

Outi Kemiläinen, Paula Hyvönen, Markku Saastamoinen,
Susanna Särkijärvi ja Atte von Wright

Klostridien ja *Clostridium perfringens*in esiintyminen terveeseen hevosen ulostenäytteessä sisä- ja ulkoruokintakaudella – menetelmävertailu

Occurrence of clostridia and *Clostridium perfringens* in the faecal samples of healthy horses during indoor and outdoor feeding seasons – comparison of methods

YHTEENVETO

Työssä vertailtiin erilaisten kuljetus-, viljely- ja inkubointiolojen vaikutusta hevosen ulosteen kokonaisbakteeri-, klostridi- ja *Clostridium perfringens* -pitoisuuksiin sekä seurattiin kahden tallin terveiden hevosten ulosteiden sulfittia pelkistävien klostridien ja *C. perfringens* -bakteerien esiintymistä sisä- ja ulkoruokintakaudella kevästä syksyyn vuonna 2003. Toisen tallin hevoset olivat kilpavalmennuksessa ja toiset kevyessä käytössä. Menetelmävertailussa havaittiin, että näytteiden anaerobisella pakkaamisella ja kuljetuksella oli vaikutusta kokonaisbakteeripitoisuuksiin. Kasvualustoina käytettiin elintarvikkeiden sulfittia pelkistävien klostridien ja *C. perfringens*in määrittämiseen soveltuvia alustoja. Näistä ensin mainittu alusta osoittautui epäspesifiseksi hevosen ulostetutkimukseen, koska hevosen ulosteessa yleisesti esiintyvät *Fusobacterium*- ja *Bacteroides*-suvun edustajat pelkistävät myös sulfittia. Elintarvikkeiden *C. perfringens* -alustan havaittiin soveltuvan myös hevosten ulostetutkimukseen. Terveiden hevosten ulosteissa esiintyi *C. perfringens* -bakteeria keskimäärin alle toteamisrajan (100 pmy/g) ruokinnasta riippumatta. Sulfittia pelkistävien klostridien pitoisuudet olivat hieman korkeammat. Laidunkaudella hevosten ulosteessa esiintyi sulfittia pelkistäviä klostrideja enemmän kuin sisäruokintakaudella.

SUMMARY

This study was undertaken to compare how different conditions of transport, culture and incubation affect the concentrations of total bacteria, clostridia and *Clostridium perfringens* in horse feces. In addition, we assessed the incidence of faecal sulphite reducing clostridia and *C. perfringens* in healthy horses during in- and outdoor feeding seasons from spring to autumn in 2003. In one stable, the horses were being trained for trotting, and in the other they were in light work. Comparing the methods, the anaerobic packing and transport of the samples affected the concentrations of total bacteria. The growth media used were those suited for the determination of sulphite reducing clostridia and *C. perfringens* in foodstuffs. The growth media routinely employed for sulphite reducing clostridia in foods was too unspecific for equine feces, because *Fusobacterium*- and *Bacteroides*-species, commonly present in horse feces, also reduce sulphite. *C. perfringens* medium for foods was suitable for the study of horse feces. The feces of healthy horses contained only few *C. perfringens*, on the average below the detection limit (100 cfu/g), in spite of seasonal change in feeding. The concentrations of sulphite reducing clostridia were lightly higher. During outdoor pasture season, sulphite reducing clostridia were detected more than during indoor pasture season.

JOHDANTO

Hevosen paksusuoli toimii naudan pötsin kaltaisena bioreaktorina, joka on erikoistunut korsirehun käyttöön. Ruokinnalla pyritään ravintoaineiden tarpeiden tyydyttämisen lisäksi estämään ruoansulatuskanavan häiriöiden, kuten koliikin, ripulin tai enterotoksemian, syntyminen. Ruoansulatuskanavan optimaaliseen toimintaan ja täten hevosen terveyteen ja hyvinvointiin vaikuttavat ennen kaikkea suolistomikrobit: bakteerit, alkueläimet ja sienet. Patogeenisia bakteereita, kuten klostrideja, löydetään vaihtelevia määriä, keskimäärin 100 pmy/g myös terveiden hevosten ulosteesta (Jullian 2001, Weese ym. 2001). Terveillä hevosilla yli 1000 pmy/g klostridipitoisuudet katsotaan epätavalliseksi (Tschirdewahn ym. 1991, Wiberg 1994, Larsen 1997, Jones 2000). Kohonneilla klostridipitoisuuksilla on yhteyttä hevosen erilaisiin suolistotulehduksiin (Wierup 1977, Wierup ja DiPietro 1981, Griffiths ym. 1997, Gustafsson 2004). *C. perfringensin* ja/tai *C. difficile*-bakteerin aiheuttaman klostridioosin eli Baron Gruff -taudin oireita ovat ripuli, kuume, laskenut ruokahalu, septinen shokki ja jopa äkillinen kuolema (Jones 2000). *C. difficile*-bakteerin tai sen sytotoksiinin on osoitettu aiheuttavan akuuttia koliittia antibioottihoidon seurauksena (Båverud ym. 1997, Herholz ym. 1999, Weese ym. 2001, Tillotson ym. 2002, Båverud ym. 2003). Terveillä tammoilla on todettu varsan saaman oraalisien antibioottihoidon seurauksena *C. difficile* aiheuttamaa koliittia (Gustafsson ym. 1997, Båverud ym. 2003, Gustafsson 2004). *C. botulinum* aiheuttaa hevosille kolmea erilaista tautia: klassista intoksikaatiota rehun välityksellä, haavabotulismia ja botulinuminfektia (Whitlock ja Buckley 1997). Täysikasvuisilla hevosilla botulismi aiheutuu usein saastuneen

rehun, kuten säilörehun, syömisestä (Luukkanen ym. 1997). Lisäksi *C. botulinumilla* on todettu olevan yhteyttä ”equine grass sickness”-tautiin (Poxton ym. 1999, Hunter ym. 1999, Garret ym. 2002). Sateisten kesien, laidunten kulumisen ja nopeiden ruokinnan muutosten arvellaan vaikuttavan paksusuolen klostridipitoisuuksiin sekä aiheuttavan ruoansulatuskanavan häiriöitä ja esimerkiksi kaviokuumetta (Wierup 1977, Garner ym. 1978, Jones 2000, Gautsch ym. 1993, Ala-Huikka suullinen tieto 2003).

Hevosen paksusuolen mikrobiflooraa on tutkittu vähemmän kuin naudan pötsin mikrobiflooraa. Nurmion ym. (1973) tutkimuksen mukaan suomalaisten terveiden hevosten suolistossa ($n = 29$) sulfittia pelkistävien klostridien pitoisuus oli kolmasosalla hevosista 10000 pmy/g ja lopuilla alle 1000 pmy/g. Julkaisemattoman tutkimuksen mukaan (Takkinen 2003) suomalaisten hevosten ($n = 28$) keskimääräiset klostridipitoisuudet paksusuoleissa olivat noin 1000 pmy/g. Illivitskyn tutkimuksen perusteella terveiden hevosten suoliston klostridipitoisuus on alle 100 ja pitoisuudet 1000–10000 pmy/g tulkittiin kohonneiksi (Illivitzky, julkaisematon tutkimus 2003).

Käytössä olevien mikrobiologisten menetelmien kirjavuus vaikeuttaa tulosten tulkintaa, arviointia ja vertailua. Useimmat hevosten ulostetutkimukset tehdään nykyään kunnallisissa elintarvikelaboratorioissa, joiden käyttämät elatusaineet soveltuvat sulfittia pelkistävien klostridien ja *C. perfringensin* toteamiseen elintarvikkeista, mutta eivät välttämättä anna oikeaa kuvaa tutkittaessa hevosen ulostenäytteitä. Klostridit ovat anaerobisia bakteereita, joten näytteenotto-, kuljetus- ja viljelyolot voivat vaikuttaa tulokseen. Ensimmäisen kokeen tarkoituksena oli selvittää näytteenotto-, kasvatus- ja kuljetusolojen sekä alustojen merkitystä hevosen

ulostetutkimuksissa. Toisessa osakokeessa selvitettiin ruokinnan voimakkuuden ja muutosten vaikutusta terveiden hevosten sulfittia pelkistävien klostridi- ja *C. perfringens*-pitoisuuksiin sisä- ja ulkoruokintakaudella.

AINEISTO JA MENETELMÄT

Näytteiden käsittelyn ja viljelymenetelmien vertailu

Kokeessa verrattiin näytteenoton, kuljetuksen, viljely- ja inkubointiolojen vaikutusta bakteeripitoisuuksiin. Viiden viikon aikana rektalisoiittiin neljästä hevosesta viikoittain ulostenäyte, joka käsiteltiin joka kerta kolmella eri tavalla (I, II ja III). Näytteet I ja II pakattiin kierrekorkillisiin muovipurkkeihin siten, että purkkiin jäi mahdollisimman vähän ilmaa ja kuljetettiin anaerobisesti Anaerocult Mini Apusseissa, joissa oli anaerobikehittimet (Merck, Saksa). Näytteet III pakattiin pakastemuovipusseihin ja kuljetettiin aerobisesti. Kylmälaukuissa kuljetetut näytteet viljeltiin seuraavana päivänä. Näytteet I viljeltiin ja inkuboitettiin anaerobityöskentelyasemassa (MACS 1000 Anaerobic Workstation, Don Whitley, Englanti). Näytteet II viljeltiin aerobisesti laminaarikaapissa ja inkuboitettiin anaerobityöskentelyasemassa. Näytteet III viljeltiin aerobisesti laminaarikaapissa ja inkuboitettiin anaerobikolveissa (Oxoid, Iso-Britannia ja Merck, Saksa), joissa käytettiin AnaeroGenTM-anaerobikehittämiä (Oxoid, Iso-Britannia). Ulostenäytteistä määritettiin aerobiset ja anaerobiset mesofiiliset bakteerit verimaljalla, sulfittia pelkistävät klostridit tryptoni-sulfiitti-agarilla (TS, Merck, Saksa) ilman sykloseriiniä ja *C. perfringens* tryptoni-sulfiittisykloseriini-agarilla (TSC), jossa oli 5 prosenttia munankeltuaista (bioTrading, Hollanti) ja 8 prosenttia D-sykloseriiniiliuosta 0,5 prosenttisena (Sigma, Saksa). Maljat

Anna Parkkari



inkuboitiin +37 °C:ssa 24 tuntia, paitsi TS-maljat 48 tuntia. Klostridialustoilla kasvaneita sulfittia pelkistäneitä bakteereja identifioitiin katalaasi- ja KOH-testillä, gram- ja itiövärjäyksellä sekä kaupallisella biokemiallisella testillä API20A (BioMerieux, Ranska).

Klostridi- ja *C. perfringens*-määritykset terveistä hevosista

Kokeessa oli mukana 18 tervettä hevosta, joista yhdeksän oli kevyessä käytössä olevaa suomenhevostammaa Maatalouden tutkimuskeskuksessa Ypäjällä ja yhdeksän ravivalmennuksessa olevaa hevosta (8 lämminveristä ravihevosta, 1 suomenhevonen) Ylä-Savossa Kiuruvedellä. Koejakso kesti viisi kuukautta: toukokuusta 2003 sisäruokinnasta laitumelle ja takaisin sisäruokintaan marraskuuhun 2003. Näytteenottokertoja kertyi 14–16, joista puolet oli sisäruokinta- ja puolet laidunkaudelta. Tutkimuksessa mukana olevien hevosten ruokinta toteutettiin ruokintanormien mukaisesti ja ruokinnasta, valmennuksesta, terveydentilasta ja niissä

tapahtuneista muutoksista pidettiin kirjaa. Molempien hevosryhmien sisäruokinta koostui kaurasta, säilörehusta ja heinästä. Kilpahevosten ruokintaan sisältyi kauran lisäksi seosmelassia, melassileikettä ja kasvisöljyä. Kevyessä käytössä olevat hevoset saivat kauran lisäksi pellavansiemenrouhetta. Laitumella kilpahevoset saivat päivittäisen väkirehuannoksen ja viikosta 29. lähtien lisäheinää. Hevosten siirtymässä laitumelle ja laitumelta pois niitä totutettiin uusiin rehuihin siten, että viikon ajan ennen siirtoa hevosille syötettiin asteittain yhä enemmän uutta rehua. Näytteet otettiin kokeen alussa viikoittain ja viikon 26 jälkeen joka toinen viikko. Menetelmävertailussa saatujen tulosten perusteella kokeeseen valittiin menetelmä I, jossa näyte kuljetettiin, viljeltiin ja inkuboitiin anaerobisesti. Maljat ja laimennusnesteet laitettiin tasaantumaan anaerobiyöskentelyasemaan kaksi tuntia ennen viljelyä. Näytteet viljeltiin rinnakkaisina siten, että kustakin laimennuksesta tehtiin siirrostus kahdelle maljalle.

Menetelmätutkimuksen tilastollinen käsittely tehtiin korrelaatioanalyyysillä ja ulosteiden klostridi-

pitoisuudet analysoitiin ryhmien välillä Mann-Whitney -testillä ja Wilcoxon Signed Ranks -testillä.

TULOKSET

Menetelmätutkimus

Menetelmätutkimuksessa anaerobisten ja aerobisten bakteerien kokonaispitoisuuksien suhde oli keskimäärin 1:1 menetelmästä riippumatta. Käsiteltäessä näyte täysin anaerobisesti saatiin suurimmat bakteeripitoisuudet. Anaerobisesti kuljetettujen näytteiden aerobisten bakteerien kokonaispitoisuudet olivat log 5,6–8,0 pmy/g, kun taas aerobisesti kuljetettujen ulosteiden aerobisten bakteerien kokonaismäärä oli hieman pienempi (log 5,5–7,8 pmy/g). Anaerobisten bakteerien kokonaispitoisuus vaihteli kokeen aikana log 6,0–9,4 pmy/g. Näytteenkuljetustapa vaikutti voimakkaasti anaerobisten bakteerien pitoisuuksiin. Tilastollisesti merkittävin ero oli menetelmien I (anaerobinen kuljetus, viljely ja inkubointi) ja III (aerobinen kuljetus ja viljely, anaerobinen inkubointi) välillä ($p=0,0001$). Menetelmien II (anaerobinen kuljetus ja inkuboin-

ti, aerobinen viljely) ja III välillä oli kohtalainen korrelaatio ($p=0,054$). Kuljetusolosuhteiden lisäksi viljelyolosuhteet vaikuttivat anaerobisten bakteerien kokonaispitoisuuteen, sillä menetelmien I ja II välinen ero oli tilastollisesti merkittävä ($p=0,030$). Menetelmätutkimuksessa klostridipitoisuudet olivat alle toteamisrajan (100 pmy/g). Alustoilla esiintyi kuitenkin runsaasti muita sulfiittia pelkistäviä bakteereja kuin klostrideja ja näytteiden käsittelytavoilla oli vaikutusta näiden bakteerien pitoisuuksiin siten, että menetelmien I ja III ($p=0,009$) ja II ja III ($p=0,05$) välillä oli tilastollisesti eroa.

Sulfiittia pelkistävät klostridit ja *C. perfringens* sisä- ja ulkoruokintakaudella

Klostridimaljoilla esiintyneet sulfiittia pelkistäneet bakteerit osoittautuivat jatkotutkimuksissa suurelta osin muiksi kuin klostrideiksi. Grampositiivisista sulfiittia pelkistävästä anaerobisista bakteereista tunnistettiin muun muassa *Eubacterium lentum*, *Actinomyces israelii* ja *naeslundii*-lajeja ja gramnegatiivisista *Fusobacterium*- ja *Bacteroides*-sukujen edustajia. Klostrideista tunnistettiin seuraavia lajeja: *C. septicum*, *C. glycolicum*, *C. perfringens*, *C. bifermentas*, *C. cadaveris* ja *C. sporogenes*/*C. botulinum*. Kokeen aikana havaittiin, että useimmat klostridit olivat helpommin löydettävissä *C. perfringens*-alustalta (TSC) kuin varsinaiselta klostridialustalta (TS). Lisäksi havaittiin, että muutkin klostridit kuin *C. perfringens* aiheuttavat lesitinääsireaktion TSC-alustalla.

Kokeen aikana *C. perfringens*iä esiintyi kolmesti sisäruokintakaudella kilpavalmennushevosilla. Sulfiittia pelkistävien klostridien määrä ulosteessa oli kevyessä käytössä olevilla hevosilla sisäruokintakaudella keskimäärin alle toteamisrajan (100 pmy/g) ja lai-

dunkaudella 190 pmy/g. Kilpavalmennuksessa olevien hevosten vastaavat pitoisuudet olivat sisäruokintakaudella keskimäärin 140 ja laidunkaudella 280 pmy/g. Laidunkaudella sulfiittia pelkistäviä klostrideja esiintyi enemmän kuin sisäruokintakaudella ($p=0,027$).

Kokeen aikana seurattiin myös kaikkien sulfiittia pelkistäneiden anaerobisten bakteerien kokonaispitoisuutta, koska näiden bakteerien osuus TS-alustoilla oli suuri. Hevosen käyttötarkoituksella ja ruokinnalla oli vaikutusta sulfiittia pelkistävien anaerobisten bakteerien pitoisuuksiin siten, että sisäruokintakaudella kevyessä käytössä olevien bakteeripitoisuus oli keskimäärin log 3,4 pmy/g ja laidunkaudella log 3,7 pmy/g. Kilpavalmennettavilla pitoisuudet olivat korkeammat: sisäruokintakaudella keskimäärin log 4,2 pmy/g ja laidunkaudella log 4,3 pmy/g. Keväällä laitumelle ja syksyllä sisälle siirron yhteydessä kevyessä käytössä olevien hevosten ulosteen sulfiittia pelkistävien bakteerien kokonaispitoisuuksissa havaittiin laskua (keväällä $p=0,031$, syksyllä $p=0,008$). Bakteeripitoisuus kohosi seuraavaan tutkimuskertaan mennessä. Kilpavalmennuksessa olleiden hevosten ulosteiden sulfiittia pelkistäneiden bakteeripitoisuudet eivät muuttuneet siirtojen yhteydessä.

POHDINTA

Menetelmätutkimuksen perusteella anaerobisten mikrobien määrittämisessä on tärkeää näytteenoton ja kuljetuksen anaerobisuus: rektalisoitu näyte, täysi näytepurkki hapen syrjäyttämiseksi ja anaerobiset kuljetusolot. Tutkimuksessa havaittiin, että anaerobisissa oloissa tapahtuvalla viljelyllä on merkitystä bakteeripitoisuuksiin, mutta menettely ei ole käytännössä useimmissa laboratorioissa toteutettavissa. Erilaisten menetelmien vaikutusta sulfiittia pel-

kistävien klostridipitoisuuksiin on mahdoton arvioida, koska niitä esiintyi käytetyillä menetelmillä alle toteamisrajan.

TS-alusta ilman jatkotutkimuksia ei sovellu hevosen ulosteen sulfiittia pelkistävien klostridien määrittämiseen, koska *Bacteroides*- ja *Fusobacterium*-suvuissa on lajeja, jotka muodostavat rikkivetyä (Holt ym. 2000) ja näin ollen pelkistävät sulfiittia. Näiden mikrobien osuus ulosteen anaerobisista mikrobeista on 5,8–15 prosenttia (Jullianand 2001, Daly ja Shirazi-Beechey 2003). Tämä selittää sulfiittia pelkistäneiden anaerobisten bakteerien runsaan esiintymisen TS-alustoilla. TS-alustalla tulosten tulkintaa vaikeuttaa ulosteessa esiintyvien sulfiittia pelkistäneiden anaerobisten bakteerien lisäksi myös vetyä tuottavat anaerobiset bakteerit, jotka voivat pelkistää kasvualustan sulfiittia ja aiheuttaa alustan mustumisen.

Tutkimuksemme mukaan terveiden hevosten ulosteiden sulfiittia pelkistävien klostridien pitoisuudet olivat keskimääräisesti alhaisempia kuin aikaisemmissa suomalaisissa tutkimuksissa (Nurmio ym. 1973, Takkinen, julkaisematon tieto 2003). Selityksenä erolle on, että varmistimme tyypillisten pesäkkeiden identifioinnin gram- ja itiövärjäyksellä sekä biokemiallisilla testeillä.

Hevosen ruokinnalla, laitumien kunnolla ja ympäristöllä saattaa olla vaikutusta klostridipitoisuuksiin, koska hevosten ulosteen klostridipitoisuudet olivat laidunkaudella korkeammat kuin sisäruokintakaudella. Klostridien runsaampi esiintyminen laidunkaudella selittyy sillä, että hevosen laiduntaessa suolistoon kulkeutuu maata ja sen bakteereja, kuten klostrideja. Tutkimus ei paljastanut sääolojen vaikutusta hevosten sulfiittia pelkistävien klostridien pitoisuuksiin, koska kesä 2003 oli hyvin lämmin ja kuiva. Ypäjän ja Kiuruveden seudulla kesä- ja

elokuu olivat vähäsatteisia, mutta heinäkuun sademäärä oli suurempi kuin edellisvuonna. Kilpavalmennettavilla esiintyi sulfiittia pelkistäviä klostrideja hieman enemmän kuin kevyessä käytössä olevilla hevosilla. Ryhmien väliseen eroon saattaa vaikuttaa ruokinnan ja valmennuksen voimakkuus, rehut ja erilaiset ympäristöolosuhteet. Vähäiseen eroon voi vaikuttaa myös, että ryhmät poikkesivat toisistaan rodun suhteen.

Kilpavalmennettavien hevosten ulosteen sulfiittia pelkistävien bakteerien pitoisuus oli korkeampi kuin kevyessä käytössä olevilla hevosilla. Onkin mahdollista, että näiden bakteerien esiintyminen ja voimakas väkirehuokinta ovat yhteydessä toisiinsa, koska bakterioidekset ja fusobakteerit käyttävät hiilihydraatteja (Allen ym. 1999). Ruokinnan muutosten yhteydessä kilpavalmennettavilla hevosilla ei havaittu pitoisuuksien hetkellistä laskua kuten kevyessä käytössä olevilla hevosilla, koska kilpahevosten ruokinnan muutos oli vähäisempi tasaisen väkirehuokinnan vuoksi.

C. perfringens -bakteerin määrittämiseen käytetty TSC-munankeltuaisalusta soveltui hevosen ulosteen klostriditutkimuksiin, sillä useimmat klostridilöydökset tehtiin tältä alustalta. Sykloseriini vähensi sulfiittia pelkistäneiden gram-negatiivisten bakteerien kasvua ja munankeltuainen mahdollisti lesitinaasireaktion, joka helpotti jatkotutkimuksia. TSC-alustaa käytettäessä sykloseriini voi selekoida osan klostrideista. Lesitinaasireaktion lisäksi munankeltuaisemulsio näytti lisäävän klostridien itiötuo-
tantoa, jolloin ne oli helpompi havaita gramvärjäyksessä. Tämän kokeen perusteella olisi syytä tutkia tarkemmin TSC-alustan soveltuvuus ulosteen klostridien toteamiseksi.

Tämän tutkimuksen *C. perfringens* -pitoisuudet vastasivat aikaisempien tutkimusten tuloksia

(Wierup 1977, Wierup ym. 1981, Tschirdewahn ym. 1991, Herholz ym. 1999, Weese ym. 2001, Garrett ym. 2002). Tämän perusteella näyttää siltä, että *C. perfringens* ei kuulu yleisesti terveen hevosen paksusuolen normaaliflooraan.

Terveen hevosen ulosteessa sulfiittia pelkistävien klostridien ja *C. perfringensin* pitoisuudet ovat alhaiset. Epäiltäessä klostridien aiheuttamia suolistotulehduksia, kannattaa klostridien selekoimiseksi kuumentaa ulosteviljelyn ensimmäinen laimennusneste +75 °C:ssa 10 minuutin ajan, jolloin vegetatiiviset bakteerisolut kuolevat ja esille saadaan itiölliset klostridit (Julliand ym. 1996, Allen ym. 1999). Jos halutaan selville ulosteen klostridien kvantitatiivinen määrä, tulee tehdä suoraviljely. Kokemuksemme mukaan klostridien määrittäminen oli helpompaa TSC-munankeltuaisalustalta kuin TS-alustalta.

KIITOKSET

Kiitokset tallimestari Timo Vääräselle sekä Jussi Ala-Huikulle, Inna Ilivitzkylle ja Johanna Takkiselle.

KIRJALLISUUS

Allen, S. D., Emery, C. L. & Siders, J.A. Manual of Clinical Microbiology. Toim. Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Teno-ver, F. ja Tenen, R. American Society for Microbiology. Washington. 7. painos, 1999: 654–671.

Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A. & Gunnarsson, A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. Equine Vet. J. 29, 1997: 279–284.

Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspan, A. & Gunnarsson, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. Equine Vet. J. 35, 2003: 465–471.

Daly, K. & Shirazi-Beechey, S.P. Design and evaluation of group-specific oligonucleotide probes for quantitative analysis of intestinal ecosystem: their application to assessment of equine microflora. FEMS Microbiol. Ecology 44, 2003: 243–252.

Garrett, L.A., Brown, R. & Poxton, I.R. A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. Vet. Microbiology 87, 2002: 81–88.

Garner, H.E., Moore, J.N., Johnson, J.H., Clark, L., Amend, J.F., Tritschler, L.G., Coffman, J.R., Sprouse, R.F., Hutcheson, D.P. & Salem, C.A. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. Equine Vet. 10, 1978: 249–252.

Gautsch, S., Beckmann, G., Amtsberg, G., Dieckman, M. & Deegen, E. The occurrence and significance of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* strains in the intestinal tract of horses. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1, 1993: 1–6.

Griffiths, N.J., Walton, J.R. & Edwards, G.B. An investigation of the prevalence of the toxigenic types of *Clostridium perfringens* in horses with Anterior enteritis: Preliminary results. Anaerobe 3, 1997: 121–125.

Gustafsson, A. Antibiotic associated diarrhea in horses. With special reference to *Clostridium difficile*. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2004: 1–59

Gustafsson, A., Båverud, V., Gunnarsson, A., Horn af Rantzien, M., Lindholm, A. & Franklin, A. The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. Equine Vet. J. 29, 1997: 314–318.

Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H. & Straub, R. Prevalence of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J. Clin. Microbiol. 37, 1999: 358–361.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. ja Williams, S. Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2000, 9. painos, 291–351, 559–596.

Hunter, L.C., Miller, J.K. & Poxton, I.R. The association of *Clostridium botulinum* type C with equine grass sickness: a toxicoinfection? Equine Vet. J. 31, 1999: 429–499.

Jones, R. Clostridial enterocolitis. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 3, 2000: 471–485.

Julliand, V., de Vaux, A., Villard, L. & Richard, Y. Preliminary studies on the bacterial flora of faeces taken from foals, from birth to twelve weeks. Effect of the oral administration of a commercial colostrum replacer. Pferdeheilkunde. 12, 1996: 209–212.

Julliand, V. Microbiology of the Equine Hindgut. Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes 2001.

Kern, D., Skyter, L.L., Weaver, J.M., Leffel, E.C. & Samuelson, G. Ponies vs. steers: effect of oats and hay on the microbial ecosystem. J. Anim. Sci. 37, 1973: 463–469.

Larsen, J. Acute colitis in adult horses. A review with emphasis on aetiology and pathogenesis. Vet. Quart. 2, 1997: 72–80.

Luukkanen, L., Eskola, J. & Jakala, J. Säilörehun aiheuttama botuliinimyrkytyspäily hevosilla – tapausselektus. Suomen eläinlääkäri. 103, 1997: 500–503.

Nurmio, P. Koiranen L. & Tupamäki, A. The faecal microflora of horses. Suom. Eläinlääkäri. 79, 1973: 668–681.

Poxton, I.R., Hunter, L. & Lough, H. Is Equine Grass Sickness (Mal Seco?) a Form of Botulism? Anaerobe 5, 1999: 291–293.

Tillotson, K., Traub-Dargatz J., Dickinson, C., Ellis, R., Morley, P., Hyatt, D., Magnuson, R., Riddle, W., Bolte, D. & Salman, M. Population-based study of fecal shedding of *Clostridium perfringens* in broodmares and foals. J. Am. Vet. Med. Ass. 3, 2002: 342–348.

Tschirdewahn, B., Notermans, S., Wernars, K. & Untermann, F. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. Int J Food Microbiol. 2, 1991: 175–178.

Weese, J.S., Staempfli, H.R. & Prescott, J.F. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. Equine Vet. J. 33, 2001: 403–409.

Whitlock, R. H. & Buckley, C. Botulism. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. Rev., 1997: 107–128.

Wiberg, Å. Eventuell korrelation mellan hästens fekala flora och sjukdomssymptom. Svensk Veterinärtidning, 46, 1994: 549–555.

Wierup, M. Equine Intestinal Clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of *Clostridium perfringens* type A. Acta Vet. Scand. 62, 1977: 1–182.

Wierup, M. & DiPietro J. A. Bacteriologic examination of equine fecal flora as a diagnostic tool for equine intestinal clostridiosis. Am. J. Vet. Res. 42, 1981: 2167–2169.

KIRJOITTAJIEN OSOITTEET

Outi Kemiläinen, FM, agrologi, Kuopion yliopisto, soveltavan biotekniikan instituutti, PL 1627, 70211 Kuopio, outi.kemilainen@uku.fi, puh. 040 501 7961

Paula Hyvönen, ELL assistentti, Kuopion yliopisto, soveltavan biotekniikan instituutti

Markku Saastamoinen, MMT dos., Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT), hevostalous

Susanna Särkijärvi, MMM tutkija, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT), hevostalous

Atte von Wright, prof., Kuopion yliopisto, soveltavan biotekniikan instituutti

Artikkelin tutkimus on osa Outi Kemiläisen pro gradu -tutkielmaa