

***BRACHYSPIRA PILOSICOLI* -BAKTEERIN OSOITTAMINEN SIAN
ULOSTEESTA KVANTITATIIVISELLÄ PCR:LLÄ**

Hannu Torssonen
Pro gradu -tutkielma
Itä-Suomen yliopiston luonnontieteiden ja
metsätieteden tiedekunta, biotiede
Toukokuu 2013

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta, biotiede

TORSSONEN, HANNU T.: *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin osoittaminen sian ulosteesta kvantitatiivisella PCR:llä

Opinnäytetyön ohjaajat: dosentti Maria Halmekytö (UEF)

FM Sirpa Heinikainen (Evira, Eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö)

Anaerobinen suolistobakteeri *Brachyspira pilosicoli* on usealla eläinlajilla ja myös ihmisellä tavattava taudinaiheuttaja. Taloudellisesti merkittävin sairaus on sikojen spirokeettaripuli, jota esiintyy nuorilla sioilla sikakasvattamoissa. Tauti ei yleensä aiheuta kuolleisuutta, mutta hidastaa sikojen kasvua. Porsastuotantotilalla *B. pilosicoli* -tartunta voi olla myös oireeton ja bakteeria esiintyykin yleisenä ympäri maailman. Spirokeettaripulia voi pahentaa sekatarjunnat muiden bakteerien kanssa. *Brachyspira pilosicolin* hävittäminen porsastuotantotilalta on vaikeaa sen useiden isäntälajien ja fysikaalisten ominaisuuksien vuoksi.

Perinteisessä laboratoriodiagnostiikassa bakteerin osoittaminen on vaatinut viljelyn puhdaskasvuksi, mikä voi kestää jopa 2–4 viikkoa. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR-menetelmä mahdollistaisi nopean spesifisen bakteerin toteamisen suoraan ulosteesta, millä saataisiin myös olennainen tieto bakteerin määrästä näytteessä.

Tässä työssä suunniteltiin ja optimoitiin kaksi erilaista koettimeen perustuvaa PCR-menetelmää suoraan ulosteesta eristetylle DNA:lle. Hybridisaatiokoettimen kohteena käytettiin bakteerin 16S rDNA:ta ja hydrolyysikoettimen 23S rDNA:ta. Menetelmien optimoinnin jälkeen valmistettiin standardinäytteet, joilla määritettiin herkkyys. Menetelmät testattiin vielä oireettomista sioista otetuilla ulostenäytteillä, joista osasta kuitenkin perinteisillä diagnostiikkametodeilla oli osoitettu *B. pilosicoli*.

Työssä onnistuttiin kehittämään spesifinen kvantitatiivinen PCR-menetelmä *B. pilosicolin* toteamiseen, minkä herkkyys on tiedossa (1×10^6 bakt./g ulostetta). Herkkyyttä heikentää ulosteen suuri määrä PCR-inhibiittoreita ja DNA:n eristyksen tehottomuus.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Natural and Forest Sciences,
Biosciences

TORSSONEN, HANNU T.: Quantification of *Brachyspira pilosicoli* bacteria from pigs' feces by real-time quantitative PCR

Supervisors: Docent Maria Halmekytö (UEF)

MSc Sirpa Heinikainen (Finnish Food Safety Authority Evira, Veterinary
Bacteriology Research Unit)

The anaerobic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* is pathogenic for various animal species and humans. From the economic perspective, porcine intestinal spirochaetosis (PIS) is of great importance to animal husbandry and it is recognized worldwide. PIS causes non-fatal diarrhoea in young pigs and reduces the weight gain of the pigs. The infection can be fairly silent or it can be co-infected with other enteric pathogens. The eradication of *Brachyspira pilosicoli* from herds is difficult because of the risk of reinfections from wide range of carriers.

Traditionally the detection of *B. pilosicoli* has required isolation of bacteria from faecal sample to pure subculture, which can take 2–4 weeks. Quantitative real-time PCR could provide a fast and sensitive method to detect and quantify *Brachyspira pilosicoli* in faecal sample.

In this study two different probe-based quantitative real-time PCR methods for faecal samples were designed and optimized. The target for the hybridization probe was 16S rDNA and for the hydrolysis probe 23S rDNA. After optimizing methods, the sensitivity limits of detection were tested with spiked samples. The methods were tested with samples from pigs that had no clinical symptoms of spirochetosis, but of which some had been tested positive to *Brachyspira pilosicoli* by traditional detection methods.

The study was successful for developing specific quantitative real-time PCR method for detection of *Brachyspira pilosicoli*. The quantification limits were 1×10^6 *B. pilosicoli* bacteria/g feces. The method sensitivity was limited by great amount of PCR inhibitors in the faecal samples and poor efficiency of DNA extraction.

LYHENTEET

AFLP	engl. <i>amplified fragment length polymorphism analysis</i> , monistettujen fragmenttien pituuspolyformia-analyysi, DNA-pohjainen genotyypitysmenetelmä
AIS	engl. <i>avian intestinal spirochaetosis</i> , lintujen suolistospiroketoosi
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i> , amerikkalainen tyyppikantakokoelma
BHI	engl. <i>brain heart infusion</i> , aivoista ja sydämestä valmistettu elatusaine
CVSBA	engl. <i>colistin-, vancomycin- and spectinomycin-containing blood agar</i> , kolistiinia, vankomysiinia ja spektinomysiinia sisältävä veriagar
DOGS	engl. <i>database of genome sizes</i> , genomikokojentietokanta
FAA	engl. <i>fastidious anaerobe agar</i> , vaativien anaerobien agar
FISH	engl. <i>fluorescent in situ hybridization</i> , <i>in situ</i> -fluoresenssihybridisaatio, kudostai soluvalmisteille käytettävä hybridisaatioanalyysimenetelmä, jossa käytetään fluoresoivia merkkiaineita
FRET	engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> , fluoresenssin resonanssienergian siirto
HIS	engl. <i>human intestinal spirochaetosis</i> , ihmisen suolistospiroketoosi
MLEE	engl. <i>multilocus enzyme electrophoresis</i> , multilokusentsyymielektroforeesi, proteiineihin perustuva bakteerien tyyppitysmenetelmä
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i> , Yhdysvaltojen kansallinen bioteknologian tietokeskus
PFGE	engl. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i> , pulssikenttägeelielektroforeesi
PIS	engl. <i>porcine intestinal spirochaetosis</i> , sikojen suolistospiroketoosi
WBHIS	engl. <i>weakly β-haemolytic intestinal spirochaete</i> , heikosti β -hemolyyttinen suolistospirokeetta

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	8
2.1	<i>Brachyspira</i> -bakteerit	8
2.1.1	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	9
2.1.2	Muista brakyspiralajeista	10
2.2	<i>Brachyspira pilosicoli</i>	12
2.2.1	Epidemiologia	13
2.2.2	PIS (Porcine Intestinal Spirochaetosis)	13
2.2.3	HIS (Human Intestinal Spirochaetosis)	14
2.2.4	<i>Brachyspira pilosicoli</i> muilla eläinlajeilla	15
2.2.5	Tutkimusmenetelmiä	16
3	TYÖN TAVOITTEET	21
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	21
4.1	Bakteerikannat ja näytteet	21
4.2	DNA:n eristäminen bakteereista	21
4.3	DNA:n eristäminen ulosteesta	22
4.4	Reaaliaikainen PCR	23
4.4.1	PCR-alukkeiden ja koettimien suunnittelu	23
4.4.2	Alukkeiden ja koettimien testaus	27
4.4.2.1	Brapilo- ja Braall-alukkeet sekä Pilo-hybridisaatiokoetin	27
4.4.2.2	SP Pitkä -alukkeet	32
4.4.2.3	SP 23S -alukkeet ja Pilo 23sTaq -hydrolyysikoetin	33
5	TULOKSET	35
5.1	Brapilo- ja Braall-alukkeet sekä Pilo-hybridisaatiokoetin	35
5.2	SP Pitkä -alukkeet	40
5.3	SP 23S -alukkeet ja Pilo 23sTaq -hydrolyysikoetin	41
6	POHDINTA	44
7	LÄHDELUETTELO	50

1 JOHDANTO

Brachyspira pilosicoli -bakteeri on suolistospirokeettoihin kuuluva spirokeettaripulin taudinaiheuttaja, ja taloudellisesti sen suurimmat merkitykset aiheutuvat sikakasvattomoissa tuotantotappioiden kautta. Spirokeettaripuli ilmenee porsaiden heikkona kasvuna ja huonona rehuhyötysuhteena. *B. pilosicoli* -bakteerin ongelmallisuutta sikakasvatuksessa lisää sen vaikeaa hävittäminen tiloilta ja sekatarhunnat muiden taudinaiheuttajien kanssa. Tietämys *B. pilosicoli* -bakteerista on kasvanut vasta viime vuosikymmeninä, ja sen esiintyvyydestä sekä merkittävydestä taudinaiheuttajana eri eläinlajeilla on vielä huomattavasti selvitettävää. *B. pilosicoli* -bakteeri on *Brachyspira*-heimosta vasta toinen myös ihmisillä todettu taudinaiheuttaja.

Brachyspira pilosicoli -bakteerin diagnostiikka on edistynyt pääasiassa sikadysenterian taudinaiheuttajan *B. hyodysenteriae* -bakteerin diagnostiikan kehittyessä. Perinteisessä brakyspirojen lajidiagnostiikassa bakteerit on eristetty maljalle viljelystä ulostenäytteestä, minkä jälkeen lajimääritys on tehty biokemiallisilla testeillä ja hemolyysiasteen vertailulla. Diagnoosin suorittaminen maljaviljelyllä vaatii kuitenkin huomattavasti aikaa (2–5 viikkoa), laadukkaan näytteen ja se ei kerro *B. pilosicoli* -bakteerin kohdalla tärkeää tietoa bakteerin määrästä. Ulosteen bakteerin määrästä voitaisiin arvioida, onko *B. pilosicoli* -bakteeri primaaritaudinaiheuttaja vai onko kyseessä sekatarhunta toisen taudinaiheuttajan kanssa. Viljelyssä lajimääritystä vaikeuttaa myös brakyspirojen sekakasvut ja bakteerikantojen väliset biokemialliset poikkeavuudet.

Konventionaaliset PCR-menetelmät on todettu suurilla näytemäärillä spesifisemmiksi kuin maljaviljely *B. pilosicoli* -bakteerin toteamiseksi (Brooke 2003). Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-menetelmä suoraan ulostenäytteestä mahdollistaisi nopean diagnoosin ja antaisi lisäksi tiedon bakteerin määrästä ulosteesta. Kvantitatiivisella PCR:llä myös laboratoriokontaminaatoriski laskee konventionaaliseen PCR:ään verrattuna, koska PCR-reaktion jälkeen putkia ei tarvitse enää avata.

Tämän työn tavoitteena oli kehittää reaaliaikainen PCR-menetelmä *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin kvantitatiiviseen osoittamiseen sikojen ulosteesta. Tavoitetilassa menetelmän spesifisyys olisi 100 %, detektiokynnys tunnettu ja menetelmä rutiinikäytössä. Detektiorajan

olisi oltava viljelyä herkempi ja tutkimuksen suorittaminen tulisi onnistua tunneissa verrattuna viikkoja kestävään maljaviljelyyn.

B. pilosicoli -bakteerin 16S rDNA eroaa muista tunnetuista brakyspiroista huomattavasti, mikä mahdollistaa lajispesifisen PCR:n kehittämisen. Konventionaalisissa *B. pilosicoli* -PCR-menetelmissä 16S rDNA -sekvenssin sisältämä uniikki TTTTTT-jakso on yleensä sisällytetty toiseen alukkeeseen. Tässä tutkimuksessa suunniteltiin ja kehitettiin TTTTTT-jaksoon spesifinen hybridisaatiokoetin ja sille soveltuvat alukkeet. Rinnalla kehitettiin 16S rDNA:n myös reaaliaikaista PCR-menetelmää ilman koetinta, sekä hydrolyysikoettiin perustuvaa menetelmää 23S rDNA:lle, minkä alukkeet tiedettiin spesifisiksi (Leser ym. 1997). Tämä työ keskittyy näiden menetelmien kehitykseen ja testaukseen.

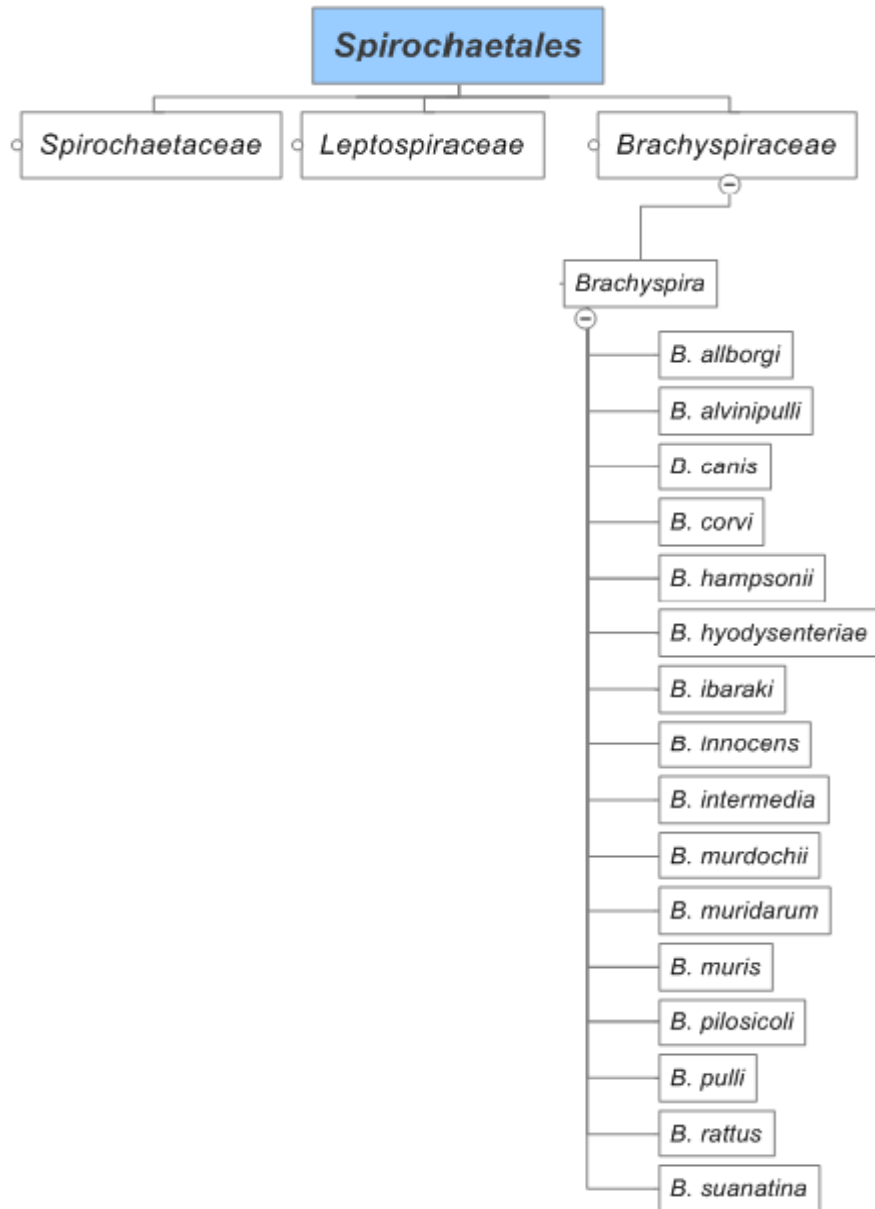
2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Brachyspira*-bakteerit

Taksonomisesti *Brachyspira*-suvun bakteerit kuuluvat *Spirochaetales*-luokkaan ja sen sisällä *Brachyspiraceae*-heimoon. *Spirochaetales*-luokka käsittää *Brachyspiraceae*-heimon lisäksi *Spirochaetaceae*- ja *Leptospiraceae*-heimot (Kuva 1) (Paster & Dewhirst 2000, Brooke 2003 mukaan). Suomessa tunnetuimpia spirokeettoja ovat ihmiselle borrelioosia aiheuttava *Borrelia burgdorferi* ja kuppaa aiheuttava *Treponema pallidum*. Suomea lämpimämmissä maissa leptospiirat ovat huomattavia taudin aiheuttajia. Vaikka leptospiirat ovat primaarisesti eläinten patogeenejä, ovat tavallisimmat lajit kuitenkin zoonoottisia, kuten esimerkiksi *L. interrogans* (Seppälä ym. 2003). Suomessa vakavaa kuumetautia leptospiroosia diagnosoidaan korkeintaan pari kertaa vuodessa.

Brachyspira-suvun bakteerit ovat anaerobisia, löyhän spiraalin muotoisia suolistobakteereja (Fossi 2000). Anaerobisuudestaan huolimatta brakyspiroille on mahdollista metaboloida pieniä määriä happea NADH-oksidaasia käyttäen, mikä mahdollistaa bakteerien selviytymisen myös heikossa happialtistuksessa (Stanton 1997, Fossi 2006 mukaan). Suolistospirokeetat ovat uniikin solurakenteen ja 4–28 periplasmisen flagellansa vuoksi erittäin liikkuvia bakteereja nestemäisessä, korkean viskositeetin ympäristössä (Holt ym. 1994, Brooke 2003 mukaan).

Brachyspira-suvun bakteereihin kuuluu taudinaiheuttajia sekä suoliston normaaliflooran bakteereja. Brakyspiralajeista monen merkitys on vielä epäselvä ja luultavasti kaikkia ei ole vielä löydetty tai määritetty erillisiksi lajeiksi. *Brachyspira*-suvun bakteerien tutkimus käynnistyi toden teolla vasta 1970-luvulla niiden eristys- ja viljelymenetelmien kehittymisen myötä (Fossi 2000). *Brachyspira*-suku sisältää tällä hetkellä 16 tunnettua lajia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>), jotka on esitetty kuvassa 1. Tunnetuin ja ensimmäinen eristetty *Brachyspira*-suvun taudinaiheuttaja on *B. hyodysenteriae*, joka aiheuttaa sikadysenteriaa.



Kuva 1. *Spirochaetales*-luokan sukupuu ja vuoteen 2013 mennessä tunnetut brakyspiralajit (The NCBI taxonomy database).

2.1.1 *Brachyspira hyodysenteriae*

B. hyodysenteriae voi aiheuttaa verisen ja kuolioisen paksusuolitulehduksen sioilla eli sikadysenterian (Fisher & Olander 1981, Fossi 2000 mukaan). Sikadysenteria on nuorten sikojen tauti, ja se voi hoitamattomana aiheuttaa jopa 50 prosentin kuolleisuuden, mutta kroonistuessaan tilalla tartunta yleensä vain heikentää eläinten kasvua ja hyvinvointia. Kliinisinä oireina sairauden alussa ilmaantuu ripulia, johon myöhemmin sisältyy verta.

Ensimmäiset tieteelliset kuvaukset sikadysenteriasta tehtiin 1900-luvun alkupuolella, mutta vasta vuonna 1971 Taylor & Alexander todistivat spirokeetan sikadysenterian aiheuttajaksi tartutuskokeellaan. Sikadysenteriaa tavataan sikaloiden vitsauksena maailmanlaajuisesti, ja se aiheuttaa huomattavia tuotantotappiota. Sikadysenteriaa tavataan myös Suomessa, mutta nykyisin enää vain harvakseltaan.

B. hyodysenteriae -bakteerin pääasiallinen isäntäeläin on sika, mutta kokeellisesti on onnistuttu tartuttamaan useita eri eläinlajeja, muun muassa hiiriä, marsuja ja kananpoikia (Brooke 2003). Bakteerin tarttuminen voikin olla mahdollinen jonkin vektorin välityksellä tai suoralla fekaalialtistuksella.

Verrattuna suureen osaan muita brakyspiroja *B. hyodysenteriae* on poikkeavan voimakkaasti hemolyyttinen eli punasoluja hajottava. Tämä ominaisuus näkyy hyvin kasvatettaessa bakteeria verta sisältävällä agarmaljalla. Bakteerikasvun ympäriltä agar kirkastuu läpinäkyväksi, kun taas muut brakyspiralajit aiheuttavat epätäydellisen hemolyysin. Voimakas hemolyyttisyys on yksi bakteerin patogeneisuustekijöistä.

B. hyodysenteriae -bakteerin hävittämistä sikatiloilta vaikeuttaa sen kolonisoituminen myös muihin eläimiin, ensi sijassa jyrsoihin (Fossi 2000; Joens & Kinyon 1982). Bakteerin on tutkimuksissa todettu myös säilyvän tartuntakykyisenä jopa seitsemän päivää ulosteissa, huolimatta sen anaerobisuudesta (Harris ym. 1999, Brooke 2003 mukaan). Tilojen saneeraaminen bakteerista on kuitenkin mahdollista yhdistämällä antibioottihoitoa, tilojen desinfiointia sekä yleistä hygieniatason kohotusta. Suomessa saneeraaminen on pääsääntöisesti onnistunut hyvin (Fossi 2000, Rabb 2003).

2.1.2 Muista brakyspiralajeista

Brachyspira innocens on nimensä mukaisesti ei-patogeeninen *Brachyspira*-suvun suolistospirokeetta. Laji löydettiin sikadysenteriaa tutkittaessa, mutta jatkotutkimuksissa sen ei ole todettu olevan taudinaiheuttaja (Kinyon & Harris 1979, Brooke 2003 mukaan). *Brachyspira innocens* on yleisesti tavattu brakyspira sioilla.

Brachyspira intermedia muistuttaa biokemiallisilta ominaisuuksiltaan *B. hyodysenteriae* bakteeria, mutta eroaa siitä heikommin hemolysoivana. *B. intermedia* bakteeria on löydetty sioilta ja siipikarjasta. Siipikarjalle *B. intermedia* on todistetusti patogeeni, aiheuttaen heikentynyttä munien tuottoa (McLaren ym. 1997), mutta sialla bakteerin patogeenisuus on vielä kiistanalainen.

Brachyspira murdochii on yleisesti tavattava brakyspira terveillä sioilla, koe-eläinrotilla (Trott ym. 1996) ja linnuilla (Skrzypczak ym. 2007). *B. murdochii* -bakteeria pidetään sialla potentiaalisena patogeeninä (Jensen TK ym. 2005), mutta siitä tarvitaan vielä lisää tutkimusta.

Brachyspira aalborgi on edelleen vajavaisesti tunnettu brakyspiralaji, vaikka se löydettiin jo vuonna 1982 (Hovind-Hougen ym. 1982). *B. aalborgi* on morfologisesti melko helposti erottuva muista tunnetuista brakyspiroista, ja sen erityispiirteenä voidaan pitää isäntäeläinten rajoittuminen ihmisiin ja muihin kädellisiin nisäkkäisiin. *Brachyspira aalborgi* on ihmisen suolistospiroketoosin yksi tunnettu aiheuttaja.

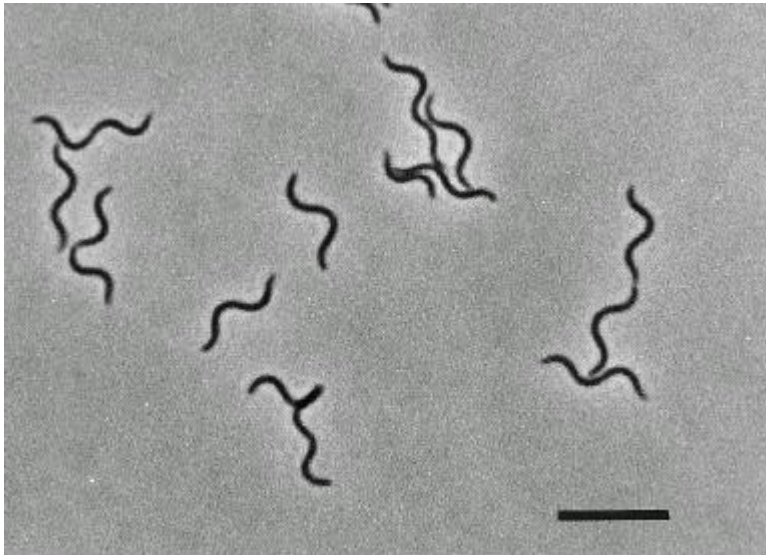
Brachyspira alvinipulli on siipikarjasta tavattu brakyspira. Sen on todettu aiheuttavan altistuskokeissa kanoilla lieviä suolisto-ongelmia (Swayne ym. 1995). *Brachyspira pulli* taas on melko uusi brakyspira-löytö, joten siitä tiedetään vielä hyvin vähän. Se eristettiin vuonna 1997 australialaisista kanoista (McLaren ym. 1997) ja on mitä ilmeisimmin ei-patogeeninen.

Brachyspira canis on koirista eristetty brakyspira, ja siitä tiedetään vielä melko vähän. Bakteeria on löydetty muun muassa terveistä koiranpennuista, joten sen ei uskota kuuluvan taudinaiheuttajiin (Oxberry & Hampson 2003). Bakteeri on eristetty myös useista suomalaisista koirista (Skrzypczak ym. 2007).

Brachyspira suanatina on äskettäin tunnistettu, *B. hyodysenteriae* -bakteerien tavoin voimakkaasti hemolysoiva brakyspira, mutta geneettisesti dysenteriabakteerista selvästi eroava. Sitä on todettu Ruotsissa sioilla ja sorsilla. Kokeellisesti se aiheuttaa sialla ripulia, mutta ei yhtä vakavaa tautia kuin *B. hyodysenteriae* (Råsbäck ym. 2007).

2.2 *Brachyspira pilosicoli*

Brachyspira pilosicoli on brakyspiroista pienimpiä, vain 5–12 µm pituudeltaan ja 0.19–0.30 µm halkaisijaltaan. Sillä on myös muihin brakyspiroihin verrattuna vähemmän periplasmisia flagelloita (4–7 kpl) (Lee ym. 1993; Trott ym. 1996). *Brachyspira pilosicoli* -bakteeri omaa rakenteeltaan *Brachyspira*-suvulle tyypillisen ”korkkiruuvi”-muodon (Kuva 2). *B. pilosicoli* kuuluu heikosti β-hemolyyttisiin suolistospirokeettoihin (WBHIS), useimpien brakyspiralajien kaltaisesti.



Kuva 2. *Brachyspira pilosicoli* -bakteereja kuvattuna faasikontrastimikroskoopilla (Trott ym. 1996). Kuvassa palkin pituus 7 µm.

Brachyspira pilosicoli -bakteerilla on värikäs nimihistoria. Vuonna 1993 eristettiin uusi brakyspiralaji, joka erottui silloin tunnetuista *B. hyodysenteriae* ja *B. innocens* -lajeista. (Lee ym. 1993). Bakteeri nimettiin tällöin *Anguillina coli* -bakteeriksi, kunnes vuonna 1996 16S rDNA:n analyysillä se palautettiin silloisiin *Serpulina*-suvun bakteereihin nimellä *Serpulina pilosicoli*. Nykyisin *Serpulina*-suvun bakteerit on yhdistetty *Brachyspira*-sukuun.

2.2.1 Epidemiologia

Brachyspira pilosicoli on tunnettuna taudin aiheuttajana melko tuore, koska vasta vuonna 1980 Taylor ym. osoittivat heikosti β -hemolyyttisen brakyspiran aiheuttavan ripulia sioilla. Tätä ennen brakyspiroista oli tunnettu taudin aiheuttajana vain *B. hyodysenteriae*. (Fossi 2000).

Brachyspira pilosicoli -bakteerilla on suolistospirokeetoista laajin isäntäkirjo ja sitä on eristetty useista koti- ja villieläimistä. (Trott 1996). *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin on myös *Brachyspira aalborgi* -bakteerin ohella todettu aiheuttavan ihmiselle suolistospiroketoosia (HIS). Tartunta eläinlajeista toiseen on mahdollinen ja tapahtuu yleensä ulosteella kontaminoituneesta ravinnosta tai vedestä.

2.2.2 PIS (Porcine Intestinal Spirochaetosis)

Brachyspira pilosicoli -bakteerin aiheuttamaa spirokeettaripulia on tutkittu eniten sioilla ja se tunnistettiin omaksi taudikseen 1980-luvulla (Taylor 1980, Fossi 2000 mukaan). Spirokeettaripuli on sikadysenteriaa lievempi ja yleensä se ei aiheuta kuolleisuutta (Fossi 2000). Spirokeettaripuli aiheuttaa kuitenkin huomattavia taloudellisia tappioita hidastamalla sikojen kasvua ja heikentämällä rehuhyötysuhdetta.

Spirokeettaripuli ilmenee yleensä vetisenä ripulina, jonka oletetaan liittyvän *B. pilosicoli* -bakteerin kertymisestä suoliston pinnalle, jolloin passiivinen nesteiden imeytyminen estyy (Hampson & Trott 1995, Brooke 2003 mukaan). *B. pilosicoli* -bakteerin virulenssitekijät ovat kuitenkin vielä hyvin epäselvät ja vaativat lisätutkimuksia. Spirokeettaripulia voi pahentaa sekatarjunnat muiden bakteerien kanssa, esimerkiksi *Salmonella*- ja *Yersinia*-suvun bakteerit (Thomson ym. 1998), sekä *Lawsonia intracellularis* -bakteeri (Jacobson ym 2003, Fossi 2003 mukaan).

Spirokeettaripulin aiheuttajaa *Brachyspira pilosicoli* -bakteeria tavataan sikaloissa maailmanlaajuisesti. Suomessa vuonna 1997 tehdyssä tutkimuksessa 14:sta sikalasta 50:stä löydettiin *Brachyspira pilosicoli* -bakteeria (Heinonen ym. 2000).

Brachyspira pilosicoli -bakteerin eradikaatio yksittäisestä sikalasta on huomattavasti vaikeampaa kuin *B. hyodysenteriae* -bakteerin (Duhamel ym. 1998). Syitä voi olla muun muassa se, että *B. pilosicoli* on enemmän happea ja pH:n vaihteluita kestävä kuin *B. hyodysenteriae*. *Brachyspira pilosicoli* -bakteeria voidaan torjua useilla antibiooteilla, mutta antibioottihoito tulee yhdistää muihin puhdistaviin toimenpiteisiin, koska infektion uusiutumisen vaara on suuri. Suomessa tehdyssä raportoidussa *B. pilosicoli* -saneerauksessa onnistuttiin hyvin. (Fossi ym. 2001).

2.2.3 HIS (Human Intestinal Spirochaetosis)

Ihmisen suolistospiroketoosilla (HIS) on kaksi tunnettua aiheuttajaa: *B. pilosicoli* ja *B. aalborgi*. *B. aalborgi* -bakteeri on taudinaiheuttajana yleisempi kehittyneissä maissa ja *B. pilosicoli* -bakteeri kehitysmaissa, joissa ihminen elää kotieläinten kanssa hyvin läheisesti ja puhtaan veden saanti on heikkoa (Brooke 2003). Ihmisen suolistospiroketoosin yleisyys vaihtelee huomattavasti maakohtaisesti, mikä johtunee ainakin osin siitä, että bakteerin tunnettuus vaihtelee eri maissa. Tautia on kuitenkin todettu maailmanlaajuisesti.

Kehittyneissä maissa suolistospiroketoosia tavataan yleensä ihmisillä, joilla on entuudestaan heikentynyt immunitetti. Suolistospirokeettoja tavataankin ihmisillä, joilla on jokin muu perustauti, esimerkiksi AIDS (Lindboe ym. 1993; Lee & Hampson 1994, Fossi 2000 mukaan). Homoseksuaalisilla miehillä suolistospirokeettoja tavataan myös muuta väestöä useammin, minkä oletetaan johtuvan suolen mekaanisista vaurioista ja bakteerin helposta leviämisestä anal-oral-seksuaalisessa kanssakäymisessä (Law ym. 1994, Brooke 2003 mukaan). Myös maahanmuuttajat tuovat varsinkin *B. pilosicoli* -bakteeria mukanaan kehittyneihin maihin.

Kehitysmaissa suolistospirokeettoja tavataan ihmisillä ilman heikentynyttä immunitettiäkin. Kehitysmaissa bakteerin leviämisen syy on usein ulosteella kontaminoitunut vesi tai ravinto.

B. pilosicoli -bakteerin laajan isäntäspektrin oletetaan olevan osasyllinen tartuntoihin, ja bakteerin zoonoottisuus onkin tärkeä tulevaisuuden tutkimuksen kohde. Merkittävimmän tartuntariskin aiheuttaa kuitenkin jonkun perheenjäsenen infektio (Munshi ym. 2004, Smith 2005 mukaan).

Valtaosa *B. pilosicoli*- ja *B. aalborgi* -infektioista ihmisellä on oireettomia (Smith 2005). Ihmisen suolistospiroketoosiin sairastuneella yleisiä oireita ovat vatsakipu ja verensekainen ripuli (Harland & Lee 1967). Pahimmillaan suolistospiroketoosi voi oireilla pitkään, kuukausia tai jopa vuosia, aiheuttaen painon laskua. Spirokeetat ovat kuitenkin usein ihmisen taudinaiheuttajina ”vahinkolöydöksiä” niiden huonon tuntemuksen vuoksi.

2.2.4 *Brachyspira pilosicoli* muilla eläinlajeilla

Brakyspiroja on tavattu lukuisista muistakin eläinlajeista kuin ihmisiltä ja sioilta. Taloudellisesti merkittävimpänä *B. pilosicoli* -bakteerin aiheuttamana sairautena muilla eläimillä voidaan pitää siipikarjan suolistospiroketoosia AIS (avian intestinal spirochaetosis). Siipikarjalla *B. pilosicoli* -bakteeria on tavattu muun muassa Australiassa (McLaren ym. 1997), sekä myös äskettäin Suomessa tarhatuilla ankoilla ja sorsilla (Skrzypczak ym 2007) AIS:n aiheuttaja voi olla myös muu brakyspira, esimerkiksi *B. intermedia* tai *B. alvinipulli*. Sairauden oletetaan olevan melko yleinen ja varsin alidiagnosoitu (Smith 2005). Kanoilla spiroketoosin yleisimpiä oireita on vähentynyt muniminen ja munien laadun laskeminen. AIS:lla uskotaan olevan suuria taloudellisia vaikutuksia siipikarjataloudessa.

Brachyspira pilosicoli -bakteeria on löydetty myös koirista Ruotsissa ja Australiassa tehdyissä tutkimuksissa (Fossi 2000), sekä myös Suomessa (Skrzypczak ym. 2007). Suolistospiroketoosi oireilee nuorilla pennuilla kroonisena ripulina, mutta aikuiset yksilöt voivat olla oireettomia kantajia. Koiria pidetään mahdollisena riskinä tartuttaa *B. pilosicoli* bakteeria myös ihmisiin (Smith 2005).

Luonnonvaraisista linnuista on löydetty myös *B. pilosicoli* -bakteeria. Linnut muodostavatkin suuren uhkatekijän siipikarja- ja sikatiloille *B. pilosicoli* -bakteerin tartunnan suhteen (Oxberry ym. 1998, Smith 2005 mukaan). Luonnonvaraisten lintujen pelätään kontaminoivan

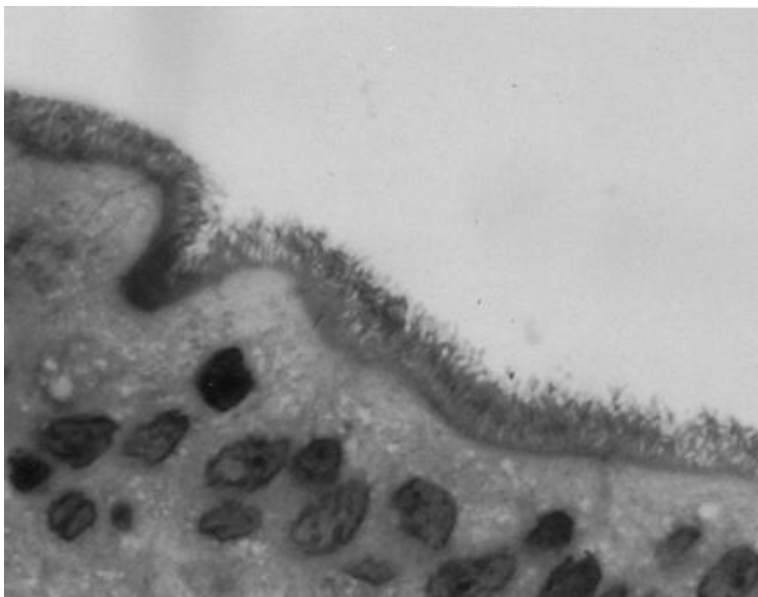
tilojen ruoka- ja vesivarastoja. Suora tartunta ihmiseen on myös mahdollinen riistalintuja käsitellessä.

Brachyspira pilosicoli -bakteerin yleisyydestä jyrksijöissä on vähän tutkimustietoa, mutta bakteeria on kuitenkin löydetty muun muassa lemmikkihamsterista (Helie ym. 2000). *Brachyspira pilosicoli* -bakteeria eristetään jatkuvasti uusista eläinlajeista, ja sitä on löydettykin muun muassa hevosesta (Hampson ym. 2006).

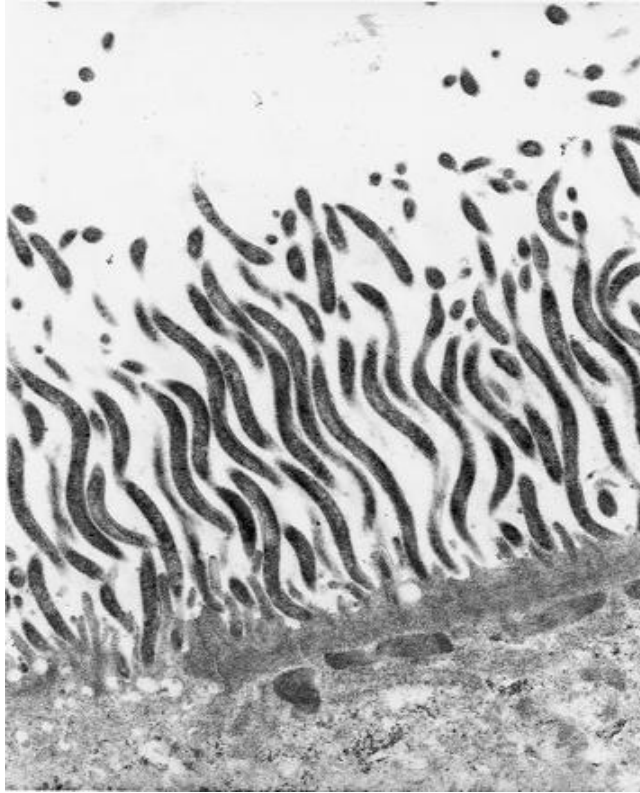
2.2.5 Tutkimusmenetelmiä

B. pilosicoli -bakteerin tutkimusmenetelmien kehitys on yhteydessä suuresti *B. hyodysenteriae* -bakteerin menetelmien kehitykseen. *B. hyodysenteriae* -bakteerin viljelymenetelmien kehittyminen on edistänyt kaikkien brakyspirojen diagnostiikkaa.

Perinteisesti ihmisen suolistospiroketoosi on todettu histologisesta näytteestä, jossa suoliston pinnalle on kertynyt tiiviiksi kerrokseksi spirokeettoja (Kuvat 3 ja 4). Tätä ilmiötä kutsutaan ”false brush border”:iksi, mutta ilmiö joudutaan vielä varmistamaan muilla menetelmillä spirokeettojen aiheuttamaksi (Kraaz ym. 2000).

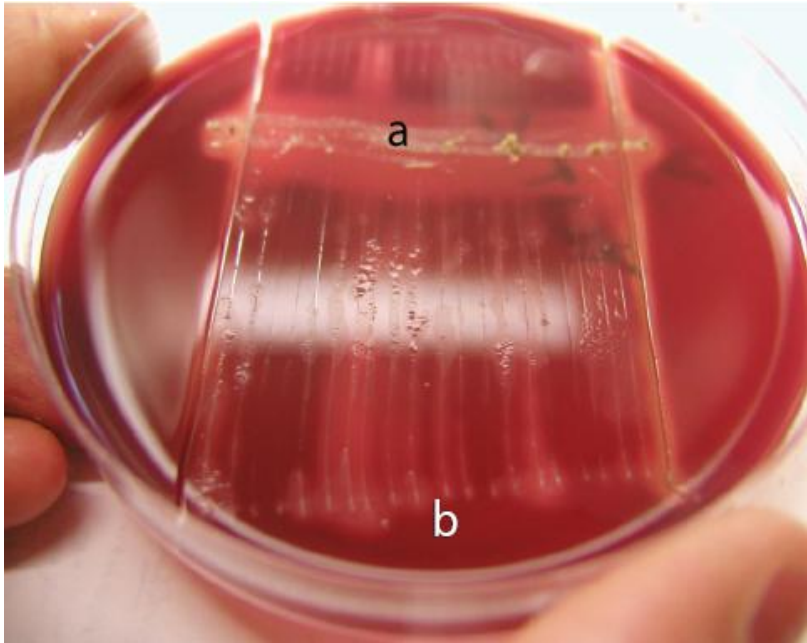


Kuva 3. HE-värjättyssä suolistoleikkeessä mikro-organismien muodostama hapsotus eli ”false brush border” (Kraaz ym. 2000).



Kuva 4. Lämpivalaisuelektronimikroskoopin kuva ”false brush border”:ista 11 000 X suurennoksella. *B. aalborgi* -bakteereja kiinnittyneinä takaosastaan suolistoepiteelin pintaan (Kraaz ym. 2000).

Mikrobiologisesti brakyspiroja on tutkittu viljelemällä ulostenäytteitä maljalle, josta bakteeri on sitten eristetty. Yleisesti käytössä oleva kasvatusmedium on selektiivinen CVSBA (kolistiinia, vankomysiinia ja spektinomysiinia sisältävä veriagar), joka soveltuu kaikkien sioilla tavattavien brakyspirojen etsintään (Jenkinson & Wingar 1981, Fossi 2006 mukaan). Maljan pintaan tehdään viiltoja ennen viljelyä, mikä mahdollistaa spirokeettojen liikkumisen viiltoja pitkin pois ulostenäytteestä (Olson 1996). Viilloilla saavutetaan nopeammin puhtaat jatkoviljelyt. (Kuva 5.)



Kuva 5. *B. pilosicoli* -bakteerin kasvu porsaan ulostenäytteestä. **a.** Ulostenäyteviljely kolmen päivän anaerobisen 42 °C inkuboinnin jälkeen CVSBA-maljalla **b.** *B. pilosicoli* -bakteeri yltänyt kasvussaan maljalle tehtyjen viiltojen päähän. (Fossi 2006.)

Brakyspirat kasvavat maljalla ulkonäöllisesti hyvin lähellä toisiaan, jolloin lajin määrittäminen (fenotyypitys) on tehty biokemiallisilla testeillä ja hemolyysiasteen vertailulla (Taulukko 1) (Fellström & Gunnarson 1995; Fossi 2006). Maljalle viljelyn ja sitä seuraavan biokemiallisiin ominaisuuksiin perustuvan fenotyypityksen heikkoutena on kuitenkin niiden pitkäkestoisuus ja työteliäisyys.

Taulukko 1. *Brachyspira*-bakteerien tärkeimmät biokemialliset erottelutestit ja hemolyysin vertailu

Laji	β -hemolyysi	Indoli	Hippuraatti	α -Galaktosidaasi	β -Glukosidaasi	D-riboosi
<i>B. hyodysenteriae</i>	++	+	-	-	+	-
<i>B. pilosicoli</i>	+	-	+/-	+/-	-	+
<i>B. intermedia</i>	+	+	-	-	+	-
<i>B. murdochii</i>	+	-	-	-	+	-
<i>B. innocens</i>	+	-	-	+	+	-

Useita uusia menetelmiä *B. pilosicoli* -bakteerin ja muiden brakyspirojen nopeampaan diagnostiikkaan on kehitetty, mutta useiden ongelmana on ollut niiden sopimattomuus arkipäiväiseen diagnostiikkaan, esimerkiksi FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) (Podzorski & Persing 1995). Tämän menetelmä etuna olisi bakteerin paikallistaminen kudoksessa, mutta menetelmän herkkyudessa ei ole päästy *B. pilosicoli* -bakteerilla viljelyn tasolle (Jensen 2005, Fossi 2006 mukaan).

B. pilosicoli -bakteerille on kehitetty myös useita PCR-menetelmiä. Menetelmissä on käytetty kohteena bakteerin 16S rDNA:ta (Kraaz ym. 2000), 23S rDNA:ta (Leser ym. 1997) ja NADH-oksidaasin (nox) geeniä (Atyeo ym. 1999). *B. pilosicoli* -kantojen antigeenisestä moninaisuudesta johtuen *B. pilosicoli* -bakteerille ei ole vielä käytössä serologista diagnostiikkamenetelmää (Lee & Hampson 1999, Fossi 2006 mukaan).

Brakyspira-bakteereille tehdään alatyypityksiä useilla eri menetelmillä, kuten MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), AFLP (amplified fragment length polymorphism analysis) ja PFGE (pulsed-field gel electrophoresis). *B. pilosicoli* -bakteerille on erityisen hyväksi todettu PFGE, koska sen DNA ei haitallisesti hajoa prosessissa, kuten muilla brakyspiralajeilla on todettu tapahtuvan (Fossi ym. 2003; Råsbäck ym. 2007).

Eri eläinlajeilta eristettyjä *B. pilosicoli* -bakteereiksi epäiltyjä kantoja on vertailtu sekvensoimalla bakteerin 16S rDNA:ta (Stanton ym. 1996). Eläinlajin sisällä tällä menetelmällä ei ole epidemiologista merkitystä, koska 16S rDNA:n sekvenssien välillä ei ole riittäviä eroja.

3 TYÖN TAVOITTEET

Työn kokeellinen osuus tehtiin osana Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitoksen (EELA, nyk. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira) laajempaa hanketta ”Ripulia aiheuttavat brakyspira-bakteeritartunnat suomalaisilla kotieläimillä 2002–2004” (Maatilatalouden kehittämisrahasto (MAKERA)), jossa kehitettiin *Brachyspira*-suvun bakteerien lajidiagnostiikkaa.

Työn tavoitteena oli kehittää reaaliaikainen PCR-menetelmä *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin kvantitatiiviseen osoittamiseen sikojen ulosteesta.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Bakterikannat ja näytteet

Brachyspira pilosicoli -spesifisten alukkeiden ja koettimien testaukseen, sekä menetelmän optimointiin käytettiin *Brachyspira pilosicoli* ATCC 51139 -kanta (American Type Culture Collection), kolmea *Brachyspira hyodysenteriae* -kanta (ATCC 31212, 27164, 49887), sekä *Brachyspira intermedia* ATCC 51140, *Brachyspira innocens* ATCC 29796 ja *Brachyspira murdochii* ATCC 700173 -kantoja.

Kliinisiä ulostenäytteitä tutkittiin 10 kpl tilalta, jossa tiedettiin olleen *Brachyspira pilosicoli* -bakteeria. Näytteistä viisi oli noin 25 kg:n painoisista, vieroitetuista porsaista, ja viisi noin 45–55 kg:n painoisista lihasioista. Eläimillä ei ollut näytteenottohetkellä selviä ripulioireita. Näytteet käsiteltiin vuorokauden sisällä niiden saapumisesta ja säilytettiin jääkaapissa.

4.2 DNA:n eristäminen bakteereista

B. pilosicoli -bakteerin ja negatiivisten kontrollibakteerikantojen DNA:ta eristettiin suoraan viljelymaljoilta käytettäväksi menetelmän optimointiin. Saadulla DNA:lla testattiin

alukkeiden ja koettimien spesifisyys, määritettiin ajo-olosuhteet ja optimaaliset reagenssien pitoisuudet.

Tutkimuksessa käytetyt kannat säilytettiin EELA:n -70 °C -pakastimessa. Viljely pakkasesta tapahtui FAA-elatusaineelle (fastidious anaerobe agar), jonka jälkeen viljeltyjä maljoja inkuboitiin 42 °C:ssa anaerobisissa olosuhteissa 4–7 vrk.

DNA eristettiin kaupallisella QIAamp DNA Mini Kitillä (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan. Eristetyn DNA:n puhtaus ja pitoisuus tutkittiin spektrofotometrillä (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Konsentraatio varmistettiin silmämääräisesti agarosigeelielektroforeesin avulla ajaen 5 µl DNA-eluaattia geelille.

4.3 DNA:n eristäminen ulosteesta

DNA:n eristykseen ulostenäytteistä käytettiin kaupallista QIAamp DNA Stool Mini Kit -reagenssipakkausta (Qiagen). Pakkauksen avulla oli mahdollista saada kvantitatiiviseen PCR:ään soveltuvaa DNA:ta. Pakkaus on erityisesti suunniteltu ulostenäytteitä varten, joissa on paljon PCR-reaktiota häiritseviä komponentteja. Ulostenäytteistä punnittiin 200 mg ulostetta ja DNA eristettiin DNA Stool Mini Kitin ohjeen mukaan.

Kliinisten näytteiden lisäksi käytettiin *Brachyspira pilosicoli* -bakteerista vapaata sian ulostetta standardien ja negatiivikontrollien valmistamiseen. Käytetty uloste oli aikaisemmin todettu EELA:n tutkimuksissa negatiiviseksi, ja sitä oli säilytetty -20 °C -pakastimessa.

Standardinäytteet valmistettiin *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin liemiviljelystä. Bakteeria istutettiin 10 µl kertakäyttösilman toista puolta käyttäen 10 ml:aan BHI-lientä (brain heart infusion), joka sekoitettiin erittäin hyvin. Välittömästi tästä putkesta otettiin näytettä 0,5 ml:aa 10 ml:aan BHI-fetaalivasikanseerumiputkeen (10 % fetaalivasikanseerumi), minkä jälkeen lientä kasvatettiin 37 °C:ssa anaerobisissa olosuhteissa magneettisekoituksella. Bakteerin kasvutiheyttä seurattiin Bürker-kammiolla laskemalla seuraavina päivinä (3–4 päivää). Samalla tarkasteltiin myös bakteerien liikkuvuutta, kerälle menoa ja mahdollista kontaminoitumista muilla bakteereilla. Bakteerien kasvatusliemestä laimennettiin

standardeihin sopivat bakteeritiheydet 0,9 % NaCl:iin. Laimennukset suunniteltiin niin, että 200 mg:aan *Brachyspira pilosicoli* -bakteerista vapaata ulostetta lisättiin 2 µl haluttua laimennusta (Taulukko 2). Kaikista standardeista tehtiin rinnakkaiset näytteet ja DNA eristettiin DNA Stool Mini Kitillä ohjeen mukaisesti.

Taulukko 2. Liemikasvatuksella valmistetut bakteerisuspensiot ja standardinäytteiden bakteeripitoisuus.

bakteerisuspensio (bakt. / µl)	määrä (µl)	puhdas uloste (mg)	<i>B. pilosicoli</i> -pitoisuus näytteessä (bakt. / mg)
1000000	2	200	10000
100000	2	200	1000
10000	2	200	100
1000	2	200	10

4.4 Reaaliaikainen PCR

4.4.1 PCR-alkukkeiden ja koettimien suunnittelu

B. pilosicoli eroaa fylogeneettisesti muista tunnetuista *Brachyspira*-suvun lajeista enemmän kuin muut brakyspirat keskenään, mikä helpottaa lajispesifisten PCR-sovellusten kehittämistä (Park ym. 1995, Stanton ym. 1996, Pettersson ym. 1996). Monistuskohdeina PCR:ssä on käytetty 16S rDNA:ta ja 23S rDNA:ta. Tässä tutkimuksessa suunniteltiin alukkeet ja spesifinen hybridisaatiokoetin *B. pilosicoli* -bakteerin 16S rDNA:lle ja hydrolyysikoetin 23S rDNA:lle.

Brachyspira pilosicoli -bakteerin 16S rDNA -sekvenssi sisältää uniikin TTTTTT-jakson (Kuva 6), joka konventionaalisessa *B. pilosicoli* -PCR:ssä on yleensä sisällytetty toiseen alukkeeseen.

<i>Brachyspira pilosicoli</i>	GCTACATAAG TAGAGTAGAG GAAAGTT–T TTTTCGCTTCA
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	GCTACATAAG TAGAGTAGAG GAAAGGAGCA ATCCGCTTTA
<i>Brachyspira murdochii</i>	GCTACACAAG TAGAGTAGAG GAAAGGAGCG ATCCGCTTTA

Kuva 6. *B. pilosicoli* 16S rDNA TTTTTT-jakson erottuminen muista brakyspiroista.

Tässä työssä TTTTTT-jaksoon suunniteltiin spesifinen hybridisaatiokoetin ja sille toimivat alukkeet. Ideaalilanteessa sekä alukkeet ja niille suunniteltu koetin olisivat *B. pilosicoli* -spesifiset. Alukkeita suunnitellessa lähtökohtana oli saada PCR-tuotteen maksimikooksi noin 200 bp ja sisältämään uniikin TTTTTT-jakson. Sopivia alukkeita haettiin Primer3-ohjelmalla (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), jonka tarjoamia alukepareja otettiin jatkotarkasteluihin. Alukkeiden valintaan vaikuttivat sopivan sulamislämmön määrittäminen ja dimeerien muodostumisen välttäminen, mitä tarkasteltiin Beacon Designer 2.0 (Premier Biosoft International)- ja Oligonucleotide Analyzer (<http://www.mature.com/oligonucleotide.html>) -ohjelmilla. Valituilla alukepareilla tehtiin haut Blastilla (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), jolla varmistettiin, että alukkeet eivät monista ei toivottujen bakteerien DNA:ta.

Alukkeiden valinnan jälkeen suunniteltiin PCR-tuotteen sisältämään TTTTTT-jaksoon hybridisaatiokoetin. Koettimen tulee olla spesifinen *B. pilosicoli* -bakteerille, ja sulamislämmön on oltava noin 5–10 °C korkeampi kuin alukkeilla. Hybridisaatiokoettimen osien välille tulee jäädä 1–5 nukleotidiä FRET-ilmiön (fluorescence resonance energy transfer) mahdollistamiseksi. Braall- ja Brapilo-alukkeille suunnitellussa Pilo-koettimessa osien väliin jää kaksi emästä (Kuva 7).

Ilman koetinta käytettäväksi suunniteltiin SP Pitkä -alukkeet, joiden F-osa sijoittuu osittain *B. pilosicoli* -bakteerin TTTTTT-jaksoon (Kuva 7). PCR-tuote detektoitiin kaksisäikeiseen DNA:han sitoutuvalla SYBR Green -värillä.

1 tgatcctggc tcagagcгаа cgttgгgat gcgtcttaag catgcaagtc gagcgggctt

61 attcgggcaa ctggataagt tagcggcgaa ctggtgagta acacgtaggt aatctgccgt

121 gaagtggggg ataacctatg gaaacatgga ctaataccgc atatactctt gctacataag









181 tagagtagag gaaag**tttt** tcgcttcacg atgagcctgc ggcctattag cctgttggtg

241 gggtaatggc ctaccaaagc tacgataggt agccgacctg agagggtgac cggccacatt

301 gggactgaga tacggcccag actcctacgg gaggcagcag ctgagaatct tccacaatgg

361 acgaaagtct gatggagcga catcgcgtga gggatgaagg ccttcggggtt gtaaacctcg

421 gaaattatcg aagaatgagt gacagtagat aatgtaagcc tcggctaact acgtgccagc

Brapilo	F 5' GGTAATCTGCCGTGAAGTGG 3'	
	R 5' CTCAGGTCGGCTACCTATCG 3'	
Braall	F 5' GCGAACTGGTGAGTAACACG 3'	
	R 5' CTCAGGTCGGCTACCTATCG 3'	
SP Pitkä	F 5' TGCTACATAAGTAGAGTAGAGGAAAGTTTTT 3'	
	R 5' TCGCTCCATCAGACTTTTCG 3'	
Pilo	Pilo 1 5'TGCTACATAAGTAGAGTAGAGGAAAGTTTTTTCG-	
	(fluoreskiini) 3'	
	Pilo 2 5'(Red640)TCACGATGAGCCTGCGGC 3'	

Kuva 7. *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin 16S rDNA (AY155458) ja siihen suunnitellut alukkeet ja koettimet.

Työssä suunniteltiin myös hydrolyysikoetin *B. pilosicoli* -bakteerin 23S rDNA:lle. Menetelmään valittiin jo käytössä olevat SP 23S -alukkeet (Leser ym. 1997), joille suunniteltiin Beacon Desinger 2.0 -ohjelmalla koetin Pilo 23sTaq (Kuva 8).



Kuva 8. SP 23S -alukkeiden ja Pilo 23sTaq -koettimen sijoittuminen *B. pilosicoli* -bakteerin 23S rDNA:han (U72703) sekä vertailu *B. innocens* (U72700) ja *B. hyodysenteriae* (U72699) -bakteerien sekvensseihin.

4.4.2 Alukkeiden ja koettimien testaus

Suunniteltujen alukkeiden testaus aloitettiin kvalitatiivisella konventionaalisella PCR-laitteella. Optimaalisia olosuhteita haettiin vaihtelemalla Mg^{2+} -ionikonsentraatiota ja alukkeiden kiinnittymislämpötilaa. $MgCl_2$:n määrää vaihtelemalla selvitettiin dimeerien muodostumista ja alukkeiden epäspesifistä sitoutumista. Kvalitatiiviset PCR-monistukset tehtiin pääsääntöisesti 25 μ l:n reaktiutilavuudessa, jossa oli 0,2 mM dNTP-seos (Finnzymes) ja 10 x puskuria (Qiagen) lisättyinä lopulliseksi 1 x pitoisuudeksi. Reaktiutilavuus täydennettiin steriilillä Molecular Grade -vedellä (Eppendorf), jota käytettiin myös negatiivikontrollina jokaisessa monistuksessa. Tuotteet ajettiin lopuksi etidiumbromidia sisältävälle 2 % agarosigeelille ja kuvattiin UV-valossa.

Kvalitatiivisesta PCR:stä saatuja tietoja hyväksikäyttäen aloitettiin kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR-reaktion optimointi. Reaktiutilavuutena käytettiin 20 μ l ja laitteistona toimi Rotor-Gene 2000 (Corbett Research).

Alukkeita testattiin ensin fluoresoivaa SYBR Green -väriainetta käyttämällä, jolloin laite mittaa kaksijuosteisen DNA:n määrää ekstensiovaiheen jälkeen. Kaikki reaktioseokset sisälsivät 0,2 mM dNTP (Finnzymes), 1 x SYBR Green ja 10 x puskuria (Qiagen) lisättyinä lopulliseksi 1 x pitoisuudeksi. Rotor-Gene 2000 -laitteella SYBR Greenin detektioon käytettiin Sybr-kanavaa (470nm–585hp).

Kvantitatiivisen PCR-laitteiston asetukset optimoitiin molemmille suunnitelluille koettimille yhdessä alukkeiden kanssa. Koettimien testauksen loppuvaiheessa, standardisuorien yhteydessä, siirryttiin käyttämään QuantiTech Probe PCR Master Mix (Qiagen) -seosta, joka sisältää PCR-reaktioon tarvittavat komponentit.

4.4.2.1 Brapilo- ja Braall-alukkeet sekä Pilo-hybridisaatiokoetin

Pilo-hybridisaatiokoettimen toiminta perustuu FRET-ilmiöön (fluorescence resonance energy transfer), jolloin kaksiosaisen koettimen sitouduttua paikoilleen tapahtuu energian siirtymistä

osien välillä. Energiaa luovuttavan osan emittoima fluoresointi siirtyy vastaanottavalle osalle, jonka fluoresointia mittaamalla kohde-DNA:n määrästä saadaan kuva. Pilo-koettimen ensimmäisen osan (donor probe) 3'-päässä on fluoreskeini, joka luovuttaa energiaa jälkimmäisen koettimen (acceptor probe) 5'-päässä olevalla Red 640 -fluoresoivalle aineelle. Rotor-Gene 2000 -laitteella Pilo-koettimen detektioon käytettiin Fret-kanavaa (470 nm–660 hp) emission mittaamiseksi.

Braall- ja Brapilo-alukkeiden testaaminen aloitettiin optimaalisen kiinnittymislämpötilan selvittämällä konventionaalisella PCR:llä. Ohjelmassa testattiin 10 eri kiinnittymislämpötilaa väliltä 49 °C–65 °C. Entsyymiä HotStarTaq (Qiagen) oli reaktioseoksessa 0,02 U/μl, alukkeita 0,6 μM, MgCl₂:a 3 mM ja templaattina 20 ng *B. pilosicoli* ja *B. hyodysenteriae* -bakteerien eristettyä DNA:ta rinnakkaisina näytteinä. Monistus suoritettiin T-Gradient Thermocycler (Whatman Biometra) -laitteella ohjelmalla 1 sykli 95 °C 15 min, 30 sykliä [94 °C 1 min; 49 °C–65 °C 1 min; 72 °C 5 min], 1 sykli 72 °C 5 min.

Alukkeiden optimaalisen kiinnittymislämpötilan selvittämisen jälkeen aloitettiin testaaminen kvantitatiivisessa PCR:ssä. Alukkeita testattiin ilman koetinta SYBR Green -väriaineella ohjelmalla 1 sykli 95 °C 15 min, 40 sykliä [95 °C 20 s; 58 °C 20 s; 72 °C 15 s]. Reaktioseoksessa (25 μl) oli entsyymiä HotStarTaq 0,02 U/μl, MgCl₂ 3 mM, alukkeita 0,6 μM ja näytteinä *B. pilosicoli* ja *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta (10 ng, 1 ng ja 0,1 ng).

SYBR Greenillä jatkettiin alukkeiden optimaalisen pitoisuuden määrittämistä reaktioseoksessa tekemällä alukelaimennussarjat Brapilo- ja Braall-alukkeilla. Alukkeista testattiin pitoisuudet 0,6 μM, 0,36 μM, 0,24 μM ja 0,12 μM, muuten reaktioseos ja ohjelma pidettiin muuttumattomina. Näytteinä oli 1 ng *B. pilosicoli* sekä *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta.

Alukkeiden optimaalisten kiinnittymislämpötilojen ja reaktioseoksen pitoisuuksien määrittämisen jälkeen testattiin herkkyyttä kahdella eri entsyymillä. Herkkyyden määrittämiseen käytettiin DyNAzyme (Finnzymes) ja Taq DNA polymerase (Qiagen) entsyymejä 0,02 U/μl reaktioseoksessa. Sekä *B. pilosicoli* että *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:sta tehtiin laimennukset, joista otettiin näytteiksi kuusi eri näytemäärää (10 ng, 1 ng, 0,1

ng, 0,01 ng 0,001 ng ja 0,0001 ng/reaktio). Reaktioseoksessa oli MgCl₂-konsentraatio 3 mM (DyNAzyme) tai 4mM (Taq), alukkeita 0,6 μM ja ajo-ohjelma pysyi muuten samana, mutta alkudenaturaatio oli 5 min.

Pilo-hybridisaatiokoettimen testaus aloitettiin Braall- ja Brapilo-alukkeille määritetyillä optimiolosuhteilla. Näytteinä oli 1 ng *B. pilosicoli* ja *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta. Brapilo-alukkeiden pitoisuutena käytettiin 0,15 μM ja koettimen molempien osien 0,5 μM. Ohjelmana oli 1 sykli 95 °C 15 min, 40 sykliä [95 °C 20 s; 50 °C 30 s; 72 °C 20 s]. Koettimen testauksessa Braall-alukkeiden kanssa alukkeiden pitoisuus oli 0,6 μM ja koettimen molempien osien 0,4 μM. Ohjelmana Braall-alukkeiden kanssa oli 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 60 °C 20 s; 72 °C 20 s]. Braall-alukkeiden kanssa testaus toistettiin pienentämällä alukkeiden konsentraatiota (0,15 μM) ja nostamalla Pilo-koettimen konsentraatiota (0,5 μM). Ohjelmana oli 1 sykli 95 °C 15 min; 40 sykliä [95 °C 20 s; 60 °C 30 s; 72 °C 25 s].

Koska Braall-alukkeet toimivat Pilo-koettimen kanssa Brapilo-alukkeita paremmin, jatkettiin optimointia Braall-alukkeilla. Braall-alukkeet ja Pilo-koettimen sisältävään reaktioseokseen tehtiin MgCl₂-sarja, jossa testattiin neljää eri konsentraatiota (1,5 mM, 2 mM, 3 mM ja 4 mM). Näytteinä oli 1 ng *B. pilosicoli* sekä *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta ja entsyyminä reaktioseoksessa DyNAzyme 0.02 U/μl. Pilo-koettimen ja alukkeiden konsentraatio oli 0,4 μM ja ajo suoritettiin ohjelmalla 1 sykli 95 °C 5 min, 45 sykliä [95 °C 15 s; 60 °C 25 s; 72 °C 20 s].

Braall-alukkeille tehdyn MgCl₂-sarjan tuloksista pääteltiin, että Braall-alukkeiden F-osa (forward) saattaisi kilpailla koettimen kanssa. Seuraavaksi testattiin Braall-alukkeiden F-osan laimennussarjaa. Koettimen ja R-osan (reverse) alukkeen pitoisuudet pidettiin 0,4 μM:ssa, mutta F-osan alukkeesta testattiin kuutta eri pitoisuutta (0,4 μM, 0,225 μM, 0,114 μM, 0,06 μM, 0,03 μM, 0,015 μM ja 0,0075 μM). Näytteinä oli 1 ng *B. pilosicoli* sekä *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta, entsyyminä DyNAzyme 0,02 U/μl, MgCl₂ 3 mM ja ohjelmana 1 sykli 95 °C 5 min, 45 sykliä [95 °C 15 s; 60 °C 25 s; 72 °C 20 s]. Samoilla asetuksilla testattiin myöhemmin myös Brapilo-alukkeiden F-osan pitoisuus, ainoana muutoksena kiinnittymislämpötilan lasku 58 °C:een.

Braall R -osan pitoisuus määritettiin laimennussarjalla (0,4 µM, 0,2 µM, 0,1 µM, 0,05 µM) samoilla näytteillä kuin F-osan pitoisuus. Braall F -osan konsentraatio pidettiin 0,015 µM:na ja koettimen 0,4 µM:na, entsyyminä oli DyNAzyme 0,02 U/µl, MgCl₂ 3 mM ja ohjelmana 1 sykli 95 °C 5 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 62 °C 25 s; 72 °C 20 s].

Braall-alukkeiden optimaalisten olosuhteiden selvittämisessä edettiin parhaan kiinnittymislämpötilan etsintään kvantitatiivisessa PCR:ssä koettimen ollessa mukana. Entsyymien ja MgCl₂:n erillisen lisäämisen sijasta reaktioseoksessa aloitettiin käyttämään QuantiTech Probe PCR Master Mix:ä (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan. Lämpötila haettiin väliltä 54–64 °C kahden asteen välein säilyttämällä muutoin ajo-olosuhteet identtisinä. Braall F -osan konsentraatio oli 0,015 µM ja R-osan sekä koettimen 0,4 µM. Ohjelma oli 1 sykli 95 °C 5 min, 45 sykliä [95 °C 15 s; 54 °C–64 °C 25 s; 72 °C 20 s]. Näytteinä oli 1 ng *B. pilosicoli* sekä *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta.

Alukkeiden F ja R -osien optimaalisten pitoisuuksien selvittyä testattiin vielä koettimen osien konsentraation vaikutusta tuloksiin Braall-alukkeilla (F-osa 0,015 µM, R-osa 0,4 µM). Pilo-koettimen molemmista puolista testattiin neljä konsentraatiota (0,4 µM, 0,3 µM, 0,2 µM ja 0,1 µM) reaktioseoksessa myös ristikkäin. Näytteinä oli 1 ng *B. pilosicoli* sekä *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta ja ohjelmana 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 62 °C 25 s; 72 °C 20 s].

Optimoitujen reaktioiden herkkyys määritettiin *B. pilosicoli* -bakteerin maljalta eristetyllä DNA:lla. Braall-alukkeiden pitoisuudet reaktioseoksessa olivat F-osa 0,015 µM ja R-osa 0,4 µM, Pilo-koettimen pitoisuus oli 0,3 µM. Näytteinä oli eristettyä *B. pilosicoli* -DNA:ta seitsemän eri määrää (60 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng ja 0,0001 ng/reaktio) neljänä rinnakkaisena näytteenä ja ajo-ohjelmana 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 62 °C 25 s; 72 °C 20 s]. Sarja toistettiin kolmella rinnakkaisella näytteellä ilman 60 ng:n näytemäärää.

Menetelmän herkkyyttä määritettäessä testattiin myös maljalta eristetyn DNA:n suoraa ympäystä puhtaisiin ulosteisiin. DNA-eluaateista laimennettiin vastaavan vahvuisia pitoisuuksiaan kuin liemikasvatuksessa tehdyistä standardeista (10–10000 bakteerisolua/mg ulostetta). *B. pilosicoli* -bakteerin genomien massana käytettiin *B. hyodysenteriae* -bakteerin

genomin massaa, joka oli Journal of Bacteriology DOGS (Database of Genome Sizes) -tietokannan mukaan $3,2 \times 10^6$ ep eli 3,242 fg. Täten 6,4 ng bakteerin DNA:ta vastaisi 2×10^6 bakteerisolua 200 mg:ssa näytettä eli 10000 solua/mg. Neljää eri määrää *B. pilosicoli* -bakteerin DNA:ta (6,4 ng, 0,64 ng, 0,064 ng ja 0,0064 ng) lisättiin *B. pilosicoli* -bakteerista puhtaaseen ulosteeseen, joista DNA eristettiin. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin kaksi rinnakkaista eristystä ja suoritettiin kvantitatiivinen PCR. Ajo-ohjelmana 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 62 °C 25 s; 72 °C 20 s], ja reaktioseoksessa käytössä QuantiTech Probe PCR Master Mix. Braall-alukkeiden pitoisuus reaktioseoksessa F-osa 0,015 µM ja R-osa 0,4 µM, sekä Pilo-koettimen pitoisuus 0,3 µM.

Liemiviljelystä *B. pilosicoli* -bakteerista valmistettiin standardit varsinaisille standardisuorille ja tutkittaville kliinisille ulostenäytteille. Kasvatus ja standardien valmistus toistettiin kaksi kertaa. Ensimmäisessä liemikasvatuksessa kasvatetut bakteerit laskettiin ja laimennettiin kuudeksi eri laimennukseksi (1000000 bakt./µl, 100000 bakt./µl, 10000 bakt./µl, 1000 bakt./µl, 100 bakt./µl ja 10 bakt./µl). Laimennuksista lisättiin 2 µl *B. pilosicoli* -bakteerista vapaaseen sian ulosteeseen (200 mg), mikä mahdollisti tunnettujen bakteerimäärien standardinäytteet (10000, 1000, 100 ja 10 bakteeria/mg ulostetta). Näytteistä eristettiin DNA:ta ja saadusta eluaatista 2 µl käytettiin templaatiksi. Reaktioseoksessa käytettiin QuantiTech Probe PCR Master Mix:iä ja jokaisesta standardista tehtiin rinnakkainen näyte. Braall-alukkeiden pitoisuudet reaktioseoksessa olivat F-osa 0,015 µM ja R-osa 0,4 µM, sekä Pilo-koettimen pitoisuus 0,3 µM. Ajo-ohjelmana oli 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 62 °C 25 s; 72 °C 20 s].

Kliinisiä ulostenäytteitä tutkittiin 10 (Liha 1, Liha 2, Liha 3, Liha 4, Liha 5, Vier 1, Vier 2, Vier 3, Vier 4 ja Vier 5) ja näytteistä eristettiin kahdella erillisellä kerralla DNA:ta. Jokaisesta eristyksestä ajettiin kaksi rinnakkaista näytettä. Ajo-ohjelmana oli 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s; 62 °C 25 s; 72 °C 20 s], Braall-alukkeiden pitoisuus reaktioseoksessa oli F-osa 0,015 µM ja R-osa 0,4 µM, sekä Pilo-koettimen pitoisuus 0,3 µM.

4.4.2.2 SP Pitkä -alukkeet

B. pilosicoli -spesifiseksi suunnitellun SP Pitkä -alukkeiden testaus aloitettiin optimaalisen kiinnittymislämpötilan hakemisella konventionaalisella PCR:llä. Ohjelmassa testattiin 10 eri kiinnittymislämpötilaa väliltä 49 °C–65 °C. Entsyymiä HotStarTaq (Qiagen) oli reaktioseoksessa 0,02 U/μl, alukkeita 0,6 μM, MgCl₂ 4 mM ja templaattina 1 ng *B. pilosicoli* ja *B. hyodysenteriae* -bakteerien eristettyä DNA:ta. Ohjelmana käytettiin 1 sykli 95 °C 15 min, 30 sykliä [94 °C 1 min; 49 °C–65 °C 1 min; 72 °C 1 min], 1 sykli 72 °C 5 min, laitteena T-Gradient Thermocycler (Whatman Biometra). Vastaava ohjelma toistettiin vielä muuttamalla MgCl₂ pitoisuus 1,5 mM:een.

Konventionaalisessa PCR:ssä testattiin SP Pitkä -alukkeiden spesifisyys kaikilla tutkimuksessa olleilla brakyspira-bakteereilla. Testaus suoritettiin UNO II Thermocycler (Biometra) -laitteella ohjelmalla 1 sykli 95 °C 5 min, 30 sykliä [94 °C 1 min; 62 °C 1 min; 72 °C 1min], 1 sykli 72 °C 5min. Näytteinä oli 1 ng tutkimuksessa bakteerien DNA-eluaattia. Reaktioseoksessa entsyyminä *Taq* (Qiagen) 0,02 U/μl, MgCl₂:n pitoisuus oli 4 mM ja alukkeiden 0,6 μM.

SP Pitkä -alukkeiden spesifisyyttä testattiin myös kvantitatiivisessa PCR:ssä SYBR Greenillä kaikkien tutkimuksessa käytettyjen brakyspirojen eristetyillä DNA:illa. Alukkeiden pitoisuus oli 0,6 μM ja MgCl₂:n 4 mM. Ajo-ohjelmana oli 1 sykli 95 °C 5 min, 40 sykliä [95 °C 20 s; 56 °C 20 s; 72 °C 20 s]. Entsyyminä DyNAzyme (Finnzymes) 0.02 U/μl ja näytteinä 1 ng bakteerien DNA:ta.

Reaktion standardisuora määritettiin liemikasvatuksesta tehdyillä *B. pilosicoli* -bakteerin standardiulostenäytteillä. Ajo-ohjelmana 1 sykli 95 °C 5 min, 55 sykliä [95 °C 20 s; 60 °C 20 s; 72 °C 20 s]. Alukkeiden pitoisuus oli 0,6 μM ja MgCl₂ 4 mM, entsyyminä *Taq* (Qiagen) 0,025 U/μl.

4.4.2.3 SP 23S -alukkeet ja Pilo 23sTaq -hydrolyysikoetin

Hydrolyysikoettimen Pilo23sTaq fluoresointi perustuu *Taq*-entsyymin aiheuttamaan vaimennetun koettimen pilkkoutumiseen ekstensiovaiheen aikana. Vapautuneen väriaineen fluoresointi voidaan tällöin mitata, mikä on suoraan verrannollinen kohde-DNA:n määrään. Pilo23sTaq -koettimessa 5'-päässä olevan 6-FAM:n fluoresenssi voitiin mitata Fam-kanavalla (470 nm–510 nm), kun vaimentimena 3'-päässä ollut TAMRA irtosi DNA-polymeraasin vaikutuksesta.

SP 23S -alukkeille optimaalinen kiinnittymislämpötila selvitettiin väliltä 45,5 °C–60,5 °C. Reaktioseoksessa entsyymiä *Taq* (Qiagen) oli 0,025 U/μl, alukkeita 0,48 μM, MgCl₂ 4 mM ja templaattina 2 ng *B. pilosicoli* ja *B. hyodysenteriae* -bakteerien eristettyä DNA:ta. Monistusohjelmana oli 1 sykli 94 °C 15 min, 30 sykliä [94 °C 1 min; 45,5 °C–60,5 °C 1 min; 72 °C 5 min], 1 sykli 72 °C 5 min.

Optimointia jatkettiin SP 23S-alukkeilla MgCl₂-sarjalla. Testauksessa käytettiin kuutta eri MgCl₂-pitoisuutta (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM), joiden kanssa näytteinä oli sekä *B. pilosicoli* ja *B. hyodysenteriae* -bakteerien DNA:ta kahdella pitoisuudella (~1 ng ja 0,1 ng). Entsyymiä *Taq* (Qiagen) oli reaktioseoksessa 0,02 U/μl ja alukkeita 0,5 μM. Ohjelmana monistuksessa käytettiin 1 sykli 94 °C 15 min, 35 sykliä [94 °C 1 min; 53 °C 1 min; 72 °C 5 min], 1 sykli 72 °C 5 min.

SP 23S -alukkeiden spesifisyys testattiin vielä konventionaalisesti kaikilla tutkimuksessa käytettyillä brakyspiroilla. UNO II (Biometra) laitteella näytteet ajatettiin ohjelmalla 1 sykli 95 °C 5 min, 30 sykliä [94 °C 1 min; 62 °C 1 min, 72 °C 1min], 1 sykli 72 °C 5 min. Näytteinä oli 1 ng bakteerien DNA-eluaattia ja entsyyminä *Taq* (Qiagen) 0,02 U/μl. MgCl₂:n pitoisuus oli 4 mM ja alukkeiden 0,6 μM.

SP 23S -alukkeilla aiemmin käytössä ollutta kiinnittymislämpötilaa 45 °C (Leser ym. 1997) nostettiin hieman paremman spesifisyyden saavuttamiseksi. Alukkeilla testattiin SYBR-Greeniä käyttäen eri pitoisuudet (0,25 μM, 0,37 μM, 0,5 μM, 0,63 μM, 0,75 μM, 0,86 μM ja 1 μM) ja ne myös testattiin ristiin. Entsyymiä *Taq* (Qiagen) 0,02 U/μl, MgCl₂ 4 mM ja

templaattina *B. pilosicoli* -bakteerin DNA:ta 1 ng ja 0,01 ng. Ohjelmana oli 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 20 s, 50 °C 20 s, 72 °C 20 s].

Pilo 23sTaq -koettimen ja SP 23S -alukkeiden yhteinen optimointi aloitettiin testaamalla koetinta pitoisuudella 0,2 µM ja alukkeita 0,5 µM. Näytteinä oli 1 ng ja 0,01 ng *B. pilosicoli* -bakteerin DNA:ta. Reaktioseoksessa käytössä oli QuantiTech Probe PCR Master Mix (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan ja ajo-ohjelmana 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 15 s; 58 °C 60 s].

Optimointia jatkettiin testaamalla SP 23S -alukkeiden neljä eri pitoisuutta (1 µM, 0,6 µM, 0,3 µM ja 0,1 µM) myös ristikkäisillä vaihtoehdoilla. Käytössä oli QuantiTech Probe PCR Master Mix (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan, Pilo 23sTaq -koetinta 0,2 µM ja ajo-ohjelmana 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 15 s; 58 °C 60 s]. Vastaavalla ohjelmalla testattiin myös Pilo 23sTaq -koettimen neljää eri pitoisuutta (0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM ja 0,4 µM), jolloin alukkeiden pitoisuutena käytettiin 1 µM.

Kliiniset ulostenäytteet (Liha 1, Liha 2, Liha 3, Liha 4, Liha 5, Vier 1, Vier 2, Vier 3, Vier 4 ja Vier 5) tutkittiin ohjelmalla 1 sykli 95 °C 15 min, 45 sykliä [95 °C 15s; 58 °C 60s]. Näiden ajojen yhteydessä ajettiin myös standardinäytteet vastaavasti kuin Pilo-hybridisaatiokoettimella.

5 TULOKSET

5.1 Brapilo- ja Braall-alukkeet sekä Pilo-hybridisaatiokoetin

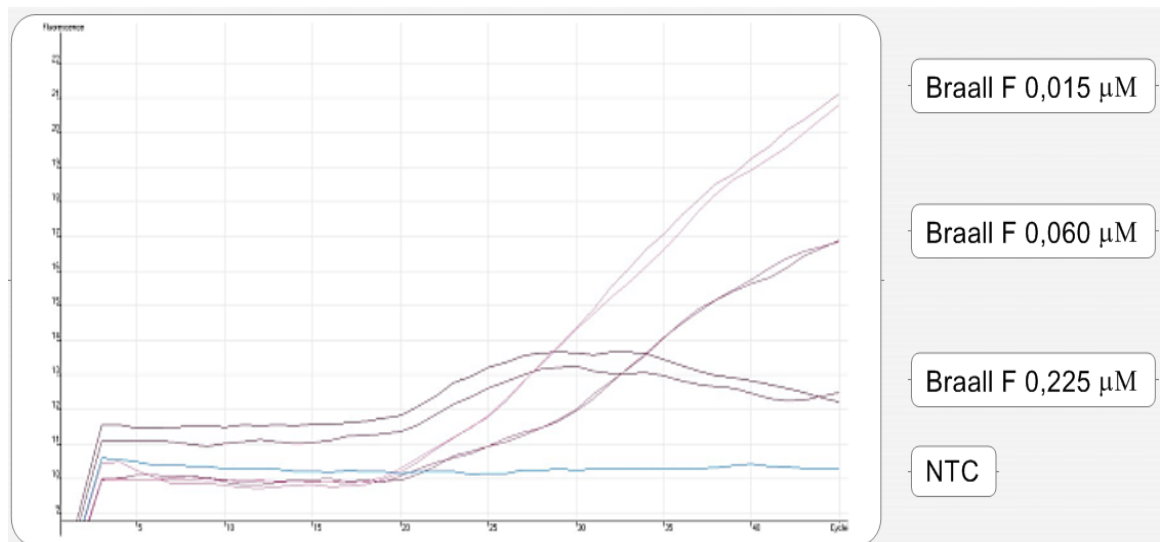
Konventionaalisella PCR:llä alukkeiden optimaalisen kiinnittymislämpötilan testaamisessa ei eri lämpötilojen välillä havaittu eroja alukkeiden toimivuudessa. Koko lämpötilavälillä 49–65 °C oikean kokoisen PCR-tuotteen monistuminen oli lähes yhtä voimakasta, eikä epäspesifistä monistumista havaittu. Kiinnittymislämpötilaksi seuraaviin kokeiluihin valittiin 58 °C.

Ensimmäisissä kvantitatiivisissa PCR:issä SYBR Green -väriaineella sekä Brapilo- että Braall-alukkeet toimivat heikosti. Alukepitoisuuksien laimennussarjalla selvisi alukkeiden toimivan paremmin korkeammilla pitoisuuksilla. Alukkeista valittiin jatkossa käytettäväksi pitoisuudeksi 0,6 µM.

SYBR Green -väriaineella tehdyissä herkkyystesteissä ei alukkeiden toimivuudessa todettu merkittäviä eroja eri valmistajien entsyymien (DyNAzyme, Finnzymes ja Taq DNA polymerase, Qiagen) välillä.

Pilo-hybridisaatiokoettimen testauksessa Braall-alukkeet toimivat huomattavasti tehokkaammin koettimen kanssa verrattuna Brapilo-alukkeisiin.

Braall-alukkeiden MgCl₂-sarjassa ei korkeammissa pitoisuuksissa huomattu monistuksen parantumista, mikä herätti epäilyksen alukekonsentraatioiden sopivuudesta. Braall-alukkeiden F-osan tiedettiin mahdollisesti kilpailevan koettimen kanssa sitoutumiskohdasta, mikä suurilla F-osan konsentraatioilla heikentää herkkyyttä. Braall F -osan laimennussarjasta (Kuva 9) saaduista hyvistä tuloksista johtuen päätettiin kokeilla myös Brapilo-alukkeilla samaa, mutta Brapilo-alukkeiden kohdalla tästä ei ollut hyötyä.



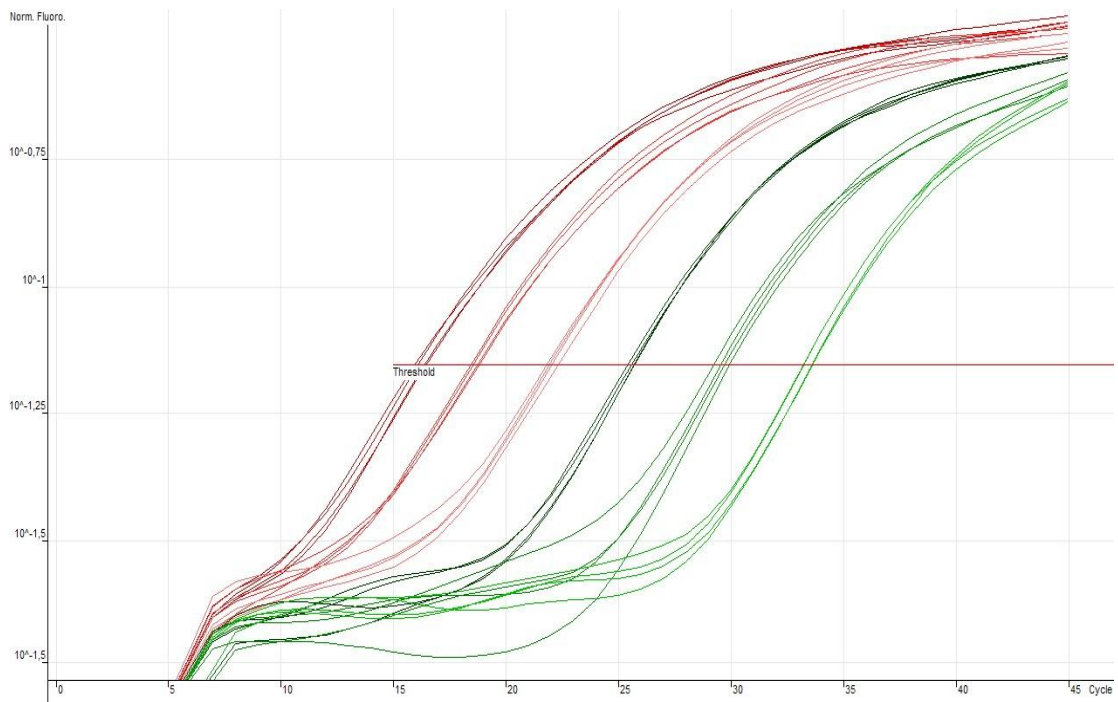
Kuva 9. Braall F -alukkeen laimennussarjasta esimerkkipitoisuuksia, jotka osoittavat alennetun konsentraation hyödyn. NTC: No Template Control (negatiivikontrolli).

Braall R -osan konsentraation määrän vaikutus testattiin vielä uudelleen, nyt lasketun F-osan kanssa. R-osan pitoisuuden laskemisella oli vain negatiivista vaikutusta reaktion tehokkuuteen. Braall-alukkeilla käytettiin jatkossa pitoisuuksia F-osa 0,015 μM ja R-osa 0,4 μM .

Kvantitatiivisen PCR:n optimaalisten asetuksien määrittämisessä siirryttiin seuraavaksi Braall-alukkeilla hakemaan ideaalista kiinnittymislämpötilaa. Siirryttäessä käyttämään QuantiTech Probe PCR Master Mix:ä (Qiagen), testattiin tämän toimivuus verrattuna aikaisemmin käytössä olleeseen itse valmistettuun reaktioseokseen ja todettiin toimivaksi. Aikaisemmin oli käytetty kiinnittymislämpötilana 60 °C, mutta nyt testattiin kaikki lämpötilat 54–64 °C kahden asteen välein. Tehdyissä testauksissa todettiin, että korkeammalla lämpötilalla (62 °C) ei ollut negatiivista vaikutusta menetelmän herkyyteen, minkä vuoksi siirryttiin jatkossa käyttämään tätä lämpötilaa. Korkeampi kiinnittymislämpötila vähentää menetelmän riskiä epäspesifisestä monistumisesta.

Alukkeiden optimaalisten asetuksien löydyttyä, koettimen osien konsentraatioiden vaikutukset testattiin. Koettimien eri osien määrillä ei todettu olevan vaikutusta menetelmän herkyyteen, joten koettimien molempien osien pitoisuus säilytettiin 0,3 μM :ssa.

Menetelmän herkkyuden testaukset aloitettiin maljalta eristetystä DNA:sta, jonka pitoisuus oli määritetty spektrofotometrillä sekä arvioimalla pitoisuutta geeliltä. Menetelmän herkkyudeksi saatiin 0,1–1 pg, joka vastaa noin 30–300 bakteeria reaktiossa (Kuva 10). Uusinnassa saatiin sama herkkyys.

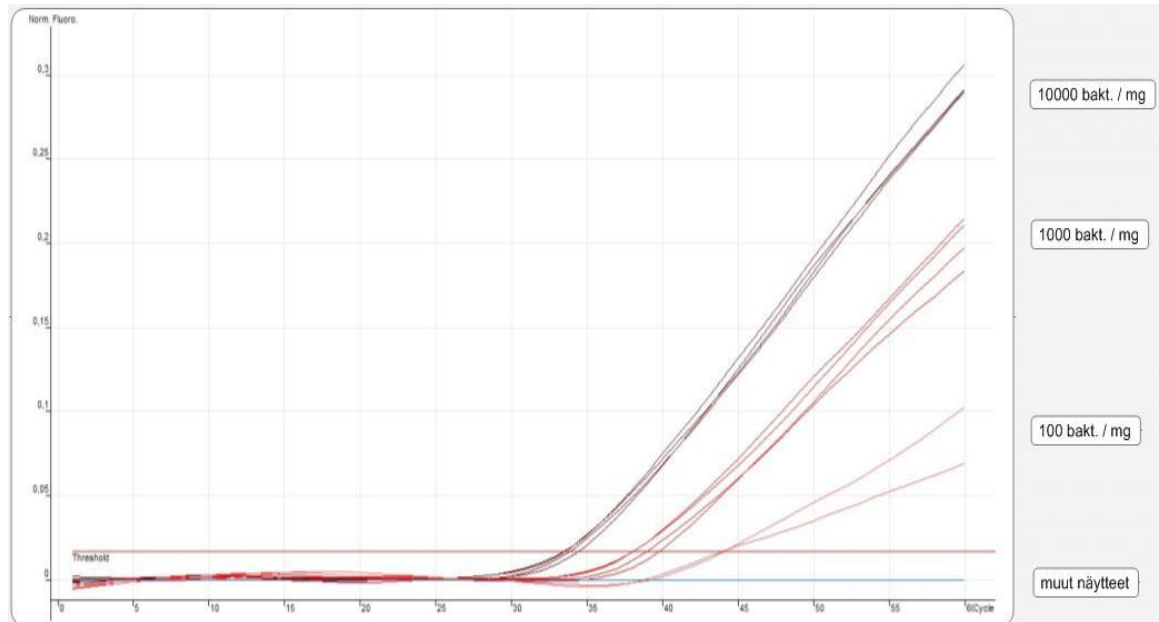


Kuva 10. *B. pilosicoli* -bakteerin DNA:n monistuminen Braall-alukkeilla ja detektio Pilo-koettimella. Käyrät vasemmalta oikealle 60 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, ja 0,001 ng DNA:ta/reaktio neljänä rinnakkaisena.

Ulostenäytteiden testaus aloitettiin siirrostamalla tulevien bakteeriympäyksen vahvuisia ulostenäytteitä *B. pilosicoli* -bakteerin DNA:lla. Näytteistä kolmen vahvimman pitoisuuden (6,4 ng, 640 pg ja 64 pg/200 mg ulostetta) osalta tulos oli selkeästi positiivinen, mutta 6,4 pg:n näytteitä ei voitu sijoittaa standardisuoralle niiden heikon monistumisen vuoksi, vaikka ne silmämääräisesti positiivisilta vaikuttavatkin. DNA:n detektorajaksi saatiin 6,4–64 pg/200 mg ulostetta, joka vastaa 10–100 bakteerisolua/mg ulostetta.

Liemiviljelyistä *B. pilosicoli* -bakteereista tehdyillä standardeilla päästiin samankaltaiseen tarkkuuteen molemmilla kerroilla, ja tulokset olivat yhtenevät myös DNA-ympäyksen kanssa. Detektoraja oli 10–100 bakt./mg ulostetta, jolloin näyte näyttää positiiviselta, mutta

sitä ei voida sijoittaa kvantitatiiviselle suoralle käyrän huonon kulmakertoimen takia (Kuva 11).



Kuva 11. Alle 100 bakt./mg -näytteiden fluoresenssin muutos ei ollut riittävän suurta kaikilla tehdyillä standardeilla.

Kymmenestä tutkitusta kliinisestä ulostenäytteestä saatiin molemmilla DNA:n eristyskerroilla yhtenevät tulokset. Molemmilla kerroilla saatiin yhdestä lihasian ja kolmesta vieroitusporsaan näytteestä positiiviset tulokset. Erityisesti huomiota herätti yhden vieroitusporsaan näytteen standardeja suurempi pitoisuus (Taulukko 3).

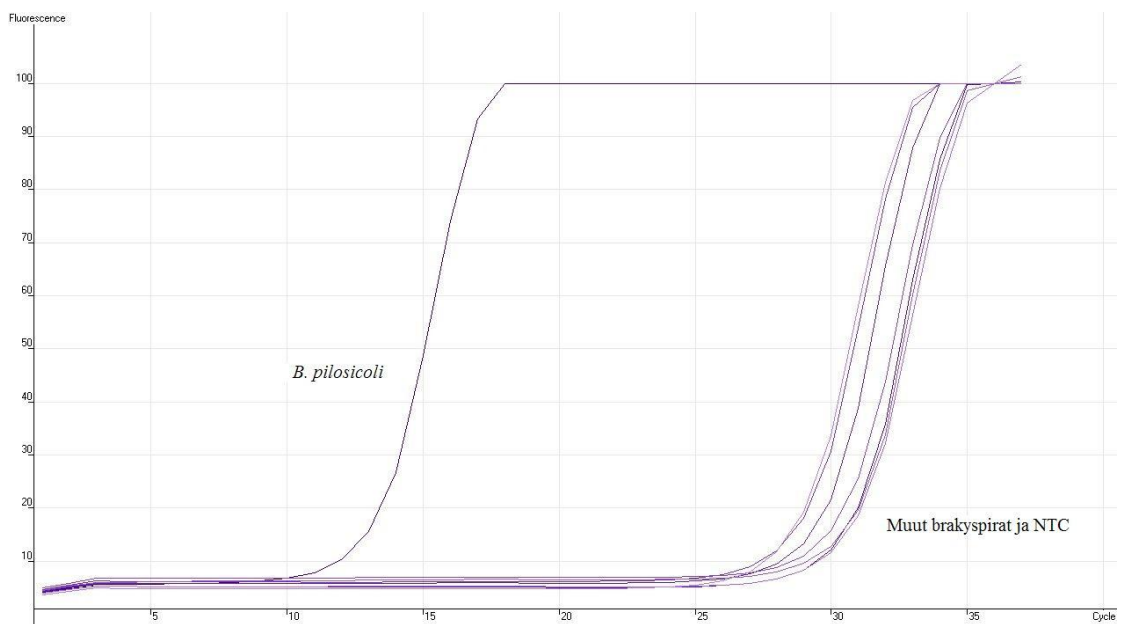
Taulukko 3. Pilo-hybridisaatiokoettimella saadut tulokset kliinisistä ulostenäytteistä ja standardeista toisella eristyskerralla.

	Näyte	Ct	Tiedetty konsentraatio (bakt./mg)	Laskettu konsentraatio (bakt./mg)
1	Liha 1			
2	Liha 1			
3	Liha 2			
4	Liha 2			
5	Liha 3			
6	Liha 3			
7	Liha 4	32,0		780
8	Liha 4	33,3		162
9	Liha 5			
10	Liha 5			
11	Vier 1			
12	Vier 1			
13	Vier 2	26,8		385138
14	Vier 2	26,4		603889
15	Vier 3	32,6		392
16	Vier 3	32,6		402
17	Vier 4			
18	Vier 4			
19	Vier 5	30,4		5306
20	Vier 5	30,6		4041
21	10000	29,9	10000	9476
22	10000	29,4	10000	17536
23	1000	32,8	1000	292
24	1000	33,1	1000	222
25	100	34,8	100	27
26	100	33,1	100	210
27	10	34,3	10	52
28	10	34,7	10	31

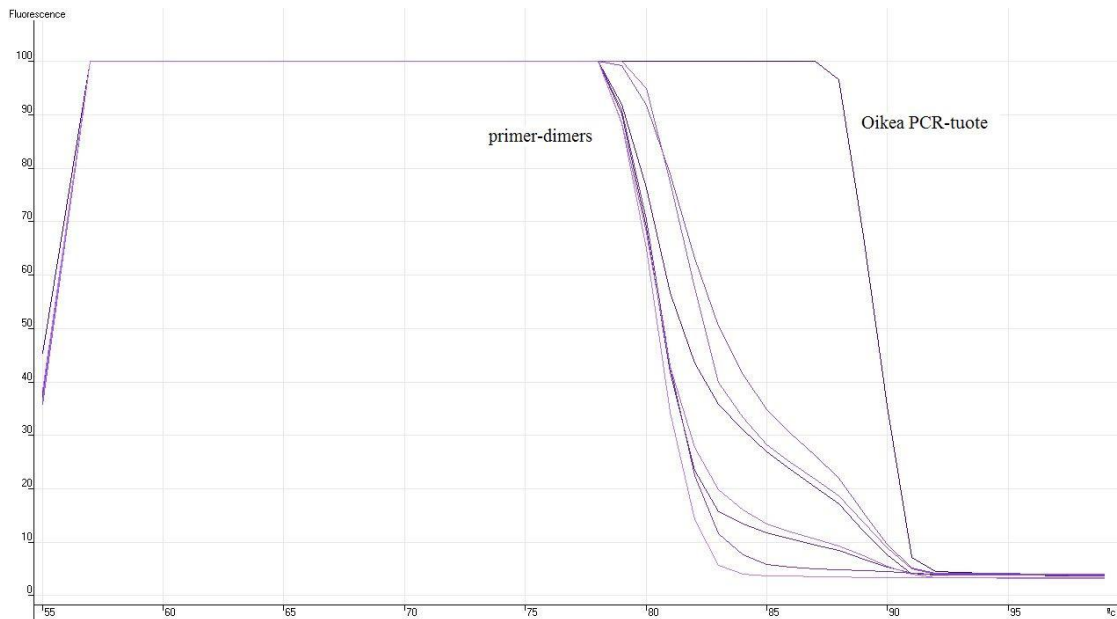
5.2 SP Pitkä -alukkeet

SP Pitkä -alukkeiden optimaalisen kiinnittymislämpötilan hakemisessa konventionaalisessa PCR:ssä todettiin monistumisen pysyvän erittäin tehokkaana 62 °C:een saakka. Tällä kiinnittymislämpötilalla testattiin vielä spesifisyys kaikkia tutkimuksessa mukana olleita bakteereja kohtaan, eikä väärää monistumista havaittu.

Kvantitatiivisessa PCR:ssä huomattiin, että SP Pitkä -alukkeet ovat herkkiä tekemään primer-dimer-tuotteita, jotka SYBR Green -väriainetta käytettäessä antavat väärän positiivisen tuloksen (Kuva 12). Sulamislämpöanalyysi osoittaa tuotteen olevan epäspesifistä (Kuva 13).



Kuva 12. Kontrollien monistuminen SP Pitkä -alukkeilla on erittäin hyvä *B. pilosicoli* -bakteeria kohtaan, mutta ongelmaksi tuli primer-dimer-tuotteiden aiheuttama väärät positiiviset tulokset real-time-PCR-ajon loppupuolella.



Kuva 13. Sulamislämpöanalyysi SP Pitkä -alukkeilla ja SYBR Green -väriaineella paljastaa, että oikea PCR-tuote saadaan vain *B. pilosicoli* -kontrollilla. Muilla näytteillä monistuu alemmissa lämpötiloissa denaturoituvia primer-dimer-tuotteita.

SP Pitkä -alukkeilla ei ollut koetinta, joten SYBR Green -väriaineella ei voitu määrittää alukkeille standardisuoraa primer-dimer-tuotteiden vuoksi ja alukkeita ei testattu enempää.

5.3 SP 23S -alukkeet ja Pilo 23sTaq -hydrolyysikoetin

SP 23S -alukkeille optimaalisen kiinnittymislämpötilan hakemisessa konventionaalisessa lämpötilagradientti-PCR:ssä todettiin monistumisen pysyvän tehokkaana 58 °C:een asti. Epäspesifistä sitoutumista ei todettu millään lämpötiloilla ja jatkossa käytettiin kiinnittymislämpötilana 53 °C :a.

Konventionaalisella PCR:llä MgCl₂-sarjassa todettiin monistumisen olevan heikentyntä vain kaikkein alimmalla pitoisuudella eli 1,5 mM. Jatkossa käytettäväksi pitoisuudeksi valittiin 4 mM. Spesifisyydestissä ei havaittu väärää monistumista muista brakyspiroista.

SYBR Greenillä tehdyissä alukekonsentraatiotesteissä huonoiten toimivat laimeimmat konsentraatit. Alukkeiden konsentraationa 0,3–1 µM toimi erittäin hyvin. Alukkeita ja

koetinta yhdessä testattaessa paras alukepitoisuus oli 1 μM ja koettimella ei eroja eri pitoisuuksien kohdalla todettu. Koettimen osalta päätettiin jatkossa käyttää pitoisuutta 0,2 μM .

Standardinäytteinä käytettiin samoista eristyksistä saatua DNA:ta kuin pilo-hybridisaatiokoettimen standardisuorissa. Pilo23Staq -koettimen osalta standardit ajettiin samoissa PCR-ajoissa kliinisten ulostenäytteiden kanssa. Menetelmän herkkyydessä pääsimme samalle 10–100 bakt./mg -tasolle kuin toisellakin menetelmällä. Ongelmana Pilo23Staq -koettimella on kvantitatiivisuuden häviäminen matalilla bakteeripitoisuuksilla, koska 10000 bakt./ mg -näyte ja 1000 bakt./mg -näyte monistuivat ajoissa lähes yhtä hyvin.

Kliinisistä ulostenäytteistä tehdyistä DNA-eristyksistä ajettiin vastaavat ajot kuin hybridisaatiokoettimilla. Ulostenäytteistä eristettiin DNA kahdella erillisellä kerralla, ja jokaisesta eristyksestä ajettiin kaksi rinnakkaista näytettä eli näytteet tutkittiin yhteensä neljä kertaa. Tuloksissa muut näytteet antoivat positiivisen, mutta näytteet Liha1 ja Liha5 jäivät kerran ja Vier1 kolme kertaa negatiiviseksi (Taulukko 4).

Taulukko 4. Pilo23sTaq -koettimella saadut tulokset kliinisistä ulostenäytteistä ja standardeista toisella eristyskerralla.

Näytenro	Näyte	Ct	Tiedetty konsentraatio (bakt./mg)	Laskettu konsentraatio (bakt./mg)	Vaihteluerroin	Standardipoikkeama
1	Liha 1	37,6		363		
2	Liha 1	25,9		76276		
3	Liha 2	38,2		280		
4	Liha 2	37,6		363		
5	Liha 3	35,1		1158		
6	Liha 3	35,8		845		
7	Liha 4	37,2		433		
8	Liha 4	36,8		525		
9	Liha 5					
10	Liha 5	44,8		13		
11	Vier 1					
12	Vier 1	41,8		54		
13	Vier 2	28,2		26412		
14	Vier 2	28,3		25815		
15	Vier 3	33,5		2353		
16	Vier 3	33,0		3039		
17	Vier 4	38,3		268		
18	Vier 4	37,0		479		
19	Vier 5	31,9		4979		
20	Vier 5	30,8		8270		
21	10000	31,7	10000	5481	45,19 %	0,05
22	10000	31,6	10000	5737	42,63 %	0,05
23	1000	34,4	1000	1552	55,20 %	0,08
24	1000	34,3	1000	1670	66,98 %	0,08
25	100	44,5	100	15	84,52 %	2,24
26	100	40,1	100	119	19,43 %	2,24
27	10	45,0	10	12	24,28 %	1,6
28	10	41,8	10	53	434,21 %	1,6
29	nk					
30	nk					
31	ntc					
32	ntc					
33	ntc					

6 POHDINTA

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää reaaliaikainen PCR-menetelmä *Brachyspira pilosicoli* -bakteerin kvantitatiiviseen osoittamiseen sikojen ulosteesta. Työssä suunniteltiin neljä aluke/koetin-yhdistelmää, joiden välillä suoritettiin vertailu soveltuvuudesta käytännön diagnostiikkaan. Menetelmistä kaksi eteni kliinisten näytteiden analysointiin asti.

Ulostenäytteille kvantitatiivisen PCR-menetelmän suunnittelun tekee haastavaksi jo varsinaista PCR-menetelmää edeltävät vaiheet. Menetelmän herkkyys vaatii DNA-eristystuotteelta puhtautta PCR-inhibiittoreista (muun muassa metabolia-tuotteita ja polysakkarideja), joita ulostenäytteet sisältävät huomattavasti. Sian uloste sisältää myös paljon kasviperäistä materiaalia, jonka polyfenolit tiedetään erittäin voimakkaiksi PCR-inhibiittoreiksi (Koonjul ym. 1999). PCR-inhibiittoreita voidaan vähentää käyttämällä erityisesti ulostenäytteille suunniteltua kaupallista DNA-eristyskittiä, jonka on todettu olevan parempi DNA-eristystapa ulostenäytteille, kuin perinteinen fenoli-kloroformiuutto (Jensen & Hoorfar 2002).

Kaupallisilla kiteillä näytteen käsittelyssä päästään paremmin eroon PCR-inhibiittoreista, mutta laskennallinen eristystehokkuus ei ole kovinkaan hyvä. Esimerkiksi tutkimuksessa käytetyllä QIAamp DNA Stool Mini Kitillä eristetyistä DNA:sta laskennallisesti vain noin seitsemäsadas osa näytteen lähtö-DNA:sta päätyy PCR-reaktioon templaatiksi. Brooke 2003 määrittä, että hänen menetelmällään PCR-reaktion detektioraja oli 40–400 bakteeria/reaktio, joka kuitenkin vastasi QIAamp DNA Stool Mini Kitillä eristetyssä ulostenäytteessä vain 1×10^5 – 1×10^6 bakt./g pitoisuutta. DNA-eristys olisikin jatkossa yksi testattavista kehityskohdista mahdollisesti parempaan menetelmäherkkyyden pääsemiseksi.

Ulostenäytteillä on myös suuria eroja koostumuksessa, mikä vaikuttaa DNA-eristykseen ja näin ollen myös koko menetelmän herkkyyteen. Sikojen ruokavalioilla ja terveydentilalla on vaikutuksia näytteen laatuun. Esimerkiksi jos sika on syönyt olkia tai muuta vastaavaa sulamatonta voi näytteen ”vääristää” eristyksessä mukana oleva sulamaton aines, joka ei sisällä bakteereja. Koska eristykseen otetaan näyte painon perusteella, on myös näytteen sisältämällä nesteellä suuri vaikutus. Oireellisen sian ulosteen vetisyys voi jopa pienentää sen sisältämien inhibiittoreiden määrää ja parantaa näytteen soveltuvuutta PCR-tutkimukseen. *B.*

pilosicoli -bakteeri hakeutuu suoliston pintaan, jolloin bakteeria ei todennäköisesti ole tasaisesti ulosteessa. Ulostenäytteiden yksilöllisiä eroja voi ehkäistä huolellisella näytteenotolla.

Menetelmän herkkyys ei ole ainoa merkittävä asia, kun mietitään menetelmän soveltuvuutta käytännön diagnostiikkaan. Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytettävillä fluoresoivilla koettimilla on tapana vaimentua pitkäaikaisessa säilytyksessä, mikä voi aiheuttaa ongelmia. Jos tutkittavia näytteitä on vähän ja uusi koetin jouduttaisiin tilamaan menetelmän luetettavuuden vuoksi usein, tulisi näytekohtaisista kustannuksista huomattavan suuria. Brakyspira-diagnostiikkaa tehdään tällä hetkellä rutiinina vain lihasikojen ripulitapauksissa ja näytemäärät ovat melko pieniä. Viljelyä yksinkertaisemman reaaliaikaisen PCR:n myötä voidaan helposti tutkia suurempia määriä näytteitä. Menetelmää voidaan käyttää myös projektiluontoisiin tutkimuksiin, esimerkiksi yksittäisen tilan *B. pilosicoli* -bakteeritilanteen selvittämiseen, sekä tilanteissa, joissa näyte on viljelykelvoton esimerkiksi pitkstä happialtistuksesta johtuen.

Reaaliaikaisen PCR -menetelmän etuja perinteiseen brakyspiradiagnostiikkaan on ehdottomasti myös nopeus. Perinteisessä brakyspiradiagnostiikassa kestää noin viikon, kunnes mahdollinen brakyspira löydös on varmennettu. Kvantitatiivisella PCR:llä vastaus saadaan saman päivän aikana kuin näyte on saatu tutkittavaksi. Diagnostiikan nopeutuminen auttaisi näin myös oikeiden hoitotoimenpiteiden aloittamista. Reaaliaikainen PCR on myös yleisesti vähemmän herkkä laboratoriokontaminaatioille verrattuna konventionaaliseen PCR:ään, koska PCR-reaktion jälkeen ei putkia tarvitse avata.

Epidemiologisesti hyödyllisin asia kvantitatiivisen PCR-menetelmän kehittämisessä *B. pilosicoli* -bakteerille on todellisen taudinaiheuttajan löytäminen. *B. pilosicoli* -bakteerille tyypilliset sekartunnat muiden taudinaiheuttajien kanssa on merkittävä tieto. On oletettu, että *B. pilosicoli* -bakteeri olisi primaaritaudinaiheuttaja vasta kun sen pitoisuus on yli 1×10^6 bakteeria grammassa ulostetta (Neef ym. 1994 ja Fellström 1997). Viljelystä luopuminen aiheuttaisi sen, että bakteeria ei voitaisi eristää, mikä tosin ei *B. pilosicoli* -bakteerin perusdiagnostiikassa ole merkittävää.

Alukkeiden ja koettimien suunnittelussa pitäydyttiin kaupallisten ohjelmistojen tarjoamissa ehdokkaissa. Brakyspirojen 16S rDNA on erittäin konservoitunutta ja ainoa mahdollinen *B. pilosicoli* -bakteerille spesifinen sitoutumiskohta koettimelle on uniikki TTTTTT-jakso, mikä pienensi mahdollisuuksia erilaisten koettimien suunnitteluun. Vastaavasti koettimelle alukkeita suunniteltaessa rajoituksia muodosti oikea PCR-tuotteen koko ja sulamislämpöjen sopiminen koettimelle. *B. pilosicoli* -bakteerin 23S rDNA:han oli jo olemassa valmiit spesifiset alukkeet, joiden toimivuus oli varma ja tuotteen kokokin sopiva kvantitatiiviseen PCR:ään. Tässä tilanteessa suunniteltiin toimiville alukkeille sopiva koetin.

Kaikille suunnitelluille kvantitatiivisille PCR-menetelmille tehtiin kattavat testaukset reaktioiden optimoimista varten. Lopulta reaktioseoksessa päädyttiin käyttämään valmista 2 X QuantiTech Probe PCR Master Mix -kittiä (Qiagen) sen helppokäyttöisyyden ja hyvän toimivuuden vuoksi.

Pilo-hybridisaatiokoettimelle suunnitelluilla Braall- ja Brapilo-alukkeilla jäi näiden monistusteho vaatimattomaksi. Ideaalitulanteessa sekä käytettävät alukkeet että koetin olisivat olleet *B. pilosicoli* -bakteerille spesifisiä, mutta Brapilo-alukkeita ei saatu toimimaan tyydyttävästi. Kaikille brakyspiroille toimivat Braall-alukkeet toimivat kuitenkin riittävän hyvin, eikä spesifisyydestä tullut ongelmaa koettimen ansiosta. Braall-alukkeidenkin toiminta näytti aluksi huonolta, kunnes koettimen sitoutumista parannettiin pienentämällä Braall F -osan konsentraatiota reaktiossa. Tulokset ovat vertailukelpoisia ja jopa parempia kuin aikaisemmillä *B. pilosicoli* -bakteerin PCR-menetelmillä, joissa detektoriraja on ollut 50–100 bakt./mg (Mikosza ym. 2001), 10–100 bakt./mg (Brooke 2003) ja 250–2500 bakt./mg (Munshi ym. 2003). Braall-alukkeilla ja Pilo-hybridisaatiokoettimella pääsimme tuloksiin, joissa detektoriraja oli 10–100 bakt./mg .

SP Pitkä -alukkeilla konventionaalisessa PCR:ssä saadut lupaavat tulokset kaatuivat siirryttäessä kvantitatiiviseen PCR:n. Vaikka SP Pitkä -alukkeet todettiin konventionaalisessa PCR:ssä *B. pilosicoli* -bakteerille spesifiseksi, todettiin näiden myöhemmin muodostavan paljon primer-dimer-tuotteita. SP Pitkä -alukkeiden kanssa ei käytetty koetinta, vaan PCR-tuote detektoitiin SYBR Green -värillä. SYBR Green -väriaine sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin myös epäspesifiset PCR-tuotteet antavat positiivisen tuloksen. SP Pitkä -menetelmästä luovuttiinkin, ja jatkettiin lupaavammilla menetelmillä.

Aiemmin julkaistuille *B. pilosicoli* -spesifisille SP 23S -alukkeille (Leser ym 1997) suunniteltiin Pilo 23sTaq -koetin. Menetelmä saatiin nopealla aikataululla ja vähäisillä testeillä toimimaan hyvin, mutta kvantitatiivinen tarkkuus jäi pienemmällä bakteerimäärillä heikoksi. Menetelmän detektoriraja (10–100 bakt./mg ulostetta) oli samaa tasoa kuin Pilo-hybridisaatiokoettimella, mutta jopa rinnakkaisissa PCR-näytteissä oli huomattavia eroja, eli luotettavaa tietoa bakteerin määrästä ei saatu. Tämän menetelmän käyttöönotto tarvitsisi huomattavasti lisää testauksia.

Menetelmien testaukseen ja herkkyysien määrittämiseen käytetyt standardinäytteet valmistettiin kaksi kertaa, ja jokaista pitoisuutta kummallakin kerralla oli kaksi rinnakkaista näytettä. Rinnakkaisten standardien välillä havaittiin huomattavia poikkeamia PCR:n antamissa pitoisuuksissa. Standardit valmistettiin käsin pipetoimalla, joten on mahdollista, että standardien pitoisuudet todellisuudessa poikkesivat toisistaan, mutta menetelmän toistettavuuden arviointi vaatii vielä lisättestausta.

Ulostenäytteet ovat yksilöllisiä, ja standardeissa käytettiin yhdellä näytteenottokerralla yhdestä siasta otettua ulostetta. Eri ulostenäytteissä on erilaisia PCR-inhibiittoreita, jotka vaikuttavat monistustehokkuuteen ja tulosten kvantitatiivisuus on siten suhteellinen. *B. pilosicoli* -bakteerin suuri liikkuvuus aiheutti myös hankaluutta niitä laskettaessa Bürker-kammiolla, mutta yhtenevät tulokset standardien valmistuskerroilla osoittivat tämän kuitenkin onnistuneen varsin hyvin. *B. pilosicoli* -bakteerin kohdalla tarkan kvantitatiivisuuden saavuttaminen ei ole pienissä pitoisuuksissa tärkeää, koska ollakseen primaarinen taudinaiheuttaja sitä olisi oltava paljon.

Kliinisinä näytteinä tutkittiin oireettomia sikoja tilalta, jolla tiedettiin olleen *B. pilosicoli* -bakteeria aikaisemmin. *B. pilosicoli* -bakteeri on sitkeä säilymään sikatiloilla, joten voitiin olettaa ainakin osan näytteistä olevan positiivisia. Näytteistä tehtiin DNA:n eristykset kahdella erillisellä kerralla ja tulokset olivat yhteneväiset.

Vieroitussioista saaduista näytteistä tehtiin myös perinteisellä viljelymenetelmällä tutkimukset EELA:n (nyk. Evira) Seinäjoen alueyksikössä. *B. pilosicoli* -bakteeri saatiin eristetyksi näytteestä VIER4, joka jäi kvantitatiivisessa PCR:ssä Pilo-hybridisaatiokoettimella

negatiiviseksi ja Pilo 23sTaq -koettimella antoi hyvin matalan positiivisen arvon. Selityksen ristiriitaan antaa australialaisten tutkimustulokset ihmisulosteilla, joissa vertailtiin eri tutkimusmenetelmiä *B. pilosicoli* -bakteerille (Brooke 2003). Brooken tutkimuksissa viljelyllä pystyttiin eristämään *B. pilosicoli* -bakteeri tehdyistä ulostenäytteistä, joiden pitoisuus oli vain 1×10^2 – 2×10^3 cfu/g, kun PCR:n herkkyudeksi määrittyi 1×10^6 bakt./g ulostetta. Viljelyn heikkoudeksi oli kuitenkin muodostunut huono toistettavuus, luotettavuus ja sen pitkä kestoisuus. Viljelyllä ei ollut saatu positiivista tulosta kaikista sellaisista näytteistä, jotka oli mikroskoopilla todettu positiivisiksi eli viljely tuotti paljon vääriä negatiivisia tuloksia. Viljely onkin PCR:ääkin herkempi epäonnistumaan huonon näytteen vuoksi. Suurilla näytemäärillä PCR paljasti enemmän positiivisia tapauksia, eli ainoastaan yksittäisten näytteiden kohdalla viljely osoittautui erityisen herkäksi.

Erytisen mielenkiintoinen oli näyte VIER 2, joka kvantitatiivisilla PCR-menetelmillä oli erittäin voimakkaasti positiivinen. Seinäjoella tehdyssä viljelyssä näytteestä eristettiin brakyspira, mutta lajinmäärittystä ei saatu tehtyä. Oireettomasta siasta olevaksi näytteeksi tapaus on erityinen, koska sen bakteerimäärä ylittää standardinäytteiden voimakkuuden. Tämä tukee käsitystä, että *B. pilosicoli* -bakteerin määrän on oltava suuri ollakseen kliinisten oireiden aiheuttaja. Valitettavasti näytteitä ei ollut oireilevasta spirokeettaripulista kärsivästä siasta, jolloin olisi nähty millaisella tasolla bakteerimäärät sairaiden eläinten näytteissä olisivat olleet.

Viljelyssä muistakin näytteistä (VIER1, VIER3 ja VIER5) saatiin eristettyä brakyspira, mutta lajinmäärittys jäi vaillinaiseksi. Tämä kuvastaa hyvin maljaviljelyn ongelmallisuutta.

Tässä työssä onnistuttiin kehittämään kaksi reaaliaikaista kvantitatiivista PCR-menetelmää *B. pilosicoli* -bakteerin osoittamiseksi. Menetelmät ovat spesifisiä ja valmiita käyttöön, mutta detektorajojen tarkempi määrittäminen vaatii kuitenkin lisätestauksia. Alustavissa määrittelyissä menetelmien detektoraja oli 1×10^4 – 1×10^5 bakt./g ulostetta, mutta kvantitatiivinen tarkkuus alkoi vasta pitoisuuksilla 1×10^6 bakt./g ulostetta. Voidaan kuitenkin varmuudella sanoa, että jos *B. pilosicoli* -bakteeri on primaaritaudinaiheuttaja, näiden menetelmien tarkkuus riittää sen todentamiseen. Tulevaisuudessa menetelmiin tulisi lisätä PCR-reaktioon sisäinen monistuskontrolli, koska ulosteesta eristetyt näytteet poikkeavat toisistaan ja voivat sisältää paljon PCR-inhibiittoreita. Sisäinen monistuskontrolli auttaisi

poistamaan väärät negatiiviset tulokset, sekä varmentaisi muutenkin tutkimuksen laadukkuuden. Menetelmän herkkyyttä voidaan jatkossa pyrkiä parantamaan myös seuraamalla ulostenäytteille soveltuvien DNA-eristysmenetelmien kehittymistä ja päivittää DNA-eristysmenetelmä tarvittaessa.

7 LÄHDELUETTELO

Atyeo RF, Stanton TB, Jensen NS, Suriyaarchichi DS & Hampson DJ, 1999. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox* -based polymerase chain reaction tests. *Veterinary Microbiology*. 67: 47–60.

Brooke CJ, 2003. The occurrence and epidemiology of intestinal spirochaetes in humans in Western Australia. PhD-thesis. Murdoch University, Murdoch, Western Australia, 220 s.

Duhamel GE, Kinyon JM, Mathiesen MR, Murphy DP & Walter D, 1998. *In vitro* activity of four antimicrobial agents against North American isolates of porcine *Serpulina pilosicoli*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10: 350–356.

Fellström C & Gunnarsson A, 1995. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Research in Veterinary Science*. 59: 1–4.

Fellström, C, Pettersson B, Thomson J, Gunnarsson A, Persson M, and Johansson K-E. 1997. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 462–467.

Fisher LF, Olander HV, 1981. Shedding of *Treponema hyodysenteriae*, transmission of disease, and agglutinin response to pigs convalescent from swine dysentery. *American Journal of Veterinary Research*. 42: 450–455.

Fossi M, 2000. *Brachyspira* (aiemmin: *Serpulina*) -bakteereiden lajistosta, isäntäkirjosta sekä merkityksestä sikojen ripulitaudeissa: kirjallisuuskatsaus. *Suomen eläinlääkärilehti: Suomen eläinlääkäriliiton jäsenlehti*. 106: 1.

Fossi M, 2006. Epidemiological aspects and improved differential diagnostics of porcine *Brachyspira pilosicoli*. Doctoral dissertation (article-based). University of Helsinki, Helsinki, Finland.

Fossi M, Heinonen M, Pohjanvirta T, Pelkonen S & Peltoniemi AT. 2001. Eradication of endemic *Brachyspira pilosicoli* infection from a farrowing herd: a case report. *Animal Health Research Reviews*. 2: 53–57.

Fossi, M., T. Pohjanvirta, and S. Pelkonen. 2003. Molecular epidemiological study of *Brachyspira pilosicoli* in Finnish sow herds. *Epidemiology and Infection*. 131: 967–973.

- Hampson DJ & Trott DJ, 1995. *A Review - Intestinal spirochaetal infections of pigs: an overview with an Australian perspective.* *Teoksessa:* Hennessy DP and Cranwell PD (eds.): Manipulating Pig Production V. Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia, ss. 139–169.
- Hampson DJ, Lester GD, Phillips ND, La T, 2006. Isolation of *Brachyspira pilosicoli* from weanling horses with chronic diarrhoea. *Veterinary Record.* 158: 661–662.
- Harland W A, Lee F D, 1967. Intestinal spirochaetosis. *British Medical Journal.* 3: 718–719.
- Harris DL, Hampson DJ & Glock RD, 1999. Swine Dysentery. *Teoksessa:* Straw BE, D'Allaire SD, Mengeling WD and Taylor DJ (eds.): Disease of Swine, 8Ed ed. Iowa State University Press, Ames Iowa USA, ss. 579–600.
- Heinonen M, Fossi M, Jalli J-P, Saloniemi H, Tuovinen V, 2000. Detectability and prevalence of *Brachyspira* species in herds rearing health class feeder pigs in Finland. *Veterinary Record.* 146: 343–347.
- Helie P, Harel J & Higgins R, 2000. Intestinal spirochaetosis in a guinea pig with colorectal prolapse. *Canadian Veterinary Journal.* 41: 124.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PNA, Staley JT & Williams ST, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Williams and Wilkins, Baltimore Maryland.
- Hovind-Hougen K, Birch-Andersen A, Henrik-Nielsen R, Orholm M, Pedersen JO, Teglbjærg PS & Thaysen EH, 1982. Intestinal spirochetosis: Morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology.* 16: 1127–1136.
- Jacobson M, Hård af Segertad C, Gunnarsson A, Fellström C, de Verdier Klingenberg K, Wallgren P, Jensen-Waern M, 2003. *Research in Veterinary Science.* 74: 163–169.
- James JL, 2005. Colonic spirochetosis in animals and humans. *Journal of Food Protection.* 68: 1525–1534.
- Jenkinson SR & Wingar CR, 1981. Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Veterinary Record.* 109: 384–385.

- Jensen TK, 2005. Application of fluorescent *in situ* hybridisation for the diagnosis of *Brachyspira* spp. *Julkaisussa: Proceedings of the 3rd International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy 5–7 June, s. 20–21.*
- Jensen, A.N. and Hoorfar, J., 2002. Optimal purification and sensitive quantification of DNA from faecal samples. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 10 (4): 231–244.
- Joens LA & Kinyon JM, 1982. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *Journal of Clinical Microbiology*. 15: 994–997.
- Kinyon JM & Harris DL, 1979. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the new type strain of *Treponema hyodysenteriae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29: 102–109.
- Koonjul, P. K., W. F. Brandt, J. M. Farrant, and G. G. Lindsey, 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research*. 27: 915–916.
- Kraaz W, Pettersson B, Thunberg U, Engstrand L & Fellström C, 2000. *Brachyspira aalborgi* infection diagnosed by culture and 16S ribosomal DNA sequencing using human colonic biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3555–3560.
- Law CLH, Grierson JM & Stevens SMB, 1994. Rectal spirochaetosis in homosexual men: the association with sexual practices, HIV infection and enteric flora. *Genitourinary Medicine*. 70: 26–29.
- Lee BJ & Hampson DJ, 1999. Lipo-oligosaccharide profiles of *Serpulina pilosicoli* strains and their serological cross-reactivities. *Journal of Medical Microbiology*. 48: 411–415.
- Lee JI & Hampson DJ, 1994. Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. *Journal of Medical Microbiology*. 40: 365–371
- Lee JI, Hampson DJ, Lymbery AJ & Harders SJ, 1993. The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Veterinary Microbiology*. 34: 273–285.
- Leser TD, Møller K, Jensen TK & Jorsal SE, 1997. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly β -haemolytic porcine intestinal spirochetes

by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Molecular and Cellular Probes*. 11: 363–372.

Lindboe CF, Tostrup NE, Nersund R & Rekkavik G, 1993. Human intestinal spirochaetosis in mid-Norway. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 101: 858–864.

McLaren AJ, Trott DJ, Swayne DE, Oxberry SL & Hampson DJ, 1997. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 412–417.

McOrist AL, Jackson M & Bird AR, 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*. 50: 131–139.

Mikosza ASJ, La T, Margawani KR, Brooke CJ and Hampson DJ, 2001. PCR detection of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in human feces. *FEMS Microbiology Letters*. 197: 167–170.

Munshi MA, Taylor NM, Mikosza ASJ, Spencer PBS, and Hampson DJ. 2003. Detection by PCR and isolation assays of the anaerobic intestinal spirochete *Brachyspira aalborgi* from the feces of captive non-human primates. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1187–1191.

Munshi MA, Traub RJ, Robertson ID, Mikosza ASJ, Hampson DJ, 2004. Colonization and risk factors for *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in humans and dogs on tea estates in Assam, India. *Epidemiology and Infection*. 132: 137–144.

The NCBI taxonomy database. Viitattu 20.4.2013.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>>.

Neef NA, Lysons RJ, Trott DJ, Hampson DJ, Jones PW, and Morgan JH. 1994. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity*. 62: 2395–2403.

Olson LD, 1996. Enhanced isolation of *Serpulina hyodysenteriae* by using sliced agar media. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2937–2941.

- Oxberry SL & Hampson DJ, 2003. Colonisation of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*. *Veterinary Microbiology*. 93: 167–174.
- Oxberry SL, Trott DJ & Hampson DJ, 1998. *Serpulina pilosicoli*, waterbirds and water - potential sources of infection for humans and other animals. *Epidemiology and Infection*. 121: 219–225.
- Park NY, Chung CY, McLaren AJ, Atyeo RF & Hampson DJ, 1995. Polymerase chain reaction for identification of human and porcine spirochaetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. *FEMS Microbiology Letters*. 125: 225–230.
- Paster BJ & Dewhirst FE, 2000. Phylogenetic foundation of spirochetes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2: 341–344.
- Pettersson B, Fellström C, Andersson A, Uhlén M, Gunnarsson A & Johansson K-E, 1996. The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Bacteriology*. 178: 4189–4199.
- Podzorski RP & Persing DH, 1995. Molecular detection and identification of microorganisms. *Teoksessa: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover FC (eds.): Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., s. 190–208.
- Rabb, Susan, 2003. Svindysenteri – dess sanering och påverkan på produktionen, samt sjukdomens förekomst i delar av svenska Österbotten. Ammattikorkeaa-asteen opinnäytetyö/examarebete. Yrkeshögskolan Sydväst. UP Lantbruk. Åbo. 58 s.
- Råsbäck T, Jansson DS, Johansson K-E, Fellström C, 2007. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated "Brachyspira suanatina" sp. nov. *Environmental Microbiology*. 9(4): 983–991.
- Seppälä IJT, Oksi J, Viljanen M., 2003. Spirokeetat ja leptospirat. Kirjassa: Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheeri A, Valtonen V (toim.): *Mikrobiologia ja infektiosairaudet Kirja I, I. p.*, Helsinki: Duodecim, s. 247–259.
- Skrzypczak T, Fossi, M. Ahola H, Vuorela J, Prusti M, 2007. Occurrence of *Brachyspira* spp. in farmed birds and dogs in Finland – a preliminary study. Neljäs kansainvälinen konferenssi: Intestinal Spirochaetes in animals and Humans (CSIAH), Praha, Tsekki, 21–22.5.2007.

Smith J., 2005. Review – Colonic Spirochetosis in Animals and Humans. *Journal of Food Protection*. 7: 1525–1534.

Stanton TB., 1997. Physiology of ruminal and intestinal spirochaetes. *Teoksessa*: Hampson DJ, Stanton TB (eds.): Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, England. ss. 7–45.

Stanton TB, Trott DJ, Lee JI, McLaren AJ, Hampson DJ, Paster BJ & Jensen NS, 1996. Differentiation of intestinal spirochetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. *FEMS Microbiology Letters*. 136: 181–186.

Swayne DE, Eaton KA, Stoutenburg J, Trott DJ, Hampson DJ & Jensen NS, 1995. Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. *Infection and Immunity*. 63: 430–436.

Taylor DJ & Alexander TJL, 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *British Veterinary Journal*. 127: 58–61.

Taylor DJ, Simmons JR & Laird HM, 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Veterinary Record*. 106: 324–332.

Thomson JR, Smith WJ, Murray BP, 1998. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Veterinary Record*. 142: 235–239.

Trott DJ, Stanton TB, Jensen NS, Duhamel GE, and Hampson DJ, 1996. *Serpulina pilosicoli* sp.nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 206–215.