

TARTU ÜLIKOOL

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Zoologia osakond

Loomaökoloogia õppetool

Hanna-Liina Pärnik-Pernik

**SALMONELLOOSI ESINEMISSAGEDUS NING
SELLE VASTANE IMMUUNVASTUS ROHEVINDIL**

Magistritöö

Juhendaja: Elin Sild, PhD

Tartu 2020

Salmonelloosi esinemissagedus ning selle vastane immuunvastus rohevindil

Salmonelloos on mitmete väikeste värvuliste hulgas suure esinemissagedusega haigus ning võib põhjustada suurt suremust eelkõige toidumaju küllastavatel aialindudel. Töö eesmärk on uurida loodusest püütud rohevintidel fekaaliproovidest *Salmonella* bakteri esinemist, määrata fekaaliproovidest koktsidioosi nakkusintensiivsust ning uurida koktsidioosi-salmonelloosi koinfektsiooni koosmõju. Antud uurimustöös ei leitud *Salmonella* lipopolüsahhariidi süstimise mõju koktsidioosi nakkusintensiivsusele, aga leiti et *Salmonella* LPS-i süstimine mõjutas karotenoidide taset vereplasmas.

B280 Loomaökoloogia

Võtmesõnad: lipopolüsahhariid, *Carduelis chloris*, koinfektsioon, *Salmonella*, metsalind

Incidence rate of salmonellosis and immune response in greenfinches

Salmonellosis is a disease with a high incidence rate among several small passerines and may cause outbreaks of mortality in garden birds visiting bird feeders. The aim of the study was to investigate the existence of *Salmonella* bacteria in faecal samples of wild greenfinches, determine the intensity of coccidial infection in faecal samples and investigate the interaction between coccidiosis and salmonellosis co-infection. In this study, *Salmonella* LPS injection was not found to affect the intensity of coccidiosis, but injection of *Salmonella* LPS was found to affect carotenoid levels in the plasma.

B280 Animal ecology

Keywords: lipopolysaccharide, *Carduelis chloris*, co-infection, *Salmonella*, wild bird

Sisukord

1. Sissejuhatus	5
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1. Salmonelloos	7
2.1.1. Salmonelloosi sümptomid	7
2.2. Salmonelloosi esinemine värvulistel	8
2.3. Toidumajade roll nakkuse levikul	9
2.4. Karotenoidid	9
2.4.1. Karotenoidid ja LPS	10
3. Materjal ja meetodid	12
3.1. Uurimisobjekti iseloomustus	12
3.2. Katses immuunsüsteemi aktiveerimiseks kasutatud meetodid	12
3.2.1. LPS-lipopolüsahhariid	12
3.2.2. Koktsidioos	13
3.3. <i>Salmonella</i> testimine fekaalidest	14
3.4. <i>Salmonella</i> testimine korjusel	16
3.5. Karotenoidide mõõtmine	17
3.6. ELISA meetod	17
3.7. Andmeanalüüs	17
3.8. Töö autori roll	18
4. Tulemused	19
4.1. Salmonelloosi esinemissagedus	19
4.2. Salmonelloosi-koktsidioosi katse	19
5. Arutelu	24
5.1. Salmonelloosi esinemissagedus rohevintidel Eestis	24
5.2. Immuunaktivatsiooni mõju karotenoididele	25
5.3. Immuunaktivatsiooni mõju koktsidioosi dünaamikale	26
5.4. <i>Salmonella</i> LPS-süstimise mõju <i>Salmonella</i> vastastele antikehadele	27
Kokkuvõte	28

Summary.....	29
Tänuavaldused.....	30
Kasutatud kirjandus	31

1. Sissejuhatus

Koinfektsioon on looduses sagedasti esinev olukord, kus organismi ründab samaaegselt kaks või enam patogeeni (Pedersen, & Babayan, 2011). Koinfektsioonide uurimine aitab mõista immuunvastusega seotud kulusid ja kasu. Organism võib suruda alla ühte tüüpi immuunvastust ning taluda vähem virulentset patogeeni selle nimel, et suuta virulentsema patogeeni vastu tõhusamat immuunkaitset luua. Koinfektsioonidel on suur mõju tervisele, sest koinfektsioonid võivad olla märksa kahjustavamad kui iga patogeeni mõju eraldi võetuna (Griffiths, Pedersen, Fenton & Petchey, 2011).

Immuunsüsteem on väga keeruline, täpselt kontrollitud ning tihedalt seotud organismi teiste funktsioonidega. Erinevat tüüpi haigustekitajate vastu aktiveeritakse erinevad immuunsüsteemi osad ning samaaegselt surutakse teisi osasid alla. Veel on ebaselge, kuidas immuunsüsteem reageerib olukorras, kus organismi ründab samaaegselt mitu erinevat patogeeni (Paterson, 2013).

Immuunkaitse ei ole alati kõigi haigustekitajate vastu maksimaalse võimsusega, see oleneb immuunvastusele vajaminevast energiast ning süsteemi enda ressursside olemasolust. Samavõrra oluliseks kuluks võivad olla immuunvastuse käigus tekitatud vabade radikaalide poolt põhjustatud kahjustused. Vabad radikaalid ründavad ning hävitavad patogeene, kuid võivad ka mitteküllaldase antioksidantide hulga korral põhjustada oksüdatiivseid kahjustusi organismi enda kudedele (Schantz, Bensch, Grahn, Hasselquist & Wittzell, 1999).

Immuunvastust võivad otseselt tugevdada karotenoidid – antioksidantsete omadustega rasvlahustuvad looduslikud ühendid (Surai, 2002). Kui organismil puudub piisav antioksidantide kaitse, siis oksüdatiivsed stressorid ja vabad radikaalid mõjutavad normaalset metabolismi ja immuunsüsteemi kaitsevõimet. See võib põhjustada ulatuslikku kahjustust nukleiinhappetele, valkudele ja lipiididele (Hõrak, Zilmer, Saks, Ots, Karu & Zilmer, 2006). On teada, et emaslinnult üle kandunud karotenoidid on embrüote arendamisel kasulikud antioksidandid. Karotenoidid näivad etendavat olulist rolli redoks homöostaasi säilitamisel embrüonaalse arengu ajal ja esimeste päevade jooksul pärast koorumist (Surai, 2002).

Mitmesugused parasiidid pärsvad karotenoididel põhinevate tunnuste avaldumist (Navara, 2003). Looduslikes populatsioonides puutuvad isendid pidevalt kokku paljude haigustekitajatega ning organismid peavad oma tervise kaitsmiseks aktiveerima

immuunvastuse (Pedersen, *et al.*, 2011). Siseparasiidid, koktsiidid, võivad mõjutada karotenoidide sisaldust sulgedes ja seega karotenoidset värvust rohevintidel (Hõrak, Saks, Karu, Ots, Surai & McGraw, 2004). Linnud peavad tegema kompromisse: kas kasutada karotenoide dekoratiivsel eesmärgil või tugevdada immuunfunktsiooni (Navara, 2003).

Salmonelloos on mitmete väikeste värvuliste hulgas suure esinemissagedusega haigus ning näiteks rohevintidel suurim talvise suremuse põhjustaja kiskluse kõrval (Refsum, Vikøren, Handeland, Kapperud & Holstad, 2003). *Salmonella* võib põhjustada suurt suremust aialindudel, kes külastavad toidumaju ja -aluseid (Pennycott, Cinderey, Park, Mather & Foster, 2002). Samuti on leitud, et talvised salmonelloosi puhangud inimeste seas toimusid samaaegselt salmonelloosi puhangutega aialindudel, seega võisid just aialinnud olla nakkusallikaks inimestele ja koduloomadele (Tizard, 2004).

Eestis vabalt elavate lindude salmonelloosi kohased teaduslikud uuringud veel puuduvad ning pole teada, milline on salmonelloosi osakaal lindude talvises suremuses ning kui suur osa linde on nakatunud.

Töö eesmärk on uurida loodusest püütud rohevintide fekaaliproovidest määratud *Salmonella* bakteri esinemist. Samuti määrata fekaaliproovidest koktsiidinakkuse esinemist ja intensiivsust ning uurida koktsidioosi-salmonelloosi koinfektsiooni koosmõju.

Rohevint on hea mudelorganism koinfektsiooni uurimise jaoks, kuna rohevindil on looduslikult väga kõrge koktsidioosi esinemissagedus, samuti on sellel liigil muudes riikides tehtud uuringute põhjal küllaltki kõrge salmonelloosi esinemissagedus. Lisaks sellele võimaldavad rohevintide karotenoidsed ornamendid uurida koinfektsiooni mõjusid sugulises valikus olulistele signaaltunnustele (sule värvus).

Rohevintidel tehtav koinfektsiooni katse võib anda uut infot, kuidas erinevate haigustekitajatega samaaegselt võitlemine mõjutab organismi seisundit, immuunsüsteemi, signaaltunnuseid, käitumist ning oksüdatiivse stressi taset. Sellistest teadmistest võib olla hiljem abi nii inimeste kui loomade haiguskulu paremaks mõistmiseks ning tõhusamate ravimeetodite väljatöötamiseks.

Töö hüpoteesideks on: 1. salmonelloos on Eestis talvituvatel rohevintidel sagedasti esinev haigus; 2. salmonelloosi vastane kaitsereaktsioon lindudel mõjutab koktsidioosi intensiivsust ning karotenoidide taset veres.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Salmonelloos

Salmonella on Gram-negatiivsete enterobakterite mitmekesine rühm, mille klassifikatsioon on viimastel aastatel muutunud. Praegu arvatakse, et lindude ja imetajate *Salmonella* koosneb ühest liigist, mida nimetatakse *Salmonella enterica* ja see jaguneb vähemalt 2300 serotüübiks. *S. enterica*, serotüüp *Typhi* põhjustab spetsiifiliselt inimestel konkreetset haigust, kõhutüüfust. Teisi, näiteks *S. enterica*, serotüüp *Typhimurium*, mis on kõige laiemalt levinum, peetakse mittespetsiifiliseks, kuna see on võimeline nakatama erinevaid liike (veiseid, sigu, närlisi, linde) (Anderson, Ward, de Saxe & de Sa, 1977; Tizard, 2004). *Salmonella* on keskkonnas püsiv patogeen, mis võib ellu jääda ja paljuneda erinevates keskkondades, sealhulgas loomades, mis moodustavad osa inimese toiduahelast (Krawiec, Kuczkowski, Kruszewicz & Wieliczko, 2015).

Salmonella bakter elab selgroogsete soolestikus ning väheses koguses on bakter organismile kahjutu. Kuid tingimustes, kus peremeesorganismi resistentsus ja immuunsüsteem on nõrgenenud, või kui nende mikroobikeskkonnas toimuvad muutused, suureneb bakterite arv märkimisväärselt, tungib peremeesorganismi ning põhjustab haigusi ja surma. Salmonelloosi leidub nii lindudel kui ka imetajatel, sealhulgas ka inimestel (Tizard, 2004).

Inimestele on salmonelloos tuttav linnulihakasvanduses, kus salmonelloos on oluline haiguste ja surma põhjus ning saastunud linnukasvatustooted põhjustavad inimese tervisele suurt ohtu. *Salmonella* baktereid esineb ka metsalindudel, kus nad levivad inimeseni koduloomade kaudu. Salmonelloos on hästi tuntud linnuhaigus, mida esineb üha sagedamini, kuna selle levik metsalindude populatsioonides on suurenenud viimase mõnekümne aastaga lisatoitmise tõttu inimeste poolt (Tizard, 2004).

2.1.1. Salmonelloosi sümptomid

Salmonelloosi puhangu ilmnemiseks on kolm eeldust. Esiteks, et linnu populatsioonis on liigiga kohanenud *Typhimurium*'i tüüp. Teiseks on suur lindude populatsiooni tihedus, et *Salmonella* bakter saaks kergesti levida uutele vastuvõtlikele peremeesorganismidele. Ning kolmandaks eelduseks on stressifaktor, näiteks järsk toidupuudus, külm ilm või bakterite kogunemine organismis kriitilise arvuni (Pennycott, Ross, McLaren, Park, Hopkins & Foster, 1998; Tizard, 2004).

Salmonelloosi kliinilised nähud lindudel on lühikesed, 2-3 tundi (Kirkwood, Holmes & Macgregor, 1995). Nakatunud varblased näiteks ei taha lennata, tunduvad hajameelsed, seejärel varisevad kokku ning surevad kiiresti. Linnud, kes peavad vastu kuni 24 tundi on kohevil sulgedega ning liikumatud. Kõhulahtisus ei ole haiguse peamine tunnus (Tizard, 2004). Salmonelloosi üheks kliiniliseks tunnuseks on ülemiste seedetrakti kahjustuste teke, mille tagajärjel lind ei suuda neelata (Grant, Todd & Pennycott, 2007). Kaalulangus on lindudel erinev ning see oleneb ka lindude suremise kiirusest. Ägeda haiguse korral ei pruugi surnud isendil alati olla märgatavat kaalukadu (Tizard, 2004). Biomeetriline analüüs näitab, et madal rasvasisaldus ja väikene mass on olulised indikaatorid hilises staadiumis *Salmonella* positiivsete lindude tuvastamisel (Grant *et al.*, 2007).

Lemmikloomade salmonelloosi nakatumine on seotud metsikute laululindude söömisega, eriti just kevadisel ajal. Arvatakse, et kassid, kes jahivad linde söötjates, saavad kätte nakatunud linnud, kes ei jõua eest ära lennata. Ka nendest kassidest on eraldatud serotüüp *Typhimurium*. Tavaliseks linnuliigiks, keda kassid püüavad, on vintlased, eriti urvalind (*Acanthis flammea*). Kasside haigust iseloomustab 2-5 päevane inkubatsiooniperiood (Refsum *et al.*, 2003).

Nakatunud kassidel esineb depressioon, isutus, oksendamine, hemorraagiline enteriit ja palavik. Haigus kestab tavaliselt 2-7 päeva ning täielik taastumine võib võtta kuni kolm nädalat. Nõrgenenud immuunsusega kassid võivad surra (Refsum *et al.*, 2003; Tizard, 2004).

2.2. Salmonelloosi esinemine värvulistel

Salmonella baktereid, eriti *Salmonella enterica*, serotüüp *Typhimurium*, leidub tavaliselt metsalindude soolestikus. Kõige sagedasemalt esinevad salmonelloosi puhangud metsalindude hulgas värvulistel. Seda soodustab aialindude lisatoitmine linnumajakestes, sest nii koguneb linde suurel hulgal toitmiskohtadesse. Toidumajad saastuvad kiiresti fekaalidega ning *Salmonella* bakteri levimise kiirus võib olla drastiliselt suur. Suurima riski all on vindid ja varblased, need linnud kannavad *S. enterica Typhimurium*'i tüvesid, mis on spetsiaalselt kohanenud laululindudega. Nakatunud linnud võivad nakatada inimesi, kas otsesel käitlemise tagajärjel või tüüpilisemal juhul kaudselt kodukasside kaudu (Tizard, 2004).

Salmonelloosi esinemissagedus tervislikes ja looduslikes rändlindude populatsioonis on väike. Eriti lindude puhul, kes elavad inimtegevusest eemal, näiteks kasvandustest ja reoveepuhastusjaamadest või keda lindude söötmiskohad ei meelita (Tizard, 2004).

2.3. Toidumajade roll nakkuse levikul

Laululindude toitmine talvekuudel, mis on alati olnud populaarne, on lindude jaoks väga oluline toiduallikas. Alates 1960-ndatest aastatest on suure energiasaldusega seemned, näiteks päevalilleseemned meelitanud üha enam söötjatesse suuri laululinde. Linnud jätaavad söötmiskohtadesse ja nende ümber omakorda suhteliselt suures koguses väljaheiteid. Talvised salmonelloosi puhangud on aias olevate toidumajade otsene tagajärg, kuna sinna koguneb suurel hulgal seemnetoidulisi linde (Kirkwood, 1998). Puuduvad andmed, mis kinnitaksid, et lindude hukkumine toimub sagedamini söötjate läheduses kui mujal. Samuti ka surnud linnud süüakse ära karnivooride poolt ning leitud surnud lindude arv ei anna kindlasti usaldusväärset hinnangut kõikide hukkunud lindude kohta. James K. Kirkwoodi saadud andmed viitasid sellele, et nakkushaigustest põhjustatud surmajuhtumeid esines söötjate läheduses, kus pakuti ohtralt toitu oluliselt sagedamini, kui kohtades, kus toitu oli vähem (Tizard, 2004).

Salmonelloosi levimise vältimiseks toitumiskohtades tuleb hoiduda suurte linnuparvede ligimeelitamist, vältimaks nakkuse levikut väljaheidete kaudu. Platvormidel söötjad, mis korraga mahutavad suurt hulka linde, saastuvad kõige tõenäolisemalt. Kasulik on varustada mitut söötjat, vältimaks agressiivseid kokkupõrkeid toidu pärast. Söötjatesse tuleb vähem toitu panna ning vältida toitmist kevadel ja suvel, mil looduslikke toiduallikaid on palju. Oluline on veel hoida toidumajad puhtad ning kui võimalik kasutada linnumaja puhul sellist disaini, mis vähendaks toidusaastumist väljaheidetega ning ei laseks seemnetel maha kukkuda (Tizard, 2004).

2.4. Karotenoidid

Linnud on kõige värvilisemad selgroogsed isendid. Karotenoidsed pigmendid on lindude sulestikus oluline komponent. Karotenoidide saadakse toidust ning ladustatakse sulgedes, hea toiteväärtuse korral saadakse erksamad ja värvilisemad mustrid (Navara, 2003). Eredamad pigmendid (erinevad punased, oranžid ja kollased toonid) (Brush, 1990; Navara, 2003) on

karotenoidid, teine oluline ühend, mis annavad sulgedele värvi, on melaniinid. Melaniinid vastutavad enamiku pruunide, mustade ja hallide värvide eest (Brush, 1990).

Karotenoidel põhinev värvus on olnud oluline kriteerium emastel isase valimisel. Isaste lindude ergas värvus reklaamib emaste jaoks nende toiduleidmise oskust, head konditsiooni ning väikest parasiitide hulka (Hill, 2002).

Karotenoidsed pigmendid võivad otseselt tugevdada selgroogsete immuunvastuseid (Bendich, 1989). Normaalseks funktsioneerimiseks vajatakse karotenoide märkimisväärse koguses, aga karotenoidide kasutamine on väidetavalt piiratud paljunemise, tervisega seotud funktsioonide või signaaltunnuste väljaarendamise osas (Costantini & Møller, 2008). Linnud peavad tegema kompromisse, kas kasutada karotenoide immuunfunktsiooni tugevdamise või dekoratiivse väljanägemise jaoks (Bendich, 1989).

Epidemioloogilistes uuringutes on leitud, et kõrge karotenoidide ja beetakaroteeni sisaldava toidu tarbimine on seotud teatud vähivormide (kopsuvähi) väiksema esinemissagedusega (Bendich, 1991).

2.4.1. Karotenoidid ja LPS

Rajput *et al.*, (2013) uuringu eesmärk oli võrrelda kahe karotenoidi (kurkumiini ja luteiini) mõju pigmenteerumisele ja immuunsusele lipopolüsahhariidiga mõjutatud broileritibudes. Linnud jagati kolme toitumisrühma: põhidieet ilma karotenoidi sisaldavate lisanditeta (kontroll); põhidieet, millele on lisatud 200 mg/kg kurkumiini ja põhidieet 200 mg/kg luteiini 42 päeva jooksul (Rajput, Naeem, Ali, Zhang, J.F., Zhang, L. & Wang 2013).

Kurkumiin (ksantofüllkarotenoid) on kurkumite peamine toimeaine, mis on saadud harilikust kollajuure (*Curcuma longa*) taimest (Awang, Pengiran, Ungku, M., Ungku, C. & Ahmad 1992). Luteiin on saialilledes looduslikult esinev ksantofüllkarotenoid (Lokaewmanee, Yamauchi, Komori & Saito, 2011). Looduslikel karotenoididel oli mõju broileri lihaste värvile ja rinnaliha keskmine kollasuse protsent oli luteiini saanud lindudel vastavalt 39,62% ja 31,70% kõrgem kui kontrollgrupil ja kurkumiini saanud lindudel, seda nii LPS kui ka kontrollrühmas. Karotenoididel oli mõju broilerite immuunsüsteemi tööd mõjutava hormoone tootva kõhurasva kaalule ning LPS-iga süstimata lindudel oli kurkumiinilisandiga lindudel kõhurasva mass vastavalt 31,31% ja 18,29% madalam kui kontroll ja luteiinilisandiga lindudel. LPS-iga süstitud lindude kaalus aga

kurkumiinilisandiga lindude kõhurasv vastavalt 38,37% ja 3,73% väiksem kui kontroll ja luteiinilisandiga lindudel (Rajput *et al.*, 2013).

Uuringu andmed kõhurasvakohta kinnitavad, et kurkumiin soodustab rasvade ainevahetust ning kõhupiirkonna rasvamass oli luteiinisaldusega lindudel madalam kui kontroll lindudel. Seega järeldus on, et karotenoididel (eriti kurkumiinil) on positiivne mõju broilerikanade soolestiku morfoloogiale, seedimisele ja immuunomodulatsioonile ja pigmentatsioonile (Rajput *et al.*, 2013).

LPS-iga mõjutatud lindude puhul võivad bioaktiivsed ühendid, nagu karotenoidid, oligosahhariidid ja antotsüaniinid osaliselt leevendada broilerite kasvuvõimet, põletikulisi parameetreid ja soolestiku morfoloogiat (Csernus, Biró, Babinszky, Komlósi, Jávora, Stündl, Remenyik, Bai, Oláh, Pesti-Asbóth & Czeglédi, 2020).

3. Materjal ja meetodid

Katse on tehtud loomkatse loa number 136 ja Keskkonnaameti korralduse number 1-3/18/2985 alusel. Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus on „Oksüdatiivne stress, immuunfunktsioon, käitumine ja sugulised signaalid koinfektsiooni tingimustes“.

3.1. Uurimisobjekti iseloomustus

Rohevint (*Carduelis chloris*) on keskmise suurusega värvuline, kaalub kuni 30 grammi ning on peamiselt seemnetoiduline. Levimisala on lääne palearktiline regioon (Cramp & Perrins, 1994). Isaslinnud on suuremad ja värvide poolest eredamad (Svensson, 1992). Erinevates piirkondades võivad värvid veidikene erineda, aga üldjuhul on vanemad isaslinnud pealtpoolt oliivirohelised ning kõhu alt erekollased. Selgelt kollased on veel tiiva ja saba välimised suled. Emased on väiksemad ning rohkem pruunikamad, nende sulestikus esineb vähem kollaseid toone, mis on pigem tuhmkollane, mitte ere (Cramp & Perrins, 1994). Noore isase, kes ei ole värvuselt veel nii ere, võib seetõttu kergelt segi ajada emaslinnuga.

Rohevint on hea näidisliik laboris töötamiseks oma paraja suuruse poolest, aga eriti seetõttu, et ta talub väga hästi vangistust (Sepp, 2012). Uurimustöö on läbi viidud Tartus, Vanemuise 21 lindlas. Rohevindid on püütud Külitse alevikust (58° 19' N, 26° 37' E) 2019. ja 2020. aasta jaanuaris. Igat lindu hoiti eraldi puuris (27 x 51 x 55) samas ruumis. Puurid asetsesid riiulitel nii, et linnud said üksteist ka näha. Ruumi valgustingimused hoiti võimalikult sarnaselt looduses toimuvale, imiteeriti ööpäeva tsüklit. See tähendab, et ruum läks automaatselt valgeks samal ajal, kui seda läks väljas hommikul ning tuli kustus, kui õhtul läks pimedaks. Temperatuur oli keskmiselt 17 kraadi ning õhuniiskus 30 protsenti. Lindudel vahetati joogivett igapäevaselt ja päevalilleseemned oli saadaval *ad libitum* (piiramatult).

3.2. Katses immuunsüsteemi aktiveerimiseks kasutatud meetodid

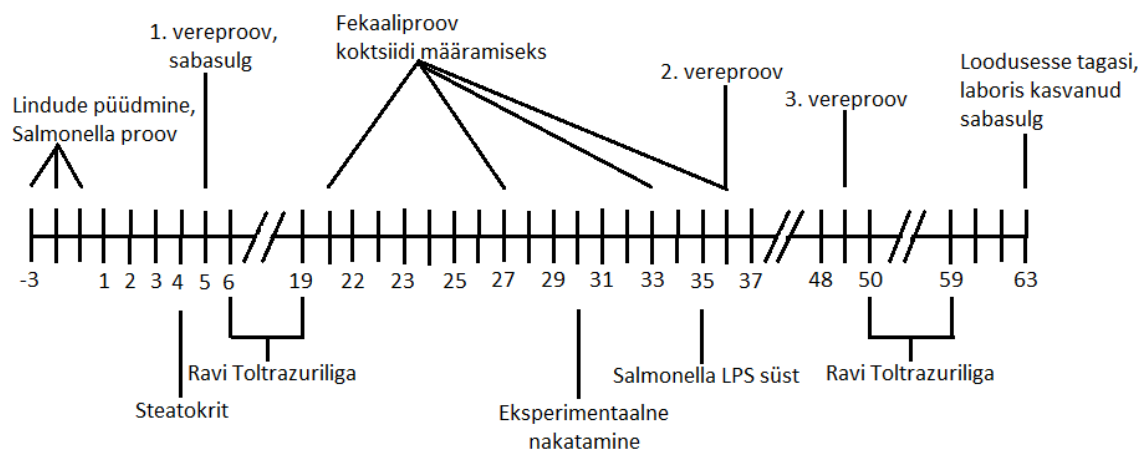
3.2.1. LPS-lipopolüsahhariid

Lipopolüsahhariid (LPS) ehk endotoksiin on Gram-negatiivsete bakterite välismembraani peamine koostiosa, mis põhjustab tugevat immuunvastust. LPS koostisesse kuulub hüdrofiilne polüsahhariidne osa ja hüdrofoobne domeen lipiid A, mis tagab LPS bioloogilise aktiivsuse (Lilleoja, 2007; Raetz & Whitfield, 2002). Lipiid A on LPS lipiidne osa, mis ei

ole bakteriliikide (või serotüüpide) hulgas varieeruv ja vastutab LPS toksilisuse eest (Tuin, 2007). LPS-i kasutatakse erinevates eksperimentaalsetes süsteemides (*in vivo*, *in vitro*) infektsioonide jäljendamiseks (Lilleoja, 2007). Bakteriaalne LPS on immuunsüsteemi üks võimsamaid aktivaatoreid, põhjustades mittespetsiifilise põletikulise vastuse (Mueller, Lindner, Kusumoto, Fukase, Schromm & Seydel, 2004).

Katselinnud jagati kahte erinevasse menetlusgruppi: koktsiididega nakatatud ja salmonelloosi väljakutsega (23 lindu) ning koktsiididega nakatatud linnud, kuid ilma salmonelloosi väljakutseta linnud (22 lindu). Antut katses rohkem katsegruppe polnud võimalik teha, kuna valim oleks liiga väikeseks jäänud.

Salmonelloosi väljakutsega gruppi süstiti rinnalihasesse 0.1 mg *Salmonella* LPS-iga lahustatuna 40 µl (standartne doos) steriilses füsioloogilises lahuses, teisele katsegrupile süstiti samaaegselt sama kogus steriilset füsioloogilist lahust. 36 katsepäeval (joonis 1) võeti lindudelt teine vereproov (150 µl) *Salmonella* vastaste antikehade taseme määramiseks, immuunfunktsiooni, oksüdatiivse stressi ning biokeemiliste näitajate mõõtmiseks. Samuti mõõdeti fekaalidest koktsiidinakkuse olemasolu ja intensiivsust ning lindude seedefektiivsust (antud töös mitte kajastatud).



Joonis 1. Katseplaan 2019.

3.2.2. Koktsidioos

Koktsidioos on laialdaselt levinud ning lind võib nakatuda haigusesse igal ajal (Friend & Franson, 1999). Koktsiidid on mitmekesine ja keeruline parasitne algloomade rühm, kes pärinevad *Isospora* perekonnast (Hõrak *et al.*, 2004; Friend & Franson, 1999).

Koktsiidid võivad stimuleerida peremeesorganismi immuunsussüsteemi fagotsütilisi rakke, et tekitada superoksiidi aniooni, mis iseenesest või vabade radikaalide kaskaadide initsiaatorina põhjustab patoloogiat ja oksüdeerib karotenoide (Allen, Danforth & Levander, 1997).

Katse käigus tuleb ka arvestada, et vangistuses olevate lindude karotenoidide tase on madalam, kui vabalt elavatel lindudel (Hõrak *et al.*, 2004). Teistes uuringutes on leitud tõendeid, et karotenoididel põhinev värvus looduses on korrelatsioonis koktsidioosinakkuse intensiivsusega (Olsen, 1996).

Peale esimest vereproovi läbisid linnud 14 päeva kestva ravi koktsiidistaatilise ravimiga Toltrazuril, mille käigus lisati nende joogivette 2ml/L Intracox Oral lahust, mis sisaldab 25 mg/L Toltrazurili.

Linnud nakatati koktsiidinakkusega oraalselt manustades neile mikropipeti abil 2000 koktsiidi ootsüsti 0,1 ml kraanivees. Koktsiidinakkuse intensiivsust mõõdeti parasiitide ootsüstide kontsentratsioonina väljaheites (Saks, Karu, Ots & Hõrak, 2006).

Katse lõppedes lasti kõik linnud tagasi loodusesse esialgsesse püügipiirkonda. Enne loodusesse tagasi laskmist raviti kõiki linde uuesti 10 päeva koktsiidistaatilise ravimiga Toltrazuril.

3.3. *Salmonella* testimine fekaalidest

Töö meetodiks kasutati RapidChek SELECT *Salmonella* testimise süsteemi, mis on välja töötatud Romer Labs ettevõtte poolt. Testkomplekt on loodud patogeensete *Salmonella* bakterite tuvastamiseks. Testkomplekti jõudlust vaatas üle AOAC uurimisinstituut ning see on kooskõlas vastavalt nõuetele (Package Insert).

Testkomplekti võimekust kontrollis töö autor Veterinaar- ja Toidulaboratooriumist saadud *Salmonella* bakteritega: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Anatum ATCC9270 ja lindudele spetsiifiline *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum DSM 13674.

Fekaaliproovide kogumiseks paigutati paberid puuride põhja päevasel ajal, mil lindude elutegevus on aktiivsem ning hoiti neid puurides vähemalt kaks tundi. Paberitelt teisaldati fekaaliproovid eraldi Stomacheri kottidesse ning igale kotile märgiti linnu number ja fekaali kogus grammides.

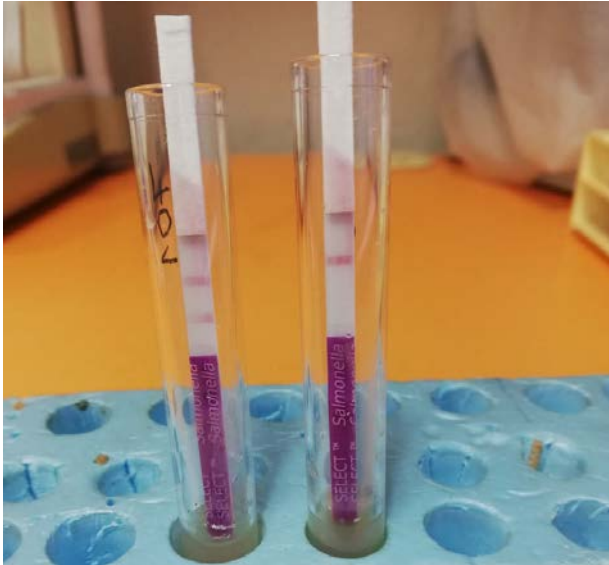
Järgmiseks valmistati juhendi järgi esmane sööde. Ühe liitri söötme jaoks kaaluti 20.0 ± 0.2 grammi RC SELECT *Salmonella* esmast söödet (Primary Media) ning lahustati see ühe liitri deioniseeritud veega. Lahust loksutati seni, kuni kogu pulber lahustus. Antud söödet võib autoklaavida 15 minutit temperatuuril $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, sellisel juhul säilib sööde hiljem kuni neli nädalat, temperatuuril $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antud töös on alternatiivina sööde kohe ära kasutatud, ilma autoklaavimata, sellisel juhul säilib sööde kuni kolm tundi. Parim on sööde kohe pärast valmimist ära kasutada, sest söötmes võivad ka muud bakterid kasvama hakata. Enne proovide rikastamist soojendati sööde inkubaatoris 42 kraadi peale ning vahetult enne kasutamist lisati söötmele ühe liitri kohta kümme milliliitrit lisandit (Supplement). Lisandit tuleb säilitada $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures (külmkapis) ("Romer RC SS Ceca Protocol").

Esmane sööde lisati seejärel fekaaliproovi sisaldavasse Stomacheri kotti. Söödet lisati kotti lahjendusastmega 1:10 (ühe grammi fekaali kohta lisada kümme milliliitrit söödet). Seejärel segati omavahel kotis olevad fekaalid ja sööde. Kotiava suleti lõdvalt. Kui sööde oli fekaalidega segunenud, hoiti seda õhu inkubaatoris temperatuuril $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16-22 tundi ("Romer RC SS Ceca Protocol").

Järgneval päeval valmistati teisene sööde (Secondary Media). Selle jaoks kaaluti 7.4 ± 0.2 grammi söödet 100 milliliitri deioniseeritud vee kohta. Loksutati kuni kogu pulber lahustus. Valminud sööd säilib külmkapis kuni kaks nädalat, kui sööde kuumutada keemiseni, samal ajal magnetiga segades.

Testkomplektis on kaasas veel spetsiaalsed tuubid ja ühekordsed pipetid. Tuubidesse pipeteeriti iga proovi jaoks eraldi üks millimeeter teisest söödet. Kui esmase söötme rikastatud proov on inkubaatorist välja võetud, lisati tuubi, mis sisaldas juba teisest söödet, üks pipetitais (kümme mikrolliitrit) esmases söötmes inkubeeritud fekaaliproovi. Teisese söötme tuube loksutati õrnalt. Enne inkubaatorisse panemist kaeti tuubid fooliumiga ning inkubeeriti temperatuuril $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16-22 tundi.

Kolmandal päeval loksutati tuube uuesti õrnalt. Igasse rikastatud tuubi asetati üks *Salmonella* SELECT riba (nooled ees). Ribadel lasti proovides seista kümme minutit ning seejärel hinnati tulemust 20 minuti jooksul. Ühe punase joone ilmumine, ülemisel juhtjoonel, näitab negatiivset tulemust. Kahe punase joone ilmumine, ka väga õrnalt nähtav joon, näitab positiivset tulemust (joonis 2).



Joonis 2. Positiivne (vasakul) ja negatiivne (paremal) *Salmonella* SELECT riba (autori foto).

3.4. *Salmonella* testimine korjusel

Korjuse jaoks valmistati puhverdatud peptonvesi. RapidChek SELECT *Salmonella* testimise juhend on mõeldud suurematele lindudele, näiteks kanadele ning juhendis on kirjas, et iga linnu kohta valada peptonvett 400 milliliitrit. Antud töös muudeti meetodikat vastavalt kasutatud linnuliigile ning seetõttu kasutati 100 milliliitrit peptonvett. Peptonvee jaoks lisati ühe liitri (destilleeritud vesi) koguse kohta 20 grammi pepton pulbrit ning seejärel autoklaaviti 15 minutit 121°C. Karkass paigutati eraldi Stomacheri kotti, valati peale 100 milliliitrit puhverdatud peptonvett (BPW) ning loksutati.

Karkassi jaoks on vaja teha kõrgema kontsentratsiooniga esmane sööde. Ühe liitri kohta läheb vaja 40.0 ± 0.2 grammi söödet ning lahustada deioniseeritud veega. Vahetult enne kasutamist tuleb lisada 20 milliliitrit toidulisandit.

Karkassiga Stomacheri kotist pipeteeriti kolm milliliitrit peptonvett uude Stomacheri kotti ning lisati kolm milliliitrit esmast söödet ja seejärel loksutati. Ka neid koguseid on vähendatud, juhendis on kirjas 30 milliliitrit. Kott tuleb õrnalt sulgeda ja inkubeerida 16-22 tundi, 42°C juures.

Teisest söödet tehti sama kogus, mis fekaalide puhulgi, 7.4 ± 0.2 grammi söödet 100 milliliitri deioniseeritud vee kohta. Igasse tuubi pandi üks milliliiter teisest söödet ning kümme mikrolitrit inkubaatoris olnud esmasest söötmes rikastatud proovi. Inkubeeriti

temperatuuril 42°C 16-22 tundi. Pärast inkubeerimist asetati üks *Salmonella* SELECT riba igasse rikastatud tuubi ja lasti ribal 10 minutit proovis seista.

Salmonella suhtes positiivse linnuga kokku puutunud puurid ning muud vahendid, samuti *Salmonella* suhtes positiivse linnu korjus, desinfitseeriti vastavalt nakkusohtlike materjalide käitlemise korrale. Nakkusohtliku materjaliga kokkupuutevõimalusi omavad inimesed kandsid vastavaid ühekordseid isikukaitsevahendeid. Nakkusohtliku materjali käideldi laboris, mis vastab 2. ohutasemele ning seda tehti vastavalt sotsiaalministri määrustele „Nõuded nakkusohtlikumaterjali käitleva isiku laboriruumidele, sisseseadele ja tehnoloogiale ning rakendavatele ohutusmeetmetele“ ning „Nakkusohtliku materjali käitlemise kord“.

3.5. Karotenoidide mõõtmine

Karotenoidide kontsentratsioonid määrati spektrofotomeetriliselt, kasutades atsetoonikindlaid mikrotiiterplaate. Atsetooni (150 µl) lisati 15 µl plasmale ja tsentrifugeeriti 10 minutit kiirusel 16 800 G. Supernatandi neeldumine mõõdeti lainepikkusel 449 nm, mis vastab luteiini maksimaalsele neeldumisele atsetoonis. Kalibreerimiskõverad valmistati, kasutades standardina luteiini (X-6250; Sigma, St Louis, MO, USA) (Hõrak, Saks, Karu & Ots, 2006).

3.6. ELISA meetod

Antikehade taseme määramiseks kasutati ELISA (immunoensüümmeetod) meetodit. Kasutati BioChek *Salmonella* B ja D rühma antikehade testikomplekti. Testi tehti vastavalt tootja juhendile ning positiivsed ja negatiivsed kontrollid toimisid nagu pidid.

3.7. Andmeanalüüs

Tulemuste analüüsimisel kasutati programme Microsoft Office Excel ja STATISTICA 10. Koksiidide ja karotenoidide andmed ei olnud normaaljaotuses, mistõttu tuli neid tunnuseid logaritmitseendada, kasutati log₁₀ teisendust. Pärast logaritmimeist analüüsiti tulemusi lineaarse mudeliga (GLM), Spearmani korrelatsiooniga ja T-testiga. Statistiliselt oluliseks erinevuseks loeti $p < 0,05$.

3.8. Töö autori roll

Töö autor viis läbi uurimistööga seotud laborikatsed, oli abiks lindude hooldamisel, katse menetluse läbiviimisel, proovide kogumisel ja analüüside tegemisel. Andmeanalüüs viidi läbi autori poolt juhendaja juhendamisel.

Fekaaliproovide, vereproovide ja koktsiidide kogumisega ning lindude hooldamisega tegelesid Ulvi Karu ja Mari-Ann Lind. Ulvi Karu analüüsis ka karotenoide. Richard Meitern ja Tuul Sepp osalesid vereproovide kogumisel. Lindude püügiga aitasid Art Villem ja Kristjan Adojaan.

4. Tulemused

4.1. Salmonelloosi esinemissagedus

Uurimistöös jooksul testiti salmonelloosi esinemist 142 linnul, millest kaks proovi olid positiivsed (tabel 1), mõlemad proovid olid aastast 2009. Kõigist salmonelloosi suhtes uuritud lindudest oli salmonelloosi suhtes positiivseid linde 1,4%. Samas aastal 2009 testitud seitsmest linnust osutus positiivseks kaks, mis on 29% sellel aastal testitud lindudest.

Tabel 1. Salmonelloosi suhtes testitud linnud erinevatel aastatel ning nende jaotumine erinevate sugude ja vanuseklasside vahel. Esimeses tulbas on vastaval aastal testitud lindude koguarv, viimasel tulbas on vastaval aastal leitud salmonelloosi suhtes positiivseks osutunud lindude arv. Tühjade lahtrite korral vastav teave puudub. Andmed aastatest 2019 ja 2020 on testitud lindudelt kogutud värsketest fekaalidest, ülejäänud aastate kohta on andmed saadud sügavkülmutatud korjuste analüüsimisel.

Aasta	Lindude kogu arv	Emaseid	Isaseid	Täiskasvanuid	Noorukeid	<i>Salmonella</i> suhtes positiivseid
2003	1	määramata	määramata	määramata	määramata	0
2009	7	määramata	1	määramata	määramata	2
2010	1	määramata	määramata	määramata	määramata	0
2014	1	määramata	1	1	määramata	0
2015	14	2	12	6	4	0
2019	58	18	28	21	26	0
2020	60	13	47	32	25	0

4.2. Salmonelloosi-koktsidioosi katse

Täiskasvanute ja noorukite kehamasside vahel ei olnud olulist erinevust katse algul (t-test, $p=0,93$; $N=19$; keskmine täiskasvanu=29,16g; $N=25$; keskmine juveniil=29,22g; standardhälve täiskasvanu=2,08; standardhälve juveniil=2,28) ega katse lõppedes (t-test, $p=0,98$; $N=18$; keskmine täiskasvanu =30,0g; $N=25$; keskmine juveniil =29,98 ; standardhälve täiskasvanu=3,33; standardhälve juveniil=2,93).

Samamoodi ei olnud kehamassil olulist erinevust emaste ja isaste lindude vahel, esimesel päeval (t-test, $p=0,33$; $N=29$; keskmine isastel=29,42g; $N=15$; keskmine emastel=28,74g; standardhälve isastel=2,46; standardhälve emastel=1,43) ja katse viimasel päeval (t-test,

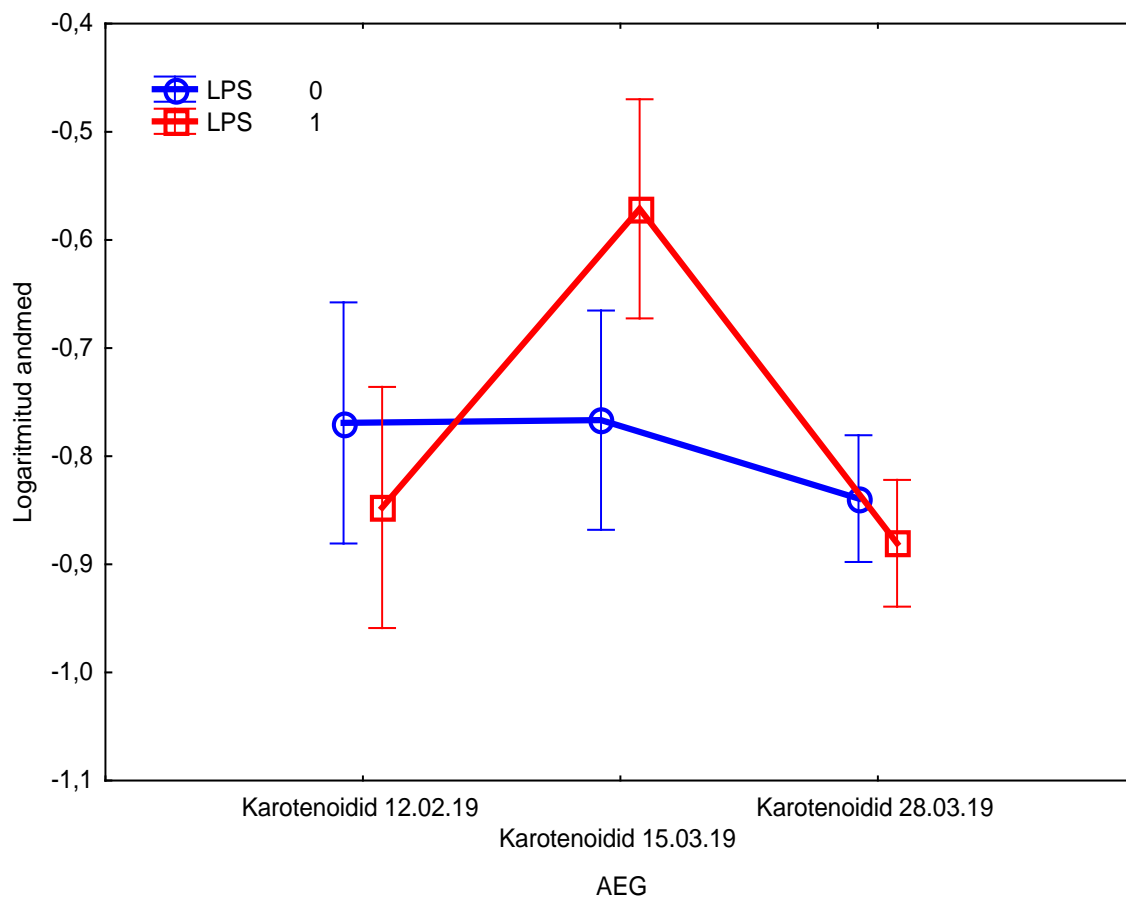
$p=0,87$; $N=29$; keskmine isastel= $29,93\text{g}$; $N=14$; keskmine emastel= $30,1\text{g}$; standardhälve isastel= $3,27$; standardhälve emastel= $2,69$). Olulist erinevust ei olnud kehamassil LPS-iga süstitud lindude ja kontrollgrupi lindude vahel katse esimesel päeval (t-test, $p=0,29$; $N=21$; keskmine kontrollgrupp= $29,56\text{g}$; $N=22$ keskmine süstitud= $28,85\text{g}$; standardhälve kontrollgrupp= $2,36$; standardhälve süstitud= $2,01$) ja katse viimasel päeval (t-test, $p=0,74$; $N=22$; keskmine kontrollgrupp= $30,09$; $N=22$; keskmine süstitud= $29,79$; standardhälve kontrollgrupp= $2,78$; standardhälve süstitud= $3,34$).

Katseplaani kohaselt toimus 30. katsepäeval eksperimentaalne nakatamine (joonis 1) koktsiidinakkusega. Kehamassi ja nakkusintensiivsuse vahel oli oluline seos 49. katsepäeva (3. vereproov) hommikul kaalutud lindude ja samal päeval mõõdetud nakkusintensiivsusega (Spearman; $N=44$; $R=-0,30$; $p<0,05$). Teistel katsepäevadel olulist seost kaalutud lindude ja nakkusintensiivse vahel ei olnud.

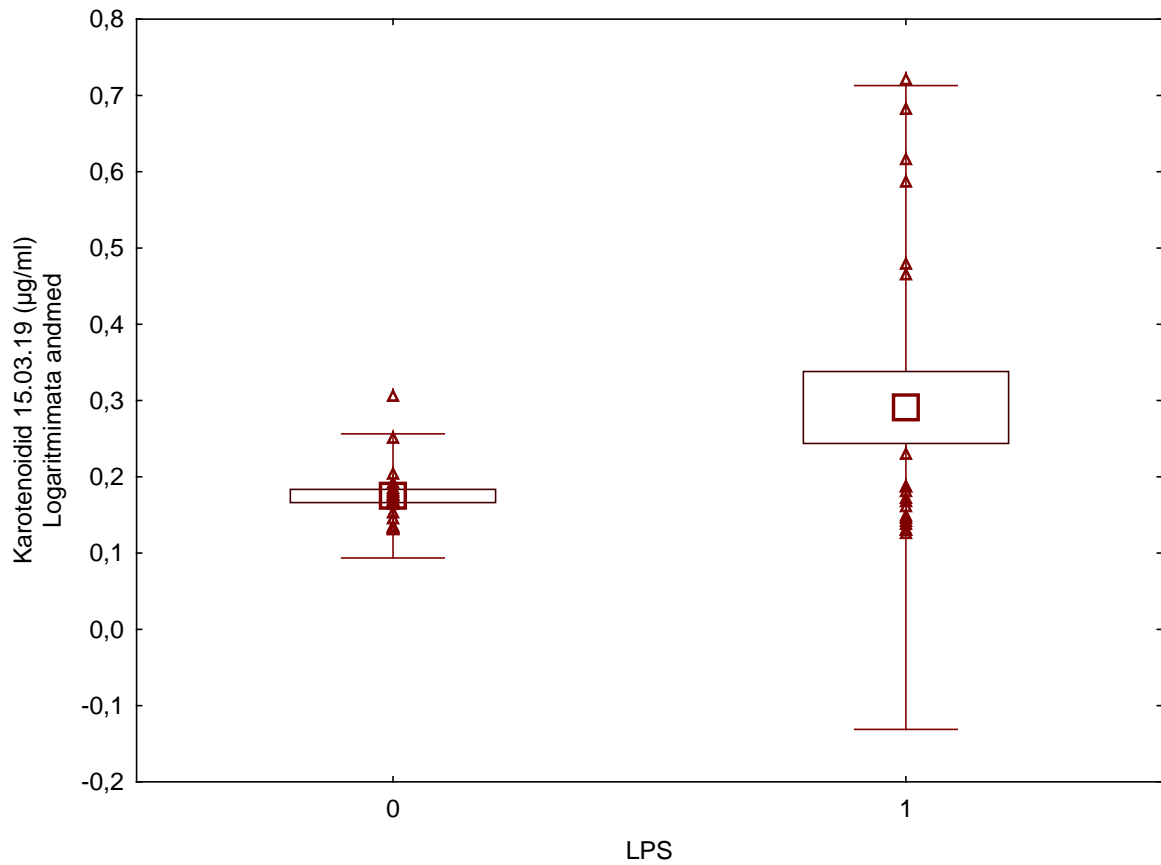
Spearmani korrelatsioon antud katses ei näidanud karotenoidide ja koktsiidide vahel olulist seost $p>0,05$.

Katse 36. päeval (15.03.2019), 24 tundi pärast LPS süsti tõusis karotenoidide tase *Salmonella* LPS-iga süstitud lindudel oluliselt võrreldes kontrollgrupi lindudega. (joonis 3) (t-test, $p<0,05$; $N=22$; keskmine kontrollgrupp= $-0,77\mu\text{g/ml}$; keskmine süstitud= $-0,57\mu\text{g/ml}$; standardhälve kontrollgrupp= $0,09$; standardhälve süstitud= $0,32$) (joonis 4).

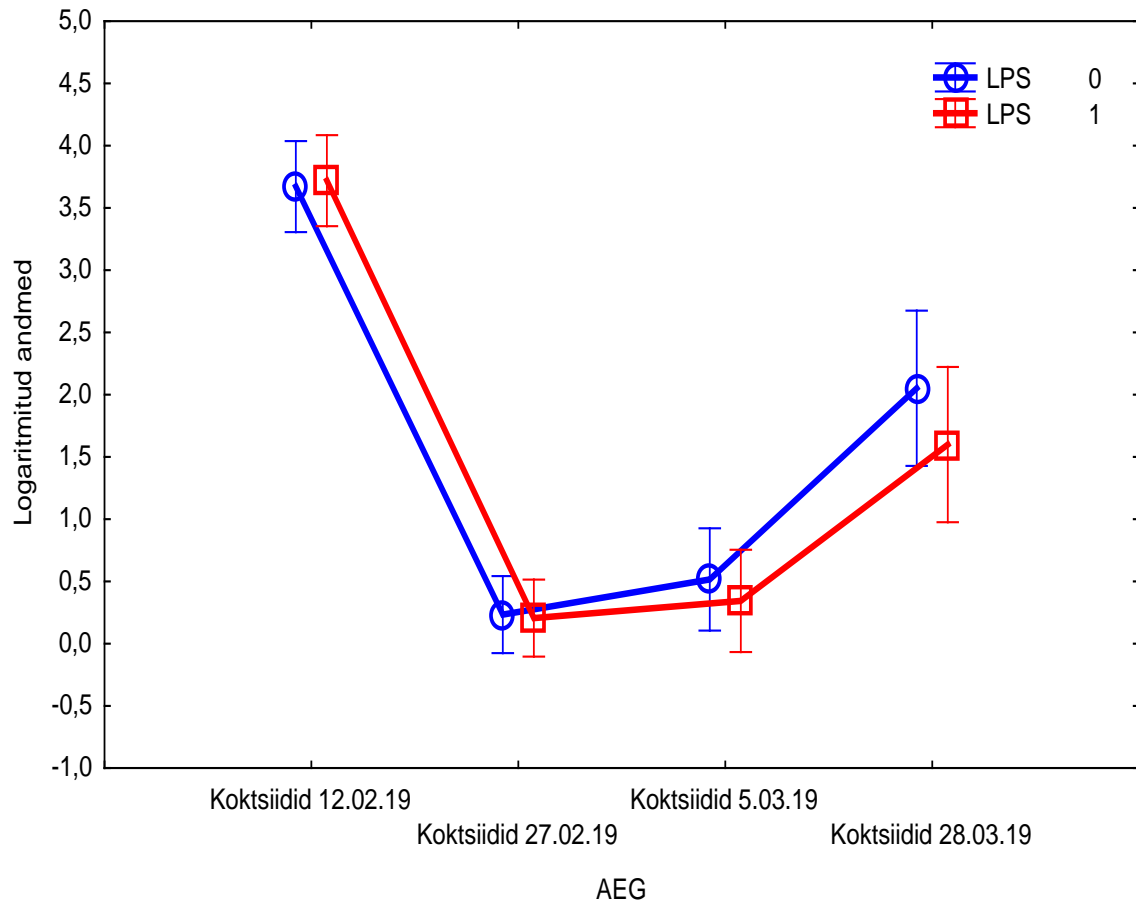
Jooniselt viis on näha, et LPS süst ei mõjutanud koktsiidinakkuse intensiivsust *Salmonella* LPS-iga süstitud lindudel võrreldes kontrollgrupi lindudega (joonis 5).



Joonis 3. Lineaarne mudel *Salmonella* LPS-i süstimise mõjust karotenoidide tasemele vereplasmas. Punase värviga on kujutatud karotenoidide dünaamika *Salmonella* LPS-iga süstitud lindudel, sinise värviga on kujutatud vastav dünaamika kontrollgrupi lindudel viiendal, 36. ja 49. katsepäeval. LPS-lipopolüsahhariid



Joonis 4. Karotenoidide tasemed vereplasmas *Salmonella* LPS-iga süstitud lindudel võrreldes kontrollgrupi lindudega 24 tundi peale süstimist. 15.03.19. Väike ruut tähendab keskmist, kolmnurgad algandmeid, t-test, logaritmitamata andmed.



Joonis 5. Lineaarne mudel *Salmonella* LPS-i süstimise mõjust koktsiidinakkuse tasemele. Punase värviga on kujutatud koktsiidinakkuse dünaamika *Salmonella* LPS-iga süstitud lindudel, sinise värviga on kujutatud vastav dünaamika kontrollgrupi lindudel 21., 27., 33. ja 36. katsepäeval. LPS-lipopolüsahhariid.

5. Arutelu

5.1. Salmonelloosi esinemissagedus rohevintidel Eestis

Käesolevas töös uuriti esmakordselt salmonelloosi esinemissagedust Eesti metsalindudel. Salmonelloosi suhtes uuriti 142 rohevinti ning nendest osutusid salmonelloosi suhtes positiivseteks kaks 2009. aastal surnud lindu, mis on 1,4% kõigist lindudest, kuid samas 29% 2009. aastal testitud lindudest. Teistes maades on leitud mitmeid erinevaid salmonelloosi esinemissagedusi metsalindudel.

Gruusias tehtud uuringus avastati broilerikanade majade läheduses metsalindude väljaheiteid, millest kuni 33% olid *Salmonella* suhtes positiivsed (Tizard, 2004). 2002. aastal Šotimaa edelaosas tehtud uuringus hinnati 12 kuu jooksul lindude väljaheiteid söötjate läheduses. Ühes linnusöötjas, kus aastaringselt toideti palju linde, eraldati 42-48% väljaheidetest serotüüp *Typhimurium*. Teises kohas, kus linde söödeti ainult talvekuudel leiti ainult kaks positiivset fekaaliproovi. Esimeses toidukohas esines rohkem surnud linde (Tizard, 2004).

Salmonelloosi on Skandinaavias hästi uuritud, 1999.-2000. aasta talveperioodil Norras, püüti linnumajadest 1990 lindu (peamiselt vindid), nendest 2% olid nakatunud serotüüpi *Typhimurium*. Aastaringselt püüti kinni 2377 aktiivselt rändavat lindu Kagu-Rootsi rannikualadelt. Eraldati haruldane *Salmonella* serotüüp *Schleissheim* hoburästalt (*Turdus viscivorus*), mille kohta varem on teateid tulnud ainult Türgist. See on kooskõlas varasema uuringuga, kus teadlased ei suutnud tuvastada salmonelloosi 101 värvuliselt, mis püüti kevadise rände ajal kohe Rootsi saabumisel (Tizard, 2004). *Salmonella* serotüüp *Typhimurium* on Euroopa Liidus kõige sagedamini esinenud inimese salmonelloosi resotüüp ning see esineb vabalt elavate lindude seas (Krawiec *et al.*, 2015).

Rohevintide salmonelloosi positiivsed nakkusjuhtumid on tuvastatud jaanuaris ja veebruaris ning näib, et salmonelloosihooaeg on seotud rohevintide toitumisaladega (Grant *et al.*, 2007).

Grant *et al.*, (2007) uuringu tulemus näitas, et salmonelloosi oli nakatunud 18 lindu 336st. Linde püüti aastaringselt ning püütud lindudest suurema osa moodustas rohevint (40,5%). Kokku oli esindatud 13 linnuliiki, millest viiel liigil oli *Salmonella* suhtes positiivne tulemus.

Kokkuvõttes moodustasid nakatunud linnud 5,4%, aga jaanuaris ja veebruaris püütud rohevindid moodustasid nakatunud lindudest 28.6% (Grant *et al.*, 2007). Põhja-Inglismaal oli 24 uurimisala (ajavahemikul veebruarist 2005 kuni oktoobrini 2006), kus metsalindudelt leiti 32 *Salmonella enterica* serotüüpi, millest 29 oli *S. enterica*, serotüüp *Typhimurium* (Hughes, Shopland, Wigley, Bradon, Leatherbarrow, Williams, Bennett, de Pinna, Lawson, Cunningham & Chantrey, 2008). Võrreldes teistes maades leitud salmonelloosi esinemissagedusega oli käesolevas töös leitud salmonelloosi esinemissagedus madal. Lindude valim oli väike ning seega ei pruugi leitud salmonelloosi sagedus peegeldada tegelikku olukorda Eestis.

Antud uuringus leiti kaks positiivset *Salmonella* tulemust 2009. aastast – see võib seotud olla mõne muu nakkushaigusega, mis nõrgestas lindude immuunsüsteemi. Algloom *Trichomonas gallinae* on lindude trihhomonoosi põhjustaja. Haigus tuvastati esmakordselt 2005. aastal Suurbritannias hilissuvel ja sügisel, eriti levis haigus rohe- ja metsvintide (*Fringilla coelebs*) seas (Ganas, Jaskulska, Lawson, Zadavec, Hess & Bilic, 2014). 2008. aasta teisel poolel, teatati rohe- ja metsvintide suremusest Fennoskandia lõunaosas Roots, Norras ja Soomes (Neimanis, Handeland, Isomursu, Agren, Mattsson, Hamnes, Bergsjö & Hirvela-Koski, 2010). Lisaks alates 2009. aprillist suurenes rohevintide suremus trihhomonoosi Põhja-Saksamaal (Ganas *et al.*, 2014).

Salmonelloosi osakaalu leidmiseks lindude talvise suremuse põhjustajana tuleks üle Eesti teha mitu uurimisala, nagu Hughes *et al.*, (2008) uurimustöös, et avastada lindude korjuseid, kes on surnud salmonelloosi tõttu ning koguda uurimisaladelt fekaaliproove. Usaldusväärsete andmete saamiseks tuleks rohkem linde püüda talveperioodil (jaanuar, veebruar), et teada saada, kui suur osa linde on nakatunud.

Kirjandusele põhinedes viitavad leiud, et *S. Typhimurium* nakkus värvulistel püsib metsalindude populatsioonides ning nakkus võib kohaneda peremees-spetsiifiliseks. Selle edasiseks uurimiseks tuleks pikema aja jooksul teha sarnaseid töid laiemal tasandil (Hughes, *et al.*, 2008).

5.2. Immuunaktivatsiooni mõju karotenoididele

Käesolevas töös leiti, et *Salmonella* LPS-iga süstitud lindudel tõusis süstimisjärgselt veres karotenoidide tase kontrollgrupi lindudega võrreldes oluliselt. Arvatavasti põhjustas LPS

süst rohevintidel mittespetsiifilise põletikulise vastuse. Organismi põletikuline vastus on esmane kaitsemehhanism, mis toimub vahetult pärast vigastust või nakatumist, mis on vajalik homöostaasi taastamiseks pärast kahjustava toimeaine täielikku elimineerimist (Coutinho & Chapman, 2011). Põletiku vähendamiseks tõusis karotenoidide tase, et tugevdada kaitsereaktsiooni ja immuunfunktsiooni. Antud töös karotenoidide tulemus on esmakordne ning uuritud kirjandusest taolisi tulemusi ei leitud.

Lipopolüsahhariidide mõju kohta on tehtud mõningaid uuringuid, näiteks lindude (broileri) jõudlusele, kasutades *in vivo* protseduure ja erinevaid nakatamise doose (Rauber, Perlin, Fin, Mallmann, Miranda, Giacomini & Nascimento, 2014).

Zhang *et al.*, (2010) uuring näitas, et LPS-iga süstitud lindude kehakaal tõusis vähem kui süstimata lindude puhul. Lisaks ilmnes LPS-iga nakatunud lindudel hüpertermia ($0,95 \pm 0,38^{\circ}\text{C}$ kõrgem kaks tundi pärast süstimist) ja haiguslik käitumine nagu isutus ja letargia (Zhang, Zhong, Zhou, Wang, Du & Wang, 2010).

Vastupidiselt käesolevas uuringus leitudle vähendas immuunsüsteemi aktiveerimine Aguilera ja Amati rohevintidel tehtud uuringus lindude veres ringlevaid karotenoide oluliselt ja need olid antigeenidega süstitud lindudel 29,4% madalamad kui kontrollgrupil. Rohevintidel läbi viidud neljast uurimisgrupist kahele lisati tavalisele seemnetoidule lisaks joogivett lahustatud ksantofüllidega. Ülejäänud kahele grupile anti seemnetoit ja tavaline vesi. Tulemused näitasid tugevamat immuunvastust karotenoididega lisatoidetud rohevintidel, samas eredamatel isastel oli madalam immuunvastus (Aguilera & Amat, 2007).

Karotenoidide olulist mõju immuunvastusele on näidanud ka Sepp *et al.*, (2011). Nende uuringust selgub, et karotenoidide seotus koktsidioosi vastase immuunvastuse moduleerimisel viitab sellele, et karotenoididel põhinevad kaunistused võivad näidata isendite võimet krooniliste infektsioonidega toime tulemisega (Sepp, Karu, Sild, Männiste & Hõrak, 2011).

5.3. Immuunaktivatsiooni mõju koktsidioosi dünaamikale

Antud uurimustöös ei leitud, et *Salmonella* LPS-i süstimine oleks mõjutanud koktsiidinakkuse intensiivsust LPS-iga süstitud lindudel võrreldes kontrollgrupi lindudega. Üheks variandiks võib olla, et LPS mõju oli liiga leebe ja lühiajaline, mis tõttu see ei avaldanud mõju kroonilisele koktsidoosile. Teiseks variandiks võib olla see, et koktsidioosi

tase linnus on juba optimaalne. Juhul kui lind saab mõjutada nakkuse intensiivsust ning ei saa lasta koktsiidinakkust intensiivsemaks, võib koktsidiosis reageerida vähem LPS-ile ja on võimalik, et lind leiab LPS-i süstimise põhjustatud immuunvastuse toetamiseks mujalt ressursse juurde (karotenoidid) (Hõrak, Saks, Karu & Ots, 2006). Veel on võimalik seletus, et lind koktsiidinakkust ei kontrolli ja nakkus ongi juba maksimaalne, see tähendab, et koktsiid juba sigibki nii palju kui jõuab.

5.4. *Salmonella* LPS-süstimise mõju *Salmonella* vastastele antikehadele

Antud uuringus ei õnnestunud lindude vereseerumist mõõta *Salmonella* vastaseid antikehasid. *Salmonella* antikehade mõõtmine teostati vastavalt tootja juhendile ning mõõtmise õnnestumist ja testikomplekti toimimist tõestasid negatiivse ja positiivse kontrolliga saadud ettenähtule vastavad tulemused. Testikomplekt oli välja töötatud kanadel kasutamiseks ning selle mitte toimimise põhjuseks on ilmselt kanade ning rohevintide *Salmonella* vastaste antikehade erinevus.

Kokkuvõte

Koinfektsioon on looduses sagedasti esinev olukord, kus organismi ründavad samaaegselt kaks või enam patogeeni. Koinfektsioonidel on suur mõju tervisele, sest koinfektsioonid võivad olla märksa kahjustavamad kui iga patogeeni mõju eraldi võetuna.

Immuunkaitse ei ole alati kõigi haigustekitajate vastu maksimaalse võimsusega, see oleneb immuunvastusele vajaminevast energiast ning ressursside olemasolust. Immuunvastust võivad otseselt tugevdada karotenoidid, kus lind teeb kompromisse näiteks dekoratiivsel eesmärgil või tugevama immuunfunktsiooni kasuks.

Salmonelloos on mitmete väikeste värvuliste hulgas suure esinemissagedusega haigus ning võib põhjustada suurt suremust aialindudel, kes külastavad toidumaju. Aialinnud võivad olla peamiseks nakkusallikaks inimestele ja koduloomadele. Salmonelloosi levimise vältimiseks tuleb hoiduda suurte linnuparvede ligi meelitamist linnu söötjatesse, et ei koguneks suurel hulgal saastunud väljaheiteid.

Töö hüpoteesideks oli: 1. salmonelloos on Eestis talvituvatel rohevintidel sagedasti esinev haigus; 2. salmonelloosi vastane kaitsereaktsioon lindudel mõjutab koktsidioosi intensiivsust ning karotenoidide taset veres.

Töös leitud salmonelloosi sagedus ei pruugi näidata tegelikku olukorda, sest salmonelloosi esinemissagedust uuriti Eestis esmakordselt. Salmonelloosi suhtes positiivseteks osutusid 1,4% kõigist lindudest, samas positiivseid proove leiti 2009. aastal testitud lindudest 29%.

Antud uurimustöös ei leitud, et *Salmonella* LPS-i süstimine oleks mõjutanud koktsiidinakkuse intensiivsust LPS-iga süstitud lindudel võrreldes kontrollgrupi lindudega. Üheks seletuseks võib olla, et LPS mõju oli liiga leebe ja lühiajaline, ning seetõttu ei avaldanud mõju koktsidoosile või koktsidioosi tase linnus on juba optimaalne ning lind ei saa lasta koktsiidinakkust intensiivsemaks, seetõttu võib koktsidioos reageerida vähem LPS-ile.

Salmonella LPS-iga süstitud lindudel tõusis süstimisjärgselt veres karotenoidide tase kontrollgrupi lindudega võrreldes oluliselt. Seda võib seletada sellega, et LPS süstimine võis põhjustada mittespetsiifilise põletikulise vastuse. Põletiku vähendamiseks tõusis karotenoidide tase, et tugevdada kaitsereaktsiooni ja immuunfunktsiooni.

Summary

Co-infection is common situation in nature, where organism is attacked by two or more pathogens at the same time. Co-infections have a major impact on health and can be far more harmful than the effects of each pathogen alone.

Immune defence is not always at maximum capacity against all pathogens, it depends on the energy required for the immune response and the availability of resources. Immune response can be directly enhanced by carotenoids. Birds compromise the use of carotenoids for decorative expressions or for stronger immune function.

Salmonellosis is a high incidence rate disease among several small passerines and can cause high mortality outbreak in garden birds visiting bird feeders. Garden birds can be a major source of *Salmonella* infection for humans and domestic animals. To control salmonellosis at bird feeders, avoid attracting overwhelming numbers of birds and so preventing the build-up of contaminated feces.

The hypotheses of the work were: 1. salmonellosis is a common disease in wintering greenfinches in Estonia; 2. the protective reaction against salmonellosis in birds affects the intensity of coccidiosis and the level of carotenoids in the blood.

Salmonellosis incidence rate was studied for the first time in Estonia therefore the frequency of salmonellosis found in the work may not indicate the actual situation. 1,4% of all birds were tested positive for salmonellosis, while 29% of birds tested in 2009 were positive for *Salmonella*.

In this study, it was not found that the injection of *Salmonella* LPS affected the intensity of coccidial infection in LPS-injected birds compared to control birds. Which means that the effect of LPS was too mild and short-lived or the level of coccidiosis in the bird is already optimal and the bird cannot let the coccidial infection intensify, therefore coccidiosis may be less responsive to LPS.

Birds injected with *Salmonella* LPS had significantly increased carotenoid levels in blood after injection compared to control birds. That could be explained by the non-specific inflammatory response caused by LPS injection. To reduce inflammation, carotenoid levels were increased to strengthen the defense response and immune function.

Tänuavaldused

Tänan enda juhendajat, Elin Silda, igakülgse aitamise eest magistritöö valmimisel. Tänan kõiki töörühma liikmeid (Ulvi Karu, Mari-Ann Lindu, Richard Meinterni ja Tuul Seppa), kes aitasid minu küsimustele lahendusi leida ning kes juhendasid mind laboritööde läbiviimisel. Tänan veel Art Villem Adojaani ja Kristjan Adojaani, kes aitasid lindlasse rohevinte püüda. Olen tänulik, et sain just immuunökoloogia ja inimese käitumisökoloogia töörühmas oma uurimistööd teha. Uurimistööd finantseeris Eesti Teadusagentuur (PUT653 ja IUT34-8).

Kasutatud kirjandus

- Aguilera, E. & Amat, J.A. (2007). Carotenoids, immune response and the expression of sexual ornaments in male greenfinches (*Carduelis chloris*). *Naturwissenschaften*, *94*, 895–902.
- Allen, P., Danforth, H. & Levander, O. (1997). Interaction of dietary flaxseed with coccidia infections in chickens. *Poultry Science*, *76*, 822–827.
- Anderson, E.S., Ward, L.R., de Saxe, M.J. & de Sa, J.D.H. (1977). Bacteriophage-typing designations of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Hygiene*, *78*, 297–300.
- Awang, I., Pengiran, R., Ungku, M., Ungku, C. & Ahmad, F. (1992). Curcumin for upgrading skin colour of broilers. *Pertanika*, *15*, 37-38.
- Bendich, A. (1989). Carotenoids and the immune response. *Journal of Nutrition*, *119*, 112–115.
- Bendich, A. (1991). β -Carotene and the immune response. *Proceedings of the Nutrition Society*, *50*, 263–274.
- Brush, A.H. (1990). Metabolism of carotenoid pigments in birds. *The FASEB Journal*, *4*, 2969–2977.
- Costantini, D. & Møller, A.P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology*, *22*, 367–370.
- Coutinho, A.E. & Chapman, K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *335*, 2–13.
- Cramp, P. & Perrins, C.M. (1994). *The birds of the Western Palearctic*. Oxford University Press, Oxford.
- Csernus, B., Biró, S., Babinszky, L., Komlósi, I., Jávora, A., Stündl, L., Remenyik, J., Bai, P., Oláh, J., Pesti-Asbóth, G. & Czeglédi, L. (2020). Effect of carotenoids, oligosaccharides and anthocyanins on growth performance, immunological parameters and intestinal morphology in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animals*, *10*, 347.
- Friend, M. & Franson, J.C. (1999). Field manual of wildlife diseases. General field procedures and diseases of birds. In. DTIC Document.
- Ganas, P., Jaskulska, B., Lawson, B., Zadavec, M., Hess, M. & Bilic, I. (2014). Multi-locus sequence typing confirms the clonality of *Trichomonas gallinae* isolates circulating in European finches. *Journal of Parasitology*, *141*, 652–661.

- Grant, D., Todd, P.A. & Pennycott, T. (2007). Monitoring wild greenfinch (*Carduelis chloris*) for *Salmonella enterica* Typhimurium. *Ecological Research*, 22, 571–574.
- Griffiths, E.C., Pedersen, A.B., Fenton, A. & Petchey, O.L. (2011). The nature and consequences of coinfection in humans. *Journal of Infection*, 63, 200–206.
- Hill, G.E. (2002). A red bird in a brown bag: the function and evolution of colorful plumage in the house finch. New York: Oxford University Press.
- Hughes, L.A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A.H., Williams, N.J., Bennett, M., de Pinna, E., Lawson, B., Cunningham, A.A. & Chantrey, J. (2008). Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 - 2006. *BMC veterinary research*, 4, 4.
- Hõrak, P., Saks, L., Karu, U. & Ots, I. (2006). Host resistance and parasite virulence in greenfinch coccidiosis. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 277–288.
- Hõrak, P., Saks, L., Karu, U., Ots, I., Surai, P.F. & McGraw, K.J. (2004). How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches. *Journal of Animal Ecology*, 73, 935–947.
- Hõrak, P., Zilmer, M., Saks, L., Ots, I., Karu, U. & Zilmer, K. (2006). Antioxidant protection, carotenoids and the costs of immune challenge in greenfinches. *Journal of Experimental Biology*, 209, 4329–4338.
- Kirkwood, J.K. (1998). Population density and infectious disease at bird tables. *Journal of Veterinary Record*, 142-468.
- Kirkwood, J.K., Holmes J.P. & Macgregor S. (1995). Garden bird mortalities. *Journal of Veterinary Record*, 136-372.
- Krawiec, M., Kuczkowski, M., Kruszewicz, A.G. & Wieliczko, A. (2015). Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC veterinary research*, 11, 15.
- Lilleoja, R. (2007). Lipopolüsahhariidi ja interleukin-2 toime hiire CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele. Tartu Ülikool, Tartu.
- Lokaewmanee, K., Yamauchi, K., Komori, T. & Saito, K. (2011). Enhancement of egg yolk color by paprika combined with a probiotic. *Journal of Applied Poultry Research*, 20, 90–94.
- Mueller, M., Lindner, B., Kusumoto, S., Fukase, K., Schromm, A.B. & Seydel, U. (2004). Aggregates Are the Biologically Active Units of Endotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26307–26313.

- Navara, K.J. (2003). Dietary carotenoid pigments and immune function in a songbird with extensive carotenoid-based plumage coloration. *Journal of Behavioral Ecology*, *14*, 909–916.
- Neimanis, A.S., Handeland, K., Isomursu, M., Agren, E., Mattsson, R., Hamnes, I.S., Bergsjø, B. & Hirvela-Koski, V. (2010). First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family *Fringillidae*) in southern Fennoscandia. *Journal of Avian Diseases*, *54*, 136–141
- Olson, V.A. (1996). Coccidia and sexual selection in the American goldfinch (*Carduelis tristis*): a test of the Hamilton–Zu hypothesis. MSc thesis, University of Guelph, Ontario, Canada.
- Package Insert - RapidChek SELECT Salmonella Test System.
- Paterson, S. (2013). The immunology and ecology of co-infection. *Journal of Molecular Ecology*, *22*, 2603–2604.
- Pedersen, A. B. & Babayan, S. A. (2011). Wild immunology. *Journal of Molecular Ecology*, *20*, 872–880.
- Pennycott, T.W., Cinderey, R.N., Park, A., Mather, H.A. & Foster, G. (2002). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype *Typhimurium* and *Escherichia coli* 086 in wild birds at two garden sites in south-west Scotland. *Journal of Veterinary Record*, *151*, 563–567.
- Pennycott, T.W., Ross, H.M., McLaren, I.M., Park, A., Hopkins, G.F. & Foster, G. (1998). Causes of death of wild birds of the family *Fringillidae* in Britain. *Journal of Veterinary Record*, *143*, 155–158.
- Raetz, C.R.H. & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, *71*, 635–700.
- Rajput, N., Naeem, M., Ali, S., Zhang, J.F., Zhang, L. & Wang, T. (2013). The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Journal of Poultry Science*, *92*, 1177–1185.
- Rauber, R.H., Perlin, V.J., Fin, C.D., Mallmann, A.L., Miranda, D.P., Giacomini, L.Z. & Nascimento, V. do. (2014). Interference of *Salmonella Typhimurium* lipopolysaccharide on performance and biological parameters of broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *16*, 77–81.
- Refsum, T., Vikøren, T., Handeland, K., Kapperud, G. & Holstad, G. (2003). Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella Typhimurium* infections in passerine birds in Norway. *Journal of Wildlife Diseases*, *39*, 64–72.

Romer RC SS Ceca Protocol.

- Saks, L., Karu, U., Ots, I. & Hõrak, P. (2006). Do standard measures of immunocompetence reflect parasite resistance? The case of greenfinch coccidiosis. *Journal of Functional Ecology*, 20, 75–82.
- Schantz, T. von., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D. & Wittzell, H. (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266, 1–12.
- Sepp, T. (2012). Hematological health state indices of greenfinches: source of individual variation and responses to immune system manipulation. Tartu Ülikool, Tartu.
- Sepp, T., Karu, U., Sild, E., Männiste, M. & Hõrak, P. (2011). Effects of carotenoids, immune activation and immune suppression on the intensity of chronic coccidiosis in greenfinches. *Journal of Experimental Parasitology*, 127, 651–657.
- Surai, P.F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. *Nottingham University Press, Nottingham*, 120, 257-264.
- Svensson, L. (1992). Identification guide to European passerine birds. British Trust for Ornithology, 368.
- Zhang, X., Zhong, X., Zhou, Y., Wang, G., Du, H. & Wang, T. (2010). Dietary RRR- α -tocopherol succinate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines secretion in broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 104, 1796–1805.
- Tizard, I. (2004). Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13, 50–66.
- Tuin, A. (2007). Detoxification of LPS by alkaline phosphatase: application of a new concept in sepsis and inflammatory bowel disease. Groningen (NL): University of Groningen.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hanna-Liina Pärnik-Pernik:

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Salmonelloosi esinemissagedus ning selle vastane immuunvastus rohevindil“, mille juhendaja on Elin Sild, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Hanna-Liina Pärnik-Pernik

26.05.2020