



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

**ELISA-MENETELMÄN PYSTYTYS JA NAUDAN SYTOKIINIEN OSOITTAMINEN
MAITO- JA SEERUMINÄYTTEISTÄ KNS-MASTITISSA**

**Työn tekijä: Jenni Ylikoski-
Okontah**

Työn ohjaaja: Tiina Soininen

**Työn ohjaajat: Tiina Salomäki,
Antti Iivanainen**

Työ hyväksytty: __. __. 2008

**Tiina Soininen
lehtori**



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan peruseläinlääketieteen laitoksella, eläinlääketieteellisen anatomian osastolla. Haluan kiittää esimiestäni, professori Antti Iivanaista mahdollisuudesta suorittaa harjoitteluni ja opinnäytetyöni tällä osastolla sekä tilaisuudesta oppia paljon uutta immunologiasta, kiitos myös ohjauksesta ja neuvoista opinnäytetyöhön liittyen. Iso kiitos kuuluu myös toiselle työn ohjaajalle, assistentti Tiina Salomäelle ohjauksesta, neuvoista ja kärsivällisyydestä. Lisäksi haluan kiittää anatomian osaston laboratoriomestari Kirsi Lahtea henkisestä tuesta ja BSA-PBS-liuoksista.

Haluan kiittää myös opinnäytetyöni valvojaa ja opintojeni kolmannen vuoden tutoropettajaa, lehtori Tiina Soinista ohjauksesta, kannustuksesta ja joustavuudesta kolmannen, ei niin helpon, opiskeluvuoden aikana.

Haluan myös kiittää vanhempiani tuesta ja kannustamisesta kaikessa, mihin olen ikinä ryhtynyt. Big Thank You to Kris and Daniel for your support, love and encouragement.

Helsingissä 10.10.2008

Jenni Ylikoski-Okontah

OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Jenni Ylikoski-Okontah	
Työn nimi: ELISA-menetelmän pystytys ja naudan sytokiinien osoittaminen maito- ja seeruminäytteistä KNS-mastiitissa	
Päivämäärä: 10.10.2008	Sivumäärä: 32 s. + 3 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioala	
Työn ohjaaja: Tiina Soininen (FL)	
Työn ohjaajat: Tiina Salomäki (FM), Antti Iivanainen (ELT, dos.)	
<p>Tässä opinnäytetyössä pystytettiin ELISA-menetelmä naudan sytokiininen mittaamiseksi koagulaasinegatiivisilla stafylokokkeilla infektoidujen nautojen maito- ja seeruminäytteistä. Opinnäytetyö tehtiin osana professori Antti Iivanaisen ja professori Satu Pyörälän Kokeellinen KNS-mastiitti –yhteistyöprojektia.</p> <p>Sytokiinit ovat osa elimistön puolustusjärjestelmää. Ne ovat pieniä solujen erittämiä proteiineja, jotka toimivat osana tulehdusreaktiota. Sytokiinien erittymistä koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttamassa mastiitissa ei ole aiemmin tutkittu. Infektiota tutkimalla saadaan tärkeää tietoa infektioita aiheuttavista lajeista sekä infektioiden kestosta. Samalla saadaan tietoa naudan immuunijärjestelmän toiminnasta, mitä puolestaan voidaan käyttää hyväksi kehitettäessä uusia keinoja diagnosoida mastiittia.</p> <p>Työ aloitettiin pystyttämällä menetelmä sytokiinien mittaamiseksi. Menetelmän pystytyksessä etsittiin sopivimmat vasta-ainepitoisuudet ja rekombinanttiproteiinien laimennossarjojen pitoisuudet. Näytteiden analysointiin valitut ”capturing”-vasta-aineen pitoisuudet olivat IL-1β 4 μg/ml, IL-8 4 μg/ml, TNF-α 1 μg/ml. Käytetyt detektiovasta-ainepitoisuudet olivat IL-1β 2 μg/ml, IL-8 20 ng/ml, TNF-α 2,5 μg/ml. Lisäksi menetelmää pystytettäessä tarkistettiin vasta-aineiden kyky tunnistaa naudan sytokiinejä. Etukäteen suunnitelluista mittauksista IL-6 jouduttiin jättämään myöhempään ajankohtaan, sillä käytetyt IL-6-vastaaineet eivät tunnistaneet naudan sytokiinejä.</p> <p>Menetelmällä pystyttiin mittaamaan tarkoitetut maito- ja seeruminäytteet. Näytteet olivat peräisin naudoista, jotka oli tartutettu joko <i>Staphylococcus epidermidis</i> tai <i>Staphylococcus simulans</i> -kannoilla. Tämän opinnäytetyön tuloksissa esitetään kaikkien nautojen tulokset kahden tartutuksen ajalta. Maitonäytteistä mitattiin IL-1β-pitoisuuksia 0 - 3,5 ng/ml, IL-8-pitoisuuksia 0 - 0,11 ng/ml ja TNF-α-pitoisuuksia 0 - 51 ng/ml välillä. Seeruminäytteiden pitoisuudet vaihtelivat IL-1β 0 - 0,065 ng/ml, IL-8 0 - 0,016 ja TNF-α 0 - 62 ng/ml. Mitatut tulokset olivat oletettua tasoa. Tässä opinnäytetyössä käsiteltyjen tulosten joukko on liian pieni, jotta siitä voitaisiin tehdä laajempia päätelmiä tai tilastollista vertailua.</p>	
Avainsanat: ELISA, sytokiini, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , mastiitti, utaretulehdus, KNS	

ABSTRACT

Name: Jenni Ylikoski-Okontah

Title: ELISA Protocol Optimizing and Detecting Cytokines from Bovine Milk and Serum Samples in CNS Mastitis

Date: 10 October 2008

Number of pages: 32 + 3 attachments

Department:

Laboratory Sciences

Instructor: Tiina Soininen

Supervisors: Tiina Salomäki, Antti Iivanainen

The aim of this study was to optimize ELISA protocol for measuring cytokines from CNS infected bovine milk and serum samples. The study was carried out as part of Professor Antti Iivanainen's and Professor Satu Pyörälä's co-operation project "Experimental CNS Mastitis".

Cytokines are one part of the immune system. They are small proteins secreted by several different cell types. Cytokines act as part of inflammation reaction. The secretion of cytokines in mastitis caused by a CNS infection has not been studied before. Studying the infection can provide important information of the bacterial species that have caused the infection and about the duration of the infection. At the same time new information about bovine immune system can be collected. That information can be used to develop new ways to detect mastitis.

The study was started by optimizing the ELISA protocol. The first step at optimizing was to find the most suitable concentrations for antibodies and recombinant protein dilutions for standard curves. Antibody concentrations which were chosen to be used for measuring samples were IL-1 β 4 μ g/ml, IL-8 4 μ g/ml, TNF- α 1 μ g/ml for capturing antibody and IL-1 β 2 μ g/ml, IL-8 20 ng/ml, TNF- α 2,5 μ g/ml for detecting antibody. The ability of antibodies to detect bovine cytokines was tested as a part of optimizing the protocol. The IL-6 analysis was postponed to a later date as it was found that IL-6 antibodies were not able to recognise bovine cytokines.

The protocol turned out to be successful in the measurement of these samples. The samples were collected from cows, which were infected with either *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus simulans*. This study presents all of the samples from two different times of infection. Cytokine levels in milk samples were IL-1 β 0-3,5 ng/ml, IL-8 0-0,11 ng/ml and TNF- α 0-51 ng/ml and in serum samples IL-1 β 0-0,065 ng/ml, IL-8 0-0,016 and TNF- α 0-62 ng/ml. The results obtained in this study correspond with the results of previous studies. The results of this study are, however, too few to allow for any further conclusions or statistical analysis.

Keywords: ELISA, cytokine, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , bovine mastitis, CNS

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

SISÄLLYS

LYHENNE- JA SANALUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	TYÖN TEORIA	<u>2</u>
2.1	Mastiitti	<u>2</u>
2.1.1	<i>Bakteerien aiheuttama tulehdusreaktio</i>	<u>2</u>
2.1.2	<i>Maidon koostumuksen muutokset mastiitissa</i>	<u>3</u>
2.1.3	<i>Koagulaasinegatiiviset stafylokokit mastiitin aiheuttajina</i>	<u>5</u>
2.2	Naudan immuunipuolustus utaretulehdusta vastaan	<u>7</u>
2.2.1	<i>Anatomiset puolustusmekanismit</i>	<u>7</u>
2.2.2	<i>Solupuolustus</i>	<u>8</u>
2.2.3	<i>Liukoiset tekijät</i>	<u>9</u>
2.3	Sytokiinit	<u>10</u>
2.3.1	<i>Interleukiini-1β</i>	<u>11</u>
2.3.2	<i>Interleukiini-6</i>	<u>12</u>
2.3.3	<i>Interleukiini-8</i>	<u>12</u>
2.3.4	<i>Tuumorinekroositekijä-alfa</i>	<u>13</u>
2.3.5	<i>Sytokiinien käyttömahdollisuudet mastiitin diagnosoinnissa ja hoidon seurannassa</i>	<u>14</u>
2.4	Sytokiini-ELISA	<u>15</u>
3	ANALYSOITAVAT NÄYTTEET	<u>16</u>
4	TYÖN TOTEUTUS	17
4.1	Menetelmän pystytys	<u>17</u>
4.1.1	<i>Käytettävien vasta-ainepitoisuuksien ja sopivan levytyypin etsiminen</i>	<u>17</u>
4.1.2	<i>Vasta-aineiden kyky tunnistaa eri lajien sytokiinejä</i>	<u>18</u>
4.1.3	<i>Standardina käytetyt rekombinanttiproteiinit</i>	<u>19</u>
4.2	Näytteiden analysointi	<u>19</u>
4.3	ELISA	<u>20</u>

5	TULOKSET	<u>21</u>
5.1	Menetelmän pystytystulokset	<u>21</u>
5.2	Näytteiden mittaustulokset	<u>24</u>
6	YHTEENVETO	<u>27</u>
	VIITELUETTELO	30
	LIITTEET	—
LIITE 1	Pipetointitaulukko	
LIITE 2	Käytetyt liuokset ja vasta-ainepitoisuudet	
LIITE 3	Mittaustulokset taulukoituna	

LYHENNE- JA SANALUETTELO

Capturing-vasta-aine	ELISA-levylle ensimmäisenä pipetoitu vasta-aine, johon näytteen sisältämät antigeenit (tässä sytokiinit) kiinnittyvät
CFU	colony forming unit, pesäkkeen muodostava yksikkö
Detektiovasta-aine	Näytteiden jälkeen ELISA-levylle pipetoitava vasta-aine, joka tunnistaa ”capturing”-vasta-aineeseen sitoutuneet antigeenit ja sitoutuu näihin. Leimattu (tässä) biotiinilla.
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
IL-1 β	interleukiini-1 β
IL-6	interleukiini-6
IL-8	interleukiini-8
Kliininen	selväoireinen, oirehtiva
KNS	koagulaasinegatiivinen stafylokokki
Koagulaasi	entsyymi, joka aiheuttaa veriplasman hyytymistä
Laktaatio	maidon erittyminen
SCC	somatic cell count, somaattisten solujen lukumäärä, maidosta laskettava lehmästä itsestään peräisin olevien solujen määrä
Subkliininen	piilevä, vähäoireinen
TNF- α	tuumorinekroositekijä- α

1 JOHDANTO

Utaretulehdus eli mastiitti on yksi yleisimmistä maitokarjan sairauksista. Sitä esiintyy laajasti ympäri maailman. Mastiitti aiheuttaa merkittäviä taloudellisia menetyksiä sekä karjailoille että meijeriteollisuudelle. Mastiitin aiheuttaa bakteeri, sieni, virus tai traumaperäinen kudosaivaurio. Mastiittia aiheuttavia bakteerilajeja on useita. Viime aikoina on havaittu perinteisten taudinaiheuttajien osuuden väheneminen mastiitin aiheuttajina. Sen sijaan koagulaasinegatiivisten stafylokokkien osuus mastiitin aiheuttajina on noussut. KNS-lajeja on noin 40. Monet näistä elävät naudon iholla, karvapeitteessä ja limakalvoilla. Niitä onkin pidetty opportunistisina ihon mikrobiotaan kuuluvina bakteereina. KNS-infektiota seuraamalla saadaan tietoa infektioita aiheuttavista lajeista sekä infektioiden kestosta.

Sytokiinit ovat osa puolustusjärjestelmän liukoisia tekijöitä. Sytokiinien tehtävänä on säädellä puolustusjärjestelmän toimintaa ja tulehdusreaktiota joko estävästi tai edistävästi. Maidon ja veren sytokiinipitoisuuksien seuraaminen infektion aikana antaa tietoa naudon puolustusjärjestelmän toiminnasta. Tämä puolestaan auttaa uusien mastiitin diagnosointitapojen kehittämisessä.

Tämä opinnäytetyö tehtiin osana professori Antti Iivanaisen ja professori Satu Pyörälän Kokeellinen KNS-mastiitti –yhteistyöprojektiä. Laboratoriotyöt tehtiin Helsingin yliopiston peruseläinlääketieteenlaitoksella eläinlääketieteellisen anatomian osastolla. Opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää ELISA-menetelmä naudon sytokiinien IL-1 β , IL-6, IL-8 ja TNF- α mittaamiseksi maito- ja seeruminäytteistä. Näytteet olivat peräisin kokeellisista mastiittitartuksista, joissa naudat oli infektoitu koagulaasinegatiivisilla stafylokokkeilla (*Staphylococcus epidermidis* ja *Staphylococcus simulans*).

2 TYÖN TEORIA

2.1 Mastiitti

Mastiitti eli utaretulehdus on maitorauhasen tulehdustila, jonka aiheuttaa bakteeri, virus, sieni tai traumaperäinen kudosaaurio. Noin 80 % utaretulehduksista on bakteerin aiheuttamia. Lopuista 20 prosentista osa saattaa olla bakteerin aiheuttamia, mutta bakteerien määrä on niin alhainen, ettei niitä pystytä maitonäytteistä osoittamaan. [1; 2, s. 60.] Utaretulehdusta esiintyy naudoilla kaikissa maidontuotannon eli laktaation vaiheissa. Esiintyvyys vaihtelee jonkin verran myös eläimen iän ja poikimakertojen mukaan. Eniten mastiittia esiintyy pian poikimisen jälkeen laktaation alkuvaiheessa. On osoitettu, että 50 prosenttia mastiiteista todetaan 60 päivän kuluessa poikimisesta. [3; 4.]

Mastiitti on yksi yleisimmistä sairauksista naudoilla. Tämä johtuu etenkin subkliinisten eli vähäoireisten mastiittien laajasta esiintymisestä maitotiloilla. Subkliinistä mastiittia arvioidaan sairastavan jopa 10 - 15 % naudoista. [3; 5.] Subkliininen mastiitti ei aiheuta selkeitä ulkoisia oireita ja voi jäädä siksi huomaamatta pitkäksi aikaa ja muuttua krooniseksi. Subkliininen mastiitti aiheuttaa kuitenkin maidon tuotannon vähenemistä sekä maidon solumäärän lisääntymistä, mikä puolestaan heikentää maidon laatua. [2.] Utaretulehdus aiheuttaaakin maitotiloille ja meijeriteollisuudelle suuret taloudelliset menetykset vuosittain. Maidontuotannon vähenemisen lisäksi tulomenetyksiä aiheutuu siitä, että antibioottihoidon aikana maito on heitettävä pois. Kuluja aiheutuu myös eläinten lääkkeitä ja tulojen menetyksiä eläinten lopettamisesta. [2; 5.]

2.1.1 *Bakteerien aiheuttama tulehdusreaktio*

Aiheuttaakseen utaretulehduksen täytyy bakteerien päästä utareen sisään sekä pystyä lisääntymään siellä. Bakteerit kulkeutuvat utareeseen vedinkanavaa pitkin. Lisääntyäkseen bakteerien tulee voida kiinnittyä utarekudokseen. Bakteerit voivat myös kiinnittyä maidon kermapallosiin, joiden mukana ne pääsevät myös siirtymään pidemmälle utareen sisällä. Utaretulehduspatoogeenit pystyvät lisääntymään tulehdusmaidossa huomattavasti nopeammin kuin normaalissa maidossa, koska maidon kaseiinit ovat siinä pilkkoutu-

neet muodostaen bakteereille otollisen kasvualustan. Naudan puolustusjärjestelmän tunnistettua bakteerit käynnistyy elimistössä tulehdusreaktio. [6, s. 49 - 50.] Tulehdus on elimistön normaali puolustusreaktio. Tulehduksen voivat aiheuttaa bakteerien lisäksi muut vieraat aineet, kuten kemikaalit, toksiininit tai bakteerien aineenvaihduntatuotteet, sekä tapaturmaiset kudonvauriot. Tulehdusreaktion tarkoituksena on sekä poistaa elimistöön tunkeutuneet mikrobit että elimistön omat vaurioituneet solut ja estää tulehduksen aiheuttaneiden tekijöiden leviäminen muihin kehon osiin. [7, s. 107; 8, s. 35.]

Tulehdusreaktiossa nesteitä ja puolustusjärjestelmän soluja siirtyy verenkierrosta kudoksiin. Tämä vaatii verenkierron vilkastumista, verisuonten laajenemista sekä verisuonten seinämien muuntumista helpommin läpäiseviksi, jotta myös solut pääsevät kulkemaan verisuonten seinämien läpi infektoituneeseen/vaurioituneeseen kudokseen. Verenkierron vilkastuminen ja verisuonten laajeneminen aiheuttaa kuumotuksen ja punoituksen tulehtuneessa kohdassa. Nesteiden ja solujen kertyminen tulehduspaikkaan aikaansaa puolestaan turvotuksen, josta seuraa kivuntunne tulehtuneella alueella. Kipua aiheutuu myös tulehdusta säätelevien tekijöiden hermonpäitä herkistävistä ominaisuuksista. Turvotus ja kipu puolestaan laskevat toimintakykyä. Verisuonten seinämien läpäisevyyttä ja solujen siirtymistä kudokseen säädelään erityisten tulehdusta säätelevien tekijöiden avulla. Näitä ovat muun muassa kiniinit, komplementin osat sekä sytokiinit. Joskus tulehdusreaktio ei kykene eliminoimaan tulehduksen aiheuttaneita mikrobeja. Subkliinisessä mastiitissa tulehdus jää käyntiin puolustusjärjestelmän pystymättä kuitenkaan tuhoamaan tulehduksen aiheuttaneita mikrobeja. [2, s. 59 - 60; 7, s. 107 - 108; 8, s. 35 - 36.]

Infektio ja tulehdus ovat muuttuvia prosesseja. Tulehdus kestää usein infektiota pidempään elimistössä. Tästä syystä utaretulehdusta sairastavan lehmän maidon bakteeripitoisuus voi olla jo laskenut niin alas, ettei bakteereja siitä voida osoittaa, vaikka tulehduksen oireet vielä näkyisivät. [2, s. 60.]

2.1.2 Maidon koostumuksen muutokset mastiitissa

Utareen tulehdusreaktio vaikuttaa sekä maidon määrään että laatuun. Se, miten paljon maidon tuotanto vähenee, heijastaa tulehduksen voimakkuutta. Tulehduksen voimakkuutta puolestaan vastaa maidon somaattisten solujen lukumäärä (somatic cell count, SCC). Somaattisilla soluilla tarkoitetaan naudasta itsestään peräisin olevia soluja. Terveen utareen maidossa solut ovat

lähinnä makrofageja, kun taas mastiitissa solumäärää nostavat pääosin muualta elimistöstä tulehduksen houkuttelemina tulleet neutrofiilit. Terveen naudan maidon somaattisten solujen määrä laktaation puolivälissä tulee olla alle 100 000 solua/ml maitoa. Somaattisten solujen lukumäärän nousu mastiitissa riippuu mastiitin aiheuttajabakteerista. Suuren tulehdusvasteen aiheuttavat patogeenit, kuten *Staphylococcus aureus*, voivat nostaa SCC:n jopa 10 - 20 miljoonaan soluun/ml. KNS-mastiitissa SCC nousee useimmiten noin 200 000 - 500 000 soluun/ml. [6, s. 76, 90, 105 - 107.]

Maito koostuu pääosin vedestä (87 %), laktoosista (5 %), rasvasta (4 %), proteiineista (3 %) ja tuhkasta (1 %). Maidon rasva koostuu triglyserideistä (98 - 99 % rasvasta) sekä fosfolipideistä, steroleista, karotenoideista, rasvaliukoisista vitamiineista ja vapaista rasvahapoista (yhteensä 1 - 2 % maidon rasvasta). Maidon proteiinit ovat kaseiini (80 % proteiineista) ja heraproteiinit (20 %). Maidon tuhkalla tarkoitetaan maidon sisältämiä suoloja ja mineraaleja. [6, s. 24 - 29.]

Maidon tuotannon lasku vähentää myös maidon komponenttien muodostumista. Maidon kuiva-aineiden määrä vähenee yhteensä 5 - 15 %. Maidon rasvapitoisuuden muutoksista mastiitissa on ristiriitaisia tuloksia. Useimmat tulokset osoittavat, että rasvapitoisuus laskee tulehduksen seurauksena alle 10 %. Rasvakoostumus sen sijaan muuttuu huomattavasti. Rasvahappojen kokonaismäärä ei muutu, mutta vapaiden rasvahappojen määrä lisääntyy ja samalla fosfolipidien määrä laskee. Rasvahappokoostumus muuttuu lyhytketjuisten rasvahappojen määrän lisääntyessä ja pitkäketjuisten määrän vähentyessä. Kuitenkin mastiittimaidon pitkäketjuisten tyydyttymättömien rasvahappojen määrä on korkeampi kuin terveeseen utareen maidossa. [6, s. 77.]

Maidon proteiinien määrä ei muutu mastiitissa ennen kuin somaattisten solujen lukumäärä nousee miljoonaan soluun/ml. Proteiinien keskinäiset suhteet muuttuvat kuitenkin jo aiemmin. Yleisesti kaseiinin määrä laskee ja heraproteiinien määrä nousee mastiitin seurauksena. Kaseiinin määrän lasku johtuu sen hajoamisesta, joka on seurausta proteolyttisen toiminnan lisääntymisestä. Useat heraproteiinit ovat peräisin verestä, joten niiden määrän nousu selittyy sillä, että verestä virtaa komponentteja utarekudokseen. Myös heraproteiinien keskinäiset suhteet muuttuvat tulehdusreaktion seurauksena. [6, s. 78.]

Laktoosin määrä maidossa laskee mastiitin seurauksena noin 10 %. Laktoosi on maidon tärkein osmoottinen tekijä, joten laktoosin määrän vähenemisen seurauksena veren ja maidon välinen osmoottinen tasapaino häiriintyy. Tasapainon palauttamiseksi verestä siirtyy maitoon natrium- ja kloridi-ioneja, joiden määrä maidossa voi jopa kymmenkertaistua. [6, s. 78.]

Mastiitti aiheuttaa muutoksia myös maidon mineraali-, hivenaine- ja vitamiinikoostumukseen, mikä on merkittävää maidon ravitsemuksellisten ominaisuuksien kannalta. Maidon natrium- ja kloridipitoisuudet nousevat, kun taas kalsium-, fosfori-, magnesium- ja kaliumpitoisuudet laskevat. Nämä muutokset ovat seurausta tulehduksen aiheuttamasta häiriöstä utareen epiteelisolujen toiminnalle sekä verisuonten läpäisykyvyn kasvamisesta. Hivenainekonsentraatiot, kuten kuparin ja raudan konsentraatio, maidossa nousevat. Vapaan sinkin pitoisuus sen sijaan laskee, koska sinkki sitoutuu kaseiiniin. Mastiitti laskee maidon vesiliukoisten vitamiinien pitoisuuksia. Riboflaviini- ja C-vitamiinipitoisuudet laskevat eniten, jopa 10 - 50 %. [6, s. 78 - 79.]

Utaretulehdus lisää entsyymaattista ja biokemiallista aktiivisuutta maidossa. Näillä muutoksilla on huomattava merkitys maidon jatkojalostamiselle. Lisääntynyt biokemiallinen aktiivisuus aiheuttaa maidossa vääränlaista käymistä hapanmaitotuotteita valmistettaessa. Entsyymiaktiivisuuden lisääntyminen puolestaan aiheuttaa muutoksia maitotuotteiden hajussa, maussa sekä rakenteessa. Kaikki nämä heikentävät tuotteiden laatua. [6, s. 79.]

2.1.3 Koagulaasinegatiiviset stafylokokit mastiitin aiheuttajina

Mastiittia aiheuttavia bakteerilajeja on useita. Suomessa eri vuosina mastiitin aiheuttajabakteerien esiintymisestä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu perinteisten taudinaiheuttajien, kuten *Streptococcus agalactiae* ja *Staphylococcus aureus*, määrän väheneminen, mutta samalla koagulaasinegatiivisten stafylokokkien (KNS) määrä on lisääntynyt [9, s. 5]. KNS:t ovatkin nykyään monissa maissa yleisimpiä maidosta eristettyjä utaretulehdusta aiheuttavia bakteereja, vaikka niitä ei perinteisesti ole pidetty tärkeinä taudinaiheuttajina [6, s. 125; 10, s. 10].

Stafylokokit ovat gram- ja katalaasiposiitivisia, itiöitä muodostamattomia bakteereja. Useimmat stafylokokit eivät muodosta kapselia tai muodostavat vain hyvin rajoittuneesti kapselin. Useimmat lajit ovat fakultatiivisia anaerobeja ja

muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta niiden kasvu on nopeampaa aerobisissa kuin anaerobisissa olosuhteissa. Stafylokokit erotetaan plasman koagulointikyvyn mukaan koagulaasiposiivisiin ja koagulaasinegatiivisiin. Yhteensä koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja on noin 40 eri lajia. Monet niistä elävät naudan iholla, karvapeitteessä sekä limakalvoilla. KNS-lajeja onkin pidetty opportunistisina ihon mikrobiotaan kuuluvina bakteereina ja ne on luokiteltu vähäpätöisiksi patogeeneiksi (minor pathogenes), kun taas esimerkiksi koagulaasiposiivinen *Staphylococcus aureus* luokitellaan merkittäväksi patogeeniksi (major pathogenes). [9, s. 9; 10, s. 6, 10, 11; 11, s. 222.]

Yleisimmät utaretulehdusta aiheuttavat KNS-lajit ovat *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus* ja *Staphylococcus epidermidis* [10, s. 20 - 21; 12, s. 13]. KNS-mastiitin tartuntalähteenä on usein mastiittia piilevänä sairastava lehmä tai haavat ja ruhjeet lehmän vetimissä, kintereissä ja nivusissa. KNS-mastiitissa kliiniset oireet ovat useimmiten paljon lievemmät kuin esimerkiksi *S. aureus* -mastiitissa. KNS-mastiittia esiintyy sekä lieväoireisena kliinisenä että subkliinisenä. Oireiden voimakkuus vaihtelee KNS-lajin mukaan, sillä toiset lajit ovat tarttuvampia ja virulentimpia kuin toiset. Perinteisesti on ajateltu KNS-tartunnan paranevan itsestään, mutta uudemmissa tutkimuksissa on havaittu, ettei näin aina ole. Paraneemisennuste KNS-mastiitissa on kuitenkin hyvä eikä kudosaaurioita yleensä esiinny. [6, s. 145; 9, s. 31; 10, s. 10 - 11; 12, s. 12.]

S. simulans on ollut Suomessa yleisin KNS-mastiittia aiheuttava laji. Se aiheuttaa utaretulehduksen useimmiten laktaation aikana, kun taas jotkin KNS-lajit aiheuttavat enemmän tulehduksia ennen laktaatiota. *S. simulansin* on havaittu aiheuttavan muita KNS-lajeja korkeamman tulehdusvasteen. Sen aiheuttamat utaretulehdukset ovatkin muita KNS-tulehduksia useammin kliinisiä. *S. simulans* tarttuu useimmiten lypsän yhteydessä lehmästä toiseen. [10, s. 20; 12, s.13 - 14.]

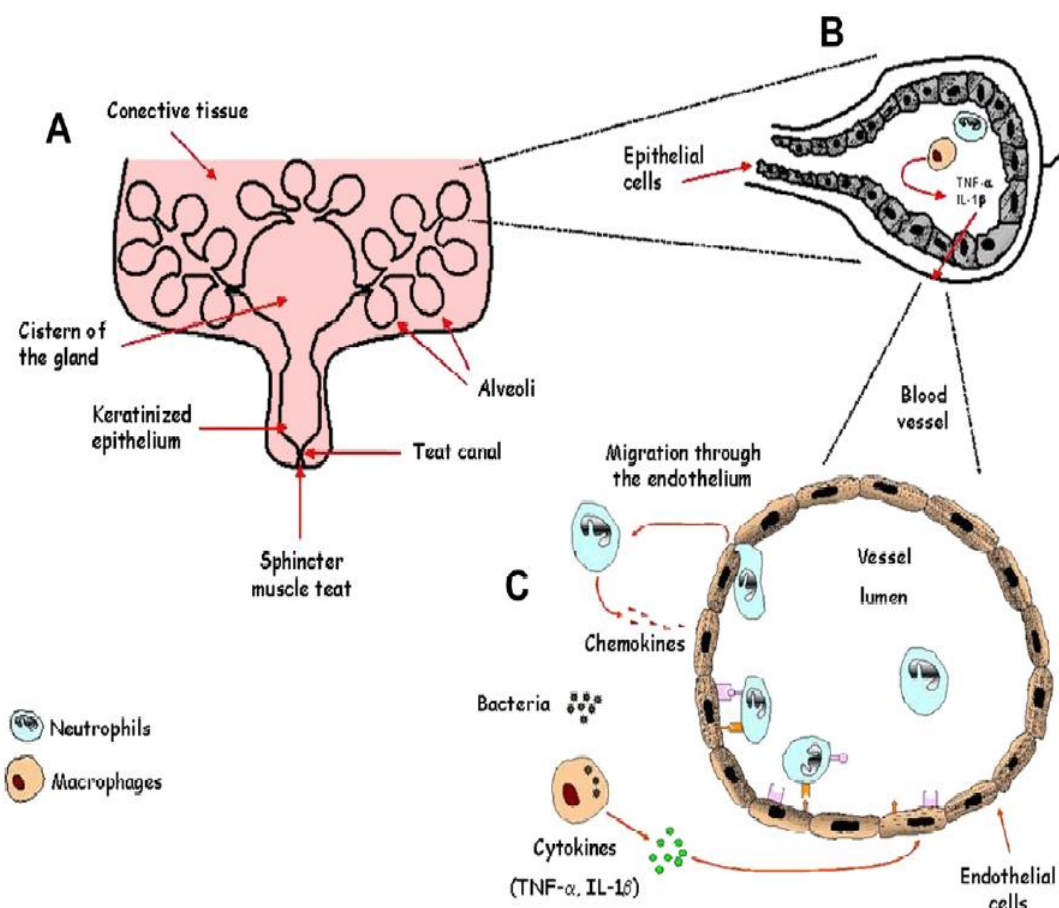
S. epidermidis on ihmisen ihon normaaliin bakteerikantaan kuuluva laji, joka on melko harvinainen naudan iholla tai limakalvoilla. Tutkittaessa utareesta tulehduksen aikana eristettyjä *S. epidermidis* -kantoja sekä lypsäjän käsissä ja muualla iholla olevia *S. epidermidis* -kantoja, on havaittu niiden olevan samoja. Onkin mahdollista, että tartunnan lähteenä olisi ihminen. Utareessa *S. epidermidis* -infektio on kliininen, mutta nopeasti ohimenevä. [10, s. 21 - 22; 12, s. 14.]

2.2 Naudan immuunipuolustus utaretulehdusta vastaan

Immuunijärjestelmän tarkoitus on suojella elimistöä vierailta organismeilta. Immuunijärjestelmä jaetaan kahteen osaan; synnynnäiseen ja hankittuun immunitettiin. Synnynnäinen ja hankittu immunitetti toimivat yhdessä puolustaessaan elimistöä mahdollisilta patogeeneilta. Synnynnäisen immunitetin puolustus ei ole antigeenispesifistä eikä sen toiminta tehostu elimistön altistuessa toistuvasti samalle patogeenille. Synnynnäinen immunitetti on valitsevana infektion alkuvaiheessa. Se myös tehostaa hankitun immunitetin toimintaa. Utareen synnynnäinen puolustusjärjestelmä perustuu vedinkanavan anatomiseen esteeseen, puolustussoluihin ja liukoisiin tekijöihin. Mikäli synnynnäinen immunitetti ei pysty tuhoamaan elimistöön tunkeutunutta patogeeniä, käynnistyy hankitun immunitetin toiminta. Hankittu immunitetti tunnistaa ja eliminoi patogeeniä spesifisesti. Se myös muistaa tunnistamansa patogeenit, joten sen toiminta tehostuu elimistön altistuessa samalle patogeenille toistuvasti. Hankittu immunitetti käyttää monia synnynnäisen immunitetin efektorimekanismeja ja lisää synnynnäisen immunitetin antimikrobiaalista toimintaa. [2; 4; 5; 10.]

2.2.1 Anatomiset puolustusmekanismit

Vedinkanava on ensimmäinen utareen puolustusjärjestelmän osa, jonka bakteerit kohtaavat. Vedinkanava on suljettuna lypsyjen välisen ajan sekä silloin, kun lehmä on ummessa eli ei tuota maitoa. Lypsyn jälkeen kanava pysyy auki noin kaksi tuntia. Vedinkanavan sulkeutumisesta huolehtivat sitä ympäröivät lihakset. Vaurio näissä lihaksissa voi estää kanavaa sulkeutumasta kunnolla, mikä puolestaan altistaa utaretulehduksille. Vedinkanava on päällystetty keratiinilla ja keratiinin kaltaisilla yhdisteillä. Keratiinilla on antimikrobiaalisia vaikutuksia ja keratiinikerroksen poistamisen on havaittu edistävän bakteerien tunkeutumista utareeseen. Myös maidon virtaus ulos utareesta lypsyn aikana estää bakteereja tunkeutumasta utareen sisään. Utareen anatomiset puolustusmekanismit on esitetty kuvan 1 kohdassa A, jossa näkyy vedinkanava sekä keratiinin peittämä epiteeli. [2; 5; 6, s. 37; 13.]



Kuva 1. Kaavakuva utareen anatomisista puolustusmekanismeista sekä solupuolustuksesta [2]

2.2.2 Solupuolustus

Mikäli bakteeri pääsee anatomisista tekijöistä huolimatta tunkeutumaan utareen sisään, se kohtaa seuraavaksi solupuolustuksen. Solupuolustusjärjestelmä koostuu makrofageista, neutrofiileistä ja lymfosyyteistä, jotka utareessa ovat peräisin joko kudoksista tai verenkierrosta. Mastiitissa maidon solumäärä nousee nopeasti elimistön puolustusolujen lisääntyneen määrän myötä. [2; 5; 13.]

Makrofagit ovat fagosytoivia soluja, jotka tuhoavat patogeenejä ja elimistön omia kudossjätteitä. Makrofagit havaitsevat bakteerit, fagosytoivat ne ja prosessoivat niiden antigeenit sekä välittävät tiedon muille soluille. Lisäksi ne säätelevät lymfosyyttien toimintaa erittämällä tulehdusreaktiota sääteleviä sytokiinejä. Aktivoiduttuaan makrofagit erittävät sytokiinejä. Maidossa makrofagien kyky fagosytoida bakteereja on heikompi kuin veressä. Maitomakrofagien tärkein tehtävä onkin antigeenien esittely ja tulehdusreaktion käynnis-

täminen. Terveen utareen maidon soluista suurin osa on makrofageja. [2; 5; 6, s. 44 - 45; 13.]

Neutrofiilit siirtyvät tulehdusalueelle makrofagien erittämien sytokiinien sekä muiden tulehdusta säätelevien tekijöiden houkuttelemina. Kuvan 1 kohdassa C näkyy, että makrofagi fagosytoi bakteereja ja erittää sytokiinejä, jonka seurauksena verenkierrosta siirtyy neutrofiileja utareen tulehduspaikalle. Neutrofiilit ovat suurin solujoukko utarekudoksessa ja maidossa utaretulehduksen alkuvaiheessa. Neutrofiilien tehtävänä on fagosytoida ja tappaa bakteereja, tosin niiden kyky fagosytoosiin on maidossa heikompi kuin veressä. Lisäksi neutrofiilit tuottavat hydroksyyli- ja happiradikaaleja, jotka ovat osa niiden käyttämää hapesta riippuvaista bakteerien tuhoamismenetelmää. Bakteerit kuolevat superoksidi-ionien, hypokloriitin ja vetyperoksidin yhteisvaikutuksesta. Fagosytoosisissa bakteerit altistuvat lisäksi useille hapesta riippuvaisille entsyymeille, kuten peroksidaasille, lysotsyymille, laktoferriniinille sekä useille hydrolyyttisille entsyymeille. Lisäksi neutrofiilit tuottavat pieniä antibakteerisia peptidejä ja defensiinejä, jotka pystyvät tappamaan useita mastiittipatogeeneja. Mastiittimaidon soluista suurin osa on neutrofiileja. [2; 5; 13.]

Lymfosyytit tunnistavat antigeenejä antigeenispesifisten kalvoreseptorien avulla. Lymfosyyteistä erotetaan T- ja B-lymfosyytit, jotka eroavat toisistaan toiminnaltaan ja tuottamiltaan proteiineilta. T- solut tuhoavat elimistön omia infektoituneita, vanhoja tai vaurioituneita soluja ja kontrolloivat immuunivastetta bakteeri-infektion aikana sekä tuottavat sytokiineja. B-lymfosyyttien tärkein tehtävä on tuottaa vasta-aineita tunkeutunutta patogeeniä vastaan. NK-solut (natural killer cells) ovat suuria, rakeisia lymfosyyttejä, joilla on sytotoksisia ominaisuuksia. NK-solut pystyvät tuhoamaan sekä gram-negatiivisia että gram-positiivisia bakteereja. NK-solut pystyvät tuhoamaan erityisen hyvin solun sisäisiä patogeenejä, kun makrofagit ja neutrofiilit tuhoavat lähinnä solun ulkopuolisia patogeenejä. Terveessä utarekudoksessa on hyvin vähän lymfosyyttejä. Näistä suurin osa on T-soluja. [2; 5; 13.]

2.2.3 Liukoiset tekijät

Maito sisältää useita liukoisia tekijöitä, jotka suojaavat elimistöä patogeeneiltä. Samoja liukoisia tekijöitä esiintyy myös veressä ja kudosteissa sekä limakalvoilla. Laktoferrini on proteiini, joka sitoo bakteerien tarvitsemää rautaa ja siten estää bakteerien kasvun. Normaalisti lehmän maidossa ei ole merkittäviä määriä laktoferriniä, mutta mastiitissa sen määrä nousee huo-

mattavasti. [5; 6, s. 38; 13; 14, s. 15.] Transferrini on elimistön tärkein rautaa sitova proteiini. Transferriniä esiintyy pääosin seerumissa, mutta utareen tulehdusreaktiossa sitä siirtyy verestä maitoon. [5; 6, s. 39.] Laktoperoksidaasi on entsyymi, joka vaatii substraatikseen tiosyanaatin ja vetyperoksidin. Näiden läsnä ollessa se estää tai tappaa monia bakteereja varsin tehokkaasti. [5; 6, s. 40; 13.] Komplementtijärjestelmä esiintyy veren lisäksi muissa kudosteissa ja maidossa. Se koostuu useista erilaisista proteiineista, jotka aktivoituessaan muodostavat kaskadimaisesti etenevän reaktiosarjan. Komplementtijärjestelmä tunnistaa ja tuhoaa mikrobeja sekä ohjaa fagosyyttejä. Terveestä utareesta erittyvässä maidossa komplementtitekijöitä esiintyy matalina pitoisuuksina, jotka kohoavat nopeasti tulehdusreaktiossa. [5; 6, s. 41; 13.] Vasta-aineiden eli immunoglobuliinien tehtävä on tunnistaa elimistöön tunkeutunut antigeeni sekä ohjata puolustusjärjestelmän soluja tuhoamaan se. Immunoglobuliinien määrä ja eri alaluokkien suhde maidossa vaihtelee laktaatiovaiheen mukaan. [5; 6, s. 41 - 42.]

2.3 Sytokiinit

Solujen erittämät sytokiinit ovat yksi puolustusjärjestelmän liukoisista tekijöistä. Sytokiinit säätelevät tulehdusta ja puolustusjärjestelmää. Tämän lisäksi sytokiinit vaikuttavat hematopoieesiin, stressireaktioon sekä kudostautien korjaamiseen. [6, s. 66; 7, s.108; 15.] Useat erilaiset solut voivat tuottaa samoja sytokiineja. Elimistön tärkeimmät sytokiineja tuottavat solutyypit ovat monosyytit/makrofagit ja T-lymfosyytit, etenkin auttaja-T-solut sekä endoteeli- ja epiteelisolut. Sytokiineja tuotetaan pieniä määriä, mutta niillä on silti merkittävä biologinen vaikutus, koska ne sitoutuvat voimakkaasti reseptoreihinsa. [7, s.108; 8, s. 10 - 11; 16.]

Sytokiinit sitoutuvat solujen pinnalla oleviin reseptoreihin ja välittävät siten viestinsä solujen sisäpuolelle. Yksi sytokiinien merkittävimmistä viestintäreiteistä on niiden kyky aktivoida solunsisäisiä signaalintireittejä. Sytokiinien välittämät viestit riippuvat sytokiinistä, kohdesolusta, solujen ympäristöstä ja muista soluja ympäröivistä liukoisista tekijöistä. Osa sytokiineista voi toimia eri tavoilla kohdesolusta riippuen, jolloin niitä kutsutaan pleiotrooppisiksi. Useilla sytokiineilla voi myös olla samanlaisia vaikutuksia. Lisäksi sytokiinit voivat edistää tai estää toistensa toimintaa. Usein yhden sytokiinin toiminta vaikuttaa toisten sytokiinien toimintaan. Vaikka sytokiineilla on elintärkeä merkitys elimistön puolustusjärjestelmän toiminnalle, niillä on myös elimistöl-

le haitallisia vaikutuksia etenkin korkeina pitoisuuksina tai mikäli niitä erittyy elimistöön pidemmän aikaa. [6, s. 66; 7, s. 108; 8 s.11 - 12; 15; 16.]

2.3.1 Interleukiini-1 β

Interleukiini-1 (IL-1) ryhmään kuuluu kaksi erilaista proteiinia, interleukiini-1 α (IL-1 α) ja interleukiini-1 β (IL-1 β), joista IL-1 β on vallitseva muoto. IL-1 β erittyy pääosin solun ulkopuolelle, kun taas IL-1 α jää pääosin solun sisäpuolelle. Näitä koodaavat eri geenit. Aminohappojärjestykseltään IL-1 α ja IL-1 β ovat 25 % homologisia. Naudan IL-1 β syntetisoidaan 266 aminohapon kokoisena esiasteproteiinina, jonka molekyylimassa on 30,76 kDa. IL-1 β spesifinen proteaasi (interleukin-1 β -converting-enzyme) pilkkoo esiasteen valmiiksi proteiiniksi, joka on kooltaan 17,73 kDa ja koostuu 153 aminohaposta. [7, s. 108; 15; 16.]

IL-1 β tuotetaan pääasiassa monosyyteissä ja makrofageissa, mutta myös muut solutyypit, kuten osteoblastit, keratinosyytit, hepatosyytit, hermosolut sekä jotkin endoteelisolut voivat tuottaa IL-1 β :aa. Molemmat IL-1-muodot sitoutuvat samoihin reseptoreihin. Näitä reseptoreja on kahta tyyppiä, IL-1RI ja IL-1RII. IL-1RI-reseptoreita on lähes kaikissa soluissa. Eniten niitä on endoteelisoluissa, hepatosyyteissä, keratinosyyteissä, T-lymfosyyteissä sekä fibroblasteissa. IL-1RI sitoo suuremmalla affiniteetilla IL-1 α :ta kuin IL-1 β :aa ja IL-1RII puolestaan IL-1 β :aa. IL-1RII-reseptoreita on eniten lymfosyyteissä, monosyyteissä ja neutrofiileissä. [2; 7, s. 108 - 109; 16.]

IL-1 β :lla on useita eri vaikutuksia eri soluille ja elimille. IL-1 β vaikuttaa paikallisesti stimuloiden monosyyttejä ja makrofageja tuottamaan enemmän IL-1 β ja muita sytokiinejä. Se myös vaikuttaa B-solujen erilaistumiseen ja lisää vasta-ainetuotantoa sekä stimuloi T-soluja tuottamaan sytokiinejä. IL-1 β tuotetaan usein korkeita pitoisuuksia ja se vaikuttaa verenkierron mukana kulkeutuessaan koko elimistöön. IL-1 β nostaa kuumeen, vaikuttaa hermostoon ja endokriiniseen järjestelmään sekä käynnistää akuutin faasin proteiinien tuoton maksassa. IL-1 β :lla on myös elimistölle haitallisia vaikutuksia, joita ovat septinen shokki, verisuonten seinämien vuotaminen sekä monielinvaurio. [7, s. 108 - 109, 16.]

IL-1 β :n on osoitettu olevan tärkeä osa immuunivastetta *Escherichia colin* ja *Staphylococcus aureuksen* aiheuttaman mastiitin alkuvaiheessa. IL-1 β :n on todettu olevan yhteydessä tulehduksen alkuvaiheessa tapahtuvaan neutrofii-

lien määrän nopeaan kasvuun *E. colin* aiheuttamassa mastiitissa. IL-1 α ja IL-1 β tai niiden lähetti-RNA:ta on todettu olevan myös terveen lehmän maidosta. [2; 15.]

2.3.2 Interleukiini-6

Naudan interleukiini-6 (IL-6) koostuu 208 aminohaposta. Se on 53 %:sesti homologinen ihmisen IL-6:n kanssa. IL-6 muodostuu lymfosyyteissä, monosyyteissä, makrofageissa, neutrofiileissä, fibroblasteissa, hepatosyyteissä, endoteeli- ja epiteelisoluissa sekä hermosoluissa. IL-6:n erittymisen voivat käynnistää bakteerien tai virusten lisäksi muut sytokiinit, kuten IL-1 β tai TNF- α . IL-6:lla on sekä tulehdusta edistäviä että estäviä vaikutuksia. Se aktivoi hematopoieettisia kantasoluja, indusoi megakaryosyyttien kypsymistä, hepatosyyttien, keratinosyyttien, hermosolujen sekä T- ja B-solujen lisääntymistä ja erilaistumista ja stimuloi akuutin faasin proteiinien tuottoa maksassa sekä aiheuttaa kuumetta. IL-6:n tulehdusta estävistä vaikutuksista yksi on sen kyky estää IL-1 β :n ja TNF- α :n muodostumista. [2; 7, s. 116; 15; 16.]

IL-6 on havaittu olevan osallisena akuuttiin septiseen shokkiin, joka voi syntyä koliformisten bakteerien tai *S. aureuksen* aiheuttamassa mastiitissa. IL-6 on osoitettu mastiitin yhteydessä sekä maidosta että seerumista. Maidossa sen konsentraatiot ovat olleet korkeampia kuin veressä paitsi vakavassa koliformisessa mastiitissa. Kun utare on infektoitu *E. colilla*, on havaittu IL-6-pitoisuuden nousu jo 14 tunnin kuluessa tartutuksesta. IL-6-osuutta tulehduksen patofysiologiaan ei voitu kuitenkaan osoittaa, koska IL-1-pitoisuus nousi samaan aikaan. Näyttää kuitenkin siltä, että IL-6:lla ja IL-1:llä on erilainen merkitys tulehdusprosessissa. [2; 15.]

2.3.3 Interleukiini-8

Interleukiini-8 (IL-8 tai CXCL8) kuuluu kemokiineihin. Kemokiinit ovat pieniä, 8 - 10 kDa:n kokoisia sytokiinejä, jotka ovat rakenteellisesti keskenään samankaltaisia. Naudan IL-8 on 7,8 kDa:n kokoinen ja 76 %:sesti homologinen ihmisen IL-8:n kanssa. IL-8 on kemotaktinen neutrofiileille eli se houkuttelee neutrofiilejä tulehduspaikalle. IL-8:n vaikutukset elimistössä ovat muihin kemotraktantteihin verrattuna pitkiä, sillä IL-8 on resistentti proteolyttiselle hajoamiselle ja siten häviää kudoksista verraten hitaasti. Monosyytit, T-lymfosyytit, makrofagit, epiteelisolut ja endoteelisolut tuottavat IL-8:aa joko

ulkoisten tekijöiden, kuten bakteerien, viruksien tai sienen, tai sisäisten tekijöiden, kuten TNF- α :n tai IL-1 β :n, vaikutuksesta. [2; 7, s. 113; 15; 16.]

Mastiitissa IL-8 houkuttelee neutrofiilejä utarekudokseen. Kokeellisessa koliformisessa mastiitissa IL-8-pitoisuuksien on todettu nousevan jo varhaisessa vaiheessa tulehdusta, 14 - 24 tunnin kuluessa. *Staphylococcus aureus* -mastiitissa sen sijaan ei merkittävää IL-8-pitoisuuden nousua ole havaittu. IL-8:n lähetti-RNA:ta on todettu olevan myös terveessä maidossa. [2; 15.]

2.3.4 Tuumorinekroositekijä-alfa

Tuumorinekroositekijä (TNF) käsittää kaksi sytokiiniä, TNF- α ja TNF- β . Yhdessä IL-1 β :n kanssa TNF:t ovat tärkeässä osassa tulehdusreaktion käynnistymistä ja puolustusjärjestelmän aktivoimista. Sama geeni koodaa sekä TNF- α :aa että TNF- β :aa. Naudan TNF- α on 233 aminohaposta koostuva 19,1 kDa kokoinen proteiini. Biologisesti aktiivinen TNF- α :n muoto on homotrimeeri eli se muodostuu kolmesta samanlaisesta yksiköstä. [7, s. 112; 15.]

TNF- α :a erittävät monosyytit ja makrofagit, neutrofiilit, T- ja B-lymfosyytit, NK-solut, epiteelisolut sekä osa leukosyyteistä. TNF- α :n erittymisen voi käynnistää, joko elimistön ulkopuolinen tekijä, kuten virus tai bakteeri, tai elimistön sisäiset tekijät, kuten muut sytokiinit tai komplementin osat. TNF-reseptoreja on kahta tyyppiä, TNFR1 ja TNFR2. Molemmat TNF-muodot sitoutuvat samoihin reseptoreihin, joten ne saavat aikaan samanlaiset vasteet. Kaikissa TNF:ien kohdesoluissa on joko toinen tai molemmat reseptorityypit. TNF:n aktiivisen muodon sitoutuminen reseptoriin saa aikaan solun tyypistä riippuvan vasteen. TNF:t aiheuttavat suoraan joidenkin kasvainsolujen kuoleman. Ne aktivoivat monosyyttejä/makrofageja sekä endoteelisoluja tuottamaan IL-1 β :aa ja muita sytokiineja sekä houkuttelevat leukosyyttejä tulehduspaikalle. Korkeampien TNF-pitoisuuksien erittymisellä on endokriinisiä vaikutuksia. Se aiheuttaa kuumeen sekä lisää proteiinin tuottoa maksassa (muun muassa komplementin osat ja akuutin faasin proteiinit). Korkeat tai pitkään koholla olevat TNF-pitoisuudet voivat aiheuttaa laihtumista, verisuonten seinämien vuotamista, kudolvaurioita ja shokin. TNF- α on pieninä pitoisuuksina elintärkeä elimistön puolustusjärjestelmälle, mutta korkeina pitoisuuksina elimistölle haitallinen. [6, s. 66; 7, s. 112; 8, s. 126; 16.]

TNF- α on tärkein infektion alkuvaiheessa erittyvistä sytokiineista. Myös TNF- α on pystytty osoittamaan terveinkin utareen maidosta, etenkin laktation

loppuvaiheessa. Tämä selittyy sillä, että TNF- α on välttämätön osa immuunijärjestelmän toiminnassa. Kokeellisessa koliformisessa mastiitissa TNF- α -pitoisuuden on osoitettu nousevan utareen imunesteessä jo 2 tunnin kuluttua infektoinnista ja maidossa 4 tunnin kuluessa infektoinnista. Pitoisuudet pysyvät korkealla koko infektion ajan. Koliformisessa mastiitissa TNF- α :n on osoitettu lisäävän haptoglobiinipitoisuutta veressä, aktivoivan ja houkuttelevan neutrofiilejä tulehduspaikalle sekä nostavan utareen ja elimistön nitraatti- ja nitriittipitoisuutta. Kokeellisessa *S. aureus* -mastiitissa TNF- α -pitoisuuden on todettu nousevan vasta 24 tunnin kuluttua infektoinnista ja laskevan nopeasti 32 tunnin kuluttua infektoinnista. [2; 13; 15.]

2.3.5 Sytokiinien käyttömahdollisuudet mastiitin diagnosoinnissa ja hoidon seurannassa

Viimeaikainen laaja sytokiinitutkimus on antanut paljon uutta tietoa naudan immuunijärjestelmän toiminnasta. Samalla on löydetty uusia mahdollisuuksia mastiitin diagnosointiin ja hoidon seurantaan. Tällä hetkellä mastiitin hoidossa käytetään paljon antibiootteja. Kuitenkaan antibiootit eivät tehoa kaikkiin bakteereihin niiden antibioottiresistenttiyden vuoksi. Lisäksi antibiootihoidon aikana pois heitettävä maito aiheuttaa tulojen menetyksiä maitotilallisille. Sytokiinien toivotaankin tulevaisuudessa tarjoavan uuden tavan diagnosoida mastiittia sekä seurata hoidon onnistumista. [2; 15.]

Sytokiinit ovat yksi tärkeimmistä elimistön immuunijärjestelmää säätelevistä tekijöistä. Jo pienet muutokset sytokiinipitoisuuksissa voivat kertoa elimistön puolustusjärjestelmän mekanismien käynnistymisestä. Tämän tiedon avulla voidaan sairauksia tunnistaa jo hyvin varhain ennen kliinisten oireiden ilmenemistä. Sytokiinipitoisuuksia seuraamalla voidaan myös tarkkailla mahdollisen hoidon vaikutusta. Kuitenkin tämä vaatii vielä parempaa tietämystä naudan immuunijärjestelmästä sekä tietoa siitä, miten sen toiminta muuttuu utareen eri laktaatiovaiheissa. Myös sytokiinien määritysmenetelmiä tulisi saada kehitettyä käyttäjäystävällisemmiksi. Nykyiset menetelmät, rt-PCR ja ELISA, eivät ole käytännössä toteutettavissa jokapäiväisenä diagnostisena menetelmänä. [15.]

Naudan sytokiiniverkoston tutkimisen seurauksena on jo nyt saatavilla useita eri rekombinanttsytokiinejä. Nämä taas luovat lisämahdollisuuden tutkimukselle sytokiinien vaikutuksista utareessa sekä sytokiinien käytöstä mastiitin hoidon seurannassa. Rekombinanttsytokiinien on jo todettu pystyvän vaikuttamaan mastiitin etenemiseen houkuttelemalla puolustusjärjestelmän soluja

utarekudokseen, lisäämällä fagosytoivien solujen määrää ja fagosyyttistä aktiivisuutta sekä säätelemällä akuuttia tulehdusreaktiota. Edelleen tarvitaan lisää tietoa bakteerien patogeenisyyden ja naudan immuunijärjestelmän vuorovaikutuksesta sekä siitä mikä osa sytokiineilla on patogeenin ja immuunijärjestelmän vuorovaikutukseen. Lisähaasteen tähän antaa mastiittia aiheuttavien bakteerien laaja kirjo sekä niiden vaihtelevat ominaisuudet. [2; 13; 15.]

2.4 Sytokiini-ELISA

ELISA eli entsyymi-immunologinen menetelmä (enzyme-linked immunosorbent assay tai enzyme immunoassay) perustuu vasta-aineen ja antigeenin väliseen sitoutumiseen. ELISasta on olemassa monia eri muunnoksia, joilla mitataan joko näytteen vasta-aine- tai antigeenipitoisuutta. Sytokiini-ELISA perustuu ns. sandwich-tekniikkaan, jossa näytteen sisältämä antigeeni jää kahden vasta-ainekerroksen väliin. [17, s. 555; 18; 19.]

ELISAn herkkyteen vaikuttaa levyyn sitoutuneiden ensimmäisten vasta-aineiden määrä, antigeenin kyky sitoutua sekä ensimmäiseen että toiseen vasta-aineeseen, leimatun vasta-aineen aktiivisuus ja pesujen tehokkuus. Myös vasta-aineiden valinnalla on merkitystä menetelmän herkkyydelle ja luotettavuudelle. Anti-sytokiinivasta-aineet saattavat olla niin spesifisiä, että kaikki epitootit eivät tunnista niitä, esimerkiksi voi olla ettei humanivasta-aine tunnista naudan sytokiiniä. Vasta-aineet valitaan yleensä siten, että ensimmäinen vasta-aine on monoklonaalinen, mikä varmistaa mahdollisimman spesifisen sitoutumisen. Toinen vasta-aine taas usein on polyklonaalinen, jotta se tunnistaa mahdollisimman monenlaiset epitootit. Vasta-aineita valittaessa on myös huomioitava, missä eläimessä vasta-aine on tuotettu, jotta vasta-aineet eivät sitoudu toisiinsa. Lisäksi molempien proteiinien eli vasta-aineen ja antigeenin on oltava laskostunut siten, että ne kykenevät sitoutumaan toisiinsa. Näytematriisi saattaa myös aiheuttaa häiriötä menetelmään näytteiden ollessa biologisia nesteitä. Sytokiini-ELISA-menetelmällä voidaan mitata ainoastaan sytokiinien määrää näytteessä, ei sitä, mistä soluista sytokiinit ovat peräisin tai ovatko ne biologisesti aktiivisia. [17, s. 579; 18.]

3 ANALYSOITAVAT NÄYTTEET

Analysoitavat näytteet olivat peräisin Eläinlääketieteellisen tiedekunnan kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksella tehdyistä kokeellisista KNS-tartutuksista, jotka ovat osa professori Satu Pyörälän johtamaa utaretulehdustutkimusta. KNS-tutkimuksen tavoitteena on selvittää koagulaasinegatiivisten stafylokokkien patogeneesiä kokeellisen infektiomallin avulla.

Näytteet olivat sekä maito- että seeruminäytteitä. Maitonäytteitä oli infektoidun utareneljänneksen (koeneljännes) lisäksi otettu myös terveestä neljänneksestä (kontrollineljännes). Maitonäytteet oli otettu aseptisesti 7(5), 2 ja 1 päivää ennen infektointia sekä juuri ennen infektointia (0 h) ja infektoinnin jälkeen 14 vuorokauden ajan. Seeruminäytteitä oli otettu hieman harvemmin kuin maitonäytteitä. Seeruminäytteet oli otettu kaulasuonesta kanyylin kautta 1 vrk ennen tartutusta – 5 vrk tartutuksen jälkeen ja muulloin neulan avulla. [20.]

Tartutuksissa käytettiin kahdeksaa nautaa, jotka olivat kerran poikineita. Naudat olivat rodultaan ayshireitä paitsi Ulrika, joka oli holstein-friisiläinen. Naudat oli infektoitu joko *S. simulans* tai *S. epidermidis* -bakteereilla. Kunkin naudan saama bakteeri näkyy taulukosta 1. Jokainen lehmä oli infektoitu kerran kummallakin bakteerilla. Infektoitu neljännes oli aina sellainen, jota ei ollut aiemmin infektoitu kummallakaan bakteerilla. Kontrollina käytettyä neljänneistä ei ollut missään vaiheessa infektoitu, tosin joillakin naudoilla kontrollineljänneksessä todettiin jonkin muun bakteerin kasvua. Tartutusannos oli 5,7 miljoonaa CFU:ta suspensoituna 7 ml:aan 0,9 % NaCl-liuosta. Kontrollineljännekseen ruiskutettiin 7 ml 0,9 % NaCl-liuosta. [20.]

Taulukko 1. Tartutuskokeessa käytetyt naudat ja bakteerit, joilla naudat infektoitiin [20]

	01/08
Ulpukka	<i>S. epidermidis</i>
Tipsa	<i>S. epidermidis</i>
Unamon	<i>S. simulans</i>
Tove	<i>S. simulans</i>
	03/08
Unssi	<i>S. epidermidis</i>
Umbra	<i>S. epidermidis</i>
Untuva	<i>S. simulans</i>
Ulrika	<i>S. simulans</i>

4 TYÖN TOTEUTUS

4.1 Menetelmän pystytys

4.1.1 Käytettävien vasta-ainepitoisuuksien ja sopivan levytyypin etsiminen

IL-6 ja IL-8 -määrittäksi oli päätetty käyttää valmiita kaupallisia kittejä (R&D Systems Human IL-6 DuoSet, DY206 ja R&D Systems Human IL-8 DuoSet, DY208). Kittien vasta-aineet olivat humaanivasta-aineita. Kiteissä ei mainittu, olivatko vasta-aineet mono- vai polyklonaalisia. Kittien sisältämät IL-6 ja IL-8 -standardit olivat rekombinanttiproteiineja. Käytetyt IL-1 β ja TNF- α -vasta-aineet olivat naudan vasta-aineita. IL-1 β "capturing"-vasta-aine (AbD Serotec Mouse Anti Sheep Interleukin-1 Beta, MCA1658) oli monoklonaalinen ja detektiovasta-aine (AbD Serotec Rabbit Anti Bovine Interleukin-1 Beta: Biotin, AHP851B) oli polyklonaalinen. Sekä TNF- α "capturing"-vasta-aine (AbD Serotec Mouse Anti Bovine TNF Alpha, MCA2334), että detektiovasta-aine (AbD Serotec Mouse Anti Bovine TNF Alpha: Biotin, MCA2335B) olivat monoklonaalisia. IL-1 β standardi (AbD Serotec, Recombinant Bovine Interleukin-1 Beta, PBP008) ja TNF- α -standardi (AbD Serotec, Recombinant Bovine TNF Alpha, PBP005) olivat rekombinanttiproteiineja.

IL-6 ja IL-8 -kiteissä oli suositeltu tiettyjä vasta-ainepitoisuuksia, joten päädyttiin käyttämään niitä. TNF- α :lle ja IL-1 β :lle oli suositeltu käytettäväksi pitoisuuksia 1-10 $\mu\text{g/ml}$. Tarkemmat käyttöpitoisuudet jouduttiin itse määrittämään.

IL-1 β :lla "capturing"-vasta-aineella kokeiltiin pitoisuuksia 1 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ja 5 $\mu\text{g/ml}$. Näitä vasten kokeiltiin detektiovasta-aineen pitoisuuksia 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ ja 10 $\mu\text{g/ml}$.

TNF- α "capturing"-vasta-aineella kokeiltiin pitoisuuksia 1 $\mu\text{g/ml}$ ja 2 $\mu\text{g/ml}$, joita vasten titrattiin detektiovasta-aineen pitoisuuksia 1 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ja 5 $\mu\text{g/ml}$.

Näytteinä käytettiin aiempien mastiittitartutusten yhteydessä otettua seerumia laimennoksina 1:10, 1:100 ja 1:1000 ja heraa laimennoksina 1:10, 1:25 ja 1:50 sekä IL-6 ja IL-8 standardeja erilaisina laimennoksina.

Samalla haluttiin verrata kahta erilaista polystyreeni-96-kuoppalevytyyppiä, high binding (Greiner Bio One, Microplate, 96-well, PS, Elisa, Microlon 600, High Binding, F-bottom, Crystal Clear, 655061) ja medium binding (Greiner Bio One, Microplate 96 well PS, Elisa, Microlon 200, Medium Binding, F-bottom, crystal clear, 655001) keskenään, joten kaikki nämä työvaiheet tehtiin kahdelle erilaiselle levyille.

4.1.2 Vasta-aineiden kyky tunnistaa eri lajien sytokiinejä

Jo ensimmäisiä testauksia tehtäessä havaittiin, että IL-6:ta mitattaessa standardit näkyivät hyvin, mutta näytteenä käytetystä seerumista ei pystytty osoittamaan IL-6:ta. Seuraavassa vaiheessa näytteiksi valittiin heroja sellaisista ajankohdista tartutuksen jälkeen, joissa kirjallisuuden perusteella olisi voinut löytyä korkeita IL-6-pitoisuuksia. Koska näistäkään näytteistä ei pystytty detektoimaan IL-6:ta, heräsi epäily humaanivasta-aineiden kyvystä tunnistaa naudan sytokiinejä. Muut vasta-aineet näyttivät tunnistavan naudan sytokiinejä, mutta sekin haluttiin vielä varmistaa.

Vasta-aineiden kykyä tunnistaa eri lajien sytokiinejä testattiin eri solulinjoista kerätyillä näytteillä. Naudan verestä eristettyjä monosyyttejä, hiiren monosyyttejä (RAW 264.7) ja makrofageja (J774A.1) sekä ihmisen monosyyttejä (THP-1 ja U-937) kasvatettiin 96-kuoppalevyllä 100 000 solua/ 300 µl kasvatusmediaa/ kuoppa. RAW- ja J774-solujen kasvatusmedia oli DMEM (BioWhittaker DMEM, Cat N° BE12-614F), johon oli lisätty 10 % FBS (Euro Lone, Foetal Bovine Serum EC Approved, Cat N° ECS0180L), 1 % Glutamax (GIBCO, GlutaMAX™-I 100x, REF 35050-038 100 ml) ja 1 % PS (HyClone, HyQ® Penicillin-Streptomycin Solution, Cat No SV30010). THP-1 kasvatettiin RPMI-mediassa (BioWhittaker RPMI 1640, Cat N° BE12-167F), johon oli lisätty 10 % FBS, 1 % Glutamax, 1 % PS ja 0,05mM β-merkaptotoetanolia. U937-solujen ja naudan monosyyttien kasvatusmedia oli muuten sama kuin THP-1 paitsi siinä ei ollut β-merkaptotoetanolia.

Monosyyttien erilaistuminen makrofageiksi käynnistettiin pipetoimalla kuoppiin PMA:ta (Sigma, Phorbol 12-myristate 13-acetate, approx 99 % (TLC), P1585-1MG), joka oli laimennettu 1:100 dimetyylisulfoksidilla (DMSO) niin, että kuopan PMA-pitoisuudeksi tuli 100 nM. Soluja kasvatettiin normaaleissa olosuhteissa (+37 °C, 5 % CO₂) 48 h. Tämän jälkeen solut stimuloitiin *Escherichia coli* -bakteerin lipopolysakkaroideilla (LPS) (Sigma, Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4, L4931-1MG) siten, että kuoppien

LPS-pitoisuudeksi tuli 1 µg/ml. Soluviljelmistä kerättiin näytteitä 48 tunnin ajan. Ensimmäinen näyte otettiin juuri ennen stimulointia. Jokainen näyte otettiin eri kuopasta. Näistä soluviljelmistä kerätyistä näytteistä mitattiin sytokiini-pitoisuuksia ELISA-menetelmällä. IL-1β- ja TNF-α-mittaukset tehtiin ainoastaan naudan monosyyteistä sekä hiiren monosyyteistä ja makrofageista, sillä nämä vasta-aineet olivat naudan. IL-6- ja IL-8-mittaukset tehtiin myös humaanisolulinjojen soluille, koska nämä vasta-aineet olivat ihmisen.

4.1.3 Standardina käytetyt rekombinanttiproteiinit

IL-8-rekombinanttiproteiinien laimennossarja valittiin aluksi kitin ohjeen mukaan, mutta myöhemmin sitä muutettiin pitoisuudeltaan matalammaksi. Tämä tehtiin, koska oli oletettavaa, että näytteiden pitoisuudet eivät ole kovin korkeita. Käytetyn standardisuoran pitoisuudet olivat 1 ng/ml; 0,5 ng/ml; 0,250 ng/ml; 0,125 ng/ml; 0,0625 ng/ml; 0,0313 ng/ml; 0,0156 ng/ml ja 0 ng/ml.

IL-1β-laimennossarjan käytetyt pitoisuudet olivat 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,625 ng/ml; 0,313 ng/ml; 0,156 ng/ml; 0,078 ng/ml ja 0 ng/ml.

TNF-α-laimennossarja valittiin sekä kirjallisuuden [16], että menetelmän herkkyyden perusteella. Käytetyn suoran pitoisuudet olivat 200 ng/ml; 50 ng/ml; 25 ng/ml; 12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,125 ng/ml ja 0 ng/ml.

Lisäksi kokeiltiin, miten rekombinanttiproteiinilaimennossarjojen OD(450 nm)-arvot vaihtelevat erilaisissa biologisissa nesteissä. Laimennokset valmistettiin 1 % BSA-PBS-liuokseen, terveen utareen heraan ja FBS:in (Euro Lone, Foetal Bovine Serum EC Approved, Cat N° ECS0180L).

4.2 Näytteiden analysointi

Näytteet sulatettiin ja maitonäytteistä erotettiin hera ennen analysointia. Hera erotettiin sentrifugoimalla näytteitä + 4 °C:n lämpötilassa pöytäfuugilla 16100 g:n voimalla 30 minuuttia. Tämän jälkeen maidon pinnalta kuorittiin rasva pois ja hera pipetoitiin erilleen putken pohjalle jääneistä soluista.

Kukin sytokiini detektoitiin omalta levyltään. Jokaisella 96-kuoppalevyllä mitattiin kolmena rinnakkaisena tunnettu rekombinanttiproteiinilaimennossarja, positiiviset kontrollinäytteet, negatiiviset kontrollinäytteet sekä varsinaiset analysoitavat näytteet. Lisäksi kullakin levyillä oli kuopat, joissa oli näyteenä

PBS. Näiden avulla vähennettiin tausta. Maitonäytteistä analysoitiin sekä koe- että kontrollineljänneksen näytteet. Positiivisena kontrollina toimi terveen lehmän maidosta erotettu hera, johon oli lisätty tunnettu määrä rekombinanttsytokiiniä (IL-1 β 5 ng/ml; IL-8 0,41 ng/ml). Negatiivisena kontrollina toimi sama hera ilman sytokiinilisäystä. Seeruminäytteiden positiiviset kontrollinäytteet laimennettiin FBS-liuokseen. Negatiivisena kontrollinäytteenä seerumeja analysoitaessa toimi pelkkä FBS.

Analysoitaviksi näytteiksi valittiin aluksi kaikki näytteet alkaen ajankohdasta 0 h (eli juuri ennen infektointia). Maitonäytteet analysoitiin 102 tuntiin (5 vrk) asti ja seeruminäytteet 117 tuntiin asti.

4.3 ELISA

ELISA-mittaukset suoritettiin seuraavasti:

1. 96-kuoppalevy pohjustettiin "capturing"-vasta-aineella 100 μ l/kuoppa. Vastata-aineet laimennettiin käyttöpitoisuuteen PBS-liuoksella. Levyjä inkuboitiin yön yli jääkaapissa.
2. Levy pestiin 96-kuoppalevyille sopivalla pesurilla. Pesuri tyhjensi kuopat ja pesi ne kolme kertaa 300 μ l:lla pesuliuosta. Levy kopautettiin kuivaksi käsi-paperiin.
3. Epäspesifinen sitoutuminen estettiin pipetoimalla levyille 250 μ l/kuoppa 1 % BSA:ta (Sigma, Albumin bovine, A2153-100G) –PBS-liuoksessa. Tätä inkuboitiin huoneenlämmössä tunnin ajan.
4. Levyt tyhjennettiin ja pestiin edellä kuvaillusti.
5. Näytteet ja standardit pipetoitiin levyille 100 μ l/kuoppa liitteessä 1 esitetyn pipetointitaulukon mukaisesti. Levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä kaksi tuntia.
6. Levyt tyhjennettiin ja pestiin edellä kuvaillusti.
7. Levyille pipetoitiin detektiovasta-ainetta 100 μ l/kuoppa. Detektiovasta-aine oli laimennettu käyttöpitoisuuteen 1 % BSA-PBS-liuoksella. Inkuboitiin kaksi tuntia huoneenlämmössä.
8. Levyt tyhjennettiin ja pestiin edellä kuvaillusti.

9. Kuoppiin pipetoitiin 100 µl 1:200-laimennettua Streptavidini-HRP-liuosta (R&D Systems, Streptavidin-HRP, Catalog No. DY998). Liuos laimennettiin 1 % BSA-PBS-liuoksella. Inkuboitiin pimeässä 20 minuuttia huoneenlämpötilassa.

10. Levyt tyhjennettiin ja pestiin edellä kuvaillusti.

11. Levyille pipetoitiin 100 µl/kuoppa substraattiliuosta. Inkuboitiin 20 min pimeässä huoneenlämmössä.

12. Kuoppiin pipetoitiin 50 µl stop-liuosta.

13. Värireaktion voimakkuus mitattiin 96-kuoppalevyille sopivalla lukulaitteella (Thermo Electron Corporation Multiskan EX) aallonpituudella 450 nm.

Koska laitteella ei voinut mitata taustan vähentämiseksi tarkoitetulla 540/570 nm:n aallonpituudella, vähennettiin muovilevyn sekä kuopissa olevien liuosten aiheuttama tausta erityisten tausta-kuoppien avulla. Näytteiden pitoisuudet laskettiin standardisuorien avulla tietokoneohjelmalla (Thermo Electron Corporation Ascent Software version 2.6).

Työssä käytetyt liuokset sekä vasta-ainepitoisuudet on koottu liitteeseen 2.

5 TULOKSET

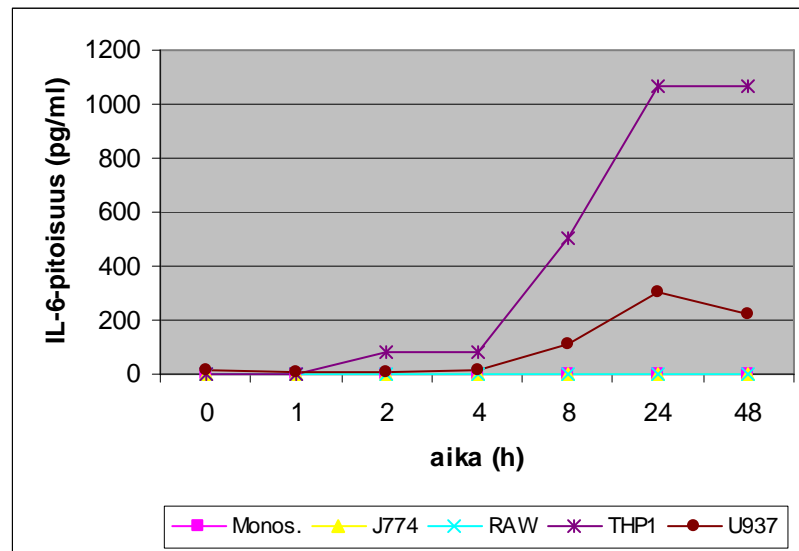
5.1 Menetelmän pystytystulokset

Määritettäessä käytettäviä vasta-ainepitoisuuksia parhaat tulokset IL-1 β :lla saatiin pitoisuuksilla 5 µg/ml ("capturing"-vasta-aine) ja 5 µg/ml (detektiovasta-aine). Myöhemmin kuitenkin havaittiin näitä pitoisuuksia käytettäessä, että tausta oli jatkuvasti yli sallitun OD(450 nm) 0,2. Tällöin pitoisuuksia titrattiin uudelleen siten, että detektiovasta-aineen pitoisuus on matalampi kuin "capturing"-vasta-aineen pitoisuus. Uusiksi käytettäviksi pitoisuuksiksi valittiin 4 µg/ml ja 2 µg/ml. TNF- α -vasta-ainepitoisuuksista valittiin käytettäviksi 1 µg/ml ja 2,5 µg/ml.

Vasta-ainepitoisuuksien kanssa samaan aikaan testatuista kahdesta levytyypistä valittiin käyttöön "High binding", koska sillä saatiin pienemmille pitoisuuksille mitattavia OD-arvoja. Tämän arvioitiin olevan tarpeen, koska oli

oletettavaa, että varsinaisten mitattavien näytteiden sytokiinipitoisuudet tulevat olemaan melko matalia.

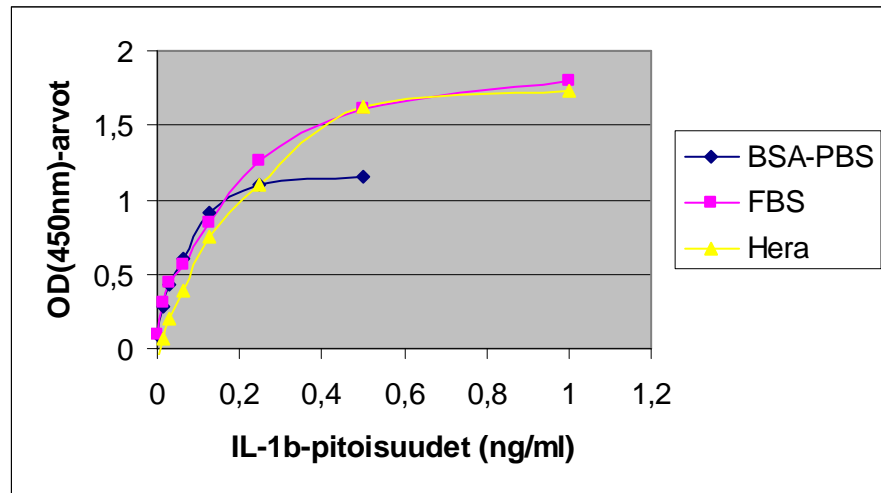
Vasta-aineiden kykyä tunnistaa naudan sytokiinejä testattiin soluviljelmistä kerätyillä näytteillä. Kuvassa 2 on esitetty IL-6-määritysten tulokset.



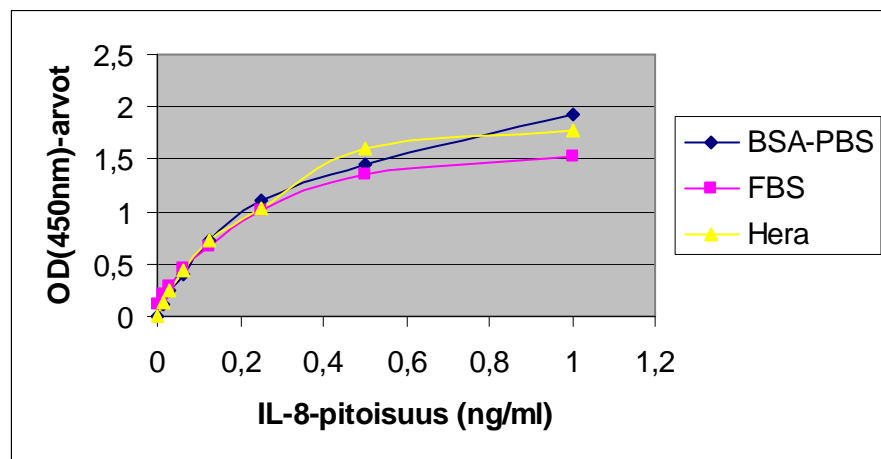
Kuva 2. IL-6-pitoisuudet (pg/ml) ajan funktiona eri solulinjoilla LPS stimulaation jälkeen

Kuten kuvasta 2 näkyy, IL-6-vasta-aineet tunnistivat ainoastaan huumanisolulinjojen tuottamat sytokiinit. Muista solulinjoista kerätyt näytteet antoivat IL-6-pitoisuuksiksi 0 pg/ml. Tämän perusteella päätettiin IL-6-määrittäminen siirtää myöhempään ajankohtaan, koska käytetyt vasta-aineet olivat ainoat käyttövalmiit kaupallisesti saatavilla olevat vasta-aineparit. Muut käytössä olleet vasta-aineet tunnistivat naudan sytokiinit.

Rekombinattiproteiineja laimennettaessa erilaisiin biologisiin nesteisiin havaittiin, että samoista pitoisuuksista mitattiin erilaiset OD(450 nm)-arvot siitä riippuen, mihin mediaan laimennokset oli tehty. Kuitenkin IL-8:n ja IL-1 β :n laimennossarjojen OD(450 nm)-arvot olivat mediasta riippumatta yhteneviä laimennossarjan pienemmillä pitoisuuksilla, kuten kuvat 3 ja 4 osoittavat. Tartutuskokeen näytteiden pitoisuuksien arveltiin olevan tällä yhtenevällä alueella, joten valittiin käytettäväksi laimennossarja, joka oli valmistettu 1 % BSA-PBS-liuokseen.

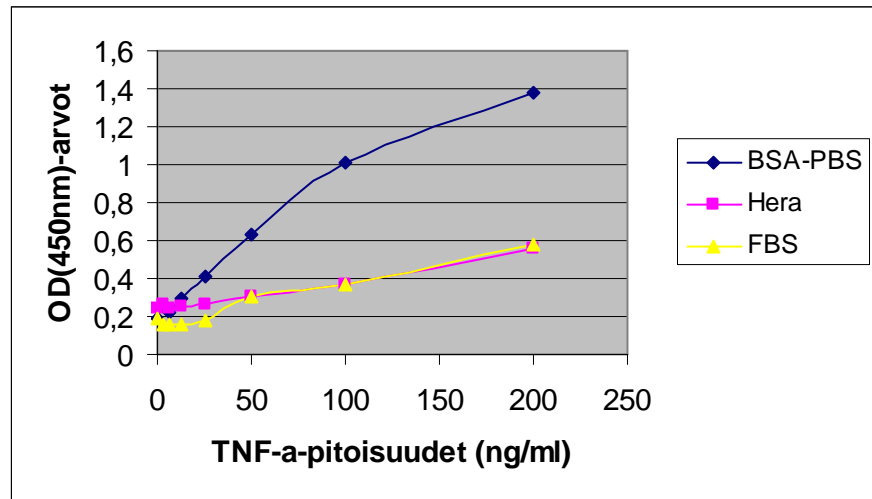


Kuva 3. IL-1 β rekombinanttiproteiinilaimennossarjat eri biologisissa nesteissä



Kuva 4. IL-8 rekombinanttiproteiinilaimennossarjat eri biologisissa nesteissä

TNF- α :n kohdalla OD(450 nm)-arvot erosivat toisistaan laimennoksessa käytetystä nesteestä riippuen jo matalammissa pitoisuuksissa. Herassa ja FBS:ssä havaittiin lisäksi se ongelma, ettei matalampia pitoisuuksia saatu erottumaan toisistaan, kuten kuvasta 5 voidaan nähdä. Tämän perusteella valittiin myös TNF- α -laimennokset tehtäväksi 1 % BSA-PBS-liuokseen. Mikäli näytteiden pitoisuudet nousevat yli 25 ng/ml, on huomioitava, että mitatut pitoisuudet ovat aliarvioituja, eivät tarkkoja tuloksia. Nämä mahdolliset korkeampia pitoisuuksia sisältävät näytteet tulee mitata uudelleen siten, että rekombinanttilaimennossarja on tehty joko heraan tai FBS:in.



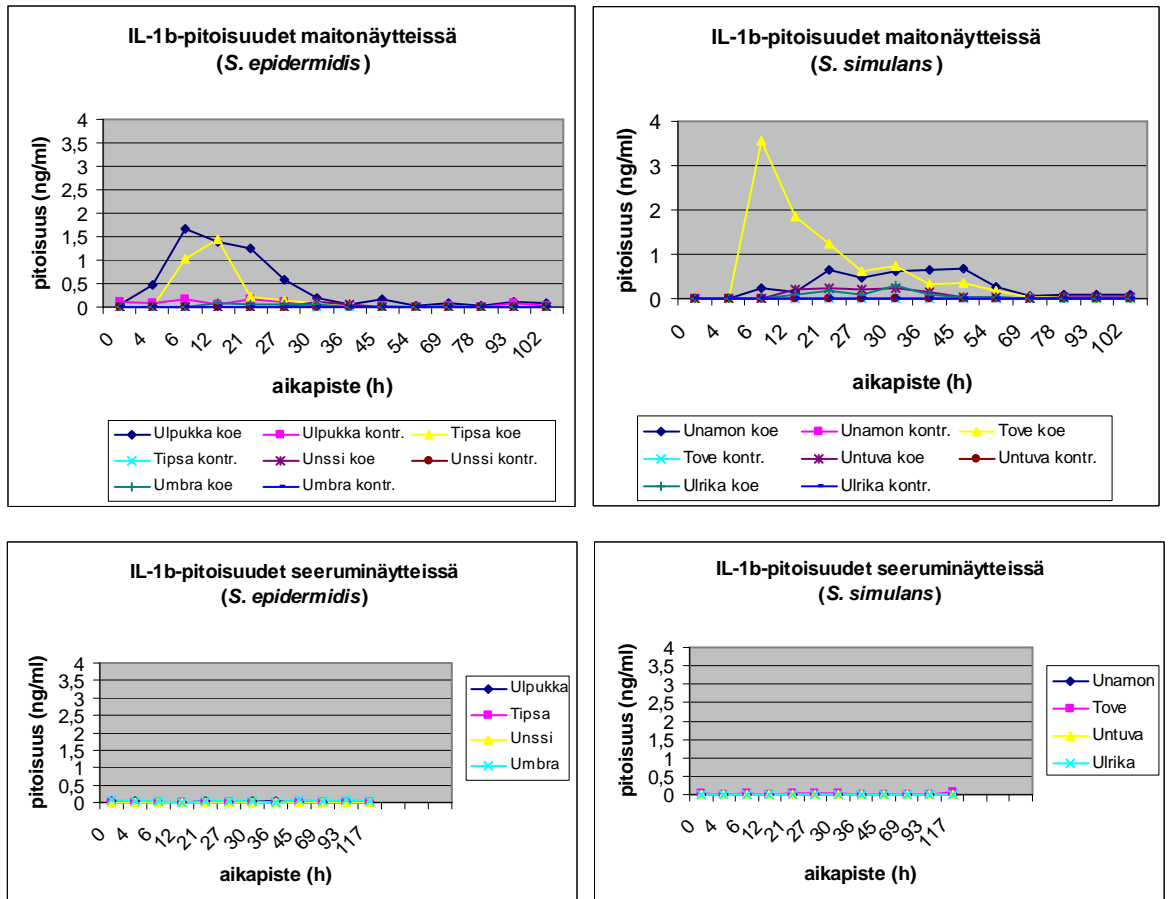
Kuva 5. TNF- α rekombinanttiproteiinilaimennossarjat eri biologisissa nesteissä

5.2 Näytteiden mittaustulokset

Mittaustulokset käsiteltiin aluksi Ascent Software -tietokoneohjelmalla. Ensimmäiseksi mitatuista tuloksista vähennettiin tausta. Taustan vähentämisen jälkeen ohjelman avulla piirrettiin standardisuora. Suora oli muotoa "Four parameter logistics" eli $y=b+(a-b)/(1+xc)^d$. Tämän suoran avulla ohjelmalla laskettiin näytteille pitoisuudet.

Tulosten käsittelyohjelmasta saatu data siirrettiin Microsoft Excel-ohjelmaan. Tulokset käsiteltiin soveltaen WHO:n IgG:n määrittämiseen käytetyn ELISA-menetelmän ohjetta [21]. Tässä vaiheessa laskettiin levykohtaisesti alin mittausraja. Tämä tehtiin laskemalla mitatuille taustakuopille keskihajonta (SD), joka kerrottiin kahdella. Alimman mittausrajan ylittäneille rinnakkaisille näytteille laskettiin variaatiovaihtelukerroin (CV %), jonka tuli olla $\leq 15\%$ vähintään kahden rinnakkaisen kuopan osalta. Rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksista laskettiin keskiarvo. Tämän jälkeen tuloksista piirrettiin kuvaajat, jotta voitiin verrata sytokiinipitoisuutta tartutuksesta kulunutta aikaa vasten. Kuvien 6 - 8 tarkat tulokset on esitetty liitteessä 3. Standardisuorien korrelaatiokertoimen tuli olla joka levyllä $\geq 0,994$. Samalla levyllä olevien rinnakkaisten standardisuorien CV % tuli olla myös $\leq 15\%$. OD(450 nm) blankarvon tuli olla $< 0,2$.

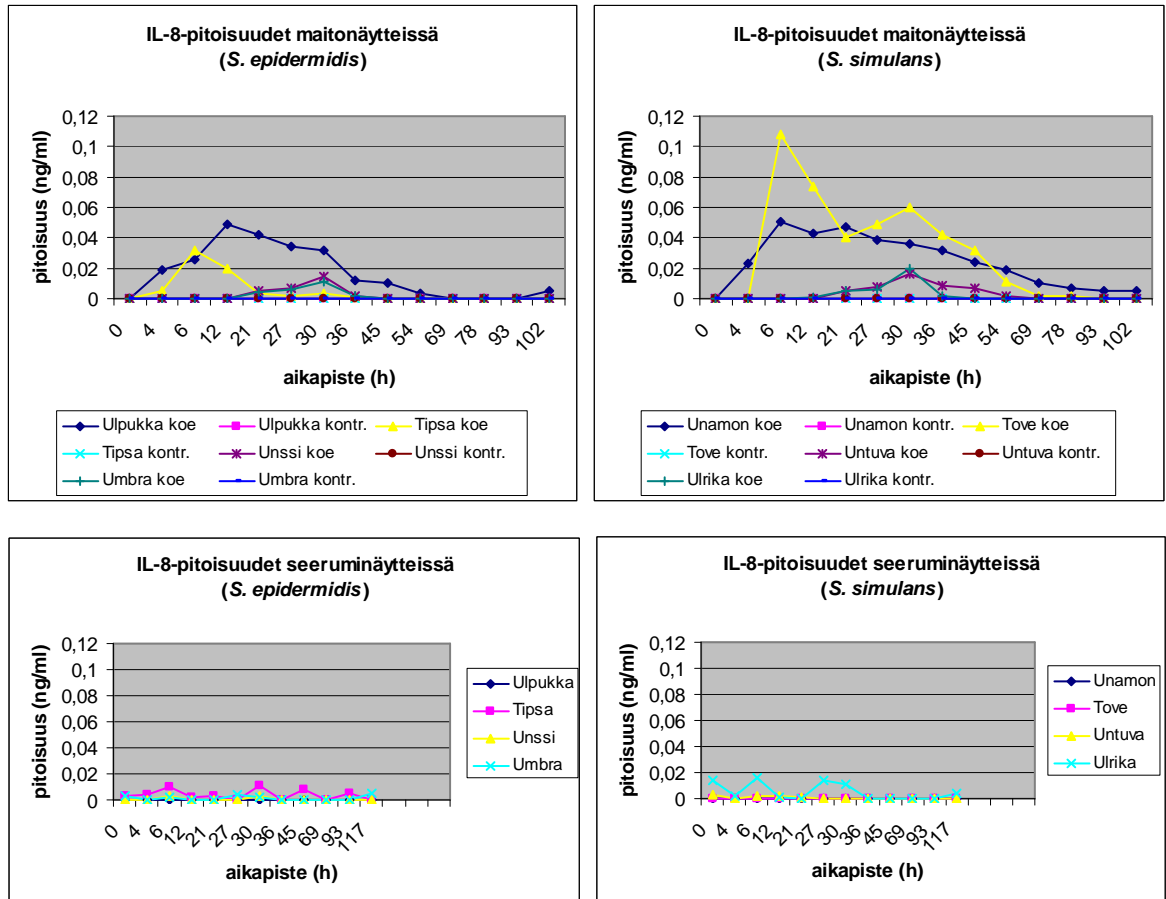
Kuvassa 6 on esitetty näytteiden IL-1 β -pitoisuuden muutokset eri naudoilla. Eri bakteereilla tartutetut naudat on esitetty omissa kuvaajissaan, samoin maitonäytteet erillään seeruminäytteistä.



Kuva 6. IL-1 β -pitoisuudet maito- ja seeruminäytteissä. Käytetyt lyhenteet: koe = koe- neljännes, kontr. = kontrollineljännes.

Kuvaajista voidaan havaita, että seeruminäytteissä pitoisuudet olivat huomattavasti matalampia kuin maitonäytteissä. Seeruminäytteissä eri yksilöiden väliset erot olivat suurempia kuin maitonäytteissä. Maitonäytteiden kohdalla voidaan havaita joitakin yhteneväisyyksiä eri yksilöiden välillä, kuten IL-1 β -pitoisuuksien nousun alkaminen 6:n ja 12 tunnin välillä.

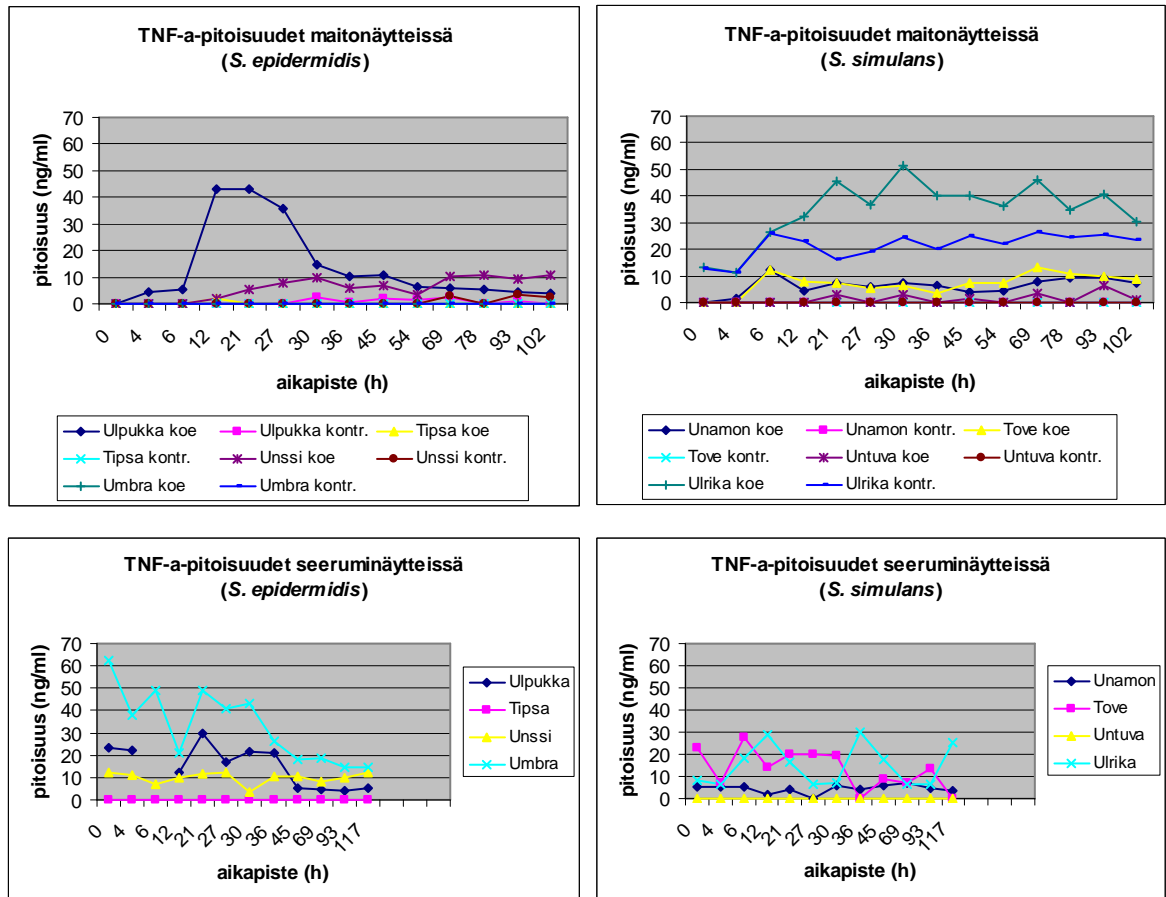
Kuvassa 7 on esitetty IL-8-pitoisuuksien muutokset ajan funktiona eri nautdoilla. Tässäkin sarjassa on eri bakteereilla tartutetut naudat erotettu eri kuvaajiin samoin kuin maito- ja seeruminäytteet.



Kuva 7. IL-8-pitoisuudet maito- ja seeruminäytteissä. Käytetyt lyhenteet: koe = koelajannes, kontr. = kontrollinelajannes.

Myös IL-8 pitoisuuksissa voidaan maitonäytteissä nähdä tiettyjä yhtenevyyksiä, kuten pitoisuuksien kohoaminen 6 - 12 ja 30 tunnin kuluttua tartutuksesta. Seeruminäytteissä yhtenevyyksiä ei juuri ole.

Kuvassa 8 on esitetty TNF- α -pitoisuuksien vaihtelu eri naudoilla tartutuksesta kuluneen ajan suhteen.



Kuva 8. TNF- α -pitoisuudet maito- ja seeruminäytteissä. Käytetyt lyhenteet: koe = koeneljännes, kontr. = kontrollineljännes.

TNF- α -pitoisuudet eivät eroa maito- ja seeruminäytteiden välillä yhtä paljon kuin muiden sytokiinien kohdalla. Näytteistä ei voida TNF-alfan kohdalla nähdä selkeitä yhtenevyyksiä eri nautojen välillä. Kuitenkin tässäkin tapauksessa maitonäytteissä yhteneväisyyksiä on enemmän kuin seeruminäytteissä. TNF- α -pitoisuudet maitonäytteissä lähtevät *S. epidermidis*-tartutetuilla naudoilla nousemaan 12 - 21 tunnin kuluttua tartutuksesta ja *S. simulans*-tartutetuilla naudoilla 4 - 6 tunnin kuluttua tartutuksesta.

6 YHTEENVETO

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää ELISA-menetelmä, jolla saataisiin luotettavasti mitattua sytokiinipitoisuuksia mastiitinäytteistä. Optimoitulla menetelmällä oli tarkoitus määrittää KNS-tartutusnäytteiden sytokiinipitoisuudet.

Menetelmää pystytettäessä valittiin käytettäväksi levytyypiksi "high binding" -levy, jolla näytteistä saatiin esille matalampia pitoisuuksia kuin "medium binding" -levyillä. Samalla määritettiin käytettäväksi "capturing"-vasta-ainepitoisuuksiksi IL-1 β 4 $\mu\text{g/ml}$ ja TNF- α 1 $\mu\text{g/ml}$ sekä detektiovasta-ainepitoisuuksiksi IL-1 β 2 $\mu\text{g/ml}$ ja TNF- α 2,5 $\mu\text{g/ml}$. IL-8:lle käytettiin valmistajan suosittelemia pitoisuuksia, jotka olivat "capturing"-vasta-aineelle 4 $\mu\text{g/ml}$ ja detektiovasta-aineelle 20 ng/ml. Rekombinanttiproteiinilaimennos-sarjat valittiin seuraavasti: IL-1 β 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,625 ng/ml; 0,313 ng/ml; 0,156 ng/ml; 0,078 ng/ml ja 0 ng/ml, IL-8 1 ng/ml; 0,5 ng/ml; 0,250 ng/ml; 0,125 ng/ml; 0,0625 ng/ml; 0,0313 ng/ml; 0,0156 ng/ml ja 0 ng/ml ja TNF- α 200 ng/ml; 50 ng/ml; 25 ng/ml; 12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,125 ng/ml ja 0 ng/ml.

Tässä vaiheessa varmistettiin myös vasta-aineiden soveltuvuus naudan sytokiinien määrittämiselle ja havaittiin, että käytössä olleet IL-1 β -, IL-8- ja TNF- α -vasta-aineet soveltuivat tarkoitukseen. IL-6-vasta-aineet sen sijaan eivät kyenneet tunnistamaan naudan sytokiinejä, joten IL-6-mittaukset siirrettiin myöhempään ajankohtaan.

IL-1 β -pitoisuudet KNS-tartutettujen lehmien maitonäytteissä alkoivat nousta keskimäärin 6 tunnin kuluttua tartutuksesta ja nousivat korkeimmillaan 3,55 ng/ml. Seeruminäytteiden pitoisuudet jäivät huomattavasti maitonäytteitä matalammiksi (alle 0,1 ng/ml). IL-8-pitoisuudet maitonäytteissä nousivat keskimäärin 6 - 12 tunnin kuluessa tartutuksesta sekä 30 tunnin kuluttua. Korkeimmillaan pitoisuudet maitonäytteissä nousivat 0,11 ng/ml. Seeruminäytteissä pitoisuudet jäivät alle 0,02 ng/ml. TNF- α -pitoisuudet maitonäytteissä alkoivat nousta *S. epidermidis* -tartutetuilla lehmillä keskimäärin 12 tunnin ja *S. simulans* -tartutetuilla 4 tunnin kuluttua tartutuksesta. Korkeimmillaan TNF- α -pitoisuudet nousivat maitonäytteissä 51,56 ng/ml ja seeruminäytteissä 60 ng/ml. TNF- α tuloksia tarkasteltaessa tulee huomioda se, että näytteiden antamia OD(450 nm)-arvoja on verrattu standardisuoriin, jotka on valmistettu 1 % BSA-PBS-liuokseen. Tällöin pitoisuudet, jotka ovat > 25 ng/ml, ovat aliarvioituja, eivät tarkkoja pitoisuuksia. Seeruminäytteissä ei havaittu yhtenevyyksiä eri lehmien välillä minkään sytokiinin suhteen. Sen sijaan maitonäytteistä havaittiin samoilla lehmillä olleen usein kaikkien sytokiinien pitoisuudet koholla. Osalla näistä lehmistä oli myös seeruminäytteissä korkeampia sytokiinipitoisuuksia.

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu kokeellisessa *E. coli* -mastiitissa IL-1 β -pitoisuuksien maidossa nousevan 0,3 - 8 ng/ml. Gram-positiivisen *S. uberis* -bakteerin on taas todettu nostavan maidon IL-1 β -pitoisuuden 2 - 3 ng/ml. IL-8-pitoisuuksien on todettu nousevan kokeellisessa *E. coli* -mastiitissa 0,2 - 1,0 ng/ml. *S. uberis* -mastiitissa maidon IL-8-pitoisuuksien on havaittu nousevan 0,035 - 0,060 ng/ml. *E. coli* -bakteerin aiheuttamassa kokeellisessa mastiitissa on todettu TNF- α -pitoisuuksien maidossa nousevan 100 - 200 ng/ml ja veressä 0,1 - 10 ng/ml. Gram-positiivisten bakteerien on todettu nostavan TNF- α -pitoisuuksia huomattavasti vähemmän. [16.]

Tässä opinnäytetyössä saadut tulokset asettuvat aiempien Gram-positiivisista bakteereista saatujen tutkimustulosten kanssa samaan linjaan, jos otetaan huomioon mitattujen näytteiden keskiarvot eikä huomioida yksittäisiä poikkeamia. Kirjallisuudesta jäi osittain epäselväksi tartutuksissa käytetyt bakteerimäärät, mitkä saattavat vaihdella ja osin aiheuttaa eroa. Niissä KNS-tartutuksissa, joista analysoidut näytteet olivat peräisin, oli käytetty huomattavan suurta bakteeriannosta. Luonnollisissa KNS-mastiiteissa elimistön reaktiot eivät siis liene näin vahvoja. Suuri bakteeriannos oli kuitenkin perusteltu, jotta saataisiin esille edes jonkinasteinen tulehdusreaktio. Pystytettyä ja näytteiden mittaamiseen käytettyä menetelmää voidaan pitää näille näytteille käyttökelpoisena.

VIITELUETTELO

- [1] Bannerman, Douglas D., ym. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* Vol.11, No 3 (2004), s. 463 - 472.
- [2] Oviedo-Boyso, Javier ym. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection* 54 (2007), s. 399 - 409.
- [3] Hillerton, J.E. – Berry E.A. Treating mastitis in the cow- a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, s. 1250 - 1255.
- [4] Sordillo, Lorraine M. – Streicher Katie L. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 7, No. 2, April 2002, s.135 - 146.
- [5] Rainard, Pascal – Riollet, Celine. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* 37 (2006), s. 369 - 400.
- [6] Sandholm, Markus ym. *The Bovine Udder and Mastitis*. Helsinki: University of Helsinki Faculty of Veterinary Medicine. 1995.
- [7] Sharon, Jacqueline. *Basic Immunology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1998.
- [8] Weir, Donald M. – Stewart, John. *Immunology*. New York: Churchill Livingstone 8. painos. 1997 (1970).
- [9] Myllys, Vesa. *Staphylococcal Mastitis in Heifers and Dairy Cows*. Väitöskirja Eläinlääketieteellinen korkeakoulu. Helsinki. 1995.
- [10] Taponen, Suvi. *Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci*. Väitöskirja. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Tuotantoeläinlääketieteen laitos. Helsinki. 2008.
- [11] Balows, Albert ym. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington, D.C.: America Society for Microbiology. 1970 (1991).
- [12] Käyhkö, Sari. *Koagulaasi-negatiivisten stafylokokkien adheesio, invaasio ja lisääntyminen sekä laktoferrinin vaikutus in vitro utare-epiteelisoluilla*. Pro gradu -tutkielma. Kuopion yliopisto. Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta. Kuopio. 2008.
- [13] Sordillo, L. M. - Shafer-Weaver, K. - DeRosa D. Symposium: Bovine Immunology – Immunology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* Vol. 80, No 8 (1997), s. 1851 - 1865.
- [14] Lehtolainen, Tanja. *Escherichia coli mastitis – Bacterial factors and host response*. Väitöskirja. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Kliinisen eläinlääketieteen laitos. Helsinki. 2004.

- [15] Alluwaimi, Ahmed M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Research in Veterinary Science* 77 (2004), s. 211 - 222.
- [16] Bannerman, D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* published online 15.8.2008. [Verkkodokumentti, viitattu 27.8.2008.] Saatavissa <http://jas.fass.org/cgi/reprint/jas.2008-1187v1>.
- [17] Harlow, Ed – Lane, David. *Antibodies – a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Laboratory. 1988.
- [18] BD Biosciences. *Cytokine ELISA* [verkkodokumentti, viitattu 23.6.2008]. Saatavissa: http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols/Cytokine_ELISA.shtml.
- [19] R&D Systems. *ELISA Development Guide* [verkkodokumentti, viitattu 23.6.2008]. Saatavissa: http://www.rndsystems.com/DAM_public/5670.pdf.
- [20] Simojoki, Heli, Helsingin yliopisto, eläinlääketieteellinen tiedekunta, klinisen eläinlääketieteen laitos, Saaren yksikkö. Re: *Lisää tietoja näytteistä* [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Jenni Ylikoski-Okontah, Tiina Salomäki. Lähetetty 9.9.2008 [viitattu 12.9.2008].
- [21] Wahm M.H. – Goldblatt D. *Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG (Pn PS ELISA* [verkkodokumentti, viitattu 8.10.2008]. Saatavissa <http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20Protocol.pdf>.
-

Pipetointitaulukko

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Näyte 1	Näyte 1	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 2	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 3	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 4	Näyte 4
2	Näyte 5	Näyte 5	Näyte 5	Näyte 6	Näyte 6	Näyte 6	Näyte 7	Näyte 7	Näyte 7	Näyte 8	Näyte 8	Näyte 8
3	Näyte 9	Näyte 9	Näyte 9	Näyte 10	Näyte 10	Näyte 10	Näyte 11	Näyte 11	Näyte 11	Näyte 12	Näyte 12	Näyte 12
4	Stand. 1	Stand. 2	Stand. 3	Stand. 4	Stand. 5	Stand. 6	Stand. 7	Stand. 8	+ kontr.	+ kontr.	+ kontr.	PBS
5	Stand. 1	Stand. 2	Stand. 3	Stand. 4	Stand. 5	Stand. 6	Stand. 7	Stand. 8	- kontr.	- kontr.	- kontr.	PBS
6	Stand. 1	Stand. 2	Stand. 3	Stand. 4	Stand. 5	Stand. 6	Stand. 7	Stand. 8	PBS	PBS	PBS	PBS
7	Näyte 13	Näyte 13	Näyte 13	Näyte 14	Näyte 14	Näyte 14	Näyte 15	Näyte 15	Näyte 15	Näyte 16	Näyte 16	Näyte 16
8	Näyte 17	Näyte 17	Näyte 17	Näyte 18	Näyte 18	Näyte 18	Näyte 19	Näyte 19	Näyte 19	Näyte 20	Näyte 20	Näyte 20

Käytetyt liuokset ja vasta-aine pitoisuudet

1 % BSA laimennettu PBS-liuoksella pH 7,2-7,4. Suodatettu 0,2 µm suodattimella.

Pesuliuos:

0,05 % Tween20 PBS-liuoksessa pH 7,2-7,4

Substraattiliuos:

0,11 M Natriumasetaatti, pH 5,5

0,01 % TMB (Sigma, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, T2885-1G)

0,006 % H₂O₂

Valmistetaan steriiliin veteen juuri ennen käyttöä

Stop-liuos:

2 M H₂SO₄

"Capturing"-vasta-ainepitoisuudet: IL-1β 4 µg/ml, IL-8 4 µg/ml, TNF-α 1 µg/ml.

Detektiovasta-ainepitoisuudet: IL-1β 2 µg/ml, IL-8 20 ng/ml, TNF-α 2,5 µg/ml

Mittaustulokset taulukoituna

Tammikuun tartutus

Lehmä	Ai- ka (h)	IL-1 β koe- nelj. (ng/ ml)	IL-1 β kontr nelj. (ng/ ml)	IL-8 koe- nelj. (ng/ ml)	IL-8 kontr nelj. (ng/ ml)	TNF- α koe- nelj. (ng/ml)	TNF- α kontr nelj. (ng/ml)	IL-1 β seeru- mi (ng/ml)	IL-8 seeru- mi (ng/ml)	TNF- α seeru- mi (ng/ml)
Ulpukka	0	0,06	0,123	0	0	0	0	0,025	0	23,332
Ulpukka	4	0,479	0,088	0,019	0	4,325	0	0,021	0	21,891
Ulpukka	6	1,657	0,161	0,026	0	5,407	0	.	.	.
Ulpukka	12	1,381	0,064	0,049	0	43,307	0	0,003	0	12,233
Ulpukka	21	1,244	0,16	0,042	0	43,291	0	0,027	0	29,512
Ulpukka	27	0,573	0,115	0,034	0	35,865	0	0,013	0	17,003
Ulpukka	30	0,181	0,001	0,032	0	14,449	2,239	0,021	0	21,394
Ulpukka	36	0,065	0	0,012	0	10,448	0,301	0,022	0	20,985
Ulpukka	45	0,158	0,016	0,01	0	10,771	1,884	0	0	5,18
Ulpukka	54	0,04	0,006	0,003	0	6,336	1,264	.	.	.
Ulpukka	69	0,075	0,024	0	0	6,061	2,255	0	0	4,601
Ulpukka	78	0,029	0,001	0	0	5,301	0	.	.	.
Ulpukka	93	0,117	0,072	0	0	4,364	0,849	0	0	3,995
Ulpukka	102	0,089	0,037	0,005	0	3,848	0	.	.	.
Ulpukka	117	0	0	5,483
Tipsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0
Tipsa	4	0	0	0,005	0	0	0	0	0,004	0
Tipsa	6	1,031	0	0,032	0	0	0	0	0,01	0
Tipsa	12	1,44	0	0,02	0	1,742	0	0	0,002	0
Tipsa	21	0,229	0	0,003	0	0	0	0	0,003	0
Tipsa	27	0,129	0	0,002	0	0	0	0	0	0
Tipsa	30	0,095	0	0,003	0	0	0	0	0,011	0
Tipsa	36	0,049	0	0,001	0	0	0	0	0	0
Tipsa	45	0,003	0	0	0	0	0	0	0,008	0
Tipsa	54	0,007	0	0	0	0	0	.	.	.
Tipsa	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tipsa	78	0	0	0	0	0	0	.	.	.
Tipsa	93	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0
Tipsa	102	0	0	0	0	0	0	.	.	.
Tipsa	117	0	0	0
Unamon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,211
Unamon	4	0,011	0	0,023	0	1,647	0	0	0	5,429
Unamon	6	0,245	0	0,051	0	12,029	0	0	0	5,21
Unamon	12	0,157	0	0,043	0	4,205	0	0	0	1,565
Unamon	21	0,635	0	0,047	0	7,36	0	0	0	4,397
Unamon	27	0,473	0	0,039	0	5,699	0	0	0	0
Unamon	30	0,611	0	0,036	0	7,283	0	0	0	5,716
Unamon	36	0,648	0	0,032	0	6,561	0	0	0	3,936
Unamon	45	0,677	0	0,024	0	3,988	0	0	0	5,857
Unamon	54	0,276	0	0,019	0	4,423	0	.	.	.

Unamon	69	0,062	0	0,01	0	7,849	0	0	0	6,779
Unamon	78	0,077	0	0,007	0	9,207	0	.	.	.
Unamon	93	0,096	0	0,005	0	9,195	0	0	0	4,794
Unamon	102	0,085	0	0,005	0	7,482	0	.	.	.
Unamon	117	0	0	3,791
Tove	0	0	0	0	0	0	0	0,022	0	22,835
Tove	4	0	0	0	0	0	0	0	0	7,017
Tove	6	3,554	0	0,108	0	12,367	0	0,019	0	27,839
Tove	12	1,842	0	0,074	0	7,809	0	0	0	14,137
Tove	21	1,225	0	0,04	0	7,48	0	0,024	0	20,282
Tove	27	0,628	0	0,049	0	5,616	0	0,02	0	19,902
Tove	30	0,741	0	0,06	0	6,384	0	0,04	0	19,523
Tove	36	0,313	0	0,042	0	3,629	0	0	0	0
Tove	45	0,366	0	0,032	0	7,194	0	0	0	9,105
Tove	54	0,191	0	0,011	0	7,296	0	.	.	.
Tove	69	0,034	0	0,002	0	13,305	0	0	0	7,017
Tove	78	0,016	0	0,002	0	10,547	0	.	.	.
Tove	93	0,013	0	0	0	9,951	0	0,007	0	13,343
Tove	102	0	0	0	0	9,018	0	.	.	.
Tove	117	0,062	0	0

Maaliskuun tartutus:

Lehmä	Aika (h)	IL-1 β koe- nelj. (ng/ml)	IL-1 β kontr nelj. (ng/ml)	IL-8 koe- nelj. (ng/ml)	IL-8 kontr nelj. (ng/ml)	TNF- α koe- nelj. (ng/ml)	TNF- α kontr. nelj. (ng/ml)	IL-1 β seeru- mi (ng/ml)	IL-8 seeru- mi (ng/ml)	TNF- α seeru- mi (ng/ml)
Unssi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,076
Unssi	4	0	0	0	0	0	0	0	0	10,97
Unssi	6	0	0	0	0	0	0	0	0,003	6,947
Unssi	12	0	0	0	0	1,764	0	0	0	9,69
Unssi	21	0	0	0,005	0	5,597	0	0	0	11,756
Unssi	27	0	0	0,007	0	7,708	0	0	0	12,426
Unssi	30	0,102	0	0,015	0	9,715	0	0	0,003	3,652
Unssi	36	0,052	0	0,002	.	5,982	0	0	0	10,33
Unssi	45	0	0	0	0	6,652	0	0	0	10,475
Unssi	54	0	0	0	0	3,231	0	.	.	.
Unssi	69	0	0	0	0	10,067	2,694	0	0	8,235
Unssi	78	0	0	0	0	10,66	0	.	.	.
Unssi	93	0	0	0	0	9,423	3,384	0	0	10,155
Unssi	102	0	0	0	0	10,713	2,389	.	.	.
Unssi	117	0	0	12,135
Umbrä	0	0	0	0	0	0	0	0,057	0,003	62,375
Umbrä	4	0	0	0	0	0	0	0,035	0	38,136
Umbrä	6	0	0	0	0	0	0	0,049	0,002	48,862
Umbrä	12	0,071	0	0	0	0	0	0,011	0	21,159
Umbrä	21	0,063	0	0,004	0	0	0	0,053	0	49,253
Umbrä	27	0,049	0	0,006	0	0	0	0,038	0,004	41,011
Umbrä	30	0,057	0	0,011	0	0	0	0,03	0,002	43,359
Umbrä	36	0,006	0	0,002	0	0	0	0,002	0	26,073
Umbrä	45	0,008	0	0	0	0	0	0,065	0	18,014
Umbrä	54	0	0	0	0	0	0	.	.	.

Umbra	69	0	0	0	0	0	0	0,051	0	18,396
Umbra	78	0	0	0	0	0	0	.	.	.
Umbra	93	0	0,008	0	0	0	0	0,057	0	14,577
Umbra	102	0	0	0	0	0	0	.	.	.
Umbra	117	0,051	0,005	14,665
Untuva	0	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0
Untuva	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Untuva	6	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0
Untuva	12	0,208	0	0	0	0	0	0	0,002	0
Untuva	21	0,247	0	0,005	0	2,862	0	0	0,001	0
Untuva	27	0,21	0	0,008	0	.	0	0	0	0
Untuva	30	0,247	0	0,016	0	2,973	0	0	0	0
Untuva	36	0,148	0	0,009	0	0,191	0	0	0	0
Untuva	45	0,042	0	0,007	0	1,334	0	0	0	0
Untuva	54	0,033	0	0,002	0	0	0	.	.	.
Untuva	69	0,008	0	0	0	3,418	0	0	0	0
Untuva	78	0,029	0	0	0	0	0	.	.	.
Untuva	93	0,024	0	0	0	6,286	0	0	0	0
Untuva	102	0,018	0	0	0	1,017	0	.	.	.
Untuva	117	0	0	0
Ulrika	0	0	0	0	0	13,444	12,947	0	0,014	7,976
Ulrika	4	0	0	0	0	11,412	11,313	0	0,002	6,66
Ulrika	6	0	0	0	0	26,576	25,76	0	0,016	18,485
Ulrika	12	0,081	0	0,001	0	32,25	23,035	0	0,001	28,822
Ulrika	21	0,189	0	0,005	0	45,738	16,26	0	0	16,445
Ulrika	27	0,091	0	0,006	0	36,933	19,24	0	0,014	6,49
Ulrika	30	0,292	0	0,02	0	51,563	24,445	0	0,011	6,787
Ulrika	36	0,08	0	0,002	0	40,142	19,926	0	0	30,086
Ulrika	45	0,028	0	0	0	40,194	25,08	0	0	17,798
Ulrika	54	0,017	0	0	0	36,053	22,08	.	.	.
Ulrika	69	0,004	0	0	0	46,217	26,576	0	0	6,444
Ulrika	78	0,002	0	0	0	34,584	24,536	.	.	.
Ulrika	93	0	0	0	0	40,532	25,61	0	0	6,19
Ulrika	102	0	0	0	0	30,391	23,73	.	.	.
Ulrika	117	0	0,004	25,059

0 = alle määritysrajan

. = ei mitattu