

**Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttama utaretulehdus:
tartunnan kesto, bakteerilajien väliset erot ja vaikutus maidon
somaattisten solujen pitoisuuteen**



Syventävien opintojen tutkielma

Tiina Juselius

Helsingin Yliopisto 2008

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos

Sisällysluettelo	sivu
1. Johdanto	3
2. Aineisto ja menetelmät	5
2.1 Näytteenotto	5
2.2 Näytteiden käsittely	5
2.3 Bakteeridiagnostiikka	6
2.4 Tulosten käsittely	7
3. Tutkimustulokset	7
3.1 Lajit	8
3.2 Somaattiset solut	8
4. Pohdinta	8
4.1 Persistointi	9
4.2 Lajit	11
4.3 Somaattisten solujen pitoisuus	12
4.4 Prevalenssi	14
5. Johtopäätökset	16
6. Kiitokset	16
7. Lähdeluettelo	17
8. Taulukko	22

1. Johdanto

Koagulaasinegatiiviset stafylokokit (KNS) ovat maailmanlaajuisesti hyvin merkittäviä utaretulehduksen aiheuttajia. Tavallisesti niitä esiintyy normaalikasvustona eläinten ja ihmisten iholla sekä lehmän ympäristössä, kuten kuivikkeissa (Matos ym. 1991). Muun muassa hiehojen sieraimet, karvapeite, vagina ja iho olivat hyvin kolonisoituneita KNS-bakteereilla Whiten ym. (1989) tutkimuksessa. KNS-bakteereja on vuosia pidetty suhteellisen harmittomina, itsestään häviävinä utaretulehdusbakteereina, jotka aiheuttavat vain lievää infektiota ja harvoin vakavia kliinisiä oireita: Taponen ym. (2006) tutkimuksessa 72 %:ssa kliinisistä tapauksista oireena olivat vain muutokset maidon koostumuksessa ja kuume oli harvinaista. Jarp (1991) sen sijaan havaitsi akuutin tulehduksen oireita noin puolessa kliinisistä tapauksista, mutta samassa tutkimuksessa ei havaittu eroa eri KNS-lajien aiheuttamien oireiden vakavuudessa.

KNS-bakteerien aiheuttaman tulehduksen hoitoon antibiooteilla on suhtauduttu varauksella, ja subkliiniset ja lievät KNS-tulehdukset on Pohjoismaissa pääasiassa jätetty ilman antimikrobihoitoa (Taponen ym. 2006). Antibioottihoidon on kuitenkin todettu tehoavan pääsääntöisesti hyvin KNS-bakteereihin lyhyillä hoitokuureilla (Wilson ym. 1999, Deluyker ym. 2005).

KNS-bakteerien säilymisestä pitkään utareessa lypsykaudella on saatu tuloksia jo parikymmentä vuotta sitten (Timms ja Schultz, 1986), ja kyseisessä tutkimuksessa KNS-infektio pysyi pitkään utarekudoksessa lypsykaudella 85 %:ssa neljänneksistä. Myös eri KNS-lajien välillä voi olla eroa pysyvyydessä (Aarestrup ja Jensen 1997, Taponen ym. 2006). Tällainen pitkään pysyvä, persistoiva KNS-tulehdus nostaa maidon somaattisten solujen pitoisuutta 2-3 kertaiseksi terveeseen utarekudokseen nähden ja aiheuttaa näin tuottajalle taloudellisia tappioita (Harmon ym. 1989). Tulehdus myös alentaa pitkällä tähtäimellä maidon tuotosta, sillä jo hiehoilla utarekudoksen erittävä aktiviteetti vähentyy bakteeritulehduksen vahingoittaessa kudosta (Trinidad ym. 1990, Shearer ja Harmon, 1993). Tuotoksen lasku voi olla niin merkittävää, että se alentaa tuottajan taloudellista tulosta (Timms ja Schultz, 1986). Vaikka KNS-bakteerit vaikuttavat solupitoisuuteen,

niiden aiheuttama nousu solupitoisuudessa ei tavallisesti ole yhtä suurta kuin pääpatogeenien (*S. aureus*, *E. coli*) aiheuttama (Timms ja Schultz 1986, Harmon, 1994, Djabri 2002, de Haas ym. 2002). Poikkeuksena tähän, Chaffer ym. 1999 eivät havainneet eroa solupitoisuuksissa KNS-bakteerien ja *S. aureuksen* aiheuttaman utaretulehduksen välillä, eivätkä myöskään eri KNS-bakteerien aiheuttaman solupitoisuuden nousun välillä.

KNS-bakteerien osuus piilevän utaretulehduksen aiheuttajista Suomessa vuonna 2001 oli 49,6 %, mikä on hieman vähemmän kuin vuonna 1995, jolloin niiden osuus oli 53,5 % (Pitkälä ym. 2004). Norjassa vuonna 2000 tehdyssä maan laajuisessa prevalenssitutkimuksessa 3,3 % lypsylehmiä neljänneksistä oli KNS-positiivisia (Østerås ym. 2006), ja Saksassa 9,1 % piilevistä tulehduksista oli KNS-bakteerien aiheuttamia (Tenhagen ym. 2006). Foxin ym. (1995) neljässä osavaltiossa eri puolilla USA:a tehdyssä tutkimuksessa eristettiin ennen poikimista KNS 27,1 %:sta hiehojen neljänneksiä, ja koko Japanissa 54,3 % hiehojen neljänneksistä oli KNS-infektoituneita (Nagahata ym. 2006). Waage ym. 1999 havaitsivat KNS-bakteerien aiheuttavan Norjassa 12,8 % hiehojen kliinisistä utaretulehduksista.

KNS-bakteerien esiintyvyyden on todettu olevan yleisintä hiehoilla (Honkanen-Buzalski ym. 1994, Fox ym. 1995, de Haas ym. 2002, Tenhagen ym. 2006), ja Matthews ym. (1992) havaitsivat niiden osuuden pysyvän lähes kaksinkertaisena poikimisen jälkeen ensikoilla lehmiin verrattuna.

Yleisimmät löydetyt lajit tutkimuksissa ovat olleet *S. chromogenes*, jota esiintyi erityisesti ennen poikimista, ja muulloin lypsykaudella *S. simulans* ja *S. epidermidis* (Aarestrup ja Jensen 1997, Taponen ym. 2006). Muita yleisesti löydettyjä KNS-lajeja ovat mm. *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ja *S. hominis* (Matthews ym. 1992, Waage ym. 1998, Chaffer ym. 1999).

Tutkimuksemme tarkoitus oli selvittää, jäävätkö poikima-aikaan havaitut KNS-infektiot utareeseen lypsykauden edetessä ja nostavatko ne maidon somaattisten solujen pitoisuutta merkittävästi verrattuna terveisiin neljänneksiin, sekä mitkä KNS-lajit erityisesti pysyvät

utareessa (Taponen ym. 2007). Tutkimus tehtiin Helsingin Yliopiston Viikin koetilan karjassa vuosina 2003-2004.

2. Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksen kohteena oli Helsingin yliopiston Viikin koetilan karja. Tutkimus tehtiin syyskuun 2003 ja toukokuun 2004 välisenä aikana. Lehmät olivat pääosin Ayrshire -rotuisia, ja joukossa oli muutama Holstein-Friisiläinen ja länsisuomenkarjan lehmä. Lehmät olivat parsinavetassa, jossa käytettiin kuivikkeena kutterinpurua ja olkea. Kesällä lehmät olivat laitumella. Tutkimusaikana poiki 82 eläintä (30 hiehoa, 52 lehmää), ja niiden utareterveyttä seurattiin yhden lypsykauden ajan. Kaikista toimivista neljänneksistä otettiin maitonäytteet noin kaksi viikkoa ennen odotettua poikimispäivää (umpinäyte), poikimispäivänä, ja sen jälkeen neljän viikon välein umpeutukseen saakka tai kunnes lehmä poistettiin karjasta. Näytteenotto tapahtui iltapäivällä 1-3 tuntia ennen lypsyä.

2.1 Näytteenotto

Ennen näytteenottoa utare pestiin lehmäkohtaisella lypsyliinalla, ja neljänneksen pää puhdistettiin huolellisesti Klorhexol–desinfiointiaineeseen (Chlorhexidin 5 mg/ml) kastetulla pumpulilla. Ensimmäiset suihkaukset lypsettiin pois ja seuraavista otettiin aseptisesti näyte 10 ml:n muoviputkeen, johon oli merkitty lehmän ja neljänneksen tunnistetiedot. Lisäksi otettiin näyte maidon solupitoisuuden määrittämistä varten siihen varattuun näytepurkkiin. Lopuksi neljännekset suihkutettiin vedinkastolla.

2.2 Näytteiden käsittely

Solunäytteet säilytettiin jääkaapissa ennen lähettämistä maitoauton mukana Valion laboratorioon (Seinäjoki tai Lapinlahti) tutkittavaksi. Siellä solupitoisuus mitattiin Fossomatic -laitteella (Foss Electric, Hillerød, Tanska). Bakteerinäytteet säilytettiin jääkaapissa seuraavaan aamuun, jolloin ne viljeltiin kotieläinhygienian laboratoriossa

verimaljalle 10µl:n kertakäyttöisellä muovisella viljelysilmukalla. Jokainen malja jaettiin neljään osaan, eli yhden lehmän näytteet viljeltiin samalle maljalle. Maljoja inkuboitii +37 °C:ssa seuraavaan päivään (noin 20 tuntia), jolloin tarkastettiin bakteerikasvut. Bakteerikasvuksi määriteltiin vähintään viisi samanlaista bakteeripesäkettä. Jos näytteessä kasvoi enemmän kuin kahta erinäköistä bakteeripesäkettä, katsottiin näyte sekakasvuksi. Jos kasvua ei ollut tai se oli hyvin heikkoa, jatkettiin inkuboimista vielä yksi vuorokausi.

2.3 Bakteeridiagnostiikka

Bakteeridiagnostiikassa käytettiin perinteisiä, fenotyypisiä menetelmiä (Honkanen-Buzalski ja Seuna, 1995). Streptokokit ja stafylokokit erotettiin katalaasitestin avulla toisistaan. Stafylokokeille tehtiin agglutinaatiotesti (Slidex Staph-Plus, bioMérieux, Ranska), jonka avulla *S. aureus* erotettiin muista stafylokokeista, joiden oletettiin olevan koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja. Varsinaista koagulaasitestiä kanin plasmalla ei tehty. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit tyypitettiin lajitasolle API staph ID 32-testin (bioMérieux, Ranska) avulla, minkä jälkeen bakteeri-isolaatit pakastettiin odottamaan jatkotutkimuksia. Myöhemmin isolaatit genotyyppitettiin Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) -analyysin avulla. DNA:n eristäminen sekä näytteiden digestio ja ligaatio tehtiin kotieläinhygienian laboratoriossa ja varsinainen AFLP-ajo elintarvike- ja ympäristöhygienian laitoksen laboratoriossa. AFLP-profiilien analysointi tehtiin BioNumerics 4.5 -ohjelmalla (Applied Maths, Kortrijk, Belgia). AFLP profiilien samankaltaisuuden laskemisessa käytettiin Pearsonin korrelaatiota ja dendrogrammien luomisessa UPGMA (unweighted pair group method by using average linkages) -ryhmittymistä. Isolaattien AFLP -profiileja verrattiin 49 stafylokokkityypikannan AFLP profiiliin.

2.4 Tulosten käsittely

Tulokset kerättiin Excel-taulukkoon kuukausittain lehmä- ja neljänneskohtaisesti. KNS-infektio määritettiin persistoivaksi, jos sama KNS-kanta eristettiin neljänneksestä

vähintään kolme kertaa peräkkäin tai lyhyellä aikavälillä. Jos KNS-kanta eristettiin kerran tai kaksi kertaa, katsottiin infektio ohimeneväksi. Jos neljänneksestä eristettiin KNS umpinäytteestä ja/tai poikimanäytteestä, mutta ei lypsykaudella, se katsottiin poikimisajan infektioksi. Myös muut kuin KNS-bakteeritartunnat merkittiin taulukkoon, mutta niitä ei huomioitu tutkimustuloksissa.

Somaattisten solujen pitoisuudet merkittiin taulukkoon myös kuukausittain, ja niistä laskettiin jokaiselle eläimelle ja neljännekselle lypsykauden geometrinen keskiarvo. KNS-infektioiden aikaiset solupitoisuuksien keskiarvot laskettiin erikseen jokaiselle infektoituneelle neljännekselle.

3. Tutkimustulokset

Kuukausittain tutkittiin 82 lehmän neljännekset, ja yhteensä näytteitä oli 328 neljänneksestä. KNS-bakteeri todettiin lypsykaudella yhteensä 19,2 %:ssa kaikista neljänneksistä (63/328). Ensimmäisen lypsykauden neljänneksistä 25,0 %:ssa (30/120) ja myöhempien lypsykausien neljänneksistä 15,9 %:ssa (33/208) todettiin KNS-infektio. Lypsykauden 63 KNS-infektiosta 29 (16 ensikoilla ja 13 lehmillä) persistoi ja 34 oli ohimeneviä (Talukko 1).

Tartunnat aiheuttivat subkliinisen tai hyvin lievän kliinisen utaretulehduksen. Heti lypsykauden alussa todettiin 32 KNS-infektiota ja myöhemmin lypsykaudella 33. Ensimmäisen lypsykauden neljänneksistä 74,0 % oli heti lypsykauden alussa infektoituneita, mutta myöhempien lypsykausien neljänneksistä vain 20,0 %. Umpi- ja tai poikimanäytteestä todettiin 57 neljänneksessä (17,4 %) KNS-kasvua. Näistä neljänneksistä 28:ssa sama KNS-kanta todettiin myös lypsykaudella, ja muista KNS-infektio hävisi lypsykauden alkaessa.

3.1 Lajit

API Staph ID 32 –testin mukaan yleisimmät KNS-lajit olivat *S. chromogenes* ja *S. simulans* (taulukko 1). API-testi ei kyennyt tunnistamaan 28,6 % kannoista (lajitunnistuksen todennäköisyys on 90 %). Umpi- ja poikimahetken näytteissä yleisin laji oli *S. chromogenes*. AFLP-profiiliryhmien katsottiin edustavan tiettyä KNS-lajia, jos ryhmä sisälsi tietyn lajin tyyppikannan. Suurin AFLP-ryhmä sisälsi *S. chromogenes* – tyyppikannan. Muut suurimmat AFLP-ryhmät sisälsivät *S. haemolyticus*, *S. simulans* ja *S. epidermidis* -tyyppikannat (taulukko 1). Samoja AFLP-profiileja oli sekä persistoivista että ohimenevistä infektiosta eristetyillä KNS-kannoilla. Umpi- ja poikimahetken isolaateista suurin osa ryhmittyi *S. chromogenes* ja *S. simulans* -tyyppikantojen kanssa.

3.2 Somaattiset solut

Somaattisten solujen lukumäärät mitattiin joka kuukausi bakteriologisen tutkimuksen yhteydessä. Terveiden neljännesten keskimääräinen solupitoisuus oli koko lypsykaudella 65 000 solua/ml ja mediaani oli 34 300 solua/ml. Pitkäkestoiset KNS-infektiot nostivat keskimääräistä solupitoisuutta sairassa neljänneksissä 317 500 soluun/ml koko laktaatiokauden aikana (mediaani 202 800 solua/ml). Pitkäkestoisen KNS-infektion aikana solupitoisuudet olivat vielä korkeammat: keskimäärin 657 600 solua/ml ja mediaani 355 400 solua/ml. Ohimenevän infektion aikana solupitoisuus oli keskimäärin 619 100 solua/ml ja mediaani oli 133 500 solua/ml. Koko lypsykauden aikana neljänneksissä, joissa oli ollut ohimenevä infektio, keskimääräinen solupitoisuus oli 292 200 solua/ml ja mediaani 50 400 solua/ml. Neljänneksissä, joissa todettiin KNS-infektio vain poikimahetkellä tai sitä ennen, oli solupitoisuuden keskiarvo lypsykaudella 72 700 solua/ml (mediaani 41 800 solua/ml).

4. Pohdinta

Tutkimuksemme tarkoitus oli Viikin koetilan karjan utareterveyden kuukausittaisella seurannalla selvittää, pysyvätkö KNS-infektiot utareessa pitkään lypsykaudella, ja kuinka paljon pitkäkestoinen KNS-infektio nostaa maidon somaattisten solujen pitoisuutta. Selvitettiin myös, onko infektion kestossa eroa eri KNS-lajien välillä.

4.1 Persistointi

Mielenkiinnon kohteena on KNS-infektion pitkäkestoisuus utareessa. Jos saataisiin selville, millä lajeilla on taipumus persistoida utareessa kauan ja kuinka kauan infektio säilyy, helpottaisi se hoitomuodon valintaa: olisi helpompi valita, milloin antibioottihoito on indikoitua ja milloin se on turhaa.

Tutkimuksessa havaittiin, että lypsykauden KNS-infektioista puolet persistoi. Ensimmäisen kerran poikineiden hiehojen neljänneksistä 38 %:ssa ja useamman kerran poikineiden lehmien neljänneksistä 6 %:ssa oli KNS tartunta ennen poikimista ja/tai poikimahetkellä. Tämänlainen tulos oli odotettavaa, sillä useiden aiempien tutkimusten mukaan hiehoilla KNS-infektio on hyvin yleinen poikiessa, ja niillä sitä tavataan tässä vaiheessa enemmän kuin lehmillä (Matthews ym. 1992). Lypsykaudella ensikoiden neljänneksistä 25 %:ssa ja vanhempien lehmien neljänneksistä 16 %:ssa todettiin KNS-infektio. Ensikoilla KNS-prevalenssi on lypsykaudella ollut noin 20 %:n luokkaa (Pankey ym. 1991, Matthews ym. 1992, Fox ym. 1995, Waage ym. 1999). Ensikoilla oli tutkimuksessamme pitkäkestoisia infektioita selvästi enemmän kuin lehmillä, kuten myös Matthews ym. (1992) totesivat. Deluyker ym. (2005) mukaan hiehojen subkliiniset KNS-infektiot kuitenkin paranivat kokonaan useammin kuin lehmillä, sekä antibioottihoidolla (pirlimysiini) että ilman hoitoa.

Suurin osa lypsykauden KNS-infektioista ilmaantuu kahden viikon sisällä poikimisen jälkeen, ja yli puolet tulehduksista on havaittu poikimisen jälkeisen kuukauden aikana (de Haas ym. 2002, Taponen ym. 2006). Noin puolet tutkimuksemme KNS-infektioista pysyi utareessa lypsykaudella joko suoraan poikimisesta lähtien, tai infektion ilmaannuttua myöhemmin, vaikka neljännes oli terve poikiessa. Joskus saman eläimen yhdessä neljänneksessä persistoinut KNS-bakteeri ilmaantui myöhemmin toiseen neljännekseen, jolloin bakteeri on todennäköisesti tarttunut neljänneksestä toiseen. Myös Taponen ym. (2006) havaitsivat, että puolella ensikoista ja 16 %:lla lehmistä oli KNS-infektio useammassa kuin yhdessä neljänneksessä. Tarttuminen neljänneksestä toiseen ja

lehmästä toiseen tapahtuu pääasiassa lypsyn aikana. Lypsyhygieenisistä puutteista johtuen kontaminoitunut maito pääsee infektoimaan muita neljänneksiä. On myös mahdollista, että ihon normaalimikrobistoon kuuluva bakteeri kolonisoituu neljänneksiin. KNS-bakteerit ovat tavallisia ihon mikrobeja: White ym. (1989) havaitsivat poikimattomilla hiehoilla mm. vetimen iholla ja vedinkanavassa pesivän lukuisia KNS-lajeja. *S. chromogenes* oli vedinkanavan yleisin löydös ja *S. xylosum* ja *S. warneri* tavallisimmat vetimen iholla. KNS-bakteereja on myös löydetty eläinten ympäristöstä kuten kuivikkeista, erityisesti *S. sciuria* ja *S. xylosum* (Matos ym. 1991).

Tutkimuksessamme sama KNS-kanta eristettiin utarekudoksessa kolmesta kahteentoista näytteenottokertaa, ja useimmissa tapauksista bakteeri persistoi neljänneksessä koko lypsykauden loppuun saakka. Vain harvoissa muissa tutkimuksissa näytteitä on otettu kuukausittain koko lypsykauden ajan kuten meillä, vaan niitä on yleensä otettu ennen poikimista ja muutamia kertoja jälkeen poikimisen. Timms ja Schultz (1986) seurasivat kahden karjan bakteeristatusta jokaisen lehmän lypsykauden ajan. Heidän tutkimuksessaan KNS-bakteerit hävisivät spontaanisti vain 15 %:ssa tapauksista. Aarestrup ja Jensen (1997) tutkivat samoja lehmiä kolme kuukautta ja havaitsivat eroa eri KNS-lajien spontaanissa katoamisessa: heillä *S. epidermidis* hävisi nopeasti, mutta *S. simulans* persistoi viikkoja. Lyhyemmällä seuranta-ajoilla tehdyissä tutkimuksissa KNS-infektioiden spontaanissa parantumisessa on ollut paljon vaihtelua. Bormin ym. (2006) tutkimuksessa hiehojen KNS-infektioista parani ilman hoitoa 31,7 %, ja Wilsonin ym. (1999) tutkimuksessa subkliinisen KNS-infektion omaavista lehmistä hoidotta jääneessä kontrolliryhmässä 72 % parani spontaanisti. Chafferin ym. (1999) tekemässä ensikoiden prevalenssitutkimuksessa taas 84,5 % neljänneksistä pysyi infektoituneena koko ensimmäisen lypsykauden ajan. Green ym. (2005) tutkivat bakteerien esiintyvyyttä umpikaudella. Umpeenlaitettaessa KNS-bakteerien osuus oli 6,3%, mutta nousi viikkoa ennen poikimista 13,9 %:iin. Osuus putosi taas poikimisessa niin, että se viikko poikimisen jälkeen oli 4,8 %.

4.2 Lajit

S. chromogenes aiheutti tutkimuksessamme usein pitkäkestoisen infektion. Myös Matthews ym. (1992) sekä Laevens ym. (1997) havaitsivat, että *S. chromogenes* aiheutti pitkäkestoisen infektion. Sitä esiintyi paljon hiehoilla ennen poikimista, ja se on yleinen ensimmäisen laktaatiokauden patogeeni (Taponen ym. 2006). Aarestrupin ja Jensenin (1997) hiehoilla tekemässä tutkimuksessa *S. chromogenes* oli yleisin KNS koko tutkimuksen ajan, mutta sen osuus putosi huomattavasti heti poikimisen jälkeen. Myös Laevens ym. (1997) totesivat *S. chromogeneksen* olevan yleisin KNS-bakteeri ensimmäisen kerran poikineilla.

S. simulans oli pitkäkestoista infektiota aiheuttavista KNS-bakteereista toiseksi yleisin, ja Taposen ym. 2006 tutkimuksessa se oli kaikkein yleisin. *S. simulansin* on aiemminkin todettu pysyvän utareessa useita viikkoja poikimisen jälkeen (Matthews ym. 1992, Aarestrup ja Jensen 1997, Aarestrup ym. 1999), ja se on ollut yleinen patogeeni etenkin myöhemmillä laktaatiokausilla (Taponen ym. 2006).

Muita poikimisen jälkeen utareessa pysyviä bakteereita todettiin tutkimuksessamme olevan mm. *S. haemolyticus* ja *S. warneri*. Tutkimuksessamme löytyi myös pitkäkestoinen *S. epidermidis*. Toisessa tutkimuksessa (Aarestrup ja Jensen 1997) *S. epidermidis* -infektion havaittiin hävinneen spontaanisti melko pian poikimisen jälkeen. Myös *S. intermedius* ja *S. haemolyticus* -bakteerien on todettu pysyvän utareessa pitkään (Chaffer ym. 1999). Samassa tutkimuksessa nämä yhdessä *S. chromogeneksen* kanssa olivat tavatuimmat KNS-bakteerit poikimisaikaan.

Waagen ym. (1999) tutkimuksessa yleisimmät KNS-bakteerit hiehoilla poikima-ajan kliinisissä utaretulehduksessa olivat *S. simulans*, *S. hyicus* ja *S. chromogenes*. Matthews ym. (1992) havaitsivat ensikoilla yleisimpien bakteerien olevan *S. chromogenes*, *S. simulans* ja *S. hominis*, ja lehmillä *S. chromogenes*, *S. hominis* ja *S. epidermidis*.

Pitkäkestoisuudessa ei tutkimuksessamme havaittu merkitseviä eroja KNS-lajien kesken, eli samat lajit joita esiintyi muutenkin yleisesti, myös pysyivät utareessa useimmin pitkään, kuten totesivat myös Matthews ym. (1992). Myös samoja genotyyppisiä (AFLP-

profiileja) oli sekä pitkäkestoisissa että ohimenevissä infektioidessa, mikä viittaa siihen, että lehmästä johtuvat tekijät, kuten lehmän luonnollinen vastustuskyky ja utareen bakteerien virulenssitekijöitä vastustavat ominaisuudet saattavat olla tärkeämpiä syitä KNS-infektion pysyvyydessä kuin bakteerin ominaisuudet.

4.3 Somaattisten solujen pitoisuus

Somaattisten solujen pitoisuus nousee vasteena utaretulehdukseen, ja sen seuranta onkin hyvä keino kartoittaa utaretulehduksen olemassaoloa: normaalista kohonnutta somaattisten solujen pitoisuutta voidaan pitää utaretulehduksen merkinä (Schukken ym. 2003). Somaattiset solut ovat pääasiassa valkosoluja: makrofageja ja polymorfonuklearisoluja, sekä osittain myös utarekudoksen epiteelisoluja (Pillai ym. 2001).

KNS-infektio nostaa maidon somaattisten solujen pitoisuutta (solupitoisuus) (Timms ja Scultz 1986, Chaffer ym. 1999, Djabri ym. 2002). Vähäisempien patogeenien, kuten KNS-bakteerien aiheuttamassa tulehduksessa solupitoisuus on tyypillisesti 110 000-150 000 solua/ml (Djabri ym. 2002). Chafferin ym. (1999) tutkimuksessa KNS-infektio vaikutti eri solujen suhteisiin niin, että se nosti polymorfonuklearisolujen pitoisuutta, mutta laski kokonaislymfosyyttien määrää.

Eri patogeenit voivat aiheuttaa eriasteisen somaattisten solujen pitoisuuden nousun. Schukken ym. (2003) havaitsivat, että KNS-infektio nostaa solupitoisuutta vähemmän kuin *S. aureus*, ja myös Trinidad ym. (1990) totesivat *S. aureuksen* infektoimilla hiehoilla suuremmat solupitoisuudet kuin muiden stafylokokkien ollessa kyseessä. Djabrin ym. (2002) meta-analyysissä pääpatogeenit (esim. *S. aureus*) nostivat solupitoisuuden keskimäärin yli 350 000 soluun/ml. Myös Nickerson ym. (1995) totesivat solupitoisuuden olleen hiehoilla korkeampi *S. aureus* kuin *S. chromogenes* tai *S. hyicus* -infektiossa. Poikkeuksen muihin muodostaa Chafferin ym. (1999) tutkimus, jonka mukaan eroa *S. aureuksen* ja KNS-bakteerien tai eri KNS-bakteerien välillä solunostokyvyssä ei havaittu.

Meidän tutkimuksessamme poikimisen aikainen tai ennen poikimista ollut infektiosta nostettiin solupitoisuutta vain väliaikaisesti, ja solujen määrä putosi lähes ennalleen infektion hävittyä. Tämä on elimistön normaali vaste utaretulehdukseen: bakteerit havaittuaan elimistö kutsuu valkosoluja neljännekseen ja kun ne ovat tappaneet bakteerit, ne häipyvät ja solupitoisuus laskee ennalleen (Schukken ym. 2003). Tällöin koko lypsykauden keskiarvo pysyi normaalilukemissa. Ohimenevä KNS-infektio aiheutti keskimääräisen solupitoisuuden nousun, sillä infektion aikainen solupitoisuus oli tarpeeksi korkea nostamaan keskiarvoa. Persistoiva infektiosta nostettiin solujen lypsykauden keskiarvoa reilusti, sillä infektion pitkän keston aikana solupitoisuudet pysyivät kauan korkealla. Kun elimistö ei kykene eliminoimaan bakteeria, seuraa krooninen infektiosta ja korkeat solupitoisuudet (Schukken ym. 2003).

Lehmän solupitoisuus nousee enemmän, jos infektoiva KNS-laji on *S. chromogenes* tai kun useampi kuin yksi neljännes on infektoitunut verrattuna muiden KNS-bakteerien aiheuttamiin infektiioihin tai vain yhdessä neljänneksessä olevaan infektiioon (Laevens ym. 1997). DeVliegher ym. (2003) totesivat, että hiehoilla ennen poikimista havaittu vetimen päässä oleva *S. chromogenes* auttaa pitämään somaattisten solujen pitoisuuden alle 200 000 solua/ml lypsykauden ensimmäisinä päivinä. Tämä on mahdollista, koska bakteerikolonisaatio on jo nostanut solupitoisuutta valmiiksi niin, että elimistö on jo puolustuskannalla patogeenin hyökätessä.

Infektoitumattoman neljänneksen solupitoisuus on alle 70 000 solua/ml (Djabri ym. 2002). On määritelty, että terveen lehmän koko utareen solupitoisuus on alle 200 000 solua/ml, mutta neljänneskohtaisesti terveeksi lasketaan neljännes, jonka solupitoisuus jää alle 100 000 solua/ml (Saloniemi, 1995). Soluluku kuitenkin vaihtelee lehmäkohtaisesti ja muuttuu lehmän eliniän ja lypsykauden vaiheen mukaan jälkimmäisen vaikuttaessa pitoisuuteen enemmän kuin poikimiskerrat (Schepers ym. 1997). Fysiologisesti solupitoisuus on korkea heti poikimisen jälkeen, mutta laskee nopeasti normaaliin ensimmäisen maidontuotantoviikon aikana. Pienimmillään se on noin 50. lypsypäivän aikaan maidontuotantohuipun kohdalla ja nousee hieman taas kohti

lypsykauden loppua (de Haas ym. 2002). Suomessa solupitoisuudet ovat kesäkuukausina (kesä-elokuussa) korkeammat kuin muina vuodenaikoina. Tämän syynä voi olla esim. maidontuotoksen lasku lämpimällä säällä (Maitohygienialiitto: http://www.maitohygienialiitto.fi/somaatt_lakisaateiset_03.html).

Koko Suomessa karjojen tankkimaidon somaattisten solujen keskimääräinen geometrinen pitoisuus oli vuonna 2006 130 000 solua/ml. Tämä oli pohjoismaiden toiseksi alhaisin luku, ja vain Norjassa oli alemmat solupitoisuudet kuin Suomessa (Maitohygienialiitto: http://www.maitohygienialiitto.fi/Pohjoism_solumaara_03.html).

Meijerin laatuvaatimusten mukaan parhaaseen E-luokkaan hyväksytään tankkimaito, jonka somaattisten solujen geometrinen kolmen kuukauden keskiarvo on alle 250 000 solua/ml. I-luokan vaatimus on 250 000-400 000 solua/ml, ja tämän yli menevä solupitoisuus pudottaa maidon II luokkaan (Maitohygienialiitto: http://www.maitohygienialiitto.fi/laatu_jak_luokkiin_03.html).

Oliverin ym. (2003) mukaan ennen poikimista annettu antibioottihoito alensi lypsykauden solupitoisuutta hiehoilla. Borm ym. (2006) kuitenkin havaitsivat, että vaikka hiehoilla ennen poikimista olleet utaretulehdukset paranivatkin paremmin hoidolla (59,5 %) kuin ilman hoitoa (31,7 %), antibioottihoidolla ei ollut merkitsevää vaikutusta tulevan lypsykauden tuotokseen tai maidon solupitoisuuteen ensimmäisen 200:n lypsypäivän aikana. Suomen antibioottipolitiikka ei salli turhien hoitojen käyttämistä ilman näyttöä infektiosta. Ennen umpeenlaittoa umpeenpanovalmisteella hoitoa suositellaan, jos lypsykaudella on ollut tai on edelleen subkliininen infektio, ja myös subkliiniset KNS-tulehdukset suositellaan hoidettavaksi (Pyörälä ym. 2004).

4.4 Prevalenssi

KNS-bakteerien on myös aikaisemmissa tutkimuksissa todettu olevan yleisimmin eristettyjä bakteereja kliinisesti oireettomien nautojen utareista (Matthews ym. 1992, Nagahata ym. 2006, Tenhagen ym. 2006), ja hiehoilla poikiessa 11,4 % neljänneksistä oli subkliinisesti KNS-infektoituneita (Pankey ym. 1990). Suomalaisissa

kartoitustutkimuksissa KNS-prevalenssi on noussut 1980-luvulta lähtien 1990-luvulle saakka. Prevalenssi laski taas hiukan 2000-luvun tutkimuksessa, mutta siinä KNS-bakteerit kuitenkin olivat edelleen yleisin eristetty bakteeriryhmä (Pitkälä ym. 2004). Norjalaisessa kartoitustutkimuksessa vain 3,3 %:ssa neljänneksiä löytyi KNS, mikä on yllättävän vähän Suomeen (49,6 %) verrattuna. Norjassa positiiviseksi kasvuksi lasketaan vähintään 40 pesäkettä muodostavaa yksikköä (Østerås ym. 2006), kun Suomessa positiiviseksi katsotaan jo viiden pesäkkeen maljat, mikä selittää Norjan alhaisen KNS-prevalenssin.

KNS voi infektoida myös samalla lehmällä useampia neljänneksiä; puolella ensikoista ja 16 %:lla usean kerran poikineista oli useampi kuin yksi neljännes infektioitunut (Taponen ym. 2006). Kliinisiä oireita kuten kuume, syömättömyys, utareen lämpö, turvotus, arkuus tai silmin havaittavat muutokset maidossa KNS-infektiot eivät tutkimuseläimillemme aiheuttaneet, eli yksikään tutkittavista lehmistä ei tarvinnut tutkimusaikana KNS-utareetulehduksen vuoksi lääkitystä. Taposen ym. (2006) tutkimuksessa lieviä kliinisiä oireita, lähinnä vähäisiä maitomuutoksia, havaittiin puolessa tapauksista. Kuume oli harvinaista ja todettiin vain seitsemällä 95 lehmästä. 72 %:ssa kliinisistä tapauksista ainoa oire oli maidon ulkonäön muutokset.

KNS-bakteerit aiheuttavat kuitenkin myös kliinistä utaretulehdusta. Saaren alueen kliinisistä utaretulehduksista vuosina 2002-2003 15,6 % oli KNS-bakteerien aiheuttamia (Nevala ym. 2004). Hiehoilla ennen poikimista olevista kliinisistä tulehduksista jopa 74,8 % oli KNS-bakteerien aiheuttamia (Borm. ym. 2006), ja Trinidadin ym. (1990) tutkimuksessa poikimattomilla hiehoilla olevista kliinisistä tulehduksista 35 % oli *S. chromogeneksen* ja 17 % *S. hyicuksen* aiheuttamia. Waage ym. (1999) havaitsivat *S. hyicuksen* aiheuttavan useammin yleisoireisen kliinisen tulehduksen kuin tulehduksen ilman yleisoireita. Samassa tutkimuksessa todettiin KNS-bakteerien aiheuttavan 12,8 % hiehojen kliinisistä utaretulehduksista lypsykaudella. Jarpin ym. (1991) tutkimuksessa samat KNS-lajit aiheuttivat sekä kliiniset että subkliiniset tulehdukset, poikkeuksena *S. warneri*, *S. hominis*, *S. epidermidis* ja *S. cohnii*, jotka aiheuttivat vain subkliinisiä

tulehduksia. Noin puolessa tutkimuksen tapauksista oli akuutin tulehduksen merkkejä, ja *S. haemolyticus* aiheutti suuremman kuumeen nousun kuin muut KNS-bakteerit.

Meidän tutkimuksessamme ei huomioitu vuodenaikaisvaihtelua, mutta norjalaistutkimuksessa todettiin KNS-bakteerien osuuden olevan suurimmillaan kevätkuukausina huhtikuussa ja toukokuussa (Østerås, 2006). Waage ym. 1999 totesivat KNS-bakteerien osuuden olevan hiehojen kliinisissä utaretulehduksissa pienin myöhään syksyllä. Tähän voi vaikuttaa se, että syyspoikivuutta suosivassa järjestelmässä aiemmin syksyllä poikineet lehmät ovat loppuvuodesta isoimmassa maidossa.

5. Johtopäätökset

Poikimisesta lähtien neljänneksissä olleet koagulaasinegatiiviset stafylokokit pysyivät utareessa lähes puolessa tapauksista koko lypsykauden ajan. Persistoivien KNS bakteerien aiheuttama infektio nosti somaattisten solujen pitoisuutta maidossa, mutta ei vaikuttanut lehmän yleisvointiin, sillä subkliinisinä infektiot eivät aiheuttaneet oireita. Solupitoisuutta maidontuotantokaudella ei nostanut pelkkä poikimisenaikainen ja sen jälkeen hävinnyt KNS-infektio, mutta pysyvät infektiot nostivat solujen määrää koko lypsykauden ajaksi. KNS-laji ei vaikuttanut persistoinnin keston, vaan persistointiajat vaihtelivat neljänneskohtaisesti KNS-lajista riippumatta; ne lajit joita muutenkin esiintyi paljon myös pysyivät kauan. Näin ollen lajin perusteella ei voida arvioida, katoaako infektio itsestään tai kuinka kauan sen voisi olettaa pysyvän utareessa. Niinpä vielä ei voida sanoa, mitä lajeja kannattaa hoitaa ja mitä ei, vaan hoitotoimenpide on edelleen harkittava tapauskohtaisesti.

6. Kiitokset

Kiitos työn ohjaajalle ja johtajalle kärsivällisyydestä ja hyvistä neuvoista, joita todella tarvittiin tämän lisensiaatintutkielman valmistumiseksi.

7. Lähdeluettelo

Aarestrup, F. M. & Jensen N. E. Prevalence and Duration of Intramammary Infection in Danish Heifers During the Peripartum Period. *J. Dairy Sci.* 80, 1997:307-312.

Aarestrup, F. M., Larsen, H. D., & Jensen, N. E. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 66, 1999: 165-170.

Borm, A. A., Fox, L. K., Leslie, K. E., Hogan, J. S., Andrew, S. M., Moyes, K. M., Oliver, S. P., Schukken, Y. H., Hancock, D. D., Gaskins, C. T., Owens, W. E. & Norman, C. Effects of Prepartum Intramammary Antibiotic Therapy on Udder Health, Milk Production, and Reproductive Performance in Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.* 89, 2006: 2090-2098.

Chaffer, M., Leitner, G., Winkler, M., Glickman, A., Krifucks, O., Ezra, E. & Saran, A. Coagulase-negative Staphylococci and Mammary Gland Infections in Cows. *J. Vet. Med. B* 46, 1999: 707-712.

de Haas, Y., Barkema, H. W. & Veerkamp, R. F. The Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on the Lactation Curve for Somatic Cell Count. *J. Dairy Sci.* 85, 2002: 1314-1323

Deluyker, H. A., Van Oye, S. N. & Boucher, J. F. Factors Affecting Cure and Somatic Cell Count After Pirlimycin Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Cows. *J. Dairy Sci.* 88, 2005: 604-614.

de Vliegher, S., Laevens, H., Devriese, L. A., Opsomer, G., Leroy, J. L. M., Barkema, H. W. & de Kruif, A. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Vet. Microbiol.* 92, 2003: 245-252

Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F. & Seegers, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows, a meta-analysis. *Vet. Res.* 33 2002: 335–357.

Fox, L.K., Chester, S.T., Hallberg, J.W., Nickerson, S.C., Pankey, J.W., Weaver, L.D. Survey of Intramammary Infections in Dairy Heifers at Breeding Age and First Parturition. *J. Dairy Sci.* 78, 1995: 1619-1628.

Green, M. J., Green, L. E., Bradley, A. J., Burton, P. R., Schukken, Y. H. & Medley, G. F. Prevalence and associations between bacterial isolates from dry mammary glands of dairy cows. *Vet. Rec.* 156, 2005: 71-77.

Honkanen-Buzalski T., Mylly V. & Pyörälä S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1994 Jul;41(5):344-50.

Honkanen-Buzalski T., Seuna E. Isolation and identification of pathogens from milk. Kirjasto: toim. Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. *The Bovine Udder and Mastitis*, University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 1995, 121-141.

Jarp, J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 27, 1991: 151-158.

Laevens, H., Deluyker, H., Devriese, L. & de Kruif, A. The Influence of Intramammary Infections with *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus warneri* or *haemolyticus* on the Somatic Cell Count in Dairy Cows. *Epidemiol. santé anim.* 1997: 31-32.

Maitohygienialiitto:

http://www.maitohygienialiitto.fi/somaatt_lakisaateiset_03.html

http://www.maitohygienialiitto.fi/laatu_jak_luokkiin_03.html

http://www.maitohygienialiitto.fi/Pohjoism_solumaara_03.html

Matos, J.S., White, D.G., Harmon, R.J., Langlois, B.E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other Than the Lactating Mammary Gland. J. Dairy Sci. 74, 1991: 1544-1549.

Matthews, K. R., Harmon, R. J. & Langlois, B. E. Prevalence of *Staphylococcus* species During the Periparturient Period in Primiparous and Multiparous Cows. J. Dairy Sci. 75, 1992: 1835-1839.

Nagahata, H., Maruta, H., Okuhira, T., Higuchi, H. & Anri, A. Bacteriological Survey of Mammary Secretions from Prepartum Heifers in a Dairy Herd with a High Prevalence of *Staphylococcus aureus* Infection. J. Vet. Med. Sci. 68(12): 1359-1361, 2006

Nevala, M., Taponen, S., Pyörälä, S. Naudan kliinisen utaretulehduksen bakteerietiologia: Saaren ambulatoisen klinikan aineisto vuosilta 2002-2003. Suomen Eläinlääkärilehti 110, 2004: 363-369.

Pankey, J. W., Drechsler, P. A. & Wildman, E. E. Mastitis Prevalence in Primigravid Heifers at Parturition. J. Dairy Sci. 74, 1991: 1550-1552.

Pillai, S.R., Kunze, E., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M. Application of Differential Inflammatory Cell Count as a Tool to Monitor Udder Health. J. Dairy Sci. 84, 2001: 1413-1420.

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V. & Honkanen-Buzalski, T. Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and

Antimicrobial Resistance. J. Dairy Sci. 87, 2004: 2433-2441.

Pyörälä, S., Lehtolainen, T., Dredge, K. Umpeenpanohoito utaretulehdusten hoidossa ja ennaltaehkäisyssä. Suomen Eläinlääkärilehti 11, 2004: 587-590.

Saloniemi, H. Use of Somatic Cell Count in Udder Health Work. Kirjasta: toim. Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. The Bovine Udder and Mastitis, University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 1995, 105-110.

Schepers, A.J., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B.M., Hanekamp, W.J.A. Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. J. Dairy Sci. 80, 1997: 1833-1840.

Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F. ym. Monitoring Udder Health and Milk Quality Using Somatic Cell Counts. Vet. Rec. 34, 2003: 579-596

Shearer, J. K. & Harmon, R. J. Mastitis in Heifers. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Vol. 9, No 3, Nov 1993.

Simojoki, H., Taponen, S. & Pyörälä, S. Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien aiheuttama utaretulehdus lehmällä. Suomen Eläinlääkärilehti 6, 2005: 303-306.

Taponen, S., Koort, J., Björkroth, J., Saloniemi, H., Pyörälä, S. Bovine Intramammary Infections Caused by Coagulase-Negative Staphylococci May Persist Throughout Lactation According to AFLP-Based Analysis. J Dairy Sci. 90(7): 3301-3307.

Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H. D. & Pyörälä, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. Vet. Microbiol. 115, 2006: 199-207.

Tenhagen B.- A., Köster, G., Wallmann, J., & Heuwieser, W. Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89, 2006: 2542-2551

Timms, L.L., Schultz, L.H. Dynamics and Significance of Coagulase Negative Staphylococcal Intramammary Infections. *J. Dairy Sci.* 70, 1986: 2648-2657.

Trinidad, P., Nickerson, S.C., Alley, T.K. Prevalence of Intramammary Infection and Teat Canal Colonization in Unbred and Primigravid Dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73, 1990:107-114.

Trinidad, P., Nickerson, S. C. & Adkinson, R. W. Histopathology of Staphylococcal Mastitis in Unbred Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.* 73, 1990: 639-647.

Waage, S., Mørk, T., Roros, A., Aasland, D., Hunshamar, A. & Odegaard, S. A. Bacteria Associated with Clinical Mastitis in Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.* 82, 1999: 712-719.

White, D.G., Harmon, R.J., Matos, J.E.S, Langlois, B.E. Isolation and Identification of Coagulase Negative Staphylococcus Species from Bovine Body Sites and Streak Canals of Nulliparous Heifers. *J. Dairy Sci.* 72, 1989: 1886-1892.

Wilson, D. J, Gonzalez, R. N., Case, K. L., Garrison, L. L. & Gröhn, Y. T. Comparison of Seven Antibiotic Treatments with No Treatment for Bacteriological Efficacy Against Bovine Mastitis Pathogens. *J. Dairy Sci.* 82, 1999: 1664-1670.

Østerås, O., Solverød, L. & Reksen, O. Milk Culture Results in a Large Norwegian Survey—Effects of Season, Parity, Days in Milk, Resistance, and Clustering. *J. Dairy Sci.* 89, 2006: 1010-1023.

Taulukko 1. Koagulaasinegatiiviset stafylokokkilajit erilaisissa infektioissa API ja AFLP –määritysten mukaan. n= infektoituneiden neljänneksen lukumäärä.

KNS laji	Infektio ennen poikimista ja/tai poikiessa				Lypsykauden persistoiva infektio				Lypsykauden ohimenevä infektio			
	API		AFLP		API		AFLP		API		AFLP	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>S. capitis</i>									1	(2,9)		
<i>S. chromogenes</i>	28	(49,1)	30	(52,6)	11	(37,9)	12	(41,4)	6	(17,6)	10	(29,4)
<i>S. cohnii</i>	1	(1,8)	2	(3,5)	1	(3,4)	1	(3,4)				
<i>S. epidermidis</i>					2	(6,9)	4	(13,8)	1	(2,9)	2	(5,9)
<i>S. equorum</i>	1	(1,8)							1	(2,9)		
<i>S. haemolyticus</i>	1	(1,8)	6	(10,5)			3	(10,3)	3	(8,8)	11	(32,4)
<i>S. simulans</i>	13	(22,8)	13	(22,8)	7	(24,1)	6	(20,7)	3	(8,8)	3	(8,8)
<i>S. warneri</i>	3	(5,2)			4	(13,8)	1	(3,4)	4	(11,8)	1	(2,9)
<i>S. xylosus</i>			1	(1,8)					1	(2,9)	2	(5,9)
<i>S. subsp.</i>	10	(17,5)	5	(8,8)	4	(13,8)	2	(6,9)	14	(41,2)	4	(11,8)
Yhteensä	57	(100,0)	57	(100,0)	29	(100,0)	29	(100,0)	34	(100,0)	34	(100,0)