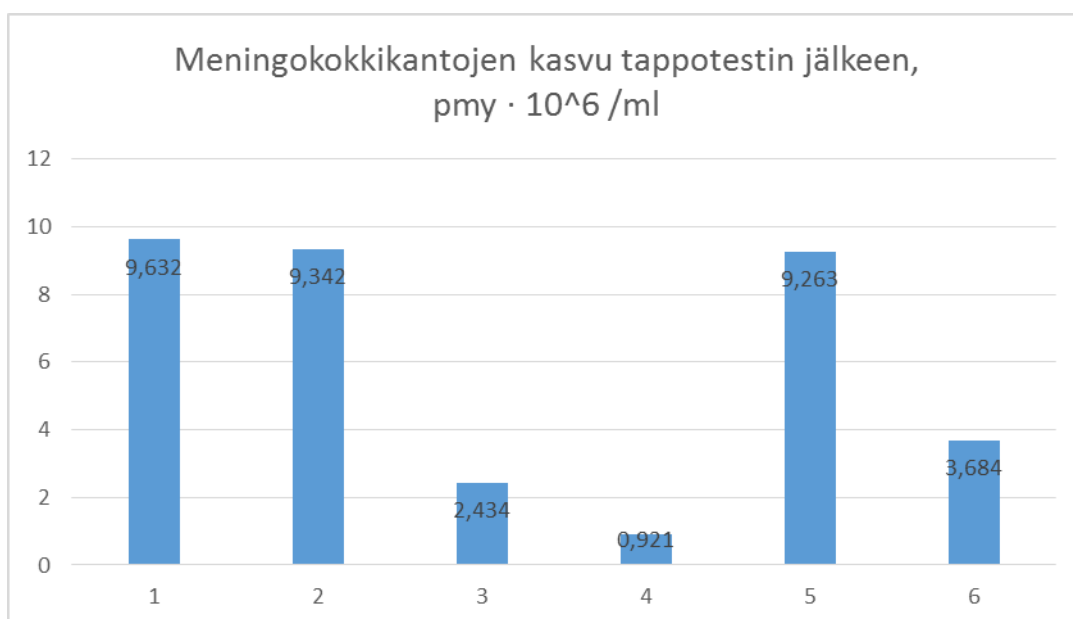
Tämän testin tarkoitus oli vertailla kuutta eri tutkimuksen kohteena olevaa kantaa ja selvittää, onko niiden selviytymiskyvyssä eroja. Kannat 1–2 olivat siis yleisesti tutkimuskäytössä olleita *N.meningiditi*-kantoja ja kannat 3–6 HUSLAB:n potilaista eristettyjä kantoja.

Suklaamaljoilla kasvaneet pesäkkeet laskettiin seuraavana päivänä (kuten luvussa 5.1). Tappotestissä käytetty seerumipitoisuus oli nyt edellä saatu 5 % ja testiaika 10 minuuttia. Tulokset on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Kuuden eri kannan selviytymiskyvyn vertailu, pmy/ml

Kannan nro	NHS	HIS
1. H44/76	$9.632 \cdot 10^6$	$20.263 \cdot 10^6$
2. MC58	$9.342 \cdot 10^6$	$12.895 \cdot 10^6$
3. HUSLAB-kanta	$2.434 \cdot 10^6$	$7.105 \cdot 10^6$
4. HUSLAB-kanta	$0.921 \cdot 10^6$	$12.895 \cdot 10^6$
5. HUSLAB-kanta	$9.263 \cdot 10^6$	$9.421 \cdot 10^6$
6. HUSLAB-kanta	$3.684 \cdot 10^6$	$3.684 \cdot 10^6$

Laboratoriokantojen 1 ja 2 maljoilla kasvua oli toistetusti eniten. Tuoreissa kannoissa kasvua oli selvästi vähemmän, lukuun ottamatta kantaa 5, joka kasvoi lähes yhtä hyvin kuin kannat 1 ja 2. Kuvassa kolme on vertailtu kantojen keskinäisiä kasvueroja suklaamaljalla NHS-seerumitappotestauksen jälkeen.



KUVA 3. Eri kantojen kasvu tappotestissä

Kaikissa vertailunäytteissä (HIS) oli kasvua. Kaikkien kantojen kasvu ei tosin jostain syystä ollut vertailunäytteissä yhtä runsasta.

5.3 Seerumiesikasvatuksen vaikutus bakteerien selviytymiskykyyn tappotestissä

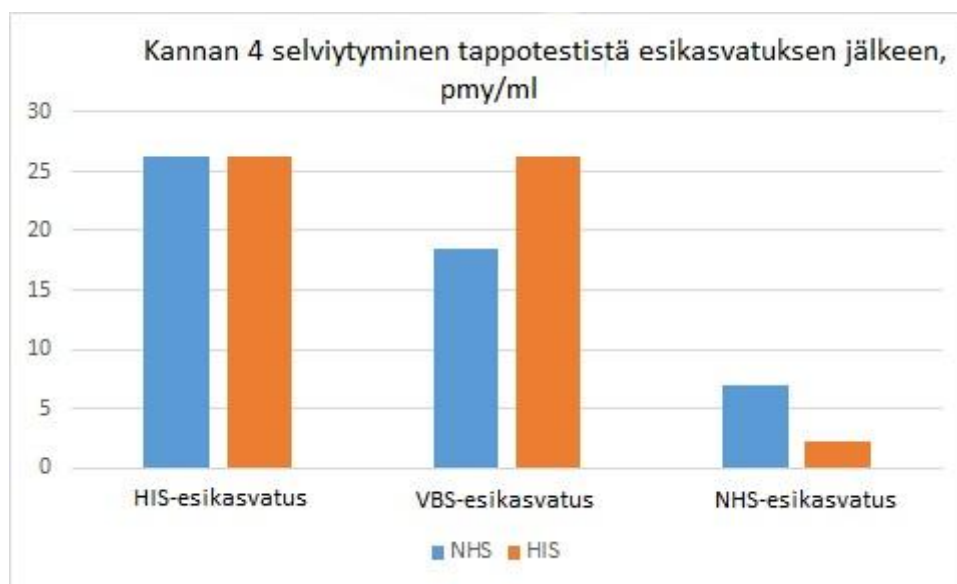
Tässä testissä vertailtiin, miten yhden kannan (kanta neljä) selviytyminen tappotestauksessa vaihteli, kun sitä oli ensin esikasvatettu joko HIS-seerumissa, NHS-seerumissa tai pelkässä puskuriliuoksessa ilman seerumia.

Yön yli suklaamaljalla kasvaneet pesäkkeet laskettiin kuten aiemmissa testeissä, ja tulokset esitetään taulukossa 3. Taulukossa on sarakkeessa 1 esikasvatusliemeen lisätty komponentti (eli joko lämpöinaktivoitu seerumi HIS, normaali seerumi NHS tai pelkkä VBS-puskuri) ja sarakkeissa 2 ja 3 tappotestissä käytetyt seerumityypit eli normaali (NHS) ja lämpöinaktivoitu seerumi (HIS). Taulukossa esitetyt tulokset ovat kannasta neljä, koska ensin käytetty kanta kolme kuoli kokonaan tai siitä selvisi liian pieni osuus esikasvatusvaiheessa, vaikka testi toistettiin sille kaksi kertaa.

TAULUKKO 3. Kannan 4 selviytyminen tappotestistä erilaisten esikasvatusten jälkeen, pmy/ml

	NHS	HIS (kontrolli)
HIS	$26.316 \cdot 10^6$	$26.316 \cdot 10^6$
VBS-puskuri	$18.421 \cdot 10^6$	$26.316 \cdot 10^6$
NHS	$7.040 \cdot 10^6$	$2.237 \cdot 10^6$

HIS-esikasvatuksen saaneet bakteerit selvisivät tappotestistä toistetusti parhaiten. Ne kasvoivat yhtä hyvin kuin HIS-kontrollin bakteerit. VBS-puskurissa esikasvatetut bakteerit selvisivät tappotestistä myös hyvin, mutta vertailunäytteeseen nähden kuitenkin selvästi vähälukuisemmin (ks. kuva 4).



KUVA 4. Esikasvatuksen ja tappotestin jälkeisen kasvun vertailu kannassa 4

NHS-esikasvatuksen saaneet bakteerit selvisivät huonoiten, vaikka niidenkin kohdalla kasvua tapahtui. Käytännössä NHS-esikasvatuksen saaneet bakteerit kävivät läpi tappotestin kaksi kertaa, koska NHS:n pitoisuus esikasvatusliemessä oli 5 % (ks. luku 4.3). HIS -kontrollissa kasvaneet bakteerit tosin selvisivät huonommin kuin varsinaisessa tappotestissä olevat bakteerit. Testi toistettiin vain kahdesti, joten tämän perusteella ei vielä pysty varmasti sanomaan, onko tulos todellinen, vai onko jossain työn vaiheessa tapahtunut esim. työskentelyvirhe, joka on johtanut bakteeripitoisuuden vähenemiseen kontrollissa.

Se, että bakteerien pitoisuudet ovat suurempia kuin edellisessä testissä, johtuu todennäköisesti siitä, että niitä myös kasvatettiin pidempään.

6. POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten meningokokki b:n kasvatusympäristö vaikuttaa sen seerumiresistenssiin eli kykyyn selviytyä normaaliseerumissa (NHS) *in vitro*. Lisäksi tutkittiin, vaikuttiko bakteerikanta selviytymiskykyyn. HIS-seerumia eli seerumia josta on kuumentamalla inaktivoitu komplementin proteiinit, käytettiin vertailunäytteenä eli kontrollina. Lisäksi kolmannessa testissä myös esikasvatettiin bakteereja siinä (5 % pitoisuudessa). NHS-seerumissa taas komplementtiproteiinit ovat aktiivisessa muodossa ja niiden pitäisi teoriassa estää tai ainakin merkittävästi vähentää meningokokkibakteerien (kuten muidenkin vieraiden organismien) kasvua.

Ensimmäinen testi tehtiin, jotta löydettiin sopivat testausolosuhteet muille testeille. Siinä selvisi, että sekä seerumikonsentraatiolle, jossa bakteerit kasvavat mahdollisimman hyvin, että tappotestissä käytetylle ajalle on olemassa optimiarvot (tässä siis ensimmäisessä testissä saadut 5 % pitoisuus ja 10 minuutin kasvatusaika, ks. Taulukko 1). Tätä tietoa hyödynnettiin muissa testeissä.

Toisen testin tarkoitus oli vertailla, miten eri meningokokkikannat poikkeavat toisistaan selviytymiskyvyssä. Käytössä oli yleisesti tutkimuskäytössä olleita kantoja (kannat 1 ja 2) sekä HUSLAB:n omia, meningokokkitautin sairastuneiden potilaiden verestä eristettyjä kantoja (kannat 3–6). Yleiset laboratoriokannat olivat pääosin kuutta eri kantaa vertailtaessa tuoreita kantoja kestävämpiä. Kanta viisi oli tuoreista kannoista ainoa, joka selvisi yhtä hyvin kuin laboratoriokannat (ks. taulukko 2 ja kuva 3). Laboratoriokantojen menestys voisi selittyä sillä, että kyseiset kannat ovat ajan myötä laboratoriosta toiseen siirtyessään mahdollisesti kehittäneet joitain resistenttitekijöitä, joita tuoreilla kannoilla ei ole, tai sitten ne ovat vain muuten sopeutuneet kasvamaan paremmin laboratorioolosuhteissa. Meningokokeille on myös tyypillistä ns. faasivaihtelu eli kyky muuttaa ulkokalvon rakenteita ja virulenssitekijöitä eri kantojen välillä ja mahdollisesti jopa saman kannan sisällä (Käyhty 2000). Tämä faasivaihtelu voisi mahdollisesti selittää, miksi yksi tuoreista kannoista menestyi niin hyvin.

Eri kantojen välisten erojen vertailun merkitys on suuri rokotuskehittelyä ajatellen, sillä isoimpia ongelmia rokotteita suunniteltaessa on tällä hetkellä saada rokotteesta mahdollisimman monia kantoja kattava. (English 2013; O'ryan ym. 2014.) Tässä työssä

saatujen tulosten perusteella ei voida kuitenkaan vielä tehdä kovin kauaskantoisia johtopäätöksiä, koska testi toistettiin vain kahdesti. Korkeintaan voidaan todeta, että eri kantojen välisessä selviytymiskyvyssä on hyvin todennäköisesti eroja.

Kasvatusympäristön vaikutuksen tutkiminen antoi odotettuja tuloksia. Työn tarkoituksena oli tutkia, miten ”ympäristön stressi” eli kolmen tunnin esikasvatus seerumissa vaikuttaa selviytymiskykyyn tappotestissä. Lämpöinaktivoidussa seerumissa (HIS) kasvaneet bakteerit selvisivät toistetuksi paremmin tappotestistä kuin puskurissa (VBS) tai normaaliseerumissa (NHS) kasvatetut bakteerit (ks. taulukko 3). Tämä tukee ajatusta, että seerumissa on tekijöitä, joita meningokokki kykenee sitomaan pinnalleen ja näin selviytymään paremmin tappotestin normaaliseerumin komplementista. Toisaalta normaaliseerumissa esikasvanut meningokokki ei menestynyt tappotesteissä, vaikka sen teoriassa pitäisi pystyä sitomaan samoja tekijöitä seerumista kuin lämpöinaktivoidussa seerumissa esikasvanut bakteerit. Voi olla, että normaaliseerumin aktiiviset komplementtiproteiinit jotenkin häiritsevät tätä sidontaa tai muuten heikentävät bakteereja. NHS-liemessä esikasvatetut bakteerit käyvät myös läpi tappotestauksen periaatteessa kaksi kertaa (koska myös esikasvatusliemen NHS-pitoisuus 5 %), mikä varmasti pienentää selvinneiden bakteerien lukumäärää.

Se mitä nämä oletetut meningokokkia suojaavat tekijät seerumissa ovat, jäi tämän tutkimuksen puitteissa arvailun varaan. Oletus on, että kyse on erilaisista komplementin säätelytekijöistä, kuten fH:sta ja C4BP:stä. Varmuuden saamiseksi seuraava vaihe työssä olisi (vielä useamman kerran toistettujen kasvatuskokeiden jälkeen) tutkia esim. virtaussytometrinen tai geelielektroforesimenetelmien avulla niitä proteiineja, joita tappotesteistä selvinneet bakteerit ovat pinnalleen sitoneet ja joita niiden oletetaan hyödyntävän selviytymisessään.

Tutkimuksessa käytetyissä menetelmissä on myönnettävä olevan puutteita. Suurimmaksi ongelmaksi muodostui kaikissa testeissä toistojen vähyys. Eri testejä toistettiin vain 2–4 kertaa kahdelle rinnakkaiselle maljalle, mikä ei vielä riitä luotettavien johtopäätösten tekemiseen. Sekä toistoja että rinnakkaisia maljoja pitäisi olla enemmän, etenkin kun otetaan huomioon meningokokkien ”ailahtelevaisuus” kasvun suhteen.

Tällä hetkellä meningokokki-tutkimus ja rokotekehittely ovat keskittyneet vahvasti

erilaisten pinta-antigeenien etsimiseen ja hyödyntämiseen, lähinnä bakteerin DNA:ta tutkimalla. Tässä työssä lähestymistapa oli hieman erilainen. Ajatus oli genomien sijaan tutkia ympäristön vaikutusta bakteerin kasvukykyyn. Toki nämä kaksi osa-aluetta, geenit ja ympäristö, liittyvät myös vahvasti toisiinsa. Ympäristön vaikutuksen tutkimista hankaloittaa se, että meningokokki on vain ihmisillä esiintyvä patogeeni, joten *in vivo* -tutkimusta on hankala toteuttaa, koska eläinmalleja ei voida käyttää.

7. LÄHTEET

Abbas A, Fausto N, Kumar V. Acute and chronic inflammation. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Inc 2005. S. 64-67.

Blom AM, Hallström T, Riesbeck K. Complement evasion strategies of pathogens – Acquisition of inhibitors and beyond. Molecular Immunology 2009; 46: 2808-2817.

Bona G, Guidi C. Meningococcal Vaccine Evolution. J Prev Med Hyg 2012; 53(3): 131-5.

Bottomley MJ, Serruto D, Safadi MAP, Klugman KP. Future challenges in the elimination of bacterial meningitis. Vaccine 2012; 30: B78-B86.

Chang Q, Tzeng YL, Stephens DS. Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention. Clin Epidemiol 2012; 4: 237-45.

English P. Vaccination against meningitis B: is it worth it? Drugs in Context 2013; 24: 212246.

Esposito S, Principi N. Vaccine profile of 4CMenB: a four-component *Neisseria meningitidis* serogroup B vaccine. Expert Rev Vaccines 2014; 13(2): 193-202.

Gao H, Yan C. New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. Front Immunol 2012; 3: 368.

Glennie L, Wordsworth R, Wright C. COUNTING THE COST OF MENINGITIS: A severe case of meningococcal septicaemia. Meningitis Research Foundation submission to October 2010 JCVI call for evidence for first meeting of meningococcal sub Group. S. 23 Viitattu 4.1.2013 www.meningitis.org/assets/x/53382

Granoff DM. Review of Meningococcal B Vaccines. Clin Infect Dis. 2010; 50: S54-S65.

Greenwood B, McIntyre P, O'Brien K, van de Beek D. Effects of vaccines of bacterial meningitis worldwide. The Lancet 2012; 380; 1703-1711.

Haapasalo-Tuomainen K. Role of the Soluble Complement Factor H in Microbial Survival and Host Infection Susceptibility. Väitöskirja. Helsingin yliopisto 2012. S. 12, 34-40.

Huovinen P, Meri S, Peltola H ym. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki. Duodecim 2010. S. 682.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M ym. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 5th edition. New York: Garland Science 2001. Viitattu 20.5.2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>

Jafri RZ, Ali A, Messonnier NE ym. Global epidemiology of invasive meningococcal disease. Popul Health Metr. 2013; 10: 17.

Jarva H, Meri S. Kliinisesti merkittävät komplementtipuutokset. Duodecim 2000; 116: 1367-74.

Jarva H, Ram S, Vogel U, Blom AM, Meri S. Binding of the Complement Inhibitor C4bp to Serogroup B Neisseria meningitidis. The journal of immunology 2005; 174: 6299-6307.

Kaaijk P, Ende A, Luytjes W. Routine Vaccination Against MenB: Considerations of Implementation. Hum Vaccin Immunother 2013; 18: 10(2)

Käyhtö H. Mitä hyötyä on meningokokin geenikartasta? Duodecim 2000; 116: 2739-2740.

Ladhani SN, Flood JS, Ramsay ME ym. Invasive meningococcal disease in England and Wales: implications for the introduction of new vaccines. Vaccine 2012; 21: 3710-6.

Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol 2008; 6(2): 132.

Lewis LA, Ram S. Meningococcal disease and the complement system. Virulence 2013; 8: 5(1).

Okroj M, Holmquist E, King BC, Blom AM. Functional Analyses of Complement Convertases Using C3 and C5-Depleted Sera. PLoS One 2012; 7(10): e47245.

Peltola H. Kohti yhä täydellisempää meningokokkirokotetta. Suomen lääkäri-lehti 2012; 67(19): 1494-1501.

Major M, Novartis Vaccines and Diagnostics, Moss S ym. From genes to vaccine: A breakthrough in the prevention of meningococcal group B disease. Paediatr Child Health 2011; 16(8): e61-e64.

Meri S. Aktivaatitiet. Kirjassa: Immunologia. Helsinki: Duodecim. 1.4.2011. (tekstiviite Meri 2011a)

Meri S. Komplementin muut tehtävät. Immunologia. Helsinki: Duodecim. 1.4.2011. (tekstiviite Meri 2011b)

Meri S. Membraaneja tuhoava kompleksi. Immunologia. Helsinki: Duodecim. 1.4.2011 (tekstiviite Meri 2011c).

Meri S. Aktivaation säätely. Immunologia. Helsinki: Duodecim. 1.4.2011 (tekstiviite Meri 2011d).

O'Ryan M, Stoddard J, Toneatto D, Wassil J, Dull PM. A Multi-Component Meningococcal Serogroup B Vaccine (4CMenB): The Clinical Development Program. Drugs 2014; 74(1): 15-30

Racloz VN, Luiz SJD. The elusive meningococcal meningitis serogroup: a systematic review of serogroup B epidemiology. BMC Infectious Diseases 2010; 10:175.

Sadarangani M, Hoe JC, Callaghan MJ ym. Construction of Opa-Positive and Opa-Negative Strains of *Neisseria meningitidis* to Evaluate a Novel Meningococcal Vaccine. PLoS One 2012; 7(12): e51045.

Schneider MC, Prosser BE, Caesar JJ ym. *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. Nature 2009; 458(7240): 890-893.

Seib KL, Brunelli B, Brogioni B *ym*. Characterization of Diverse Sub Variants of the Meningococcal Factor H (fH) Binding Protein for Their Ability To Bind fH, To Mediate Serum Resistance, and To Induce Bactericidal Antibodies. *Infect Immun* 2011; 79(2): 970-81.

Sim SH, Heo JY, Kim EC, Choe KW. A Case of Meningococcal Sepsis and Meningitis with Complement 7 Deficiency in a Military Trainee. *Infect Chemother*. 2013; 45(1): 94-98.

Strelow VL, Vidal JE. Invasive meningococcal disease. *Arq. Neuropsiquiatr*. 2013; 71(9B): 653-8.

Welsch J, Ram S. Factor H and Neisserial pathogenesis. *Vaccine* 2008; 26(Suppl 8): I40-I45.

Yazdankhah S, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004; 53; 821-832.

Zipfel PF, Hallström T, Riesbeck K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes – Tipping the balance. *Molecular Immunology*, 2013; 56(3):152-160.

