



SIAN SIEMENNESTEEN MIKROBIOLOGISEN LAADUNVALVONNAN KEHITTÄMINEN

Tiina Merinen

Opinnäytetyö
Huhtikuu 2011
Laboratorioalan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

MERINEN, TIINA:

Sian siemennesteen mikrobiologisen laadunvalvonnan kehittäminen

Opinnäytetyö 26 s.
Huhtikuu 2011

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli auttaa Finnpig Oy:tä luomaan valmistamalleen tuotteelle mikrobiologinen laadunvalvontajärjestelmä. Finnpig Oy on kahden suuren elintarvikealan yrityksen omistama keinosiemennys- ja sianjalostusyritys, jonka karjuasemalla valmistetaan annospusseja keinosiemennykseen sikatiloille ympäri Suomea. Tuotteen aistinvaraisen ja fyysisten ominaisuuksien tarkkailun lisäksi laboratoriollla oli tarve seurata tuotteen mikrobiologista laatua. Työn tavoitteena oli auttaa yritystä mikrobiologisen laadunvalvonnan kehittämisessä. Työn tarkoituksena oli selvittää raaka-aineiden ja valmiin tuotteen kokonaisbakteerimääriä, hiivojen ja homeiden esiintymistä sekä seurata laboratorioveden mikrobiologista laatua. Tätä varten viljeltiin useita näytteitä sopivien laimennosten ja normaalin mikrobitason määrittämiseksi. Kasvatusalustoiksi valittiin 3M™ Petrifilm™-alustat niiden helppokäyttöisyyden ja pienen koon vuoksi.

Aluksi tutkittiin kokonaisbakteerialustojen sopivuutta tutkittavalle materiaalille sekä selvitettiin mahdollista näytteen laimennostarvetta. Tutkimuksessa oli mukana raakasiementä, antibioottiliuoksella laimennettua myyntisiementä, sekä laimennosaineen tekoon käytettävää ionivaihdettua vettä. Veden mikrobiologista laatua ja säilymistä säilytysastioissaan tutkittiin samanaikaisesti siemenen kanssa. Normaalisti raakasiemenestä haluttiin selvittää keskimääräinen bakteeritaso, jotta voitaisiin verrata sitä poikkeavien näytteiden pitoisuuksiin. Lisäksi bakteeritasoa vertailtiin eri sikarotujen välillä. Myyntisiemen laimennetaan mikrobien kasvua estävällä antibioottiliuoksella ja pakataan annospusseihin, joita tutkittiin laimentimen tehon varmistamiseksi. Hiiva- ja homealustojen soveltuvuuden selvittämiseen käytettiin samoja materiaaleja kuin kokonaisbakteerien kohdalla.

Jatkossa laboratoriossa on tarkoitus seurata myyntipussien sekä käytössä olevan veden mikrobiologista laatua. Koska tutkimus tehtiin yrityksen tuotannon kehittämiseksi, ovat tarkemmat tutkimustulokset ainoastaan Finnpigin omaan käyttöön ja vain työn teoriaosuus on julkinen. Teoriaosuudessa käsitellään yleisesti karjuasematoimintaa, sikojen siemennesteen laatuun vaikuttavia seikkoja sekä käytettyjä työmenetelmiä.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

MERINEN, TIINA:

Developing of Microbiological Quality Control for Boar Semen

Bachelor's thesis 26 pages

April 2011

Finnpig Oy is a company specialized in artificial insemination and breeding of swine. It is owned by two large Finnish food companies. A boar stud in Sastamala manufactured boar semen doses for sow farms. The aim of this study was to aid Finnpig to develop the microbiological quality control system of their own for their products. At present semen doses are controlled only for physical characteristics. The purpose was to determine the average state of total aerobic bacteria as well as yeasts and molds of raw boar semen, laboratory water and of the finished product. The investigation was made by 3MTM PetrifilmTM plates.

The first step in investigation was to find out if the selected research method is suitable for sperm. Several dilutes were made on raw semen to explore which is the best. At the same time with semen examination water quality tests were made by using laboratory water as blank. The permanency of water microbiological quality was investigated by filling seven water cans and storing them in a heater like they usually do in a laboratory. During the six-day period, a sample was taken every day. The finished semen doses are diluted on antibiotic solution. The tests on semen doses showed effectively of solution.

In the future there are plans to observe the microbiological quality of laboratory water and finished semen doses in laboratory. The results of the thesis are not public. In the public part of the thesis there is discussion on function of boar studs and matters which prejudice of boar semen.

Key words: Boar semen, quality control, total bacteria, yeast and mold

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 KARJUASEMATOIMINTA	7
2.1 Siemennesteen käsittely	7
2.2 Tautiseuranta	8
3 MIKROBIT SIEMENNESTEESSÄ	10
3.1 Bakteerit	10
3.1.1 Brucella	11
3.1.2 <i>Leptospira</i>	12
3.1.3 Mykoplasmat	12
3.2 Virukset	13
3.2.1 Sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymä PRRSV	13
3.2.2 Aujeszky'n tauti	14
3.2.3 Parvovirus	15
4 ULKOISIA LISÄÄNTYMISEEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ	16
5 BAKTEERIEN OSOITTAMINEN NÄYTTEESTÄ	17
5.1 Mikroskopia	17
5.2 Viljely	18
5.3 Muut menetelmät	19
6 TYÖN SUORITUS	20
6.1 Työhön käytetty menetelmät ja kasvualustat	20
6.1.1 Aerobic Count Plate	21
6.1.2 Yeast and Mold Plate	22
6.2 Kokonaisbakteerien viljely	23
6.3 Hiivojen ja homeiden viljely	24
LÄHTEET	25

1 JOHDANTO

Kaupallinen keinosiemennystoiminta on Suomessa hiljalleen valtaamassa lähes kaiken sikatiloilla tapahtuvan emakoiden siemennyksen. Erityisillä karjuasemilla tuotettujen siemenannosten käytöllä saavutetaan monia etuja oman karjun käyttöön verrattuna. Karjuasemilla panostetaan jalostukseen ja käytetään vain parasta eläinainesta. Käyttämällä ostosiemettä saadaan nopeasti ja tehokkaasti käyttöön jalostuksella saavutetut edut, kuten terveemmät eläimet ja suuremmat pahnueet. Lisäksi karjuasemien laboratorioilla on sikatiloja paremmat resurssit siemennesteen laadun tarkkailuun. Näin vältetään turhat uusimiset, kun käytetty siemen on aina hyvälaatuista.

Opinnäytetyö tehtiin Finnpig Oy:n Sastamalan karjuasemalla. Finnpig Oy on puoliksi A-Tuottajat Oy:n ja HK Agri Oy:n omistama keinosiemennys- ja sianjalostusyritys, joka omistaa puolet ruotsalaisesta Nordic Geneticsistä ja tekee jalostusyhteistyötä norjalaisen Norsvinin kanssa. Karjuasemalla tuotetaan annospusseihin pakattua karjun siemennestettä omistajayritysten sopimuskasvattajille. Asemalta lähetetään viikoittain noin 5000 annospussia sikatiloille ympäri Suomea. Opinnäytetyötä tehtäessä asemalla oli noin 175 karjua, jotka edustivat neljää eri rotua: durocmaatiainen DM, hampshire H, norjanmaatiainen NM ja ruotsalainen yorkshire Y. Norjanmaatiaisen ja yorkshiren siementä käytetään jalostukseen sekä risteytysemakoiden tuotantoon. Durocmaatiainen ja hampshire taas ovat lihasikarotuja, joilla NM/Y-emakot siemennetään.

Karjuaseman toimintaa säätelevät useat lait ja asetukset, joiden tarkoituksena on ehkäistä eläintautien leviämistä sikatiloilla. Erityisen tärkeää valvonta on tuotaessa eläimiä ulkomailta maista, joissa tauteja esiintyy enemmän kuin meillä. Säädökset määrittelevät muun muassa asemalle tuotavien eläinten karanteeniaikojen pituudet, eläinlääkärin tekemät tarkastukset sekä omavalvonnan. Omavalvonnan yhtenä osa-alueena on myytävän tuotteen laadun seuranta. Nykyisen käytännön mukaan kaikelle raakasiemenelle tehdään laboratoriossa aistinvarainen seuranta (haju, väri), sekä määritetään siittiöiden liikkuvuus (elävyys), morfologia ja määrä siemennesteessä. Myyntiin hyväksyty raakasiemen laimennetaan ravintoaineita ja antibiootteja sisältävällä liuoksella, jonka tarkoituksena on pidentää tuotteen käyttöikää sekä tuhota näytteissä mahdollisesti esiintyviä taudinaiheuttajia ja haitallisia bakteereja. Laimennettujen siemenerien elävyys tarkistetaan uudelleen viiden päivän kuluttua.

Laboratoriossa on tarkoitus aloittaa edellä mainittujen seikkojen lisäksi valmiiden myyntipakkausten mikrobiologisen laadun seuranta, koska karjuaseman tavoitteena on toimittaa asiakkailleen laadukasta ja turvallista siementä. Vaikka karjuasemalla noudatetaan hyviä yleisiä hygieniaohjeita kaikissa työvaiheissa, on siemennesteen kontaminoitumista bakteereilla lähes mahdoton estää. Mahdollisia kontaminaatiolähteitä on useita, merkittävimpana karju itse. Bakteerien vaikutusta siemenen laatuun on tutkittu varsin vähän. Viitteitä on kuitenkin saatu siitä, että bakteerit heikentävät siittiöiden laatua ja lyhentävät niiden elinikää jos ne jätetään huomiotta. Useiden siemennesteestä löydettyjen bakteerikantojen on todettu olevan resistenttejä useille antibiooteille. Tämän vuoksi valmiiden keinosiemennysannosten mahdollisen bakteerikasvun tarkkailu on tärkeää.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli auttaa yritystä luomaan tuotteille mikrobiologinen laadunvalvontajärjestelmä. Työn tarkoituksena oli selvittää tuotteissa ja valmistusmateriaaleissa eri vaiheissa esiintyviä kokonaisbakteeri- sekä hiiva- ja homepitoisuuksia ja vertailla onko eri sikarotujen välillä merkittäviä eroja. Tarkoituksena oli myös tarkkailla laboratorioveden mikrobiologista laatua ja siemennesteen laimentamiseen käytetyn antibioottiliuoksen toimintaa. Tutkittavana olevia näytteitä viljeltiin käyttövalmiille PetrifilmTM-kasvualustoille ja saatujen tulosten pohjalta suunnitellaan yrityksessä ohjeistus tulevaa seurantaa varten.

2 KARJUASEMATOIMINTA

Karjuasemaksi kutsutaan laitosta, jossa kerätään, käsitellään ja säilytetään karjun spermaa keinosiemennystarkoitukseen (Maa- ja metsätalousministeriö 2007). Keinosiemennysala on kehittynyt huomasti viimeisen 50 vuoden aikana ja se on levinnyt lähes kaikkiin maailman maihin. Menestyksen taustalla on karjuasemilla kerätyn siemennesteen hyvä laatu. Eläinten kasvattajat voivat siementä ostaessaan olla varmoja, että se ei sisällä patogeenejä ja on siten turvallista käyttää. (Thibier & Guerin 2000.)

Karjuasemien haasteena ovat useat sperman välityksellä leviävät patogeenit. Erilaisten taudinaiheuttajien eristäminen siemennesteestä on kuitenkin melko hidasta ja tulokset epävarmoja. Paras tapa tuottaa tautivapaata siementä on huolehtia, etteivät karjuasemalla olevat eläimet kannan kyseisiä patogeenejä. Tämä varmistetaan tautisuluilla ja säännöllisellä tarkkailulla. (Maes ym. 2008.)

2.1 Siemennesteen käsittely

Karjujen siemennesteen laatua tai hedelmällisyyttä ei mahdollisuuksista huolimatta juurikaan tutkita tiloilla, joissa eläimet lisääntyvät luonnollisella tavalla. Sen sijaan tiloilla, joilla kerätään siementä keinosiemennystä varten, laatuun kiinnitetään erityisen paljon huomiota. Nykyaikaisilla laitteilla ja menetelmillä voidaan helposti tutkia jokaisen käytössä olevan karjun siemennesteen laatu sekä seurata eläinten terveydentilaa. Keinosiemennysasemilla elävien karjujen terveyttä tarkkaillaan säännöllisesti sairauksien varalta. Lisäksi useimmilla asemista määritetään rutiininomaisesti jokaisen siemennesteannoksen massa, siittiöiden liikkuvuus ja morfologia mikroskooppisesti sekä tiheys spektrofotometrillä. Keinosiemennyksen vahvuutena onkin juuri jatkuvalla seurannalla saatava taloudellinen hyöty. Kyseisillä tutkimuksilla on saatu merkittävästi pienentyä heikentyneestä lisääntymiskyvystä johtuvia tappioita sikateollisuudessa. (Althouse 2007b, 722.)

Jotta tuoreesta siemennesteestä saataisiin keinosiemennyksessä mahdollisimman suuri hyöty, se yleensä laimennetaan kaupallisilla laimennosaineilla. Laimennosaineet ovat neutraaleja, isotonisia liuoksia, jotka on kehitetty erityisesti parantamaan siittiöiden liikkuvuutta ja käyttöikä. Ne sisältävät ravintoaineita, biologisia puskureita sekä

elektrolyyttejä. Lisäksi liuokset sisältävät antibiootteja, jotka ovat välttämättömiä siemennesteen bakteerikontaminaatioiden kontrolloimiseksi. (Althouse, Kuster, Clark & Weisiger 1999.) Kaikilta laimennosaineeseen lisättäviltä antimikrobisilta yhdisteiltä vaaditaan muutamia tiettyjä ominaisuuksia; niiden pitää toimia tehokkaasti mikro-organismia vastaan, olla myrkyttömiä lisääntymiskudoksille, inertejä muille laimennosaineen yhdisteille sekä nopeasti ja helposti käytettäviä (Bielanski 2006).

Tuotteen laatu varmistetaan laboratoriossa, jossa käytössä ovat mikroskooppi 200 X suurennoksella liikkuvuuden ja morfologian määrittämiseen sekä spektrofotometri tai sitäkin tarkempi solulaskuri (Kuva 1.) tiheyden määrittämiseen. (Finnpig Oy 2008.) Jotta siemennestettä voidaan käyttää, on siinä oltava muodoltaan normaaleja eläviä siittiöitä vähintään 70 % (Reicks & Levis 2008).



KUVA 1. Siemennesteen laadun tutkimiseen käytettävää välineistöä

2.2 Tautiseuranta

Taloudellisen hyödyn lisäksi järjestelmällisellä tautiseurannalla karjuasemilla on saatu estettyä haitallisten sairauksien leviäminen tilojen välillä. Tautitilanteen kontrollointi koostuu seuraavista komponenteista: tautisuojaus, karanteeni, rokottaminen, hoito ja seuranta. Tautisuojaus alkaa karjuaseman tarkoituksenmukaisella sijoittamisella siten, että ympäristöstä tulevat uhat minimoidaan. Rakennuksen ympäristöä sekä eläin-,

henkilöstö- ja tavaraliikennettä on pystyttävä kontrolloimaan kontaminaatioiden estämiseksi. Asemalle hankittavat eläimet tulee valita tiloilta, joilla on vähintään samantasoinen tautisuojaus kuin omalla tilalla. Siitä huolimatta kaikki asemalle tuotavat eläimet kulkevat karanteenin kautta, jossa ne rokotetaan vastustettavia tauteja vastaan. Jatkossa karjuasemalla olevien eläinten terveyttä seurataan säännöllisillä tarkastuksilla. (Althouse 2007a).

Monet hedelmättömyyttä ja tiineiden emakoiden keskenmenoja aiheuttavat patogeenit leviävät siemennesteen välityksellä. Tämän vuoksi keinosiemennysasemalle tuotavat eläimet joutuvat karanteeniin ennen asemalle pääsyään. (Althouse 2007b, 722.) Karanteeniaikana eläinten terveyttä seurataan tarkkailemalla päivittäin niiden vointia, kuten yskimistä, aivastelua, muutoksia ulosteen koostumuksessa ja määrässä, vähentyntä ruokahalua tai veden kulutusta, ihomuutoksia, raajarikkoisuutta sekä uneliaisuutta. Ulkoisen seurannan lisäksi mahdollisia tauteja etsitään ottamalla verinäytteitä. (Althouse 2007a.) Jos näytteistä saadaan laboratoriossa positiivisia tuloksia, on niistä viipymättä ilmoitettava viranomaisille (Maa- ja metsätalousministeriö 1995). Ainoastaan täysin terveet eläimet voidaan hyväksyä asemalle. Karjuasemilla onkin suuri vastuu maansa sikateollisuuden toimivuudesta. Yksikin sairas eläin asemalla voi levittää tautia kymmeniin, jopa satoihin eläimiin muilla tiloilla. (Althouse 2007b, 722.)

Suomessa karjuasemalle saapuvien sikojen karanteeniaika on vähintään 30 vuorokautta. Ennen karanteeniajan alkamista on eläimet testattava Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen mukaisten tautien varalta. Vasta negatiivisten tulosten saavuttua voi varsinainen karanteeni alkaa. Karanteeniaikana siat hoidetaan leptospiroosin varalta, sekä tutkitaan tarttuvien sikatautien varalta. Negatiivisten tutkimustulosten jälkeen eläimet voidaan siirtää asemalle. Karjuasemalla eläimet ovat asemaeläinlääkärin säännöllisessä valvonnassa. Kerran vuodessa kaikki aseman karjut tutkitaan Aujeszkyin taudin, luomistaudin, sikaruton sekä leptospiroosin varalta. (Maa- ja metsätalousministeriö 2007.)

3 MIKROBIT SIEMENNESTEESSÄ

3.1 Bakteerit

Karjun siemennesteen keräily ja käsittely on prosessi, jossa bakteerikontaminaatioita on melko mahdotonta välttää. Tämän vuoksi tuore siemenneste sisältää lähes aina bakteereita, joista valtaosa on Gram-negatiivisia *Enterobacteriaceae*-sukuun kuuluvia. Erilaiset bakteerit voivat heikentää siemenen laatua, lyhentää sen säilyvyysaikaa ja kontrolloimattomana vähentää sen hedelmöityskykyä. Merkittävin kontaminaatiolähde prosessissa on karju. Muita mahdollisia lähteitä voivat olla ympäristö, siemenenottaja, laboratorion työvälineet ja henkilöstö sekä siemenen esikäsittelyyn käytettävä vesi. (Althouse & Lu 2005.)

Vuosina 1996–1999 Pohjois-Amerikassa useita sikatiloja käsittävässä tutkimuksessa selvitettiin tarkemmin bakteerien vaikutusta siemennesteeseen. Tiloilla oli aiemmin havaittu siittiöiden agglutinaation, eli yhteenliimautumisen olevan yhteydessä niiden lyhentyneeseen elinikään ja emakoiden huonoon tiinehtyvyyteen. Tutkimusta varten tiloilla otettiin siementä ja lähetettiin laboratorioon tutkittavaksi. Näytteet kerättiin hansikoiduin käsin astioihin, joita tiloilla normaalistikin käytetään siemenen säilytykseen. Ne myös laimennettiin tiloilla käytössä olevilla laimennosaineilla. Heti näytteiden saavuttua laboratorioon, noin 1 vuorokauden kuluttua keräilystä, niistä mitattiin lämpötila ja pH, sekä mikroskoopin avulla siittiöiden liikkuvuus ja morfologia. Lisäksi tehtiin mikrobiviljelyt. (Althouse ym. 1999.)

Tutkittavaksi lähetetyissä siemennäytteissä havaittiin siittiöiden agglutinaatiota ja erittäin merkittävää liikkuvuuden heikkenemistä, 96 % näytteistä liikkuvuus oli < 5 %. Suurin osa näytteistä (93 %) oli lisäksi happamia, pH 5.7–6.4, kun tavallisesti siemenneste on neutraalia. Mikrobiologisessa tutkimuksessa havaittiin useiden eri sukuihin kuuluvien bakteerien kasvua. Löydetyissä bakteereissa oli sekä suolistoperäisiä (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*), että muihin lajeihin kuuluvia kantoja (*Alcaligenes xylosoxydans*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*), joista suurimman osan havaittiin olevan resistenttejä laimennosaineissa käytettäville antibiooteille. Edellä mainitut lajit muodostivat 71 % kaikista löydetyistä lajeista. Kaikki löydetyt kannat olivat resistenttejä laimennosaineissa eniten käytetylle

gentamysiinille. (Althouse ym. 1999.) Gentamysiini kuuluu aminoglykosideihin, jotka ovat bakteerien proteiinisynteesiä häiritseviä lääkeaineita. Ne vaikuttavat ensisijaisesti aerobisiin gramnegatiivisiin bakteereihin, kuten *E. coli* ja *Pseudomonas*. Suomessa käytettäviä aminoglykosideja ovat gentamysiinin lisäksi streptomysiini, amikasiini, tobramysiini ja netilmysiini. (Tuominen & Männistö 2011.)

Siemenneste on sisältämiensä komponenttien vuoksi optimaalinen kasvu- ja levittäytymisalusta erilaisille patogeeneille. Perinteiset mikrobien kasvua ehkäisevät toimet eivät sovi siemennesteelle, koska siittiöt ovat erittäin herkkiä monille ulkoisille tekijöille ja kemikaaleille. Sen vuoksi kontaminaatioiden välttäminen on paras tapa ehkäistä mikrobien leviäminen. (Bielanski 2006.) Hyvällä henkilökohtaisella hygienialla, yleisellä siisteydellä, oikeilla työskentelytavoilla sekä jatkuvalla seurannalla voidaan helposti kontrolloida karjun ulkopuolisten kontaminaatiolähteiden määrää (Althouse & Lu 2005).

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen mukaisesti Suomessa karjuasemalla kerättyyn spermaan on lisättävä antibiootteja leptospiirojen ja mykoplasmojen varalta. Laimennetun siemennesteen antibiootipitoisuuksien tulee olla vähintään seuraavat: 500 µg/ml streptomysiiniä, 500 k.y./ml penisilliiniä, 150 µg/ml linkomysiiniä sekä 300 µg/ml spektinomysiiniä. Muitakin antibioottiyhdistelmiä on mahdollista käyttää, kunhan niillä on sama vaikutus leptospiiroihin ja mykoplasmoihin. (Maa- ja metsätalousministeriö 2007.)

3.1.1 Brucella

Brucella-bakteeri aiheuttaa eläimissä bruselloosia eli luomistautia, joka Suomessa luokitellaan vaaralliseksi eläintaudiksi. Kyseinen bakteeri ei kuulu eläimen normaaliin bakteerikantaan ja on aina tautia aiheuttava. Sioissa taudin aiheuttaa serotyyppi *B.suis*. Luomistautia esiintyy yleisesti Kreikassa, Espanjassa, Italiassa, Ranskassa ja Irlannissa, kuten myös Afrikassa, Aasiassa ja Etelä-Amerikassa. Suomi on bruselloosivapaa maa. (Eläintautien torjuntayhdistys 2011a.)

Bruselloosi leviää yleisimmin tartunnan saaneen oireettoman ostoeläimen välityksellä tai suun kautta saastuneen rehun, juoman ja kuivikkeen välityksellä. Bakteeria erittyy myös runsaasti spermaan, mutta leviämisen välikäden välityksellä on vähäinen merkitys. Tauti voi olla ei-tiineillä eläimillä lähes oireeton, jonkin verran esiintyy nivel- ja kivistulehduksia. Tiineillä eläimillä oireina ovat luominen ja huonokuntoisena syntyvät porsaat. (Eläintautien torjuntayhdistys 2011a.)

3.1.2 *Leptospira*

Leptospiroosin aiheuttaja on pieni spiraalinmuotoinen leptospiira-bakteeri. Suomessa leptospiroosi-tauti luokitellaan välittömästi Eviralle ilmoitettavaksi tarttuvaksi eläintaudiksi. Sikojen tautia aiheuttava serotyyppi on *L.pomona*. Leptospiroosia esiintyy kaikkialla maailmassa, Suomessa se on kuitenkin melko harvinainen. (Eläintautien torjuntayhdistys 2011b.)

Leptospiroosi leviää virtsan saastuttaman veden, rehun ja siemennesteen välityksellä, josta se tarttuu uuteen eläimeen limakalvojen tai rikkinäisen ihon kautta. Kantajaeläin voi levittää tautia vielä kuukausia parantumisen jälkeen. Tuotantoeläimillä tauti on useimmiten oireeton, mutta emakoilla se aiheuttaa tiinehtymättömyyttä. Tämän vuoksi tehdäänkin usein leptospiroositutkimus selvittäessä hedelmättömyyden syitä sikatiloilla. (Eläintautien torjuntayhdistys 2011b.)

3.1.3 Mykoplasmat

Suomessa *Mycoplasma hyopneumoniae*-bakteerin aiheuttama porsasyskä on taloudellisesti merkittävin sikojen hengitystiesairaus. Mykoplasmat ovat erittäin pienikokoisia soluseinättömiä bakteereja, jotka elävät kantajansa hengitysteissä. Porsasyskä on erityisesti pienten porsaiden tauti, joka aiheuttaa niiden heikentymistä ja altistaa jopa kuolemaan johtaville jälkitaudeille. Bakteereita pääsee ilmaan eläinten yskiessä ja pienen kokonsa vuoksi ne voivat levitä hyvinkin pitkiä matkoja ilmavirtojen mukana. (Maatilan Pellervo 2001.)

3.2 Virukset

Monien virusten on todettu aiheuttavan sioille hedelmättömyyttä ja keskenmenoja. Merkittävimpiä maailmanlaajuisia taloudellisia menetyksiä nykyaikaisessa sikateollisuudessa aiheuttavat sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymävirus PRRSV, Aujeszkyntautia aiheuttava valeraivotautivirus PRV, sian parvovirus PPV, klassinen sikakuumevirus CSFV, sian koleravirus HCV, sian enterovirus PEV sekä encephalomyocarditis virus joista muutama on perehdyttään myöhemmin tarkemmin. Lisäksi satunnaisesti paikallisia epidemioita aiheuttavat muun muassa sian cytomegalovirus PCMV ja blue eye disease virus BEDV. (Torremorrell 2007b.) Siemennesteessä virukset voivat kiinnittyä siittiöiden pintaan sekä muihin nesteessä oleviin soluihin tai solulimaan ja siten kulkeutua eteenpäin. Joidenkin virusten (kuten PRRSV) tiedetään myös läpäisevän siittiön pään ja integroituvan sen genomiin. (Bielanski 2006.)

Virukset ovat erityisen vaarallisia tiineenä oleville emakoille, sillä niillä on kyky läpäistä istukka ja siten tartuttaa ja tappaa sikiö. Viruksen aiheuttamien vahinkojen taso riippuu raskauden kestosta tartuntahetkellä, viruksen infektointimekanismista sekä viruskannan haitallisuudesta. Ensimmäisen kahden raskausviikon aikana tapahtuvat vahingot ovat lähes aina sikiölle kuolettavia. Virukset voivat aiheuttaa myös häiriöitä raskautta ylläpitäviin systeemeihin, jolloin seurauksena on keskenmeno, kuolleena syntyviä porsaita tai vastasyntyneiden kuolemia. (Torremorrell 2007b.)

3.2.1 Sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymä PRRSV

PRRSV (porsine reproductive and respiratory syndrome virus) on suhteellisen uusi virus, joka on tunnettu vasta 1980-luvun lopulta ja taudinaiheuttaja eristetty ensimmäisen kerran Euroopassa 1991. Myöhemmin siitä on tullut yksi merkittävimmistä maailmanlaajuisesti sikateollisuudelle kustannuksia aiheuttavista viruksista. (Torremorrell 2007b.) PRRS-tauti on *Arteri*-virussukuun kuuluvan viruksen aiheuttama sairaus, joka ei tartu ihmiseen. Sen aiheuttamat infektiot vaihtelevat virustyyppin mukaan ja taudin kliininen kuva voi vaihdella lähes oireettomasta voimakkaasti oireileviin yksilöihin. Oireet alkavat tyyppillisesti kahden- kolmen viikon

kuluttua tartunnasta ja niiden voimakkuuteen vaikuttavat eläinten ikä, viruskanta sekä mahdolliset muut sikalassa esiintyvät taudinaiheuttajat. (Evira 2010c.)

PRRS-tauti aiheuttaa emakoille keskenmenoja, porsimisvaikeuksia, ennenaikaisia porsimisia sekä häiriöitä maidontuotantoon. Lisäksi kuolleena tai heikkokuntoisena syntyvien porsaiden osuus kasvaa. Karjuille tauti aiheuttaa yleensä lieviä hengitystieoireita, kuumetta ja ruokahaluttomuutta. Virus voi levitä tilalta toiselle siirtyvien eläinten ja työntekijöiden mukana ulosteen, pölyn, sieraineritteiden, syljen, virtsan sekä vaatteiden ja kenkien välityksellä. Lisäksi se voi levitä keinosiemennykseen käytettävän siemennesteen välityksellä. Suomen lainsäädäntö luokittelee PRRS-taudin vastustettavaksi, valvottavaksi eläintaudiksi (Maa- ja metsätalousministeriö 1995), jota ei toistaiseksi ole todettu Suomessa. (Evira 2010c.)

3.2.2 Aujeszzkyn tauti

Aujeszzkyn tautia aiheuttaa herpesviruksiin kuuluva pseudorabiesvirus PRV. Pääasiassa luonnollisessa isäntälajissaan siassa esiintyvä tauti voi infektoida myös muita eläinlajeja, kuten nautoja ja lampaita, mutta ihmisiin se ei tartu. (Evira 2010a.) Tauti luokitellaan vaaralliseksi, vastustettavaksi eläintaudiksi (Maa- ja metsätalousministeriö 1995). Se aiheuttaa sioissa erilaisia oireita kuumeesta ja hengitystieoireista keskushermosto-oireisiin eläimen iästä ja viruskannasta riippuen. Vastasyntyneillä porsailla sairaus etenee hyvin nopeasti ja johtaa lähes aina kuolemaan. Vanhemmilla porsailla ja aikuisilla sioilla taudin eteneminen on hitaampaa ja oireet lievempiä. Tauti on yleensä ohimenevä, mutta eläin jää toivuttuaan viruksen kantajaksi. (Evira 2010a.)

Tiineillä emakoilla Aujeszzkyn tauti aiheuttaa keskenmenoja, uusimisia sekä kuolleina tai heikkokuntoisena syntyviä porsaita. Karjuilla taas esiintyy ohimenevää hedelmättömyyttä. Virus leviää siasta toiseen sierainalueen kosketuksesta, hengitysilma-istukan kautta sikiöön sekä astutuksen ja keinosiemennyksen yhteydessä. Suomi on Euroopan yhteisöjen komission virallisella päätöksellä Aujeszzkyn taudista vapaa maa. (Evira 2010a.)

3.2.3 Parvovirus

Sikojen parvovirus PPV (Porsine parvovirus) on merkittävin sikojen hedelmällisyshäiriötä aiheuttava tartunta Suomessa (Evira 2010b). Raskauden aikana saatu tartunta lisää kuolleena syntyvien porsaiden määrää sekä pienentää pahnuekokoja, keskenmenot ovat harvinaisia. Virustartunnan vaikutuksista karjujen hedelmällisyyteen tai libidoon on hyvin vähän tietoa. (Torremorrell 2007b.)

Parvovirus leviää kohdussa sikiöstä toiseen, mutta ei välttämättä tartuta niitä kaikkia. Tämän vuoksi pahnueeseen voi samalla kertaa syntyä useita eri-ikäisenä kuolleita sikiöitä sekä täysin terveitä porsaita. Paras keino ehkäistä viruksen leviämistä on emakoiden rokottaminen ennen tiineyttämistä. (Torremorrell 2007b.)

4 ULKOISIA LISÄÄNTYMISEEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

Viruksien ja bakteerien lisäksi sikojen hedelmällisyyteen ja pahnueiden kokoon vaikuttavat monet muut tekijät. Tällaisia ovat muun muassa anatomiset poikkeavuudet, toksiinit, vuodenaikojen vaihtelut sekä eläinten oikeanlainen hoito. Anatomisia poikkeavuuksia esiintyy noin 2 % kaikista syntyvistä porsaista. Suurin osa elävillä eläimillä esiintyvistä poikkeavuuksista ei näy päällepäin ja yksittäisten eläinten tarkka tutkiminen on tarpeellista. Ensimmäistä kertaa tiineytettävät emakot, eli ensikot, joiden hedelmöitys ei onnistu toisella tai kolmannellakaan kerralla, tulee poistaa. (Tubbs 2007.)

Nykyaikaisissa sikaloissa eläimet altistuvat erittäin vähän myrkyllisille yhdisteille. Mahdollisia ongelmia voivat kuitenkin aiheuttaa ravinnoksi käytetyssä viljassa kasvava home tai huonosta ilmanvaihdosta johtuva hiilimonoksidi. Emakoilla esiintyy myös kausittaista hedelmättömyyttä eri vuodenaikoina, erityisesti talvikuukausina. Lisäksi tiineiden emakoiden oikeanlaisella ruokinnalla on suuri merkitys elävänä syntyvien porsaiden kuntoon ja emakon kykyyn imettää porsaita. (Tubbs 2007.)

5 BAKTEERIEN OSOITTAMINEN NÄYTTEESTÄ

Bakteerien osoittamiseen ja tunnistamiseen näytteestä on käytettävissä useita erilaisia menetelmiä. Kaikkien menetelmien edellytyksenä on mahdollisuus eristää ja kasvattaa bakteereita laboratoriossa. Kasvattaminen tapahtuu tarkoin kontrolloiduissa olosuhteissa erityisellä kasvatusmedialla. Bakteerien tunnistaminen voi perustua niiden ulkomuotoon ja rakenteeseen, käyttämiin ravintoaineisiin ja tuottamiin aineenvaihduntatuotteisiin tai esimerkiksi nukleiinihapposekvenssiin. (Prescott, Harley & Klein 2002.) Seuraavissa kappaleissa käsitellään muutamia tunnistusmenetelmiä.

5.1 Mikroskopia

Bakteerit ovat kooltaan hyvin pieniä (yleensä 1-2 μm). Valomikroskoopilla saavutetaan noin 1000–1200-kertainen suurennos, jolla suurin osa bakteereista voidaan havaita. Jotta bakteerisolut erottuisivat paremmin taustastaan, voidaan niille tehdä värjäyskäsittely ennen mikroskopointia. Eniten käytetty menetelmä on Gramvärjäys, jolla saadaan eroteltua bakteerit grampositiivisiin ja – negatiivisiin soluseinän rakenteen perusteella. Samalla saadaan näkyviin bakteerin muoto. Gramvärjäys soveltuu useimmille bakteerilajeille. Valomikroskooppia tarkempi, mutta vaativan tekniikan vuoksi vähemmän käytetty on elektronimikroskooppi, jolla voidaan tarkastella solun hienorakenteita. (Huovinen ym. 2005)

Mikroskopoinnin etuihin voidaan lukea sen nopeus ja helppous. Menetelmä ei vaadi bakteerimäärän kasvattamista eikä aineenvaihduntatuotteiden muodostumisen odottelua, eli inkubointivaihe jää pois. Mikroskoopilla voidaan tutkia hyvin monenlaisia näytematriiseja, kuten kiinteitä ja nestemäisiä näytteitä sekä eläviä ja kuolleita soluja. Lisäksi tutkitut näytteet on mahdollista säilyttää tulevaa tarvetta tai arkistointia varten. (Korkeala 2007.)

5.2 Viljely

Yksinkertainen ja halpa menetelmä bakteerien tutkimiseen on viljely. Siinä tutkittavaa näytettä siirretään bakteerien kasvua edistävälle kasvualustalle. Viljelymenetelmällä voidaan havaita ainoastaan eläviä mikrobeja. Useimmissa näytteissä esiintyy monia eri bakteerilajeja, jotka ensin erotellaan toisistaan käyttäen puhdasviljelytekniikkaa. Tekniikan periaatteena on laimentaa näytettä niin paljon, että maljalta saadaan poimittua jatkoviljelyyn yksittäisen bakteerin tuottamia pesäkkeitä. Laimentaminen tapahtuu hajotusmenetelmällä, jossa näytettä levitetään ensin pienelle osalle kasvualustaa ja siitä asteittain koko maljalle. Erilaisia kasvutekijöitä sisältäviä kasvualustoja käyttämällä voidaan tunnistaa bakteerilajeja tai määrittää niiden mikrobilääkeherkkyyttä. (Huovinen ym. 2005.)

Viljelyn periaatteena on luoda optimaaliset olosuhteet mikrobien kasvulle. Bakteerit, kuten kaikki mikrobit, tarvitsevat kasvuun ja elämiseen tiettyjä ravintoaineita. Tärkeimpiä näistä ovat makroravinteet, joita solu tarvitsee suuria määriä muun muassa biomolekyylien rakennusaineeksi. Makroravinteita ovat hiili, happi, vety, typpi, rikki, fosfori, kalium, kalsium, magnesium ja rauta. Lisäksi solu tarvitsee vähäisiä määriä mikroravinteita, kuten mangaania ja sinkkiä. Ravintoaineiden lisäksi bakteerien kasvuun vaikuttavat olosuhteet, esimerkiksi pH, suola- ja happipitoisuus sekä lämpötila. (Prescott, Harley & Klein 2002.)

Bakteerien viljelyalustat voivat olla joko kiinteitä tai nestemäisiä, selektiivisiä eli valikoivia tai ei-selektiivisiä eli ei valikoivia. Nestemäisten kasvatusliemien kiinteyttämiseen käytetään yleisimmin agaria. Ei-selektiivisiä kasvualustoja voidaan käyttää mikrobikantojen rikastamiseen jatkotutkimuksia varten sekä kokonaisbakteerien määrittämiseen. Kokonaisbakteerien määrittäminen ei nimestään huolimatta kerro näytteen absoluuttista bakteerimäärää, mutta se on hyvä keino vertailla keskenään eri näytteiden bakteeripitoisuuksia. Se on myös hyvä menetelmä erilaisten tuotteiden, prosessien ja pintojen puhtauden tarkkailuun. (Korkeala 2007.)

Selektiivisiä alustoja käytetään, kun halutaan tutkia näytteestä vain tietyn mikrobin esiintymistä. Valikoiviin kasvualustoihin on valittu sellaiset ravintoaineet, antibiootit ja muut aineet, että se suosii ainoastaan kohdemikrobin kasvua samalla estäen kilpailevien lajien kasvun. Jos näytteessä tiedetään olevan määritettävää bakteeria erittäin vähän,

voidaan sitä ensin rikastaa yleismaljalla ja sen jälkeen poimia pesäkkeitä selektiiviselle alustalle tunnistusta varten. (Korkeala 2007.)

5.3 Muut menetelmät

Viljelyn ja mikroskopoinnin apuna voidaan käyttää kalvosuodatusmenetelmää, jossa bakteerit kerätään näytteestä suodatinkalvolle. Menetelmä soveltuu nestemäisille näytteille, jotka sisältävät hyvin pieniä määriä mikrobeja, esimerkiksi vedelle. Suodatuksen jälkeen kalvoja voidaan inkuboida elatusainemaljalla tai värjätä ne mikroskopointia varten. (Korkeala 2007.)

Bakteerien fyysisiä ja biokemiallisia ominaisuuksia voidaan määrittää muun muassa mikrokolorimetrillä, joka perustuu mikrobiaineenvaihdunnassa muodostuvan lämpöenergian mittaamiseen sekä virtaussytometrillä, jolla solut osoitetaan niiden fluoresenssin, absorbanssin tai valontaittumisominaisuuksien perusteella. Immunologisissa menetelmissä mikrobi tai sen tuottama toksiini tunnistetaan spesifisen vasta-aineen avulla. Yksi käytetyimmistä menetelmistä on ELISA-testi. Molekyylibiologiset analyysitekniikat perustuvat bakteerien geneettisen perimän erojen tarkasteluun. Käytetyin tekniikka on polymeerasiketjureaktio eli PCR. (Korkeala 2007.)

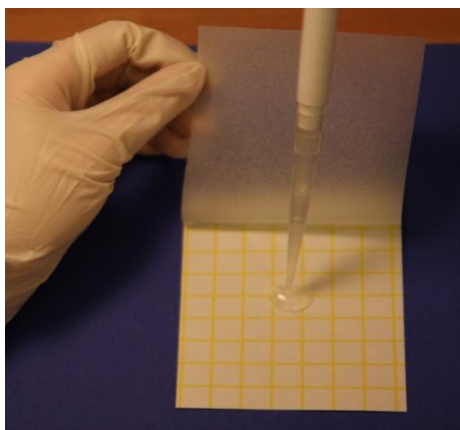
6 TYÖN SUORITUS

Seuraavissa kappaleissa tutkimuskohteita lueteltaessa esiintyvät termit hyppy ja myyntisiemenannos. Hyppyllä tarkoitetaan yksittäisen karjun siemenenkeräystapahtumaa, josta saadaan raakasiemenannos laboratorioon tutkittavaksi. Myyntisiemenannokset taas valmistetaan sekoittamalla useiden samanrotuisten karjujen siementä yhdeksi eräksi, lukuun ottamatta jalostuskarjujen siementä, joka pakataan erikseen.

6.1 Työhön käytetty menetelmät ja kasvualustat

Mikrobien osoittaminen ja niiden määrän laskeminen siemennesteestä ja vedestä tehtiin viljelemällä näytteitä valmiille kaupallisille kasvualustoille. Työhön käytettiin 3M™ Petrifilm™-kasvualustoja kokonaisbakteereille (Aerobic Count Plate) sekä hiivoille ja homeille (Yeast and Mold Plate). Kumpikin on näytevalmis viljelyalusta kahden kalvon välissä. Kuivattu media aktivoituu nesteen lisäämisen jälkeen. 3M™ Petrifilm™-alustat ovat kooltaan erittäin pieniä ja helppokäyttöisiä verrattuna perinteisiin maljoihin.

Viljely Petrifilmeille tapahtuu yksinkertaisesti pipetoimalla 1 ml nestemäistä näytettä alakalvolle ja laskemalla yläkalvo sen päälle. Näytteen levitys tietylle pinta-alalle tapahtuu pakkauksen mukana tulevalla kiekolla, jolla painetaan kevyesti kalvon päältä (Kuva 3). Inkuboinnin jälkeen tulokset on laskettavissa läpinäkyvän yläkalvon päältä (Kuva 4).



KUVA 3. Näytteen viljely Petrifilmille



KUVA 4. Inkuboidut Petrifilmit, vasemmalla ei kasvua, keskellä sopiva laimennos, oikealla liian tiheä laskettavaksi

6.1.1 Aerobic Count Plate

Aerobic Count (AC) alusta on näytevalmis viljelyalusta, joka on tarkoitettu aerobisten kokonaisbakteerien määrittämiseen erityisesti elintarviketeollisuudessa. Alusta muodostuu kahdesta kalvosta, joista alempi sisältää Standard Methods-ravinteita ja kylmään veteen liukenevia geelitysaineita. Ylemmässä kalvossa taas on indikaattorina toimivaa tetrazoliumosoitinta. AC-alustojen komponentit ovat dekontaminoitu, mutta ei steriloitu. (3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate – käyttöohjeet.)

AC-alustoja käytettäessä on näytteen pH säädettävä välille 6,6 – 7,2 optimaalisen mikro-organismien kasvun ja saannon varmistamiseksi. pH:n säätöön käytetään NaOH:a tai HCl:a. Näytteen laimentamiseksi on suositeltavaa käyttää steriiliä fosfaattipuskuriliuosta, peptonivettä, laimeaa suolaliuosta tai tislattua vettä. Laimentimena ei saa käyttää sitraattia, bisulfiittia tai tiosulfaattia sisältäviä liuoksia, sillä ne estävät mikrobien kasvun alustalla. (3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate – käyttöohjeet.)

Kokonaisbakteerimäärittämissä tehtävissä inkubointiaika ja – lämpötila riippuvat käsiteltävästä näytteestä. Validoituja menetelmiä löytyy muun muassa ihmisruuille ja meijerituotteille. AC-alustojen mukana tulevalle levittimelle tehty pyöreä kasvualue on

kooltaan noin 20 cm². Kaikki alueella olevat punaiset pesäkkeet lasketaan niiden koosta tai intensiteetistä riippumatta. Suuret pesäkemäärät muuttavat koko kasvualueen vaaleanpunaiseksi, jolloin näytettä pitää laimentaa. (Aerobic Count Plate – käyttöohjeet.)

6.1.2 Yeast and Mold Plate

Yeast and Mold (YM) laskenta-alusta on hiivojen ja homeiden määrittämiseen tarkoitettu käyttövalmis kasvualustajärjestelmä. Se on suunnattu erityisesti elintarvike- ja virvoitusjuomateollisuuden käyttöön. Alustat sisältävät antibiooteilla täydennettyjä ravinteita, kylmään veteen liukenevaa geeliä sekä hiivan ja homeen laskentaa helpottavaa fosfataasientsyymi-indikaattoria. YM-alustan komponentit ovat dekontaminoitu, mutta ei steriloitu. (3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Plate – käyttöohjeet.)

Suositteluvia laimennosaineita YM-alustoja käytettäessä ovat fosfaattipuskuri, peptonivesi, peptonisuolaliuos, saliiniliuos, bisulfiititon leheen broth ja tislattu vesi. Sitraattia, bisulfiittia tai tiosulfaattia sisältäviä laimentimia ei tule käyttää. Alustojen inkubointiaika ja lämpötila riippuvat tutkittavasta näytteestä. Yleisesti lämpötila on alhaisempi ja inkubointiaika pidempi kuin bakteerialustoilla. (3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Plate – käyttöohjeet.)

Hiivat ja homeet muodostavat alustojen 30 cm²:n kokoiselle kasvualueelle monen muotoisia ja värisiä pesäkkeitä. Pääsääntöisesti hiivat muodostavat pieniä, selvärajaisia ja kolmiulotteisia pesäkkeitä, kun taas homeet muodostavat suuria, rajoiltaan epämääräisiä ja litteitä pesäkkeitä. Liian suuret hiivapesäkemäärät saattavat muuttaa koko kasvualueen siniseksi, samoin kuin elävien solujen sisältämä luonnon fosfataasi reagoidessaan indikaattorin kanssa. Tällöin näytettä tulee laimentaa lisää. (3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Plate – käyttöohjeet.)

6.2 Kokonaisbakteerien viljely

Muutaman koeviljelyn jälkeen käsittelemättömästä raakasiemenestä päädyttiin tekemään varsinaisia viljelyjä varten 10- ja 100-kertaiset laimennokset. Laimentamiseen käytettiin laboratoriossa Milliporen laitteella valmistettua ionivaihdettua vettä. Ioninvaihdon lisäksi laite käsittelee veden UV-valolla, joten oletuksena oli veden olevan steriiliä. Raakasiemen laimennettiin välittömästi sen saavuttua laboratorioon ja laimennetut näytteet viljeltiin kasvualustoille mahdollisimman nopeasti. Kontrollinäytteenä käytettiin laimentamiseenkin käytettyä vettä. Kasvualustojen inkubointilämpötilaksi valittiin 32 °C ja ajaksi kaksi vuorokautta. Liuskoja inkuboitui lämpökaapissa 20 kappaleen pinoissa (Kuva 5.).

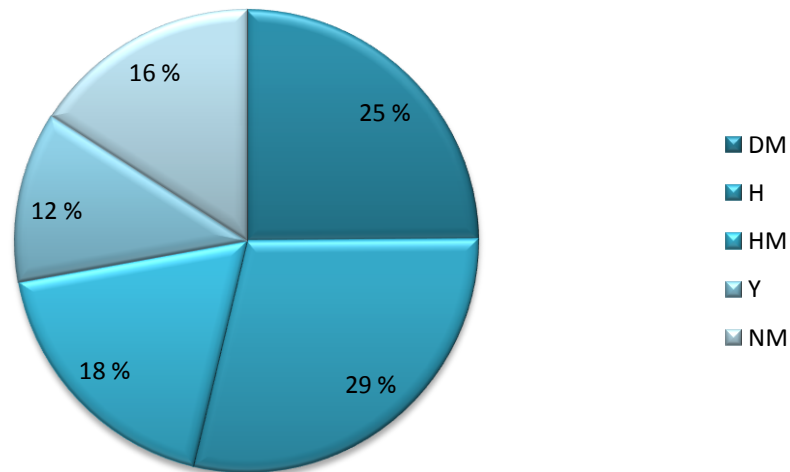


KUVA 5. Lämpökaappi, jossa kasvualustoja

Raakasiemenen ja veden lisäksi tutkittiin valmiita myyntisiemenannoksia. Myyntisiemenannokset on laimennettu antibioottia sisältävällä laimennosaineella, joten niitä ei tarvinnut erikseen laimentaa viljelyä varten. Myyntipakkauksista viljeltiin näytteet valmistuspäivänä, sekä samoista eristä uudelleen viiden päivän kuluttua. Annospussit säilytettiin siemennesteen säilytysohjeiden mukaisesti 17 °C viileäkaapissa.

Kesä- elokuun 2010 välisenä aikana kerättiin seitsemänä päivänä näytteet kaikista päivän hypyistä, yhteensä 201 näytettä. Kuviosta 1. on nähtävissä hypänneiden karjujen rodullinen jakautuminen. Merkittävä osa, 72 % tutkituista näytteistä edustaa

lihasikarotuja (DM, H ja HM), joiden siementä lähetetään suuria määriä ympäri Suomea. Viimeinen neljännes muodostui jalostusroduista Y ja NM. Näytteistä tehtiin laimennokset ja rinnakkaiset viljelyt kokonaisbakteerialustoille. Kahden päivän kuluttua alustoilta laskettiin pesäkkeet ja laskettiin keskiarvo laimentamattomalle näytteelle. Lisäksi viljeltiin satunnaisina päivinä myyntisiemenannoksista sekä tuoreet, että viiden päivän ikäiset näytteet.



KUVIO 1. Testattujen karjujen rotujen prosenttijakauma

Laboratorioveden puhtautta seurattiin käyttämällä sitä kontrollinäytteenä jokaisen viljelyn yhteydessä. Lisäksi tutkittiin veden laadun pysyvyyttä kertakäyttöisissä kannuissa, joita päivittäin käytetään veden säilömiseen. Vettä laskettiin seitsemään kannuun, joita säilytettiin koko tutkimuksen ajan käytössä olevassa lämpöhauteessa. Haude lämmitettiin päivittäin 39 °C:ksi. Jokaisesta kannusta viljeltiin näytteet päivittäin kuuden päivän ajan.

6.3 Hiivojen ja homeiden viljely

Tarkoituksena oli tutkia hiivoja ja homeita käsittelemättömästä raakasiemenestä sekä valmiista annospusseista samoin kuin kokonaisbakteereja. Koeviljelyä varten näytteistä tehtiin laimennossarja $10^1 - 10^6$. Käytetty inkubointilämpötila oli 24 °C ja inkubointiaika 5 vrk. Kokeessa ilmenneiden hankaluuksien ja ajanpuutteen vuoksi työtä ei kuitenkaan jatkettu tämän pidemmälle.

LÄHTEET

Althouse G. C. 2007a. Artificial Insemination in Swine: Boar Stud Management. Teoksessa Youngquist R. S. & Threlfall W. R. (toim.) Current Therapy in Large Animal Theriogenology. s. 731-737. 2. painos. Missouri: Saunders

Althouse G. C. 2007b. Infectious and Noninfectious Causes of Infertility in Boars. Teoksessa Youngquist R. S. & Threlfall W. R. (toim.) Current Therapy in Large Animal Theriogenology. s. 722-725. 2. painos. Missouri: Saunders

Althouse G. C., Kuster C. E., Clark S. G. & Weisiger R. M. 1999. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Theriogenology 53 (2000) 1167-1176

Althouse G. C. & Lu K. G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. Theriogenology 63 (2005) 573-584

Bielanski A. 2006. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. Theriogenology 68 (2007) 1-22

Eläintautien torjuntayhdistys ETT ry. 2011a. Bruselloosi eli luomistauti. Luettu 21.02.2011. http://www.ett.fi/tarttuvat_taudit/sikojen_tarttuvat_taudit/bruselloosi

Eläintautien torjuntayhdistys ETT ry. 2011b. Leptospiroosi. Luettu 21.02.2011. http://www.ett.fi/tarttuvat_taudit/sikojen_tarttuvat_taudit/leptospiroosi

Evira. 2010a. Aujeszkyntauti (AD, pseudorabies). Päivitetty 17.09.2010. Luettu 19.01.2011. http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/elaintaudit/usealle_elainlajille_yhteiset_taudit/aujeszkyn_tauti/

Evira. 2010b. Luominen. Päivitetty 21.10.2010. Luettu 19.01.2011. http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/elaintaudit/siat/luominen/

Evira. 2010c. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). Päivitetty 07.09.2010. Luettu 19.01.2011. http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/elaintaudit/siat/prrs-tauti/

Finnpig Oy. 2008. Siemenen laadun tutkiminen. Päivitetty 16.01.2008. Luettu 04.01.2011. http://www.finnpig.fi/docs/041-uqv-Siemenen_laadun_tutkiminen2008.pdf

Huovinen P., Meri S., Peltola H., Vaara M., Vaheri A. & Valtonen V. (toim.) 2005. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja II. Jyväskylä. Kustannus Oy Duodecim

Korkeala H. (toim.) 2007. Elintarvikehygieniä. 1. painos. Helsinki. WSOY Oppimateriaalit Oy

Maatilan Pellervo. 2001. Porsasyskä on pahin sikojen hengitystiesairaus Suomessa. Luettu 01.02.2011. http://www.pellervo.fi/maatila/8m_01/tepahin.htm

Maa- ja metsätalousministeriö. 1995. Maa- ja metsätalousministeriön eläinlääkintä- ja elintarvikeosaston päätös vastustettavista eläintaudeista ja eläintautien ilmoittamisesta 15.12.1995/1346

Maa- ja metsätalousministeriö. 2007. Maa- ja metsätalousministeriön asetus sikojen koeasemille, karjuasemille ja karjun spermalle asetettavista eläinten terveysvaatimuksista. 08.02.2007. 2/EEO/2007

Maes D., Nauwynck H., Rijsselaere T., Mateusen B., Vyt P., de Kruif A. & Van Soom A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology* 70 (2008) 1337-1345

Prescott L. M., Harley J. P. & Klein D. A. 2002. *Microbiology*. 5. painos.

Reicks D.L. & Levis D.G. 2008. Fertility of semen used in commercial production and the impact of sperm numbers and bacterial counts. *Theriogenology* 70 (2008) 1377-1379

Thibier M. & Guerin B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62 (2000) 233-251

Torremorrell M. 2007a. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and Fungal Causes of Infertility and Abortion in Swine. Teoksessa Youngquist R. S. & Threlfall W. R. (toim.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. s. 794-800. 2. painos. Missouri: Saunders

Torremorrell M. 2007b. Viral Causes of Infertility and Abortion in Swine. Teoksessa Youngquist R. S. & Threlfall W. R. (toim.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. s. 801-807. 2. painos. Missouri: Saunders

Tubbs R. C. 2007. Noninfectious Causes of Infertility and Abortion. Teoksessa Youngquist R. S. & Threlfall W. R. (toim.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. s. 808-811. 2. painos. Missouri: Saunders

Tuominen R. K. & Männistö P. T. 2011. Proteiinisynteesiä estävät mikrobilääkkeet. Teoksessa Koulu & Tuomisto (Toim.) *Farmakologia ja toksikologia*. 6. painos. Luettu 26.01.2011. <http://www.medicina.fi/fato/52.pdf>

3M™ Petrifilm™. 2010a. Aerobic Count Plate - käyttöohjeet

3M™ Petrifilm™. 2010b. Yeast and Mold Plate - käyttöohjeet