



Meiju Liukkonen

ANISAKIS SIMPLEX -LOISTEN ETSIMINEN KOMPRESSIOME- NETELMÄLLÄ

ANISAKIS SIMPLEX -LOISTEN ETSIMINEN KOMPRESSIOME- NETELMÄLLÄ

Meiju Liukkonen
Opinnäytetyö
Kevät 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä: Meiju Liukkonen

Opinnäytetyön nimi: Anisakis simplex -loisten etsiminen kompressiomenetelmällä

Työn ohjaaja(t): Erkki Winter, Perttu Koski

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2013 Sivumäärä: 44 + 2 liitettä

Tässä opinnäytetyössä etsittiin *Anisakis simplex* -loisia kompressiomenetelmällä. Työn tarkoituksena oli löytää menetelmä, jolla nähtäisiin *Anisakis simplex* -loiset Suomessa esiintyvistä kaloista. Käytännön osuus tehtiin syksyllä 2011 Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Tuotanto- ja villieläinterveyden tutkimusyksikössä Oulussa.

Alkuperäinen idea oli etsiä *Anisakis simplex* -loisia digestiomenetelmällä, jossa luotaisiin vatsalaukun olosuhteet ja hajotettaisiin entsyymaattisesti kalan lihan proteiineja, mutta tämä ei toiminut halutulla tavalla. Se oli hidasta ja sulamisjäännökset jäivät liian suuriksi. Päätettiin vaihtaa menetelmä kompressiomenetelmäksi, jossa kala litistettiin puristimen avulla ja litistelyistä tutkittiin loiset.

Kompressiomenetelmä havaittiin toimivaksi ja työssä ei löytynyt yhtään *Anisakis simplex*iä. Jos kyseisiä loisia olisi löytynyt, niin esimerkiksi kalaruokia valmistavien ravintoloitsijoiden olisi täytynyt ensimmäiseksi pakastaa kalat, jotta loiset olisivat kuolleet. Tämä olisi huonontanut kalojen lihan rakennetta.

Asiasanat: *Anisakis simplex*, kompressiomenetelmä, digestiomenetelmä

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	6
2 KALOISSA ESIINTYVIÄ LOISIA	7
2.1 <i>Anisakis simplex</i>	7
2.1.1 Kiertokulku	8
2.1.2 Levinneisyys	9
2.1.3 Vaikutus ihmiseen	9
2.1.4 Tartunnan ehkäisy	9
2.2 <i>Contracaecum osculatum</i>	10
2.2.1 Kiertokulku	10
2.2.2 Levinneisyys Suomessa	10
2.3 <i>Henneguya zschokkei</i>	11
2.4 <i>Diphyllbothrium dendriticum</i>	12
2.4.1 Loisen kiertokulku	12
2.4.2 Loisen esiintyminen ja tunnistus	13
2.4.3 Rakkuloiden esiintyminen	13
2.5 <i>Triaenophorus crassus</i>	13
2.5.1 Kiertokulku	15
2.5.2 Ennaltaehkäisy ja hoito	16
3 TUTKITTAVAT KALAT	17
3.1 Lohi	17
3.1.1 Ulkonäkö	18
3.1.2 Elinympäristö ja ravinto	19
3.1.3 Lisääntyminen ja kasvu	20
3.1.4 Ravinto ja syönnösalueet	20
3.2 Siiat	21
3.2.1 Ulkonäkö	21
3.2.2 Pohjasiika	22
3.2.3 Karisiika	22
3.2.4 Vaellussiika	23
3.2.5 Järvisiika	23

3.2.6 Planktonsiika	23
3.3 Silakka	23
3.3.1 Ulkonäkö	24
3.3.2 Lisääntyminen	25
3.3.3 Ravinto	25
4 TYÖSSÄ KÄYTETTÄVÄT MENETELMÄT	27
4.1 Kompressiomenetelmä	27
4.2 Digestiomenetelmä	28
5 TYÖN SUORITUS	29
5.1 Anisakismääritys Stomacher-digestiomenetelmällä	29
5.2 Kompressointi	30
5.3 Tarkastelu Woodin lampulla	33
6 TULOKSET	34
6.1 Kompressiomenetelmällä löydetyt loiset	34
6.2 Paljalla silmillä havaitut loiset	35
6.2.1 Tunnistetut loiset	35
6.2.2 Ei-tunnistetut loiset	36
6.3 Kompressiomenetelmän tuloksien yhteenveto	37
6.4 Paljain silmin havaittujen tulosten yhteenveto	38
6.5 Tekojärvistä löydetyt loiset	38
6.6 Kaikki tutkitut kalat	39
7 YHTEENVETO	41
8 LÄHTEET	42
LIITTEET	45
LIITE 1: KALALISTA	
LIITE 2: TYÖVÄLINEET JA REAGENSIT	

1 JOHDANTO

Aiheeksi valittiin *Anisakis Simplex* -loisten etsiminen kompressiomenetelmällä. Opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Tuotanto- ja villieläin-terveyden tutkimusyksikölle.

Opinnäytetyössä päätettiin alun perin käyttää digestiomenetelmää, jossa luotaisiin vatsalaukun olosuhteet, joissa kalanliha sulaisi. Tämä ei toiminut toivotulla tavalla, joten idea päätettiin hylätä. Tämän vuoksi kokeiltiin kompressiomenetelmää ja todettiin se toimivaksi. Kala fileoitiin ja prässättiin teollisuuspuristimen avulla litteäksi ja katsottiin Woodin lampun avulla löydettäisiinkö lihasta loisia.

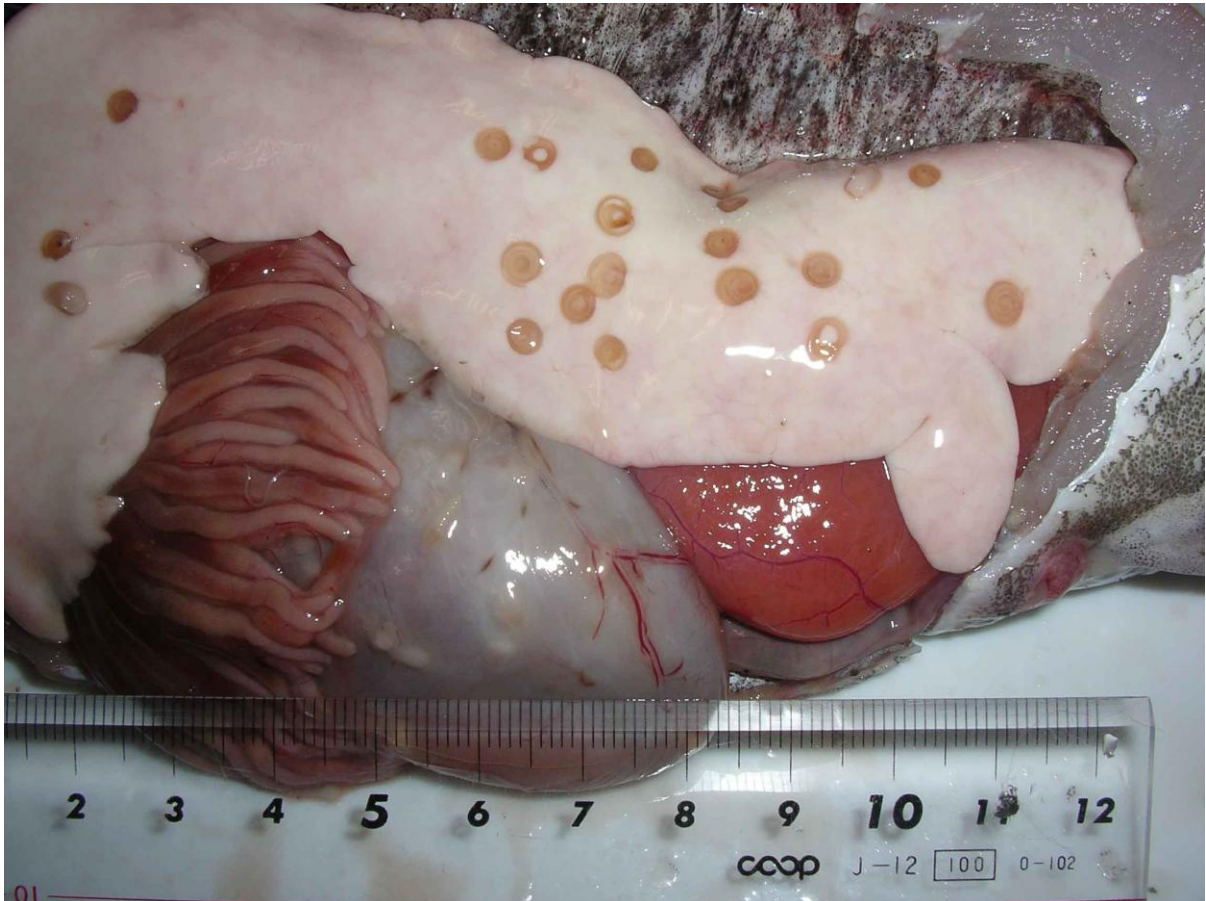
Kompressiomenetelmällä tutkittuja kaloja oli yhteensä 238. Näistä 93 kappaletta oli lohia, jotka tulivat Kemijokisuusta, Tornio- ja Simojoesta, Perämeren siikoja 50 kappaletta ja 95 kappaletta silakkaa Perämerestä. Myös Lokan ja Porttipahdan tekojärvistä tutkittiin yhteensä 60 kappaletta vaellussiikoja fileoimalla.

2 KALOISSA ESIINTYVIÄ LOISIA

Tässä luvussa kerrotaan tämän työn kannalta olennaisista loisista. Tarkasteluista loisista kerrotaan lähinnä Suomen näkökulmasta.

2.1 *Anisakis simplex*

Anisakis simplex on loinen, joka kuuluu sukkulamatoihin (Nematoda) (kuva 1) ja Anisakidae-heimoon. Sukkulamadoilla ei ole käytännön merkitystä viljellyille kaloille. Pituudeltaan loinen on 18–36 mm, leveydeltään 0,3–0,7 mm ja väriltään valkoinen. (1.) Mikroskoopilla katsottaessa loisen voi tunnistaa siitä, että vatsan muoto on pitkulainen ja se on neljä kertaa niin pitkä kuin loinen on leveydeltään. Kyseiseltä lajilta puuttuvat myös umpilisäkkeet. (2.) *Anisakis simplex* -loisesta käytetään myös nimitystä sillimato, sillä sen isäntänä toimii silli. (1.)



KUVA 1. *Anisakis simplex*- loisia lyyraturskan maksan pinnalla (1)

2.1.1 Kiertokulku

Anisakis simplex -loiset, kuten muutkin sukkulamadot, kuoriutuvat munista. Toukat kasvavat ja vaihtavat pintakerroksensa neljästi, ja tämän jälkeen kehittyvät sukukypsä yksilö. Neljää toukkavaihetta kutsutaan L1- (larva 1), L2-, L3- ja L4- vaiheiksi. Useimmilla sukkulamatalajeilla L1- ja L2- vaiheessa olevat toukat ovat kehittyneet munassa. L3-vaiheen toukka siirtyy pääisäntään ja tämä voi kehittyä aikuiseksi loiseksi L4-vaiheen jälkeen. Pääisännässä naaras ja uros loinen parittelee ja tuloksena syntyy hedelmöittyneitä munia tai toukkia.(2.)

Suomen vesille *Anisakis simplex* -loisten leviämistä rajoittaa se, että sopivia ensimmäisiä väli-isäntiä ei ole ja pääisännät, kuten pienvalaat ovat harvinaisia (Pohjanmerellä pyöriäiset). Itämeren eteläosissa esiintyy *Anisakis simplex*ä,

koska Pohjanmereltä tulevat loiset sillit kutemaan Itämerelle ja kun petokalat syövät näitä, ne saavat tartunnan. (2.)

2.1.2 Levinneisyys

Anisakis-suvun loisia esiintyy joka puolella maailmaa, valtamerissä (2). Itse *Anisakis simplex* -loista tavataan muun muassa Pohjanmerellä ja Japanissa (1). Suomessa loista on tavattu vain satunnaisesti: Ahvenanmaan alueella on ollut L3-vaiheinen toukka nokkakalassa ja kuolleella pyöriäisellä on ollut 1990-luvun lopulla *Anisakis simplex* -tartunta. (2.)

2.1.3 Vaikutus ihmiseen

Ihminen voi saada loisen itseensä syömällä raakaa, marinoitua tai heikosti suolattua kalaa (2). Jos loinen saadaan, se tulee yleensä sillistä, makrillista, turskasta, mustekalasta tai villilohesta (3).

Anisakis simplex -loinen on toistaiseksi ainoa loinen, joka aiheuttaa allergista reaktiota ja josta voi saada myös anisakiasis-sairauden (3;4). Suomessa ei ole tavattu yhtään sairaustapausta (1). Jos loisesta tulee jotain oireita, niiden itämisaika on 1–12 tuntia, mutta joskus saattaa olla, että oireet ilmenevät vasta usean vuorokauden kuluttua (3).

Vaikka kalassa itsessään ei olisi näkyvää *Anisakis simplex*iä, kala on voinut saada muusta kalasta kontaminaatiota ja aiheuttaa näin ihmiselle, joka on yliherkkä loiselle, allergisen reaktion. Reaktiona voi olla krooninen nokkosihottuma (mekanismi ei tunnettu), reuman kaltaisia oireita ja astmaa. Myös ohimenevät vatsaoireet kuuluvat reaktioihin. Pahimmissa tapauksissa loinen voi aiheuttaa vatsakalvon tulehduksen, suolen tukkeutumisen tai puhkaista suolen infektiokohdasta. (3; 4.)

2.1.4 Tartunnan ehkäisy

Kala olisi hyvä perata heti, kun se on pyydetty (3). Kun kalaa aletaan laittaa ruuaksi, infektiiviset toukat tuhoutuvat, kun kalaa lämmitetään vähintään + 60 °C:ssa minuutin ajan tai sitä pakastetaan –15 °C:ssa 96 tunnin ajan (4). Varsinkin silliä ja makrillia marinoitaessa olisi hyvä, että kala jäähdytettäisiin tai pakas-

tettaisiin muutamaksi vuorokaudeksi. Jos silli- tai makrillituote on tehty teollisesti, on niillä ollut pakastuspakko. (3.)

2.2 *Contracaecum osculatum*

Contracaecum osculatum on loinen, joka kuuluu *Anisakis simplexin* tavoin sukulamatoihin (*Nematoda*). Loisella on pääntasolla erityisaukko, josta se tunnisteitaan. Myös sileää häntää voidaan pitää lisätuntomerkinä. Täysikasvuinen loinen on pituudeltaan 34–53 mm pitkä ja väriltään vaalea. Kaloissa tavataan vain L3- vaiheen toukkia ja nämä ovat 3–16 mm:n pituisia. (2.)

2.2.1 Kiertokulku

Loisten täydellistä kiertokulkua ei tunneta. Loisten munat joutuvat veteen, kun harmaahylkeet ulostavat. Munista kuoriutuu L3-vaiheen toukkia, ja ei ole varmaa, miten nämä siirtyvät kaloihin. On kuitenkin tehty koe, jossa toukkien siirtyminen kalaan on tapahtunut suoraan tai hankajalkaisäyriäisten välityksellä. Kalat ovat *Contracaecum osculatum* -loisen siirtoisäntiä. Näin ollen kala ei ole välttämätön loisen kehittymisen kannalta. (2.)

2.2.2 Levinneisyys Suomessa

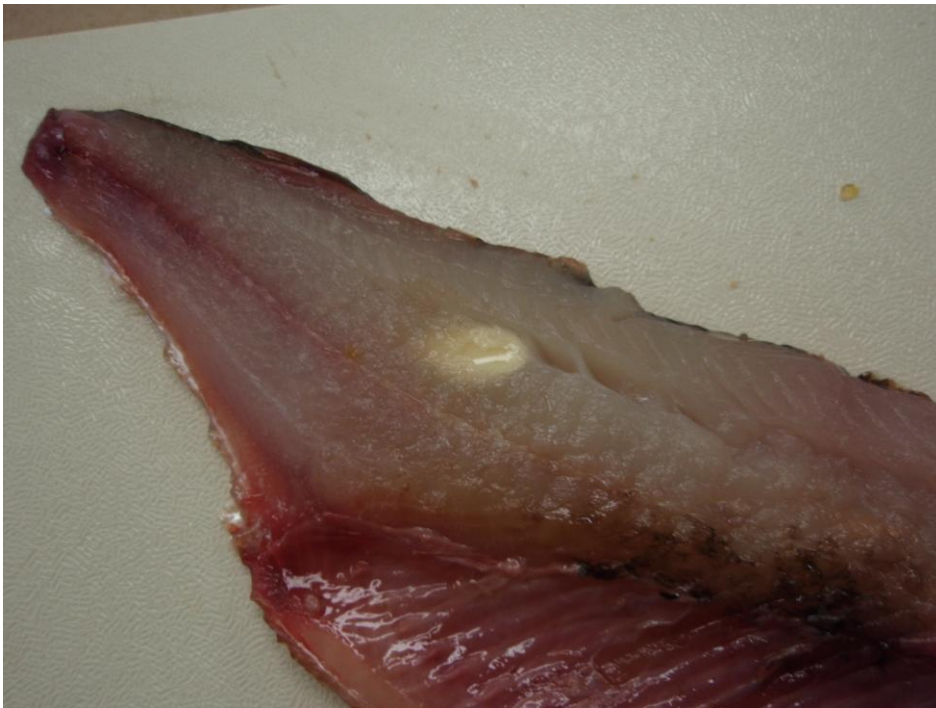
Sisäelinten osa, josta *Contracaecum osculatum* -loisen L3-vaiheen toukat löytyvät kalalta, on lähes aina maksa. Näitä on tavattu Saaristomeren alueella merilohissa, härkäsimpluissa, silakoissa ja mateissa. Myös 1970-luvun lopussa kyseisellä alueella loisituin kala oli turska, joista joka kolmas kantoi loisia. Yhdellä turskalla on havaittu 102 kappaletta *C.osculatum*-loista. Perämerellä loisia löytyi myös kuoreista ja isosimpluista (1–2 kpl/kala). (2.)

Itämeressä lähes kaikista harmaahylkeistä löytyy *C.osculatum*-loisia. Myös norpista on löydetty nuoria loisia, mutta ne ovat esiintyneet yksittäin, kun harmaahylkeessä niitä on keskimäärin satoja kappaleita. Suurin loismäärä, mikä on havaittu, on hylkeellä, ja niitä on ollut 1244 kappaletta. Loisten tartuttamia kaloja ei saisi tarjota kotieläimille pakastamatta tai perkaamatta, sillä loinen voi tarttua lämminveriseen isäntään. (2.)

2.3 *Henneguya zschokkei*

Rakkoloisio (latinankieliseltä nimeltään *Henneguya zschokkei*) on itiöeläinloinen. Tämä tuottaa kalan lihakseen rakkulan (kuva 2), jonka koko voi vaihdella 2 mm–2 cm. Rakkula sisältää maitomaista nestettä, jossa on rakkoloision itiöitä. Itiöt tunnistaa parhaiten kahdesta pitkästä jäykästä ulokkeesta, soikeasta muodosta ja 10 µm:n pituudesta. Rakkoloision rakkuloita esiintyy lohikalojen lihassa useimmiten siialla ja muikulla. Rakkuloita voidaan tavata sekä sisävesissä että rannikoilla. (5.)

Rakkoloisio ei ole haitallinen ihmiselle, mutta kaloilla rakkulat syrjäyttävät lihas kudosta, minkä vaikutuksena kalan kunto voi heiketä. Jos rakkula on päässyt puhkeamaan, se avaa tien erilaisille sieni- ja bakteeritartunnoille (5;6). Rakkoloision kiertokulkua ei tunneta (23). Loisten leviämiseksi ei ole muuta ehkäisykeinoa kuin haudata saastuneet kalat (6).



KUVA 2. Fileoidussa siiassa (OPAT: 7190) rakkula, joka sisältää rakkoloisioita

2.4 *Diphyllobothrium dendriticum*

Lokkilapamato (latinankieliseltä nimeltään *Diphyllobothrium dendriticum*) kuuluu heisimatojen (*Cestoidea*) sukuun. *Diphyllobothrium dendriticum* -loinen on alun perin vesilintujen heisimato, joka kiertokulun kautta joutuu kalan suolistoon. (5.)

2.4.1 Loisen kiertokulku

Lokkilinnut ovat lokkilapamadon lopullisia isäntiä. Lokkien suolessa tapahtuu munien tuotanto ja ne joutuvat linnun ulostaessa vesiympäristöön. Vesistössä niistä kehittyy korakidium-toukkia, joita plaktonäyriäiset eli copepodit syövät ja saavat loisen itseensä. Lohensukuiset kalat, kolmipiikki ja made, syövät infektioituneet äyriäiset ja petokalat taas nämä. Näin loinen on päässyt petokalaan saakka ja tekee kalaan kuvan 3 kaltaisia rakkuloita. Kun petokala joutuu esimerkiksi kalastuksen uhriksi, perkkujätteet ovat lokin saatavilla ja tämä syö ne. Lokkilapamato pääsee taas lokin suolistoon, vapautuu rakkulasta (kysta), aikuistuu ja sen kiertokulku jatkuu. (8.)



KUVA 3. Lokkilapamadon, *D. dendriticum*, toukan aiheuttamia rakkuloita siian suolistolla (8.)

2.4.2 Loisen esiintyminen ja tunnistus

Lokkilapamatoa tavataan koko pohjoisella pallonpuoliskolla. Kyseistä loista esiintyy Suomessa murto- ja sisävesialueella yleensä vain luonnonkaloissa, mutta nykyään sitä on esiintynyt myös kasvatetuissa kaloissa, muun muassa Lokan ja Porttipahdan tekojärvissä. (5; 9.)

Lokkilapamadon tunnistuksen voi aloittaa aukaisemalla varovasti esimerkiksi suoliston pinnalla olevan rakkulan. Rakkulan sisältä saadaan esille voimakkaasti poimuttunut liidunvalkoinen loinen, jonka pituus voi vaihdella 0,5 cm–4,0 cm välillä. Lokkilapamadolla on päässä imu-uurteet, jotka voidaan havaita mikroskooppisesti. (5.)

2.4.3 Rakkuloiden esiintyminen

Eri kalalajeilla rakkulat muodostuvat eri paikkoihin, mutta yleensä rakkulat muodostuvat sisäelimiä pinnalle. Jos rakkulat ovat muodostuneet mahalaukun pinnalle, kala pystyy jatkamaan elämäänsä ilman koteloituneiden toukkien haittavaikutusta (tavataan usein siialla). Kun toukka ei ole koteloitunut, se pystyy vaeltamaan kalan kudoksissa aiheuttaen samalla vakavia vammoja. Yksi näistä on verenkierrossa aiheutuvat tukokset. Joskus toukka voi päästä sydämeen ja näin ollen aiheuttaa kalalle kuoleman. Toukan vaeltaminen kudoksissa tapahtuu yleensä muilla lohikaloilla kuin siialla. (5; 8.)

Kun kala on saanut lokkilapamatotartunnan, sille ei ole hoitokeinoja. Jos taudin saastuttamat kuolleet kalat haudataan, eivät linnut pääse syömään saastunutta kalaa eikä tauti leviämään. (5; 6.)

2.5 *Triaenophorus crassus*

Haukimato (*Triaenophorus crassus*) kuuluu heisimatojen (*Cestoidea*) sukuun. Haukimatoja on myös *Triaenophorus nodulosus*, joka käyttää väli-isäntänään muun muassa lohia, ahvenia, kiiskejä ja mateita. Tämä rakkuloituu kalan maksaan (5). *T. nodulosus* -loista ei löytynyt tutkimuksista.

Haukimatoa tavataan koko Suomen alueella, mutta sen esiintymisessä on suuria järvikohtaisia eroja. Myös ulkomailta *T. crassus* -loista on havaittu. Muun

muassa Venäjällä, Volgajoella lohikalojen kassikasvatus on vaikeutunut loisten takia. Suomessakin loista tavataan viljellyillä kaloilla, esimerkiksi kirjolohella ja siialla. (5.)

T. crassus -loisen toukat saavat kalan lihan näyttämään rumalta, mutta ne ovat kuitenkin vaarattomia ihmiselle, sillä toukat eivät infektoi lämminverisiä. Kalan lihassa oleva loinen on yleensä vaaraton kalan terveydelle, mutta kalanpoikasia on jonkin verran kuollut loisen vaelteluun ennen sen päätymistä lihaksistoon. Elintarvikekäyttöön suunnatulle kalalle loiset ovat ongelma, sillä siinä ei saisi esiintyä näkyviä loisia. (10.)

Haukimadon toukkarakkuloita sijaitsee useasti selkälihakossa, selkäevän tyvellä. *T. crassus* -loinen on laskoksilla rakkulassa, ja kun tätä hammaslankaista toukkaa vedetään rakkulasta, paljastuu yleensä 2–7 cm:n pituinen mato. Mikroskoopilla otetussa kuvassa voidaan havaita jykevät koukkumaiset kiinnityselimet madon päässä (kuva 4). (5.)



KUVA 4. Haukimadon, *Triaenophorus crassus*, toukan pää. *T. crassus*-lajilla kiinnityskoukkujen leveys on 250 - 350 μm (merkitty viivalla) (10)

2.5.1 Kiertokulku

Haukimadon (kuva 5) kiertokulku saa alkunsa keväällä, jäiden lähdön aikaan. Madon pääisäntänä toimii hauki. Aikuisen hauen suolistossa loinen tuottaa munia ja nämä pääsevät veteen kalan ulostaessa. Munien sisällä olevat ripselliset toukat (korakidiat) infektoivat planktonäyriäisiä (copodi) ja näin ollen äyriäiset ovat ensimmäisiä väli-isäntiä. *T. crassus*-loisen toisena väli-isäntänä on yleensä siika tai muikku. Toukka tekee rakkulan kalan lihakseen, mutta rakkula ei välttämättä ole mitenkään selkeä. Tämän jälkeen hauki syö loistartunnan saaneen kalan. Loinen tarttuu hauen suoleen ja kehittyy siellä munia tuottavaksi täysikasvuiseksi aikuiseksi, jolla voi olla pituutta yli 30 cm. (5; 10.)



KUVA 5. Haukimato, Triaenophorus crassus, kirjolohifileessä (10)

2.5.2 Ennaltaehkäisy ja hoito

Jos kala on saanut haukimatorakkuloiden aiheuttamia lihasvaurioita, niihin ei ole hoitokeinoa. Loistartuntojen lisääntymistä on yritetty kontrolloida vähentämällä vedenottamon haukikantaa. Kalanpoikaset siirretään kasvatuskasseihin vasta heinäkuun lopulla, jolloin infektoituneiden copodejen määrä on enää vähäinen ja näin ollen poikaset eivät saisi niin paljon haukimatotartuntoja. (5.)

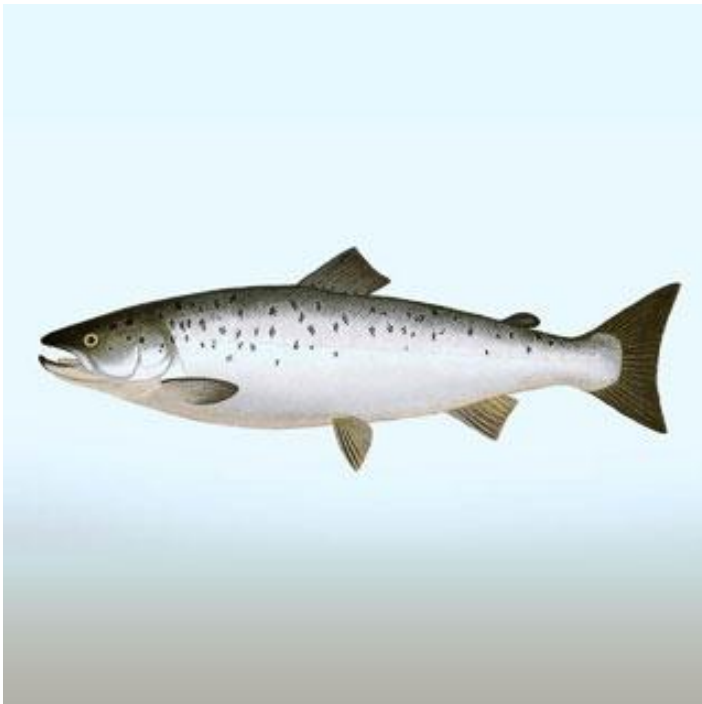
3 TUTKITTAVAT KALAT

Tässä luvussa on tietoa kaloista, joita opinnäytetyössä tutkittiin. Opinnäytetyössä tutkittavia kaloja oli yhteensä 298 kappaletta, joista 238 käsiteltiin kompressiomenetelmällä. Lohista ja siiioista on liitteessä 1 lisää tietoa, muun muassa kalojen painot ja pituudet, jos ne ovat olleet saatavilla.

3.1 Lohi

Lohikala kuuluu lohikalujen, *Salmoniformes*, lahkoon ja lohien, *Salmonidae*, heimoon. Latinankieliseltä nimeltä lohi tunnetaan *Salmo salar*ina (kuva 6). Lohella on kaksi ekologista muotoa: merilohi ja järvilohi (11). Järvilohi asustaa koko elämänsä sisävesissä toisin kuin merilohi, joka tekee vaelluksia meressä kutien jokeen.

Opinnäytetyössä tutkitut lohet olivat merilohia, jotka tulivat Simo- ja Torniojoes- ta, sekä Kemijoen kosseja. Kossi tarkoittaa lohta, joka on viettänyt vain yhden merivuoden ja palaa sitten kudulle. Sukupuoleltaan kossi on lähes aina koiras. (12.)



KUVA 6. Lohi (13)

3.1.1 Ulkonäkö

Lohen voi helposti sekoittaa taimeneen. Hyvä muistikeino kalojen erottamiseen on se, että lohella yläleuka ulottuu silmän takareunan kohdalle ja taimenella se menee reilusti yli. Lohen pituus voi vaihdella 60–110 cm välillä ja paino heitellä 2 kg:sta 12 kg:aan saakka. (13.) Suurin saatu lohi on jäänyt lohipatoon Tornionjoessa 1900-luvun alussa, ja painoa sillä oli 43 kg. Nykyään yli 30 kg painavat lohet ovat harvinaisia (11).

Lohi on kyljistään hopeanvärinen, ja sen selkä on sinertävä tai vihreähkö. Vatsan puolelta lohi on vaalea. Lohella on kylkiviivan yläpuolella tummia pilkkuja ja ne harvoin ulottuvat selvästi kylkiviivan alapuolelle. (13.) Lohen noustessa kutemaan sen väri muuttuu harmaanvihertäväksi tai ruskeankellertäväksi (14). Pilkut kalan kyljissä lisääntyvät ja osa niistä on väriltään punaisia. Koiraslohelle kasvaa koukku leukaan (kuva 7). Lohi-kalan poikanen poikkeaa aikaisemmasta kuvauksesta jonkin verran. Tummiin ja punaisten täplien lisäksi poikaselle muodostuu 8–10 isoa ja selkeärajaista poikaslaikkua. (11.)



KUVA 7. Kutevan koiraan koukkuleuka

3.1.2 Elinympäristö ja ravinto

Merilohta esiintyy koko Itämeren alueella ja siihen laskevien jokien suistoissa. Ainoat Itämereen laskevat joet Suomessa ovat Tornionjoki ja Simojoki, joissa on luonnonvarainen lohikanta. (13.) Muihin Itämereen laskevien jokien (esimerkiksi Kuivajoki, Kiiminkijoki, Pyhäjoki, Merikarvianjoki, Vantaanjoki, Kokemäenjoki, Kymijoki, Aurajoki ja Porvoonjoki) lohet ovat peräisin istutuksista. Näätämö- ja Tenjoessa on myös luontainen lohikanta, mutta ne laskevat Jäämereen. Järvi-lohen ainoat luontaiset kannat ovat Vuoksen vesistössä ja Hiitolanjoessa, mutta sitä on istutettu esimerkiksi Inarinjärveen ja Päijänteeseen. (15.)

3.1.3 Lisääntyminen ja kasvu

Merilohi ja järvilohi lähtevät nousemaan kudulle jokiin jo keväällä, ja tämä jatkuu kesään saakka. Kun syntymäjoki on löydetty, viettävät lohет siellä aikaa ja odottavat syys-marraskuuta, jolloin kuteminen alkaa. Lohi kaivaa pyrstöllään pesäkuopan mädille, joka sijaitsee 0,5–3 metrin syvyydessä sorapohjalla virtapainakassa. Mäti peitetään soralla. Naaraan kuteminen saattaa kestää jopa pari viikkoa. Kuteminen on niin raskasta, että suurin osa lohista kuolee kutemisen jälkeen. Vain 3–6 % kaloista kutee toisen kerran. (11; 16.)

Lohen poikaset kuoriutuvat keväällä ja ovat noin 20–25 mm:n pituisia tullessaan soran seasta, jolloin ruskuaispussin ravinto on loppunut. Jokipoikaset elävät maksimissaan 1–6 vuotta joessa (yleensä 2–3 vuotta), jolloin ne ovat 12–20 cm pitkiä ja lähtevät vaellukselle mereen tai järveen. Jotkut koiraista tulevat sukukypsiksi jo jokipoikasena ja kutevat ennen omaa vaellusta. Tällaista lohta kutsutaan kääpiökoiraaksi. (11.)

Syönnösvaellus kestää yleensä 2–3 vuotta, ja tämän jälkeen lohет palaavat synnyinjokeen kudulle (17). Koiraat ovat 5–10 -vuotiaita ja painavat 2–20 kilogrammaa ja naaraat puolestaan nuorempia ja pienempiä (5–8 vuotta ja 4–9 kg). Järvilohinaaraat palaavat kudulle hieman aikaisemmin, noin 4-7 vuoden ikäisinä ja keskimäärin neljän kilogramman painoisina (3–8 kg). (18.)

3.1.4 Ravinto ja syönnösalueet

Ensimmäisenä kesänä jokipoikaset syövät pieniä hyönteisiä, eläinplanktonia ja pohjaeläimiä. Myöhempinä jokivuosina ravintona ovat hyönteistoukat ja vesihyönteiset. Syönnösvaelluksien alkuaikoina lohет käyttävät samaa ravintoa kuin jokipoikasina, mutta 25 cm:n kokoisina ne alkavat syödä enimmäkseen kalaa. Silakka ja kilohaili ovat Itämeressä merilohien ravintoa ja järvilohет herkuttelevat yleensä muikulla. Ravinnon eteen voi joutua vaeltamaan jopa 2000 kilometriä. Näin tekevät muun muassa Tornionjoen läheisyydessä syntyneet lohет, jotka vaeltavat Itämeren eteläosiin syönnösvaellukselle, mutta jos Selkämerellä on runsaasti silakkaa voi osa lohista parkkeerata siihen. Suomenlahden lohет pysyvät pääosin syönnösvaelluksellaan Suomenlahden alueella. (18.)

3.2 Siiat

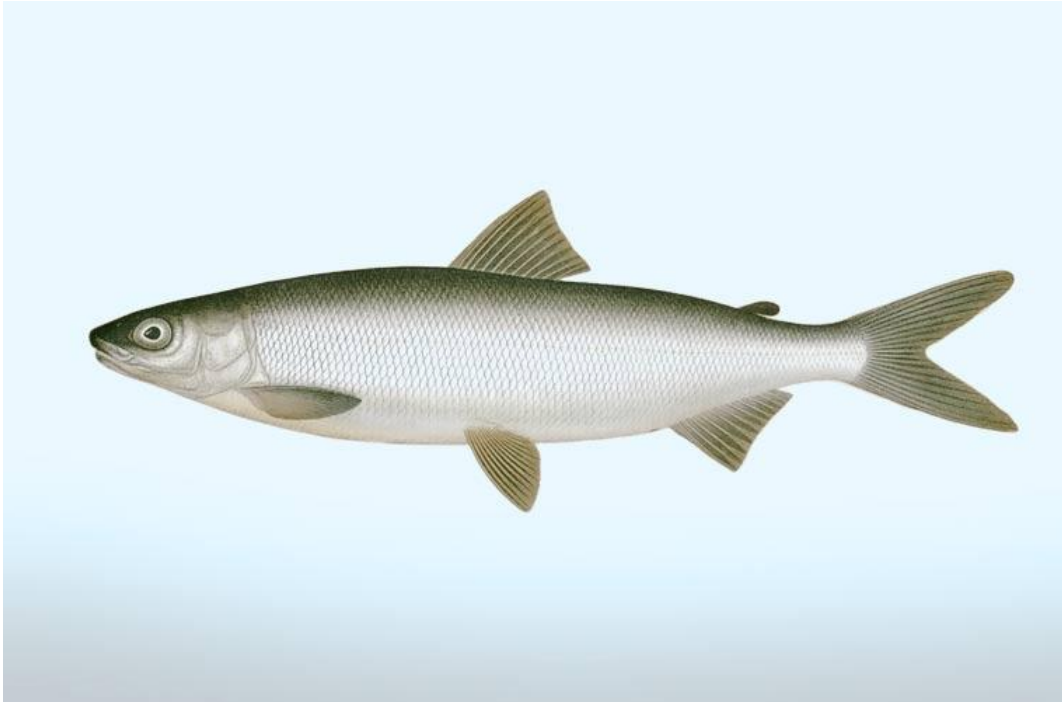
Siika-kalat kuuluvat lohikalojen, *Salmoniformes*, lahkoon ja lohien, *Salmonidae*, heimoon. Alaheimo siioilla on *Coregoninae*. Suomessa on useita siikatyyppiä, jotka ovat lueteltuina taulukossa 1. Kaikki siikamuodot muistuttavat hyvin paljon toisiaan, joten kiduskaarissa olevien siivilähampaiden lukumäärää käytetään tärkeimpänä erottamisperusteena. (16.) Opinnäytetyössä tutkitut siiat tulivat Perämereltä sekä Porttipahdan ja Lokan tekojärvistä.

TAULUKKO 1. Eri siikamuotoja (14)

siikamuodot	latinaksi	siivilähampaiden lkm.
pohjasiika	<i>Coregonus lavaretus pidshian</i>	17–22
karisiika	<i>Coregonus l. widegreni</i>	24–28
vaellussiika	<i>Coregonus l. lavaretus</i>	28–32
järvisiika	<i>Coregonus l. nilssoni</i>	40–45
planktonsiika	<i>Coregonus l. pallasi</i>	41–56

3.2.1 Ulkonäkö

Siika, *Coregonus lavaretus*, on kyljistään hopeanvärinen ja kalan selkä on sini-vihreä tai rusehtava (kuva 8). Vatsan puolelta siika on valkea. Kalalla on tummanharmaan väriset evät ja selkäevän ja pyrstöevän välissä on rasvaevä, joka on ominainen lohikaloille. Siika saatetaan sekoittaa muikkuun tai peledsiikaan, mutta hyvä muistikeino on, että siialla yläleuka on alaleukaa pidempi. Muikulla se on juuri päinvastaisesti ja peledsiialla leuat ovat lähes samanpituiset. Siika-kaloilla on virtaviivainen lyhyt kuono. Siikaa tavataan vesistöissä, joissa on puhdasta, viileää ja happirikasta vettä. (16.)



KUVA 8. Siika, *Coregonus lavaretus* (16)

3.2.2 Pohjasiika

Coregonus lavaretus pidshian eli pohjasiika on alkuperäinen laji, ja sitä esiintyy Jäämereen laskevissa vesistöissä, joita ovat Lapissa Paatsjoki ja Tenojoki ja Kuusamossa Oulankajoki ja Pistojoen vesistöalue. Pohjasiian kuteminen on syys-tammikuussa veden ollessa +4 °C: n lämpötilassa. Kala kutee joissa ja kasvaa järvissä. Pohjaeläimet kuuluvat tärkeimpänä kyseisen kalan ravintoon. Uhanalaisluokitukseltaan pohjasiika on elinvoimainen. (19.)

3.2.3 Karisiika

Coregonus lavaretus widegreni elää Itämeressä, yleensä rannikkoalueilla. Karisiikaa tavataan myös pohjoisessa ja idässä sisävesissä. Kuteminen kalalla tapahtuu loka-joulukuussa ja karisiika kutee meressä, karikoilla. Sukukypsyyden karisiika tavoittaa 3–5 vuoden iässä. Kalan kasvunopeus vaihtelee reilustikin; Perämeressä kalan pituus on vain 20–25 cm ja Suomenlahdella 35–55 cm (11). Karisiian ravintoon kuuluvat pohjaeläimet kuten pohjasiiallakin. Karisiika on

uhanalaisluokituksestaan luokiteltu vaarantuneeksi, sillä varsinkin Merenkurkun eteläpuolella lisääntymisalueiden laatu ja määrä ovat heikentyneet. (19.)

3.2.4 Vaellussiika

Latinankieliseltä nimeltä *Coregonus lavaretus lavaretus* eli vaellussiika on erittäin uhanalainen. Kalaa esiintyy Itämeressä ja siihen laskevissa joissa ja eräissä sisävesialueilla, kuten Vuoksen vesistössä (kuteminen joessa, syönnösvaellus järvissä). Vaellussiika nousee syys-joulukuussa kudulle merestä jokiin. Kala tekee syönnösvaelluksia, ja jos kala on kutunut esimerkiksi Perämeren joissa, saattaa se vaeltaa Ahvenanmaalle asti. Sukukypsyyden vaellussiikakoiraat tavoittavat 3–5-vuotiaina ja naarat vuotta myöhemmin. (19.)

3.2.5 Järvisiika

Coregonus lavaretus nilssoni eli järvisiika on järvialuilla esiintyvä siikamuoto (11), mutta sitä löytyy myös Kemijoesta, Oulujoesta, Kymijoesta ja Vuoksen vesistöstä. Näistä neljästä edellä mainitusta vesistöalueesta voidaan sanoa, että esiintymiä on 10–20 ja osaa tuetaan istutuksin. Istutuksien seurauksena järvisiika on sekoittunut muiden siikamuotojen kanssa ja tästä on tullut uhanalaisluokituksestaan silmällä pidettävä. (19.) Ravintona järvisiika käyttää planktonia, mutta isot yksilöt voivat syödä myös pohjaeläimiä. (20.)

3.2.6 Planktonsiika

Coregonus lavaretus pallasii eli planktonsiika on virtaavissa salmissa ja joissa kuteva siikamuoto. Se tekee syönnösvaelluksia järviin. Planktonsiikaa esiintyy alkuperäisenä kantana Kymijoen, Oulujoen ja Vuoksen vesistöissä, mutta vesirakentamisen vuoksi kannat ovat heikentyneet. Niitä tuetaan istutettujen kalojen avulla. Uhanalaisluokituksestaan planktonsiika on vaarantunut. (19.)

3.3 Silakka

Silakka, toiselta nimeltään haili, on Atlantin pohjoisosissa elävän sillin alalaji. Silakka on silliin verrattuna vähärasvaisempi ja hidaskasvuisempi. Se on leviytännyt koko Itämerelle aina Tanskan rannikolta Perämeren pohjukkaan saak-

ka. (14; 21.) Opinnäytetyössä tutkittavat silakat ostettiin kauppahallista, ja ne oli pyydystetty Perämereltä.

3.3.1 Ulkonäkö

Silakka, *Clupea harengus membras*, (KUVA 9.) on kyljistään hopeanhohtoinen ja kalan selkä on sinimusta/vihertävä ja väri vaalenee alaspäin mentäessä. Vatsan puolelta silakka on vaalea. (14.)



KUVA 9. Silakka (21)

Silakka on kooltaan yleensä 15–20 cm:n pituinen, mutta kaloja voi olla niin sanottuja jättiläissilakoita, jotka voivat kasvaa jopa 30 cm:n pituisiksi (21). Kalojen paino vaihtelee 30–100 gramman välillä. Myös kalan kasvupaikka vaikuttaa kalan kokoon; Perämerellä kasvanut kahdeksanvuotias silakka painaa 40–60 grammaa ja vastaavanikäinen Suomenlahden pääaltaan kasvatti 50–100 grammaa.(22.) Helsingin edustalta on vuonna 1997 pyydystetty ennätysilakka, jolla oli painoa jopa 1 100 grammaa (14).

3.3.2 Lisääntyminen

Silakat ovat parvikaloja ja näin ollen kuteminenkin tapahtuu parvissa. Tästä voi myös johtua, että silakoille ei tule ollenkaan kutuasua, vaan ne pysyvät samanikäisinä. Silakalla on eri aikaan kutevia kuturyhmiä eli populaatioita. Suurin osa silakoista kuitenkin kutee kevätkutuisena silakkana eli touko-kesäkuussa. Toinen kuturyhmä on syyskutuiset silakat, jotka kutevat elokuun lopusta syyskuun loppuun. Syyskutuisien silakoiden määrä yleensä nousee leutojen talvien jälkeen, sillä poikaset ovat selviytyneet talvesta hyvin. (11.)

Silakan valitsema kutupaikka sijaitsee rannikolla, ja se on kova, kasvillisuuden, hiekan tai soran peittämä. Yleensä kutupaikkojen syvyys vaihtelee alle metristä jopa kymmeneen metriin. Naarassilakassa on keskimäärin jopa 10 000 mätimuna. Nämä tarttuvat alustaansa kiinni, esimerkiksi levään tai hiekkapohjaan. Mädin kehittyminen kuoriutuviksi poikasiksi riippuu veden lämpötilasta. Yleensä se kestää 6–15 vuorokautta. (11.)

Kuoriutuessaan silakanpoikaset ovat 6–7 mm:n pituisia, langanohuita ja läpikuultavia. Kesäisin poikaset viihtyvät parvissa lähellä veden pintaa. Ensimmäisen kesän aikana kevätkudusta syntynyt poikanen saavuttaa jo 8–10 cm:n pituuden ja kasvutahdista riippuen silakka kutee ensimmäisen kerran 2–3-vuotiaana 11–16 cm:n pituisena (14). (11.)

3.3.3 Ravinto

Silakan suu on suuri ja hampaaton. Kiduskaarella on siivilähampaisto, joka koostuu 66–69 pitkistä, ohuista ja hieman taipuisista lisäkkeistä. Näköaistia hyödynnetään ravinnon hankkimisessa eikä se ole vain veden siivilöintiä, vaan ravinto napataan yksi kerrallaan suuhun. Silakka käyttää ravinnokseen yleensä planktonäyriäisiä ja pohjaeläimiä. Jos kyseessä on suuri silakka, voi se napata ravinnokseen kalanpoikasiakin. Taulukosta 2 nähdään silakan ravinnoksi käyttämiä äyriäisten nimiä. (11.)

TAULUKKO 2. Silakan ravinnoksi käyttämiä äyriäisiä (11)

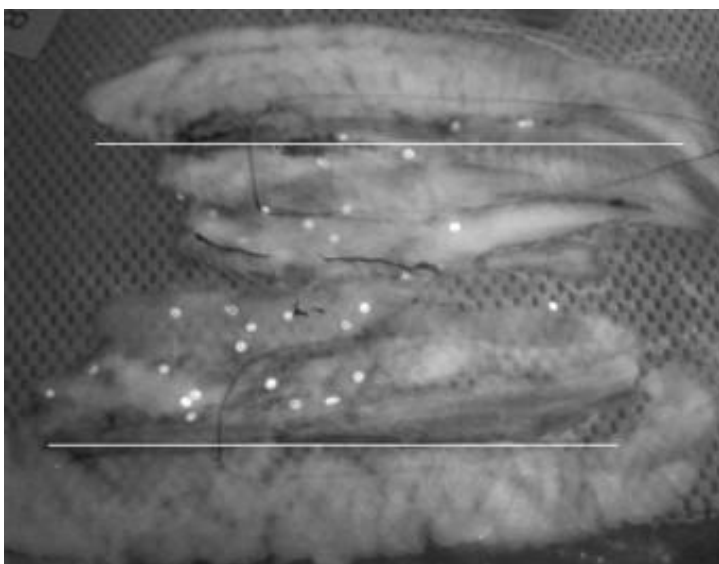
	latinankielinen:	koko (mm):
hankajalkaiset	<i>Copepoda</i>	0,5-1,3
vesikirput	<i>Cladocera</i>	0,3-0,5
valkokatkat	<i>Pontoporeia</i>	7,0–11,0
halkomisjalkaiset	<i>Mysis</i>	< 20,0

4 TYÖSSÄ KÄYTETTÄVÄT MENETELMÄT

Tässä luvussa esitellään työssä käytetyt menetelmät: kompressiomenetelmä ja digestiomenetelmä. Kompressiomenetelmä tunnetaan myös nimellä prässäysmenetelmä.

4.1 Kompressiomenetelmä

Kompressiomenetelmä perustuu siihen, että litistellyt ja jäädytetyt kalafileet ja suolistot tutkitaan ultraviolettivalon avulla. UV-valon aallonpituus on alle 366 nm ja valo näyttää *Anisakis simplex* -loiset fluoresoivina kirkkaina pisteinä, mikä näkyy kuvassa 10. (4.)



KUVA 10. *Anisakis simplex* -loisia UV-valossa (4)

Ennen valolla tarkastelua kalat täytyy esikäsitellä. Jokainen tutkittava kala täytyy perata, fileoida ja nylkeä, jotta kalan nahka ei häiritse tarkastelua. Tämän jälkeen esikäsitellyt kalafileet ja suolistot asetellaan läpinäkyvään muovipussiin ja puristetaan hydraulikkapuristimella 1–2 mm:n paksuiseksi. Kun puristelut ovat valmiit, pakastetaan ne alle $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa vähintään 12 tuntia. Pakastuksen jälkeen ne voidaan tutkia silmämääräisesti UV-valon avulla. Menetelmällä kalojen lihasta pystytään katsomaan myös, mihin kohtaan kalaa (selkä/vatsa) loinen on infektoitunut. Kompressiomenetelmää (prässäystä) käytetään laajalti erilai-

sisä tutkimuksissa, missä halutaan etsiä sukkulamadon toukkia, joihin *Anisakis simplex* -lajin kuuluu. (4.)

4.2 Digestiomenetelmä

Digestiomenetelmä perustuu siihen, että pepsiinientsyymi ja suolahappo (HCl) tekevät yhdessä veden kanssa seoksen, joka vapauttaa *Anisakis*-loiset kalan lihaksista tai muualta kudoksista (4). Pepsiini-entsyymi hydrolysoi kalan lihaksen proteiineja, jolloin lihakseen kiinnittyneet toukat vapautuvat. Voitaisiin siis sanoa, että kalalle luodaan vatsalaukun olosuhteet.

Pepsiiniä lisätään natriumkloridiliuokseen (0,85 % NaCl) niin paljon, että konsentraatioksi saadaan 10 mg/l. Liuos lisätään esimerkiksi dekanterilasiin, jossa on pohjalla kalanpalaset. Tämän jälkeen digestioliuoksen pH säädetään pH 2:een (pepsiini-entsyymin pH-optimi) käyttämällä konsentroitua suolahappoa. Kun tämä on saatu valmiiksi, inkuboidaan liuosta ja kalanpaloja + 38 °C:ssa yön yli. (4.)

Seuraavana päivänä liuos siivilöidään siivilällä, jonka verkkokoko on 1,5 mm x 1,0 mm (kuva 11). Elävät toukat selviävät digestiosta vahingoittumattomina ja näin ollen ne on helppo havaita. Kuolleet toukat, esimerkiksi jos kala on pakastettu, on myös helppo kerätä talteen kyseisellä menetelmällä. (4.)



KUVA 11. Digestiomenetelmän siivilöintiä

5 TYÖN SUORITUS

Opinnäytetyössä käytettiin kompressiomenetelmää. Alkuperäisenä ideana oli käyttää digestiomenetelmää, mutta se ei toiminut halutulla tavalla; se oli hidasta, kallista ja sulamisjäännökset jäivät liian suuriksi. Liitteessä 2 on kerrottu työssä käytettävät työvälineet ja reagenssit.

5.1 Anisakismääritys Stomacher-digestiomenetelmällä

Digestiomenetelmää päätettiin kokeilla Eviran Trikinellamääritys Stomacher-digestiomenetelmällä -ohjeen pohjalta. Tämä menetelmä on Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 38/EEO/2006 mukainen digestiomenetelmä. Kokeiludigestioon vaikutti myös artikkeli Recovery of Parasitic Nematodes from Fish by Digestion or Elution, (G.J. Jackson, J.W. Bier, W.L. Payne and F.D. McClure) jossa pH säädettiin pitoisuuteen 2 suolahapolla. Tämä otettiin mukaan kokeiluohjeeseen.

Fileoidusta siasta punnittiin 20 g lihaa ja punnittiin pepsiiniä 1,2 g. Dekantterilasiin mitattiin 300 ml +40 -celsiusasteista kraanavettä ja liha lisättiin sinne. Seokseen lisättiin pepsiini-entsyymi, minkä jälkeen säädettiin pH HCl:llä pitoisuuteen 2. Pepsiini alensi jo suoraan liuoksen pH:ta hieman, joten se laitettiin ennen suolahappoa. Edellä olevia seoksia tehtiin viisi kappaletta, ja ne menivät samaan stomacher-homogenisaattoriin sekoittumaan.

Jotta prosessi nopeutuisi, lihat päätettiin laittaa stomacheriin, eikä inkuboida lihoja vuorokautta. Dekantterilasin sisältö kaadettiin stomacher -pussiin ja pussit aseteltiin homogenisaattoriin. Stomacher laitettiin päälle 25 minuutin ajaksi, minkä jälkeen katsottiin, miltä lihat näyttäisivät. Pussissa oli isoja lihaskimppuja, joten lopulliseksi ajaksi muodostui 40 minuuttia. Tämän jälkeen punnittiin sulamisjäännös. Pussin sisältö kaadettiin siivilän numero 18 läpi ja siivilä punnittiin ja erotettiin siitä kuivan siivilän paino, jotta saataisiin sulamisjäännös (kuva 12).

Stomacher-digestiomenetelmää kokeiltiin 24 kertaa erilaisilla pepsiinimäärillä, jotta olisi saatu pienempiä sulamisjäännöksiä. Menetelmä kuitenkin hylättiin.

Hylkäämisperusteina olivat sulamisjäännöksen suuruudet, menetelmän hitaus ja pepsiinin suuri kulutus, sillä entsyymi on kallista.



KUVA 12. Siian sulamisjäännöstä

5.2 Kompessointi

Prässin (kuva 13) idea syntyi, kun erikoistutkija Perttu Koski ja obduktissaliteknikko Timo Multasniemi miettivät, miten saataisiin litistettyä kalanliha niin, että sen saisi muutaman millimetrin paksuiseksi levyksi. Päätettiin käydä ostamassa teollisuusprässi.

Jotta kala saatiin prässättyä, asetettiin prässin tuen päälle 15 mm:n paksuinen akryylilevy, johon oli tehty 3 mm:n paksuisesta akryylilevystä kehykset. Ne helpottivat varsinkin rasvaisen kalan, esimerkiksi lohen prässäyksessä, sillä kala ei päässyt niin helposti luisumaan alustalta lattialle. Litistettävä kala asetettiin kirkaaseen pussiin, joka oli avonainen molemmista päistä, mutta kiinni molemmista sivuista. Pussi aseteltiin keskelle pohjalevyä ja tämän päälle asetettiin toinen 15 mm:n paksuinen akryylilevy. Tämän jälkeen levyjen päälle laitettiin musta painolevy, joka saisi puristusvoiman leviämään tasaisemmin koko puristettavalle alueelle.



KUVA 13. Käyttövalmiudessa oleva prässä

Ennen varsinaista prässäysvaihetta kalaa täytyi hieman käsitellä. Ensin aukaisiin kalan vatsa kirurginsaksilla, jotta saataisiin suolisto talteen. Kun suolisto oli otettu talteen, kala fileoitiin. Fileestä irrotettiin veitsen ja pinsettien avulla kiinnijääneet ruodot, minkä jälkeen fileet nyljettiin, sillä nahka häiritsi näytteiden tutkimista. Kalan päälle ei tehty tutkimuksia, joten sen sai hävittää.

Silakoiden käsittely erottui muiden kalojen käsittelystä. Kuvassa 14 oleva silakka on niin pieni, että ensimmäiseksi irrotettiin nahka pinsettien avulla ja sitten aukaistiin vatsa ja otettiin suolet talteen. Silakkaa ei fileoitu, joten ruodotkin päätyivät prässäykseen. Pää ja pyrstö hävitettiin.



KUVA 14. Nyljetty silakka

Kalan fileestä leikattiin fileen paksuuden ja pituuden mukaan sopiva pala tai otettiin suolisto, joka asetettiin keskelle pussia, joka oli päästä avonainen ja molemmista sivuista kiinni. Ennen kuin näyte päätyi pussiin, se tarkastettiin silmämääräisesti mahdollisten loisten varalta. Loisia löytyi enimmäkseen kalojen maksasta ja ne irrotettiin pinsettien ja kirurgin veitsen avulla ja laitettiin 70-prosenttiseen etanoliin. Yksi loinen jätettiin mikroskoopinäytettä varten laittamatta etanoliin, jotta se pystyttiin tunnistamaan. Loinen asetettiin preparaattilasille ja sen päälle laitettiin tippa cotton blue -väriainetta. Näiden päälle asetettiin peitinlasi ja loinen oli valmis tarkasteltavaksi mikroskoopilla.

Pussissa oleva näyte nostettiin prässäystasolle, jonka päälle nostettiin toinen 15 mm paksuinen akryylilevy niin, että levyjen reunat olivat päällekkäin. Sitten levyjen päälle asetettiin painolevy, jotta tunkin puristusvoima ei olisi niin pistemäinen, vaan leviäisi tasaisemmin koko alueelle. Tämän jälkeen alettiin prässäätä. Kompressointi oli valmis, kun levyt olivat painuneet toisiinsa kiinni ja tunkkaaminen tuntui hieman raskaalta. Levyt eivät kuitenkaan saaneet kaartua alaspäin.

Päällimmäinen levy nostettiin pois ja prässätty kalanäyte vietiin pakasteeseen. Kun näyte oli jäänyt, se tutkittiin Woodin lampulla.

5.3 Tarkastelu Woodin lampulla

Woodin lampun suorituskyky testattiin ilveksen suolinkaisella, joka oli piilotettu litistettävän kalan lihaan. Suolinkainen kuuluu *Anisakis simplex* -loisen tavoin sukkulamatoihin, joten se oli oiva valinta testausloiseksi. Suolinkainen fosforoi lihan seasta heleän sinertävänä.

Pakastetut näytteet tutkittiin ensin silmämääräisesti, mutta niissä ei havaittu mitään. Sen jälkeen tutkimushuone pimennettiin ja kalanäytteet tutkittiin molemmien puolin UV-valon avulla. Valoa pidettiin noin 15–20 cm:n etäisyydellä tutkittavasta kohteesta. Kun jotain löytyi, irrotettiin se tutkittavasta materiaalista kirurginveitsen avulla. Löydös tutkittiin mikroskoopilla, jotta saataisiin selville loisen laji.

6 TULOKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää menetelmä, jolla voidaan selvittää, esiintyykö tutkittavissa kaloissa *Anisakis simplex* -loista. Loisten etsimiseen paras menetelmä oli kompressio, jolla kalat pystyttiin tutkimaan helposti. Tutkittavat kalat tulivat suurimmaksi osaksi Perämeren alueelta ja niissä ei ollut *Anisakis simplex* -loisia.

6.1 Kompressiomenetelmällä löydetyt loiset

Taulukossa 3 nähdään yhteenveto siitä, mitä kompressiomenetelmällä löytyi.

TAULUKKO 3. Kompressiomenetelmän tuloksia

kala	pyyntipaikka	OPAT (Eviran tunnistus)	laji	lukumäärä
siika	Perämeri	7190	Henneguya Zschokkei	5
siika	Perämeri	7194	Henneguya Zschokkei	1
siika	Perämeri	7198	Henneguya Zschokkei	5
siika	Perämeri	7199	Henneguya Zschokkei	3
siika	Perämeri	7202	Henneguya Zschokkei	24
siika	Perämeri	7210	Henneguya Zschokkei	19
siika	Perämeri	7211	Henneguya Zschokkei	1
siika	Perämeri	7220	Henneguya Zschokkei	7
siika	Perämeri	7224	Henneguya Zschokkei	6

Löydetyt rakkoloisiot olivat kuivettuneet riisinjyvän tapaisiksi koviksi nystyröiksi (kuva 15), minkä ne voivat joskus tehdä (23). ”Riisinjyvä” pystyttiin irrottamaan kalan lihasta ja mikroskoopin avulla voitiin todeta kyseessä olevan Henneguya zschokkei.



KUVA 15. Kompressiomenetelmän tuloksia

6.2 Paljailla silmillä havaitut loiset

Paljain silmin havaitut loiset havaittiin kalan käsittelyvaiheessa. Mikään kala ei näyttänyt sairaalta päällepäin. Loiset löydettiin lihaksistosta tai suolistosta maksan pinnalta. Maksan pinnalla olleet loiset näkyivät kohoumina (vaalea) tai pitkinä vaaleina nauhoina.

6.2.1 Tunnistetut loiset

Kalan fileointivaiheessa lihaksistosta paljastui *Henneguya zschokkei* -itiöeläinloisien näköisiä rakkuloita, mutta nämä varmistettiin vielä mikroskooppisesti. Myös maksasta löydettiin loinen ja se tunnistettiin mikroskoopin avulla *Contracaecum osculatum* -loiseksi. Tulokset löytyvät taulukosta 4.

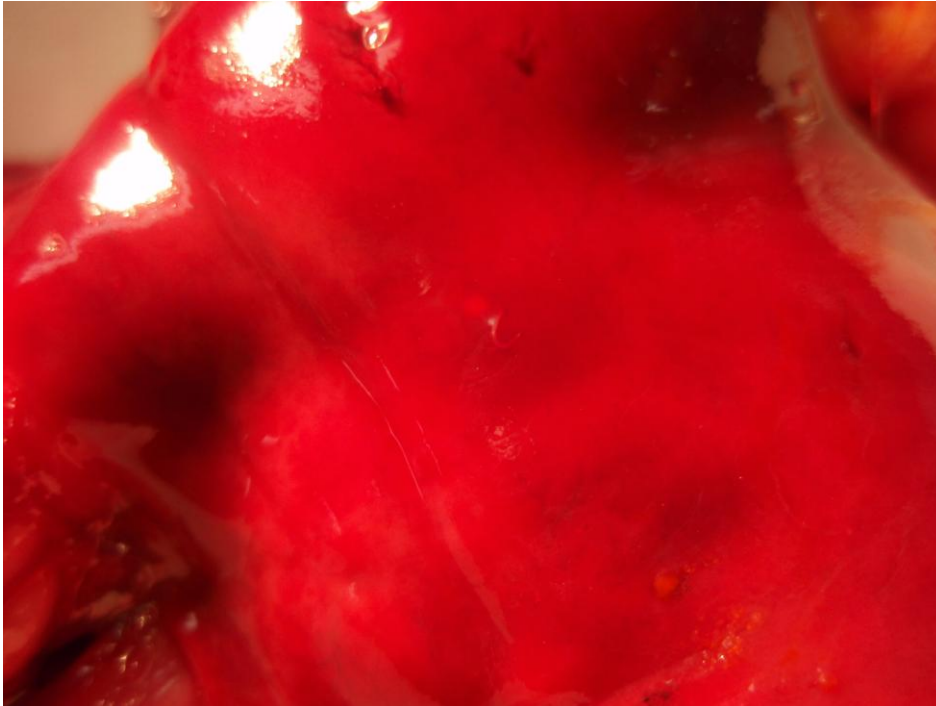
TAULUKKO 4. Tulokset paljailta silmillä havaituista: tunnistetut

kala	pyynti- paikka	OPAT	laji	lukumäärä
siika	Perämeri	7189	Henneguya zschokkei	11
siika	Perämeri	7190*	Henneguya zschokkei	4
siika	Perämeri	7191	Henneguya zschokkei	1
siika	Perämeri	7194*	Henneguya zschokkei	11
siika	Perämeri	7195	Henneguya zschokkei	16
lohi	Simojoki	6865	Contraecum osculatum	1

Tähdellä merkityissä kohdissa näkyi myös prässäysmenetelmällä rakkoloisioita.

6.2.2 Ei-tunnistettut loiset

Ei-tunnistettut loiset löytyivät maksan pinnalta (kuva 16) ja niitä ei tunnistettu mikroskoopilla. Tämä johtui siitä, että näytteet värjäytyivät epäselviksi, minkä vuoksi ei saatu selville loisten elimien suhteita saatu selville, minkä perusteella ne olisi tunnistettu. Tulokset näkyvät taulukosta 5.



KUVA 16. Maksan pinnalla oleva loinen OPAT: 6551

TAULUKKO 5. Paljalla silmillä havaitut, ei-tunnistetut loiset

kala	pyynti- paikka	OPAT	mistä löytyi	pituus (cm)	muuta
lohi	Torniojoki	6550	maksa		
lohi	Torniojoki	6551	maksa	0,5 ja 0,8	
lohi	Simojoki	6688	maksa	1,8	
lohi	Simojoki	6693	maksa	1,4 ja 0,6	koteloita pinnan alla
lohi	Simojoki	6697	maksa	1,0 ja 2*0,7	koteloita pinnan alla
lohi	Simojoki	6698	maksa	1,0	
lohi	Kemijoki	6872	maksa	1,3	

Jos kala olisi tullut elintarvikekäyttöön, loiset olisivat lähteneet perkuussa pois.

6.3 Kompressiomenetelmän tuloksien yhteenveto

Taulukosta 6 nähdään, kuinka pieni osa kaikista kaloista, vain 3,8 %, oli infektoitunut loisille. Vastaavasti tutkittujen siikojen kohdalla prosentuaalinen luku oli

paljon isompi, 18 %. Tämä suuri prosentti kertoo sen, että kaikki kaloissa havaitut loisesiintymät, jotka löytyivät kyseisellä menetelmällä, löytyivät siika-kaloilta.

TAULUKKO 6. Yhteenveto kompressiosta

kala	kalojen määrä	infektoituneet kalat	infektoituneet kalat %	loisten	
				keskiarvo	vaihteluväli
kaikki kalat	238	9	3,8	7,9	1-24
siika	50	9	18	7,9	1-24

6.4 Paljain silmin havaittujen tulosten yhteenveto

Taulukosta 7 nähdään, että kaikista kaloista 5,5 % oli infektoitunut loisille. Siikojen kesken infektoitumisprosentti oli 10 % ja lohilla 8,6 %. Taulukossa on myös mukana loiset, joista ei tiedetä, mitä ne ovat.

TAULUKKO 7. Yhteenveto paljain silmin havaituista

kala	kalojen määrä	infektoituneet kalat	infektoituneet kalat %	loisten	
				keskiarvo	vaihteluväli
kaikki kalat	238	13	5,5	4,2	1-16
siika	50	5	10	7,3	1-16
lohi	93	8	8,6	1,6	1-3

6.5 Tekojärvistä löydetyt loiset

Lokan- ja Porttipahdan tekojärvistä tulleilla vaellussiioilla harjoittelin kalojen fileoimista ohjaajani Perttu Kosken kanssa ja samalla laskettiin kaloissa näkyvien loisten määrät. Näitä kaloja ei prässätty. Taulukosta 8 nähdään Lokan tekojärven tulokset ja taulukosta 9 Porttipahdan.

Lokan ja Porttipahdan tekojärvien vaellussioilla tavattiin lokkilapamatoa, haukimatoa ja rakkoloisiota. Kaikki Porttipahdan yksilöt olivat saaneet lokkilapamato- ja haukimato -tartunnan. Lokan tekojärvässä lokkilapamatoa oli 98 % kaloista ja haukimatoa 96 %. Rakkoloisio ei ollut yhtä yleinen. Vain 6 % Lokan kaloista kantoi kyseistä itiöeläintä. Porttipahdalla rakkoloisiota ei tavattu tutkituissa kaloissa.

TAULUKKO 8. Lokan tekojärven tulokset

loinen	kalojen määrä	infektoituneet kalat	infektoituneet kalat %	loisten	
				keskiarvo	vaihteluväli
Lokkilapamato (<i>D. dentriticum</i>)	50	49	98	13,4	1-48
Haukimato (<i>T. crassus</i>)	50	48	96	8,9	2-29
Rakkoloisio (<i>H. zschokkei</i>)	50	3	6	9,7	4-21

TAULUKKO 9. Porttipahdan tekojärven tulokset

loinen	kalojen määrä	infektoituneet kalat	infektoituneet kalat %	loisten	
				keskiarvo	vaihteluväli
Lokkilapamato (<i>D. dentriticum</i>)	10	10	100	16,9	1-128
Haukimato (<i>T. crassus</i>)	10	10	100	7,3	1-26
Rakkoloisio (<i>H. zschokkei</i>)	10	0	0	0	0

6.6 Kaikki tutkitut kalat

Taulukossa 10 on kaikkien tuloksien koottu yhteenveto. Tuloksia nostaa Lokan ja Porttipahdan tekojärvien loisiintuneet kalat, ja ne ovat ongelma kyseisissä

järvissä. Tuloksista nähdään, että kaikista kaloista 26,5 % kantoi loisia. Siiolla kyseinen prosentti on 64,5 ja lohien osuus on 8,6 %. Tulos voi olla hieman virheellinen, sillä kyseisissä määrissä on mukana myös ei-tunnistettut loiset.

TAULUKKO 10. Kaikki kompressiomenetelmän, paljain silmin havaittujen ja tekojärvien kalojen yhteistulokset

kala	kalojen määrä	infektoituneet kalat	infektoituneet kalat %
kaikki kalat	298	79	26,5
siika	110	71	64,5
lohi	93	8	8,6

7 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää käytettävä menetelmä, jolla voidaan tutkia, esiintyykö suomalaisten vesistöjen kalakannassa *Anisakis simplex* -loista. Kaloja, joita tutkimuksessa käytettiin, olivat merilohi, vaellussiika ja silakka. Tutkittavat kalat olivat peräisin seuraavilta vesistöalueilta: Torniojoki, Kemijoki, Simojoki ja Porttipahdan ja Lokan tekoaltaat.

Loisten etsintään löytyi toimiva menetelmä, mutta *Anisakis simplex* -loista ei löytynyt, mikä ei yllättänyt. Kyseistä loista on havaittu Suomen vesistöillä vain muutaman kerran, joten se ei ole aiheuttanut ongelmaa Suomessa. Kompressiomenetelmällä löydettiin Henneguya zschokkei -itiöeläintä ja menetelmällä havaittiin, että 3,8 % tutkituista kaloista oli saanut loisinfection. Kaikkien kalojen määrä oli 298, joista 26,5 % oli loisittuja. Tätä prosenttiosuutta nostavat tekojärvien kalat, sillä tekojärvillä on ollut ongelma infektoiduneista kaloista.

Opinnäytetyön kannalta olisi ollut mukava, jos olisi saatu ainakin yksi kala, jossa olisi ollut *Anisakis simplex* -loinen. Tämä olisi voitu prässätä ja katsoa, miten se olisi näkynyt opinnäytetyössä kehitetyssä prässissä. Opinnäytetyön tekoaika oli rajallinen, mutta jos loisen esiintymistä kompressiomenetelmällä vielä tutkitaan, kaloja kannattaisi olla myös muulta alueelta, esimerkiksi Suomenlahdelta.

8 LÄHTEET

1. Kalojen loiset. 2012. Evira. Saatavissa:
http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/tapahtumat/elintarvikkeet/kalojen_loiset.pdf Hakupäivä: 8.4.2013.
2. Valtonen, E. Tellervo – Hakalahti- Sirén, Teija – Karvonen, Anssi – Pulkkinen, Katja 2012. Suomen kalojen loiset. Tampere: Tammerprint Oy (Gaudemus Oy) Kalantutkimukseen ja kalastukseen liittyviä käsitteitä.
3. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia loisia.2012. EVIRA. Saatavissa:
http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden_riski- ja_vaaratekijat/mikrobiologiset_vaaratekijat/ruokamyrkytyksia_aiheuttavia_loisia_/anisakis_simplex Hakupäivä: 27.4.2013.
4. European Food Safety Authority (EFSA), 2010: Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. Parma, Italy.
5. Rahkonen, Riitta – Vennerström, Pia – Rintämäki-Kinnunen, Päivi – Kannel, Risto 2000. Terve Kala: Tautien ennaltaehkäisy, tunnistus ja hoito. Helsinki: Nykypaino.
6. Kalojen yleisimpiä loisia.2011. Elintarviketurvallisuusvirasto (EVIRA). Saatavissa:
http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten_terveys_ ja_ elaintaudit/elaintaudit /kalat_ ja_ ravut/loistaudit/ Hakupäivä: 8.4.2013.
7. Kalojen loiset. 2006. LAP, Åbo Akademi. Saatavissa:
<http://web.abo.fi/instut/fisk/Fin/Parasiter/henneguya.htm> Hakupäivä: 8.4.2013.
8. Kalojen loiset. 2006. LAP, Åbo Akademi. Saatavissa:
<http://web.abo.fi/instut/fisk/Fin/Parasiter/ddend.htm> Hakupäivä 8.4.2013.

9. Leinonen, Kirsti – Mutenia, Ahti, 2009. Siikakantojen ja kalaston rakenteen parantaminen Lokan ja Porttipahdan tekojärvillä. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos Helsinki. Tampereen Yliopistopaino Oy – Juvenes Print.
10. Kalojen loiset.2006. LAP, Åbo Akademi.Saatavissa:
<http://web.abo.fi/instut/fisk/Fin/Parasiter/triaenop.htm> Hakupäivä 14.4.2013.
11. Koli, Lauri, 1990. Suomen kalat. Porvoo: WSOY:n graafiset laitokset.
12. Kalantutkimukseen ja kalastukseen liittyviä käsitteitä.2009. RKTL. Saatavissa: http://www.rktl.fi/kala/kalavarat/kalantutkimuksen_sanastoa/. Hakupäivä: 16.4.2013.
13. Kalat.2013. Luontoportti. Saatavissa:
<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kalat/lohi> Hakupäivä: 16.4.2013.
14. Lehtonen, Hannu, 2006. Suomalainen kalaopas. Porvoo: WS Bookwell Oy.
15. Lohen uhanalaisuus. 2010. RKTL. Saatavissa:
http://www.rktl.fi/kala/tietoa_kalalajeista/suomen_uhanalaiset_kalat/lohen_uhanalaisuus.html Hakupäivä: 16.4.2013.
16. Kalat.2013. Luontoportti. Saatavissa:
<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kalat/siika> Hakupäivä: 15.4.2013.
17. Koli, Lauri, 1990. Suomen kalat. Porvoo: WSOY:n graafiset laitokset.
18. Tietoa kalalajeista.2012. RKTL. Saatavissa:
http://www.rktl.fi/kala/tietoa_kalalajeista/lohi_jarvilohi/. Hakupäivä: 16.4.2013.
19. Siian uhanalaisuus.2011. RKTL. Saatavissa:
http://www.rktl.fi/kala/tietoa_kalalajeista/suomen_uhanalaiset_kalat/siian_uhanalaisuus.html Hakupäivä: 15.4.2013.
20. Muus, Bent J. – Dahlstrom, Preben, 2005. Suomen ja Euroopan sisävesikalat. Tanska.

21. Kalat.2013. Luontoportti. Saatavissa:
<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kalat/silakka> Hakupäivä: 14.4.2013.
22. Tietoa kalalajeista. 2009. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos (RKTL). Saatavissa: http://www.rktl.fi/kala/tietoa_kalalajeista/silakka/ Hakupäivä:14.4.2013.
23. Luonnonkalojen tauteja ja loisia.2006. LAP, Åbo Akademi. Saatavissa:
<http://web.abo.fi/instut/fisk/Fin/Vild/sik.htm> Hakupäivä: 8.4.2013.

LIITTEET**KALALISTA**

Lohet:

Simojoen emokat 2011 Merilohi
 Loukku pyyntiin 8.6.2011 Lintukkalahti

OPAT:	sukupuoli	paino (g)	pituus (cm)
6687	♀	8760	94
6688	♂	10900	104
6689	♀	7260	87
6690	♀	12780	106
6691	♂	6520	90
6692	♀	10000	99
6693	♀	12840	102
6694	♂	19520	118
6695	♀	6060	84
6697	♀	10460	102
6698	♀	6450	82
6700	♀	4620	79
6701	ei tietoa	7800	101

 E20111018-014 Simojoki

E11-0146854

OPAT:

6863

6864

6865

E20111011-124 Torniojoki

OPAT:	sukupuoli:	paino (kg):	pituus (cm):
6536	♀	3,7	80,5
6546	♀	7,1	98,0
6547	♀	8,9	105,0
6550	♀	3,5	77,0
6551	♀	5,1	86,0
6552	♀	8,7	104,0
6529	♂	1,3	55,5
6528	♂	1,7	60,5
6549	♀	4,0	81,0
6531	♂	4,9	82,0
6532	♂	9,1	97,0
6560	♀	4,2	82,5
6548	♀	9,1	107,0

E20111011-124 Torniojoki

OPAT:	sukupuoli:	paino (kg):	pituus (cm):
6536	♀	3,7	80,5
6546	♀	7,1	98,0
6547	♀	8,9	105,0
6550	♀	3,5	77,0
6551	♀	5,1	86,0
6552	♀	8,7	104,0
6529	♂	1,3	55,5
6528	♂	1,7	60,5
6549	♀	4,0	81,0
6531	♂	4,9	82,0
6532	♂	9,1	97,0
6560	♀	4,2	82,5
6548	♀	9,1	107,0

Kemijoen kossit

OPAT:	sukupuoli	OPAT:	sukupuoli	OPAT:	sukupuoli
6878	♂	6887	♂	6899	♂
6879	♂	6901	♂	6898	♂
6872	♀	6903	♂	6905	♂
6924	♂	6883	♂	6908	♀
6873	♂	6889	♂	6866	♂
6875	♂	6897	♂	6876	♀
6869	♂	6907	♂	6929	♂
6880	♂	6909	♂	6930	♂
6922	♂	6891	♂		
6871	♂	6902	♂		
6928	♂	6884	♂		
6923	♂	6892	♂		
6918	♂	6897	♂		
6927	♂	6906	♂		
6923	♂	6910	♂		
6874	♂	6896	♂		
6915	♂	6886	♂		
6868	♂	6877	♂		
6926	♂	6888	♂		
6916	♂	6890	♂		
6919	♂	6911	♂		
6914	♂	6893	♂		
6870	♂	6867	♂		
6913	♂	6904	♂		
6920	♂	6881	♂		
6921	♂	6900	♂		
6917	♂	6895	♂		
6912	♂	6882	♂		

Siijat:

E20111102-072

E11-0156753

OPAT:	paino (g):	pituus (cm):
7798	804,1	45
7799	625,7	43,5
7800	791,9	44
7801	277,3	34
7802	636,4	45,5
7803	522,9	40
7804	568,9	43

Perämerestä pyydettyjä siikoja
(painot ilman suolia)

OPAT:	paino (g):	pituus (cm):
7188	737,5	45,5
7189	583,7	42,5
7190	796,2	46,0
7191	610,4	43,0
7192	772,2	48,5
7193	415,0	39,0
7194	681,9	43,0
7195	541,2	43,0
7196	464,2	39,5
7197	559,9	42,0

E20111104-027

E11-0158418

OPAT:	paino (g):	pituus (cm):
7882	819,2	44,0
7883	968,7	47,0
7884	519,1	41,0

Siijat:

Perämerestä pyydettyjä siikoja (ilman päitä)

OPAT:	paino (g):	pituus (cm):
7198	632,70	44,0
7199	640,20	42,5
7200	725,40	47,0
7201	644,10	42,5
7202	440,10	37,0
7203	547,30	40,0
7204	592,80	42,0
7205	485,30	37,0
7206	652,10	42,5
7207	418,70	39,5
7208	629,30	40,0
7209	761,50	43,5
7210	466,80	39,5
7211	693,70	43,5
7212	454,80	40,0
7213	625,70	42,0
7214	450,00	41,5
7215	529,00	41,0
7216	515,50	39,0
7217	386,20	36,0
7218	562,20	40,0
7219	582,30	39,5
7220	385,30	36,0
7221	327,00	35,0
7222	410,80	38,5
7223	568,00	42,5
7224	553,60	40,5
7225	616,10	44,0
7226	535,50	40,0
7227	395,00	37,5

Tekojärvien siiat:

Lokan tekojärvi
D20111101-060

OPAT:	paino (g):	pituus (cm):	sukupuoli:	OPAT:	paino (g):	pituus (cm):	sukupuoli:
7738	121	26,0	♂	7763	132	26,5	♂
7739	153	28,5	♂	7764	206	31,0	♀
7740	157	28,0	♂	7765	139	27,5	♂
7741	191	29,0	♂	7766	185	28,5	♂
7742	165	28,5	♂	7767	181	29,5	♀
7743	159	28,0	♂	7768	152	27,5	♂
7744	166	29,5	♂	7769	193	30,0	♂
7745	167	28,0	♂	7770	143	27,5	♂
7746	146	26,5	♀	7771	146	28,5	♂
7747	168	28,0	♂	7772	158	28,0	♂
7748	157	27,5	♂	7773	200	30,0	♀
7749	158	29,0	♂	7774	172	27,5	♂
7750	197	29,5	♂	7775	151	27,0	♂
7751	117	25,5	♂	7776	138	26,0	♂
7752	186	29,5	♂	7777	135	27,5	♂
7753	128	26,5	♂	7778	161	28,0	♂
7754	180	28,5	♀	7779	150	27,0	♂
7755	182	28,5	♀	7780	138	27,5	♂
7756	139	27,0	♂	7781	205	29,5	♀
7757	170	28,0	♀	7782	180	29,0	♀
7758	179	29,0	♂	7783	106	25,0	♂
7759	139	26,5	♂	7784	149	28,0	♀
7760	163	27,5	♀	7785	158	28,5	♂
7761	189	30,0	♀	7786	138	26,0	♂
7762	169	29,0	♂	7787	121	25,5	♂

Porttipahdan tekojärvi
E20111103-122

OPAT:	paino (g):	pituus (cm):	sukupuoli:	OPAT:	paino (g):	pituus (cm):	sukupuoli:
7870	229	31,5	♂	7875	277	32,0	♀
7871	331	35,5	♀	7876	270	33,5	♀
7872	202	30,5	♂	7877	211	29,5	♂
7873	279	35,5	♀	7878	290	33,0	♂
7874	393	36,0	♀	7879	291	33,0	♀

Työvälineet

- analyysivaaka
- Stomacher-homogenisaattori ja stomacher-pusseja
- lämpömittari
- Blak-Ray, longwave ultraviolet lamp, san gabriel, ca 91778 U.S.A, model - 100A,200-260 volts, 50/60Hz, 2.0 Amps @ 220 Volts
- laboratorioastiasto
- fileointiveitsi
- kirurginveitsi
- preparaattilasi
- peitinlasi

Reagenssit

- HCl, Merck
- Pepsiini
- 70 % etanoli
- Cotton blue