

**Suomalaisessa siipikarjassa ja tarhariistalinnuissa
todettujen *Brachyspira*-suvun bakteereiden
karakterisointia**

Jaana Vuorela

Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Biotekniikka
Lokakuu 2006

ALKUSANAT

Annan suuret kiitokset Eviran Seinäjoen tutkimusyksikölle hienosta mahdollisuudesta tehdä Pro gradu -tutkielmani täällä. Erityiset kiitokset haluan osoittaa erinomaisesta ohjauksesta ja avusta yksikönjohtaja Marja Fossille sekä Heikki Aholalle. PCR-työn käytännön perehdyttämisestä kiitokset kuuluvat laborantti Maria Mäkiselle.

Eviran Kuopion tutkimusyksikölle kuuluvat kiitokset pulssikenttägeelielektroforeesi (PFGE) analyyseistä. Sirpa Heinikaiselle kiitokset PFGE:n kuvien analysoinnin opastuksesta sekä teoretietoista. Riikka Luukkaselle kiitokset työn opastuksesta käytännössä ja myös erinomaisista tiedoista teoriapuolelta.

Osoitan kiitokseni myös Suomen kulttuurirahastolle Väinö Tuomaalan rahastosta myöntämästään apurahasta.

Haluan kiittää myös ystäviäni ja perhettäni hyvästä tuesta, mikä osaltaan vaikutti positiivisesti työn tekoon.

Jyväskylän yliopisto
 Pro gradu –tutkielman tiivistelmä
 Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Tekijä:	Jaana Vuorela
Tutkielman nimi:	Suomalaisessa siipikarjassa ja tarhariistalinnuissa todettujen <i>Brachyspira</i> -suvun bakteereiden karakterisointia
English title:	Characterization of <i>Brachyspira</i> spp. bacteria in Finnish poultry and game birds
Päivämäärä:	9.10.2006 Sivumäärä: 61 + 8
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Biotekniikka
Tutkielman ohjaaja(t):	Marja Fossi ja Heikki Ahola

Tiivistelmä:

AIS (avian intestinal spirochaetosis) on sairaus, jota esiintyy munivilla ja lihaa tuottavilla kanoilla. Sen aiheuttaa suolistossa kasvavat anaerobiset *Brachyspira*-suvun spirokeetabakteerit. Ne aiheuttavat kanoille ripulia, munankuorien värjäytymistä ulosteella sekä alentunutta ja viivästyntä munantuotantoa. Vasta melko vähän tutkituista *Brachyspira*-lajeista on löydetty patogeeneja mm. sialle ja siipikarjalle. Linnuille patogeenisia lajeja ovat *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli* ja mahdollisesti myös *B. murdochii*. Ei- patogeeninen lintujen *Brachyspira*-laji on *B. innocens* ja varmaa tietoa ei ole lajista *B. "pulli"*. Suomalaisessa siipikarjassa olevien *Brachyspira*-bakteereiden lajien selvitys on tärkeää tuotantotalouden takia, tautivastustustyön edistämiseksi ja myös elintarvikkeiden korkean laadun takaamiseksi. Vuosina 2002-2005 on kerätty siipikarjan *Brachyspira*-näytteitä luomukanaloista, perinteisistä munakanaloista ja kalkkunoista. Näytteitä on jonkin verran myös tarhataista riistalinnuista eli fasaaneista, ankoista, sorsista ja hanhista. Tähän tutkimukseen oli valittu noin 150 näytettä, joista oli tarkoitus selvittää, mitä *Brachyspira*-lajeja niissä esiintyy. *Brachyspira*-bakteereiden karakterisoinnissa käytettiin biokemiallisia tunnistusmenetelmiä, polymeerasiketjureaktiota (PCR) ja pulssikenttägelelektroforeesia (PFGE). PCR:n avulla identifioitiin *Brachyspira*-lajeista *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. murdochii* ja *B. innocens*. *B. intermedia*:lle täytyi myös optimoida PCR-sovellus, jossa se tunnistettiin NADH oksidaasi (NOX)-geenin perusteella. Aiemmin käytetty PCR-sovellus, joka perustui 23S rDNA geeniin, ei ole tarpeeksi spesifinen lintujen *B. intermedia*:n osoittamiseksi. NOX-geeniin perustuvat PCR-sovellukset optimoitiin myös *B. innocensille* ja *B. murdochii*:lle. Aiemmin käytetty PCR-menetelmä, NOX4, tunnisti molemmat niitä erittelemättä. Uusien sovellusten oli tarkoitus olla spesifisiä vain joko *B. murdochii*:lle tai *B. innocens*:lle. PFGE-analyysin jälkeen nähtiin näytteiden geneettinen monimuotoisuus ja vaihtelu samalla tilalla sekä tilojen ja lintulajien välillä. Biokemialliset testit eivät olleet kovin luotettavia lajimäärityksessä, mutta antoivat alustavaa tietoa. PCR- ja PFGE-tulosten perusteella pystyttiin varmemmin tunnistamaan eri lajit. NOX-PCR –sovellus *B. intermedia*:lle vaatii vielä kehittelyä, koska se ei tunnistanut ilmeisesti kaikkia *B. intermedia*-bakteereita. Tulosten perusteella patogeenista *B. intermedia*:a löytyi siipikarjasta ja tarhariistalinnuista. Ankkujen ja sorsien näytteistä löytyi myös *B. pilosicoli*:a. *B. murdochii* ja *B. innocens* olivat yleisimpiä siipikarjassa ja fasaaneilla esiintyviä *Brachyspira*-bakteereita. Osaa näytteistä ei näillä menetelmillä pystytty karakterisoimaan. Usean tutkimusmenetelmän käyttö auttoi paremmin selvittämään Suomessa esiintyviä *Brachyspira*-lajeja ja niiden genotyypikirjoa sekä sekataruntojen tunnistamista. Jatkossa genomien sekvensointi toisi lisää selvyyttä lintujen *Brachyspira*-lajeihin. Varsinkin *B. alvinipulli*:n mahdollinen esiintyminen suomalaisessa siipikarjassa tulisi selvittää. Perinteisten munituskanaloiden tutkimuksia *Brachyspira*-bakteereiden esiintymisen varalta tarvitaan lisää. Suomalaisesta siipikarjasta eristetyillä, patogeenisiksi epäiltävillä *Brachyspira*-kannoilla tulisi myös tehdä infektiokokeita niiden todellisen taudinaiheutuskyvyn selvittämiseksi.

Avainsanat: *Brachyspira*, kana, PCR, NADH oksidaasi, PFGE

University of Jyväskylä
 Abstract of Master's Thesis
 Faculty of Mathematics and Science

Author: Jaana Vuorela
Title of thesis: Characterization of *Brachyspira* spp. bacteria in Finnish poultry and game birds
Finnish title: Suomalaisessa siipikarjassa ja tarhariaistalinnuissa todettujen *Brachyspira*-suvun bakteereiden karakterisointia
Date: 9.10.2006 **Pages:** 61 + 8
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Biotechnology
Supervisor(s): Marja Fossi and Heikki Ahola

Abstract:

AIS (avian intestinal spirochaetosis) is a disease that affect commercial laying and meat breeder hens. It is caused by anaerobic intestinal spirochaetes which includes also the genus *Brachyspira*. The genus of the *Brachyspira* has not been comprehensively studied. However, a couple of species which are pathogenic for pigs and hens have been identified. The *Brachyspira* bacteria are associated with fecal staining of egg shells, delayed and reduced egg production, and chronic diarrhoea in birds. The diarrhoea leads to problems in cage cleaning, odour emission and attraction of flies. The pathogenic species for poultry are *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli* and probably *B. murdochii*. Non-pathogenic species for bird is *B. innocens*, and suggestively *B. pulli*, as well. The occurrence of *Brachyspira* species in Finnish domestic birds had to be clarified, due to their economic impact, fight against the disease and guarantee the quality of food.

The samples for this research have been collected during years 2002-2005. The samples were collected from hens as well as from farmed pheasants, geese, ducks and mallards. Altogether 150 spirochaete isolates were investigated in purpose to get more information about *Brachyspira* spp in Finnish domestic and game birds.

Characterization of the isolates included the results from biochemical tests, polymerase chain reaction (PCR) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PCR applications were used to detection of *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. murdochii* and *B. innocens*. A novel PCR application which is based on NADH oxidase (NOX) gene had to be optimized for *B. intermedia*. Previously used 23S rDNA-based PCR was not spesific enough for avian species. New PCRs which are based on NOX gene were also optimized for *B. murdochii* and *B. innocens*. Previously used PCR application for NOX4, did not differentiate the species of *B. murdochii* and *B. innocens*. PFGE elucidated the high genetic diversity of the strains within and between the farms, as well as between the avian species.

Biochemical tests were not so reliable for avian *Brachyspiras* albeit they provided preliminary information. The NOX gene based PCR for *B. intermedia* was not sensitive enough for the avian strains. PCR and PFGE results together strengthened the identification of *Brachyspira* species. According to the results, potentially pathogenic *B. intermedia* were found from domestic and game bird samples. *B. pilosicoli* was found only from ducks and mallards. The most prevalent species in domestic birds and pheasants were *B. innocens* and *B. murdochii*. A portion of the samples could not be characterized by these methods.

The presence of various *Brachyspira* species in Finnish birds was clarified better by using more than one method. Sequencing the genome portions of some avian *Brachyspira* strains could give more information about the species involved. The presence of *B. alvinipulli* in Finnish poultry is also important to clarify. Further studies for occurrence of *Brachyspira* spp. in conventional layer hen herds should be done. Furthermore, the true pathogenicity of the Finnish avian *Brachyspira* isolates should be studied by the infection trials.

Keywords: *Brachyspira*, avian, PCR, NADH oxidase, PFGE

LYHENTEET

AIS	Avian Intestinal Spirochaetosis
ATCC	American Type Culture Collection
BA-3	<i>Brachyspira</i> Agar 3
bp	Base Pair
FAA	Fastidious Anaerobe Agar
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NOX	Nicotinamide adenine dinucleotide Oxidase
NOX4	NADH Oxidase 4 (sama sekvenssi sekä <i>B.innocens</i> :lla että <i>B. murdochii</i> :lla)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	9
1.1. BRACHYSPIRA-BAKTEERIT	11
1.1.1. <i>Avian Intestinal Spirochaetosis</i>	12
1.1.2. <i>Brachyspira pilosicoli</i>	13
1.1.3. <i>Brachyspira intermedia</i>	14
1.1.4. <i>Brachyspira murdochii ja innocens</i>	15
1.1.5. <i>Brachyspira alvinipulli</i>	16
1.1.6. <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	17
1.2. MAATALOUDEN NÄKÖKULMA	18
1.2.1. Luomukanalat	18
1.2.2. Munituskanalat	18
1.2.3. Lihasiipikarja.....	19
1.2.4. Riistalinnut.....	19
2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA MERKITYS	20
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	21
3.1. NÄYTTEET.....	21
3.2. KASVATUSOLOSUHTEET.....	22
3.3. GRAMVÄRJÄYS	23
3.3.1. Gramnegatiiviset solut.....	23
3.4. BIOKEMIAALLISET TESTIT.....	24
3.5. POLYMEERAASIKETJUREAKTIO	25
3.5.1. Alukkeet.....	26
3.5.2. 23S rDNA-geeniin perustuva PCR-sovellus <i>B. intermedia</i> :lle	27
3.5.3 23S rDNA-geeniin perustuva PCR-sovellus <i>B. pilosicoli</i> :lle.....	27
3.5.4. NOX4 PCR-sovellus <i>B. murdochii</i> :lle ja <i>B. innocens</i> :lle.....	27

3.5.5. NOX-geeniin perustuvat PCR-sovellukset <i>B. murdochii</i> :lle ja <i>B. innocens</i> :lle.....	28
3.5.6. NOX-geeniin perustuva PCR-sovellus <i>B. intermedia</i> :lle.....	28
3.5.7. PCR-valmisteet.....	29
3.5.8. PCR reaktio-olosuhteet.....	29
3.6. AGAROOSIGEELIELEKTROFOREESI	30
3.7. PULSSIKENTTÄGEELIELEKTROFOREESI.....	30
4. TULOKSET.....	33
4.1. BRACHYSPIRA-BAKTEERIEN PITUUDET.....	34
4.2. BIOKEMIAALLISET TESTIT.....	34
4.3. NOX-GEENIIN PERUSTUVAT PCR-SOVELLUKSET B. INNOCENS:LLE JA	
B. MURDOCHII:LLE	34
4.4. NOX-GEENIIN PERUSTUVA PCR-SOVELLUS B. INTERMEDIA:LLE	35
4.5. BIOKEMIAALLISTEN TESTIEN JA PCR:N TULOSTEN VERTAILU LAJIKOHTAISESTI	37
4.5.1. Luomukanalat	37
4.5.2. Harrastekanala	38
4.5.3. Häkkikanalat	38
4.5.4. Kalkkunat	39
4.5.5. Fasaanit	40
4.5.6. Ankat	40
4.5.7. Sorsat	41
4.5.8. Hanhet.....	42
4.6. PFGE.....	42
4.6.1. PFGE-tulokset kanojen <i>Brachyspira</i> -bakteerieristyksistä.....	43
4.6.2. PFGE-tulokset tarhariistalinnuista eristetyistä <i>Brachyspira</i> -kannoista	45
4.6.3. PFGE-tulokset identifioimattomista <i>Brachyspira</i> -kannoista.....	46
4.6.4. PFGE-tulokset <i>B. intermedia</i> -kannoista.....	48
4.6.5. PFGE-tulokset <i>B. pilosicoli</i> -kannoista	49
4.6.6. PFGE-tulokset <i>B. innocens</i> -kannoista	50
4.6.7. PFGE-tulokset <i>B. murdochii</i> -kannoista.....	51

5. TULOSTEN TARKASTELU	52
6. LÄHDELUETTELO	58
7. LIITTEET	62

1. JOHDANTO

Brachyspira -suvun (aiemmin *Serpulina*) spirokeetabakteereita esiintyy yleisesti eläinten suolistossa. Eri eläinlajeilla on omia *Brachyspira* -lajeja, ja osa lajeista esiintyy useilla eri eläimillä. *Brachyspira*-tutkimus on melko nuori tutkimusala. Uusia *Brachyspira* -lajeja, myös aiemmin tutkimattomilta eläinlajeilta, löytyy jatkuvasti. Tautia aiheuttavilla *Brachyspira*-bakteereilla on kotieläintuotannossa suuri tuotantotaloudellinen merkitys ja eläinten hyvinvointia heikentävä vaikutus (Hampson, D.J. ja Stephens, C.P. 2002; Hampson, D.J. ja Stanton, T.B. 1997). Myös ihmisillä tunnetaan kaksi lajia, *Brachyspira pilosicoli* ja *Brachyspira aalborgi*. *B. pilosicoli* on mahdollinen zoonoosi eli eläimistä ihmisiin tarttuva, mutta *B. aalborgi*:a on tavattu vain ihmisillä ja korkeammilla kädellisillä (Smith, J.L. 2005).

Parhaiten tunnettu *Brachyspira* on voimakkaasti β -hemolyyttinen *B. hyodysenteriae*, joka on patogeeninen varsinkin sioille, mutta satunnaisesti myös linnuille (Roche, J. ym., 2002). Ulkomaisen tutkimustiedon perusteella siipikarjalla voi esiintyä ainakin kolme tautia aiheuttavaa *Brachyspira*-lajia: *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli* ja *B. intermedia*. Mahdollisesti myös *B. murdochii* saattaa olla patogeeninen. Ei- patogeeninen lintujen *Brachyspira*-bakteeri on *B. innocens*. Varmaa tietoa ei ole lajista *B. ”pulli”*.

Suomessa sioille tautia aiheuttavat *Brachyspira*-bakteerit tunnetaan melko hyvin. Sen sijaan tietämys suomalaisessa siipikarjassa esiintyvistä *Brachyspira*-lajeista on lähes olematon. Yksi syy on se, että *Brachyspira*-bakteerit eivät tule esiin bakteriologisessa rutiiniviljelyssä, vaan edellyttävät erikoismenetelmien käyttöä. *Brachyspira*-bakteereja on ulkomailla todettu esiintyvän yleisesti siipikarjalla kaikissa niissä maissa, joissa niitä on osattu etsiä (Burch, D.G.S. 2005). Spirokeetoja on yleisesti eristetty siipikarjasta USAssa, Australiassa sekä Euroopan maissa (Jansson, D.S. ym., 2001; Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 2000). Muun muassa ensimmäistä kertaa vuonna 2005, *B. pilosicoli*:n on raportoitu aiheuttavan umpisuolentulehdusta kalkkunoille (Shivaprasad, H.L. ja Duhamel, G.E. 2005). Myös kotieläiminä pidetyiltä hanhilta on Unkarissa äskettäin löydetty *B. alvinipulli*:a, joka on

patogeeninen laji. Hanhien kuolleisuus kahdessa laumassa oli 28% ja 18%. Hanhien paksusuolesta tehtiin tulehdukseen viittaavia löydöksiä (Nemes, C.S. 2006).

Brachyspira-bakteerien lajitunnistuksessa käytetään perinteisiä biokemiallisia menetelmiä. Nykyisin tunnistusta helpottavat myös molekulaariset menetelmät. Siipikarjan *Brachyspira*-tutkimuksessa on törmätty lajiltaan vielä tuntemattomien kantojen, ja usean *Brachyspira*-lajin erottamattoman yhteiskasvun runsauteen, mikä tekee tutkimustyön tällä saralla erityisen haastavaksi (Råsbäck, T. ym., 2005; Wagenaar, J.A. ym., 2003).

Vaikka *B. pilosicoli* on mahdollisesti ihmisiin tarttuva, ei ole selvää käsitystä miten se tarttuu. On mahdollista, että tartunta tapahtuu infektoituneen eläimen lihasta, ulosteen välityksellä tai kontaminaationa huonosta ruoan käsittelystä, koska se on melko yleinen ihmisillä maissa, joissa hygienia- ja eläinlääkintätasot ovat huono (Smith, J.L. 2005). Suhteellisen vähän tutkimusryhmiä työskentelee *Brachyspira*-bakteerien parissa ja tutkimus on lähinnä keskittynyt diagnosoimiseen, kontrolloimiseen ja epidemiologiaan (Hampson, D.J. ja Thomson, J.R. 2004).

Avian intestinal spirochaetosis (AIS) -taudin patogeneista on melko vähän tutkittua tietoa, mutta spirokeetojen on demonstroitu aiheuttavan kanoilla kasvun heikkenemistä sekä taipumusta nostaa ulosteen rasvapitoisuutta. Varsinkin aikuisilla kanoilla tauti on usein krooninen. Broileri-emoilla, joilla oli AIS, havaittiin enemmän heikkoja poikasia ja niillä hitaampi kasvu sekä heikompi rehunkäyttökyky kuin jälkeläisillä, joiden emolla ei ollut spirokeeta-infektiota. Sairaantuneet tuottivat noin 7,5% vähemmän munia. Kuten muissakin infektiosairauksissa, on ekonomisesti kannattavampaa ehkäistä tautia kuin hoitaa sitä (Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 2000). *Brachyspira*-tartunnoissa hyvä hygienia estää tehokkaimmin bakteerien leviämistä. *Brachyspira*-tartuntojen ehkäisynä käytetäänkin hyvän hygienia- ja eläinlääkintätason ylläpitoa, eläinsuojien desinfiointia kasvatuserien välillä, sekä ristikontaminaation estämistä ja haittaeläintorjuntaa.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa (entisessä EELA:ssa) on vuoden 2002 lopulta lähtien tutkittu siipikarjanäytteitä myös *Brachyspira*-bakteerien esiintymisen varalta. *Brachyspira*-bakteereja on löytynyt kohtalaisesti munituskanoista, tarhatuista fasaaneista ja sorsista, sekä niukalti kalkkunoista. Näiden tarkempaa lajia pyritään selvittämään, koska toistaiseksi niitä ei ole voitu luotettavasti määrittää. Eviran Seinäjoen tutkimusyksikkö on erikoistunut

sikojen ja siipikarjan sairauksiin ja terveydenhuoltoon. Sioille ja siipikarjalle ripulia aiheuttavien *Brachyspira* -bakteereiden diagnostiikka ja tunnistusmenetelmien parantaminen on tutkimusyksikön erikoisalaa. Suomessa tehtävä *Brachyspira*-tutkimus onkin tällä hetkellä keskittynyt Seinäjoen tutkimusyksikköön.

Tutkituista *Brachyspira*-lajeista vain harvat on todettu patogeenisiksi mm. sialle ja siipikarjalle. Spirokeetojen esiintyminen siipikarjassa on hankala huomata, koska oireet vaihtelevat ja voivat olla vähäisiä tai epäspesifisiä. Diagnosointi on ollut hankalaa myös bakteerien vaativien kasvatusolosuhteiden takia. *Brachyspira*-bakteerit vaativat anaerobiset ja muiden bakteerien kasvua voimakkaasti hillitsevät olosuhteet. *Brachyspira*-bakteerit ovat gram-negatiivisia, spiraalinmuotoisia bakteereja, jotka luontaisesti kasvavat vain paksu- ja umpisuoleessa. Niitä kasvatetaan anaerobisesti 40-43°C:ssa, mutta ne kasvavat myös 37°C:ssa. Osa bakteereista kasvaa jo parissa päivässä hyvin, mutta jotkut saattavat vaatia jopa 10 päivän kasvatuksen. Nämä bakteerit liikkuvat vikkellä eteen- ja taaksepäin pyörimällä pituusakselin ympäri. Liikkeen saavat aikaan endoflagellat, joiden määrät vaihtelevat lajikohtaisesti. Myös bakteerien kokonaispituus, paksuus ja kierteiden määrä vaihtelevat jonkin verran.

1.1. *Brachyspira*-bakteerit

Taksonomisesti spirokeetat kuuluvat *Spirochaetales*-lahkoon, joka sisältää suvut *Borrelia*, *Brachyspira*, *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Leptospiraceae*, *Leptonema* ja *Leptospira*. Näissä suvuissa on patogeenisiä lajeja eläimille ja ihmisille. *Brachyspira*-sukuun kuuluvat lajit *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. "pulli"* ja *B. "canis"* (Fellström, C. 2001). *Brachyspira*-suvun nimi on muuttunut useaan otteeseen ja muutoksia saattaa vieläkin tulla. Ensimmäinen nimi oli *Treponema*, josta se muutettiin *Serpula*:n ja *Serpulina*:n kautta *Brachyspira*-muotoon. *Serpulina* on vieläkin yleinen nimi muutamalle lajille.

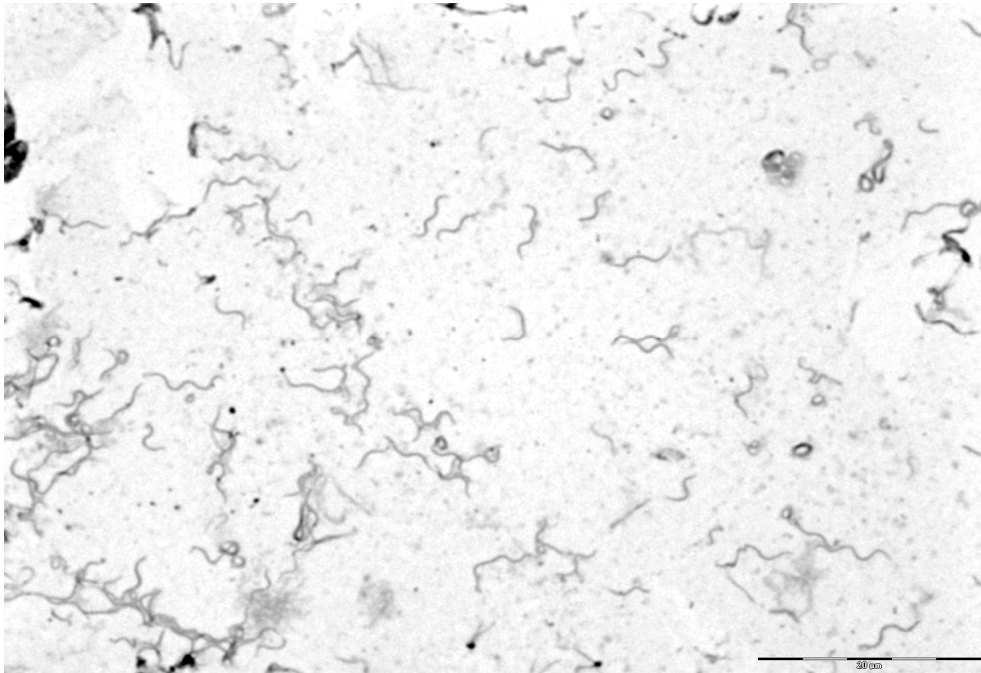
Brachyspira-bakteereja on toistaiseksi eristetty mm. linnuista, sioista, ihmisistä, koirista, erilaisista jyrtsijöistä ja viimeisimpänä hevosista. Kanoilla *B. intermedia*, *B. alvinipulli* ja *B. pilosicoli* on yhdistetty hidastuneeseen kasvuun, ripuliin, vähentyneeseen ja viivästyneeseen

munantuotantoon. Seitsemän *Brachyspira*-lajia on havaittu siipikarjassa ja patogeenisiä ovat ainakin *B. intermedia*, *B. alvinipulli* ja *B. pilosicoli* (Hampson, D.J. ym., 2004). Australiassa tehdyissä tutkimuksissa on todettu patogeenisten *B. pilosicoli*:n ja *B. intermedia*:n olevan yleisiä siipikarjassa. Broileritiloilla vetinen uloste on liittynyt *B. pilosicoli*:in (Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 1999).

1.1.1. Avian Intestinal Spirochaetosis

Avian intestinal spirochaetosis (AIS) on munivien ja lihaa tuottavien kanojen sairaus. Taudin saavat aikaan suolistossa kasvavat anaerobiset spirokeetabakteerit. *Brachyspira*-bakteerit lukeutuvat näihin. Patogeeniset *Brachyspira*-bakteerit aiheuttavat muniville kanoille ripulia, munankuorien värjäytymistä ulosteella sekä alentunutta ja viivästyntä munantuotantoa (Dunn, P.A. ym., 2003). Ripuli aiheuttaa myös hajuhaittoja, ongelmia häkkien siivouksessa sekä karpästen lisääntymistä (Phillips, N.D. ym., 2005). AIS voidaan määritellä subakuutista krooniseen riippuen infektion asteesta, mutta varsinkin aikuisilla kanoilla tauti on yleensä krooninen (Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 2000). 1990-luvulta lähtien AIS:n on raportoitu aiheuttaneen kuolemantapauksia linnuilla (Hampson, D.J. ja Stanton, T.B. 1997). Broilereille ja kalkkunoille se aiheuttaa ainakin kokeellisesti kasvun hidastumista (Stephens, C. P. ja Hampson, D. J. 2002; Hampson D.J. ja Stanton T.B. 1997).

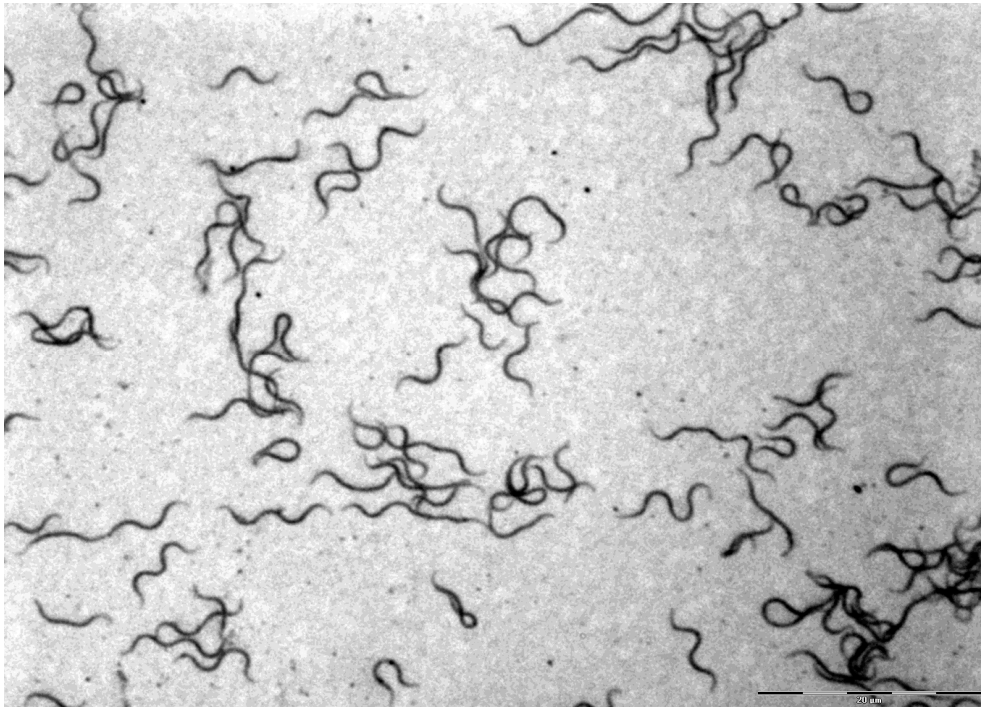
1.1.2. *Brachyspira pilosicoli*



Kuva 1. *B. pilosicoli*, viitekanta ATCC 51139. Valomikroskooppikuva gram-värjätystä bakteerista. 1000x kokonaissuurennus. (kuva J. Vuorela)

B. pilosicoli on heikosti hemolyyttinen, hippuraattia hydrolysoiva, patogeeninen bakteeri. *B. pilosicoli*:n genomi koostuu yhdestä sirkulaarisesta kromosomista, jonka koko on noin 2,5 Mb (Zuerner, R.L. ym., 2004). *B. hyodysenteriae*:n verrattuna *B. pilosicoli* on lyhyempi ja ohuempi, mutta sillä on useita genomisia ja fenotyypisiä samankaltaisuuksia sekä *B. hyodysenteriae*:n että *B. innocens*:n kanssa, muun muassa 16S rRNA sekvenssit ovat 98,2-99,5%:sti yhteneväiset (Trott, D.J. ym., 1996). *B. pilosicoli* voidaan osoittaa esimerkiksi polymeerasiketjureaktiolla, joka tunnistaa sen 23S ribosomaalisen DNA:n (rDNA) lajispesifisen sekvenssialueen. *B. pilosicoli* on eristetty ainakin sioista, koirista, ihmisistä, useista lintulajeista ja hevosista (Hampson, D.J. ym., 2006a). Sen on todettu aiheuttavan broileritiloilla merkittävää munantuotannon alentumista ja viivästyistä (Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 2002). Sioille *B. pilosicoli* aiheuttaa ns. spiroketaaliripulia (Jensen, T.K. ym., 2004; Trott, D.J. ym., 1996). *B. pilosicoli* aiheutti 8,8% kuolleisuuden kasvun kanaparvessa verrattuna parveen, jota oli hoidettu infektiota vastaan (Burch, D.G. ym., 2006). *B. pilosicoli* saattaa olla myös zoonoottinen, mutta sen merkitys ihmiselle on vielä epäselvää (McLaren, A.J. ym., 1997; Trott, D.J. ym., 1996).

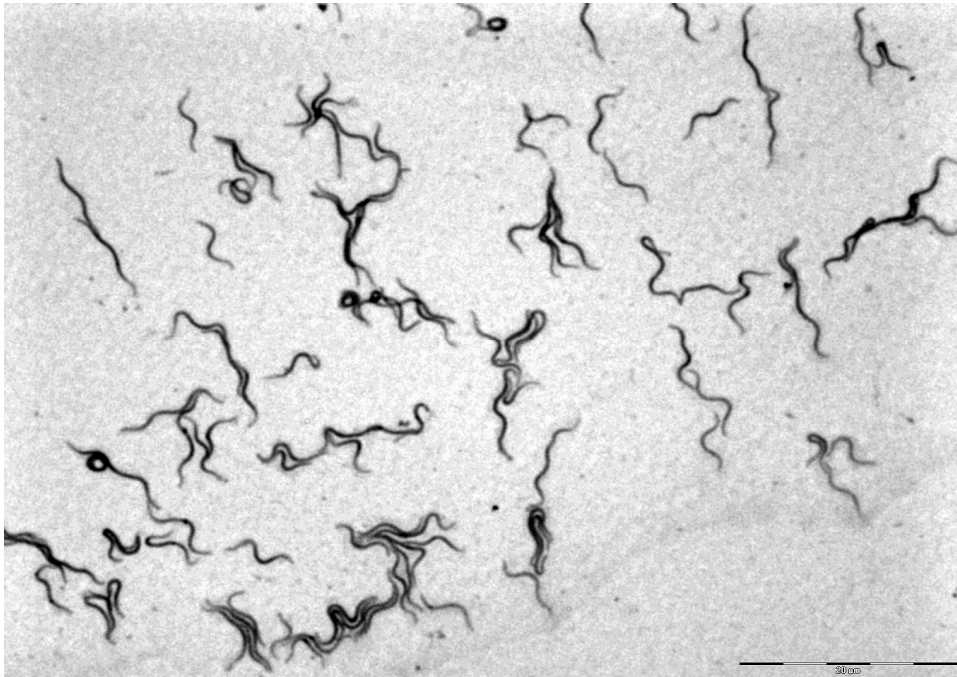
1.1.3. *Brachyspira intermedia*



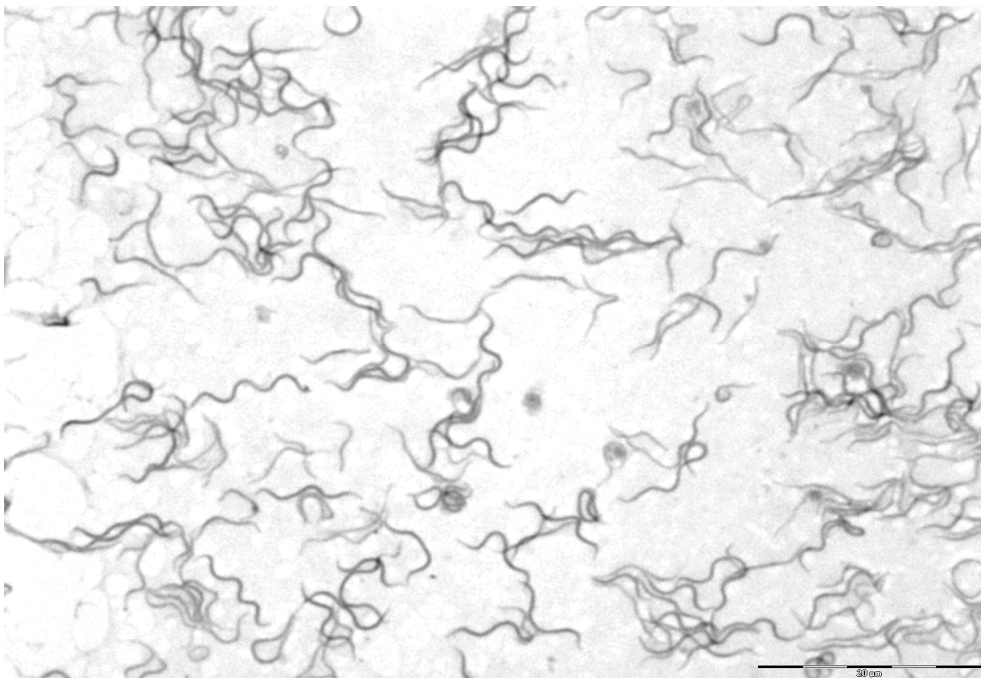
Kuva 2. *B. intermedia*, viitekanta ATCC 51140. Valomikroskooppikuva gram-värjätystä bakteerista. 1000x kokonaissuurennus. (kuva J. Vuorela)

Serpulina intermedia nimi on virallisesti ehdotettu muutettavan *Brachyspira intermedia*:ksi vasta tänä vuonna (Hampson, D. ja La, T. 2006). *B. intermedia*:a on todettu maailmanlaajuisesti ainakin sioissa ja linnuissa. Se on ekonomisesti merkittävä alentuneen munantuotannon ja ripulin aiheuttaja munakanaloissa ja broilereissa. Sioille sen eräät kannat mitä ilmeisimmin aiheuttavat spiroketaaliripulia. Tutkimuksissa *B. intermedia* aiheutti kanoille ulosteiden vesipitoisuuden kasvua, munantuotannon laskua ja kasvun hidastumista. Heikentynyt tuotanto oli keskimäärin 1,4 munaa/lintu vähemmän ja munien paino oli noin 1,16 grammaa vähemmän kuin linnuilla, joilla infektiota ei havaittu (Hampson, D.J. ja McLaren, A.J. 1999). *B. intermedia*:n ei ole havaittu aiheuttavan selkeitä patologisia muutoksia linnuille, joten diagnosointi on tehtävä mikrobiologisten tutkimusten perusteella. Ilmeisen heterogeenisen luonteensa, ja kuten muillakin *Brachyspira*-bakteereilla, anaerobisuutensa ja vaativien kasvuolosuhteidensa takia *B. intermedia*:n diagnosointi on hankalaa. Linnuista eristettyjen *B. intermedia* -kantojen on osoitettu olevan indolipositiivisia eli ne tuottavat indolia tryptofaanista (Hampson, D.J. ja Stanton, T.B. 1997).

1.1.4. *Brachyspira murdochii* ja *innocens*



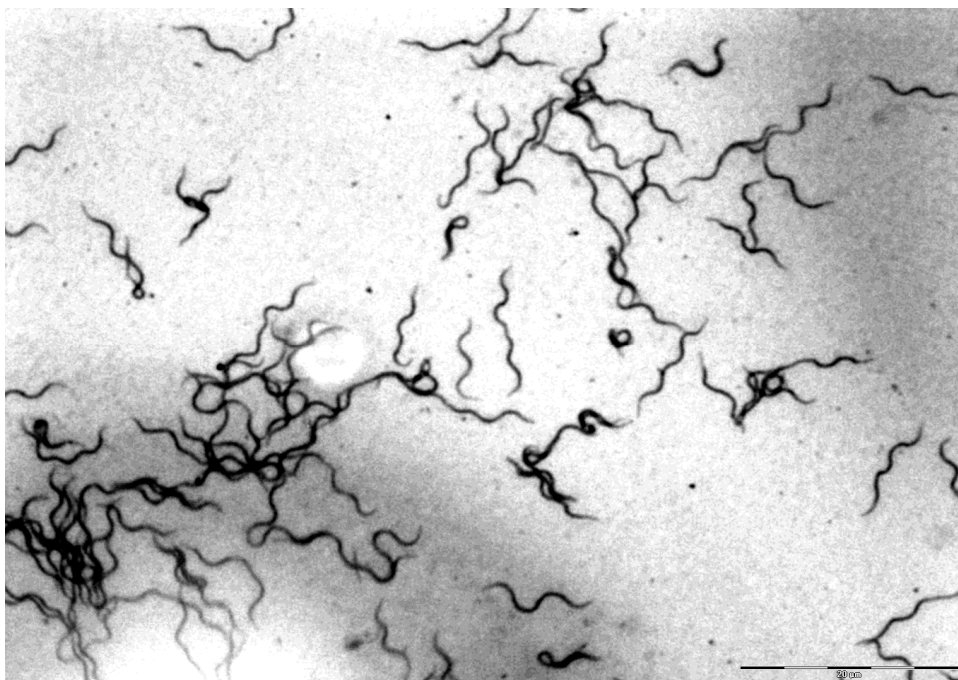
Kuva 3. *B. murdochii*, viitekanta ATCC 700173. Valomikroskooppikuva gram-värjätystä bakteerista. 1000x kokonaissuurennus. (kuva J.Vuorela)



Kuva 4. *B. innocens*, viitekanta ATCC 29796. Valomikroskooppikuva gram-värjätystä bakteerista. 1000x kokonaissuurennus. (kuva J. Vuorela)

Myös *Serpulina murdochii* nimi on ehdotettu muutettavan virallisesti *Brachyspira murdochii*:ksi tänä vuonna (Hampson, D. ja La, T. 2006). *B. murdochii* kuuluu ns. fylogeneettiseen ryhmään III, johon kuuluvat myös *B. innocens*-b ja -c. *B. murdochii* saattaa olla uusimpien tutkimusten mukaan patogeeninen, vaikka *B. innocens* ei ole (Stephens C.P. ym., 2005). Molemmat lajit ovat yleisiä sekä linnuilla että sioilla.

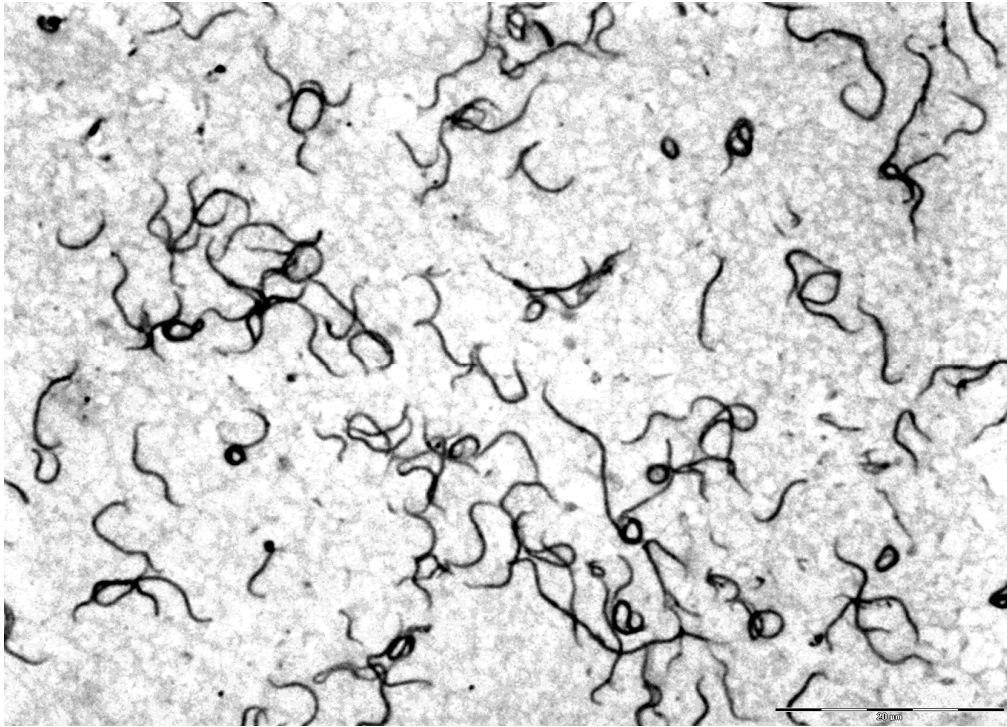
1.1.5. *Brachyspira alvinipulli*



Kuva 5. *B. alvinipulli*, viitekanta ATCC 51933. Valomikroskooppikuva gram-värijätystä bakteerista. 1000x kokonaissuurennus. (kuva J. Vuorela)

B. alvinipulli on heikosti hemolyyttinen, hippuraattia hydrolysoiva ja linnuille patogeeninen laji. Genomin 16S rRNA:n sekvensoinnin perusteella *B. alvinipulli* on erotettu muista *Brachyspira*-bakteereista, vaikka sekvenssi onkin 98-99%:sti samankaltainen muiden *Brachyspira*-lajien kanssa (Stanton, T.B. ym., 1998). *B. alvinipulli*:a on löydetty tarhatuista hanhista ja se aiheutti niille umpisuolentulehdusta sekä patologisia muutoksia munuaisissa (Nemes, C.S. ym., 2006). Tällä hetkellä *B. alvinipulli*:a on löydetty perinteisestä siipikarjasta vain USA:ssa (Hampson, D.J. ja Stephens, C.P. 2002).

1.1.6. *Brachyspira hyodysenteriae*



Kuva 6. *B. hyodysenteriae*, viitekanta ATCC 31212. Valomikroskooppikuva gram-värjätystä bakteerista. 1000x kokonaissuurennus. (kuva J. Vuorela)

B. hyodysenteriae:n genomin koko on noin 3,2 Mbp (Zuerner, R.L. ym., 2004). *B. hyodysenteriae*:n aiheuttama sikadysenteria on vakava sairaus, joka aiheuttaa sioille veristä ripulia, heikkoa kasvua ja voi johtaa jopa kuolemaan. Sikaloissa liikkuvat jyräjät ovat yksi syy *B. hyodysenteriae*:n leviämiseen. *B. hyodysenteriae*:a ei ole löydetty perinteisestä siipikarjasta, mutta Ruotsissa *B. hyodysenteriae* on löydetty villeistä ja tarhatuista sorsista (Jansson, D.S. ym., 2004; Råsbäck, T. ym., 2005). Myös Suomessa havaittu, yksittäinen ankan voimakkaasti hemolysoiva kanta on mahdollisesti *B. hyodysenteriae* (Suullinen tiedonanto M. Fossi, 2006). Tarhatuilla nanduilla, joilla *B. hyodysenteriae* on löydetty, oli kuolleisuus 25-80% (Hampson, D.J. ja Stanton, T.B. 1997).

1.2. Maatalouden näkökulma

Siipikarjaryhmään kuuluvat munituskanalat, broilerit, kalkkunat, hanhet, ankat ja muut maatalouden tuotannossa käytettävät lintueläimet. Suomen osalta siipikarjan terveydentilanne on hyvä, koska eläintauteja on vähän maantieteellisen sijainnin, harvan asutuksen ja tautien erinomaisen ennaltaehkäisyn takia. Hyvästä terveystilanteesta huolehditaan niin terveydellisistä kuin taloudellisistakin syistä.

1.2.1. Luomukanalat

Luomutiloilla kanoja kohdellaan lajinmukaisesti ja luonnonmukaista tuotantoa noudatetaan koko eliniän ajan. Pääperiaatteena on, että kanat saavat luomutilalla toteuttaa lajilleen tyypillistä käyttäytymistä, joten esimerkiksi häkkikanalat ovat kiellettyjä. Luomukanala on lattiakanala, jossa kanat saavat liikkua vapaana ja lattiapinta-alasta vähintään puolet on pehkun ja hiekan tms. peitossa. Luomukanaloissa on myös ikkunat, orret ja virikkeitä kanoille. Kesäaikaan kanoilla on käytössä ulkotarha. Myös kanoille annettu ruoka on luomuviljeltyä. Luonnonmukaisia kananmunia tuotetaan Suomessa 50 tilalla ja niiden määrä tuotannossa on 1,5% (MMM työryhmämuistio 2003:14). Luomukanaloissa on lisääntynyt tautivaara ulostekontaminaatioiden takia ja koska kontaktit villien lintujen kanssa ovat mahdollisia.

1.2.2. Munituskanalat

Suomessa vuonna 2001 munivia kanoja oli 2111 tilalla, joista yli sadan kanan kanatiloja oli alle puolet. Näillä tiloilla oli keskimäärin 3165 kanaa. EU:ssa munia tuotetaan vuosittain 5,6 miljardia kiloa, josta Suomen osuus on 1% (MMM työryhmämuistio 2003:14). Vuonna 2002 Suomessa tuotettiin kananmunia 55 miljoonaa kiloa. Kanojen määrä on viime vuosina laskenut jatkuvasti. Vuonna 2002 kanojen määrä oli 3,2 miljoonaa. Kananmunien vähittäishinta oli noin 2,2 €/kg vuonna 2001. Koska MTT:n selvityksen mukaan kanatilojen lukumäärä vähenee edelleen, on tärkeää, että *Brachyspira*-bakteerit tai mikään muukaan infektio tauti ei alenna kanojen munantuotosta. Useissa maissa todettujen *B. intermedia* ja *B.*

pilosicoli -tartuntojen aiheuttama munantuotannon pienentyminen on 5-10% kannan patogeenisuudesta riippuen. Pohjois-Amerikasta löydetyn *B. alvinipulli*:n vaikutus munantuotantoon oli 5% (Burch, D.G.S. 2005). *Brachyspira*-infektioiden aiheuttamat kustannukset, perustuen 1,5%:iin tuotannosta, olivat tutkimuksen mukaan Englannissa noin 14 miljoonaa puntaa (Burch, D.G. ym., 2006).

1.2.3. Lihasiipikarja

Suomessa lihantuotantoon kasvatettava siipikarja koostuu pääosin broilereista ja kalkkunoista. Vuonna 2004 Suomen tuotanto oli 87 miljoonaa kiloa ja siitä broilerin osuus 71 miljoonaa kiloa. Suurin osa tuotannossa on siis broilereita, kalkkunankasvatustiloja Suomessa on vain noin 90. Broilerin ja kalkkunan kulutus vuonna 2004 oli noin 15 kiloa henkilöä kohti ja suomalaisen broilerintuottajan saama kilohinta oli 1,15 €. (MMM, työryhmämuistio 2004:15) Siipikarjanlihan menekki on kasvanut nopeasti ja kasvun odotetaan jatkuvan.

1.2.4. Riistalinnut

Riistalintujen kasvatusta on yleensä sivuelinkeino. Suomessa yleisin kasvatettu riistalintu on fasaani, mitä näkee nykyään paljon myös luonnonvaraisena. Tarhatuilla riistalinnuilla spirokeetat ovat yleisiä. Ruotsalaisessa tutkimuksessa sorsilta, fasaaneilta ja peltokanoilta spirokeetoja eristettiin 85,4%:lta. Biokemiallisten testien perusteella yleisin laji oli fylogeneettisen ryhmän III *Brachyspira*-bakteerit, mutta myös *B. pilosicoli*:a ja *B. intermedia*:a esiintyi. Tutkimuksessa eristettiin sorsalta myös yksi mahdollinen *B. hyodysenteriae* (Jansson, D.S. ym., 2001).

2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA MERKITYS

Tämän tutkimuksen tavoite oli karakterisoida etenkin munituskanoista, mutta myös muista domestikoiduista linnuista eristettyjä *Brachyspira* -bakteerikantoja. Koko materiaali oli tarkoitus tutkia PCR:llä *B. pilosicoli*:n, *B. intermedia*:n, *B. murdochii*:n ja *B. innocens*:n esiintymisen selvittämiseksi näytteistä. NOX-geeniin pohjautuvat PCR-sovellukset oli tarkoitus optimoida *B. intermedia*:lle, *B. innocens*:lle ja *B. murdochii*:lle. Tarkoitus oli myös arvioida PCR- ja PFGE-tulosten perusteella biokemiallisten testien luotettavuutta lintujen *Brachyspira*-bakteerien tunnistuksessa, koska biokemialliset testit on optimoitu käyttäen sian *Brachyspira*-kantoja.

Pulssikenttägeelelektroforeesilla (PFGE) analysoitujen näytteiden oli tarkoitus myös tuoda selvennystä eri *Brachyspira*-lajien geneettisen diversiteettiin ja vaihteluun samalta tilalta otettujen näytteiden kesken, sekä myös eri tilojen välillä (Phillips, N.D. ym., 2005). Tulokset antavat suuntaviivoja tuleville muille tutkimuksille.

Siipikarjan terveydenhuollon kehittäminen eläinten hyvinvointia ja sen myötä tuotannon taloudellisuutta edistävästi edellyttää uutta tutkimustietoa mahdollisesti haitallisista *Brachyspira*-bakteeritartunnoista. Tutkimuksen erityinen tavoite ja merkitys oli saada varmempi käsitys niiden *Brachyspira*-lajien läsnäolosta, jotka ulkomaisten tutkimusten perusteella ovat linnuille tai jopa ihmisille patogeenisia.

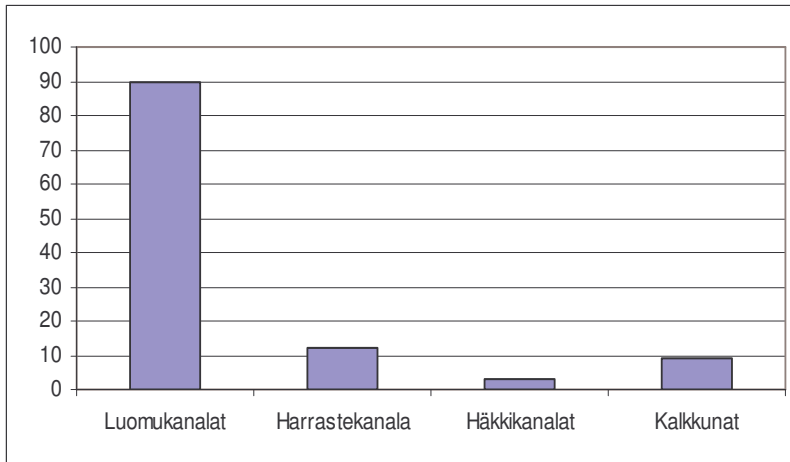
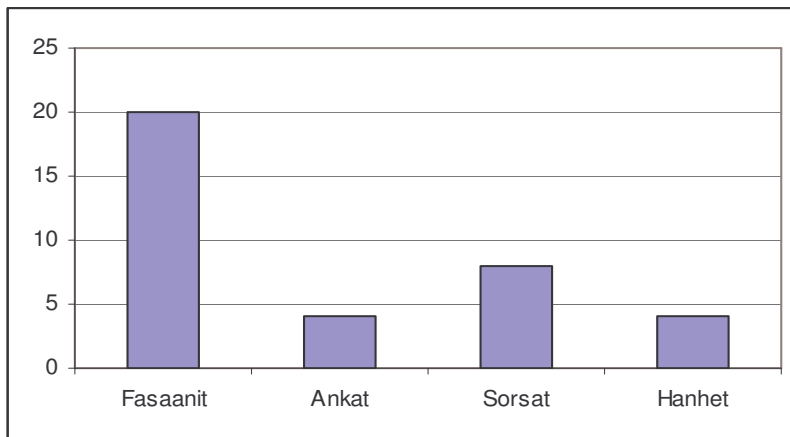
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Brachyspira-bakteereiden lajimäärityksessä käytetään biokemiallisia ja molekulaarisia tunnistusmenetelmiä. Identifiointi on melko haastavaa, eikä lintujen *Brachyspira*-lajeille ole vielä yhtä täysin varmaa menetelmää olemassa. Siksi useamman menetelmän käyttö antaa luotettavamman tuloksen lajista. Myös mikroskooppi on tärkeä *Brachyspira*-bakteerien läsnäoloa selvittäessä.

3.1. Näytteet

Tutkimus tehtiin pääosin Eviran Seinäjoen tutkimusyksikössä, mutta PFGE tutkimus tehtiin Eviran Kuopion tutkimusyksikössä. Vuosina 2002-2005 Seinäjoen ja Helsingin toimipisteisiin oli kerätty siipikarjan uloste- ja suolinäytteitä *Brachyspira*-tutkimukseen luomukanaloista, häkkikanaloista, harrastekanalasta ja kalkkunakasvatuseristä. Näytteitä oli jonkin verran myös tarhutuista riistalinnuista eli fasaaneista, ankoista, sorsista ja hanhista.

Tässä työssä tutkittavien *Brachyspira*-kantojen määrä oli noin 150 kappaletta. Kannat oli valikoitu mahdollisimman edustavasti bakteereiden alustavien kasvuominaisuus- ja biokemiallisten reaktioiden perusteella. Kaavioissa 1. ja 2. on eritelty tässä työssä tutkittujen kantojen määrät eri lintulajeilla ja erityyppisistä kanaloista. Kontrolleina käytettiin ATCC (American Type Culture Collection) viitekantoja *B. intermedia*:lle (ATCC 51140), *B. innocens*:lle (ATCC 29796), *B. murdochii*:lle (ATCC 700173) ja *B. pilosicoli*:lle (ATCC 51139). Näytteitä oli 19 eri tilalta ja osa kanoja koskevista näytteistä oli otettu samalta tilalta kaksi kertaa, puolen vuoden välein. Tiloilla on ollut molemmilla kerroilla sama kanaparvi. Bakteerikannat olivat peräisin tiloilta eri puolilta Suomea ja tarkoitus oli selvittää, mitä *Brachyspira* -lajeja niissä esiintyy. Työn suorituspaikka oli Elintarviketurvallisuusvirasto (Evira), ja ensisijaisesti sen Seinäjoen tutkimusyksikkö, jossa on tutkimukseen tarvittavat laitteet sekä eläinlääkärien erinomainen asiantuntemus siipikarjan tautidiagnostiikasta.

Kaavio 1. Siipikarjalta tutkitut *Brachyspira*-eristyksetKaavio 2. Tarhariaistalinnuilta tutkitut *Brachyspira*-eristykset

3.2. Kasvatusolosuhteet

Brachyspira-bakteerit kasvatettiin BA-3 (*Brachyspira* agar) agarilla, jossa oli lampaan verta sekä kolmea antibioottia inhiboimassa muun kasvun. Toisena kasvatusalustana käytettiin FAA:ta (Fastidious Anaerobe Agar) pääasiassa pakastettujen puhdasviljelmien kasvatukseen, kun tarvittiin suuri määrä bakteerimassaa. Liitteessä 1. on esitetty näiden kasvatusalustojen tarkemmat tiedot sekä BA-3:ssa käytetyt antibiootit. Näiltä maljoilta on hyvä varmistaa aina bakteerien puhtaus gramvärjäyksellä. Kasvatuslämpötilat vaihtelevat 37-43°C:n välillä, mutta kasvu tapahtuu nopeimmin 43°C:ssa. Korkeampi lämpötila inhiboi myös kontaminanttien kasvua. Kasvu-aika vaihtelee kahdesta kymmeneen päivään, joskus

jopa pidempäänkin. Ehdottoman tärkeää on kasvatus anaerobisesti, vaikka aerotolerantteina anaerobeina *Brachyspira*-bakteerit kestävät jonkin verran happea.

3.3. Gramvärjäys

Brachyspira-bakteerit ovat gramnegatiivisia ja spiraalinmuotoisia. Gramvärjäyksessä ne näkyvät yksittäin, kerälle kiertyneenä tai toisiinsa takertuneina. Gramvärjäys on hyvä tapa varmistaa kasvatuksen puhtaus ja *Brachyspira*-bakteerien läsnäolo, koska agarilla olevat pesäkkeet saattavat olla hyvin erinäköisiä. Värjäyksen erottelykyky perustuu grampositiivisten ja gramnegatiivisten solujen soluseinämien rakenne-eroihin. Gramvärjäyksellä on mahdollista myös erottaa alustavasti *B. pilosicoli* pienen kokonsa perusteella muista *Brachyspira*-lajeista. Liitteessä 2. on esitetty gramvärjäyksessä käytetyt reagenssit. *Brachyspira*-bakteerien valokuvaukseen käytettiin Olympus BX61 mikroskooppia (kokonaissuurennus 1000x, öljy-immersio). *Brachyspira*-maljojen puhtauden varmistaminen tapahtui Leican DMLS valomikroskoopilla (kokonaissuurennus 1000x, öljy-immersio).

3.3.1. Gramnegatiiviset solut

Kristallivioletti värjäyksessä gramnegatiiviset solut värjäytyvät ensin violeteiksi, mutta alkoholikäsitteily rikkoo niiden soluseinää liuottamalla sen lipidejä. Siksi kristallivioletti-jodi-kompleksi pääsee värjäyksen seuraavassa vaiheessa huuhtoutumaan ulos soluista. Kristallivioletti ja Lugolin-liuoksen jodi reagoivat tuottaen kompleksin. Alkoholikäsitteily kutistaa grampositiivisten solujen peptidoglykaanisoluseinämät ja estää kristallivioletti-jodi-kompleksia huuhtoutumasta ulos solusta. Viimeinen safraniinikäsitteily värjää gramnegatiiviset solut vaaleanpunaisiksi, jollaisina ne näkyvät mikroskoopissakin, kun taas grampositiiviset solut näkyvät sinisinä.

3.4. Biokemialliset testit

Biokemialliset testit antavat alustavaa tietoa mikä *Brachyspira* –laji saattaa olla kyseessä (Stanton, T.B. ym., 1997). Polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla saadaan kuitenkin tarkemmin identifioitua *Brachyspira*-lajit: *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. murdochii*, ja *B. innocens*.

Brachyspira-lajeja pyritään erottelemaan biokemiallisilla testeillä, joihin kuuluvat: β -hemolyysin voimakkuus, indolireaktio, hippuraatin hydrolyysi ja glukosidaasi-entsyymien aktiivisuus. β -hemolyysi nähdään veriagarilta ja osalla se on voimakasta (*B. hyodysenteriae*) ja osalla heikompaa (esimerkiksi *B. intermedia*). β -hemolyysissä bakteerit hajottavat veren punasolut saaden aikaan kirkkaan, läpikuultavan alueen pesäkkeiden ympärille. Nopeassa indolinmuodostus testissä bakteerimassaa otettiin suoraan maljalta imupaperille, joka oli kyllästetty indoli-spot –reagenssiluoksella. Tietyt bakteerit hajottavat tryptofaanin indoliksi ja tulos nähdään värireaktiona. Värireaktio tapahtui nopeasti (<30 sekuntia). Positiivinen tulos oli sinivihreä väri ja negatiivinen oli vaaleanpunainen. Hippuraatin hydrolyysissä muodostuu glysiiniä, joka havaitaan ninhydriinin lisäyksen jälkeen voimakkaana mustansinisenä värinä (ei läpikuultava). Negatiivinen tulos on väritön tai vaalean sinivioletti. Glukosidaasi entsyymien testaus tapahtui Rosco®:n kiekkoilla. Glukosidaasi-entsyymeihin kuuluvat α -galaktosidaasi, β -galaktosidaasi, β -glukuroni, α -glukosidaasi ja β -glukosidaasi. Testi perustuu bakteerien entsyymiaktiivisuuteen tai sen puutteeseen. Taulukossa 1. on eri lajien biokemiallinen käyttäytyminen. Liitteessä 2. on esitetty biokemiallisissa testeissä käytetyt reagenssit.

Taulukko 1. *Brachyspira*-lajien biokemiallinen käyttäytyminen

LAJI	Biokemialliset testit							
	β -hemo-lyysi	Indoli	Hippuraatin hydrolyysi	α -galakto-sidaasi	β -galakto-sidaasi	β -glukuroni	α -glukosi-daasi	β -glukosi-daasi
<i>B. hyodysenteriae</i>	+	+/-	-	-	+	-	+/-	+
<i>B. intermedia</i>	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>B. murdochii</i> (IIIa)	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>B. innocens</i> (IIIb)	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>B. innocens</i> (IIIc)	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>B. pilosicoli</i>	-	-	+/-	+/-	+	-	-	-
<i>B. alvinipulli</i>	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>B. aalborgi</i>	-	ND	ND	-	ND	ND	-	-
<i>B. "canis"</i>	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>B. "pulli"</i>	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND=ei määritetty (engl. not determined)

3.5. Polymeraasiketjureaktio

Mikrobien viljely sekä biokemialliset ja immunologiset tunnistusmenetelmät ovat ensisijaisesti käytössä mikrobiologisessa diagnostiikassa. On jo nähtävissä, että hitaasti kasvavien tai vaikeasti viljeltävien mikrobien tunnistaminen tulee olemaan PCR-diagnostiikan kehitysalue. PCR:llä voidaan lyhyessä ajassa valmistaa halutusta DNA-molekyylin pätkästä miljoonia kopioita.

PCR on menetelmä, jossa kolmivaiheisessa reaktiossa käytetään hyväksi DNA-polymeraasientsyymiä ja kahta oligonukleotidialuketta kohteena olevan DNA-fragmentin eksponentiaaliseen monistukseen. Polymeraasiketjureaktio koostuu sykleistä (yleensä 20-40 sykliä), joissa on kolme perusvaihetta: (1) kaksijuosteisen DNA:n denaturaatio, (2) oligonukleotidialukkeiden pariutuminen kohde-DNA:n kanssa ja (3) nukleinihapposäikeen synteesi. Ensimmäisessä vaiheessa tutkittava näyte denaturoidaan korkeassa lämpötilassa, jotta kaksoiskierteisen DNA:n vastakkaiset säikeet saadaan irti toisistaan. Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan, jolloin kohde-DNA:n juosteet pariutuvat valittuihin alukkeisiin. Kolmannessa vaiheessa syntetisoidaan DNA-polymeraasin katalysoimassa reaktiossa uusi

DNA-säie alukkeen ohjaamasta paikasta. Alukkeet ovat komplementaarisia kohde-DNA:n kummallekin päälle, joten reaktiossa syntetisoidaan kopio molemmista DNA-säikeistä. Syntyneet kopiot toimivat seuraavien syklien templaattina.

16S ja 23S rDNA ovat kaikista bakteereista löytyviä geenejä, jotka ovat sangen konservoituneita. Niitä käytetään hyvin yleisesti mikrobiekologisissa ja fylogeneettisissa tutkimuksissa. Vähemmän konservoitunut NADH-oksidaasi eli NOX-geeni oli PCR:lle parempi vaihtoehto useiden *Brachyspira*-lajien identifiointiin. NOX-geenipohjaisia PCR-sovelluksia on optimoitu sioista otetuista *Brachyspira*-näytteistä (Weissenböck, H. ym., 2005).

Kantojen karakterisoinnissa käytettiin kuutta eri PCR-sovellusta, joista kolme optimoitiin uusina sovelluksina. *B. intermedia*:lle optimoitiin PCR-sovellus, jossa se tunnistettiin NOX-geenin sekvenssin perusteella. Aiemmin käytetty PCR-sovellus, joka perustui 23S rDNA sekvenssiin, ei ole ilmeisesti tarpeeksi spesifinen lintujen *B. intermedia*:n erottamiseksi (Suriyaarachichi, D.S. ym., 2000). Myös *B. murdochii*:lle ja *B. innocens*:lle optimoitiin uudet PCR-sovellukset, jotka perustuivat NOX-geenin sekvensseihin. Aiemmin käytetty PCR-menetelmä (NOX4) tunnisti molemmat erottelematta niitä (Atyeo, R.F. ym., 1999), joten uusien NOX-sovellusten on tarkoitus olla spesifisiä vain joko *B. murdochii*:lle tai *B. innocens*:lle. *B. murdochii* ja *B. innocens* kuuluvat samaan fylogeneettiseen ryhmään (III a-c) ja aikaisemmin molempia on pidetty ei-patogeenisina. Nyt on kuitenkin alettu epäillä, että *B. murdochii* saattaa sittenkin olla patogeeninen (Weissenböck, H. ym., 2005), joten siksi on tärkeää saada näytteistä erotettua *B. murdochii* *B. innocens*:sta.

3.5.1. Alukkeet

Onnistuneen PCR-reaktion tärkein edellytys on kohde-DNA:n ja sitä vastaavien alukkeiden oikea valinta. Alukkeiden pituus ja sekvenssit ovat tärkeitä tekijöitä PCR:ssä ja ne tulisikin suunnitella hyvin. Käytettävien alukkeiden emäsjärjestykset eivät saa olla edes osin toisilleen käänteisiä. Periaatteessa emäskoostumuksessa G + C suhteen tulee olla noin 40-60%. Aluke ei saa muodostaa stabiilia sekundaarirakennetta ja pitkiä polypuriini- ja polypyrimidiinijaksoja tulee välttää. Alukkeiden kiinnittymislämpötila voidaan laskea

kaavalla: $T_m = 4(nG+nC) + 2(nA+nT)^{\circ}C$. Nykyään alukkeiden suunnittelua helpottavat erilaiset tietokoneohjelmat. Alukkeet kiinnittyvät yleensä nopeasti, noin 30 sekunnissa. Yli 17 emäksen alukkeet ovat hyvin sekvenssi-spesifisiä. Tässä työssä käytetyt alukkeet on esitetty liitteessä 3. Alukkeet liuotettiin valmistajan (Oligomer) ohjeen mukaan veteen ja lopullinen käyttökonsentraatio oli 10 μ M.

3.5.2. 23S rDNA-geeniin perustuva PCR-sovellus *B. intermedia*:lle

B. intermedia:n identifiointiin käytettiin 23S rDNA-sovellusta. Koko aineisto tutkittiin tällä ja uudella NOX-geeniin perustuvalla sovelluksella, jotta tuloksia voitiin vertailla. 23S-sovelluksen reaktioseokseen (kokonaistilavuus 25 μ l) tuli yhtä näytettä kohden 1x PCR puskuria (DyNAzyme™ II DNA polymerase puskuri: 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl and 0.1 % Triton X-100), 0,2 mM dNTP:tä, 0,4 U DyNAzyme™ II DNA polymeraasia (2U/ μ l), 1,5 μ M S-II_f sekä 1,5 μ M S-II_r aluketta (Leser, T.D. ym., 1997). Tähän lisättiin templaatti, joka otettiin suoraan maljalta puutikulla.

3.5.3 23S rDNA-geeniin perustuva PCR-sovellus *B. pilosicoli*:lle

B. pilosicoli:n identifiointiin 23S-sovellus on hyvä sekä sioille että linnuille. Reaktioseos on samanlainen kuin *B. intermedia*:n 23S sovelluksessa edellisessä kappaleessa, mutta alukkeina käytettiin *B. pilosicoli*:n 1,5 μ M S-IV_f ja 1,5 μ M S-IV_r alukkeita (Leser, T.D. ym., 1997). Templaatti lisättiin reaktioseokseen myös suoraan maljalta puutikulla.

3.5.4. NOX4 PCR-sovellus *B. murdochii*:lle ja *B. innocens*:lle

NOX4 PCR-sovelluksessa monistetetaan osa NOX-geeniä, joka on sama *B. murdochii*:lla ja *B. innocens*:lla. Tämä sovellus ei erota näitä kahta lajia toisistaan. NOX4-sovellus on spesifinen ja toimii hyvin sikojen ja lintujen näytteillä. Reaktioseokseen (kokonaistilavuus 25 μ l) tuli yhtä näytettä kohden: 1xPCR puskuria (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 1,5

mM MgCl₂:a, 0,2 mM dNTP:tä, 0,5 U *Taq* DNA polymeraasia (5U/μl) ja 0,75 μM SINNF aluketta sekä 0,75 μM SINNR aluketta (Atyeo, R.F. ym., 1999). Templaatti lisättiin tässäkin puutikulla suoraan maljalta.

3.5.5. NOX-geeniin perustuvat PCR-sovellukset *B. murdochii*:lle ja *B. innocens*:lle

Templaatti otettiin ilman DNA eristystä aluksi suoraan agarilta puutikun päällä varovasti, mutta parempi tapa oli siirtää bakteerimassaa noin pesäkkeen verran 50μl:aan vettä ja ottaa siitä 2μl reaktioseokseen. Bakteerimassan määrän arviointi oli vaikeaa, koska suurin osa bakteereista kasvoi ohuena mattana agarin pinnalla. Vain muutamat kannat tekivät selviä pesäkkeitä, jotka oli helppo ottaa puutikulla. Tässä työssä käytettiin reaktioseosta (kokonaistilavuus 25μl), jossa oli yhtä näytettä kohden 1xPCR Buffer:a (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂:a, 0,2mM dNTP:tä, 0,5U *Taq* DNA polymeraasia ja 0,2 μM sekä F- että R-aluketta (Weissenböck, H. ym., 2005).

3.5.6. NOX-geeniin perustuva PCR-sovellus *B. intermedia*:lle

NOX-geeniin perustuva PCR on todettu hyväksi myös kanojen *B. intermedia*:lle. Siitä saatava tuote on 567bp pitkä väliltä 517 ja 1083 NADH-oksidaasi geeniä. Geeni löytyy GenBank:sta tunnistenumeraalla AF060812. Samassa tutkimuksessa kaikki indoliposiitiviset näytteet olivat positiivisia myös *B. intermedia*:lle PCR:llä (Phillips, N.D. ym., 2005). 23S geeniin perustuva PCR ei ole kovin spesifinen *B. intermedia*:lle, koska se antaa helposti vääriä positiivisia tuloksia (Suriyaarachchi D.S. ym., 2000). Tässä työssä käytettiin reaktioseosta (kokonaistilavuus 25μl), jossa oli yhtä näytettä kohden 1xPCR Buffer:a (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 1,5 mM MgCl₂:a, 0,2mM dNTP:tä, 0,5U *Taq* DNA polymeraasia ja 0,5μM sekä F- että R- aluketta. Templaatti lisättiin kuten *B. innocens*:lla ja *B. murdochii*:lla edellisessä kappaleessa.

3.5.7. PCR-valmisteet

Brachyspira-bakteerien NOX-geeniin perustuvassa identifiointi-PCR:ssä käytettiin entsyyminä Platinum® *Taq* DNA polymerase -valmistetta (Invitrogen). Siihen kuuluivat valmis 10xPCR puskuri ja MgCl₂. DyNAzyme™ II DNA Polymerase -valmistetta (Finnzymes) käytettiin *B. intermedia*:n ja *B. pilosicoli*:n 23S geeniä monistettaessa. Lisäksi tarvittiin valmis seos kaikkia neljää nukleotidia (Finnzymes).

3.5.8. PCR reaktio-olosuhteet

Sekvenssien monistuksessa käytettiin PCR-laitetta (MJ Research, PTC-200), johon oli ohjelmoitu ohjelmat kullekin bakteerilajille (taulukko 2.).

Taulukko 2. PCR-ohjelmat ja PCR-tuotteiden pituudet eri *Brachyspira*-lajeille

Laji, geeni ja tunniste GenBank:ssa	Aloitus		Denaturaatio		Annealing		Renaturaatio		Lopetus		syklit	tuote/ bp
	°C	aika/ minuuttia	°C	aika/ sekuntia	°C	aika/ sekuntia	°C	aika/ minuuttia	°C	aika/ minuuttia		
<i>B. intermedia</i> NOX AF060812	95	5	94	30	55	30	72	1	72	10	38	567
<i>B. innocens</i> NOX AF060804	95	5	94	30	57	30	72	1	72	10	36	249
<i>B. murdochii</i> NOX AF060813	95	5	94	30	55	30	72	1	72	10	39	260
<i>B. intermedia</i> 23S U72700	94	1	92	40	60	40	75	1	75	5	37	1027
<i>B. murd/inno</i> NOX4 AF060813	95	1	95	30	46	60	72	2	72	10	32	149
<i>B. pilosicoli</i> 23S U72703	94	1	92	40	45	40	75	1	75	5	35	729

3.6. Agarosigeelielektroforeesi

PCR:ssä syntyneet tuotteet analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla. Monistetut tuotteet saatiin erotettua kokonsa perusteella, ja niiden visualisointi tapahtui suoraan geeliltä. DNA:n visualisoimiseksi geeliin oli lisätty etidiumbromidia (Amresco). Elektroforeesin jälkeen geeliä tarkasteltiin UV-valossa, jossa DNA-etidiumbromidikompleksit näkyvät juovina. Monistettu DNA voidaan myös sekvensoida.

Geelin valmistukseen käytettiin SeaKem LE agarose:a (Cambrex), joka liuotettiin Sigman TAE-puskuriin (0,4M Tris-Acetate, 0,01M EDTA). *B. pilosicoli*:n PCR-tuotteille valmistettiin 2% geeli, *B. intermedia*:n 23S PCR-tuotteille 1% ja kaikille NOX-geeni – pohjaisille PCR-tuotteille 1,5% geeli. Agarosia ja TAE-puskuria keitettiin kunnes agarosia oli liuennut ja sitten lisättiin etidiumbromidi. Sen jälkeen geeli valettiin ajokelkkaan, jossa oli kampa näytekaivoja varten. Ennen näytteiden pipetoimista geelille niihin lisättiin latauspuskuri (Invitrogen, 10xBlue Juice). Markkerina käytettiin PCR 100bp Low Ladder:a (Sigma), joka näyttää kymmenen fragmenttia välillä 100 ja 1000bp eli 100bp:n välein. Elektroforeesi tapahtui horisontaalisesti Wealtec:n Elite 300 Plus -laitteella. NOX-geeneille sekä *B. intermedia*:n 23S ja *B. pilosicoli*:n 23S geenisekvensseille elektroforeesi aika oli 45 minuuttia ja jännite 100 voltia ja NOX4:lle 60V/50 minuuttia. Elektroforeesin päätyttyä geelit kuvattiin Olympus-kameralla Alpha Innotech:n kuvauskammiossa, jolloin UV-valoa käyttämällä positiiviset näytteet saatiin näkyviin. Alpha Digi Doc -tietokoneohjelmalla kuvaa voitiin käsitellä ja tulostaa. Liitteessä 5. on esimerkkinä kaksi agarosielektroforeesi kuvaa.

3.7. Pulssikenttägeelielektroforeesi

Yhteensä noin 85 kotimaisen kannan ja ulkomaisen viitekannan genotyyppejä arvioitiin pulssikenttägeelielektroforeesilla. Vertailemalla genotyyppejä PCR-tuloksiin ja biokemiallisiin tuloksiin voitiin arvioida suomalaisten *Brachyspira*-kantojen todennäköistä lajia ja liittyvätkö tietyt *Brachyspira*-lajit lintujen tai siipikarjan kasvatustapoihin. PFGE-

analyysin perusteella varsinkin *B. intermedia*:n heterogeenisyyttä on helpompi tutkia. Lisäksi voitiin tunnistaa ilmeiset useamman lajin sekakasvut.

PFGE:n avulla voidaan erotella kooltaan suuria bakteerien kromosomipalasia. Tärkeimmät asiat PFGE:n onnistumisen kannalta ovat DNA-näytteiden valmistus ja elektroforeesiolosuhteet. Bakteerin kromosomi täytyy eristää ja pilkkoa se restriktioentsyymillä. Myös DNA pitoisuuden pitää olla oikea, koska liian pieni määrä ei tuota tulosta ja liian suuri pitoisuus aiheuttaa DNA-vyöhykkeeseen epäselvyyttä ja vääristymistä. Restriktioentsyymi valitaan siten, että DNA-fragmenteja on sopiva määrä (10-30) ja niistä saadaan hyvä kokojakautuma. Jos DNA:n pilkkominen on epätäydellistä, on tuloksena suuri fragmentti geelin yläosassa. Onnistuneessa analyysissä kromosomaalinen DNA eristetään ja suojataan mekaaniselta ja entsyymiselta hajoamiselta. Tämä onnistuu suojaamalla solut agarosigeelillä. Kuitenkin yksi suurimmista ongelmista on organismien nukleaasiaktiivisuus, joka saattaa tuhota kaikki näytteen DNA-fragmentit. Useimmiten tämän ongelman voi ratkaista lisäämällä thioureaa ajopuskuriin puhdistamaan siitä Tris-radikaalit, jotka saavat tämän tuhon aikaan.

Valitut kannat tutkittiin pulssikenttägeelielektroforeesilla Eviran Kuopion tutkimusyksikössä, jossa analyysit teki pääosin laborantti Riikka Luukkanen. PFGE-analyysi on monivaiheinen ja kestää noin viisi päivää. Aluksi bakteerimassaa siirrostettiin 2 ml:aan TEN-pesupuskuria (200mM NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA) ja solut kerättiin putken pohjaan (+4°C:ssa 3000 rpm, 10 min). Pesu tehtiin kahteen kertaan, jonka jälkeen pelletti suspensoitiin 250 µl:aan pesupuskuria ja 400 µg proteinaasi K:ta, joka hajottaa proteiinit ja lämmitettiin hetki 37 °C:ssa. Näytteisiin lisättiin sulaa 1%:sta SeaKem Gold – agarosia (Cambrix) ja ne valettiin muotteihin, jotka siirrettiin jähmettymistä varten jääkaappiin. Agarosipalat siirrettiin proteinaasi K –liuokseen, jossa oli 0,5M EDTA, 1% Na-lauroyyylisarkosiinia ja 1,5 mg/ml proteinaasi K:ta näytettä kohden. Näytteitä inkuboitiin +50°C vesihauteessa yön yli. Seuraavana päivänä sama liuos tehtiin uudelleen ja palat siirrettiin vielä seuraavaksi yöksi hauteeseen. Dialyysivaiheessa agarosipalat olivat 2-3 vuorokautta TEN-puskuriliuoksessa ja puskuriliuos vaihdettiin vähintään kerran. Proteinaasi K ja muut bakteerisolujen hajotustuotteet poistettiin TEN-puskurilla. Proteinaasi K estää restriktioentsyymin toimintaa ja siksi huolellinen pesu ennen entsyymin lisäystä on tarpeen. Sen jälkeen tehtiin pre-restriktio +37°C:ssa 10%:lla NEB3 –puskurilla (BioLabs) 5-10 minuuttia. Varsinainen restriktio-liuos (200 µl) sisälsi 10% NEB3-puskuria ja 30U *MluI* –

restriktioentsyymiä (BioLabs). Inkubointi tapahtui yön yli +37°C:ssa. Reaktio pysäytettiin EDTA:lla. Sen jälkeen näytepalat siirrettiin agarosigeelille (1%), jossa oli myös päällysgeeli (1%). Restriktioentsyymi pilkkoo DNA:n sille ominaisista tunnustusalueista ja näin saatiin sopivan kokoiset DNA-fragmentit, jotka visualisoitiin kuten PCR:ssäkin. Ajopuskurina käytettiin 0,5xTBE-liuosta (45mM Tris, 45mM boraatti, 10mM EDTA). PFGE:n ajoparametrit ja restriktioentsyymien tunnustusalue ovat liitteessä 4. Liitteessä 6. on esimerkkinä kaksi kuvaa PFGE-analyysistä.

Useat asiat, kuten agarosityyppi ja agarosikonsentraatio, geelin tiheys, puskurin valinta ja sähkökentän voimakkuus vaikuttavat PFGE:n onnistumiseen. Nykyään nämä parametrit on pääosin standardoitu. Agarosigeelin pitoisuus on 0,8-1,0% ja puskurina 0,5x tris-boraatti-EDTA puskurin. Orientoitumiskulmana käytetään pääosin 120° ja jännitteenä 6V/cm. PFGE-ajossa on tärkeää olla mukana kokostandardi, jonka fragmenttien koot ovat tiedossa. Sen avulla voidaan arvioida näytteen fragmenttien koot (Goering, R.V. 2003). Tässä työssä käytettiin MidRange II –PFGmarkkeria (BioLabs), jonka kevein fragmentti on 48,5 kb ja seuraavat ovat sen moninkertoja (97kb, 145,5kb jne.). Elektroforesilaitteena oli BioRad Chef-DR® III System sekä BioRad Cooling Module.

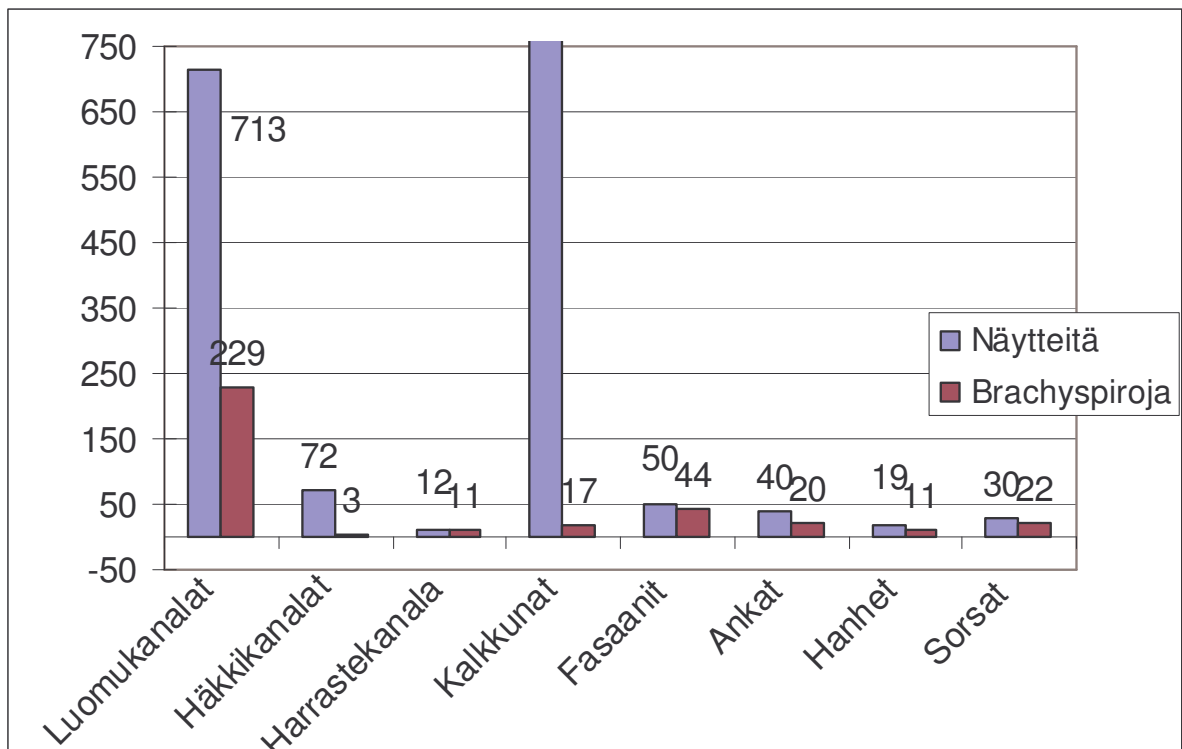
PFGE:lla arvoidaan infektion aiheuttajan eri eristysten välisiä suhteita. PFGE:n avulla pyritään vertailemaan eristyksiä kromosomaalisen samankaltaisuuden perusteella. Varsinkin kun tutkitaan suurempia populaatioita, tarvitaan tietokoneanalyysia (Goering, R.V. 2003). Tässä työssä käytetty tietokoneohjelma, jolla pulssikenttä kuvia analysoitiin, oli BioNumerics.

PFGE-näytteiden tulkinnassa tulee ymmärtää mahdollisten geneettisten tapahtumien aiheuttamat muutokset DNA:han. Erilaisten mutaatioiden mahdollisuus kasvaa useiden siirrostusten jälkeen, näytteiden ottokertojen välillä ja bakteerin siirtyessä eläimestä toiseen. PFGE-kuvien tulkinnassa on neljä kategoriaa, joiden mukaan näytteet ovat identtisiä, läheistä sukua, mahdollisesti sukua tai ei-sukua (Tenover, F.C. ym., 1995). Tämä tulkinta on tiukka eikä sovellu suurten populaatioiden tutkimiseen, jotka on kerätty pitkän ajan kuluessa, koska sama kanta saattaa muuttua pitkän ajan kuluessa.

4. TULOKSET

Kaaviossa 3. on esitetty erikseen lajikohtaisesti kokonaisnäytemäärät ja niistä positiivisten *Brachyspira*-bakteerien määrä. Kuten kaaviosta 3. nähdään, kalkkunoista (kokonaisnäytemäärä oli 1248) löydettyjen positiivisten *Brachyspira*-kantojen määrä oli alhaisin, noin 1%. Häkkikanaloiden näytteistä löydettyjen *Brachyspira*-kantojen määrä oli 4% ja luomukanaloista 32%. Harrastekanalasta kerätyistä näytteistä jopa 92%:ssa todettiin olevan *Brachyspira*-bakteereja. Vastaavat määrät fasaaneilla oli 88%, ankoilla 50%, hanhilla 58% ja sorsilla 73%. Tässä on laskettu kaikki mahdolliset positiiviset *Brachyspira*-näytteet, vaikka niiden lajien identifiointia ei olisi pystytty tekemään.

Kaavio 3. *Brachyspira*-bakteereiden osuus kokonaisnäytemääristä lajikohtaisesti. Kalkkunoiden näytemäärä oli 1248, mikä ei kuvassa näy.



4.1. *Brachyspira*-bakteerien pituudet

Brachyspira-bakteerien pituudet mitattiin mikroskooppikuvista. Keskiarvoon otettiin 20 tulosta ja jokaisen bakteerin pituudelle laskettiin myös luottamusväli. Tulokset mittauksista on esitetty taulukossa 3. *B. alvinipulli* todettiin pisimmäksi kun taas *B. pilosicoli* oli odotetusti lyhin. Mittausta tehtäessä ei voitu huomioida *Brachyspira*-bakteerien aaltomaista muotoa, vaan mittaus tehtiin suoraviivaisesti jokaiselle bakteerille päästä päähän.

Taulukko 3. Eri *Brachyspira*-bakteerilajien pituudet

	Ka pituus μm	+/-
<i>B. alvinipulli</i>	9,9	0,7
<i>B. intermedia</i>	9	0,6
<i>B. innocens</i>	8,9	0,3
<i>B. hyodysenteriae</i>	8,7	0,5
<i>B. murdochii</i>	6,3	0,3
<i>B. pilosicoli</i>	4,1	0,3

4.2. Biokemialliset testit

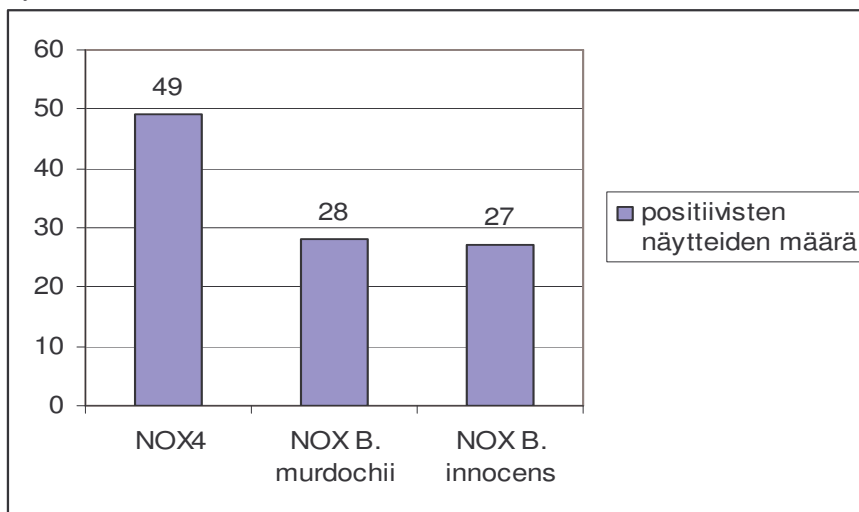
Biokemiallisia testejä oli tehty osalle näytteistä myös Helsingissä. Seinäjoen ja Helsingin tuloksissa oli jonkin verran eroja. Tulosten tulkinnassa saattaa olla jonkin verran eroja riippuen tulkitsijasta. Glykosidaasi-entsyymien testeissä vaaleankeltainen väri saattaa aiheuttaa hämmennystä joissain tapauksissa, onko se sitten keltainen vai valkoinen. Myös indolitestin tekeminen ja tulkinta vaativat harjoittelua. Biokemialliset testit eivät antaneet kovin luotettavaa tulosta lajien tunnistukseen, mutta ne ovat kuitenkin hyödyllisiä alustavien tietojen takia. Suurin merkitys oli indolituloksella ja hippuraattituloksella.

4.3. NOX-geeniin perustuvat PCR-sovellukset *B. innocens*:lle ja *B. murdochii*:lle

Näytteille, joille NOX4-PCR oli antanut positiiviset tulokset, saatiin pääosin myös NOX-pohjainen positiivinen tulos joko *B. innocens*:lle tai *B. murdochii*:lle. Koko aineistossa

NOX4 positiivisia tuloksia oli 49 kappaletta ja positiivisen tuloksen antoi joko *B. innocens*:lle tai *B. murdochii*:lle 51 kappaletta. Aineistossa oli yksi positiivinen *B. murdochii* tulos, joka oli NOX4-PCR:llä negatiivinen ja yksi positiivinen *B. innocens*, joka oli NOX4-PCR:llä negatiivinen. Neljä näytettä antoi positiivisen tuloksen molemmille, *B. innocens*:lle ja *B. murdochii*:lle. Näissä näytteissä saattaa olla myös näiden lajien sekakasvua. Kaaviossa 4. on esitetty *B. innocens*:n ja *B. murdochii*:n positiivisten NOX-PCR -tulosten tasainen jakautuminen sekä NOX4-PCR:llä saatujen positiivisten tulosten määrä. Kaaviossa on huomioitu myös näytteet, jotka olivat positiivisia molemmille.

Kaavio 4. Positiivisten näytteiden määrät NOX-PCR:llä *B. innocens*:lle ja *B. murdochii*:lle sekä positiivisten näytteiden määrät NOX4:llä.



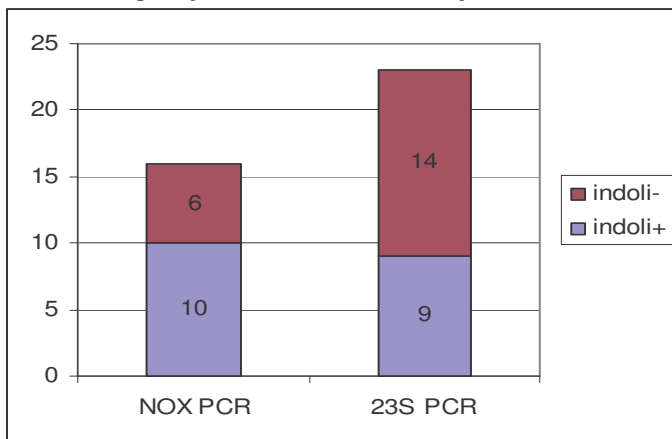
4.4. NOX-geeniin perustuva PCR-sovellus *B. intermedia*:lle

B. intermedia:lle optimoitiin myös NOX-geenipohjainen PCR-sovellus, koska 23S geenin sekvenssiin perustuva PCR näyttäisi olevan epäspesifinen lintujen *Brachyspira*-bakteereille. Koko aineisto testattiin molemmilla sovelluksilla ja hajonta on melkoinen. 23S-menetelmällä positiivisia tuloksia oli 35 kappaletta, kun taas NOX-sovelluksella positiivisia oli selvästi vähemmän, 19 kappaletta. Kahdeksan näytettä, jotka olivat positiivisia NOX-sovellukselle, olivat negatiivisia 23S sovellukselle. Vastaavasti 24 näytettä, jotka olivat positiivisia 23S sovelluksella, olivat negatiivisia NOX-sovelluksella. Näytteistä vain 10 kappaletta oli positiivisia molemmille sovelluksille. Varmimpina *B. intermedia* -kantoina

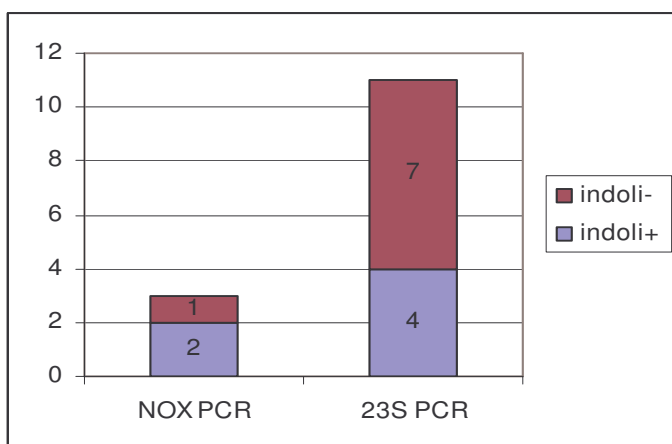
voidaan pitää sellaisia kantoja, joissa molemmat PCR-sovellukset ja biokemialliset testit antoivat positiivisen tuloksen. Näitä oli koko aineistossa vain kuusi kappaletta.

B. intermedia:n NOX-geeniin perustuvista positiivisista PCR-tuloksista indoliposiitivisia oli siipikarjassa 63%, kun tarhariistalinnuilla vastaava luku oli 67%. PCR:llä 23S geeniin perustuvista positiivisista *B. intermedia* -bakteereista oli indoliposiitivisia siipikarjassa 39% ja tarhariistalinnuilla 36%. Eli NOX-geeniin perustuvat PCR-tulokset korreloivat paremmin *B. intermedia*:lle tyypillisen indoliposiitivisuuden kanssa. Kaavioissa 5. ja 6. on esitetty nämä tulokset. Kumpikaan PCR-menetelmä ei ollut kovin hyvä *B. intermedia*:lle, mikä saattaa nimenomaan johtua kyseisen bakteerin heterogeenisestä luonteesta.

Kaavio 5. Siipikarjan *B. intermedia*:n 23S- ja NOX-PCR -sovellusten vertailu indoliposiitivisuuden kanssa



Kaavio 6. Tarhariistalintujen *B. intermedia*:n 23S- ja NOX-PCR -sovellusten vertailu indoliposiitivisuuden kanssa



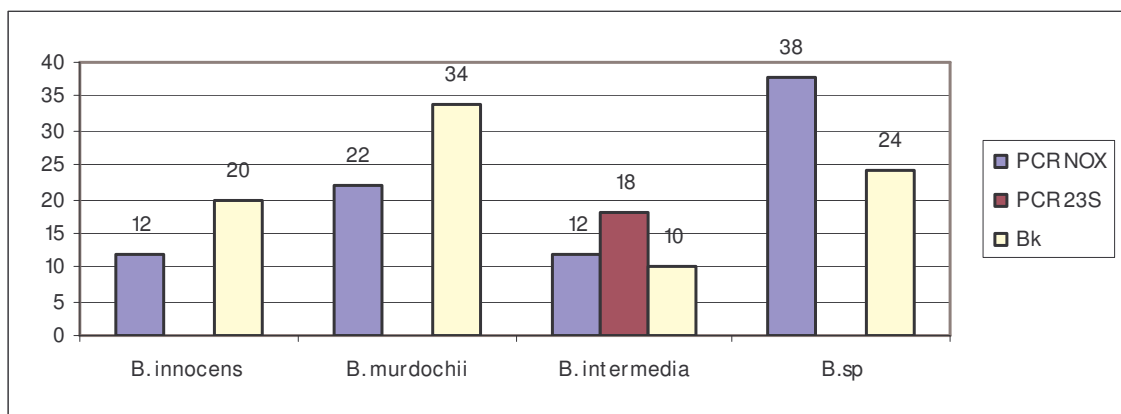
4.5. Biokemiallisten testien ja PCR:n tulosten vertailu lajikohtaisesti

Kaavioissa 7-14 on vertailtu biokemiallisia ja PCR tuloksia keskenään eri lajeilla. Näissä kaavioissa Bk tarkoittaa biokemiallisten testien perusteella tehtyä tunnistusta. PCR NOX –palkki näyttää NOX-geeniin perustuvan PCR:n positiiviset tulokset eli *B. murdochii*:lle, *B. innocens*:lle ja *B. intermedia*:lle. PCR 23S –palkki näyttää PCR-positiiviset tulokset *B. pilosicoli*:lle tai *B. intermedia*:lle 23S geeniä käyttämällä. B. sp merkintä tarkoittaa *Brachyspira*-lajeja, joita ei pystytty identifioimaan näillä menetelmillä.

4.5.1. Luomukanalat

Luomukanalanäytteitä oli tässä työssä eniten. Kaaviossa 7. on esitetty *Brachyspira*-lajit PCR:n ja biokemiallisten testien perusteella. PCR:llä tuloksista suurin osa oli käytettävillä menetelmillä negatiivisia eli lajia ei pystytty määrittämään. Näytteistä löytyi kuitenkin *B. innocens*:a, *B. murdochii*:ta ja *B. intermedia*:a. Biokemiallisten testien perusteella *B. innocens*:a ja *B. murdochii*:ta olisi enemmänkin, mutta *B. intermedia*:a tunnistettiin vähemmän kuin PCR:llä.

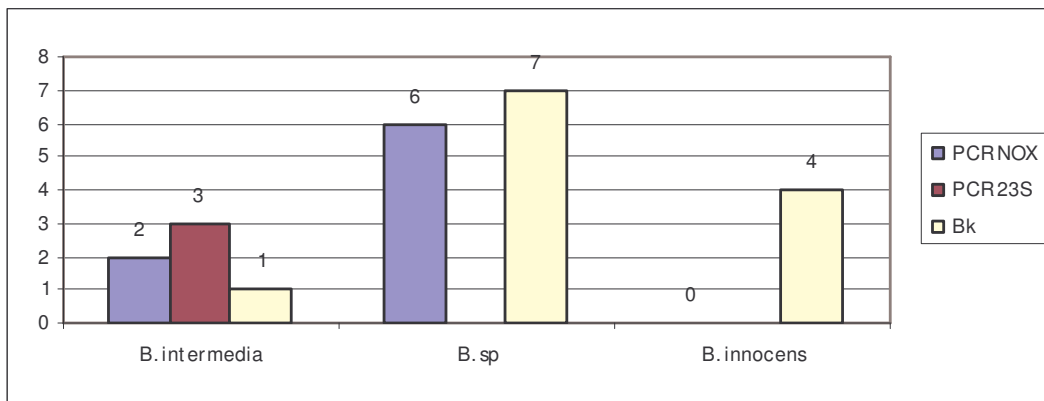
Kaavio 7. Luomukanala-näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR –tulokset.



4.5.2 Harrastekanalala

Kaaviossa 8. nähdään harrastekanalasta otettujen näytteiden tuloksia. Näytteitä oli 12 kappaletta ja ne oli otettu useana eri vuonna. Suurimman osan lajia ei pystytty määrittämään, mutta PCR:n mukaan *B. intermedia*:a ainakin löytyy. Kahdessa näytteessä 23S- ja NOX-sovellukset ovat positiivisia ja samalla ne tukevat toisiaan. Näistä näytteistä toinen on myös biokemiallisesti *B. intermedia* ja toinen on indolipositiivinen, mikä viittaa vahvasti *B. intermedia*:an.

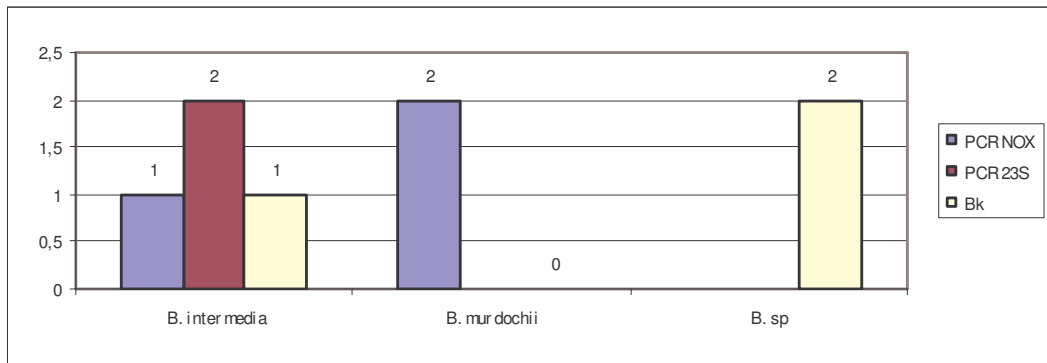
Kaavio 8. Harrastekanalala-näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.5.3 Häkkikanalat

Häkkikanalanäytteitä oli vain kolme kappaletta. Kaaviossa 9. on esitetty niistä saadut tulokset. Kahdessa näytteessä, joissa 23S *B. intermedia* on positiivinen, on myös *B. murdochii* positiivinen. Vain yhdessä näytteessä on sekä biokemiallisten testien että *B. intermedia*:n NOX-geenin perusteella aihetta olettaa, että kyseessä on *B. intermedia*. Vielä tuntemattomasta syystä NOX-sovelluksella saatu positiivinen näyte ei ollut 23S-sovelluksella positiivinen. Ja päinvastoin 23S positiiviset *B. intermedia*:t eivät olleet NOX-sovelluksella positiivisia. Tosin mahdollinen *B. murdochii*:n sekakasvu saattaa vaikuttaa tuloksiin.

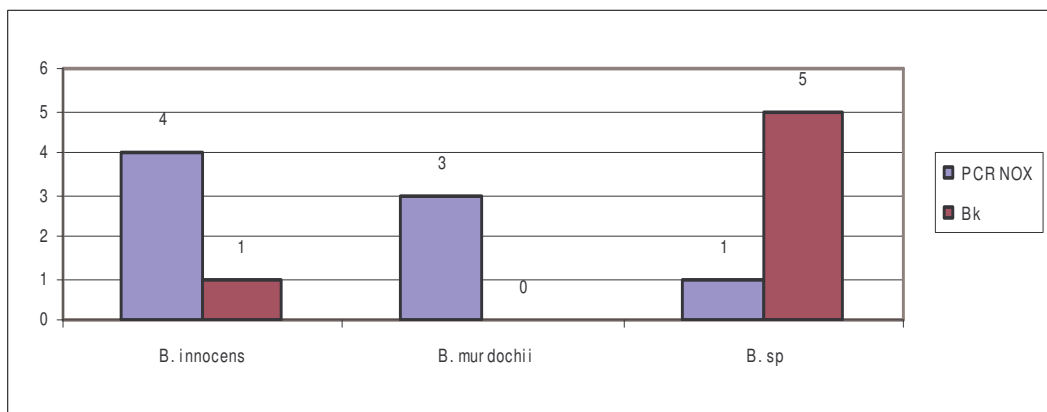
Kaavio 9. Häkkikanala-näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.5.4 Kalkkunat

Kalkkunoista näytteitä tutkittiin kuusi kappaletta, jotka olivat PCR:n perusteella joko *B. innocens*:a tai *B. murdochii*:ta, mutta biokemialliset testit eivät tunnistaneet näitä miksiäkään lajiksi. Näyte, joka oli biokemiallisesti *B. innocens*, ei antanut mitään positiivista tulosta PCR:llä. Tulokset on esitetty kaaviossa 10.

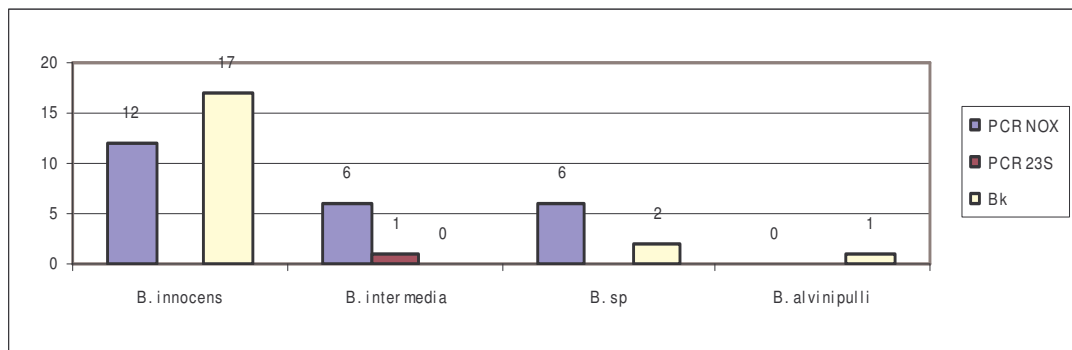
Kaavio 10. Kalkkunoiden näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.5.5. Fasaanit

Fasaaninäytteitä määritettiin yhteensä 20 kappaletta, joista yleisin *Brachyspira*-laji oli biokemiallisesti ja PCR:n perusteella *B. innocens*. NOX-geeniin perustuvia positiivisia PCR-tuloksia *B. intermedia*:lle oli myös jonkin verran vaikka vastaavia 23S PCR tuloksia ei ollutkaan kuin yksi kappale ja biokemiallisesti mikään ei ollut *B. intermedia*. Sen sijaan biokemiallisten testien perusteella yksi näyte vaikuttaisi olevan *B. alvinipulli*. Kaaviossa 11. näkyvät PCR-positiivisten näytteiden ja biokemiallisten testien tulokset eriteltyinä.

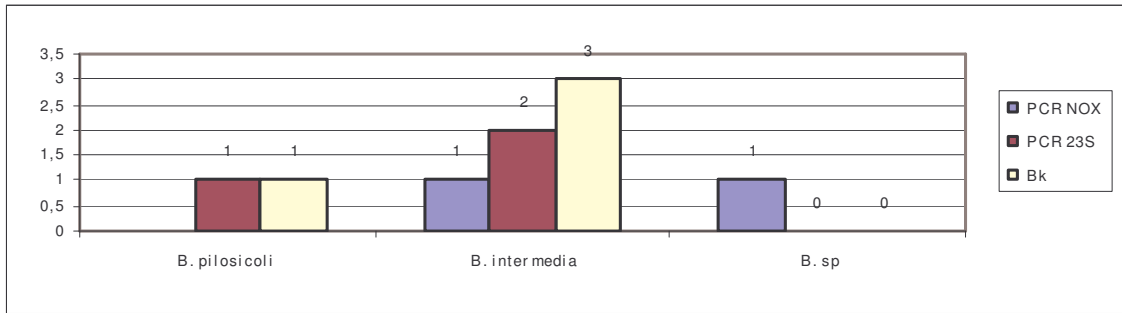
Kaavio 11. Fasaanien näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.5.6 Ankat

Kaaviossa 12. ovat ankojen tutkimustulokset. Ankoilta identifioitiin *B. pilosicoli* yhdestä näytteestä. Tämä näyte tutkittiin myös mikroskoopilla mittajanaa apuna käyttäen ja se todettiin myös kokonsa puolesta olevan *B. pilosicoli*. Ankoilla identifioitiin myös varmasti ainakin yksi *B. intermedia*. Ankoilta tutkittiin yhteensä vain neljä näytettä.

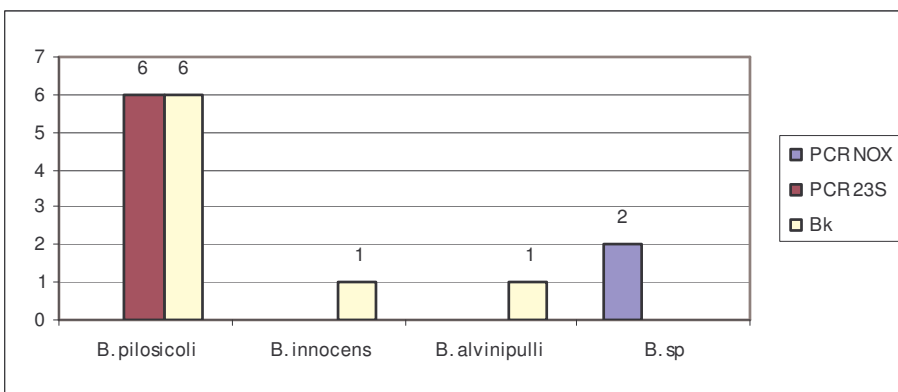
Kaavio 12. Ankkujen näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.5.7. Sorsat

Sorsilta tutkittujen näytteiden tulokset ovat kaaviossa 13. *B. pilosicoli* näyttäisi olevan sorsilla varsin yleinen, koska kahdeksasta näytteestä jopa kuusi oli *B. pilosicoli*:lle positiivisia niin biokemiallisesti kuin PCR:llä. Näitä tuloksia tukee myös mikroskoopilla tehty tutkimus, jossa *B. pilosicoli*:n erottaa helposti pienen kokonsa takia. PCR:llä ei muita positiivisia tuloksia tullut, mutta biokemiallisten testien perusteella yksi olisi *B. alvinipulli* ja yksi *B. innocens*. Näille näytteille PCR-tulokset olivat negatiivisia käytetyillä sovelluksilla.

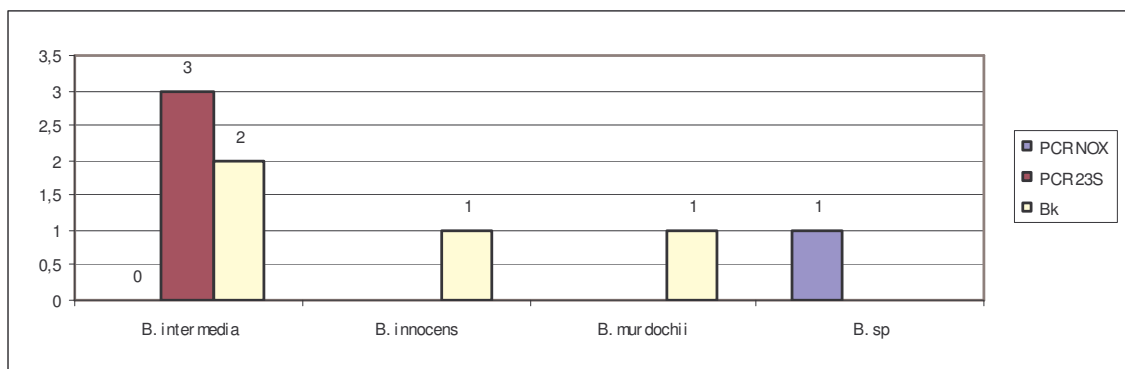
Kaavio 13. Sorsien näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.5.8. Hanhet

Hanhinäytteistä saadut tulokset ovat kaaviossa 14. Näytteitä oli yhteensä 4, joista suurin osa näyttäisi olevan *B. intermedia*:a biokemiallisten testien ja *B. intermedia*:n 23S-geeniin perustuen. NOX-geeniin perustuva PCR ei kuitenkaan antanut yhtään positiivista tulosta. Biokemiallisten testien mukaan hanhista löytyisi myös *B. innocens*:a ja *B. murdochii*:ta, mutta PCR-tulokset eivät tue näitä tuloksia. Näiden tulosten perusteella, hanhissa esiintyvien *Brachyspira*-bakteerien tarkka lajitunnistus on epäselvää.

Kaavio 14. Hanhien näytteiden biokemialliset (Bk) ja PCR -tulokset



4.6. PFGE

PFGE-analyyseistä tehtiin erilaisia dendrogrammeja, jotta nähtäisiin paremmin, kuinka läheistä sukua tutkitut kannat olivat. Osa näytteistä oli osittain epäonnistunut, eikä DNA-fragmentteja saatu kunnolla näkymään. Tietyillä *Brachyspira*-lajeilla oli mahdollista nähdä yhtenäisyyttä fragmenteissa, vaikka tutkimusaineistossa oli hyvin suurtakin vaihtelua lajien kesken. Heterogeenisyyttä ilmeni eri tiloilta ja eri lintulajeista saatujen kantojen, sekä eri aikoina eristettyjen kantojen kesken. Heterogeenisyyteen saattoi vaikuttaa myös se, että näytteitä oli kerätty usean vuoden ajan.

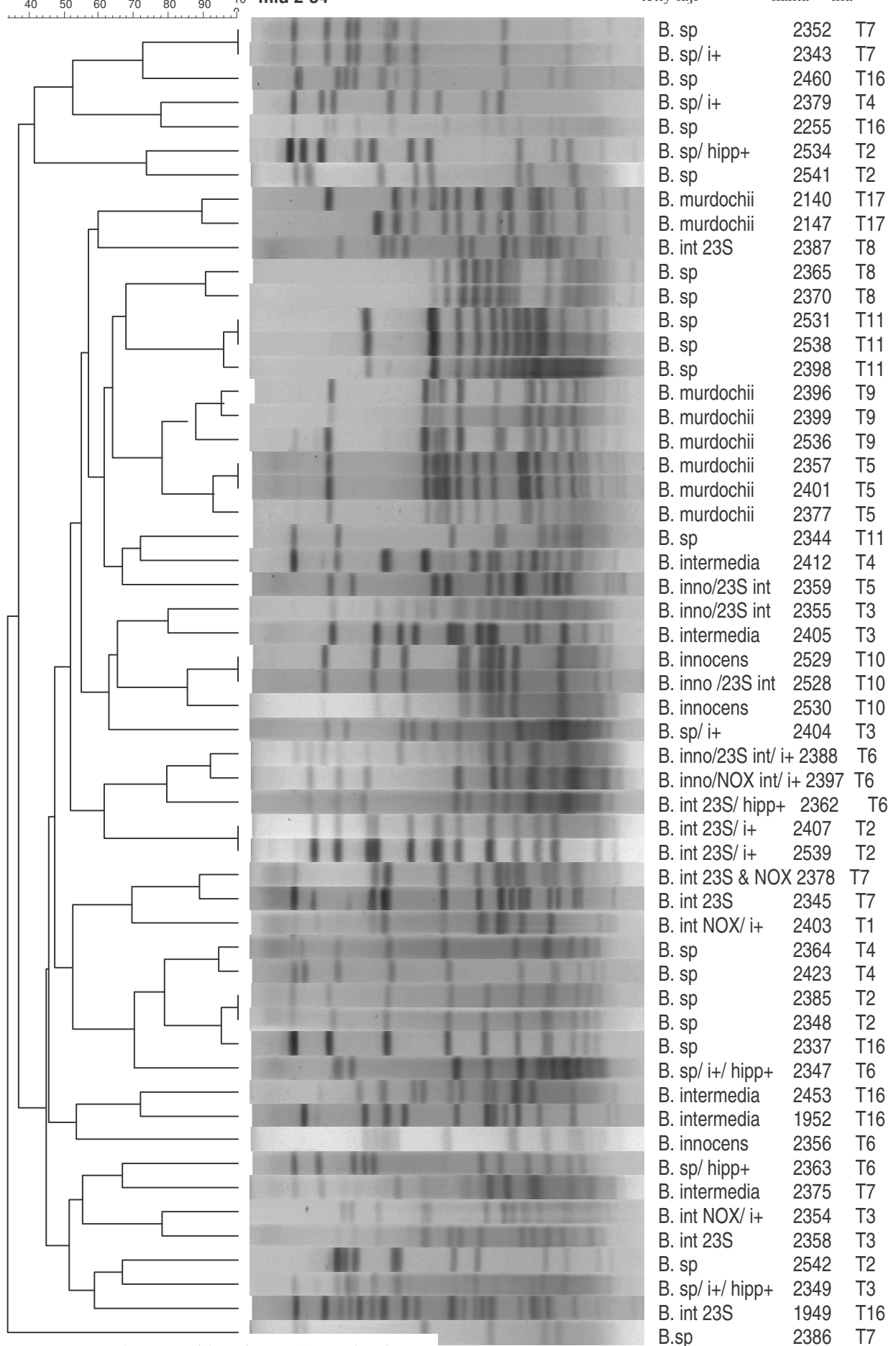
4.6.1. PFGE-tulokset kanojen *Brachyspira*-bakteerieristyksistä

Kuvassa 7. on esitetty dendrogrammi kanojen kannoista. Dendrogrammeissa näytteiden perään on kirjoitettu PCR:n perusteella määritetty laji. Määritetyn lajin perässä on myös maininta, jos näyte on ollut indoli- (i+) tai hippuraattiposiitivinen (hipp+). *B. intermedia* on useimmiten tilan puutteen vuoksi lyhennetty *B. int* –muotoon. *B. intermedia*:n perässä on myös maininta, jos tulos on ollut positiivinen vain toisella PCR-sovelluksella (23S tai NOX). Jos kanta on ollut positiivinen molemmilla PCR-sovelluksilla ja biokemiallisten testien perusteella, lukee näytteen perässä vain *B. intermedia*. Kanoilla identtisiä kantoja oli varsinkin samalta tilalta otettujen näytteiden kesken. Identtisiä ja läheistä sukua olevia kantoja oli kuitenkin myös eri tilojen välillä. Kannassa 1949 (tila 16) on selkeästi näkyvissä sekakasvu, vaikka PCR:llä saatiin positiivinen tulos vain *B. intermedia*:n 23S-sovelluksella.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%)

mlu 2-54

mlu 2-54

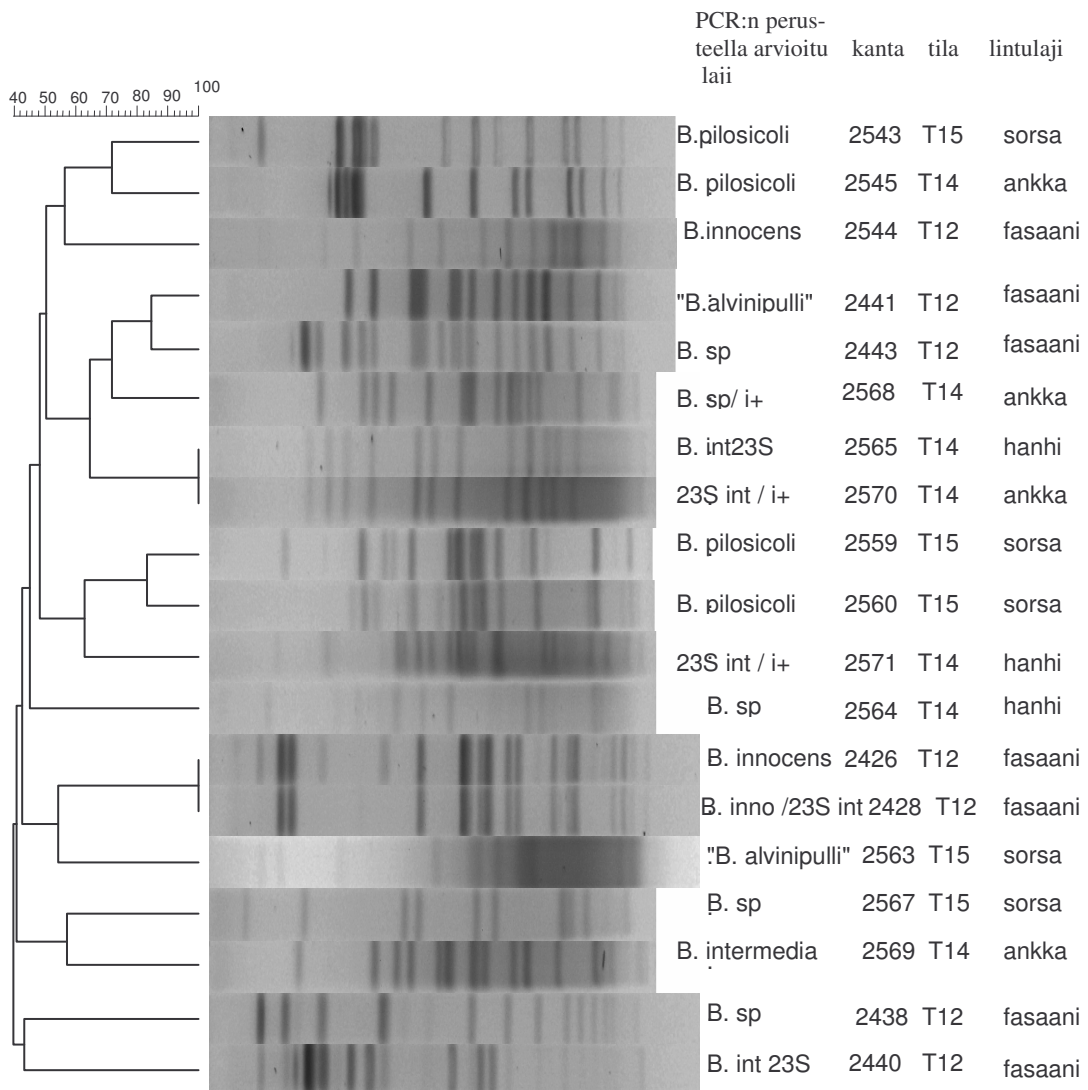


Kuva 7. Dendrogrammi kanojen PFGE-analyysistä

4.6.2 PFGE-tulokset tarhariistalinnuista eristetyistä *Brachyspira*-kannoista

Saman tilan fasaaneilta löytyi kaksi identtistä *B. innocens* -kantaa. 85%:sti samankaltaisia olivat fasaaninäytteet, joista toinen oli biokemiallisten testien mukaan *B. alvinipulli* ja toinen *B. innocens*. Muuten fasaaninäytteet eivät osoittaneet juurikaan samankaltaisuutta. Sorsilla *B. pilosicoli*:sta kaksi oli identtisiä, mutta kolmas hyvin erilainen. Ankoilla näytteet eivät myöskään osoittaneet läheistä sukulaisuutta keskenään, vaikka kaksi kantaa identifioitiin 23S PCR-sovelluksella *B. intermedia*:ksi. Ankan 23S *B. intermedia* näyte oli kuitenkin identtinen hanhen vastaavanlaisen näytteen kanssa. Se voi johtua siitä, että ankat ja hanhet olivat samalta tilalta. Hanhilla ei ollut muuta yhteistä näytteiden kesken tai muiden ankojen näytteiden kanssa. Kuvassa 8. on esitetty tarhariistalintujen dendrogrammi.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
mlu 2-54



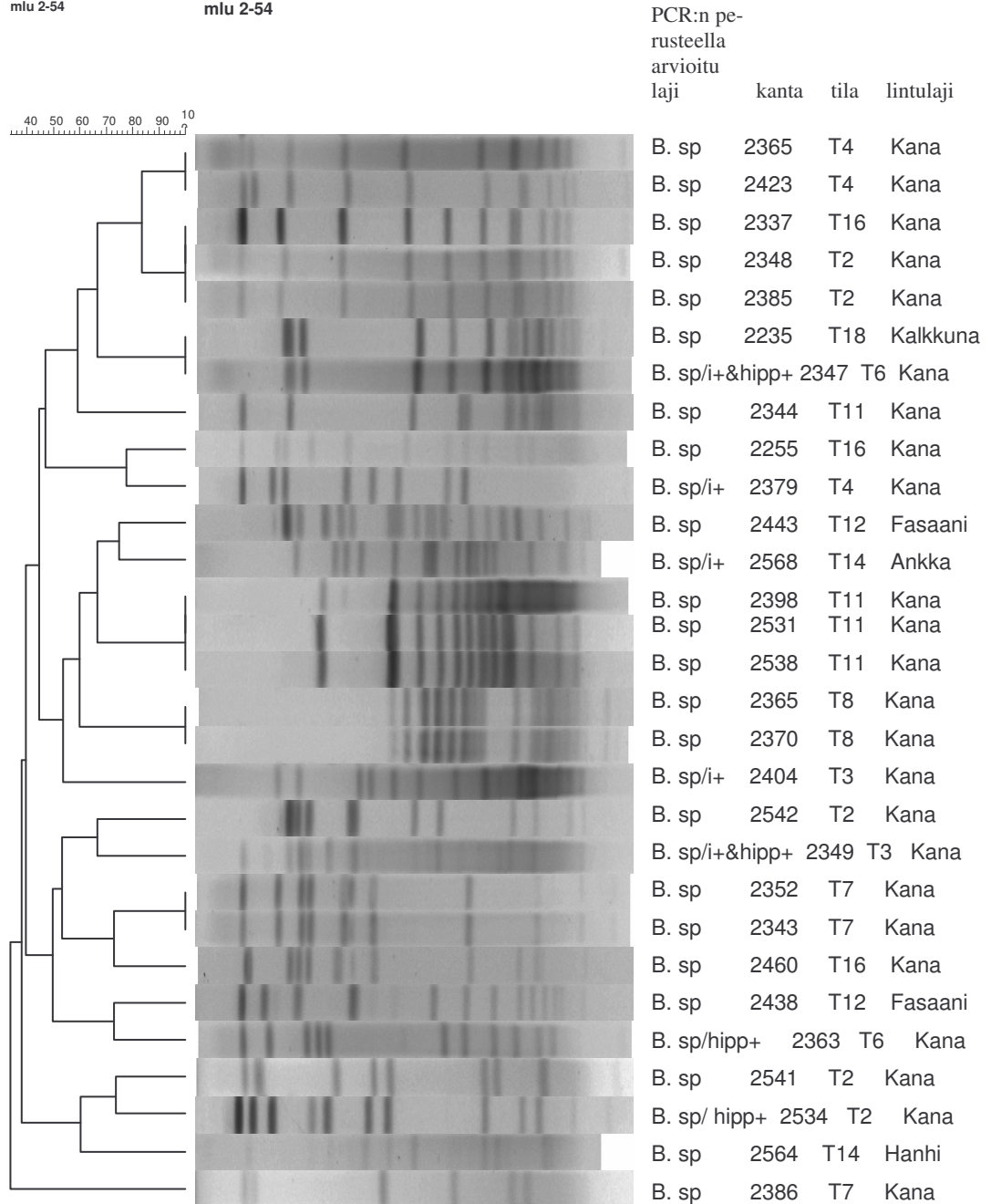
Kuva 8. Dendrogrammi tarhariistalintujen PFGE-analyysistä

4.6.3. PFGE-tulokset identifioimattomista *Brachyspira*-kannoista

Kuvassa 9. on dendrogrammi kannoista, joita ei pystytty PCR:llä tunnistamaan. Osa näistä kannoissa oli keskenään identtisiä ja olisi tarpeellista selvittää, mitä lajia ne edustavat. Suurin osa identtisistä kannoista oli samalta tilalta, mutta myös eri tilojen ja jopa eri lintulajien välillä oli keskenään identtisiä kantoja. Tästä hyvä esimerkki on kanta 2235 (kalkkunasta) ja 2347 (kanasta). Nämä kannat olivat identtiset, vaikka ne olivat eri lintulajeilta ja vieläpä eri tiloilta. Kanan kanta oli myös biokemiallisesti indoli ja hippuraattiposiitivinen, mitä kalkkunan kanta ei ollut.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-
mlu 2-54

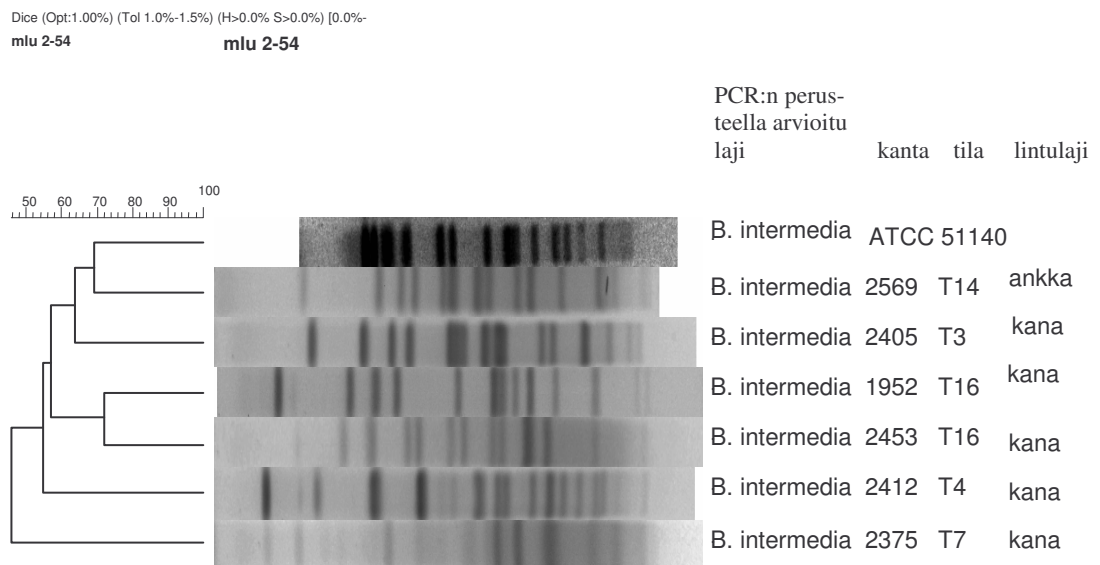
mlu 2-54



Kuva 9. Dendrogrammi identifioimattomista kannoista

4.6.4. PFGE-tulokset *B. intermedia*-kannoista

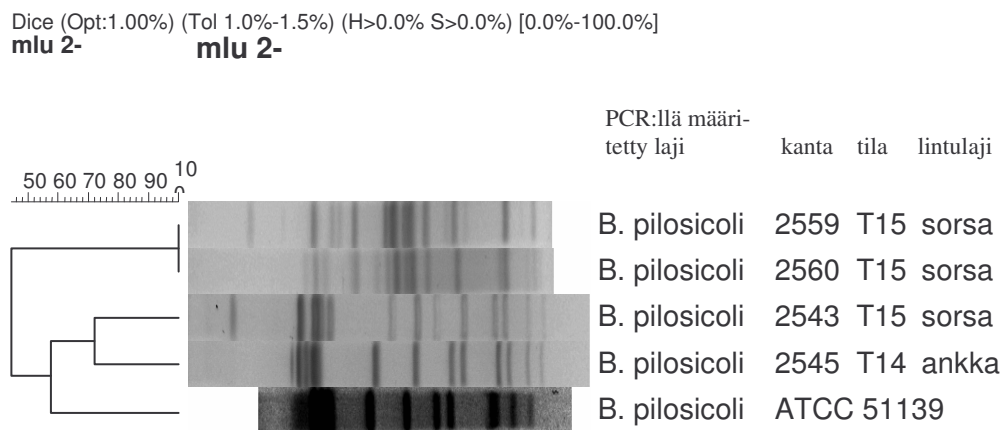
Dendrogrammiin, joka on kuvassa 10., on koottu kannat, jotka olivat NOX- ja 23S-PCR:llä sekä biokemiallisten testien perusteella *B. intermedia*:a. Näistä läheisimmät olivat samalta tilalta, mutta vain noin 75%:sti samanlaisia, mikä osoittaa *B. intermedia*-kantojen olevan hyvin heterogeenisiä.



Kuva 10. Dendrogrammi identifioituista *B. intermedia* -kannoista

4.6.5. PFGE-tulokset *B. pilosicoli*-kannoista

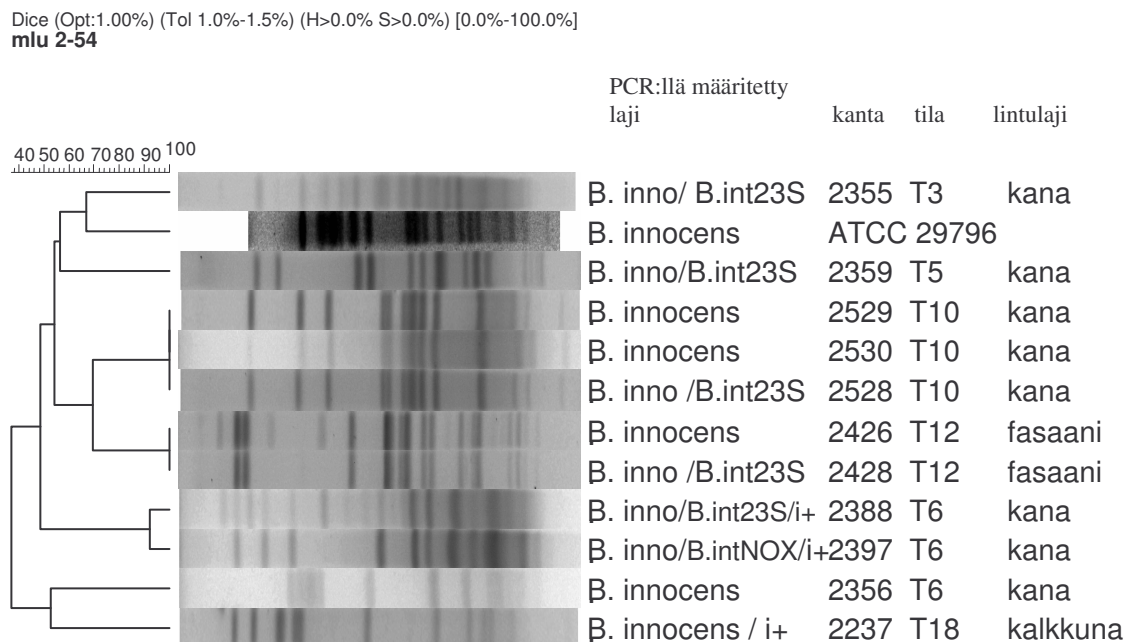
Kuvassa 11. on esitetty dendrogrammi *B. pilosicoli*:n kannoista. Nämä *B. pilosicoli*-näytteet ovat saman tilan sisällä samankaltaisia, mutta tilojen välillä samankaltaisuutta oli vain noin 50%. Sorsilla kaksi näytettä oli identtisiä. Tässä dendrogrammissa näytteet olivat PCR:n ja biokemiallisten testien sekä mikroskoopilla tutkittuna *B. pilosicoli*-kantoja.



Kuva 11. Dendrogrammi identifioiduista *B. pilosicoli* -kannoista

4.6.6. PFGE-tulokset *B. innocens*-kannoista

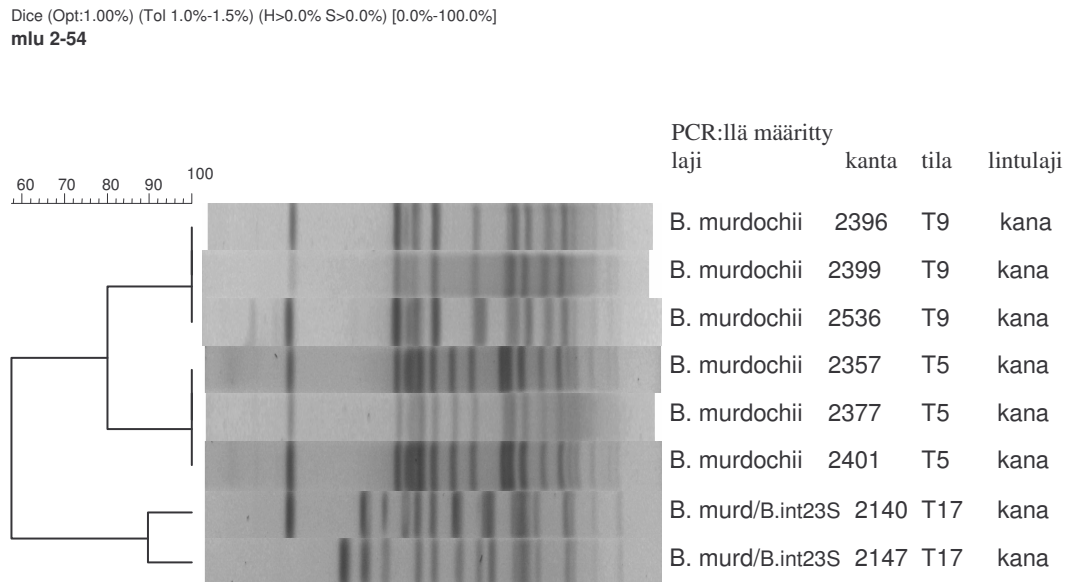
Kuvassa 12. on esitetty dendrogrammi *B. innocens*:n kannoista. Tässä dendrogrammissa on kaikki näytteet, jotka olivat PCR-positiivisia *B. innocens*:n NOX-sovelluksella. Osa näytteistä oli positiivisia myös toiselle PCR-sovellukselle, joka pääosin oli *B. intermedia*:n 23S-PCR. Saman tilan näytteissä oli jopa kolme identtistä kantaa, mikä eliminoi sekakasvun mahdollisuuden, vaikka PCR-tulokset toisin väittää. Myös fasaanien *B. innocens* –kannat 2426 ja 2428 ovat identtisiä, vaikka toisesta on saatu positiivinen tulos myös *B. intermedia*:n 23S-sovelluksella. Tämän perusteella *B. intermedia*:n 23S PCR on antanut vääriä positiivisia tuloksia. Tilan 6 (T6) näytteet ovat indoliposiitivisia ja toinen on positiivinen *B. intermedia*:n 23S ja toinen NOX- sovelluksella. Näissä saattaa olla *B. innocens*:n ja *B. intermedia*:n sekakasvua. Geneettistä vaihtelua saattaa esiintyä *B. innocens* –b:n ja –c:n, eli eri fenotyypisten kantojen välillä, joita PCR ei erikseen tunnista.



Kuva 12. Dendrogrammi identifioiduista *B. innocens* -kannoista

4.6.7. PFGE-tulokset *B. murdochii*-kannoista

Dendrogrammissa, joka on kuvassa 13., on NOX-PCR:llä saadut positiiviset *B. murdochii*:t. Saman tilan näytteistä 2140 ja 2147 on saatu PCR:llä myös positiiviset *B. intermedia*:n 23S sovelluksella. Tässäkin on todennäköisesti väärät positiiviset tulokset, kuten *B. innocens*:n dendrogrammista edellisessä kappaleessa selvisi. *B. murdochii*:den DNA-fragmentit ovat hyvin samanlaisia saman tilan ja myös eri tilojen kesken



Kuva 13. Dendrogrammi identifioituista *B. murdochii* -kannoista

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tämä tutkimus osoittaa, että spirokeetainfektioita esiintyy Suomessa laajasti sekä siipikarjassa että tarhatuissa riistalinnuissa. On myös selvää, että suomalaisissa linnuissa esiintyy ainakin kaksi ulkomaisissa tutkimuksissa patogeenisiksi osoitettua lajia: *B. intermedia* ja *B. pilosicoli*. *B. alvinipulli*-lajia ei nykyisillä menetelmillä pystytty luotettavasti identifioimaan tästä aineistosta. *Brachyspira*-bakteereiden esiintyvyys oli tarhariistalintujen näytteissä korkeampi kuin siipikarjan näytteissä. Luomukanaloista ja harrastekanalasta kerätyistä näytteistä *Brachyspira*-bakteereiden esiintyvyys oli suurempi kuin kalkkunoiden ja häkkikanaloiden näytteistä, mikä todennäköisesti johtuu eläinten vapaasta liikkumisesta kanalassa ja mahdollisista kontakteista ulkona villien lintujen kanssa. Oli myös hyvin merkittävää nähdä, miten *Brachyspira*-lajit jakaantuivat tai esiintyivät eri lintulajeissa.

Biokemiallisissa testeissä hippuraatti- ja indolireaktiot ovat merkittävimmät tunnistettaessa lintujen *Brachyspira*-bakteerilajia. Tosin näitä testejä ei voi täysin luotettavina pitää, koska saman lajin eri kannat saattavat biokemiallisesti käyttäytyä eri tavalla (Rohde, J. ym., 2002). Identifioinnissa ongelmat PCR:llä saattavat johtua siitä, että kontrollinäytteet ovat sikojen *Brachyspira*-kantoja. Sioilta eristetyt kannat saattavat olla hyvinkin erilaisia lintujen *Brachyspira*-bakteereihin verrattuna. Tätä oletusta tukee se, että Australiassa tehdyssä tutkimuksessa läheisimmät sian ja linnun *B. intermedia*-kannat olivat vain 62%:sti samanlaisia (Suriyaarachchi, D.S. ym., 2000).

NOX4 PCR-sovellus oli suunniteltu tunnistamaan sekä *B. innocens* että *B. murdochii*, mutta molemmille lajeille tarvittiin erilliset omat identifiointisovellukset. Uudet NOX-geeniin perustuvat sovellukset toimivat hyvin ja tulokset tukivat toisiaan. Jos NOX4:llä oli saatu positiivinen tulos, saatiin positiivinen tulos myös joko *B. murdochii*:n tai *B. innocens*:n NOX-sovelluksella. *B. innocens*:n NOX-PCR antoi aluksi positiivisen tuloksen välillä myös *B. murdochii*:n kontrollikannalle, mutta syklien vähentäminen poisti tämän ongelman. *B. innocens* ja *B. murdochii* olivat yleisimmät *Brachyspira*-lajit luomukanaloiden ja kalkkunoiden näytteissä. Tarhariistalinnuista vain fasaanien näytteissä esiintyi PCR:n perusteella *B. innocens*:ia, mutta *B. murdochii*:ta ei PCR:n perusteella esiintynyt yhdessäkään tarhariistalintujen näytteessä.

B. intermedia:n identifiointi oli varsin hankalaa. Indolintuoton ja *B. intermedia*:n 23S sovelluksen perusteella NOX-PCR ei ilmeisesti tunnistanut kaikkia lintujen *B. intermedia* kantoja, mutta 23S geeniin perustuva sovellus kylläkin antaa myös vääriä positiivisia tuloksia. Myöskään indolintuottoon ei voida täysin luottaa *B. intermedia*:n määrittämisessä (Stephens, ym., 2005). NOX-PCR:llä positiivisista kannoista noin 2/3 oli indoliposiitivisia kun taas 23S-PCR:llä positiivisista kannoista vain noin 1/3 oli indoliposiitivisia. Tällä hetkellä varmin tapa identifioida *B. intermedia* on käyttää molempia PCR-sovelluksia ja biokemiallisia testejä apuna. *B. intermedia*:a esiintyi melko yleisesti siipikarjassa ja tarhariistalinnuissa. Ainoastaan kalkkunoiden ja sorsien näytteistä ei identifioitu yhtään *B. intermedia*:a. Vielä tuntemattomasta syystä *B. intermedia*:n 23S-PCR antoi usein positiivisen tuloksen varsinkin *B. innocens* -kannoille, joista PFGE-analyysin jälkeen eliminoitiin sekakasvun mahdollisuus.

Brachyspira-bakteereita tutkivissa tutkijapiireissä on noussut esiin käsitys, että *B. intermedia*:ksi vaihtelevia kriteerein määritellyt kannat muodostavatkin todellisuudessa useamman *Brachyspira*-lajin ryhmän (suullinen tiedonanto, Fossi 2006). Tämän *B. intermedia* -ryhmän selvittely edellyttää kantojen genomien laajempaa sekvensointia kuin mitä toistaiseksi on tehty.

Tarhariistolintunäytteistä peräisin olevia *Brachyspira*-kantoja oli melko vähän, mutta sorsilla ja ankalla saatiin varmuus *B. pilosicoli*:n läsnäolosta. Koska *B. pilosicoli* on melko helppo erottaa muista tunnetuista *Brachyspira*-lajeista mikroskooppilla pienen kokonsa perusteella, olisi koko joka kerta hyvä varmistaa. Sorsilla on ulkomaisissa tutkimuksissa myös törmätty tilanteeseen, jossa *Brachyspira*-laji näyttäisi olevan *B. hyodysenteriae* biokemiallisten ja PCR:n tulosten perusteella, mutta possukokeessa kyseinen kanta ei sairastuttanut sikoja. Nämä kannat olivat todennäköisesti *B. hyodysenteriae*:n geneettisiä variantteja (Jansson, D.S. ym., 2003). Vastaavasti naakoilla on eristetty hippuraatti-negatiivisia kantoja, joiden epäillään edustavan vielä tuntematonta *Brachyspira*-lajia. *B. pilosicoli*:n 16S rRNA geeniin perustuvalla PCR menetelmällä nämä antoivat positiivisen tuloksen, mutta sekvensointi erotti nämä kannat *B. pilosicoli*:sta (Jansson, D.S. ym., 2005). Hanhilla todettiin *B. intermedia*:a näillä menetelmillä, mutta kaikista näytteistä ei täysin varmaa tulosta saatu. Fasaaneilla *B. innocens* oli selvästi yleisin laji, mutta niillä todettiin myös patogeenista *B. intermedia*:a. Yksi kanta sekä sorsilla että fasaaneilla oli

biokemiallisten testien perusteella *B. alvinipulli*. *B. alvinipulli*:n varmistamiseksi nämä kannat tulisi sekvensoida, koska tällä hetkellä kyseiselle lajille ei ole olemassa luotettavaa PCR-menetelmää.

Horisontaalista geeninsiirtoa eli geenin siirtymistä lajilta toiselle esiintyy usein bakteereilla. Sen avulla bakteerit selviytyvät paremmin muuttuvista olosuhteista. Hyvänä esimerkkinä tästä on bakteerien antibioottiresistenssin kehittyminen. Bakteerien DNA:n guaniini ja sytosiini emästen suhteen analysoinnilla voidaan havaita mahdollinen horisontaalinen geeninsiirto (Tuimala, J. 2005). *Brachyspira*-bakteereissa heterogeenisyys varsinkin *B. intermedia*:n kohdalla saattaa johtua myös horisontaalisesta geeninsiirrosta eri kantojen ja jopa eri lajien kanssa (Atyeo, R.F. ym., 1999). Geenien siirtyminen saattaa myös haitata luotettavaa PCR-identifiointia.

PCR-tuloksia vertailtiin PFGE-tuloksiin sekartuntojen sekä väärin positiivisten ja negatiivisten tulosten selvittämiseksi. PCR:ssä näyte otetaan yhdestä kohtaa maljalta kun taas PFGE:ssä analysointiin otetaan suuri määrä bakteerimassaa. Näin PFGE voi paljastaa paremmin mm. kahden lajin yhteiskasvun.

PFGE-kuvista ei voi päätellä, mitkä todella olivat *B. intermedia*:a, koska viitekanta on siasta peräisin ja yhtään keskenään samanlaista kuvaa ei ollut. Aineistossa oli suuri määrä kantoja, joiden lajia ei pystytty identifioimaan. Kyseessä saattaa olla lajit, joita ei näillä menetelmillä tutkittu, kuten *B. alvinipulli* ja ”*B. pulli*”. On mahdollista, että mukana oli myös vielä täysin tuntemattomia lajeja (Kizerwetter-Swida, M. ym., 2005). Myös PCR:n teknisistä syistä tai aluke-alueen pistemutaatioista johtuvat väärät negatiiviset tulokset saattavat hankaloittaa identifiointia. Useamman menetelmän käyttö ja tulosten vertaileminen keskenään on paras tapa varmistua *Brachyspira*-lajista.

Pulssikenttägeelelektroforeesin avulla on mahdollista selvittää epidemiologisesti, mitkä näytteistä ovat läheistä sukua. Näytteet voidaan jakaa päätyyppeihin ja alatyypit ovat variantteja näistä yhdestä kolmeen juovan erolla. Tutkimusaineistossa oli hyvin suurta vaihtelua näytteiden kesken. Kuitenkin oli mahdollista nähdä tietyillä *Brachyspira*-lajeilla yhtenäisyyttä fragmenteissa, kuten esimerkiksi *B. murdochii*:lla. Heterogeenisyyttä aiheutti eri tiloilta otetut näytteet, eri lintulajeista otetut näytteet ja se, että näytteiden otto oli jakautunut usealle vuodelle. Suomessa vähän tutkituista *Brachyspira*-bakteereista on vielä

tällä aineistolla ennen aikaista sanaa onko jokin *Brachyspira*-laji domestikoiduilla linnuilla yleisempi kuin muut.

Pulssikenttäelektroforeesin kuvien analysoinnin perusteella pyrittiin selvittämään *Brachyspira*-lajien heterogeenisuutta. Samalta tilalta puolen vuoden välein otetut näytteet antoivat viitteitä tartunnan kroonisuudesta. Kaikilla tiloilla kyseessä oli sama kanaparvi ensimmäisellä ja toisella näytteenotto kerralla. Useissa tapauksissa pulssikenttäkuvat olivat identtiset tai lähes identtiset varsinkin *B. murdochii*:n osalta. *B. innocens*:en kesken erilaiset PFGE-kuvat saattavat johtua lajin eri fenotyyppien b ja c erilaisuudesta. NOX-geeniin perustuva PCR ei erotellut näitä kahta fenotyyppiä toisistaan. Tosin se ei ole tarpeenkaan, koska kumpaakaan ei ole osoitettu patogeeniseksi. *B. intermedia*-kannat olivat todella heterogeeninen ryhmä. Sekavuutta saattaa aiheuttaa bio- ja genotyyppiltään epätyypilliset *B. intermedia* -kannat tai mahdollisesti jokin hyvin läheinen, vielä identifioimaton, *Brachyspira*-laji (Kizerwetter-Swida, M. ym., 2005).

Toukokuussa 2005 pulssikentässä analysoitu fasaanin *Brachyspira*-näyte oli mukana myös tässä tutkimuksessa. Erikoista oli, että kuvat olivat melko erilaisia. On mahdollista, että *Brachyspira*-bakteerien geenit muuntuvat helposti siirrostusten myötä. Ongelmaa pulssikenttä-ajoissa aiheutti myös kannat, jotka eivät digestoituneet kunnolla, eli niistä jäi suuria fragmentti-ryhmiä kuvan yläosaan. Analyysissä täytyi ottaa myös huomioon mahdolliset ”haamu-fragmentit”. Dnaasi tuhosi osittain osan kannoista. Myös sangen erikoinen tapaus oli kalkkunasta eristetty kanta, josta ei saatu yhtään fragmenttia. Mahdollisesti Dnaasin toiminta oli ollut niin voimakasta, että kaikki DNA oli hajonnut. Toinen, joskin epätodennäköisempi mahdollisuus on, että kyseisessä kannassa ei ollut yhtään tunnistuskohtaa käytettävälle restriktioentsyymille. On myös mahdollista, että DNA ei jostain syystä päässyt vapautumaan solusta lainkaan. Tämä kantaa tutkittiin useaan otteeseen, mutta tulos oli aina sama. Muutamien kantojen pulssikenttätutkimus uusittiin, koska Dnaasi oli tuhonnut osan näytteestä. Nämä kannat käsiteltiin formaliinilla, joka estää Dnaasia toimimasta.

Tämä tutkimus osoitti, että suomalaisessa siipikarjassa ja tarhatussa riistalinnuissa esiintyy monia *Brachyspira*-suvun lajeja, niin tunnettuja kuin vielä tuntemattomia. Karakterisointi oli hankalaa kantojen genomien heterogeenisyyden takia, mutta on selvää, että *B. intermedia*:a esiintyy suhteellisen yleisesti. *B. intermedia*:n esiintymisellä sekä kanoissa että

riistalinnuissa voi olla merkitystä tuotannon ja eläinten hyvinvoinnin takia. Tämän aineiston perusteella *B. pilosicoli*:a ei näyttäisi olevan perinteisessä siipikarjassamme, mikä on siipikarjatuotannon kannalta hyvä asia. Tarhariistalinnuista sitä kuitenkin identifioitiin ja *B. pilosicoli*:n mahdollinen tarttuminen linnuista kasvattajaan ja muihin ihmisiin pitäisi huomioida. Vielä ei kuitenkaan tiedetä varmuudella mitä *B. pilosicoli* ihmiselle aiheuttaa. Lisää selvitystä tarvitaan muun muassa mahdollisen *B. alvinipulli*:n toteamiseksi sekä muiden ei-identifioitujen näytteiden selvittämiseksi. RFLP-PCR:n (Restriction Fragment Length Polymorphism) avulla on myös mahdollista selvittää paremmin identifioimattomat kannat (Bano, L. ym., 2005). *B. ”pulli”* nimitystä käytetään tällä hetkellä siipikarjan *Brachyspira*-lajeista, jotka ovat atyyppisiä ja alustavan käsityksen mukaan harmittomia (Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 1999; Phillips, N.D. ym., 2005).

Laajempi tutkimusaineisto varsinkin perinteisistä tuotantokanaloista, joissa eläimet eivät ulkoile, olisi tärkeää tulevaisuudessa, jotta pystytään tarkemmin kartoittamaan *Brachyspira*-bakteerien läsnäolo ja mahdollinen vaikutus munien tuotantoon. Koska suuri osa kannoista jäi identifioimatta, pitäisi esimerkiksi genomien sekvensoinnin avulla yrittää selvittää, mitkä lajit ovat kyseessä. MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) on myös eräs tapa identifioida bakteereita ja tutkia niiden välisiä geneettisiä suhteita.

Kokeelliset infektiot ovat toistaiseksi olleet luotettavimmat menetelmät *Brachyspira*-kantojen patogeenisyyden osoittamiseksi (Stephens, C.P. ja Hampson, D.J. 2002; Trott, D.J. ym., 1997; Jensen, T.K. ym., 2004). Koska tässä aineistossa *B. intermedia*:ksi arvioidut kannat olivat erityisen heterogeenisiä, useita eri kriteerein kyseiseen lajiin määritettyjä kantoja tulisi sisällyttää kananpoikasilla ja kananuorikoilla tehtäviin infektiokokeisiin. Tarhariistalinnuista todettujen *B. pilosicoli* –kantojen taudinaiheutuskyky kanoille ja jopa myös porsaille olisi aiheellista selvittää tartutuskokeilla. Koska eräät sikojen *B. murdochii* –kannat ovat sioille patogeenisia, olisi perusteltua tarkastella eräiden lintuperäisten *B. murdochii* –kantojen patogeenisuutta kanoille.

Jatkossa voisi myös selvittää miten infektiot vaikuttavat ja esiintyvät eri-ikäisillä kanoilla sekä niiden tartuntatapaa. Kantojen antibioottiherkkyuden tutkiminen olisi myös tarpeellista. Tällä hetkellä *Brachyspira*-tartunnoille on olemassa useita antibioottihoitoja (mm. tiamuliini, linkomysiini ja tylosiini), mutta antibioottiresistenssin syntymisen takia jokainen tilatapaus on tutkittava erikseen, että saadaan tehokas hoito. MIC-arvojen (minimum

inhibitory concentration) perusteella voidaan selvittää kannoille parhaiten tehoavat antibiootit (Hampson, D.J. ym., 2006b). Tällä hetkellä linnuille, kuten muillekaan eläinlajeille, ei ole olemassa rokotetta spirokeetainfektioita vastaan.

6. LÄHDELUETTELO

Atyeo, R. F., T. B. Stanton, N. S. Jensen, D. S. Suriyaarachichi ja D. J. Hampson. 1999. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests.

Vet. Microbiol. vol. 67, issue 1, Pages 47-60

Bano, L., G. Meriardi, P. Bonilauri, G. Dall'Anese, K. Capello, D. Comin, G. Cattoli, V. Sanguinetti ja F. Agnoletti. 2005. Prevalence of intestinal spirochaetes in layers flocks in Treviso province, northeastern Italy. Proceedings of The Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Parma. 5-7th June 2005. (pp. 56 - 57)

Burch, D.G.S. 2005. Avian Intestinal Spirochaetosis - Clearing the Confusion.

BVetMed MRCVS, Veterinarian, Octagon Services Ltd

(Article published in "Poultry World" April 2005)

Burch, D.G.S., C. Harding, R. Alvarez, ja M. Valks. 2006. Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin.

Avian Pathol. 35(3):211-6

Dunn P.A., V.A. Lintner, C.W. Maddox ja G.E. Duhamel. 2003.

Brachyspira intermedia in a Flock of Commercial Layers with Increased Egg Shell Stains. (Case Report) 75TH Northeastern Conference on Avian Diseases, University of Maine, Orono, ME

Fellström, C. 2001. Intestinal *Brachyspira* infections.

Anim Health Res Rev, 2,

(<http://www-afac.slu.se/Workshop%20Norge/Manus%20Claes%20Fellstrom.pdf>.)

Goering, R.V. 2003. Pulsed Field Gel Electrophoresis. In D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versalovic, Y. Tank, B. Unger, D. Relman ja T.J. White (eds.), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press, Washington, D.C. Chapter 15, pp. 185-196

Hampson, D.J. ja T.B. Stanton. 1997. Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans.

CAB International, Oxon, 382 pages.

Hampson, D.J. ja A.J. McLaren. 1999. Experimental infection of laying hens with *Serpulina intermedia* causes reduced egg production and increased faecal water content.

Avian Pathol. 28, 113-117

Hampson, D.J. ja C.P. Stephens. 2002. Control of intestinal spirochaete infections in chicken.

RIRDC Publication No 02/087, Executive summary.

Hampson, D. J. ja J.R. Thomson. 2004. *Brachyspira* research – special issue on colonic spirochaetes of medical and veterinary significance.

J Med Microbiol 53, 263-265; DOI: 10.1099/jmm.0.45597-0

ISSN 0022-2615

Hampson, D.J., C.P. Stephens, N.D. Phillips, T. La ja J.R. Pluske. 2004. Control of intestinal spirochaete infections in chickens. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation (Australian Government). 54 p. RIRDC Publication No 04/141. RIRDC Project No UMU-29J.

<http://www.rirdc.gov.au/reports/CME/04-141.pdf>

Hampson, D.J. ja T. La. 2006. Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1009-1012

- Hampson, D.J., G.D. Lester, N.D. Phillips ja T. La. 2006a. Isolation of *Brachyspira pilosicoli* from weanling horses with chronic diarrhoea.
Vet Rec. 13;158(19):661-2.
- Hampson, D.J., C.P. Stephens ja S.L. Oxberry. 2006b. Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens.
Avian Pathol. 35(1):12-6.
- Jansson, D.S., C. Bröjer, D. Gavier-Widén, A. Gunnarsson ja C. Fellström. 2001. *Brachyspira* spp. (Serpulina spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds.
Anim. health. res. rev. 2(1); 93-100
- Jansson, D.S., K.E. Johansson, T. Olofsson, B. Pettersson, A. Gunnarsson U. Zimmerman ja C. Fellström. 2003. Analysis of *Brachyspira Hyodysenteriae* isolated from mallards (*Anas Platyrhynchos*).
Poster abstract no. 4. *In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Scotland, UK.*
- Jansson, D.S., K.E. Johansson, T. Olofsson, T. Råsbäck, I. Vågsholm, B. Pettersson, A. Gunnarsson ja C. Fellström. 2004. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly β -haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*)
J Med Microbiol 53 (2004), 293-300; DOI: 10.1099/jmm.0.05488-0
- Jansson, D.S., K.E. Johansson, U. Zimmerman, A. Gunnarsson ja C. Fellström. 2005. Intestinal spirochetes isolated from Jackdaws, Hooded crows and Rooks (Genus *Corvus*).
Poster abstract no. 11. *In Proceedings of the Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy.*
- Jensen, T. K., M. Boye ja K. Møller. 2004. Extensive intestinal spirochaetosis in pigs challenged with *Brachyspira pilosicoli*.
J Med Microbiol 53, 309-312; DOI: 10.1099/jmm.0.05403-0
- Kizerwetter-Swida M., M. Rzewuska ja M. Binek. 2005. Characterization of *Brachyspira* sp. strains isolated from flock of hens with diarrhoea.
Bull Vet Inst Pulawy 49,169-173
- Leser T.D., K. Moller, T.K. Jensen ja S.E. Jorsal. 1997. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA.
Mol Cell Probes. 11(5):363-72.
- Maa- ja metsätalousministeriö. 2003. Kananmunien tuotantostrategia: Uusiin tuotantomuotoihin siirtyminen vuonna 2012. Loppuraportti. Työryhmämuistio MMM 2003:14
- Maa- ja metsätalousministeriö. 2004. Siipikarjanlihan tuotantostrategia: Tuottavasti laadukasta. Loppuraportti. Työryhmämuistio MMM 2004:15
- McLaren, A. J., D. J. Trott, D.E. Swayne, S. L Oxberry, ja D. J. Hampson. 1997. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups.
J Clin Microbiol, 35(2): 412–417.
- Nemes, C.S., R. Glávits, M. Dobos-Kovács, E. Ivanics, E. Kaszanyitzky, A. Beregszászi, L. Szeredi ja L. Dencsö. 2006. Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks.
Avian Pathol 35(1), 4-11
- Phillips, N.D., T. La ja D.J. Hampson. 2005. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens.
Vet Microbiol volume 105, Issues 3-4, Pages 189-198

- Rohde, J., A. Rothkamp ja G.F. Gerlach. 2002. Differentiation of Porcine *Brachyspira* Species by a Novel *nox* PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol.* 2002 July; 40(7): 2598–2600
- Råsbäck, T., D.S. Jansson, K-E. Johansson ja C. Fellström. 2005. New isolates of strongly haemolytic porcine spirochaetes dissimilar to *Brachyspira hyodysenteriae*. Poster abstract no. 9. In Proceedings of the Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy.
- Shivaprasad, H.L. ja G.E. Duhamel. 2005. Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial turkeys. *Avian Diseases* 49(4):609-613.
- Smith, J.L. 2005. Colonic spirochetosis in animals and humans. *J Food Prot.* 68(7):1525-34.
- Stanton, T.B., E. Fournie-Amazouz, D. Postic, D.J. Trott, P.A. Grimont, G. Baranton, D.J. Hampson ja I. Saint Girons. 1997. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol 47, 1007-1012,
- Stanton, T.B., D. Postic ja N.S. Jensen. 1998. *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 669-676.
- Suriyaarachchi, D. S., A.S.J. Mikosza, R.F. Atyeo ja D. J. Hampson. 2000. Evaluation of a 23S rDNA polymerase chain reaction assay for identification of *Serpulina intermedia*, and strain typing using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* Volume 71, Issues 1-2 , Pages 139-148
- Stephens, C. P. ja D. J. Hampson. 1999. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. *Avian Pathol.* Volume 28, Number 5, 1 pp. 447-454(8)
- Stephens, C.P. ja D.J. Hampson. 2000. Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Anim. health. res. rev.* 2(1); 83-91
- Stephens, C.P. ja D.J. Hampson . 2002. Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* causes reduced egg production. *Avian Pathol.* 31(2):169-175.
- Stephens, C.P., S.L. Oxberry, N.D. Phillips, T. La ja D.J. Hampson. 2005. The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonising hens in commercial flocks. *Vet Microbiol.* Volume 107, Issues 1-2 , 25, Pages 149-157
- Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing ja B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9):2233-9.
- Trott, D.J., T.B. Stanton, N.S. Jensen, G.E. Duhamel, J.L. Johnson ja D.J. Hampson. 1996. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol.* 46(1):206-15.
- Trott, D J., S L. Oxberry ja D.J. Hampson. 1997. Evaluation of day-old SPF chicks for pathogenicity testing of intestinal spirochete species. Abstracts of the NADC First International Virtual Conference on Infectious Diseases of Animals. I00003.

Tuimala, J. 2005. Bioinformatiikan perusteet.
158s, Picaset Oy Helsinki

Wagenaar, J.A., M.A.P. van Bergen, L. van der Graaf ja W.J.M. Landman. 2003.
Free-range chicken show a higher incidence of Brachyspira infection in the Netherlands
Poster abstract no. 16. The second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals
and Humans, Scotland, UK.

Weissenböck, H., A. Maderner, A.M. Herzog, H. Lussy ja N. Nowotny. 2005. Amplification and sequencing
of Brachyspira spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in
Austrian pigs shows frequent solitary presence of Brachyspira murdochii.
Vet Microbiol.;111(1-2):67-75.

Zuerner, R.L., T.B. Stanton, F.C. Minion, C. Li, N.W. Charon, D.J. Trott ja D.J. Hampson. 2004. Genetic
variation in Brachyspira: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish B. pilosicoli from B.
hyodysenteriae.
Anaerobe 10(4):229-37

7. LIITTEET

LIITE 1. *Brachyspira*-bakteerien kasvualustat

LIITE 2. Gram-värjäyksen ja biokemiallisten testien reagenssit

LIITE 3. PCR –sovellusten alukkeet

LIITE 4. PFGE-genotyyppitys

LIITE 5. PCR-kuvia

LIITE 6. PFGE-kuvia

LIITE 1. *Brachyspira*-bakteerien kasvualustat

BA-3 eli Blood agar base No.2 (OXOID) täydennettynä kolmella antibiootilla.

BA-3 on *Brachyspira*-bakteereille tarkoitettu verimalja, johon on lisätty lampaan verta ja selektiivisiä lisäaineita estämään muiden bakteerien kasvun sekä Na-ribonukleinaattia (ribonucleic acid sodium salt, Fluka) parantamaan hemolyysiä.

Selektiiviset lisäaineet:

- Spectinomycin dihydrochloride (Sigma)
- Vancomycin hydrochloride (Lilly)
- Colistin methane sulphonate (Sigma)

FAA eli Fastidious anaerobe agar (LAB M)

FAA on ravinnerikas anaeroobeille tarkoitettu yleismalja, jolla saadaan yleensä kasvatettua runsas bakteerimassa tutkimuksia varten. FAA-maljoissa käytettiin hevosen tai naudan verta. Sekä FAA että BA-3 maljat esipelkistetään ennen käyttöä.

LIITE 2. Gramvärjäyksen ja biokemiallisten testien reagenssit

Gramvärjäyksessä käytetyt reagenssit:

- Kristallivioletti (J.T. Baker) ja NaHCO_3 kaikkien solujen värjäämiseen
- Lugolin jodiliuos (Jodi (I_2) Merck, Kaliumjodidi (KI) Merck)
- Huuhtelut asetoni-alkoholilla ja vedellä
- Safraniini (Merck) vasta-värjäykseen

Biokemiallisten testien reagenssit:

Hippuraatin hydrolyysiin käytettiin Na-hippuraattiliettä (Hippuric acid ,Sigma) sekä ninhydriiniliuosta (Ninhydrini, J.T. Baker). Ninhydriiniliuoksen valmistuksessa käytettiin myös asetonia ja etanolia.

Indoli-spot –reagenssi valmistettiin väkevästä suolahaposta (BDH Prod.) ja 4-(dimethylamino)-cinnamaldehyd:stä ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}$, Merck)

Glukosidaasi entsyymien testaus tapahtui Rosco®:n kiekkoilla.

LIITE 3. PCR -sovellusten alukkeet

NOX-PCR alukkeet *B. innocens*:lle (Weissenböck ym., 2005):

Innoc-F1 ATGGTGCTATAAAAGTAGAC

Innoc-R1 ACCAACCAGTAGAAGCCATG

NOX-PCR alukkeet *B. murdochii*:lle (Weissenböck ym., 2005):

Murd-F1 GAATACTGCGGTAAGCAAGGA

Murd-R1 GAGAATGCGTGAATAGCTTCG

NOX-PCR alukkeet *B. intermedia*:lle (Phillips ym., 2005):

Int1 AGAGTTTGATGATAATTATGAC

Int2 ATAAACATCAGGATCTTTGC

NOX4-PCR alukkeet *B. innocens*:lle ja *B. murdochii*:lle (Athey ym., 1999)

SINNF CCTGAAAGTTTAAAAGCT

SINNR CGATGTATTCTTCTTTTCC

23S PCR alukkeet *B. intermedia*:lle (Leser ym., 1997)

S-II_f CCGTTGAAGGTTTACCGTG

S-II_r GGCCTGTAACAGTCCGC

23S PCR alukkeet *B. pilosicoli*:lle (Leser ym., 1997)

S-IV_f AGGTGATGGTTATCCTC

S-IV_r AATCTTTATTAAGGATTCCAA

LIITE 4. PFGE-GENOTYYPITYS

Restriktioentsyyminä käytettiin *Mlu* I :sta (*Micrococcus luteus*), jonka pitoisuus oli 40 U.

Digestio tapahtui 37°C:ssa 16h.

Mlu I:n tunnistuskohta on

5'..A[^]CGCGT..3'

3'..TGCGC[^]A..5'

Ajoparametrit

geeli: 1% SeaKem Gold

ajopuskuri: 0.5x TBE

ajoaika: 20h

lämpötila: n. +12°C

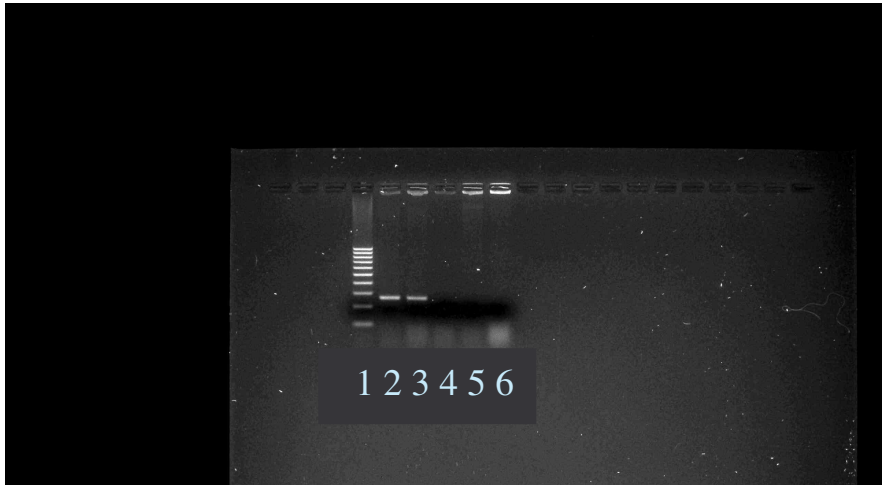
pulssiaika: 2,2-54,2 sek

kulma: 120°

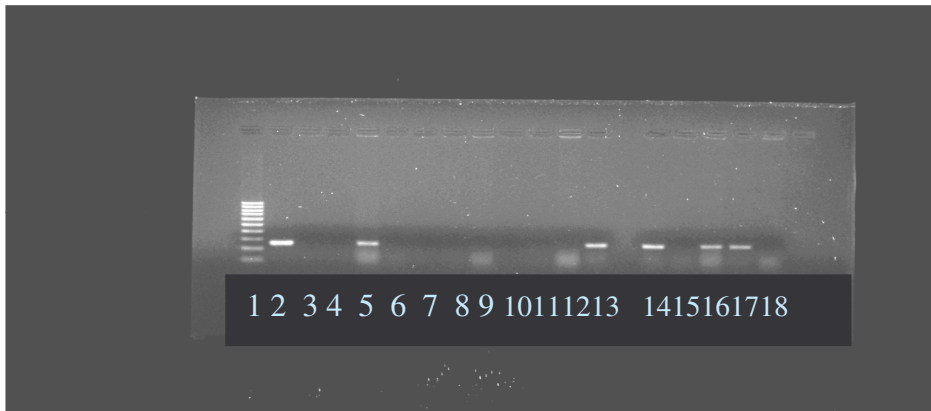
tasapainotus: 1h

jännite: 6,0 V/cm

LIITE 5. PCR-kuvia

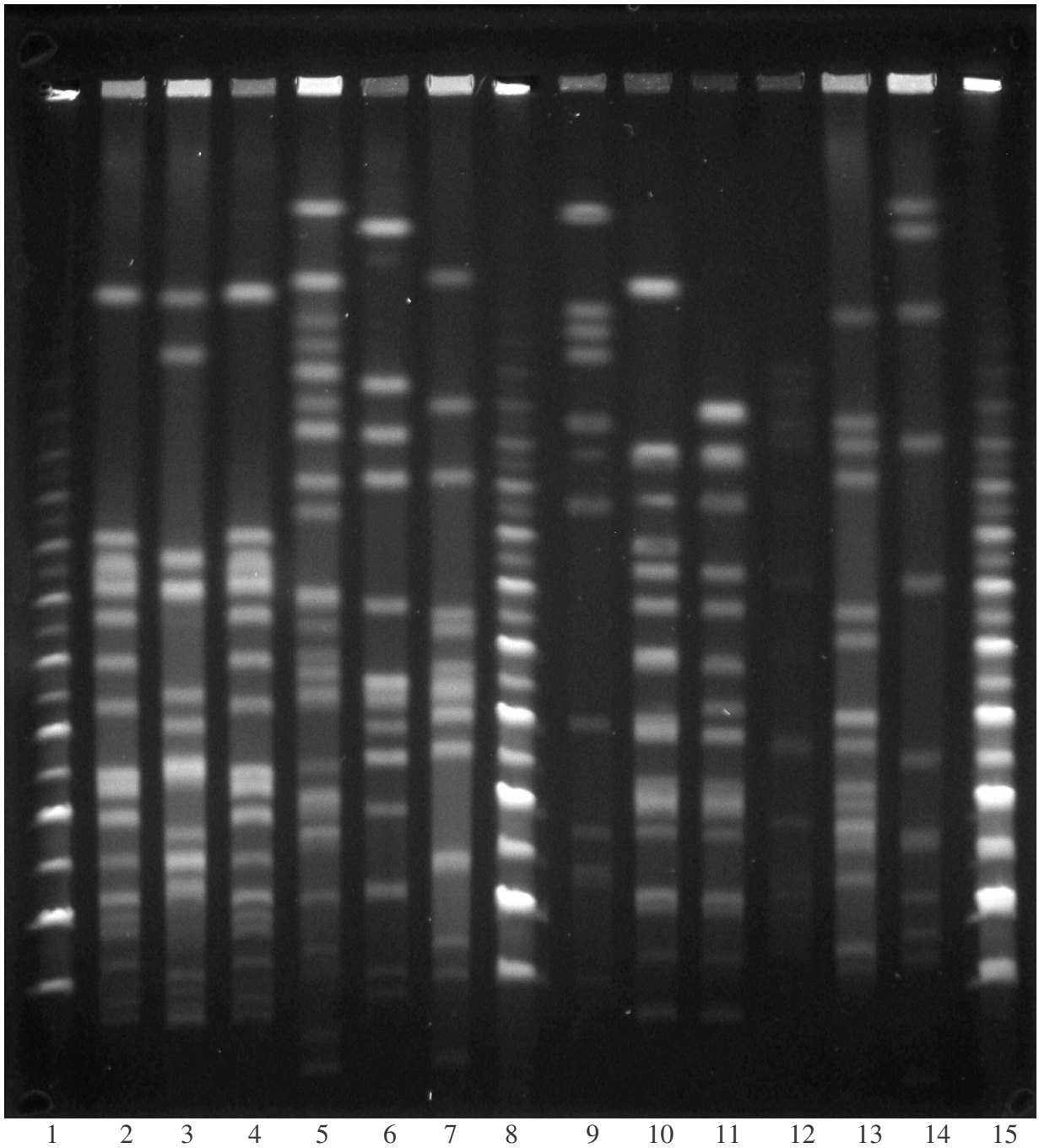


Agaroosigeelielektroforeesin jälkeen kuva NOX-PCR sovelluksesta *B. murdochii*:lle, 14.12.2005
 1. kokomarkkeri (Low Ladder 100-1000bp), 2. *B. murdochii* ATCC 700173, 3. *B. murdochii* ATCC 700173, 4. *B. innocens* ATCC 29796, 5. *B. pilosicoli* ATCC 51139, 6. *B. intermedia* ATCC 51140



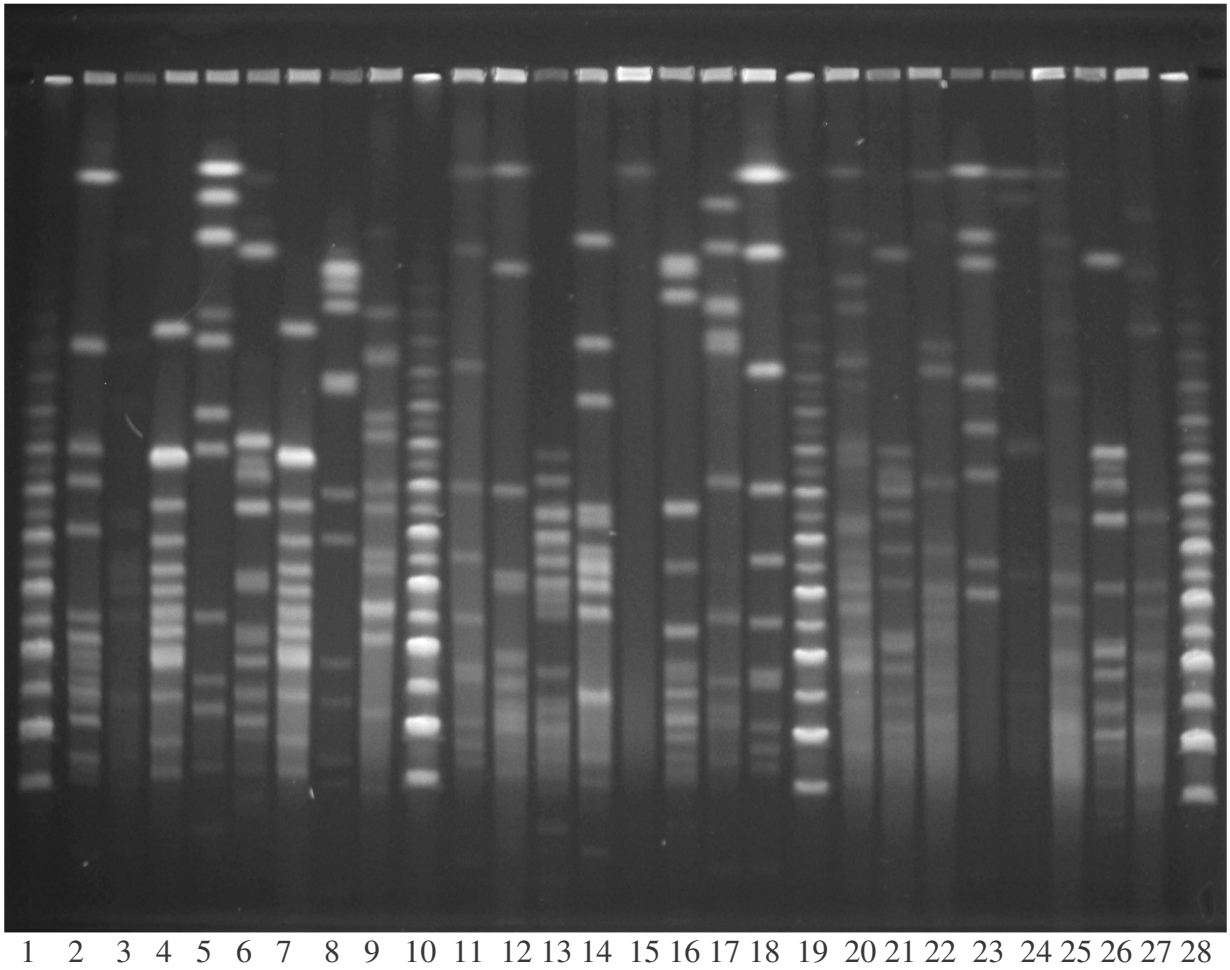
Agaroosigeelielektroforeesin jälkeen kuva NOX-PCR sovelluksesta *B. innocens*:lle, 9.2.2006
 1. kokomarkkeri (Low Ladder 100-1000bp); 2. *B. innocens* ATCC 29796; 3. *B. murdochii* ATCC 700173; 4. 2394; 5. 2395; 6. 2400; 7. 2402; 8. 2406; 9. 2409; 10. 2414; 11. 2417; 12. 2425; 13. 2433; 14. 2437; 15. 2439; 16. 2442; 17. 2446; 18. 2447.

LIITE 6. PFGE-kuvia



Kuva PFGE-analyysistä, 4.1.2006

1. kokomarkkeri(MidRange II); 2. 2357; 3. 2359; 4. 2401; 5. 1949; 6. 1952; 7. 2528; 8. kokomarkkeri(MidRange II); 9. 2460; 10. 2140; 11. 2147; 12. 2356; 13. 2387; 14. 2423; 15. kokomarkkeri(MidRange II)



Kuva PFGE-analyysistä 12.1.2006

1. kokomarkkeri(MidRange II); 2. 2546; 3. 2530; 4. 2531; 5. 2534; 6. 2536; 7. 2538; 8. 2542; 9. 2453; 10. kokomarkkeri(MidRange II); 11. 2385; 12. 2344; 13. 2365; 14. 2529; 15. 2152; 16. 2235; 17. 2237; 18. 2337; 19. kokomarkkeri(MidRange II); 20. 2375; 21. 2377; 22. 2378; 23. 2379; 24. 2386; 25. 2388; 26. 2396; 27. 2397; 28. kokomarkkeri(MidRange II)