

Katri Kangastalo

## **Leptospiroosin diagnostiset tutkimusmenetelmät hevosilla**

Kuvaileva kirjallisuuskatsaus

# **Leptospiroosin diagnostiset tutkimusmenetelmät hevosilla**

Kuvaileva kirjallisuuskatsaus

Katri Kangastalo  
Opinnäytetyö  
Lukukausi syksy 2023  
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma  
Oulun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

---

Tekijä: Katri Kangastalo

Opinnäytetyön nimi: Leptospiroosin diagnostiset tutkimusmenetelmät hevosilla

Työn ohjaajat: Jaana Holappa-Girginkaya & Jaana Hoffren

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2023

Sivumäärä: 51 + 6 liitettä

---

Leptospiroosi on zoonoottinen tauti, jonka aiheuttaa *leptospira*-bakteeri. Tautia esiintyy Suomessa vain vähän, mutta sen esiintyvyys voi kasvaa ajan myötä, kun hevoset ja ihmiset liikkuvat enemmän ympäri maailmaa. Opinnäytetyössä käydään läpi leptospiroosi taudin diagnostisia menetelmiä, tautia, oireita, levinneisyyttä, leviämistapaa sekä hoitoa hevosilla. Opinnäytetyössä käydään läpi myös bakteerin rakennetta ja sukua.

Kuvailevan kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli laatia tutkimus, jonka avulla tietoa leptospiroosi taudin diagnostisista menetelmistä hevosilla löytyisi suomeksi sekä tietojen saatavuus helpottuisi tutkimuksessa käytettyjen lähteiden kautta. Tutkimusta varten suoritettiin tietokantahaku, jonka julkaisujen aikaväli rajattiin vuosiin 2017–2022. Sisäänottokriteereitä käyttäen 17 kansainvälistä tutkimusta ja artikkelia, sekä 1 pro gradu valittiin mukaan tutkimukseen.

Tutkimuksessa selvisi, että käytetyin diagnostinen menetelmä oli MAT eli mikroskooppinen agglutinaatiotesti. Mikroskooppista agglutinaatiotestiä kuvattiin leptospiroosi taudin kultaiseksi standarditestiksi, mutta myös PCR oli hyvin suosittu menetelmä. MAT:ssä positiivisissa tuloksissa oli hyväksytty eri tittereitä, mutta suurimmassa osassa aineistoista 1:100 laimennos, missä agglutinaatioreaktio tapahtui, oli matalimpana rajana positiiviselle tulokselle. Näytemateriaaleista käytetyin oli seerumi.

Taudin yleistyessä tulevaisuudessa olisi hyvä kartoittaa, mitkä diagnostiset menetelmät olisivat parhaita käyttää Suomessa, ja mitä tutkimusmenetelmiä on mahdollisesti tulossa. Taudin leviämisen takia myös kartoitus yleisimmistä serovareista, jotka aiheuttavat taudin hevosille Suomessa olisi hyödyllinen, koska siitä ei ole ajankohtaista tietoa.

---

Asiasanat: Leptospiroosi, *leptospira*, hevonen, diagnostiikka, zoonoosi

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

---

Author: Katri Kangastalo  
Title of thesis: Diagnostic Methods of Leptospirosis in Horses  
Supervisor: Jaana Holappa-Girginkaya & Jaana Hoffren  
Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2023  
Number of pages: 51 + 6 appendices

---

Leptospirosis is zoonotic disease, which is caused by *leptospira*-bacteria. Leptospirosis is rare disease in Finland, but amount of leptospirosis cases can grow, when human and horses travel across the world. This thesis address diagnostic methods of leptospirosis, leptospirosis disease, symptoms, appearance, way of transmitting and treatment in horses. This thesis covers *leptospira*-bacteria's structure and genus.

Goal of this literature review was to compose a study, which can help to find information about diagnostic methods of leptospirosis in horses in Finnish language and that more information would be easier to find through the articles and studies. To this review was accepted 17 international research and review articles and one Finnish master's thesis. These researches, review articles and master's thesis were published during 2017–2022 to increase the reliability.

The most used diagnostic method was microscopic agglutination test. MAT was described to be the golden standard test. Other used method was PCR. In microscopic agglutination test, different titers for positive result were accepted. Most of the studies dilution of 1:100, where agglutination happened was the lowest limit for the positive result. Serum was the most used sample in the studies.

In the future the disease might spread easier in Finland. It would be good to do a study to find out what diagnostic methods would be the best to use in Finland and what methods can be expected to come. It would be necessary to understand and examine the most common serotypes, which cause the disease to horses in Finland. There is not enough current knowledge about them, because of the rareness of appearance in Finland.

---

Keywords: leptospirosis, *leptospira*, horse, diagnostics, zoonosis

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	7
2	LEPTOSPIROOSI.....	8
2.1	Zoonoosi.....	8
2.2	Levinneisyys.....	8
2.3	Oireet .....	9
2.4	Leviämistapa .....	9
2.5	Hoito.....	9
3	LEPTOSPIRA-BAKTEERI .....	11
3.1	<i>Leptospira</i> -bakteerin rakenne.....	11
3.2	<i>Leptospira</i> -bakteerin suku .....	12
4	DIAGNOSTISET MENETELMÄT.....	13
4.1	Polymeraasiketjureaktio – Polymerase chain reaction .....	13
4.2	Mikroskooppinen agglutinaatiotesti .....	14
4.3	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	15
4.4	Immunohistokemia .....	15
4.5	Bakteeriviljely .....	16
4.6	Muita menetelmiä .....	16
5	TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSKYSYMYKSET.....	18
6	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	19
6.1	Kuvaileva kirjallisuuskatsaus .....	19
6.2	Tiedonhankinta ja aineiston kuvaus .....	19
6.3	Tutkittavan ilmiön kuvailu sisällönanalyysin avulla .....	21
7	KIRJALLISUUSKATSAUKSEN TULOKSET.....	23
7.1	Käytetyt diagnostiset menetelmät.....	23
7.2	Näyttemateriaali .....	26
7.3	Menetelmän ja näyttemateriaalin tarkkuus .....	27
7.4	Titteri .....	30
8	TULOSTEN TARKASTELU .....	32
8.1	Diagnostiset menetelmät.....	32
8.2	Näyttemateriaali .....	33
8.3	Menetelmän tarkkuus .....	34

8.4	Titteri .....	36
9	POHDINTA .....	37
9.1	Johtopäätökset .....	37
9.2	Opinnäytetyön luotettavuus ja eettisyys .....	38
9.3	Jatkotutkimusehdotukset .....	40
9.4	Opinnäytetyön arviointi .....	40
9.5	Sovellutus bioanalytikoille .....	41
	LÄHTEET .....	43
	LIITTEET .....	52

# 1 JOHDANTO

Leptospiroosi on zoonoottinen infektio tauti nisäkkäillä, minkä aiheuttaa *leptospira*-bakteeri. Zoonoottisuus tarkoittaa, että bakteeri voi siirtyä eläimestä ihmiseen, ja toisin päin (Ruokavirasto 2022 c). Leptospiroosi tautia ei esiinny Suomessa paljoa, mutta muualla maailmassa se on yleisempi tauti. Bakteerin läsnäoloa voidaan etsiä ja varmistaa diagnostisin menetelmin. Hevosten tartuntatapauksissa *leptospira*-bakteereita on etsitty PCR-tutkimuksella, mikroskooppisella agglutinaatiotestillä, ELISA:lla, bakteerin osoituksella verestä tai kudoksista, virtsa-, veri- tai kudospäyteviljelyllä ja näytteen mikroskopoinnilla tai immunohistokemiallisilla menetelmillä kuten fluoresenssivärjäyksellä. (Salonen 2018; Ruokavirasto 2022 a.)

Kuvailevassa kirjallisuuskatsauksessa käydään läpi leptospiroosi tautia, taudin oireita, taudin leviämistä, ehkäisyä sekä hoitoa, keskittyen diagnostisiin menetelmiin. *Leptospira*-bakteeri ja sen aiheuttama tauti on harvinainen Suomessa, joten se on suhteellisen tuntematon. Määrällisesti hevosten liikkuminen Euroopassa sekä maailmalla kasvaa jatkuvasti, jolloin tartunnan saamisen todennäköisyys kasvaa. Sen takia on tärkeää kartoittaa, miten leptospiroosia voidaan diagnosoida.

## 2 LEPTOSPIROOSI

Leptospiroosi on kuumetauti, jonka aiheuttaa *leptospira*-bakteerisuku. Kaikki *leptospira*-lajit eivät aiheuta leptospiroosi tautia, vaikka serovareja on useampia. Serovari on synonyymi serotyypille, millä tarkoitetaan bakteerien tai virusten alalajeja, jotka voidaan määrittää vasta-aineiden avulla (Terveyskirjasto 2016 a). Leptospiroosi taudilla on zoonoottinen luonne eli se voi tarttua eläimestä ihmiseen. Leptospiroosi on tauti, jota ilmenee eri nisäkäslajeilla, muun muassa naudoilla, hevosilla, siioilla sekä koirilla. Eri eläinlajien leptospiroositartunnoissa on havaittu kyseiselle eläinlajille tyyppisiä serovareja. (Ruokavirasto 2022 a; Ruokavirasto 2022 b.)

### 2.1 Zoonoosi

Zoonoosi määritellään tartuntataudiksi, jonka aiheuttaja kykenee siirtymään ihmisestä eläimeen sekä eläimestä ihmiseen. Zoonoottisen tartuntataudin aiheuttaja voi olla bakteeri, virus, alkueläin, loinen tai prioni. Ihmisen on mahdollista saada tartunta joko suoraan tai välillisesti eläimestä. Välillisellä tartuntatavalla tarkoitetaan, että tartunta tapahtuu jonkin toisen materian välityksellä, esimerkiksi veden, hyönteisten tai elintarvikkeiden kautta. Zoonoottisten tartuntatautien kirjo on laaja, joten tartunta vaihtelee lievän ja hengenvaarallisen välillä. Zoonooseja valvotaan sekä kansallisesti, että kansainvälisesti, ja niiden esiintymisistä tehdään selvitykset, jotka näkyvät Euroopan Elintarviketurvallisuus viranomaisten (EFSA) sekä Euroopan tautien ehkäisyn ja valvonnan keskuksen (ECDC) yhteenvetoraportista. Molemmat viranomaiset tekevät työtä Euroopan Unionin alueella, ja ne keskittyvät zoonoosien torjuntaan sekä zoonoosien ja niiden taudinaiheuttajien seurantaan. Terveystieteiden tutkimuskeskus (THL) keskittyy zoonoosien seurantaan ihmisissä ja Ruokavirasto elintarvikkeissa, eläimissä sekä eläinten rehuissa. (Ruokavirasto 2022 c.)

### 2.2 Levinneisyys

Leptospiroosi tauti on maailmanlaajuinen, vaikka sitä ilmenee eniten trooppisilla ja subtrooppisilla alueilla eli lämpimissä maissa, joissa on kosteat olosuhteet. Suomen lähialueilla tautia esiintyy muun muassa Baltiassa ja Luoteis-Venäjällä. (Verma ym. 2013; Ruokavirasto 2022 a.) Suomessa tauti on varmistettu ainakin kahdella ihmisellä, joissa molemmissa tapauksissa tartunta oli saatu ulkomailta (Salonen 2018).



## 2.3 Oireet

Leptospiroosi taudin oireet vaihtelevat runsaasti. Leptospiroosi taudin oireita hevosilla ovat kuume, hemoglobiinivirtsaisuus, keskenmenot, äkillinen maidontuotannonlasku, munuais- ja maksatulehdukset sekä hedelmättömyys. Oireita ovat myös voimattomuus, painonputoaminen, sidekalvon punoitus, silmien ja ihon keltaisuus, anemia, limakalvon verenpurkaumat, apaattisuus, munuaisten vajaatoiminta erityisesti varsoilla, istukkatulehdus sekä varsan syntyminen kuolleena (Verma ym. 2013). Oireiden moninaisuudesta johtuu, että taudin vakavuus vaihtelee. Tauti voi olla lähes oireeton, mutta se voi olla myös yleisinfektio, joka johtaa kuolemaan. Leptospiroosi-infektiot ovat useimmiten eläimillä subkliinisiä. Subkliinisellä tarkoitetaan piileväoireista (Terveyskirjasto 2016 b). Jos eläin sairastaa leptospiroosi tautia kroonisesti, se voi pysyä taudin kantajana ja oireettomana erittäjänä kuolemaansa asti. Hevosilla krooninen leptospiroosi-infektio voi aiheuttaa silmään jälkitautina uusiutuvan uveiitin eli ERU:n (equine recurrent uveitis). (Ruokavirasto 2022 a.) Uveitti on silmänsairaus, jossa kovakalvon ja verkkokalvon välinen kerros uvea on tulehtunut (Askel Terveysteen 2021).

## 2.4 Leviämistapa

*Leptospira*-bakteeri tarttuu herkästi. Sen yleisin reitti elimistöön on limakalvojen kautta, esimerkiksi suun tai hengitysilman välityksellä. *Leptospira*-bakteeri leviää yleensä eritteiden, esimerkiksi virtsan tai eritteillä saastuneen materian, kuten veden välityksellä. *Leptospira*-bakteeri voi säilyä päiviä tai viikkoja maassa, vedessä tai jätteissä, mutta se ei kykene monistumaan niissä (Begon ym. 2018). Se tekee virtsasta eritteen, joka on tehokas bakteerin levittäjä. Hevonen voi myös jäädä taudin oireettomaksi kantajaksi, jolloin se voi levittää bakteeria ja tautia. (Ruokavirasto 2022 a.) Vaikka se tarttuu herkästi, sen tartuntariskiä ei pidetä suurena. Riskin takia kuitenkin suositellaan käytettäväksi suojarusteita, esimerkiksi abortoituneita sikiöitä tai sairastuneita hevosia käsitellessä. (Salonen 2018.)

## 2.5 Hoito

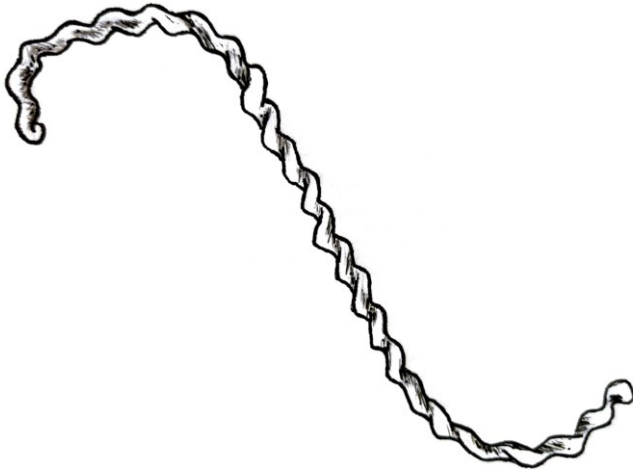
Leptospiroosi taudin hoidossa käytetään antibiootteja, kuten penisilliiniä, streptomysiiniä sekä tetrasykliiniä, joista penisilliini sekä streptomysiini ovat suosituimmat vaihtoehdot (Verma ym. 2013). Carter ym. (2019) tutkimuksessa todettiin Pohjois-Amerikassa olevan yksi rokote, jota voidaan

käyttää leptospiroosi tautia vastaan hevosilla. Vuonna 2022 sekä Yhdysvalloissa että Brasiliassa oli yksi rokote, mikä oli hyväksytty käyttöön hevosten leptospiroosi tautia vastaan. Silloin käytössä olleissa rokotteissa käytettiin inaktivoitua bakteeria, jossa oli alueen yleisimpien serovarien bakteeriyhdistelmä. Hevosten rokotukset eivät ole olleet yleisessä käytössä, koska rokotteet ovat kehitetty tietyille *leptospira*-bakteerin serovareille, jolloin rokotteen toimivuuden varmistamiseksi pitäisi tietää mitä bakteerin serovaria vastaan rokote annetaan. (Di Azevedo & Lilenbaum 2022.)

### 3 LEPTOSPIRA-BAKTEERI

#### 3.1 *Leptospira*-bakteerin rakenne

*Leptospira* on spirokeetta bakteeri, jonka solun ulkorakenne muistuttaa gram-negatiivista bakteeria. Viljelyliuoksessa se on ohut, kiemura sekä vikkelä liikkeistään (Terpstra, WHO & ILS 2003, 15). *Leptospiran* mikroskooppitarkastelussa voidaan huomata, että solun ympärillä on rakeinen rakenne (Ackermann ym. 2021). Solun ulkopinnassa on lipopolysakkaridikerros, ja sen alla on solun kapseli. Niillä on iso vaikutus bakteerin patogeneettisyyteen infektion aikana. Ulkoisen solukalvon eli kapselin alla on peptidoglykaanikerros eli soluseinä, ja sen jälkeen sisäinen kalvo eli solukalvo. Solukalvon ja soluseinän välissä on tila, jossa sijaitsee solun flagella eli siima. Flagella on solun moottori, jonka avulla solu liikkuu sekä tunkeutuu isäntäsoluun. *Leptospira*-bakteerilla on yksi flagella kummassakin solun päässä. Solun päissä on myös koukumainen muoto, joka muodostuu flagellan ansiosta. Flagella ei kuitenkaan vaikuta solun spiraaliseen muotoon. Mitä vähemmän siimoja bakteereilla on, sitä huonommin ne pystyvät liikkumaan. Tästä huolimatta *leptospira*-bakteerilla on erittäin hyvä kyky liikkua. Bakteerien liikkuvuuteen vaikuttaa myös signaalien siirtyminen. Tämä on osa kemotaksia, joka tarkoittaa solujen kaavamaista ja suunnattua liikkumiskäyttäytymistä. Kemotaksiassa kemiallinen aine voi toimia sekä karkottavana että houkutin ärsykkeenä, joka aiheuttaa liikkumisen (Solunetti 2006). Marion-Poll & Wicherin (2018) mukaan bakteerin kemoreseptorit ovat proteiineja tai proteiinikomplekseja, joiden tehtävänä on vastaanottaa ympäristön signaali, ja muuttaa se solun ymmärrettäväksi viestiksi. Kun viestiä muutetaan solun ymmärtämään muotoon, käynnistyy solunsisäinen signaalien sarja, jossa ympäristön tietoa välittyy soluun (Marion-Poll & Wicher 2018). *Leptospira*-bakteerissa kemoreseptoreilla on luonteenomainen järjestys, jossa ne ojentuvat sisäiseltä kalvolta ulospäin. Bakteerin solulimassa on pyöreitä soluplasma kappaleita, joiden tiheys voi olla korkea tai matala. Kappaleiden rooli solussa on epäselvä, mutta on mahdollista, että niiden tarkoituksena on varastoida ravintoaineita. Sytoplasma ja pyöreät soluplasma kappaleet ovat toisensa vieressä ilman ylimääräistä kalvoa. Bakteerin DNA:ta on levittäytynyt ympäri solua. Solussa on myös alueita, joissa ei ole ribosomeja, sekä sen sisällä on kuitumaisia rakenteita, jotka ovat nippuuntuneet. Kuitumaiset rakenteet täyttävät solua, mutta niitä ei löydy solun päistä. Nämä nippuuntuneet rakenteet sisältävät solun DNA:ta. (Haake ym. 2012.)



KUVA 1. *Leptospira*-bakteeri (Virkkunen 2023).

### 3.2 *Leptospira*-bakteerin suku

*Leptospira*-bakteerien sukuun kuuluu 20 bakteerilajia, joista 9 on patogeenisia. Hevosilla leptospiroosi tautia aiheuttaa *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* ja *L. kirschneri* bakteerit. Ne ovat maailmanlaajuisesti yleisimpiä patogeenisia serotyyppejä. Bakteerit kehittyvät evoluution mukana, minkä takia ne muuttuvat jatkuvasti. Tällä hetkellä *leptospira*-bakteerin suku pystytään jakamaan kolmeen eri linjaan riippuen niiden patogeneettisyydestä eli kyvystä aiheuttaa tautia. Nämä kolme linjaa ovat saprofyttinen, intermediaarinen eli välimuotoinen, sekä patogeeninen. Saprofyttisellä bakteerilla ei ole patogeneettisyyttä eli se ei aiheuta tautia. Välimuotoisessa linjassa patogeneettisyys on epäselvä, eli bakteeri voi aiheuttaa tai olla aiheuttamatta tautia. Patogeeninen bakteeri taas aiheuttaa tautia. (Apun ym. 2017; Salonen 2018.) Lipopolysakkaridikerros on erilainen saprofyttisen ja patogeenisen solun pinnassa, joka vaikuttaa bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn. (Haake ym. 2013). Patogeenistä *leptospira*-bakteeria kantaa usein jyräjät, kun taas saprofyttisen linjan bakteeria löytyy usein maaperästä sekä vedestä (Amran ym. 2013).

## 4 DIAGNOSTISET MENETELMÄT

Leptospiroosi tautia voidaan diagnosoida muutamilla eri menetelmillä. Bakteeri voidaan osoittaa määrittämällä sen vasta-aineen pitoisuus. Yleisimmät tavat määrittää seerumin vasta-ainepitoisuus, on joko mikroskooppisella agglutinaatiotestillä eli MAT:llä, tai ELISA:lla. Bakteeria voidaan myös osoittaa verestä tai kudoksista, PCR-tutkimuksella, viljelemällä virtsa-, veri- tai kudoksenäyte ja mikroskopoida se tai käyttää immunohistokemiallisia menetelmiä, kuten immunofluoresenssivärystä. (Salonen 2018.)

### 4.1 Polymeraasiketjureaktio – Polymerase chain reaction

Bakteereilla on tunnusomaisia DNA-jaksoja (Airas 2013, 58). PCR eli polymeraasiketjureaktio-menetelmällä *leptospira*-bakteeri voidaan osoittaa havaitsemalla bakteerin DNA (Terpstra ym. 2003, 85). PCR-menetelmässä on kyse DNA:n monistumisesta synteettisesti. Siinä DNA-polymeraasi syntetisoi uutta DNA-jaksoa templaattista komplementaarisesti eli emäspari-säännön mukaisesti. Emäsparisäännön mukaisesti nukleotidit C, G, T ja A liittyvät tiettyihin nukleotideihin eli ne kulkevat pareittain. Nukleotideista C – G ja T – A ovat pareja toisilleen. Templaattilla tarkoitetaan DNA:n kohtaa, joka sisältää halutun kohdesekvenssin, jota monistetaan. DNA:n monistuminen tapahtuu ympäristössä, joka on spesifisesti puskuroitu, tarkasti säädeltyjä toimintoja hyödyntäen. (Hyvärinen, Mattila & Toivonen 2019, 5.)

PCR reaktiossa on kolme vaihetta, joita toistetaan mitä enemmän DNA-kopioita halutaan. Jokaisessa syklistä DNA-kopioiden lukumäärä kasvaa eksponentiaalisesti. PCR-reaktion vaiheita ovat denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen, ja uuden DNA:n syntetisoiminen. Denaturoituminen on reaktion ensimmäinen vaihe, jossa reaktiolämpötila nostetaan 94–95 °C, jotta DNA:n juosteiden väliset vetysillat katkeavat. Vetysillojen katketessa DNA:sta tulee yksijuosteista, joka mahdollistaa alukkeiden kiinnittymisen juosteeseen. Alukkeet eli primerit ovat 20 nukleotidin mittaisia komponentteja, mitkä määräävät kohdealueen, joka halutaan monistaa. Alukkeiden ominaisuuksiin kuuluu, että ne kiinnittyvät vain tiettyihin templaatteihin. Lämpötilaa alennetaan alukkeen mukaan 40–72 celsiusasteeseen, jotta alukkeet kiinnittyvät juosteeseen emäsparisäännön mukaisesti. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet, lämpötilaa nostetaan, jotta DNA-polymeraasi voi rakentaa uutta DNA-juostetta liittämällä deoksinukleotidejä juosteeseen, jolloin DNA:sta tulee kaksijuosteista. Jos

DNA:ta halutaan monistaa lisää, sykli alkaa alusta. Kun reaktio on valmis, reaktioseos jäädytetään. (Hyvärinen ym. 2019, 5–7.)

PCR-menetelmässä on mahdollista monistaa perintöaines yhdestä solusta, tai jopa kokonainen templaattimolekyylillä eli geenillä. (Hyvärinen ym. 2019, 5). Jos PCR-menetelmällä saadaan monistettua havaittavaa DNA:ta spesifisillä alukkeilla, näytteen voidaan todeta sisältävän kyseisen bakteerin DNA:ta. (Airas 2013, 26). Bakteeri voidaan tunnistaa myös sekvensoinnin avulla, jolloin bakteerin emäsjärjestys selvitetään ja sitä verrataan tietokantojen tietoon (Airas 2013, 17, 26; Myllylä 2013, 6).

## 4.2 Mikroskooppinen agglutinaatiotesti

MAT on lyhenne mikroskooppisesta agglutinaatiotestistä (Terpstra ym. 2003, 63). Agglutinaatioreaktio on immunokompleksien saostusmenetelmä, joka perustuu suoraan havaitsemiseen. Saostusmenetelmä voi olla kvalitatiivinen tai kvantitatiivinen. Agglutinaatiossa vasta-aine ja antigeeni reagoivat keskenään, jolloin muodostuu sakkaa. Antigeenin ja vasta-aineen lisäksi reaktiossa on mukana mikropartikkeleita tai soluja. (Heikkinen, Moilanen & Virén 2014, 29.)

MAT on yksinkertainen tutkimusmenetelmä. Siinä tutkittavaa seerumia on laimennettu, jonka jälkeen siihen sekoitetaan liuosta, jossa on *leptospira*-bakteerin tiettyjä serotyyppejä. Seerumi ja serotyypit sekoitetaan keskenään, jonka jälkeen ne inkuboidaan (Chirathaworn ym. 2014). Sen jälkeen niistä arvioidaan agglutinaation eli saostumisen määrää. MAT:ä suoritetaan testaamalla eri seerumilaimennoksia tiettyä serotyyppiä vastaan, jolloin voidaan määrittää vasta-aineen määrä seerumissa. Tällöin kyse on kvantitatiivisesta tutkimuksesta. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa voidaan määrittää mistä serotyypistä on kyse, testaamalla yhtä seeruminäytettä useaa eri serotyyppiä vastaan. Mikroskooppinen agglutinaatiotesti vaatii pariseerumin, eli saman potilaan toisen seeruminäytteen, joka on otettu pari viikkoa myöhemmin diagnoosin varmistamiseksi, jolloin vasta-ainepitoisuuden tulisi olla nelinkertainen (Liimatta ym. 2017). Titteri on mittayksikkö, jolla tarkoitetaan korkeinta laimennosta, jolla vasta-aineen pitoisuus ilmoitetaan tutkittavasta seerumista, jossa reaktio vielä tapahtuu (Tieteen termipankki 2014 a). Agglutinaation määrän arvioimisessa käytetään hyväksi pimeäkenttämikroskopointia. (Terpstra ym. 2003, 63, 65–66.)

Pimeäkenttämikroskopoinnissa käytetään erityistä kondensaattoria, joka häiritsee suoraa keskeltä tulevaa valoa, jolloin näytteelle siroaa sivuttainen valo. *Leptospira*-bakteeria ei voida havaita normaalilla mikroskoopilla, koska niiden rakenne on liian ohut ja ne värjäytyvät huonosti yleisimmillä värjäysmenetelmillä. Pimeäkenttämikroskooppia käytettäessä *leptospira*-bakteeri näkyy hopeisena juosteena tummaa taustaa vasten. (Terpstra ym. 2003, 51.)

Positiivisessa tuloksessa laimennettu seerumi reagoi eli se agglutinoituu. Korkein laimennos eli päätepiste, missä agglutinaatio tapahtuu 50 %:sti, mutta jättää toiset 50 % soluja vapaiksi, kertoo vasta-aineen pitoisuuden. Näytteet, joissa agglutinaatioreaktio tapahtuu vähintään 50 %:sti, luetaan positiiviseksi tulokseksi. (Terpstra ym. 2003, 63–65.) Positiiviseksi tulokseksi luetaan myös nelinkertainen nousu titterissä, joka tapahtuu akuutin ja toipuvan näytteissä (Agampodi ym. 2021).

### 4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA muodostuu sanoista enzyme-linked immunosorbent assay (Heikkinen ym. 2014, 26). ELISA on serologinen testi, joka tunnistaa vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä tietyille suvuille. Sillä ei pysty tunnistamaan eri seroryhmiä. Testissä vasta-aine, sekä antigeeni asetetaan samalle alustalle, johon on mahdollista lisätä tai poistaa muita nesteitä. Esimerkiksi kuoppalevy on tällainen alusta, jota voi käyttää testissä. Vasta-aine – antigeeniliuosta inkuboidaan, minkä jälkeen niistä poistetaan ylimääräinen vasta-aine pesemällä niitä. Pesujen jälkeen liuokseen lisätään anti vasta-ainetta, joka konjugoituu entsyymiksi. Liuokseen lisätään tietynlainen kromogeeninen substraatti, koska entsyymin toiminta eli reaktio halutaan päättää. Kromogeeninen substraatti tuottaa väriä reagoidessaan (DiaPharma 2023). Sen takia substraatin lisäyksen jälkeen liuos vaihtaa väriä. Värin vahvuuden perusteella voidaan määrittää, kuinka paljon vasta-ainetta on näytteessä, koska värin vahvuus kertoo, paljonko substraatti heikentyi. Substraatin heikentyminen on verrannollinen vasta-aineen määrään näytteessä, jonka jälkeen vasta-aineen pitoisuus tiedetään. (Terpstra ym. 2003, 66–67.)

### 4.4 Immunohistokemia

Leptospiroosi taudin yhtenä tutkimusmenetelmänä käytetään fluoresenssivärjäystä, joka on immunohistokemiallinen menetelmä. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä tietyt antigeenit havaitaan spesifisten vasta-aineiden avulla (Lindroos 2019, 5). Tutkimuksessa käytettävä näyte on yleensä kudoksesta tai solusta. Tutkimuksessa antigeeni värjätään ja vasta-aineeseen liitetään

fluoresoiva leima, joka tunnistaa antigeenin solussa tai kudoksessa. Antigeenistä tehdään näkyvä, jolloin tietty kohta säteilee tietyllä aallonpituudella. Reaktio näkyy värimuutoksena, mikä voidaan havaita käyttäen mikroskooppia. (Hirvonen 2013, 16; Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2022.)

#### 4.5 Bakteriviljely

*Leptospira*-bakteeri on mahdollista viljellä ja kudus-, virtsa tai verinäytteestä. Viljely voidaan tehdä myös selkäydinnesteestä tai vainajan kudoksesta, kuten abortoituneesta sikiöstä (Terpstra ym. 2003, 82). Näytettä viljellään elatusaineessa, joka muodostuu B1- ja B12-vitamiineista, pitkäketjuisista rasvahapoista sekä ammoniumsuloista. 5-fluorourasiili-antibioottia saattaa olla lisättynä elatusaineeseen, koska se estää kontaminanttibakteerien kasvua. Riippuen bakteerin serotyypistä, viljely voi kestää muutamista viikoista useisiin kuukausiin. Viljely-aikaan vaikuttaa myös bakteerien määrä viljelyaineessa. Elatusaineessa ei saa olla liikaa näytettä, koska liian suuri määrä soluja estää bakteerin kasvua (Terpstra ym. 2003, 82). Viljelyn tapahtuessa 30 celsiusasteessa, näytteitä tulisi tarkistaa säännöllisin väliajoin. Bakteerien määrä kasvaa viljelyn aikana, koska bakteeri jakautuu elatusaineessa (Montonen 2016, 8). Jakautumisesta huolimatta bakteerien lopulliseen määrään vaikuttaa elinkelpoisten bakteerien määrä viljelyn aikana, johon lämpötila ja kuolemanjälkeiset muutokset vaikuttavat herkästi (Terpstra ym. 2003, 82). Bakteriviljely on menetelmänä hidas, ja sen herkkyys on matala, mutta sen tarkkuus on korkea. (Salmela 2021, 16.) Viljelyn jälkeen bakteeri voidaan tunnistaa esimerkiksi DNA-sekvensoinnilla tai mikroskoipimalla näyte (Airas 2013, 17; Salonen 2018).

#### 4.6 Muita menetelmiä

Bakteeri voidaan osoittaa suoraan pimeäkenttämikroskoipimalla veri-, virtsa- tai aivo-selkäydinnesteestä. Pimeäkenttämikroskoipinnin lisäksi bakteeri voidaan osoittaa elektronimikroskoipilla (Terpstra ym. 2003, 52). Suoraan mikroskoipointi vaatii riittävän tuoreen näytteen, jossa bakteeria esiintyy paljon, jotta bakteeri voidaan havaita. Bakteerin mikroskoipointi on nopeaa sekä edullista, mutta se on haastavaa ja vaatii taitoa. Sen lisäksi menetelmänä sen herkkyys ja tarkkuus ovat heikkoja, jonka vuoksi sitä ei suositella käytettäväksi. (Salmela 2021, 15–16.)

*Leptospira*-bakteeria voidaan diagnosoida myös lateral flow-testillä (Boehmer ym. 2022). Lateral flow-testi eli lateraalivirtaustesti on immunomääritys -testi, joka havaitsee antigeenin fluoresoivalla



tai kolloidisella kullalla leimatun vasta-aineen avulla. Positiivinen tulos on silminnähtävissä esimerkiksi kahtena viivana testiliuskalla, kun vasta-aine ja antigeeni kohtaavat. (Karppinen & Pirinen 2022, 14.)

Lateksi-agglutinaatiotesti voidaan käyttää bakteerin diagnosointiin (Afsahr ym. 2020). Se on ollut suosittu menetelmä kehitettäessä testikittejä, joista vastaus tulee nopeasti. Lateksi agglutinaatiotestissä vasta-aine reagoi antigeenin kanssa hyödyntäen lateksihelmiä. Lateksihelmet pystyvät imeyttämään pinnallensa vasta-ainetta tai antigeeniä. Agglutinaatio tapahtuu, jos lateksihelmen pinnalla oleva vasta-aine tai antigeeni tunnistaa näytteestä vastinkappaleensa eli antigeenin tai vasta-aineen, riippuen kumpaa lateksihelmen pinnalla on. (Abdullah, Che Hussin & Mahat 2014.) Jos agglutinaatio on havaittavissa silmillä, tulos on positiivinen (Kyllönen, Lagus & Niskanen 2020, 12).

Mikroskopoinnista voidaan tehdä herkempi menetelmä värjäämällä näytteitä. *Leptospira*-bakteerin värjäyksessä käytettäviä metodeja ovat hopea-, immunofluoresenssi- ja immunoperoksidaasivärjäys sekä in-situ hybridisaatio. In situ hybridisaatiossa leimataan vastinnukleinihappojuoste, jonka avulla paikannetaan tietty nukleinihappojuoste (Tieteen termipankki 2014 b). Menetelmissä on otettava huomioon, että väärin positiivisten ja negatiivisten mahdollisuus on suuri niin värjätyissä näytteissä, kuin myös pimeäkenttämikroskopoinnissa. (Terpstra ym. 2003, 15, 52.)

## 5 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kuvata kirjallisuuskatsauksen avulla hevosilla käytettyjä leptospiroosi taudin diagnostisia menetelmiä. Opinnäytetyö on suunnattu bioanalyttikko-opiskelijoille, hevosten kanssa työskenteleville ihmisille ja muille, joita *leptospira*-bakteerin diagnostiset menetelmät kiinnostavat.

Opinnäytetyön tavoitteena on koota kuvailevan kirjallisuuskatsauksen avulla yhteen uusinta tutkimustietoa leptospiroosi taudin diagnostiikasta. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus lisää leptospiroosi taudin tunnettavuutta, mikä on tärkeää, vaikka kyseistä tautia ei esiinny Suomessa paljon. Leptospiroosi taudin esiintyvyys voi kuitenkin nousta, kun hevoset ja ihmiset liikkuvat ympäri maailmaa kuljettaen tautia mukanaan.

Kuvailevan kirjallisuuskatsauksen tutkimuskysymyksiä on vain yksi. Mitä diagnostisia tutkimusmenetelmiä käytetään leptospiroosi taudin diagnosoimiseen hevosilla. Tutkimuskysymyksiä on vain yksi aiheen rajaamisen takia, ettei tutkimus laajenisi liikaa. Kysymys valikoitui sen perusteella, että diagnostiset tutkimusmenetelmät ovat olennaisimpia keinoja, miten *leptospira*-bakteerin aiheuttama tauti voidaan todeta. Taudin oirekuva on hyvin laaja, eikä sen diagnoosia voida tehdä pelkästään oireiden perusteella, koska ne voivat viitata myös moneen muuhun tautiin.

## 6 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 6.1 Kuvaileva kirjallisuuskatsaus

Tämä opinnäytetyö mukailee kuvailevaa kirjallisuuskatsausta yleiskatsauksen toteutustavalla. Kirjallisuuskatsaus on kriittinen ja tiivis erittely kirjallisuudesta, joka liittyy tutkimusongelman aikaisempiin tutkimuksiin. Sen tulee olla toistettavissa, systemaattinen sekä täsmällinen. Kirjallisuuskatsaus on synteesi, joka on tehty kriittisyyden ja tiiviin erittelyn pohjalta, jonka tarkoituksena on täydentää aiempia tutkimuksia aiheesta. Kirjallisuuskatsauksen avulla voidaan myös tunnistaa, arvioida ja tiivistää valmiina olevia julkaistuja tutkimusaineistoja. Se on siis johtopäätös alkuperäisestä tutkimustyöstä. (Salminen 2011, 5; Mannila 2021.)

Salmisen (2011) opetusjulkaisun mukaan kuvaileva kirjallisuuskatsaus luonnehditaan yleiskatsaukseksi ilman tiukoja ja tarkkoja sääntöjä sekä siinä käytettävät aineistot voivat olla laajoja, eikä niiden valintaa rajaa metodiset säännöt. Julkaisun mukaan kuvaileva kirjallisuuskatsaus jaetaan vielä tarkemmin kahteen osaan. Nämä kaksi osaa ovat narratiivinen ja integroiva muoto. Narratiivisessa kirjallisuuskatsauksessa pystytään käsittelemään aiheen historiaa ja kehityskulkua eli sen avulla epäyhtenäistä tietoa voidaan järjestellä niin, että se helppolukuinen ja kronologisesti oikeassa järjestyksessä. Ajallisen järjestyksen lisäksi se voi antaa laajan kuvan käsiteltävästä aiheesta. (Salminen 2011, 6–7.)

Salminen (2011) julkaisussa todetaan, että narratiivisessa katsauksessa on kolme toteutustapaa. Nämä toteuttamistavat ovat toimituksellinen, kommentoiva sekä yleiskatsaus. Yleiskatsauksen katsotaan olevan laajin toteuttamistapa, koska se on laajempi prosessi verrattuna toimitukselliseen tai kommentoivaan tapaan. Se tiivistää aiemmin tehtyjä tutkimuksia eli sen yhteenveto on ytimekäs ja johdonmukainen. (Salminen 2011, 7.)

### 6.2 Tiedonhankinta ja aineiston kuvaus

Aineistohaku tehtiin Elsevier Science Direct, PubMed sekä Google Scholar tietokannoissa. Haussa aineistojen julkaisuvuosia rajoitettiin ja rajattiin vuosiin 2017–2022, jotta tieto olisi mahdollisimman tuoretta. Kirjallisuuskatsaukseen käytettävää aineistoa haettiin ja käsiteltiin tammikuu 2023 – hel-

mikuun 2023 välisenä aikana. Aineistoa haettiin sekä suomen, että englannin kielen termeillä käyttäen hyödyksi Boolean operaattoreita. Käytetyt hakusanat koottiin taulukkoon 2. Käytetyt artikkelit ja tutkimukset ovat kansainvälisiä, koska leptospiroosi taudin diagnostisista tutkimusmenetelmistä ei ole kovin paljon tietoa suomen kielellä. Artikkelien kokotekstien tuli olla saatavilla, sekä niiden tuli olla vertaisarvioitu ja muutoin luotettavista lähteistä. Artikkelien tuli olla maksuttomia ja käsitellä leptospiroosi taudin diagnostisia menetelmiä hevosilla. Artikkelien sisäänotto- ja poissulkukriteerit koottiin taulukkoon 1. Tutkimukseen hyväksyttiin mukaan ne artikkelit, joissa käsiteltiin leptospiroosi tautiin liittyvien muiden tautien diagnostiikkaa, kuten ERU:a, koska ainoastaan leptospiroosi taudin diagnostiikkaan keskittyviä artikkeleita ei ollut riittävästi. Tutkimukseen hyväksyttiin myös ne artikkelit, joissa puhuttiin myös muiden eläinten leptospiroosi taudista. Näistä artikkeleista huomiointiin osuus, jossa käsiteltiin hevosten näytteiden diagnostiikkaa.

*TAULUKKO 1. Opinnäytetyön sisäänotto- ja poissulkukriteerit*

<b>Sisäänottokriteerit</b>	<b>Poissulkukriteerit</b>
Tutkimukset ovat vertaisarvioitu tai muutoin luotettavista lähteistä	Lähde ei käsitellyt tutkimuskysymystä
Teksti oli saatavilla kokonaan	Lähde ei ollut saatavilla kokonaan tai se on maksullinen
Tekstikieli on suomi tai englanti	Tekstikieli on jokin muu kuin suomi tai englanti
Tutkimukset kansallisia ja kansainvälisiä	Lähde ei ole luotettava
Lähteet käsittelevät leptospiroosi tautia hevosilla <i>leptospira</i> -bakteeria, sekä sen diagnostisia tutkimusmenetelmiä	

TAULUKKO 2. Tiivistelmä aineistohaussa käytetyistä sanoista, tietokannoista ja artikkeleista

Tietokanta	Käytetyt hakusanat	Tuloksia yhteensä	Otsikoiden perusteella valittu	Kokonaisuutena mukaan hyväksytyt
<b>Elsevier Science Direct</b>	(Leptospirosis OR leptospira) AND horse AND diagnostics	128	13	4
<b>PubMed</b>	(Leptospirosis OR leptospira) AND horse AND diagnostics	39	29	13
<b>Google Scholar</b>	Leptospiroosi AND hevonen AND diagnostiikka	6	1	1

Haku alkoi hakusanojen miettimisellä, ja kun ne oli päätetty, suoritettiin itse haku. Haun jälkeen tutkimusten otsikot luettiin, ja niiden perusteella valittiin tutkimukset, joiden abstraktit luettiin. Otsikoiden ja abstraktien sekä kokotekstien perusteella valikoitiin artikkelit ja tutkimukset, jotka hyväksyttiin mukaan sisäänotto ja poissulkukriteereitä käyttäen. Tutkimukseen käytettäviä aineistoa valikoitui kaiken kaikkiaan 18 eri artikkelia, tutkimusta tai pro gradua. Pro gradu on suomenkielinen, ja 17 muuta artikkelia ovat kansainvälisiä tutkimuksia tai artikkeleita. Materiaaliin perehdyttiin ja se luettiin huolellisesti läpi tehden muistiinpanoja ja poimien niistä toistuvat asiat eli teemat. Teemat jäsenneltiin ja ne käydään läpi tutkimuksen tuloksissa.

### 6.3 Tutkittavan ilmiön kuvailu sisällönanalyysin avulla

Aineistoa tarkasteltiin laadullisen tutkimuksen aineistolähtöisellä lähestymistavalla. Sisällönanalyysissä korostetaan tekstin eli aineiston sisällöllisiä ja laadullisia merkityksiä. Erityisesti kvalitatiivisessa sisällönanalyysissä tavoitteena on saada systemaattinen ja kattava kuvaus aineistosta. Aineiston analyysi tapahtuu yleensä sykleissä, eli se alkaa, kun aineisto luetaan ensimmäisen kerran

yleiskuvan saamiseksi. Sen jälkeen sitä voidaan alkaa luokittelemaan, ja kun analyysi jatkuu, kategoriat muuttuvat ja kehittyvät. Kategoriat ovat joustavia välineitä aineiston hahmottamiseen siitä huolimatta, että prosessi on systemaattinen ja koko aineiston kattavaa. Luokittelussa kategorioihin käytetään vastakkainasettelua ja vertailua ja sitä käytetään koko analyysin ajan. Sen takia uusia kategorioita voi syntyä, kun analyysi etenee. (Seitamaa-Hakkarainen 2023.)

Aineistoa lukiessa kirjoitettiin ylös asioita, joita kerrottiin tutkimuskysymykseen liittyen. Nämä asiat luokiteltiin, ja niistä muodostettiin teemoja. Teemat järjestettiin, jotta tutkimus olisi helposti luettavissa. Alla on selventävä taulukko 3 synteessin muodostamisesta.

*TAULUKKO 3. Yhteenveto synteessin muodostamisesta*

<b>Yläluokat</b>	<b>Alaluokat</b>
Diagnostinen menetelmä	PCR, mikroskooppinen agglutinaatiotesti (MAT), viljely, eristys, ELISA, hopeavärjäys, fluoresenssi vasta-ainetestti (FAT)
Näytemuoto	Veri (seerumi), virtsa, kohdun lima, kohdun pala/biopsia, silmän lasiaisen neste, silmän kamion neste
Menetelmän tarkkuus	Spesifisyys ja sensitiivisyys
Titteri	Eri maiden käytäntö positiiviselle tulokselle.

## 7 KIRJALLISUUSKATSAUKSEN TULOKSET

Kirjallisuuskatsauksen aineistojen tulokset käydään lävitse tässä osiossa. Aineistojen teemat luokiteltiin, ja ne käydään läpi yksitellen taulukon 3 mukaisesti, jotta ne olisivat helposti luettavissa. Aineistoa referoiden tarkastellaan, mitä artikkelien ja tutkimusten tulokset ovat olleet ja kuinka ne vastaavat tutkimuskysymykseen.

### 7.1 Käytetyt diagnostiset menetelmät

Leptospiroosi taudin epidemiologiaa on tutkittu Kroatiaassa, Pohjois-Italiassa sekä Nicaraguassa. Cvetnic ym. (2017) julkaisema tutkimusartikkeli kertoi leptospiroosi taudin epidemiologiasta sekä taudin kuvasta eläimissä Kroatiaassa vuosien 2009–2014 välisenä aikana. Tutkimus keskittyi uusiin trendeihin niin ihmisen kuin eläinten leptospiroosi-tartunnoissa. Tutkimuksessa he käyttivät näytteitä, joita oli tutkittu mikroskooppisella agglutinaatiotestillä eli MAT:llä. (Cvetnic ym. 2017.) Samoihin aikoihin tehtiin leptospiroosi taudin epidemiologian tutkimus Italian pohjoisosissa, missä näytteet oli kerätty niin koti-, kuin villieläimillä vuosien 2002–2016 välisenä aikana. Pohjois-Italiassa tehdyssä tutkimuksessa näytteet analysoitiin MAT:llä ja niistä etsittiin anti-leptospiran vasta-ainetta. (Bertelloni ym. 2019.) Duttmann ym. (2017) tutkimuksessa *leptospira* spp:n epidemiologista käyttäytymistä analysoitiin kotieläimillä niillä alueilla, joissa leptospiroosi tautia oli todettu ihmisillä. Diagnostisina menetelminä tutkimuksessa olivat MAT, PCR, DNA:n sekvensointi sekä bakteeriviljely. (Duttmann ym. 2017.) Spp liite *leptospira*-bakteerin nimessä tarkoittaa useita *leptospira*-bakteerisuvun lajeja (Oregon State University 2023).

*Leptospira*-bakteerin serologista yleisyyttä on tutkittu Etelä-Brasiliassa, Iranissa sekä Puolassa. Da Silva ym. (2020) tutkimuksessa Etelä-Brasiliassa kartoitettiin *leptospira*-bakteerilajien seroleisyyttä sekä tekijöitä, jotka vaikuttavat *leptospira*-bakteerin aiheuttamaan infekioon sekä bakteerin lisääntymiseen. Tutkimus tehtiin vuonna 2020, ja siinä käytetyt näytteet analysoitiin MAT:llä. (Da Silva ym. 2020.) Samana vuonna Iranissa kartoitettiin, kuinka yleinen *leptospira* spp on serologisesti niin ihmisissä kuin eläimissä. Afshar ym. (2020) tutkimuksen aineisto oli tammikuun 1998 – joulukuun 2017 väliseltä ajalta. Tutkimuksen näytteet analysoitiin käyttäen mikroskooppista agglutinaatiotestiä, sekä lateksi agglutinaatiotestiä. (Afshar ym. 2020.) Vuosi myöhemmin Puolassa julkaistiin tutkimus, missä kartoitettiin *leptospira*-bakteerien serologista yleisyyttä Puolan isoimmilla

arabiahevosrotua jalostavilla tiloilla vuosina 2011–2013. Puolassa julkaistussa tutkimuksessa näytteet tutkittiin mikroskooppisella agglutinaatiotestillä. (Carter ym. 2021.)

ERU:n liitännäisyyttä leptospira-bakteeriin on tutkittu serologisin ja PCR-menetelmää käyttäen muun muassa Israelissa, Iso-Britanniassa sekä Belgiassa. Vuonna 2021 Baum ym. tutki hevosten epidemiologista altistumista leptospira-bakteerille MAT:llä kahdella tilalla Israelissa. Baum ym. (2021) tutkimuksessa todettiin *L.pomona*:n olevan mahdollisesti se leptospira-bakteerin laji, joka aiheuttaa ERU:a eli hevosten kroonista uveiittia. Blundell ym. (2017) mukaan ERU on tunnettu tauti Iso-Britanniassa. Tutkimuksessa arvioitiin erityisesti serologisen testin kykyä varmistustestinä ERU:n diagnosoinnissa. Serologisena testinä leptospira-bakteerin vasta-aineiden tunnistamiseen käytettiin MAT:ia. Belgiassa Grauwels ym. (2018) tutkimuksessa tarkasteltiin intraokulaarisen eli silmänsisäisen leptospira spp:n yleisyyttä. Grauwels ym. (2018) tutkimus tehtiin niin terveistä silmistä, kuin ERU-silmistä. Näytteet tutkittiin käyttämällä diagnostisena menetelmänä PCR-menetelmää. (Grauwels ym. 2018.)

Bjelica ym. (2022) tutkimuksessa selvitettiin leptospira-bakteerin DNA:n ja anti-leptospiran vasta-aineiden korrelaatiota hevosten silmiin, joissa oli todettu ERU. Tutkimuksen näytteet olivat vuosien 2002–2017 väliseltä ajalta. Käytetyt diagnostiset menetelmät olivat MAT, PCR sekä ELISA. ELISA:n rooli oli lähtökohtaisesti olla täydentävä testi, jos MAT:n tuloksesta tuli negatiivinen. (Bjelica ym. 2021.)

Ackermann ym. (2021) tutkimuksessa tarkasteltiin leptospira-bakteerin biofilmin muodostumista hevosilla, joilla on ERU. Biofilmi tarkoittaa alustalla kasvavaa mikrobiyhteisöä (Talvitie 2014). Tutkimuksessa käytettiin Warthin-Starry:n hopeavärjäystä sekä immunohistokemiallista menetelmää. Tutkimuksessa käytettiin näytteitä, joissa tiedettiin olevan leptospira-bakteeria. Sen takia tutkimuksen näytteet tutkittiin ensin PCR-menetelmällä sekä MAT:llä, joilla tartunta voitiin varmistaa. Tutkimukseen hyväksyttiin näytteet, jotka olivat positiivisia PCR-vastauksella. Näytteet värjättiin käyttäen Warthin-Starry:n hopeavärjäystä sekä immunohistokemian menetelmää ja niiden tulokset tarkastettiin käyttämällä valomikroskooppia. (Ackermann ym. 2021.)

Geiger, Gerhards & Wollanke (2021) tutkimuksessa verrattiin SNAP-pikatestiä eli rapid-ELISA-testiä mikroskooppiseen agglutinaatiotestiin. SNAP-pikatesti on testi, joka tunnistaa bakteerilajin sisällä anti-Lip32 vasta-ainetta. Se on hyvin sensitiivinen sekä spesifinen, kun käytetään intraokulaarisia näytteitä eli lasiaisen tai kammion nestettä. Seerumin ja intraokulaaristen näytteiden tuloksia verrattiin toisiinsa, koska niiden tarkkuus on sama näyttemateriaalista riippumatta. Tutkimuk-



nessa MAT todettiin epäspesifisemmäksi seeruminäytteille, verrattuna kammionesteeseen. Tutkimuksen näytteet olivat terveistä sekä ERU-silmistä. Kammioneste näytteille tehtiin myös PCR-tutkimus, jolla varmistettiin *leptospiran*-bakteerin olemassaolo. (Geiger, Gerhards & Wollanke 2021.)

Di Azevedo & Lilenbaum (2022) tutkimuksessa koottiin leptospiroosi taudin liittyvyyttä hevosten lisääntymiseen. Tutkimuksessa pyrittiin siihen, että hevosille voitaisiin ehdottaa uutta EGL-oireyhtymää (equine genital leptospirosis), koska se on *leptospira*-bakteerin aiheuttama tauti, joka liittyy erityisesti lisääntymiselimiin, ja sitä ilmenee hevosilla. Ehdotuksen pohjana oli lehmille todettu oma oireyhtymä kyseisestä sairaudesta. Di Azevedo & Lilenbaum (2022) tutkimuksen aineisto oli vuodesta 1940 lähtien. Aineistoissa *leptospira*-bakteerin olemassaoloa oli tutkittu käyttäen sekä PCR-menetelmää ja MAT:ä. (Di Azevedo & Lilenbaum 2022.)

*Leptospira*-bakteerin aiheuttama infektio voi aiheuttaa munuaisvaurion, ja erityisesti varsat ovat herkkiä saamaan kyseisen vaurion. Munuaisvaurion lisäksi varsat ovat herkempiä saamaan äkillisen hengitysvajauksen. Hengitysvajauksessa keuhkot eivät pysty ottamaan riittävästi happea tai tuulettamaan hiilidioksidia pois elimistöstä (TYKS 2023). *Leptospira*-bakteerin aiheuttaman infektion vaikutusta munuaisvaurioon kartoitettiin, jonka perusteella havaittiin, miten tärkeä varhainen diagnoosi on hoidon kannalta. Fouché ym. (2020) artikkelissa oli mukana neljä varsaa, joilla oli *leptospira interrogans* -bakteerin aiheuttama munuaisvaurio. Artikkelissa käytetyistä näytteistä *leptospira* -bakteeria diagnosoitiin seerumista ja virtsasta käyttäen joko MAT:ä, PCR-menetelmää tai molempia. (Fouché ym. 2020.)

Coloradossa kartoitettiin anti-leptospiran vasta-aineiden esiintyvyyttä hevosilla, jotka vaikuttivat terveille, ennen kuin niille annettiin rokote *L. Pomona*a vastaan. Näytteet oli otettu Coloradon alueen hevosilta heinäkuu 2010 – tammikuun 2017 välisenä aikana. Tutkimuksen hevoset vaikuttivat terveille, mutta niillä oli aikaisemmin todettu anemia, joka oli yhteinen tekijä tutkimuksen näytteissä. Näytteet tutkittiin PCR-menetelmällä tai MAT:llä, etsien *L.interrogans*:n nukleiinihappoa tai vastaainetta. MAT:llä tutkitut näytteet tarkastettiin vielä käyttämällä fluoresenssimikroskooppia. (Fagre ym. 2020.)

Boehmer ym. (2022) tutkimuksessa verrattiin kahta *leptospira*-bakteerin kantaa tutkien niitä mikroskooppisella agglutinaatiotestillä. Riippuen näytemateriaalista, näytteet analysoitiin joko MAT:llä tai PCR-menetelmällä. Tutkimuksen näytteet saatiin hevosilta Saksasta ja sen naapurimaista. (Boehmer ym. 2022.)

Carter ym. (2019) artikkelissa kuvattiin kattavasti leptospiroosi taudista hevosilla. Esimerkiksi missä elimissä tauti on tekemisissä jonkin toisen sairauden kanssa, sen diagnostisista menetelmistä sekä hoidosta. Artikkelissa puhuttiin yleisesti, että diagnostisia menetelmiä ovat PCR, FAT, hopeavärjäys, ELISA sekä MAT. (Carter ym. 2019.)

Salosen (2018) kirjallisuuskatsauksessa kerrottiin, että yleensä leptospiroosi tauti diagnosoidaan vasta-aineen määrittelyllä seerumista käyttäen MAT:ä tai ELISA:a. Todettiin myös, että bakteeri voidaan osoittaa verestä tai kudoksista. PCR:n suorittaminen on mahdollista, viljely voidaan tehdä virtsasta, verestä tai kudoksenäytteestä, joka mikroskopoidaan. Lisäksi immunohistokemialliset menetelmät ovat mahdollisia tapoja varmistaa kliininen diagnoosi. (Salonen 2018.)

## 7.2 Näyttemateriaali

Tutkimuksissa oli käytetty eri näyttemateriaaleja riippuen diagnostisesta tavasta. Käytetyt diagnostiset menetelmät riippuivat käytössä olevista resursseista sekä ajasta. Muutamissa tutkimuksissa haluttiin verrata kahta eri näyttemateriaalia keskenään, jolloin yhdessä tutkimuksessa voitiin käyttää useampaa eri näyttemateriaalia sekä menetelmää. Näytteitä kerättiin sekä terveiltä hevosilta, että hevosilta, joilla tiedettiin tai epäiltiin olevan jokin tietty sairaus kuten ERU.

Artikkeleissa ja tutkimuksissa, joissa diagnostisena menetelmänä oli MAT, näytemuotona oli useimmiten verestä saatu seerumi, mutta muutamassa tutkimuksessa oli käytetty myös silmän lasiaisen nestettä seerumin tilalta. Tutkimukset, joissa oli käytetty seerumia näytteenä, olivat Cvetnic ym. (2017), Bertelloni ym. (2019), Di Azevedo & Lilenbaum (2022), Da Silva ym. (2020), Boehmer ym. (2022), Baum ym. (2021) sekä Carter ym. (2021) tutkimukset. Blundell ym. (2017) tutkimuksessa käytettiin sekä seerumia, että kammionestettä, koska haluttiin verrata tuloksia eri näytemuotojen välillä käyttäen mikroskooppista agglutinaatiotestiä.

Fagre ym. (2020) tutkimuksessa käytettiin seerumia tutkien sitä sekä PCR-menetelmällä, että MAT:llä, jossa MAT:ssä korkein laimennos määritettiin käyttämällä fluoresenssi mikroskooppia. Fouché ym. (2020) tutkimuksessa näyttemateriaaleina olivat seerumi, josta tehtiin MAT sekä virtsaa, josta tehtiin PCR-tutkimus. Afshar ym. (2020) tekemässä tutkimuksessa näytteiden analyysit oli tehty verestä sekä virtsasta. Verestä tehtiin MAT sekä lateksi agglutinaatio -testi ja virtsa viljeltiin. Duttmann ym. (2017) tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat verta sekä virtsaa.

Di Azevedo & Lilenbaum (2022) tutkimuksessa käytettiin kohdun limakalvoa ja kohdun palasia, joista tehtiin PCR-tutkimus sekä seerumia MAT:n suorittamiseen. Boehmer ym. (2022) tutkimuksessa käytettiin niin seerumia, kuin lasiaisen ja kammion nestettä, jotka tutkittiin käyttäen MAT:ä, sekä lasiaisen ja kammion nesteet tutkittiin lisäksi myös PCR:llä. Geiger ym. (2021) käyttivät tutkimuksessaan seerumia sekä silmän kammionestettä tutkien niitä rapid-ELISA:lla sekä MAT:llä. Carter ym. (2019) kertovat artikkelissaan, että *leptospira*-bakteerin diagnoosi voidaan tehdä kohdun kudoksesta tai nesteestä, istukasta, napanuorasta, sikiön maksasta tai munuaisesta, virtsasta, silmän tai sikiön nesteistä ja verestä.

Bjelica ym. (2022) tutkimuksessa näytteenä käytettiin intraokulaarisia nesteitä eli lasiaisen ja kammion nesteitä, joita tutkittiin PCR:llä sekä osaa näytteistä myös ELISA:lla. Ackermann ym. (2021) tutkimuksessa näyttemateriaalina oli lasiaisen nestettä, joita tutkittiin käyttäen immunohistokemian värjäystä sekä Warthin-Starry hopeavärjäystä. Grauwels ym. (2018) käyttivät silmän lasiaisen sekä kammion nestettä ja tutkivat näytteitä PCR-menetelmällä.

### 7.3 Menetelmän ja näyttemateriaalin tarkkuus

Joissakin tutkimuksissa verrattiin kahden eri menetelmän tai näyttemateriaalin tarkkuutta. Serologinen MAT, todettiin useammassa tutkimuksessa epäspesifiseksi, koska näytteiden vasta-ainepitoisuudet olivat matalia. Erityisesti näin oli Di Azevedon & Lilenbaum (2022) tutkimuksessa. PCR:n todettiin olevan nopea sekä ratkaisukykyinen tutkimusmenetelmä. Tutkimuksessa todistettiin eläimen ollessa PCR positiivinen genitaalialueen näytteestä, vasta-ainepitoisuudet ovat yleensä niin matalia, ettei niitä voida tunnistaa MAT:llä. MAT on kuitenkin hyödyllinen, jos epäillään akuuttia leptospiroosi tautia. MAT:llä voidaan myös arvioida, mikä serovari saattaa olla liikkeellä kiertävästi. Niin kutsutussa hiljaisessa taudissa vasta-ainepitoisuus ei kasva niin korkeaksi, mikä on rajoittava tekijä leptospiroosi taudin osoittamisessa MAT:llä. PCR taas osoittaa sen huomattavasti paremmin koska se on erittäin herkkä sekä spesifinen tutkimus. (Di Azevedo & Lilenbaum 2022.)

MAT on laadullinen tutkimus, jonka avulla voidaan selvittää, missä vaiheessa infektio on vasta-ainepitoisuuden mukaan. Sen lisäksi sillä voi selvittää bakteerin seroryhmän, joka aiheuttaa infektion. ELISA:lla ei ole kykyä tunnistaa infektion vaihetta kuten ei lateral-flow-testeilläkään. Boehmer ym. (2022) mukaan PCR ei kuitenkaan ole luotettava menetelmä jokaisessa taudin vaiheessa. Esimerkiksi kun bakteerin määrä on vielä liian alhainen PCR:llä tunnistettavaksi. Tutkimuksessa tun-

nistettiin MAT:ä käyttäen prosentuaalisesti enemmän vasta-aineita lasiaisen nesteestä kuin seerumista, mikä tukee tietoa siitä, että leptospiroosi voi olla enemmän paikallinen infektio. MAT todetaan kuitenkin arvokkaaksi sekä joustavaksi menetelmäksi, koska se voidaan tehdä monesta eri näyttemateriaalista, vaikka sen suorittaminen on monimutkaisempaa verrattuna viljelyyn. (Boehmer ym. 2022.)

Blundell ym. (2017) viittaa toiseen tutkimukseen, jossa *leptospira*-bakteeri oli tunnistettu PCR:n avulla. Heidän oman tutkimuksensa tulosta verrattiin toiseen tutkimukseen päätyen tulokseen, jossa MAT sekä PCR tunnistavat bakteerin paremmin lasiaisen nesteestä verrattuna viljelyyn tai elektronimikroskooppilla tutkimiseen. Tutkimuksessa mainitaan kuitenkin MAT:n mahdollisuus risti-reaktioon, jolloin tarkan seroryhmän määrittäminen hankaloituu. (Blundell ym. 2017.)

Bjelica ym. (2022) tutkimuksessa ELISA sekä MAT olivat yhtä tarkkoja, ja molempien tulos oli 83 %. PCR:llä luku oli 72 %. Tarkkuuden arvioitiin olevan korkeampi MAT:lla siksi, koska vasta-aineet, jotka agglutinoituvat ovat jakautuneet paremmin koko alueelle lasiaisnesteessä, sekä niitä tuotetaan lisää jatkuvasti. PCR:ssä taas *leptospira*-bakteerin DNA on vapaana nesteessä, jolloin DNA:ta ei välttämättä saada joka näytteeseen. Tutkimuksen mukaan biofilmi mikä tuotettiin lasiaisessa, ei todennäköisesti vapautta bakteeria jatkuvasti, mikä saattaa vaikuttaa siihen, että PCR ei ole niin sensitiivinen. (Bjelica ym. 2022.)

PCR on nopeampi ja sensitiivisempi menetelmä tunnistaa *leptospira*-bakteeri, kun sitä verrataan bakteeriviljelyyn ja eristämiseen, mutta siinä on oma ongelmansa. Nukleiinihappo vapautuu ajoittain, jonka takia nukleiinihappoa ei ole jatkuvasti näytteessä. Hyvänä puolena MAT:ssä on, että se pystyy tunnistamaan molemmat IgG sekä IgM vasta-aineet tiettyjä serovareja kohtaan seerumista. (Fagre ym. 2020.)

Ackermann ym. (2021) tutkimuksessa käytetyt näytteet haluttiin tutkia ensin PCR:llä sekä MAT:llä, jotta ne voitiin varmistaa positiivisiksi näytteiksi. Näytteistä (n=29) oli tutkittu ja varmistettu PCR:llä positiivisiksi, jonka jälkeen niille tehtiin MAT, joista 28 oli positiivisia. Kaikista laseista ei löydetty *leptospira* spp:ta siitä huolimatta käytettiin lasille hopeavärjäystä vai immunohistokemian menetelmää. Tutkimuksen mukaan yhtenä syynä voi olla se, että näytteitä oli laimennettu, jonka takia bakteeria oli pienemmässä suhteessa verrattuna alkuperäiseen näytteeseen. Sekä hopeavärjäyksellä, että immunohistokemian värjäyksellä pystyttiin tunnistamaan ja erottamaan yksittäiset organismit toisistaan. (Ackermann ym. 2021.)

Geiger ym. (2021) päätyivät tutkimuksessaan tulokseen, että kun näyte on intraokulaarinen, sen herkkyys sekä sensitiivisyys on sama niin MAT:llä kuin SNAP leptolla. MAT ei kuitenkaan yllä samalle tasolle spesifisyydessä, kun kyse on seeruminäytteestä, koska MAT antoi positiivisen tuloksen myös puolelle terveiden hevosten näytteistä. Tutkimus osoitti, että intraokulaarisesta näytteestä tehty SNAP Lepto, on informatiivisesti arvokkaampi verrattuna seeruminäytteisiin. Seeruminäytteen ollessa negatiivinen MAT:llä, se oli myös useimmiten negatiivinen käytettäessä SNAP Leptoa. SNAP Lepto testiä tehdessä huomattiin värin intensiivisyyden ero seerumin ja intraokulaarisen nesteiden välillä, joka on huomattavasti vähäisempi käytettäessä seerumia. (Geiger ym. 2021.)

Fouché ym. (2020), tutkimuksessa tarkasteltiin hiukan eri diagnostisten menetelmien tarkkuutta. Tutkimuksessa todettiin, että PCR on tehokas menetelmä tunnistamaan *leptospira*-bakteerin aiheuttama abortti, kun sitä verrattiin MAT:in ja FAT:in. (Fouché ym. 2020.)

Carter ym. (2019) totesivat artikkelissaan, että *leptospira*-bakteeriin liittyvissä aborteissa diagnoosi on mahdollista tehdä parhaiten PCR-menetelmällä abortoituneesta kudoksesta tai nesteestä. Vaihtoehtoisesti diagnoosi voidaan tehdä FAT:lla sikiön maksasta tai munuaisesta, istukasta tai napanuorasta. Molempien tutkimustapojen tarkkuus sekä sensitiivisyys ovat lähellä 100 %, minkä takia ne ovat parhaimpia tutkimustapoja. Hopeavärjäys, esimerkiksi munuaisesta on riskialtis, koska väärin positiivisten sekä negatiivisten tulosten mahdollisuus on suuri. Artikkelin mukaan PCR-menetelmää suositetaan myös nestemäisten näytemateriaalien analysoinnissa. Tällaisia näytemateriaaleja ovat virtsa, okulaarinnesteet, sikiövesi ja veri. PCR-menetelmän, viljelyn sekä pimeäkenttä-mikroskopoinnin tulokset ovat sensitiivisempiä, jos potilas on saanut furosemidia ja virtsanäyte on annettu lääkkeenoton jälkeen. Artikkelin kirjoittajat olivat etsineet tietoa löytämättä sitä, kuinka sensitiivinen sekä spesifinen fluoresenssi vasta-ainetesti on tehtynä virtsanäytteestä. He olivat tehneet kokeellisen tutkimuksen, jonka tuloksena fluoresenssi vasta-ainetutkimus ei ole sensitiivinen eikä spesifinen. Mikroskooppinen agglutinaatiotesti mainittiin kultaisena serologisena standarditestinä. ELISA:n kerrottiin olevan yhtä herkkä ja vasta-aineita tunnistava tutkimus kuin mikroskooppinen agglutinaatiotesti. (Carter ym. 2019.)

Grauwels ym. (2018) tutkimuksessa käytettiin lasiaisen ja kammion nestettä näytteenä, joista molemmista näytemateriaaleista etsittiin *leptospira* spp:tä PCR-menetelmällä. Lopputuloksena kahdeksan hevosen näytteet olivat positiivisia molemmista näytemateriaaleista. Yhdeksällä hevosella näyte oli positiivinen ainoastaan lasiaisen nesteestä ja kolmen hevosen näytteet olivat positiivisia

ainoastaan kammion nesteestä. Tutkimuksessa käytettiin PCR-menetelmää, koska sen sensitiivisyys sekä spesifisyys on korkea analyttisesti. (Grauwels ym. 2018.)

Duttmann ym. (2017) tutkimuksessa analysoitujen näytteiden tulokset olivat positiivisia 35.10 % MAT:illä, 30,31 % viljellen, sekä 31.10 % PCR:illä. DNA:n sekvensoinnissa *lfb1* lokuksen analyysissä löydettiin 2 eri *leptospiran* kantaa hevosilta. (Duttmann ym. 2017.)

#### 7.4 Titteri

Tutkimuksissa, joissa diagnostisena menetelmänä oli MAT, oli käytössä titteriraja, joka määritteli näytteen joko positiiviseksi tai negatiiviseksi. Titteri tarkoittaa korkeinta laimennosta, missä tapahtuu tutkittava reaktio, millä vasta-aineen pitoisuus ilmoitetaan (Tieteen termipankki 2014 a). 1:100 laimennoksen kerrottiin olevan matala joissakin tutkimuksissa, mutta tulos voitiin lukea positiiviseksi. Näin todettiin esimerkiksi Bertelloni ym. (2019) tutkimuksessa.

Da Silva ym. (2020) katsoivat tuloksen positiiviseksi 1:100 laimennoksessa, jos siinä tapahtui yli 50 % agglutinaatio. Näytettä laimennettiin lopullisen tuloksen saamiseksi niin kauan, että agglutinaation määrä oli alle 50 % (Da Silva ym. 2020). Fagre ym. (2020) tutkimuksessa näytteitä laimennettiin niin kauan, että agglutinaatio tipahti alle 50 %. Suurin laimennos tutkimuksessa oli 1:6400, mutta näyte luettiin positiiviseksi jo 1:100 laimennoksessa (Fagre ym. 2020). Blundell ym. (2017) tutkimus katsoi tuloksen positiiviseksi 1:100 laimennoksella, jos agglutinaatiota syntyi.

Bjelica ym. (2022) tutkimuksessa 1:100 tai korkeammat titterit luettiin positiivisiksi. Positiiviset tulokset vaihtelivat runsaasti 1:100, 1:400, 1:800, 1:3200 ja 1:6400 tai korkeamman laimennoksen välillä. Jos näytteessä tapahtui agglutinaatiota 1:25 tai 1:50 laimennoksilla, näytteille tehtiin lisätutkimuksia. (Bjelica ym. 2022.) Baum ym. (2021) tutkimuksessa serologinen tulos oli positiivinen, jos titteri oli yli 200, epäilyttävä jos tulos oli 100, ja jos pitoisuus oli 50 tai alle, tulos oli negatiivinen.

Cvetnic ym. (2017) tutkimuksessa positiiviseksi tulokseksi laskettiin hevosilla 1:200 titteri *L. Australis* ja *L. Bratislava* serovareille, mutta muille 1:400 titteri. Geiger ym. (2021) tutkimuksessa hyväksyttiin positiiviseksi 1:100 titteri vähintään yhdessä tai useammassa serovarissa sekä snap testissä haalea sininen viiva. Fouché ym. (2020) tutkimuksessa ei käytetty tiettyä rajaa, mikä luettiin posi-

tiiviseksi tai negatiiviseksi tulokseksi. Seeruminäytteet tutkittiin MAT:llä, joiden positiiviseksi tulokseksi luettavat titterit vaihtelivat 1:100 ja 1:800 välillä riippuen seroryhmästä. Varsoista kolmen virtsanäytteet tutkittiin PCR:llä, joista kaikille kolmelle tulos oli positiivinen. (Fouché ym. 2020.)

## 8 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä osiossa tarkastellaan tutkimuksen tuloksia, sekä tuloksiin vaikuttavia asioita, joita tutkimuksia lukiessa on ilmentynyt. Kirjallisuuskatsauksessa käytettyjen tutkimuksien lisäksi tässä osiossa on viitattu myös muihin tieteellisiin julkaisuihin, joissa on käyty läpi diagnostisiin menetelmiin vaikuttavia tekijöitä.

### 8.1 Diagnostiset menetelmät

Jokaisella tutkimuksella oli tietty tapa analysoida näytteet, näistä suosituin analysointitapa oli MAT. Tutkimuksen oman diagnostisen menetelmän lisäksi niissä ehdotettiin vaihtoehtoisia tapoja. Di Azevedo & Lilenbaum (2022) ehdottivat bakteeriviljelyä verestä, virtsasta tai kudoksesta. Fagre ym. (2020) mainitsivat bakteeriviljelyn ja bakteerin eristämisen. Fouché ym. (2020) tutkimuksessa vaihtoehtoiset tavat olivat virtsanviljely sekä virtsan fluoresenssivärjäys ja munuaisten biopsia. Ackermann ym. (2021) tutkimuksessa muistutettiin elektronimikroskoopin sekä ELISA:n diagnostista mahdollisuuksista eri värjäyksien ohella.

Leptospiroosi taudin diagnostiikassa pitäisi ottaa huomioon muutamia eri asioita kuten milloin altistuminen on tapahtunut, kliininen yleisilme sekä laboratorioarvot kuten myös suorien ja epäsuorien testien tulokset. Erilaisia testejä tulisi tehdä useampi, koska kyky havaita bakteeri vaihtelee infektion eri vaiheessa. Suora tunnistusmenetelmä on yleensä tarkin menetelmä infektion alkuvaiheessa, jonka takia ei ole yhtä oikeaa diagnostista testiä. (Boehmer ym. 2022.) Suoralla tunnistusmenetelmällä tarkoitetaan bakteerin osoittavia menetelmiä kuten suora mikroskopointi, bakteeriviljely sekä PCR-menetelmä. Epäsuorat diagnostiset menetelmät perustuvat vasta-aineiden havaitsemiseen, joita ovat esimerkiksi MAT ja ELISA (Salmela 2021.)

Myös menetelmissä voi olla haasteita. Viljely tuli esille aikaa vievänä tutkimusmenetelmänä (Da Silva ym. 2020; Boehmer ym. 2022). MAT:ssä on omat riskinsä liittyen spesifisyyteen, mikä tunnistettiin tutkimuksessa. Näytteessä olevat vasta-aineet voivat reagoida ristiin, jolloin tarkka serovarin määrittäminen on hankalaa, erityisesti infektion alkuvaiheessa. (Blundell ym. 2017.)



*Leptospira*-bakteerin kantojen värjäyksessä huomattiin ero laboratorio-oloissa viljellyn kannan sekä luonnonoloissa kasvaneen kannan ero. Ackermann ym. (2021) värjäivät WHO:n (World Health Organization) viljeltyjä kantoja, sekä muita kantoja Warthin-Starry:n hopeavärjäyksellä, sekä immunohistokemian menetelmällä. Tutkimuksessa huomattiin, että luonnon *leptospira* spp. näyttää mikroskoopilla tarkasteltuna 1–2 mikrometriä paksummalta sekä vähemmän hauraalle verrattuna WHO:n *leptospira* spp:n kantaan. Ero näkyi erityisen hyvin Warthin-Starry:n hopeavärjäyksessä. (Ackermann ym. 2021.)

Bjelica ym. (2022) tutkimuksessa käytettiin ELISA:a täydentävänä menetelmänä. ELISA:lla tutkittiin näytteitä, jotka olivat negatiivisia MAT:llä. ELISA on sensitiivinen diagnostinen menetelmä, koska se pystyy tunnistamaan IgG, IgA sekä IgM-vasta-aineita. ELISA jäi täydentäväksi menetelmäksi sen takia, koska se ei sopinut tutkimukseen budjetti- ja aikasyistä. Artikkelissa mainittiin Goldmann-Witmer coefficient (GWC), joka on laskentamenetelmä intraokulaaristen vasta-aineiden tuotannon tunnistamiseen. Sitä käytettiin ennen kuin seerumitesteistä tuli luotettava uveitin diagnosoinnissa. (Bjelica ym. 2022.)

## 8.2 Näyttemateriaali

Ackermann ym. (2021) tutkimuksessa pohdittiin, miksi lasiaisen nesteestä otetut näytteet ovat useammin positiivisia sekä PCR:llä, että viljeltäessä verrattuna kammionesteen näytteisiin, vaikka tu- lehdus on tunnistettavissa molemmista näyttemateriaaleista. Tutkimuksessa todettiin bakteerin ole- van yleensä ensin lasiaisen nesteessä, mistä se siirtyi kammionesteeseen veden välityksellä, mikä voi olla yksi syy. (Ackermann ym. 2021.)

Intraokulaariset näytteet otetaan silmästä. Jos ERU on taudin loppuvaiheessa, silmän intraokulaa- riset rakenteet eivät ole fysiologisesti kunnossa. Se saattaa olla syy, miksi *leptospira*-bakteerin ai- heuttama intraokulaarisen tulehduksen tunnistaminen epäonnistuu. Jos silmät ovat vähän vahin- goittuneet taudin seurauksena, niiden ei pitäisi vuotaa proteiineja uvean eli suonikalvoston veri- suonista. Bjelica ym. (2022) tutkimuksen mukaan sen takia näytteet, jotka ovat negatiivisia alle 1:100 laimennoksissa, pitäisi hyväksyä positiivisena. Jos uveitti tulee uudelleen, pidetään aiemmin saatua tulosta vääränä negatiivisena. PCR:llä sekä MAT:lla väärän negatiivisuuden mahdollisuus voi riippua mistä ja milloin lasiaisen näyte on otettu. Erityisesti ERU:n ollessa taudin alkupuolella,

kun immuunireaktio ja vasta-aineiden tuottaminen ei ole käynnistynyt. Taudin edetessä ja muutosten tullessa yhä ilmiselvemmiksi, myös laboratoriotestien tulokset muuttuvat luotettavimmiksi. (Bjelica ym. 2022.)

Grauwels ym. (2018) tutkimuksen mukaan näytemateriaalin rakenne, voi vaikuttaa tulokseen. Esimerkiksi Grauwels ym. (2018) tutkimuksessa käytetty lasiainen neste on parempi kuin kammion neste, koska sen hydrogeelisessä rakenteessa on enemmän proteiineja. Hydrogeeli on veteen liukenematon vähintään kahden yhdisteen seos, joista toinen on nestemäisessä ja toinen kiinteässä olomuodossa (Korhonen 2019).

Di Azevedo & Lilenbaum (2022) tutkivat leptospiroosi tautia lisääntymiselimissä, jonka takia he käyttivät tutkimuksessaan näytemateriaalina kohdun palasia sekä limakalvoa, voidakseen osoittaa *leptospira*-bakteeria niistä. Juuri näitä näytemuotoja käytettiin, koska on tiedossa, että EGL-taudissa *leptospira*-bakteeri siirtyy astutuksen yhteydessä. (Di Azevedo & Lilenbaum 2022.)

Duttmann ym. (2017) arvioi tutkimuksessaan, että *leptospira*-bakteerien selviytymiseen vaikuttaa virtsan pH. Esimerkkinä tutkimuksessa käytetään lihansyöjien virtsaa, jonka pH on matalampi verrattuna kasvinsyöjiin, milloin *leptospira*-bakteerien määrä on pienempi. (Duttmann ym. 2017.)

### **8.3 Menetelmän tarkkuus**

Agglutinaatiossa eli sakkautumisessa on kyse antigeenistä sekä vasta-aineesta, jotka reagoivat keskenään. Sakkautumisen määrään vaikuttaa antigeenien sekä vasta-aineen määrien suhde. Jos toista on huomattavasti enemmän kuin toista, se voi heikentää sakkautumista. Saostumisreaktiossa on tärkeää, että antigeenit ovat puhtaita, vasta-aineet ovat spesifisiä ja partikkelit ovat yhdenmukaisia sekä stabiileja. (Heikkinen ym. 2014, 29.)

Da Silva ym. (2020) tutkimuksessa käytettiin eläviä antigeenejä, mutta muissa tutkimuksissa ei mainittu, oliko niissä käytetty kuolleita vai eläviä antigeenejä. Terpstra ym. (2003) mukaan elävien ja kuolleiden antigeenien käyttö vaikuttaa agglutinaation määrään MAT:ssä riippuen kumpaa antigeeniä käytetään. Kuolleiden antigeenien käyttö oli sensitiivisempi, mutta ei niin spesifinen. Elävää antigeeniä käytettäessä spesifisyys on suurempi. (Terpstra ym. 2003, 64.)

Serologisia metodeja pidetään hyödyllisinä leptospiroosi taudin seulonnassa sekä diagnosoinnissa. Siihen kuitenkin vaikuttaa infektion vaihe sekä tartunnan saaneen eläimen immuunireaktio. (Carter ym. 2021.) Immuunireaktio voi olla niin pieni, että vasta-aineiden mittaaminen ei onnistu niiden takia (Ackermann ym. 2021). Sen lisäksi on mahdollista, että näyte otetaan liian aikaisessa vaiheessa, jolloin vasta-aineet eivät ole havaittavissa (Baum ym. 2020). MAT:ä suorittaessa täytyy kuitenkin ottaa huomioon sen kyvyttömyys erottaa IgG ja IgM vasta-aineet toisistaan (Fagre ym. 2020) sekä mahdollinen ristireaktio serovarien välillä (Blundell ym. 2017; Duttman ym. 2017; Da Silva ym. 2020; Fagre ym. 2020; Fouché ym. 2020).

Geiger ym. (2021) pitää MAT:ä haastavana menetelmänä, koska se vaatii ammatillista osaamista, jotta testin voi suorittaa. Ammatillisen osaamisen lisäksi saatavilla tulisi olla useita serovareja, jotta tutkimuksen voi tehdä. MAT:n spesifisyyden puute johtuu osittain siitä, että *leptospira*-bakteeria on hevosilla paljon, eli sen tausta-arvo on liian suuri. Geiger ym. (2021) ottaa kantaa in-house ELISA menetelmään kertoen, että se on hyvin sensitiivinen sekä spesifinen, joista suurin osa pyrkii havaitsemaan IgA vasta-aineita. In house menetelmällä tarkoitetaan organisaation sisällä kehitettyä menetelmää (Saarinen 2018). In-house ELISA:a käyttäessä on hyvä huomioida, että se tunnistaa IgA vasta-aineita myös terveiltä hevosilta. ELISA on parempi infektion akuutissa vaiheessa, verrattuna MAT:in, vaikka MAT:n kerrotaan olevan epäluotettava tutkimusmenetelmä myös kroonisissa tulehduksissa. SNAP Lepto ei ole spesifinen tietyille immunoglobuliineille, eli se tunnistaa kaikki vasta-aineet eri immunoglobuliiniryhmistä, joka on etu *leptospiran*-bakteerin tunnistamisessa. PCR-menetelmää ja MAT:ä verrattaessa toisiinsa todettiin PCR:n olevan parempi, koska se kykenee havaitsemaan LipL32-geenin. Jos MAT:ssa ei ole tiettyä serovaria käytössä, se ei välttämättä tunnistaa bakteeria. (Geiger ym. 2021.)

Terpstra ym. (2003) tukee Geiger ym. (2021) näkemystä ELISA:n käytöstä infektion alkuvaiheessa, koska se voi antaa positiivisen vastauksen jopa 6–8 päivää ensimmäisen kliinisen oireen ilmaantuttua. Taudin edetessä ELISA voi antaa myös nopeamman negatiivisen vastauksen kuin MAT. Nopeuden lisäksi ELISA on sensitiivisempi IgM vasta-aineille. (Terpstra ym. 2003, 68.)

Grauwels ym. (2018) tutkimuksen mukaan serologinen tutkimus ainoastaan verestä ei ole luotettava. Sen sijaan PCR-tutkimus on käytännöllinen ja luotettava tutkimus niin eläinlääketieteessä, kuin ihmisten lääketieteessä. Se ei kykene erottamaan serovareja, vaikka se on sensitiivinen sekä spesifinen, mutta se pystyy analysoimaan pienen määrän näytettä. DNA:n monistusprosessissa on huomioitava, että niissä on eroja, kuten esimerkiksi käytetty kasvatusliuos voi olla erilainen, ja se

voi vaikuttaa tulokseen. Sen lisäksi esimerkiksi seerumi- ja plasmanäytteistä on saatu erilaisia tuloksia. Grauwels ym. (2018) tutkimuksessa kultaisena standardina bakteeri-infektion diagnostiikassa on positiivinen viljelytulos. Viljelyä pidettiin kuitenkin työteliäänä ja pitkäkestoisena metodina, jossa väärin negatiivisten riski oli olemassa. (Grauwels ym. 2018.)

Fouché ym. (2020) tutkimuksessa todetaan, että PCR on aikaisemmin osoittanut, että se on tehokas menetelmä, jopa tehokkaampi kuin MAT tai FAT. Diagnostiseksi tutkimusmenetelmäksi mainitaan myös virtsanviljely, joka nähtiin epäkäytännöllisenä, koska organismit kasvavat pitkään, jonka takia tunnistaminen tapahtuu myöhään. Munuaisbiopsia oli toinen vaihtoehto, mutta sen suorittamisessa on riskejä, jotka tulee ottaa huomioon. (Fouché ym. 2020.)

Carter ym. (2019) artikkelissa kerrotaan PCR:n sekä FAT:in sensitiivisyyden sekä spesifisyyden olevan hyvin lähellä 100 %, jos näytteenä on abortoitunut kudos tai nesteet käyttäen PCR-menetelmää. FAT:lla sensitiivisyys ja spesifisyys ovat lähellä 100 %, jos tutkimus tehdään istukasta, napanuorasta, sikiön maksasta tai munuaisesta. Hopeavärjäys ei ole kovin tarkka väärin positiivisten ja negatiivisten suuren määrän vuoksi. (Carter ym. 2019.)

*Leptospira* spp. on spirokeettabakteeri, joka näkyy värjätynä. Tämän takia hopeavärjäys, jota Ackermann ym. (2021) tutkimuksessa käytettiin, on luotettava menetelmä ja tekniikka. Menetelmän huono puoli on, että sillä ei pysty tunnistamaan fragmentteja *leptospira*-bakteerista, jos vain muutama organismi on läsnä. Immunohistokemian menetelmää pidetään spesifisenä menetelmänä *leptospira*-bakteerin antigeeneille, koska sillä pystytään tunnistamaan antigeenejä monesta eri kudospalasta sekä tunnistamaan eri *leptospira*-lajeja. (Ackermann ym. 2021.)

#### **8.4 Titteri**

Eri tutkimuksissa positiivisen MAT-tuloksen laimennos vaihtelee (Bjelica ym. 2022). Saman asian huomasi myös Carter ym. (2021), vaikka tutkimuksessa todetaan, että WHO:n kansainvälisen ohjeistuksen mukaan agglutinaatio 1:100 laimennoksessa tulkitaan positiiviseksi. Carter ym. (2021) tutkimuksessa mainitaan, että suosituksen sijaan saatetaan käyttää 1:200 tai 1:400 titteriä alimmana rajana positiiviselle tulokselle. Geiger ym. (2021.) huomautti eri tittereistä eri tutkimuksissa, käyttäen kuitenkin 1:100 titteriä rajana positiiviselle tulokselle sen suosituksen vuoksi ja, koska sitä käytettiin useimmissa tutkimuksissa.

## 9 POHDINTA

### 9.1 Johtopäätökset

Leptospiroosi on zoonootinen tauti, minkä diagnostisista menetelmistä hevosilla ei ole tehty monia tutkimusta Suomessa. Se ei ole kovin tunnettu tauti Suomessa, koska sitä esiintyy harvoin. Kansainvälisesti se on kuitenkin tunnettu tauti, ja siitä on tehty tutkimuksia eri mantereilla ja maissa. Tutkimuksissa oli myös otettu huomioon muut taudit, jotka ovat liitännäisiä *leptospira*-bakteerin aiheuttamaan tautiin.

Käytetyimmät diagnostiset menetelmät ovat mikroskooppinen agglutinaatiotesti sekä PCR. Näiden kahden lisäksi monissa tutkimuksissa viljely on suosittu menetelmä huolimatta sen työläydestä ja pitkäkestoisuudesta. ELISA todettiin sensitiiviseksi diagnostiseksi menetelmäksi. Sen avulla diagnosoiminen pystyy tekemään infektion eri vaiheissa, mutta se ei ole kustannustehokas menetelmä. MAT ei ole diagnostisista menetelmistä spesifisin, koska ristireaktion mahdollisuus on suuri, eikä serovarin määrittäminen ole sen takia aina mahdollista. Se on kuitenkin erinomainen menetelmä, jos vain halutaan tietää, onko elimistössä *leptospira*-bakteeria. Tutkimuksissa se mainittiin useasti kultaisten menetelmänä *leptospira*-bakteerin vasta-aineiden tunnistamisessa. MAT on kuitenkin antanut hieman ristiriitaisia tuloksia sen sensitiivisyydestä ja hyödyllisyydestä kroonisessa leptospiroosi-infektiossa. PCR-menetelmä on todettu sekä sensitiiviseksi, että spesifiseksi sen nopeuden lisäksi. Mutta se on diagnostinen menetelmä, mitä on käytetty yllättävän vähän. Yhtenä syynä voi olla, että tutkimuksissa käytetyt näytteet oli tutkittu kauan aikaa sitten, jolloin PCR-menetelmä on ollut harvinaisempi. Sen kustannukset ovat olleet kalliimmat sekä se ei välttämättä ole ollut vielä niin kehittynyt menetelmä. Värjäykselliset menetelmät eli hopeavärjäys tai immunohistokemiallinen menetelmä eivät olleet suosittuja diagnostisia menetelmiä, koska väärin positiivisten sekä negatiivisten tuloksien mahdollisuudet ovat suuret, kun näytteitä tarkastellaan mikroskoopista.

Eri diagnostiset menetelmät todettiin sopiviksi, sekä niiden tarkkuudet ovat yhteneväisiä, vaikka niissä on myös eroja. Ideaalisen menetelmän valinta riippuu infektion vaiheesta sekä käytössä olevasta ajasta ja resursseista. MAT sopii käytettäväksi diagnostiseksi menetelmäksi akuuttia infektiota epäiltäessä, mutta ei aivan infektion alkuun, koska vasta-aineet eivät mahdollisesti ole vielä ehtineet muodostua. Tällöin PCR olisi parempi menetelmä. MAT:n avulla kuitenkin voisi arvioida,

missä vaiheessa infektio on vasta-ainepitoisuuksia seuraten. Warthin-Starry:n hopeavärjäys sekä immunohistokemian värjäyksen tarkkuudesta ei voida olla täysin varmoja, koska *leptospira*-bakteeria ei löydetty, vaikka bakteerin tiedettiin olevan näytteessä. SNAP lepto on erittäin sensitiivinen sekä spesifinen, niin kuin nopeasta ELISA:sta voi osata odottaa.

Näyttemateriaali kertoo sijaintinsa perusteella paljon leptospiroosi-infektiosta. Tutkimustuloksista käy ilmi, että infektio voi olla enemmän paikallinen, kuin systeeminen. Sen takia taudit, jotka voivat viitata leptospiroosi tautiin oireiden sijainnin perusteella, olisi hyvä ottaa vakavasti ja niistä kannattaa tutkia *leptospira*-bakteerin mahdollisuutta. Intraokulaariset nesteet sekä seerumi ovat sensitiivisiä, mutta intraokulaariset näytteet voivat olla informatiivisempia, ja kertoa tulehduksen paikallisuudesta.

ERU:n on huomattu liittyvän vahvasti *leptospira*-bakteerin aiheuttamaan infektiin, jonka takia intraokulaaristen nesteiden käyttäminen näyttemateriaalina on yleistä. Tulos silmän näytteestä antaa nopean vastauksen infektion aiheuttajasta. Leptospiroosi-infektion on arvioitu liittyvän myös lisääntymiseen, jonka takia infektion esiintyvyyttä lisääntymiselimissä on tutkittu. Kuten ERU:ssa, myös tässä tapauksessa on käytetty näytteitä suoraan kohdusta, jotta tulos olisi selkeä.

WHO:n suositus on, että jos agglutinaatio tapahtuu 1:100 laimennoksessa, tulos on positiivinen. Siitä huolimatta tutkimuksissa käytetään eri laimennosrajaa, missä agglutinaatio tapahtuu riittävästi. Suurimassa osassa tutkimuksia positiiviseksi tulokseksi luettiin riittävä agglutinaatio 1:100 laimennoksessa.

## **9.2 Opinnäytetyön luotettavuus ja eettisyys**

Hyvän tieteellisen käytännön eli HTK:n mukaan luotettavuus, rehellisyys, arvostus sekä vastuunkanto ovat perusperiaatteita eurooppalaisen tutkimuseettisen ohjeistuksen mukaan. Hyvän tieteellisen käytännön ohjeiden mukaan tieteellistä työtä tehdään suunnitellen, toteuttaen ja dokumentoiden toiminta huolellisesti. Tieteellistä työtä tehdessä noudatetaan avoimen tieteen periaatteita mahdollisuuksien mukaan huomioiden aiempi tutkimustieto. Tieteellisessä toiminnassa tulee huolehtia eettisyydestä, jolloin toiminta on tieteenalan sääntöjen ja ohjeistusten sekä HTK-ohjeen mukaisesti tehty. Tieteellisessä toiminnassa on myös huolehdittava mahdollisesti tarvittavat luvat,

suostumukset sekä eettisen ennakoarvion tekemisestä ennen tutkimusaineiston keruun aloittamista. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 11–13.)

Opinnäytetyötä kirjoitettiin HTK-ohjeen mukaisesti. Työn luotettavuutta tuotiin esille käyttämällä tutkimusmetodina kirjallisuuskatsausta, joka on kriittinen ja tiivis erittely kirjallisuudesta (Mannila 2021). Koska kirjallisuuskatsauksen tulee olla toistettavissa, systemaattinen sekä täsmällinen, pidettiin kirjallisuushaku läpinäkyvänä alusta loppuun asti. Työvaiheiden esiintuominen, sekä niiden järjestäminen, taulukoilla havainnollistaminen sekä työvaiheiden avaaminen sanallisesti ovat osa läpinäkyvyyttä ja toistettavuutta, mikä ilmenee luotettavuutena. Työssä käytetyt lähteet ovat vertaisarvioituja artikkeleita sekä tutkimuksia tunnetuista tietokannoista, mikä edistää työn luotettavuutta. Luotettavuuden lisäämiseksi, kirjallisuuskatsauksen loppuosaan on koottu liitteeseen 1 taulukko, johon on listattu kaikki tutkimuksessa käytetyt artikkelit sekä tutkimukset.

Hyvää tieteellistä käytäntöä on kollegoiden, tieteellisen toiminnan osapuolien, yhteiskunnan, ekosysteemien, ympäristön ja kulttuuriperinnön arvostaminen (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 12). Opinnäytetyössä kollegoiden ja tieteellisen toiminnan osapuolien arvostaminen tuotiin ilmi teksti- ja lähdeviittauksin, viitaten teksteihin totuudenmukaisesti yksityiskohtia salaamatta. Rehellisyyttä tuotiin ilmi lähestymällä aihetta neutraalisti raportoiden siitä puolueettomasti sekä yksityiskohtaisesti. HTK-ohjeen mukaisesti opinnäytetyössä otettiin huomioon mahdollisesti tarvittavat luvat ja suostumukset, joita ei ollut tarpeen hakea, koska opinnäytetyö toteutettiin kirjallisuuskatsauksena.

Kirjallisuuskatsausta rajasivat siihen laaditut sisäänotto- sekä poissulkukriteerit, jotka ovat koottu taulukkoon 1. Niiden avulla kirjallisuuskatsauksessa käsiteltiin vain niitä artikkeleita sekä tutkimuksia, jotka vastasivat tutkimuskysymykseen. Kirjallisuuskatsauksessa käytetyn kirjallisuuden tuli olla joko suomen- tai englanninkielistä. Englanninkielisissä artikkeleissa sekä tutkimuksissa mahdollisesti tapahtuneet käännösvirheet sekä poissuljetut maksulliset aineistot saattoivat vaikuttaa tutkimukseen.

### 9.3 Jatkotutkimusehdotukset

Tutkimuksissa ei tullut ilmi, mitä diagnostisia menetelmiä Suomessa käytetään leptospiroosi taudin diagnostiikassa, koska ne olivat kansainvälisiä tutkimuksia. Bakterin ja taudin harvinaisuus Suomessa vaikuttavat asiaan, mutta olisi hyvä tietää, mitkä diagnostiset menetelmät olisivat parhaita käyttää Suomessa, ja mitä tutkimusmenetelmiä on mahdollisesti tulossa. Tässä olisi hyvä ottaa huomioon myös diagnostisten menetelmien kehitys ja kustannustehokkuus.

Harvinaisuudesta huolimatta leptospiroosi tautia esiintyy Suomessa. On tiedossa, että serovarit *L. Pomona*, *L. Bratislava*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Hardjo*, *L. Canicola*, *L. Grippityphosa* ja *L. Sejroe* aiheuttavat eniten leptospiroosi tautia hevosille (Ruokavirasto 2022 a). Kuitenkaan ei ole ajankohtaista tietoa, mitkä serovarit ovat yleisimmät taudinaiheuttajat hevosille Suomessa.

### 9.4 Opinnäytetyön arviointi

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kuvata kirjallisuuskatsauksen avulla hevosilla käytettyjä leptospiroosi taudin diagnostisia menetelmiä. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus suunnattiin bioanalytiko-opiskelijoille, hevosten kanssa työskenteleville ja muille, joita *leptospira*-bakteerin diagnostiset menetelmät kiinnostavat.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli koota kirjallisuuskatsauksen avulla yhteen uusinta tutkimustietoa leptospiroosi taudin diagnostiikasta. Aiheeseen päädyttiin, koska kyseinen tauti leviää, vaikka se on vielä harvinainen Suomessa. Leviämisen takia olisi hyvä, jos leptospiroosi tauti olisi tunnetumpi.

Opinnäytetyötä tehdessä koin oppineeni enemmän tiedonhausta, tutkimusmetodeista sekä tutkimusprosessista. Tiedonhaussa lähteiden löytäminen ja niiden luotettavuuden arviointi ovat osa prosessia, missä koen kehittyneeni. Ongelmien ja kysymysten ilmaantuessa vastauksien löytäminen vaihtoehtoisilla tavoilla tai kielellä kehittyi. Opinnäytetyöprosessin aikana itsenäisen työn ja suunnitelmallisuuden merkitys korostui, jonka takia opin suunnittelemaan paremmin ottaen huomioon käytössä olevat resurssit sekä työskentelemään itsenäisesti. Opinnäytetyön edetessä opin tarkastelemaan omaa työtä paremmin. Sillä pystyin varmistamaan keskittymisen oikeisiin asioihin



sekä käyttämään luotettavia ja ajankohtaisia lähteitä. Opinnäytetyön teossa haasteet, sekä ongelmatilanteet opettivat taitoja, joiden uskon olevan hyödyllisiä tulevaisuudessa. Opin kirjoittamaan tieteellistä tekstiä paremmin sekä kokoamaan yhteen tietoa samasta aiheesta.

Opinnäytetyön tekemisen lisäksi opin paljon uutta niin leptospiroosi taudista, *leptospira*-bakteerista sekä diagnostisista menetelmistä. Mielestäni sain laadittua kirjallisuuskatsauksen, joka kertoo monipuolisesti leptospiroosi taudin diagnostisista menetelmistä ottaen huomioon niiden hyvät ja huonot puolet.

## 9.5 Sovellutus bioanalytikoille

Bioanalytikko on näytteenoton ja kliinisen laboratoriotyön asiantuntija, joka voi työskennellä terveydenhuollon laboratorioissa, tutkimusryhmissä, hoito- ja tutkimusyksiköissä tai laboratorioalan yrityksissä (Opintopolku 2023). Suomessa on kaksi eri laboratoriota, jossa *leptospira*-bakteeria tutkitaan eläimiltä. Nämä laboratoriot ovat Movet Oy sekä Ruokaviraston laboratorio.

Movet Oy on eläindiagnostiikkalaboratorio, joka tuottaa laboratoriopalveluita eläinten näytteille. Movet Oy tekee *leptospira*-tutkimuksia PCR:llä ja MAR:lla (microagglutination reaction), joka vastaa mikroskooppista agglutinaatiotestiä yhteistyössä yhteistyölaboratorion kanssa. Movet Oy käyttää PCR tutkimuksessaan virtsaa tai verta. MAT:lla taas seerumia. (Movet Oy 2023 a; Movet Oy 2023 b; Movet Oy 2023 c.)

Ruokaviraston eläintautitutkimuspalveluja tarjotaan viranomaisille, eläinlääkäreille, yrityksille ja henkilöasiakkaille. Palveluihin kuuluu eläintautien ja zoonosien toteaminen sekä maataloilla ilmenevien eläinten sairauksien ja terveysongelmien syiden selvittely. Ruokavirasto käsittelee tuotanto-, harraste- sekä luonnonvaraisten eläinten tautitilannetta. Taudin- tai kuolinsyy selvitetään patologistisanatomisella tutkimuksella. Patologistisanatomisella tutkimuksella tarkoitetaan diagnoosia sairastuneesta elimestä tai kudoksesta, joka tehdään mikroskooppitutkimuksella (Synlab 2023). Laboratoriotutkimusten avulla voidaan todeta taudinaiheuttajia, eli bakteereja, viruksia ja loisia. (Ruokavirasto 2023 d.) Ruokavirastossa *leptospira*-bakteeria tutkitaan mikroskooppisella agglutinaatiotestillä (MAT) seerumista. (Ruokavirasto 2022 a).

Tässä työssä kuvattiin leptospiroosi taudin tutkimusmenetelmiä, niiden eroja, luotettavuutta sekä tarkkuutta. Bioanalytikko voi työskennellä yllä mainittujen laboratorioiden kaltaisissa yrityksissä, käyttäen erilaisia tutkimusmenetelmiä, pureutuen niiden luotettavuuteen, tarkkuuteen sekä nopeuteen ottaen huomioon käytössä olevat resurssit.

## LÄHTEET

Abdullah, W, Che Hussin, C & Mahat, M 2014. Conventional Rapid Latex Agglutination in Estimation of von Willebrand Factor: Method Revisited and Potential Clinical Applications. *Journal of Immunology Research*. Hakupäivä 10.8.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4352515/>

Ackermann, K, Gerhards, H, Kenngott, R, Maierl, J, Settles, M & Wollanke, B 2021. In Vivo Biofilm Formation of Pathogenic *Leptospira* spp. in the Vitreous Humor of Horses with Recurrent Uveitis. *Microorganisms* 9 (9), 1915. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC8464839/>

Afshar, D, Amiri, F, Esmaeili, S, Khalili, M, Safat, A & Sakhaee, E. 2020. Serological evidence of leptospirosis in Iran; A systematic review and meta-analysis. *Microbial pathogenesis* 138. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www-sciencedirect-com.ezp.oamk.fi:2047/science/article/pii/S0882401019312136?via%3Dihub>

Agampodi, S, Gamage, C, Jayasundara, D, Matthias, M, Senavirathna, I, Vinetz, J & Warnasekara J 2021. Optimizing the microscopic agglutination test (MAT) panel for the diagnosis of Leptospirosis in a low resource, hyper-endemic setting with varied microgeographic variation in reactivity, *Plos neglected tropical diseases* 15 (7). Hakupäivä 8.8.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8279374/>

Airas, A 2013. PCR kliinisessä bakteriologiassa – Kliinisen bakteriologian PCR menetelmäpohjaiset tutkimukset. Savonia ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 26.8.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/67210/Airas\\_Anna.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/67210/Airas_Anna.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Amran, F, Benacer, D, Thong, K, Zain, S & Woh, P 2013. Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. *Microbes Environments* 28 (1), 135–140. Hakupäivä 6.8.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070680/>

Apun, K, Bilung, L, Pui, C & Su'ut, L 2017. Diversity of *Leptospira* spp. in Rats and Environment from Urban Areas of Sarawak, Malaysia. Journal of Tropical Medicine. Hakupäivä 6.8.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5350390/>

Askel Terveysteen 2021. Uveiitti: oireet, diagnoosi ja hoito. Hakupäivä 30.12.2022. <https://askelterveyteen.com/uveiitti-oireet-diagnoosi-ja-hoito/>

Baum, M, Bernstein, M, Blum, S, Kalir, B, Pe'er, O, Schwartz, G, Shnaiderman-Torban, A, Steinman, A & Tirosh-Levy, S 2021. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Horses in Israel. Pathogens 10 (4), 408. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC8065697/>

Begon, M, Casanovas-Massana, A, Diggle, P, Ko, A, Pedra, G & Wunder, E 2018. Quantifications of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology 84 (13). Hakupäivä 8.1.2023. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.00507-18>

Bertelloni, F, Cerri, D, Cilia, G, Fratini, F, Pinzauti, P & Turchi, B 2019. Epidemiology of leptospirosis in North-Central Italy: Fifteen years of serological data (2002–2016). Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 65, 14–22. Hakupäivä 26.1.2023. <https://www.sciencedirect.com.ezp.oamk.fi:2047/science/article/pii/S0147957119300700>

Bjelica, B, Geiger, T, Gerhards, H, Mackenthun, E & Wollanke, B 2022. Analysis of 1840 Equine Intraocular Fluid Samples for the Presence of Anti-*Leptospira* Antibodies and Leptospiral DNA and the Correlation to Ophthalmologic Findings in Terms of Equine Recurrent Uveitis (ERU) - a Retrospective Study. Veterinary sciences 9 (8), 448. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC9414351/>

Blundell, R, Malalana, F, MCGowan, C & Pinchbeck, C 2017. The role of *Leptospira* spp. in horses affected with recurrent uveitis in the UK. Equine veterinary journal 49 (6), 706–709. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC5655720/>

Boehmer, J, Dohman, K, Goris, M, Strutzberg-Minder, K & Ullerich, A 2022. Comparison of Two

*Leptospira* Type Strains of Serovar Grippotyphosa in Microscopic Agglutination Test (MAT) Diagnostics for the Detection of Infections with Leptospire in Horses, Dogs and Pigs. *Veterinary Sciences* 9 (9), 464. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC9503138/>

Carter, C, Chang, Y, Divers, T, Irby, N & Smith, J 2019. Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine veterinary journal* 51 (3), 287–292. Hakupäivä 31.1.2023. <https://beva-onlinelibrary-wiley-com.ezp.oamk.fi:2047/doi/10.1111/evj.13069>

Carter, C, Cywińska, A, Czopowicz, M, Kita, J, Markowska-Daniel, I, Paschalis-Trela, K, Trela, J, Wasiński, B, Witkowski, L & Zychska, M 2021. Serological Survey of *Leptospira* Infection in Arabian Horses in Poland. *Pathogens* 10 (6), 688. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC8228686/#B11-pathogens-10-00688>

Chirathaworn, C, Inwattana, R, Poovorawan, Y & Suwancharoen, D 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4 (1), 162–164. Hakupäivä 16.12.2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025277/>

Cvetnic, Z, Habus, J, Milas, Z, Perharic, M, Persic, Z, Spicic, S, Stritof, Z, Turk, N & Vince, S 2017. New Trends in Human and Animal Leptospirosis in Croatia, 2009–2014. *Acta Tropica* 168, 1–8. Hakupäivä 26.1.2023. <https://www.sciencedirect-com.ezp.oamk.fi:2047/science/article/pii/S0001706X16309470>

Da Silva, A, Da Silva, M, De Moura, A, Eucates von Lauer, A, Jaguezeski, A, Laber, I & Lovato, L 2020. *Leptospira* spp. in horses in southern Brazil: Seroprevalence, infection risk factors, and influence on reproduction. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 73. Hakupäivä 26.1.2023. <https://www.sciencedirect-com.ezp.oamk.fi:2047/science/article/pii/S0147957120301417>

Di Azevedo, M & Lilenbaum, W 2022. Equine genital leptospirosis: Evidence of an important silent chronic reproductive syndrome. *Theriogenology* 192, 81–88. Hakupäivä 26.1.2023. <https://www.sciencedirect-com.ezp.oamk.fi:2047/science/article/pii/S0093691X22003478>

DiaPharma 2023. What is chromogenic substrate? Hakupäivä 8.8.2023. <https://diapharma.com/news-and-events/faq/what-is-a-chromogenic-substrate/>

Duttmann, C, Flores, B, Fuertes, H, Halaihel, N, Jirón, W, Múzquiz, J, Pérez-Sánchez, T & Sheleby-Elías, J 2017. A cross-sectional study of domestic animals related to human leptospirosis cases in Nicaragua. *Acta Tropica* 170, 79–84. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.sciencedirect.com.ezp.oamk.fi:2047/science/article/pii/S0001706X16305514?via%3Dihub>

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2022. Immunohistokemia. Hakupäivä 22.4.2023. [https://www.epshp.fi/ammattilaiselle\\_ja\\_opiskelijalle/ammattilaiselle/patologia/tutkimusohje-kirja/immunohistokemia](https://www.epshp.fi/ammattilaiselle_ja_opiskelijalle/ammattilaiselle/patologia/tutkimusohje-kirja/immunohistokemia)

Fagre, A, Landolt, G, Mayo, C & Pabilonia K 2020. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Colorado equids and association with clinical disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 32 (5), 718–721. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC7488961/>

Fouché, N, Francey, T, Gerber, V, Graubner, C, Lanz, S & Schweighauser, A 2020. Acute kidney injury due to *Leptospira interrogans* in 4 foals and use of renal replacement therapy with intermittent hemodiafiltration in 1 foal. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34 (2), 1007–1012. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC7096627/#jvim15713-bib-0007>

Geiger, T, Gerhards, H & Wollanke, B 2021. Detection of Anti-LipL32 Antibodies in Serum Samples from Horses with Chronic Intraocular Infection with *Leptospira* spp. *Pathogens* 10 (10), 1325. Hakupäivä 31.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp.oamk.fi:2047/pmc/articles/PMC8537251/>

Grauwels, M, Elensary, M, Hansen, P, Monclin, S & Sauvage, A 2018. Detection of intraocular *Leptospira* spp. By real-time polymerase chain reaction in horses with recurrent uveitis in Belgium. *Equine Veterinary Journal* 51 (3), 299–303. Hakupäivä 31.1.2023. <https://beva-onlinelibrary-wiley-com.ezp.oamk.fi:2047/doi/10.1111/evj.13012>

Haake, D, Liu, J, Morado, D, Raddi, G, Yan, J & Yang, F 2012. Three-Dimensional Structures of

Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species Revealed by Cryo-Electron Tomography. American Society for Microbiology. Journal of Bacteriology 194 (6). Hakupäivä 8.1.2023. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.06474-11>

Heikkinen, S, Moilanen, L, Virén, A 2014. Immunokemialliset menetelmät kliinisen kemian analytiikassa. Savonia ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 19.4.2023. [http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/82689/Heikkinen\\_Sini\\_Moilanen\\_Laura\\_Viren\\_Annika.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/82689/Heikkinen_Sini_Moilanen_Laura_Viren_Annika.pdf?sequence=1&isAllowed=y) s:

Hirvonen, M 2013. Immunohistokemiallisten värjäysmenetelmien pystytys hiiren kudoksetleikille. Turun ammattikorkeakoulu, Bio- ja elintarviketekniikka. Opinnäytetyö. Hakupäivä 22.4.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/62439/Hirvonen\\_Karoliina.pdf?sequence=1](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/62439/Hirvonen_Karoliina.pdf?sequence=1)

Hyvärinen, T, Mattila, M & Toivonen, Krista 2019. Reaaliaikainen PCR – Verkko-oppimateriaali BioDigi-hankkeeseen. Savonia ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 18.4.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/172578/Hyv%E4riinen\\_Tiia\\_Mattila\\_Maaret\\_Toivonen\\_Krista.pdf?sequence=2](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/172578/Hyv%E4riinen_Tiia_Mattila_Maaret_Toivonen_Krista.pdf?sequence=2)

Karppinen, S & Pirinen, J 2022. SARS-CoV-2 antigeenitestauksen luotettavuus. Savonia ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 10.8.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/748323/Karppinen\\_Pirinen.pdf?sequence=2](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/748323/Karppinen_Pirinen.pdf?sequence=2)

Korhonen, E 2019. Hydrogeelit hermosolujen kasvatuksessa. Jyväskylän yliopisto. Kandidaatintutkielma. Hakupäivä 13.8.2023. <https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/65605/1/URN%3ANBN%3Afi%3Aju-201909234237.pdf>

Kyllönen, P, Lagus, E & Niskanen, S 2020. Kliinisen mikrobiologian työohjeiden päivitys - Oppimateriaali bioanalytiikka-opiskelijoille. Savonia ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 10.8.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/354529/Kyll%C3%B6nen\\_Pinja%2C%20Niskanen\\_Samuel%20ja%20Lagus\\_Elina.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/354529/Kyll%C3%B6nen_Pinja%2C%20Niskanen_Samuel%20ja%20Lagus_Elina.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Liimatta, L, Laurila, H P, Spillmann, T & Virtala, A-M 2017. Koiran leptospiroosi Suomessa ja naa-

purimaissa – kirjallisuuskatsaus ja kartoitus leptospiroosiepäilyistä Yliopistollisessa eläinsairaalassa 2006–2014. Suomen eläinlääkärilehti, 123, (9), 594–557. <https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/6360fdbf-671b-4c9b-8ad9-fc6a55eff5e8/content>

Lindroos, E 2019. Immunohistokemiallisen värjäyksen laadunvarmistus. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Kirjallisuuskatsaus. Hakupäivä 8.8.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/346956/Lindroos\\_Emmi.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/346956/Lindroos_Emmi.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Mannila, M 2021. Kirjallisuuskatsaus opinnäytetyön muotona. Vaasan ammattikorkeakoulu. Hakupäivä 22.4.2023. <https://energia.vamk.fi/osaaminen/kirjallisuuskatsaus-opinnaytetyon-muotona/>

Marion-Poll, F & Wicher, D 2018. Editorial: Function and Regulation of Chemoreceptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12, 496. Hakupäivä 7.8.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6305422/>

Montonen, H-K 2016. Virtsan bakteeriviljely tutuksi. Turun ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutus. Opinnäytetyö. Hakupäivä 21.4.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/112210/Montonen\\_Hanna-Kaisa.pdf?sequence=1](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/112210/Montonen_Hanna-Kaisa.pdf?sequence=1)

Movet Oy 2023 a. Palveleva eläindiagnostiikkalaboratorio. Hakupäivä 18.8.2023. <https://www.movet.fi/>

Movet Oy 2023 b. *Leptospira* spp (PCR) (B + U). Hakupäivä 18.8.2023. <https://www.movet.fi/tutkimukset/leptospira-pcr-bu/>

Movet Oy 2023 c. *Leptospira interrogans* AB (MAR) (S), Hakupäivä 2023. <https://www.movet.fi/tutkimukset/leptospira-interrogans-vasta-aineet/>

Myllylä, S 2013. Oppimateriaalia DNA:n sekvensoinnista. Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 26.8.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/65403/Myllyla\\_Suvi.pdf?sequence=1](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/65403/Myllyla_Suvi.pdf?sequence=1)

Opintopolku 2023. Bioanalyttikko (AMK). Hakupäivä 18.8.2023. <https://opintopolku.fi/konfo/fi/koulutus/1.2.246.562.13.00000000000000000230>



Oregon State University 2023. Microbiology Writing Guide: Scientific Style. Hakupäivä 10.8.2023  
<https://wic.oregonstate.edu/microbiology-writing-guide-scientific-style>

Ruokavirasto 2022 a. Leptospiroosi. Hakupäivä 5.12.2022. <https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/usealle-elainlajille-yhteiset-taudit/leptospiroosi/>

Ruokavirasto 2022 b. Usealle eläinlajille yhteiset taudit. Hakupäivä 15.12.2022. <https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/usealle-elainlajille-yhteiset-taudit/>

Ruokavirasto 2022 c. Zoonoosit. Hakupäivä 16.12.2022. <https://www.ruokavirasto.fi/zoonoosikeskus/zoonoosit/>

Ruokavirasto 2023 d. Eläintautitutkimukset. Hakupäivä 18.8.2023. <https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/elaintautitutkimukset/>

Saarinen, K 2018. In House Immunospot -menetelmän detektiotavan kehittämisprojekti. Metropolia ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma. Opinnäytetyö. Hakupäivä 22.8.2023. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/144189/opinnaytetyo\\_kristasaarinen.pdf?sequence=1](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/144189/opinnaytetyo_kristasaarinen.pdf?sequence=1)

Salmela, A 2021. Koiran ja kissan leptospiroosi Euroopassa-kirjallisuuskatsaus. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteen tiedekunta. Lisensiaatin tutkielma. Hakupäivä 8.8.2023. <https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/02f98df0-4650-4d52-aa75-02b14534a171/content>

Salminen, A 2011. Mikä kirjallisuuskatsaus? Johdatus kirjallisuuskatsauksen tyypeihin ja hallintotieteellisiin sovellutuksiin. Vaasan yliopiston julkaisuja, 5–7. Hakupäivä 23.4.2023. [https://www.uwasa.fi/materiaali/pdf/isbn\\_978-952-476-349-3.pdf](https://www.uwasa.fi/materiaali/pdf/isbn_978-952-476-349-3.pdf)

Salonen, E 2018. Hevosien bakteeri-, virus- ja sieniperäiset zoonoosit: Suomen näkökulma. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteen tiedekunta. Pro Gradu-tutkielma. Hakupäivä 8.12.2022. [https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/301284/Salonen%20Eveliina%20Lisensiaatintutkielma\\_Salonen.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/301284/Salonen%20Eveliina%20Lisensiaatintutkielma_Salonen.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Seitamaa-Hakkarainen, P 2023. Kvalitatiivinen sisällönanalyysi. Metodix. Hakupäivä 22.4.2023. <https://metodix.fi/2014/05/19/seitamaa-hakkarainen-kvalitatiivinen-sisallon-analyysi/>

Solunetti 2006. Kemotaksia. Hakupäivä 7.8.2023. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kemotaksia/>

Synlab 2023. Tietopankki. Patologis-anatominen diagnoosi, PAD. Hakupäivä 18.8.2023. <https://www.synlab.fi/tietopankki/patologis-anatominen-diagnoosi-pad/>

Talvitie, S 2014. Biofilmit bakteeri-infektioissa. Eläinlääketieteen tiedekunta. Eläinlääketieteen lissensiaatin tutkielma. Hakupäivä 22.8.2023. <https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/a5f11221-8f44-4841-acb5-d2cf580739c2/content>

Terpstra, W, World Health Organization, International Leptospirosis Society 2003. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Hakupäivä 20.4.2023. Google Scholars. [https://books.google.fi/books?hl=fi&lr=&id=ilg0DgAAQ-BAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=U4345SfB9S&sig=mcTG5aZGpdX47ljOwqEMC3M4yg4&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.fi/books?hl=fi&lr=&id=ilg0DgAAQ-BAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=U4345SfB9S&sig=mcTG5aZGpdX47ljOwqEMC3M4yg4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Terveyskirjasto 2016 a. Lääketieteen sanasto. Serotyypit. Hakupäivä 13.8.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03096>

Terveyskirjasto 2016 b. Lääketieteen sanasto. Subkliininen. Hakupäivä 13.8.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03271>

Tieteen termipankki 2014 a. Nimitys: titteri. Hakupäivä 10.8.2023. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:titteri>

Tieteen termipankki 2014 b. Nimitys: in situ -hybridisaatio. Hakupäivä 22.8.2023. [https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:in\\_situ\\_hybridisaatio](https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:in_situ_hybridisaatio)

Turun yliopistollinen keskussairaala 2023. Hengitysvajaus. Hakupäivä 13.8.2023. <https://www.tyks.fi/hoidot-ja-tutkimukset/hengitysvajaus>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa 2023. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisuja 2, 11, 13. Hakupäivä 18.8.2023. [https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje\\_2023.pdf](https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf)

Verma, A, Stevenson, B & Adler, B 2013. Leptospirosis in horses. *Veterinary microbiology* 167 (1.–2), 61–66. Hakupäivä 8.1.2023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378113513002150?via%3Dihub>

Virkkunen, E 2023. Valokuva piirroksesta. *Leptospira*-bakteeri. Kuvan ottopäivä 24.8.2023.

Tekijä(t), vuosi	Tutkimuksen tarkoitus	Asetelma, aineiston keruumenetelmä	Tulokset
Cvetnic, Z., Habus, J., Milas, Z., Perharic, M., Persic, Z., Spicic, S., Stritof, Z., Turk, N. & Vince, S. 2017.	Tutkia leptospiroosi taudin esiintyvyyttä Kroatiaassa vuosina 2009–2014.	Tilastollinen tutkimus. Tutkittiin dataa vuosilta 2009–2014. Näytteitä oli ihmisiltä, hevosilta, nautakarjalta, koirilta, sioilta sekä pieniltä märehäjöiltä.	<i>Leptospira</i> -bakteerin yleisyys vaihteli 6.16 %–23.45 % välillä. Esiintyvyys oli korkeimmillaan myöhään kesällä tai syksyllä.
Bertelloni, F., Cerri, D., Cilia, G., Fratini, F., Pinzauti, P. & Turchi, B. 2019.	Tutkia ja raportoida leptospiroosi taudin esiintyvyyttä koti- ja villieläimiltä keski-Italiassa vuosina 2002–2016.	Tietoa raportoitiin vuosilta 2002–2016. <i>Leptospira</i> -bakteeria etsittiin MAT-menetelmää käyttäen. Käytetyt näytteet oli saatu 23 eri eläinlajilta sekä ihmiseltä.	Hevosilla <i>leptospira</i> -bakteerin esiintyvyys on 2.89 %.
Di Azevedo, M. & Lilienbaum, W. 2022.	Kerätä ja koota tietoa hevosten lisääntymiseen liittyvästä leptospiroosi taudista. Tutkimuksen tuloksena haluttiin ehdottaa uutta oireyhtymää hevosten lisääntymiselinten leptospiroosista.	Systemaattinen katsaus. Tutkimuksia alkaen vuodesta 1940.	EGL eli equine genital leptospirosis on tauti, jonka aiheuttaa <i>L. Bratislava</i> serovari.

Da Silva, A., Da Silva, M., De Moura, A., Eucares von Lauer, A., Jaguezeski, A., Lamber, I. & Lovato, L. 2020.	Tiedostaa <i>leptospira</i> spp:n serologinen yleisyys hevosilla Brasiliassa. Yleisyyden lisäksi kartoitettiin infektion riskitekijöitä sekä sen vaikutuksia lisääntymiseen.	Seeruminäytteet olivat 60 eri laumasta, ja niitä oli yhteensä 595 kappaletta.	Näytteistä 45.9 % olivat serologisesti positiivisia Hevosten sijainti, rotu, kontaktit koiriin tai muihin kotieläimiin eivät ole riskitekijöitä, mutta sukupuoli on. Lisääntymistauteihin leptospiroosilla ei ole vaikutusta.
Boehmer, J., Dohman, K., Goris, M., Strutzberg-Minder, K. & Ullerich, A. 2022.	Verrata <i>L. Grippityphosa</i> serovarin kahta eri kantaa käyttäen mikroskooppista agglutinaatiotestiä diagnostiikassa. Täydentävät näytteet tutkittiin käyttämällä PCR-menetelmää.	Seerumi-, lasiaisnesteen sekä kammionesteen näytteet olivat kerätty niin hevosilta, koirilta sekä sioilta. Hevosten näytteitä oli 115 kappaletta.	Molempien kantojen tulos oli positiivinen 53 %, kun käytettiin MAT:ä
Baum, M., Bernstein, M., Blum, S., Kalir, B., Pe'er, O., Schwartz, G., Shnaiderman-Torban, A., Steinman, A. & Tirosh-Levy, S. 2021.	Tutkia hevosten epidemiologista altistumista <i>leptospira</i> -bakteerille. Tunnistaa <i>leptospira</i> seroryhmä <i>L. Pomona</i> , jonka arvellaan aiheuttavan ERU:a	Näytteet kerättiin kahdelta eri tilalta ja ne tutkittiin käyttäen MAT:ä, 8 eri serovaria vastaan.	7/13 näytteestä oli positiivinen serovari <i>L. Pomonalle</i> .

<p>Carter, C., Cywińska, A., Czopowicz, M., Kita, J., Markowska-Daniel, I., Paschalis-Trela, K., Trela, J., Wasiński, B., Witkowski, L. &amp; Żychska, M. 2021.</p>	<p>Kartoittaa <i>leptospira</i>-infektion serologista esiintyvyyttä Puolassa arabiahevosrodussa.</p>	<p>Seeruminäytteet kerättiin Puolan isoimilta jalostustiloilta vuosina 2011–2013, ja ne otettiin 615 hevoselta. Näytteet tutkittiin MAT:llä eläviä antigeenejä käyttäen</p>	<p>Hevosten seerumeista 33.2 % eli 204/615 näytteestä löytyi vasta-ainetta. <i>L. Grippotyphosa</i> serovaria vastaan tuli eniten positiivisia.</p>
<p>Blundell, R., Malalana, F., McGowan, C. &amp; Pinchbeck, C. 2017.</p>	<p>Osoittaa paljonko Iso-Britanniassa on <i>leptospira</i> spp:hen liittyvää ERU:a. Tutkimuksessa arvioitiin serologisen testin eli MAT:n hyötyä yksinään varmistustestinä ERU:n diagnosoinnissa.</p>	<p>Aineisto kerättiin taupaus-kontrolloidusti niiltä hevosilta, joilla tiedettiin olevan ERU. Näytteet kerättiin huhtikuun 2013 – kesäkuun 2016 välisenä aikana.</p>	<p>Tutkimuksessa verrattiin seerumi- ja kammionestenäytteiden tuloksia toisiinsa, sekä tunnistettiin näytteissä olevia serovareja. Hevosilta, joilta tiedettiin olevan ERU, positiivisia <i>leptospira</i>-bakteerin vasta-aineille oli 6.7 %. Serologisella testillä ei voi varmuudella diagnosoida <i>leptospira</i>-liittynyttä uveittia.</p>
<p>Fagre, A., Landolt, G., Mayo, C. &amp; Pabilonia K. 2020.</p>	<p>Vertailla anti-leptospiran vasta-aineiden esiintyvyyttä ulkoisesti terveille näyttävillä hevosilla, ennen rokotteen antamista <i>L.Pomona</i> serovaria vastaan Coloradossa.</p>	<p>124 näytettä oli kerätty aiemmin, heinäkuusta 2010 – tammi-kuun 2017 välisenä aikana. Kontrollinäytteet oli kerätty kesä- ja syyskuun 2015 välisenä aikana. Näytteet ajettiin 6 eri serovaria vastaan.</p>	<p>Tutkimuksen näytteistä 82 % olivat positiivisia yhden serovarin kohdalla, kun titteri oli 1:100. 57 % näytteistä olivat positiivisia yhden tai useamman serovarin kohdalla, kun titteri oli 1:200.</p>

<p>Bjelica, B., Geiger, T., Gerhards, H., Mackenthun, E. &amp; Wollanke, B. 2022.</p>	<p>Analysoida hevosten intraokulaarisia nesteitä PCR-menetelmällä, MAT:llä sekä osaa näytteistä myös ELISA:lla verraten niitä silmälääkäriin löydöksiin, jotka viittaavat ERU:un.</p>	<p>Retrospektiivinen tutkimus, jossa näytteet oli kerätty 2002–2017 välisenä aikana.</p>	<p>Tutkimukseen käytetyistä ERU-silmistä 83 % olivat vasta-aine positiivisia titterillä 1:100 tai korkeampi. 72 % olivat positiivisia PCR:llä, 83 % olivat positiivisia ELISA:lla. Silmistä, jotka olivat terveitä tai niissä oli uveitti, ei tullut positiivisia tuloksia MAT:lla. PCR:llä yksistä terveistä silmistä tuli positiivinen tulos.</p>
<p>Ackermann, K., Gerhards, H., Kenngott, R., Maierl, J., Settles, M. &amp; Wollanke, B. 2021</p>	<p>Tarkoituksena oli havaita <i>leptospira</i> spp:n muodostamaa biofilmiä hevosilla käyttäen Warthin-Starry:n hopeavärijäystä sekä immunohistokemiaa.</p>	<p>Tutkimukseen valittiin hevosia, joilla oli historia sekä kliininen löydös, joka vaikutti <i>leptospiran</i> aiheuttamalle uveitille. <i>Leptospira</i>-bakteerin läsnäolo varmistettiin PCR:llä sekä MAT:llä</p>	<p>Kaikista lasille tehdyistä näytteistä ei löydetty <i>leptospiraa</i>, mutta eri asteisia biofilmin muodostumista löydettiin joka lasilta. Viljellyistä <i>leptospira</i>-näytteistä ei löydetty biofilmin muodostamista tukevia todisteita. Eli biofilmiä ei muodostunut.</p>
<p>Geiger, T., Gerhards, H. &amp; Wollanke, B. 2021.</p>	<p>Verrata SNAP Leptopikatestiä MAT-menetelmään käytettäessä seerumia.</p>	<p>Tutkimuksessa käytettiin 90 <i>leptospira</i>-tartuntavarmistettua ERU-hevosta, sekä 103 terveet silmät omaavaa hevosta.</p>	<p>MAT on epäspesifimpi verrattuna SNAP Lepton, kun kyse on seeruminäytteestä.</p>

<p>Fouché, N., Francey, T., Gerber, V., Graubner, C., Lanz, S. &amp; Schweighauser, A. 2020.</p>	<p>Tarkoituksena oli korostaa aikaisen diagnoosin sekä hoidon merkitystä varsoilla, joilla oli <i>leptospira</i>-bakteerin aiheuttaman infektion akuutti munuaisvaurio</p>	<p>4 varsaa oli tuotu hevosklinikalle akuutin munuaisvaurion takia. Artikkelissa kuvattiin varsojen infektiota ja sen hoitoa. Seeruminäytteistä tehtiin MAT ja virtsasta PCR-tutkimus</p>	<p>Varsasta ja serovarista riippuen MAT oli positiivinen 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 tittereillä. Myös PCR oli positiivinen varsoilla, joiden näytteille se tehtiin. Leptospiroosi-infektiota pitäisi miettiä diagnoosina varsoilla, jos ne osoittavat epäspesifisiä oireita.</p>
<p>Carter, C., Chang, Y., Divers, T., Irby, N. &amp; Smith, J. 2019.</p>	<p>Käydä läpi <i>leptospira</i>-bakteeria, sen aiheuttamaa tautia, siihen liitettyjä sairauksia, diagnostisia menetelmiä, hoitoa, estämistä sekä zoonoottista vaikutusta ihmisiin.</p>	<p>Artikkeli.</p>	<p>Lasiainen neste ja seeruminäytteitä veratessa vasta-aineiden määrä oli eri, mikä todennäköisesti viittaa bakteerin paikallisuuteen. (Muuta tämä)</p>
<p>Afshar, D., Amiri, F., Esmaeili, S., Khalili, M., Safat, A. &amp; Sakhaee, E. 2020.</p>	<p>Kartoittaa leptospiroosi taudin serologista yleisyyttä ihmisissä, ja eläimissä Iranissa.</p>	<p>Systemaattinen katsaus sekä meta-analyysi, jossa aineisto oli tammikuun 1998 – joulukuun 2017 väliseltä ajalta.</p>	<p>Serologisen yleisyyden keskiarvo hevosilla oli 19.99 %.</p>



<p>Grauwels, M., Elen-sary, M., Hansen, P., Monclin, S. &amp; Sauvage, A. 2018.</p>	<p>Tarkastella intraoku-laarisen <i>leptospira</i>-bakteerin esiintyvyyttä hevosilla, käyttäen PCR-menetelmää, verraten lasiaisen- ja kammionesteenäytteiden tuloksia keskenään.</p>	<p>Poikittaistutkimus, jossa käytetyt näytteet oli kerätty touku-kuun 2015 – joulukuun 2017 aikana.</p>	<p>Hevosilla, joille oli todettu ERU, <i>leptospira</i>-bakteerin yleisyys oli 30,3 %. 9 hevosella lasiaisen näyte oli positiivinen <i>leptospira</i>-bakteerille. 3 näytettä oli positiivinen kammionesteestä sekä 8 hevosta oli positiivinen molemmista näytteistä.</p>
<p>Duttmann, C., Flores, B., Fuertes, H., Halaihel, N., Jirón, W., Múzquiz, J., Pérez-Sánchez, T. &amp; Sheleby-Elías, J. 2017.</p>	<p>Analysoida <i>leptospira</i> spp:n epidemiologista käyttäytymistä eläimissä Nigaraguassa, ympäristössä, jossa ihmiset elävät.</p>	<p>Poikittaistutkimus. Näytteet oli kerätty vuosien 2007–2013 välisenä aikana.</p>	<p>Tutkimus osoitti leptospiroosi taudin endemisyyden Nicaragua. Leptospiroosi taudin epidemiologinen käyttäytyminen kotieläimillä on riskitekijä ihmisten leptospiroosi-tapauksissa.</p>
<p>Salonen, E. 2018.</p>	<p>Käsitellä hevosten bakteeri-, virus- ja sieniperäisiä zoonooseja.</p>	<p>Kirjallisuuskatsaus</p>	