

Suomalaisesta broilerintuotantoketjusta, broilerinlihasta ja koirista eristettyjen AmpC-positiivisten *Escherichia coli* -bakteerien resistenssiplasmidien ja genomin tyypittäminen

Heli Tamminen
Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän Yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia
29.5.2014

Alkusanat

Tämän työn kokeellinen osa suoritettiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Eläintautibakteriologian tutkimusyksikössä Kuopiossa syksyn 2012 ja kesän 2013 aikana. Kirjoitusprosessi tapahtui pääosin syksyn 2013 ja kevään 2014 välisenä aikana työn ja muun opiskelun ohella. Pro gradu -työn tekeminen oli haastavaa mutta erittäin antoisaa.

Haluan kiittää yksikönjohtajaa Sinikka Pelkosta, joka myös toimi ohjaajanani, mahdollisuudesta tehdä tämä pro gradu -työ Kuopion Eviran tutkimusyksikössä. Haluan antaa myös ison kiitoksen toiselle ohjaajalleni erikoistutkija Tarja Pohjanvirralle, joka on ohjannut ja valvonut graduprosessini etenemistä alusta loppuun asti. Kiitos kuuluu myös koko laboratorion väelle ja erityisesti laborantti Riitta Paldanius-Vidgrénille sekä laborantti Riikka Luukkaselle, jotka ovat opastaneet minua käytännön töissä. Suurta tukea olen saanut myös tutkija Nella Vähänikkilältä, jonka kanssa graduun liittyviä asioita on monesti puitu yhdessä, ja jolta olen saanut apua myös laboratoriossa.

Lisäksi haluan kiittää perhettäni tuesta ja kannustuksesta tässä pitkässä projektissa ja avopuolisoani, joka on jaksanut olla vierelläni turhautumisien hetkillä sekä iloinnut kanssani onnistumisista. Suuri kiitos kuuluu myös avopuolisoni vanhemmille, jotka ovat majoittaneet ja pitäneet huolta minusta Kuopiossa asuessani.

Tekijä:	Heli Tamminen	
Tutkielman nimi:	Suomalaisesta broilerintuotantoketjusta, broilerinlihasta ja koirista eristettyjen AmpC-positiivisten <i>Escherichia coli</i> -bakteerien resistenssiplasmidien ja genomien tyypittäminen	
English title:	Plasmid and genomic typing of AmpC producing <i>Escherichia coli</i> from Finnish broiler production, broiler meat and dogs	
Päivämäärä:	29.5.2014	Sivumäärä: 49
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Solu- ja molekyylibiologia	
Tutkielman ohjaajat:	Professori ELT Sinikka Pelkonen, ELL Tarja Pohjanvirta	

Tiivistelmä:

Plasmidivälitteistä AmpC-beetalaktamaasia tuottavia *Escherichia coli* -bakteereja on löydetty suomalaisesta broilerintuotantoketjusta, broilerinlihasta ja koirista. Nämä bakteerit ovat resistenttejä kolmannen polven kefalosporiineille, joita käytetään yleisesti ihmisten lääkkeenä. Koska resistenssi ilmenee plasmidissa, on mahdollista, että plasmidit siirtyvät konjugaation avulla ihmisille harmittomista bakteereista patogeenisiin bakteereihin. Nämä bakteerit voivat puolestaan siirtyä suoraan ruoan välityksellä tai lemmikkieläimistä ihmisiin ja aiheuttaa vaikeasti hoidettavia infektioita.

Tämän tutkielman tarkoitus oli tyypittää yhteensopimattomuus eli inkompatibiliteetti (Inc) ryhmään II kuuluvia konjugatiivisia resistenssiplasmideja plasmidien multilokus-sekvenssityypityksen (pMLST) avulla sekä ryhmään K kuuluvia plasmideja restriktioentsyymianalyysin avulla. Nämä menetelmät sopivat plasmidien samankaltaisuuden ja alkuperän tutkimiseen. Resistenssiplasmidien lisäksi tässä työssä tutkittiin fylogeniaryhmiin B2 ja D kuuluvien AmpC-positiivisten *E. coli* -bakteerien koko genomia multilokus-sekvenssityypitys (MLST)-analyysillä.

Plasmideja konjugoitiin vastaanottajakantaan, jonka jälkeen plasmidit tyypitettiin polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla Inc-ryhmiin. Transkonjuganteista *E. coli* -bakteereista eristettiin yhteensä 24 IncII- ja 10 IncK-tyypin plasmidia. Plasmidien multilokus-sekvenssityypitystä (pMLST) varten plasmideista monistettiin PCR:n avulla viittä spesifistä geenilokusta, jotka sekvensoitiin. Jokaisen geenilokuksen allelivariantti tunnistettiin ja plasmidi tyypitettiin allelivarianttien yhdistelmän mukaan. Restriktioentsyymianalyysissä plasmidit katkaistiin käyttämällä BamHI- ja HindIII-restriktioentsyymejä. Restriktioprofiilit saatiin erottelemalla näytteet agaroosigeelielektroforeesissa. Bakteerien koko genomien tyypitys toteutettiin samaan tapaan kuin pMLST-analyysissä, mutta määrittäen bakteerin genomien seitsemää spesifistä geenilokusta.

Suurin osa broilerintuotannosta eristetyistä *E. coli* -kannoista sisälsi konjugatiivisen resistenssiplasmidin, joka kuului IncII-tyyppiin. Broilerinlihasta eristettyjen kantojen konjugatiiviset plasmidit kuuluivat sen sijaan suurimmaksi osaksi IncK-tyyppiin. Koirien konjugatiiviset plasmidit kuuluivat IncII-tyyppiin. pMLST-analyysin mukaan kaikki broilerintuotantoketjun ja broilerinlihan bakteereista eristetyt IncII-plasmidit kuuluivat samaan sekvenssityyppiin 12. Tästä voidaan olettaa, että plasmidit ovat siirtyneet vertikaalisesti bakteerien mukana yhteisestä lähteestä broilerintuotantoketjussa alaspäin. Plasmidit ovat levittäytyneet tuotantoketjussa todennäköisesti myös horisontaalisesti konjugaation avulla. Restriktioentsyymianalyysin mukaan IncK-plasmideja oli ainakin viittä eri tyyppiä. Broilerintuotannon eri vaiheista ja broilerinlihasta eristetyistä *E. coli* -bakteereista löydettiin samanlaisesti pilkkoutuneita IncK-plasmideja, ja onkin mahdollista, että plasmidit ovat siirtyneet bakteerien välityksellä broilerintuotannosta broilerinlihaan. Koirien *E. coli* -kannoista eristetyissä plasmideissa oli pieniä eroavaisuuksia. Koska broilerinlihan plasmidit kuuluivat suurimmaksi osaksi IncK-tyyppiin, on kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että koirien bakteerien plasmidit olisivat peräisin broilerinlihasta. Lopuksi bakteerien koko genomien tyypityksestä selvisi, että bakteerit kuuluivat sekvenssityyppeihin 131 ja 38. Sekvenssityyppiin ST131 kuuluva *E. coli* -kanta on resistentti monille antibiooteille ja aiheuttaa ihmisille suoliston ulkopuolisia infektioita. Onkin huolestuttavaa, että tällaisia kantoja löytyy suomalaisesta broilerintuotannosta. Tämän työn tuloksia voidaan hyödyntää suunniteltaessa toimenpiteitä antibioottiresistenssin leviämisen ehkäisemiseen suomalaisessa broilerintuotannossa.

Avainsanat: *Escherichia coli*, plasmidi, AmpC, pMLST

Author: Heli Tamminen
Title of thesis: Plasmid and genomic typing of AmpC producing *Escherichia coli* from Finnish broiler production, broiler meat and dogs
Finnish title: Suomalaisesta broilerintuotantoketjusta, broilerinlihasta ja koirista eristettyjen AmpC-positiivisten *Escherichia coli* -bakteerien reistenssiplasmidien ja genomien tyypittäminen
Date: 29.5.2014 **Pages:** 49
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Supervisors: Professor VMD Sinikka Pelkonen, VML Tarja Pohjanvirta

Abstract:

Plasmid mediated AmpC beta-lactamase producing *Escherichia coli* (*E. coli*) have been found from Finnish broiler production chain, broiler meat and dogs. These bacteria are resistant to third generation cephalosporins that are frequently used to treat human infections. Because these resistance genes are carried in plasmids they can transfer from commensal bacteria to pathogenic bacteria by conjugation. These bacteria can in turn transfer from food or pets to humans and cause infections that are difficult to treat.

The aim of this study was to characterize resistance plasmids belonging to the incompatibility (Inc) group I1 by using plasmid multilocus sequence typing (pMLST) and plasmids belonging to Inc group K by using restriction enzyme analysis. With the help of these methods it is possible to study plasmid similarity and origin. In addition genomes of AmpC positive *E. coli* -bacteria belonging to phylogenetic groups B2 and D were studied by using multilocus sequence typing (MLST).

Plasmids were conjugated to recipient strain and typed to Inc groups using polymerase chain reaction (PCR). A total of 24 IncI1 and 10 IncK plasmids were isolated from *E. coli* transconjugants. pMLST was performed by amplifying and sequencing five specific plasmid loci. Allele variants for each sequenced loci were identified and plasmids were typed according to the combinations of allele variants. Restriction enzyme analysis was performed by digesting plasmids using HindIII and BamHI restriction enzymes. Samples were resolved on agarose gel to get restriction profiles. The bacterial whole genome typing was performed like plasmid multilocus sequencing but by using seven specific loci of bacterial genome.

Most *E. coli* strains isolated from broiler production chain carried conjugative resistance plasmid belonging to type IncI1. Most strains isolated from broiler meat carried conjugative plasmids belonging to type IncK. *E. coli* isolated from dogs carried conjugative plasmids belonging to type incI1. According to pMLST all IncI1 plasmids in *E. coli* isolated from broiler production and broiler meat had the same sequence type 12. This suggests that the plasmids come from a common source and have then transferred vertically via bacteria in the broiler production chain. Plasmids have also probably spread out in the production chain horizontally by conjugation. Restriction enzyme analysis revealed that IncK plasmids belonged to at least five different types. The same restriction profiles were found in bacteria isolated from broiler production chain and broiler meat. It is possible that these plasmids have transferred from broiler production to broiler meat via bacteria. Plasmids in *E. coli* isolated from dogs had minor differences but because most plasmids from broiler meat were IncK it is quite unlikely that these plasmids originated from broiler meat. Finally bacterial whole genome typing revealed that studied bacteria belonged to sequence types 131 and 38. Sequence type 131 *E. coli* strain is multi-drug resistant and pathogenic to humans causing extra intestinal infections. It is worrisome that these strains have been found from Finnish broiler production. These results can be useful when planning actions to prevent antibiotic resistance from spreading in Finnish broiler production.

Key words: *Escherichia coli*, plasmid, AmpC, pMLST

Sisällysluettelo

Alkusanat

Tiivistelmä

Englanninkielinen tiivistelmä

Lyhenteet

1	Johdanto	8
1.1	Plasmideista.....	8
1.1.1	Konjugatiiviset plasmidit.....	8
1.1.2	Plasmidien luokittelu	9
1.2	Beetalaktaamiantibiootit	10
1.2.1	Yleistä beetalaktaamiantibiooteista	10
1.2.2	Beetalaktaamiresistenssi	11
1.3	ESBL.....	12
1.4	AmpC	12
1.5	ESBL- ja AmpC-geenien yleisyys tuotantoeläimissä, ruoassa ja seuraeläimissä. 14	
1.6	Siipikarjassa ja ihmisissä esiintyvien ESBL- ja AmpC-geenien, plasmidien ja <i>E. coli</i> -kantojen yhtäläisyydet.....	15
1.7	Broilerinkasvatus Suomessa.....	16
1.8	Multilokus-sekvenssityypitys-menetelmä bakteerien ja plasmidien tutkimisessa	17
2	Tutkimuksen tavoitteet	19
3	Materiaalit ja menetelmät	20
3.1	<i>E. coli</i> -kannat	20
3.2	Konjugaatiokoe	20
3.3	CIT-PCR	21
3.4	Inc-tyypitys-PCR.....	22

3.5	Plasmidien eristys transkonjuganteista	25
3.6	Plasmidien eristys villin tyypin bakteerikannoista.....	26
3.7	pMLST	26
3.8	Restriktioentsyymianalyysi	28
3.9	MLST	29
4	Tulokset	32
4.1	Konjugaatio	32
4.2	CIT-PCR ja Inc-tyypitys	32
4.3	IncI1-plasmidien pMLST.....	35
4.4	IncK-plasmidien eristys ja restriktioentsyymianalyysi	35
4.5	MLST	37
5	Tulosten tarkastelu.....	38
5.1	Konjugaatio	38
5.2	AmpC-geeni ja Inc-tyypit	39
5.3	pMLST ja restriktioentsyymianalyysi.....	40
5.4	MLST	42
5.5	Tulosten hyödyntäminen.....	43
5.6	Yhteenveto	43
6	Lähdeluettelo	45

Lyhenteet

AmpC	AmpC-luokan beetalaktamaasi
BHI	brain-heart infusion
ESBL	laajakirjoinen beetalaktamaasi
Inc	yhteensopimattomuus eli inkompatibiliteetti
LB	Luria-Bertani
MLST	multilokus-sekvenssityypitys
PBP	penisilliiniin sitoutuva proteiini
PFGE	pulssikenttäelektroforeesi
pMLST	plasmidien multilokus-sekvenssityypitys
ST	sekvenssityyppi
TSA	tryptic soy-agar

1 Johdanto

Escherichia coli on gram-negatiivinen bakteeri, joka elää tavallisesti ihmisten ja eläinten suolistossa. *E. coli* -bakteeri voi olla myös patogeeninen ja aiheuttaa suolitulehduksia sekä suoliston ulkopuolella muun muassa virtsatieinfektioita ja aivokalvontulehdusta. *E. coli* -bakteerin aiheuttamia infektioita hoidetaan ihmisillä pääasiassa laajakirjoisilla beetalaktaamiantibiooteilla. Näille antibiooteille vastustuskykyiset bakterikannat ovat lisääntyneet ja levinneet ympäri maailmaa viime vuosikymmeninä (EFSA 2011). Resistenttiys laajakirjoisille beetalaktaamiantibiooteille on liitetty laajakirjoisiin beetalaktamaasi (ESBL) -geeneihin sekä AmpC-luokan beetalaktamaasigeeneihin. Tuotantoeläimissä ESBL- ja AmpC-geenejä on todettu erityisesti siipikarjassa ja ne mahdollisesti toimivat näiden geenien varastoina (Smet ym., 2008; Börjesson ym., 2013b). Myös suomalaisista broilerintuotantoketjun näytteistä ja broilerinlihasta sekä koirien ulosteista on löydetty plasmidivälitteistä AmpC-entsyymiä tuottavia *E. coli* -kantoja (Evira ja THL julkaisematon). Koska plasmidit voivat siirtyä konjugaation avulla bakteerista toiseen, voi resistenttiys levitä sopivissa olosuhteissa nopeasti. Tämä on uhka ihmisten terveydelle, sillä resistenttien bakteerien aiheuttamia infektioita on vaikea hoitaa. Vaikka ei ole olemassa paljon näyttöä resistenttien bakteerien siirtymisestä ruoan välityksellä tai lemmikkieläimistä ihmisiin, tätä pidetään kuitenkin todennäköisenä (EFSA 2011).

1.1 Plasmideista

1.1.1 Konjugatiiviset plasmidit

Antibioottiresistenssigeenit, kuten ESBL- ja AmpC-geenit, ilmenevät usein plasmideissa (ks. yleiskatsaus Carattoli 2003). Plasmidit ovat kaksijuosteisia DNA-molekyylejä, jotka sijaitsevat bakteerin kromosomin ulkopuolella solulimassa useimmiten rengasmaisina rakenteina. Plasmidit voivat olla kooltaan vain muutamasta tuhannesta emäsparista useaan sataan kiloemäspariin ja ne pystyvät replikoitumaan itsenäisesti (ks. yleiskatsaus Couturier ym., 1988). Isäntäbakteeri tulee toimeen ilman plasmidia, sillä plasmidi ei sisällä isännälle välttämättömiä geenejä. Sen sijaan plasmideissa voi olla isännälle hyödyllisiä

ominaisuuksia, joita antibioottiresistenssin lisäksi ovat muun muassa virulenssitekijät, myrkyjen erityis ja kyky metaboloida tiettyjä molekyyliä (ks. yleiskatsaus Couturier ym., 1988). Plasmidit siirtyvät vertikaalisesti bakteerisukupolvelta toiselle, mutta useat plasmidit pystyvät lisäksi konjugoitumaan eli siirtymään bakteerista toiseen jopa eri bakteerilajien välillä. Konjugaatio on yksi horisontaalisen geenien siirtymisen mekanismeista transformaation ja transduktion lisäksi (ks. yleiskatsaus Thomas ja Nielsen 2005). Konjugatiiviset plasmidit ovat merkittäviä antibioottiresistenssin leviämisen kannalta, sillä konjugaation avulla plasmidit voivat levitä varsin nopeasti bakteeripopulaatiossa (Dionisio ym., 2002).

Konjugaatio on yleistä gram-negatiivisissa bakteereissa, mutta sitä esiintyy myös gram-positiivisissa bakteereissa (Willets 1988). Mekanismi on kuitenkin hieman erilainen. Seuraavaksi esitän pääpiirteittäin, miten konjugaatio tapahtuu gram-negatiivisessa *E. coli* -bakteerissa. Konjugatiiviset plasmidit ovat F-plasmideja, joilla on tarvittavat geenit plasmidin siirtämistä varten. Tällaisia geenejä ovat muun muassa piluksesta vastaavat geenit sekä DNA:n synteesistä ja kuljetuksesta vastaavat geenit (Holmes ja Jobling 1996). Konjugoituakseen bakteerien pitää olla läheisessä kontaktissa toisiinsa. Bakteerit muodostavat piluksen avulla mating-parin, jossa F-plasmidin kaksijuosteinen DNA katkaistaan replikaation aloituskohdasta relaksaasin välityksellä (ks. yleiskatsaus Lanka ja Wilkins 1995). Yksijuosteinen DNA siirtyy bakteerien välille muodostunutta huokosta pitkin vastaanottajasoluun Rolling circle-replikaation tapaan. Sekä vastaanottaja että luovuttajasolussa yksijuosteinen DNA täydennetään lopuksi kaksijuosteiseksi.

1.1.2 Plasmidien luokittelu

Koska plasmideilla on suuri merkitys antibioottiresistenssin leviämässä, on plasmidien tunnistaminen ja luokittelu tarpeellista. Plasmideja voidaan luokitella yhteensopimattomuus- eli inkompatibiliteetti (Inc) -ryhmiin sen perusteella pystyvätkö ne lisääntymään samassa bakteerisolussa yhtäaikaaisesti muiden plasmidien kanssa (ks. yleiskatsaus Couturier ym., 1988). Kaksi plasmidia, joilla on samanlaiset replikaatio- ja jakautumistekijät, eivät pysty lisääntymään samassa solussa, sillä ne kilpailevat näistä toiminnoista keskenään. Kyseiset plasmidit kuuluvat tällöin samaan Inc-ryhmään. Luokittelun avulla tiettyjä plasmidityyppejä on pystytty yhdistämään erilaisiin antibioottiresistenssigeeneihin (Johnson ym., 2007b). Tällä hetkellä Enterobacteriaceae-

heimon bakteereilla tunnetaan 27 Inc-ryhmää. Suurimmat plasmidiperheet ovat HI2, HI1, II- γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K ja B/O. Inc-tyypitystä varten on kehitetty PCR-menetelmä, jolla voidaan tunnistaa suurimpiin plasmidiperheisiin kuuluvat plasmidit (Carattoli ym., 2005).

1.2 Beetalaktaamiantibiootit

1.2.1 Yleistä beetalaktaamiantibiooteista

Beetalaktaamit ovat yleisiä bakteeri-infektioiden hoitoon käytettäviä antibiootteja. Niiden rakenteelle on tyypillistä laktaamisidoksella muodostunut rengas. Yleisimpiin beetalaktaamiantibiootteihin kuuluvat penisilliinit, penisilliinin johdannaiset, kefalosporiinit, kefamysiinit, karbapeneemit, monobaktaamit ja monokarbaamit (ks. yleiskatsaus Essack 2001). Penisilliinit tehoavat hyvin erityisesti gram-positiivisiin bakteereihin. Penisilliinin johdannaiset, joita ovat muun muassa laajakirjoiset aminopenisilliinit, tehoavat sen sijaan kapeakirjoisia penisillinejä paremmin gram-negatiivisiin bakteereihin. Kefalosporiinit jaotellaan eri sukupolviin sen mukaan, miten hyvin ne sietävät niitä hydrolysoivaa beetalaktamaasia tai milloin ne on löydetty (Koulu ja Tuomisto 2001). Kefalosporiineja on hyvin monenlaisia ja ne eroavat toisistaan erilaisten sivuketjujen tai rakenteen perusteella. Ensimmäisen polven kefalosporiinit eivät tehoa kovinkaan hyvin gram-negatiivisiin bakteereihin toisin kuin toisen, kolmannen ja neljännen polven kefalosporiinit. Karbapeneemeillä on kaikista laajin antimikrobinen spektri ja ne tehoavat useimpiin patogeeneisiin bakteereihin (ks. yleiskatsaus Essack 2001). Monobaktaamit poikkeavat rakenteeltaan hieman muista beetalaktaameista ja ne tehoavat vain gram-negatiivisiin bakteereihin.

Beetalaktaamiantibioottien vaikutus perustuu bakteerin soluseinän peptidoglykaanisynteesin estoon. Peptidoglykaanikerros ylläpitää solun muotoa ja suojaa bakteeria osmoottiselta paineelta. Beetalaktaamit vaikuttavat penisilliiniä sitovaan proteiiniin (PBP). PBP osallistuu peptidoglykaanisynteesiin linkittämällä soluseinän peptidiketjut yhteen. Beetalaktaami antibiootti sitoutuu PBP:n aktiiviseen kohtaan ja estää näin sen toiminnan ja peptidoglykaanisynteesin (Spratt 1994).

Beetalaktaameja käytetään yleisesti ihmisten lääkkeenä, mutta niitä on käytetty ja käytetään edelleen myös tuotantoeläinten hoidossa. Koska antibioottien käyttö luo bakteereille valintapaineen, resistentit kannat pääsevät helposti lisääntymään. Beetalaktaamiantibioottien käytön uskotaankin lisänneen näille antibiooteille resistenttien bakteerikantojen kasvua tuotantoeläimissä (EFSA 2011). Kefalosporiinien käyttö siipikarjanhoidossa on EU-maissa kiellettyä, mutta niitä käytetään jonkun verran nautojen, sikojen ja hevosten infektioiden hoitoon. Monissa Euroopan maissa eläinten hoitoon sallittuja beetalaktaamiantibiootteja ovat kapeakirjoiset penisilliinit sekä laajakirjoiset aminopenisilliinit (EFSA 2011). Kymmentä Euroopan maata koskevasta tutkimuksesta selviää että Suomessa, Ruotsissa ja Norjassa tuotantoeläinten hoidossa käytetyistä antibiooteista suurin osa kuuluu juuri beetalaktaamiantibiootteihin (Grave ym., 2010). Toisaalta monissa muissa Euroopan maissa antibioottien kokonaiskulutus on huomattavasti suurempaa kuin Suomessa. EU-maiden ulkopuolella antibioottien käyttö eläimillä on vaihtelevaa. Joissakin maissa antibioottien käytölle eläinten hoidossa ei ole lainkaan rajoituksia (Maron ym., 2013).

1.2.2 Beetalaktaamiresistenssi

Bakteerit voivat olla luonnostaan resistenttejä eri antibiooteille. Esimerkiksi mykoplasmoilla ei ole peptidoglykaanista koostuvaa soluseinää, jolloin ne ovat resistenttejä kaikille beetalaktaamiantibiooteille (ks. yleiskatsaus Normark ja Normark 2002). Bakteereilla tunnetaan myös muita resistenssimekanismeja beetalaktaamiantibiootteja vastaan. Bakteerilla voi olla mutaatio PBP:tä koodittavassa geenissä tai muuten muuttunut muoto kyseisestä proteiinista, jolloin beetalaktaamien affiniteetti PBP:hen on pienentynyt (ks. yleiskatsaus Georgopapadakou 1993). Toinen resistenssiä aiheuttava syy voi olla soluseinän läpäisevyyden muutos, jolloin lääke ei pääse vaikuttamaan (ks. yleiskatsaus Nikaido 1989). Kolmas ja yleisin resistenssimekanismi gram-negatiivisilla bakteereilla on kuitenkin beetalaktaamaasientsyymien tuotto (ks. yleiskatsaus Poole 2004; ks. yleiskatsaus Smet ym., 2009). Beetalaktaamaasit pystyvät pilkkomaan antibioottien beetalaktaamirenkaan, jolloin näiden antibioottien teho häviää.

1.3 ESBL

ESBL-entsyymit antavat bakteerille vastustuskyvyn muun muassa penisilliineille, toisen, kolmannen ja neljännen polven kefalosporiineille sekä monobaktaameille (ks. yleiskatsaus Bradford 2001). Yleensä ESBL-entsyymit eivät kuitenkaan aiheuta vastustuskykyä karpabeneemeille tai kefamysiineille. ESBL-geenit ilmentyvät plasmidissa ja ovat yleisiä *E. coli*- ja *Klebsiella pneumoniae* -bakteereissa.

ESBL-geenit kuuluvat yleisimmin TEM-, SHV- tai CTX-M-geeniperheisiin (ks. yleiskatsaus Paterson ja Bonomo 2005). Suurin osa TEM-ryhmän geneistä tuottaa ESBL-entsyymejä. TEM-1-, TEM-2- ja TEM-13-entsyymit hydrolysoivat kuitenkin vain penisilliinejä eikä niitä lasketa kuuluviksi ESBL-entsyymeihin. Jotkin TEM-ryhmän mutantit pystyvät hydrolysoimaan kolmannen polven kefalosporiinien lisäksi myös beetalaktamaasi-inhibiittoreita (Fielt ym., 2000). SHV-1-tyypin beetalaktamaasientsyymi on löydetty ensimmäisen kerran *K. pneumoniae* -bakteereista (ks. yleiskatsaus Gupta 2007). Tämä entsyymi antaa vastustuskyvyn vain laajakirjoisille penisilliineille. Vuonna 1983 *K. pneumoniae* -bakteerista löydettiin SHV-2 -tyypin beetalaktamaasi, joka hydrolysoi myös kefotaksiimia. CTX-M-ryhmän beetalaktamaasit ovat kaikki ESBL-entsyymejä ja ryhmä on nimetty sen mukaan, että niillä on kyky hydrolysoida kefotaksiimia. CTX-M -ryhmän geenit ovat peräisin *Kluyvera*-suvun bakteerin kromosomista, josta geenit ovat insertiosekvenssien avulla hypänneet plasmidiin (ks. yleiskatsaus Cantón ja Coque 2006). CTX-M-ryhmän geenit ovat levinneet nopeasti luultavasti siksi, että geenit ilmentyvät plasmideissa joissa on useita resistenssi- ja virulenssigeenejä. CTX-M onkin tällä hetkellä yleisin ESBL-geeniperhe. OXA-ryhmän beetalaktamaasit eivät pääsääntöisesti ole ESBL-entsyymejä, koska ne eivät hydrolysoi kefalosporiineja. OXA-10, OXA-13 ja OXA-19 ovat kuitenkin poikkeuksia (Toleman ym., 2003).

1.4 AmpC

AmpC-geenit voivat sijaita bakteerin kromosomissa tai plasmidissa. AmpC-entsyymit ovat aktiivisia penisilliinejä kohtaan, mutta vielä aktiivisemmin ne hydrolysoivat kefalosporiineja (ks. yleiskatsaus Jacoby 2009). Lisäksi AmpC-entsyymit hydrolysoivat kefamysiinejä ja monobaktaameja. AmpC-entsyymit inhiboituvat klavulaanilaholla. On

tavallista, että AmpC-plasmidit tuottavat lisäksi entsyymejä, jotka tuhoavat muihin antibioottiryhmiin kuuluvia antibiootteja kuten esimerkiksi kinoloneja (Rodriguez-Martinez 2003).

AmpC-entsyymejä koodaavat geenit voivat sijaita bakteerien kromosomissa ja näin onkin monissa gram-negatiivisissa bakteereissa kuten *Citrobacter*, *Serratia* ja *Enterobacter*-suvuissa (ks. yleiskatsaus Smet ym., 2009). AmpC-geeni indusoituu yleensä beetalaktaamiantibiooteista ja tuottaa AmpR-säätelytekijän säätelmänä beetalaktamaasia. Mutaatiot AmpD-repressorissa voivat puolestaan johtaa beetalaktamaasien ylituottoon (Schmidtke ym., 2006). *E. coli*-bakteerien AmpC-geenit eivät induoidu, sillä *E. coli*-bakteereilta puuttuu AmpR-säätelytekijä (Peter-Getzlaff ym., 2011). Jos *E. coli*-bakteerilla on kromosomissaan AmpC-geeni, se ei yleensä ilmenny tai ilmentyy vain hyvin vähän (Jaurin ym., 1981). Plasmidivälitteiset AmpC-geenit ovat yleisiä *E. coli*- ja *Klebsiella*-bakteereissa. Kromosomaaliset AmpC-geenit ovat todennäköisesti karanneet kromosomista plasmideiksi insertiosekvenssien ja transposonien avulla (ks. yleiskatsaus Jacoby 2009). Plasmidien AmpC-geenit eivät yleensä ole indusoituvia, sillä niissä ei ole AmpR-säätelytekijää. AmpC-entsyymien ylituotto johtuukin luultavasti muutoksista tai mutaatioista geenin promoottorialueella (Reisbig ym., 2003).

AmpC-beetalaktamaasit jaetaan viiteen ryhmään niiden sekvenssivertailujen perusteella (ks. yleiskatsaus Walther-Rasmusen ja Høiby 2002; ks. yleiskatsaus Poole 2004). Ensimmäiseen ryhmään kuuluu hyvin läheisesti sukua olevia beetalaktamaaseja. Näitä ovat CMY-2–7, LAT-1–4 ja BIL-1. C1-ryhmän geenien, uskotaan olevan peräisin *C. freundii*-bakteerin kromosomaalisesta AmpC-lokuksesta. Ryhmään C2 kuuluvat keskenään vähemmän samanlaiset CMY-1, CMY-8–11, MOX-1–2 ja FOX-1–6. Ryhmään C3 kuuluvat ACT-1 sekä MIR-1 ja ryhmään C4 DHA-1 sekä DHA-2. Ryhmään C5 kuuluu vain yksi beetalaktamaasi ACC-1, jota on löydetty *K.pneumoniae*-, *S. enterica*- sekä *E. coli*-bakteereista. Eri geeniperheiden tunnistamista varten on kehitetty multiplex-PCR-menetelmä (Perez-Perez ja Hanson 2002). PCR-menetelmän avulla geeniperheet voidaan jakaa kuuteen ryhmään, jossa FOX on eroteltu omaksi ryhmäkseen.

1.5 ESBL- ja AmpC-geenien yleisyys tuotantoeläimissä, ruoassa ja seuraeläimissä

ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavia bakteereja on löydetty sairaalahoidossa olevilta potilailta jo 1980-luvulta alkaen. Ensimmäinen lemmikkieläimestä löydetty ESBL-entsyymejä tuottava *E. coli* -bakteeri löydettiin toistuvista virtsatulehduksista kärsivältä koiralta vuonna 1998 (Teshager ym., 2000). ESBL/AmpC-geenien yleisyyttä tuotantoeläimissä ja ruoassa on alettu kartoittaa vasta 2000-luvulta lähtien. Tiedot eri maiden välillä eivät ole kuitenkaan suoraan vertailtavissa, sillä tilastojen keräämiseen käytetyt menetelmät ovat vaihdelleet. ESBL/AmpC-positiivisten bakteerikantojen määrä on kuitenkin selvästi kasvanut, vaikka antibioottien käyttöä on rajoitettu monissa maissa.

Ensimmäiset tuotantoeläimistä esiintyvät ESBL/AmpC-geenit löydettiin terveistä kanoista eristetyistä *E. coli* -bakteereista vuosina 2000–2001 Espanjassa suoritetussa antibioottiresistenssin valvontatutkimuksessa (Brinas ym., 2003). Ulostenäytteiden *E. coli* -bakteereista 1,6 % oli ESBL-positiivisia ja 0,8 % AmpC-positiivisia. Tällä hetkellä ESBL/AmpC-entsyymejä on löydetty kasvavassa määrin ympäri maailmaa tuotantoeläimistä ja ruoasta. Erityisen yleisiä nämä entsyymit ovat siipikarjassa ja siipikarjatuotteissa, mutta myös sioista ja naudoista on löydetty ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavia bakteereja (EFSA 2011). ESBL-geenejä on myös löydetty siipikarjan *E. coli* -bakteereista EU-maiden ulkopuolella muun muassa Kiinasta, Japanista, Yhdysvalloista sekä Tunisiasta. Euroopasta löydetyt ESBL-geenit ovat kuuluneet yleisimpiin CTX-M-, SHV- ja TEM-geeniperheisiin (ks. yleiskatsaus Cantón ym., 2008). AmpC-geenejä on löydetty myös maailmanlaajuisesti siipikarjasta ja siipikarjatuotteista eristetyistä *E. coli* -bakteereista. Selvästi yleisin AmpC-geeni on CMY-2 (EFSA 2011). Hollannissa vuonna 2010 tehdystä tutkimuksesta selvisi, että jopa 94 % tutkituista siipikarjanlihan *E. coli* -bakteereista oli ESBL- tai AmpC-positiivisia (Dierikx ym., 2010). Ruotsissa vuonna 2012 tutkitusta broilerinlihasta löydettiin *E. coli* -bakteereja, joista 44 % tuotti AmpC/ESBL-entsyymejä (Börjesson ym., 2013b). Yleisin geeni oli CMY-2. Tanskassa vuonna 2011 tutkituista broilerinlihanäytteistä niin ikään 44 % sisälsi ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavia *E. coli* -bakteereja (Agero ym., 2012). Suomessa vuonna 2010–2011 tutkituista broilerinlihasta eristetyistä *E. coli* -kannoista löytyi myös AmpC-positiivisia kantoja ja löydösten määrä kasvoi vuonna 2012 (Evira ja THL, julkaisematon). ESBL-positiivisia *E.*

coli -bakteereja ei löydetty vuosina 2010–2011 lainkaan, mutta vuotta myöhemmin niitä kuitenkin löydettiin pienestä osasta näytteitä.

Lemmikkieläinten ESBL/AmpC taakkaa on tutkittu selvästi vähemmän, mutta myös lemmikit voivat toimia ESBL/AmpC-geenien varastoina (ks. yleiskatsaus Guardabassi ym., 2004). Koirista, kissoista ja hevosista otetuista ulostenäytteistä on löytynyt ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavia Enterobacteriaceae-heimon bakteereja, erityisesti *E. coli* -bakteereja (Gibson ym., 2010). Hollannissa tehdyssä tutkimuksessa sairaiden koirien ja kissojen ulostenäytteistä 25–55 % sisälsi ESBL/AmpC-positiivisia bakteereja (Hordijk ym., 2013). Myös Suomesta on löydetty ESBL/AmpC-positiivisia *E. coli* -bakteereja koirien ulosteista (Evira ja THL, julkaisematon).

1.6 Siipikarjassa ja ihmisissä esiintyvien ESBL- ja AmpC-geenien, plasmidien ja *E. coli* -kantojen yhtäläisyydet

Siipikarja ja siipikarjatuotteet voivat toimia ESBL/AmpC-geenien varastoina ja edesauttaa geenien siirtymistä ihmisiin. Geenit voivat siirtyä suoraan ruoan välityksellä tai siipikarjan kasvatusympäristöstä. Yhdysvalloissa Minnesotassa ja Wisconsinissa vuosina 2002–2004 tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että ihmisistä eristetyissä ESBL-entsyymejä tuottavissa *E. coli* -näytteissä oli enemmän yhtäläisyyksiä siipikarjasta eristettyjen ESBL-entsyymejä tuottavien *E. coli* -kantojen kanssa kuin ihmisistä eristettyjen herkkien *E. coli* -kantojen kanssa (Johnson ym., 2007a). Tästä pääteltiin, että ihmisissä esiintyvät resistenssibakteerit ovat mahdollisesti peräisin siipikarjasta. Myös Hollannissa on tehty useita tutkimuksia siipikarjan ja ihmisten ESBL-geenien, plasmidien ja *E. coli* -kantojen yhtäläisyyksistä. Leverstein-van Hall ym. (2011) löysivät ihmisten ja siipikarjanliha näytteistä ESBL-entsyymejä tuottavia *E. coli* -bakteereja, jotka kuuluivat samaan sekvenssityyppiin, sisälsivät samanlaisen resistenssiplasmidin ja ESBL-geenin. Yhteiset bakteerikannat kuuluivat sekvenssityyppiin ST10, ST117 ja ST58. Suurin osa plasmideista kuului IncI1-tyyppiin ja ne sisälsivät CTX-M-1- tai TEM-52 -geenejä, jotka ovat hyvin yleisiä sekä ihmisissä että siipikarjassa. Tutkimustulokset osoittivat, että on hyvin todennäköistä, että ESBL-geenit/plasmidit ovat voineet siirtyneet ruoan välityksellä siipikarjanlihasta ihmiseen. Myös Kluytmans ym. (2013) osoittivat, että broilerinlihasta ja ihmisistä löytyi samoja ESBL-entsyymejä tuottavia bakteerikantoja. Lisäksi myös bakteerien

virulenssitekijöissä oli yhtäläisyyksiä. Ihmisille erittäin virulentin multiresistentin ST131-*E. coli* -kloonin on osoitettu levinneen maailmanlaajuisesti niin ihmisiin kuin eläimiin. Ihmisistä, siipikarjasta ja lemmikkieläimistä eristetyiltä ST131-kloonin kuuluvilta kannoilta on löydetty myös huomattavia yhtäläisyyksiä resistenssiominaisuuksien suhteen (ks. yleiskatsaus Platell ym., 2011). Ruoan lisäksi ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavat bakteerit voivat siirtyä ihmiseen myös siipikarjatuotannon ympäristöstä. Tätä hypoteesia tukee Hollannissa tehty tutkimus, jonka mukaan siipikarjatilalla työskentelevillä on selvästi suurempi riski olla ESBL/AmpC-kantaja kuin muulla väestöllä keskimäärin (Dierikx ym., 2013).

1.7 Broilerinkasvatus Suomessa

Broilerinkasvatus on Suomessa hyvin valvottua ja tapahtuu sopimustiloilla, jotka ovat sitoutuneet noudattamaan hyviä tuotantotapoja (Suomen Siipikarjaliitto ry ja Suomen Broileryhdistys ry). Isovanhempaispolven linnut tuodaan Suomeen untuvikkoina Skotlannista ja kasvatetaan karanteenissa tautiriskin pienentämiseksi. Isovanhempaispolven kasvatuksen jälkeen niiden munista haudotaan ja kasvatetaan tuotantopolven emot. Tuotantopolven emojen munista puolestaan haudotaan ruoaksi tarkoitetut tuotantopolven broilerit. Tuotantopolven broilerit kasvatetaan sopimustiloilla, jonka jälkeen broilerit teurastetaan ja toimitetaan kauppoihin.

Tautien leviämistä broilerintuotantoon pyritään ehkäisemään hyvän hygienian ja oikeiden kasvatusolosuhteiden avulla. Suomessa on käytössä all-in all-out -kasvatusmenetelmä, jossa kaikki tuotantopolven untuvikot tuodaan kasvatukselle samanaikaisesti ja lähetetään teurastukseen myös yhtä aikaa (Suomen Siipikarjaliitto ry ja Suomen Broileryhdistys ry). Kasvatustilat puhdistetaan hyvin ennen uutta erää. Suomalaiset broilerit ovat varsin terveitä, mutta joskus infektioiden hoitoon joudutaan käyttämään antibiootteja. Tällöin koko parvi täytyy lääkittää. Eniten käytetyt mikrobilääkkeet broilerin hoidossa ovat V-penisilliini ja aminopenisilliini amoksisilliini (ETT ry). Niitä käytetään broilereilla yleisimmin kuolioisen suolistotulehduksen sekä nivel- ja jännetupentulehduksen hoitoon. ETT ry:n vuosina 2007–2012 tekemän raportin mukaan 0–17,1 % broileriparvista jouduttiin lääkitsemään antibiootilla. Vuosina 2010–2012 broilerintuotantopolven lintuja ei

tarvinnut lääkkeitä lainkaan. Antibioottien käyttö broilerintuotannossa Suomessa on siis hyvin vähäistä ja perustuu aina diagnosoitujen infektioiden hoitoon.

1.8 Multilokus-sekvenssityypitys-menetelmä bakteerien ja plasmidien tutkimisessa

Antibioottiresistenssigeenit voivat levittäytyä bakteeripopulaatiossa siirtymällä vertikaalisesti bakteerisukupolvelta toiselle tai horisontaalisesti resistenssiplasmidien välityksellä. Bakteerit puolestaan kulkeutuvat ihmisten ja eläinten mukana kaikkialle, minne ne liikkuvat ja voivat levittää resistenssiä edelleen. Bakteerien ja plasmidien alkuperää sekä levittäytymistä voidaan tutkia multilokus-sekvenssityypitys (MLST)-menetelmän avulla. MLST-menetelmä sopii hyvin epidemiologisesti kaukaisten bakteerikantojen geneettisen sukulaisuuden tutkimiseen.

MLST-tyypityksessä tutkitaan bakteerin koko genomia 5–8 konservoituneen ylläpitogeenin suhteen (Maiden ym., 1998). Geeneistä monistetaan PCR:n avulla tavallisesti noin 400–500 bp kokoinen DNA-pätkä, joka sekvensoidaan. Sekvensoinnin jälkeen jokaisen geenin alleelivariantti numeroidaan sekvenssietokannan mukaan ja näiden alleelivarianttien yhdistelmä tuottaa tietyn sekvenssityypin (ST). MLST:n avulla voidaan verrata saman lajin bakteerikantoja eri maiden ja ajanjaksojen välillä. MLST on suhteellisen nopea toteuttaa ja se on myös helposti toistettavissa. MLST:tä voidaan käyttää muun muassa antibioottiresistenttien bakteerien vertailussa sekä virulenssigeenien ja genotyyppien yhteyden selvittämisessä. (ks. yleiskatsaus Urwin ja Maiden 2003). MLST:n avulla voidaan myös selvittää patogeenisten bakteerien epidemiologiaa, evoluutiota ja populaatiobiologiaa. Tällä hetkellä MLST-menetelmä on saatavilla monelle eri bakteerilajille ja eri lajien sekvenssityypit sekä alleeliprofiilit on helposti saatavissa Internetissä olevista tietokannoista.

Plasmideja voidaan tyypittää PCR:n avulla eri Inc-ryhmiin, kuten aiemmin on mainittu. IncII-, IncF-, IncHI-, IncH2- ja IncN-ryhmien plasmideja voidaan edelleen karakterisoida plasmidien multilokus-sekvenssityypitys (pMLST) menetelmällä (pubMLST). pMLST-tyypityksen periaate on samanlainen kuin MLST-tyypityksen, mutta tutkimuksen kohteena ovat plasmidit. Tämän varsin uuden menetelmän avulla voidaan analysoida plasmidien sukulaisuussuhteita ja epidemiologiaa eri bakteerilajien välillä sekä myös eri lähteistä tai

alueilta olevien bakteerien välillä. pMLST:tä varten valitut geenit ovat hyvin konservoituneita ylläpitogeenejä, mutta niissä on kuitenkin riittävästi eroavaisuuksia tyypitystä varten (García-Fernández ym., 2008). Sekvenssityyppettä voidaan vertailla eri laboratorioden, eri lajien ja eri lähteiden välillä. Plasmideja, joille ei ole kehitelty pMLST menetelmää, voidaan tyypittää restriktioentsyymianalyysin avulla. Restriktioentsyymianalyysissä eristetyt plasmidit katkaistaan tietyillä restriktioentsyymeillä ja ajetaan agarosielektrofooresissa (García-Fernández ym., 2009). Restriktioprofiileja vertailemalla voidaan tehdä päätelmiä plasmidien samankaltaisuudesta.

2 Tutkimuksen tavoitteet

ESBL- ja AmpC-entsyymejä tuottavat bakteerit tarttuvat ihmisten välillä erityisesti sairaalaympäristössä. Näitä bakteereja on löydetty kuitenkin myös tuotantoeläimistä ja ruoasta monista maista. Koska beetalaktamaasigeenit ilmenevät usein plasmideissa, ne voivat levitä nopeasti ja tehokkaasti. Plasmidien välityksellä resistenssigeenejä voi siirtyä ihmisille harmittomista bakteereista myös patogeenisiin bakteereihin.

Erityisesti kolmannen polven kefalosporiineille resistenttien *E. coli* -bakteerien määrä on kasvanut huomattavasti suomalaisessa broilerintuotantoketjussa viime vuosina (Evira ja THL, julkaisematon). Resistenttiys johtuu plasmidivälitteisestä AmpC-geenistä, joka tuottaa kefalosporiinia hajottavaa beetalaktamaasia. Plasmidivälitteistä AmpC-entsyymiä tuottavia *E. coli* -bakteereja on löydetty myös potilaskoirien ulosteesta.

Tämän Pro gradu -tutkielman tarkoituksena on tutkia pMLST:n ja restriktioentsyymianalyysin avulla kuinka samanlaisia, broilerintuotantoketjusta, broilerinlihasta ja koirista, eristettyjen AmpC-positiivisten *E. coli* -bakteerien konjugatiiviset resistenssiplasmidit ovat. Lisäksi tarkoituksena on tutkia AmpC-positiivisten bakteerien koko genomia MLST-tyypityksen avulla ja selvittää esiintyykö broilerien *E. coli* -bakteereissa sellaisia MLST-tyyppejä, jotka on yhdistetty ihmisille suoliston ulkopuolisia infektoita aiheuttaviin (ExPEC)-bakteereihin. Resistenssiplasmidien ja bakteerien tutkiminen on tärkeää, jotta saadaan selville, mistä resistenssigeenit ovat peräisin ja miten ne leviävät.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 *E. coli* -kannat

Siipikarjan *E. coli* -bakteereja oli eristetty vuosien 2010–2012 aikana Eviran bakteriologian tutkimusyksikössä Kuopiossa. Kantoja oli eristetty terveiden broilerin isovanhempaispolven sivelynäytteistä ja aluspapereista, broileriemokasvattamoiden- ja tuotantopolvien kasvattamoiden ulostenäytteistä sekä broilerin vähittäismyyntilihasta. Eristetyistä näytteistä ei ollut seurattu systemaattisesti tietyn isovanhempaiserän, emojen, tuotantopolven ja niistä saadun lihan *E. coli* -kantoja. Koirien kannat oli eristetty vuosina 2010–2011 Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa ulostenäytteistä. Ulostenäytteitä oli saatu sekä terveistä että potilaskoirista. Tässä työssä oli mukana sellaisia kantoja, jotka oli aikaisemmin todettu AmpC positiivisiksi. Yhteensä tutkittavia *E. coli* -kantoja oli 54, joista 9 oli eristetty isovanhempaispolvesta, 8 emopolvesta, 18 tuotantopolvesta, 9 vähittäismyyntilihasta ja 11 koirista. Kantojen tarkemmat tiedot löytyvät Taulukosta 16. Näytteistä oli tutkittu aiemmin *E. coli* -bakteerien fylogeniaryhmiä ja virulenssitekijöitä. Broilerintuotannon eri vaiheiden ja broilerinlihan AmpC-positiivisista *E. coli* -bakteereista oli lisäksi tutkittu plasmidien kokoa ja resistenssi geenien sijaintia sekä määritetty plasmidien Inc-tyyppejä.

3.2 Konjugaatiokoe

Konjugaatiokokeen avulla pyrittiin saamaan aikaan kantoja, joissa on vain yhteen plasmidityyppiin kuuluvia plasmideja jatkotutkimuksia varten. Samalla tutkittiin, ovatko resistenssiplasmidit ylipäättänsä konjugoituvia. Tutkija Nella Vähänikkilä toteutti osan konjugaatiokokeista. Konjugaatiokokeessa vastaanottajana käytettiin *E. coli* -kanta DA11782. AmpC-positiivisista luovuttaja *E. coli* -kannoista tehtiin puhdasviljelämä Tryptic Soy-Agar (TSA)-maljoille, joissa oli kefotaksiimia (2 mg/l). Vastaanottaja *E. coli* -kannasta tehtiin puhdasviljelämä TSA-maljoille, joissa oli rifampisiinia (100 mg/l) ja streptomysiiniä (250 mg/l). Maljoja pidettiin yön yli +37 °C:ssa. Seuraavana päivänä luovuttajamaljoilta siirrettiin yksi pesäke 10 ml:aan Brain Heart Infusion (BHI)-lientä, jossa oli kefotaksiimia (2 mg/l). Vastaanottaja maljalta siirrettiin yksi pesäke 10 ml:aan

BHI-lientä jossa rifampisiinia (100 mg/l) ja streptomysiiniä (250 mg/l). Kasvatuksia pidettiin + 37 °C:ssa yön yli. Kolmantena päivänä kasvatukset laimennettiin 1:50 ja niitä pidettiin ravistelijassa +37 °C:ssa 3 tuntia. Liemikasvatuksia sentrifugoitiin 4000 kierrosta minuutissa 5 minuutin ajan, jonka jälkeen solut pestiin kaksi kertaa 5 ml:lla 1xPBS:ää. Tämän jälkeen bakteerisolut suspensoitiin BHI-liemeen (ei antibiootteja), niin että $A_{620} \approx 1$. Luovuttaja ja vastaanottaja yhdistettiin (400 μ l vastaanottaja ja 200 μ l luovuttaja) ja putkiin lisättiin 2 ml BHI-lientä. Putkia pidettiin ravistelijassa + 37 °C:ssa noin tunnin ajan. Liemikasvatukset sekoitettiin ja tilavuus täydennettiin BHI-liemellä 6 ml:aan. Liemikasvatuksista lanattiin 100 μ l TSA-maljoille, joissa oli kefotaksmiinia (2 mg/l), rifampisiinia (100 mg/l) ja streptomysiiniä (250 mg/l). Maljoja pidettiin + 37 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä tarkastettiin, kasvoiko maljoilla pesäkkeitä. Maljoilla voi kasvaa ainoastaan transkonjugantteja bakteereja, jotka ovat konjugoineet resistenssiplasmidin vastaanottajalle. Konjugoituneet bakteerit säilytettiin -72 °C:ssa.

3.3 CIT-PCR

CIT-PCR:n avulla varmistettiin, että kaikki transkonjugantit bakteerit sisältävät CIT-geeniperheeseen eli ryhmään C1 kuuluvia geenejä. PCR-reaktioita varten transkonjugantit *E. coli* -kannat viljeltiin TSA-maljoille, joissa oli kefotaksiimia (2 mg/l), rifampisiinia (100 mg/l), ja streptomysiiniä (250 mg/l). Maljoja pidettiin + 37 °C:ssa yön yli. Bakteereista tehtiin noin 1,5 McFarlandin vahvuinen bakteerivesisuspensio, jota käytettiin PCR-reaktioissa templaattina. PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet on lueteltu Taulukossa 1 (Perez-Perez ja Hanson 2002). PCR-reaktiot ajettiin PTC-200-laitteella (MJ Research). Reaktioissa positiivikontrollina toimi CIT-positiiviseksi todettu *E. coli* -kanta 2707/1 ja negatiivikontrollina toimi steriili vesi. Pipetointikaavio on esitetty Taulukossa 2 ja PCR-ohjelma Taulukossa 3.

Taulukko 1. CIT-PCR-alukkeet

Alukkeet	5'-3' emäsjärjestys	PCR- tuote
CIT-MF	TGGCCAGAACTGACAGGCAA	462 bp
CIT-MR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	

Taulukko 2. CIT- PCR:n pipetointikaavio, 1 x reaktio

reagenssi	μl
bakteerivesisuspensio	1
10 x puskuri (DyNAzyme, sis. 1,5 mM MgCl ₂)	2,5
dNTP (10 mM, Thermo Scientific)	0,5
alukkeet (25 pmol/ μl , Oligomer)	2 x 0,6
DNA-polymeraasi (Dynazyme 2 U/ μl)	0,5
H ₂ O (Gibco)	19,3

Taulukko 3. CIT-PCR-ohjelma

3 min	94° C	
30 s	94 °C	
30 s	64 °C	30 sykliä
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	

PCR-ajon jälkeen tuotteet ajettiin agarosigeelielektroforeesissa 2 %:ssa geelissä, 140 V jännitteellä 60 minuutin ajan. Molekyylikomarkkereina toimi Generuler™ 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas). Elektroforeesilaitteistona käytettiin GNA 200 (Pharmacia LKB) ja Cleaver Scientific Ltd ajokammioita sekä EPS 600 (Pharmacia LKB) ja CS-300 (Cleaver Scientific Ltd) virtalähteitä. Geeli kuvattiin UV-valossa. Kuvauslaitteisto oli AlphaDigidoc™ (Alpha Innotech). Samoja elektroforeesilaitteistoja, ajokammiota ja kuvauslaitteistoa käytettiin myös muissa agarosigeelielektroforeesia vaativissa tutkimuksissa tässä työssä.

3.4 Inc-tyypitys-PCR

Inc-tyypitys PCR:n avulla haluttiin saada selville konjugaatiossa vastaanottajakantaan siirtyneiden resistenssiplasmidien Inc-tyypit. Tässä työssä määritettiin *E. coli* -bakteerien plasmideissa yleisesti esiintyviä Inc-tyyppejä FIA, FIB, FIC, I1, N, A/C, B/O K ja X. PCR-reaktioita varten transkonjugantteja *E. coli* -bakteereja kasvatettiin TSA-maljoilla, joissa

oli kefotaksiimia (2 mg/l), rifampisiinia (100 mg/l) ja streptomysiiniä (250 mg/l) + 37 °C:ssa yön yli. Bakteereista tehtiin noin 1,5 McFarlandin vahvuinen suspensio 500 µl:aan steriiliä vettä. Näytteet tutkittiin kolmella eri PCR-reaktiolla. Ensimmäisessä reaktiossa (FIB) alukkeina toimi FIB. Toisessa reaktiossa (multiplex 1) alukkeina toimivat B/O, A/C ja N ja kolmannessa reaktiossa (multiplex 2) alukkeina toimivat I1, FIA, FIC, X ja K/B. Positiivikontrolleina käytettiin PBRT-reagenssipaketin (Diatheva) kontrolleja laimennettuna 1:5. FIB:n positiivikontrollina käytettiin PBRT-reagenssipaketin kontrollia M3. Multiplex 1-PCR -reaktiossa N:n ja B/O:n kontrolleina toimi PBRT-reagenssipaketin kontrolli M2 ja A/C:n kontrollina PBRT-reagenssipaketin kontrolli M5. Multiplex 2-PCR-reaktiossa I1:n positiivikontrollina toimi PBRT-reagenssipaketin kontrolli M 1, FIA:n kontrollina M3, FIC:n kontrollina M4 sekä X ja K/B kontrolleina M7. Negatiivikontrollina käytettiin steriiliä vettä. PCR-reaktiot ajettiin TC-Plus-laitteella (Techne). Kaikkien PCR-reaktioiden alukkeet on esitetty taulukossa 4 (Carattoli ym., 2005). PCR-reaktioiden pipetointikaaviot on esitetty Taulukoissa 5, 6 ja 7. PCR-ohjelmat löytyvät Taulukoista 8 ja 9.

Taulukko 4. Inc-tyypitys-PCR:ssä käytetyt alukkeet

Alukkeet	5'-3' emäsjärjestys	PCR- tuote
FIB F:	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702(683) ep
FIB R:	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	
A/C F:	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465 ep
A/C R:	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	
N F:	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559 ep
N R:	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	
I1 F:	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139 ep
I1 R:	TCGTTCGTTCCGCCAAGTTCGT	
FIA F:	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462 ep
FIA R:	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	
FIC F:	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262 ep
FIC R:	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	
X F:	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376 ep
X R:	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	

Alukkeet	5'-3' emäsjärjestys	PCR- tuote
K/B F:	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160 ep
K/B R:	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	

Taulukko 5. FIB-PCR:n pipetointikaavio, 1 x reaktio

reagenssi	µl
bakteerivesisuspensio	1
10 x puskuri (1,5 mM MgCl ₂ Qiagen)	2,5
dNTP (10 mM, Thermo Scientific)	0,5
alukkeet (FIB) (25 pmol/µl, Oligomer)	2 x 0,6
DNA-polymeraasi (5 U/µl, Hot Star Taq, Qiagen)	0,2
H ₂ O (Gibco)	19,6

Taulukko 6. Multiplex 1 PCR:n pipetointikaavio, 1 x reaktio

reagenssi	µl
bakteerivesisuspensio	1
10 x puskuri (1,5 mM MgCl ₂ Qiagen)	2,5
dNTP (10 mM, Thermo Scientific)	0,5
alukkeet (B/O, A/C ja N) (25 pmol/µl, Oligomer)	6 x 0,6
DNA-polymeraasi (5 U/µl, Hot Star Taq, Qiagen)	0,2
H ₂ O (Gibco)	17,2

Taulukko 7. Multiplex 2 PCR:n pipetointikaavio, 1 x reaktio

reagenssi	µl
bakteerivesisuspensio	1
10 x puskuri (10x, 1,5 mM MgCl ₂ , DyNAzyme)	2,5
dNTP (10 mM, Thermo Scientific)	0,5
alukkeet (I1, FIA, FIC, X ja K/B) (25 pmol/µl, Oligomer)	10 x 0,6
DNA-polymeraasi (2 U/µl, DyNAzyme)	0,2
H ₂ O (Gibco)	14,8

Taulukko 8. FIB-PCR- ja multiplex 1 PCR-ohjelma

15 min	95° C	
1 min	95 °C	
1 min	53 °C	30 sykliä
1 min 15 s	72 °C	
5 min	72 °C	

Taulukko 9. Multiplex 2 PCR-ohjelma

5 min	95° C	
1 min	95 °C	
1 min	60 °C	30 sykliä
1 min 15 s	72 °C	
5 min	72 °C	

PCR-ajon jälkeen PCR-tuotteet pipetoitiin 2 %:lle agarosigeelille. Molekyylikomarkkereina käytettiin Generuler™ 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas). PCR tuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesissa 140 V jännitteellä 60 minuutin ajan. Tämän jälkeen geeli kuvattiin UV-valossa.

3.5 Plasmidien eristys transkonjuganteista

Plasmidit eristettiin sellaisista bakteerikannoista, joissa oli vain yhteen Inc-tyyppiin kuuluvia resistenssiplasmideja. Inc-tyypitys-PCR:n mukaan nämä kannat sisälsivät, joko IncI1-tyypin tai IncK-tyypin plasmideja. Inc-I1-plasmidin sisältäviä kantoja oli yhteensä 24 ja IncK-tyypin plasmidin sisältäviä kantoja 10. Eristykset tehtiin käyttäen Qiagenin plasmid midi kit -reagenssipakettia. Plasmidieristystä varten transkonjuganteista tehtiin puhtasviljelmä TSA-maljoille, joissa oli kefotaksiimia (2 mg/l), rifampisiinia (100 mg/l) ja streptomysiiniä (250 mg/l). Maljoja pidettiin + 37 °C:ssa yön yli. Tämän jälkeen maljalta poimittiin yksi pesäke putkeen, jossa oli 5 ml Luria Bertani (LB)-lientä ja kefotaksiimia (2 mg/l), rifampisiinia (100 mg/l) sekä streptomysiiniä (250 mg/l). Putkia pidettiin ravistelijassa + 37 °C:ssa noin 8 tuntia. Tämän jälkeen kasvatusliuos laimennettiin 1:500

90 ml:aan LB-lientä. Putkia pidettiin ravistelijassa +37 °C:ssa yön yli. Bakterisolut sentrifugoitiin pohjaan 4000 kierrosta minuutissa + 4 °C:ssa 30 minuutin ajan. Pelletti käsiteltiin reagenssipaketin ohjeen mukaisesti. Lopuksi plasmidi-DNA liuotettiin TE-puskuriin. Tämän jälkeen plasmidi-DNA eroteltiin agarosigeelielektroforeesissa 0,8 %:ssa geelissä 70 V jännitteellä 3 tunnin ajan. Geeli kuvattiin UV-valossa. Molekyylikomarkkerina käytettiin Lambda/Hind III - Phi-X174/Hae III (Thermo Scientific). DNA-pitoisuus mitattiin Qubit-fluorometrillä.

3.6 Plasmidien eristys villin tyypin bakteerikannoista

Transkonjuganttien plasmidieristyksessä havaittiin, että monet bakteerikannat sisälsivät useita erikokoisia plasmideja. Haluttiin selvittää, olivatko nämä plasmidit peräisin villin tyypin luovuttajakannoista, joten myös niiden plasmidit eristettiin. DNA:ta ei tarvittu suuria määriä, joten työmäärän vähentämiseksi eristys tehtiin Agencourt COSMCPrepillä (Beckman Coulter), jonka erottelukyky perustuu magneettikuuliin. Villin tyypin bakteerikannoista tehtiin puhdasviljelmä TSA-maljoille, joissa kefotaksiimia (2 mg/l) ja maljoja pidettiin + 37 °C:ssa yön yli. Maljoilta siirrostettiin yksi pesäke 5 ml:aan LB-lientä, jossa kefotaksiimia (2 mg/l) ja kasvatuksia pidettiin ravistelijassa + 37 °C:ssa yön yli. Eristys tehtiin reagenssipaketin ohjeen mukaisesti 1,5 ml liemikasvatuksista. Sekä transkonjuganttien että villikantojen plasmidi-DNA ajettiin rinnakkain agarosigeelielektroforeesissa kuten aiemmin.

3.7 pMLST

IncII-tyypin plasmideille on kehitetty pMLST-PCR-menetelmä (García-Fernández ym., 2008). PCR-menetelmän avulla monistetaan eri reaktioissa viittä ylläpitogeneitä, joiden DNA sekvensoidaan. IncII-pMLST-menetelmällä monistettavat geenit ovat *repI*, *ardA*, *trbA*, *sogS* ja *pilL*. *RepI* on RNA-antisense, joka säätelee IncII-plasmidin replikaatiosysteemiä. *ArdA* koodittaa tyypin I restriktio-modifikaatio entsyymiä, jolla on tärkeä merkitys bakteerin puolustautuessa vieraalta DNA:lta. *TrbA* on puolestaan tärkeä plasmidin ylläpitogeneeni. *SogS* koodaa primaasia, joka rakentaa RNA-alukkeet plasmidin DNA:n replikaation aloituskohtiin ja on siten tärkeä replikaatiossa. *PilL* koodittaa tyypin IV-piluksen ulkokalvon proteiinia.

PCR-reaktioissa templaattina käytettiin aiemmin eristettyä plasmidi DNA:ta. PCR-reaktiot ajettiin TC-plus-laitteella (Techne). Negatiivikontrollina toimi steriili vesi. Käytetyt alukkeet löytyvät Taulukosta 10 (García-Fernández ym., 2008). PCR-reaktioseoksen valmistusohjeet on esitetty Taulukossa 11 ja PCR-ohjelma Taulukossa 12.

Taulukko 10. pMLST-PCR-alukkeet

Alukkeet	5'-3' emäsjärjestys	PCR-tuote
repI F:	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	142 ep
repI R:	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	
ardA F:	ATGTCTGTTGTTGCACCTGC	501 ep
ardA R:	TCACCGACGGAACACATGACC	
trbA F:	CGACAAATGCTTCCGGGGT	507 ep
trbA R:	TCTTACAATCGACAGCCTGT	
sogS F:	TTCCGGGGCGTAGACAATACT	291 ep
sogS R:	AACAGTGATATGCCGTCGC	
pilL F:	CCATATGACCATCCAGTGCG	316 ep
pilL R:	AACCACTATCTCGCCAGCAG	

Taulukko 11. pMLST-PCR:n pipetointikaavio, 1 x reaktio. Jokaiselle alukeparille tehtiin oma reaktioseos.

reagenssi	µl
50 ng/µl eristettyä plasmidi DNA:ta	1
2x Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific)	25
alukkeet repI, ardA, trbA, sogS tai pilL(20 pmol/µl, Oligomer)	2 x 1
H ₂ O (Gibco)	22

Taulukko 12. pMLST-PCR-ohjelma

2 min	98° C	
45 s	95 °C	
45 s	60 °C	30 sykliä
1 min 15 s	72 °C	
5 min	72 °C	

PCR-reaktioiden onnistuminen tarkastettiin ajamalla 5 µl PCR-tuotetta agarosigeelielektroforeesissa 2 %:ssa geelissä 140 V jännitteellä 60 minuutin ajan. Molekyylikomarkkerina käytettiin GeneRuler 100 bp ladder plus (Fermentas). Geeli kuvattiin UV-valossa. Loput PCR-tuotteet puhdistettiin sekvensointia varten käyttäen Qiaquick PCR purification kit -reagenssipakettia (Qiagen). DNA eluoiitiin lopuksi 50 µl:aan EB-eluointipuskuria. DNA-pitoisuus mitattiin Qubit-fluorometrillä. Näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi Hollantiin Macrogenille, jossa näytteet sekvensoitiin molempiin suuntiin tulosten varmistamiseksi. Tulokset analysoitiin vertaamalla näytteiden sekvenssejä pMLST-tietokantaan, joka löytyy osoitteesta <http://pubmlst.org/plasmid/>. Jokainen tunnistettu alleelivariantti sai tietokannasta numeron. Eri geenien alleelivarianttien numeron yhdistelmää verrattiin olemassa oleviin IncII-profiileihin ja näin saatiin selville näytteen sekvenssityyppi.

3.8 Restriktioentsyymianalyysi

Koska IncK-tyypin plasmideille ei ole kehitetty pMLST-menetelmää, niitä tutkittiin restriktioentsyymianalyysin avulla. IncK-plasmidit katkaistiin kahdella eri restriktioentsyymillä HindIII ja BamHI.

HindIII katkaisee DNA:n seuraavasti:



ja BamHI seuraavasti:



Plasmidit katkaistiin kahdessa erillisessä reaktiossa. Yhteen reaktioseosputkeen pipetoitiin 200 ng plasmidi-DNA:ta, 2 µl 10 x Nebuffer-puskuria (Biolabs) (HindIII reaktioon Nebuffer 2 ja BamHI reaktioon Nebuffer 3), 1 µl HindIII- tai BamHI-restriktioentsyymiä (20 000 U/ml, Biololabs) ja tilavuus täytettiin 20 µl:aan tislattulla vedellä (Gibco). Reaktioseosputket laitettiin + 37 °C:een vesihauteeseen 3 tunniksi. Reaktio pysäytettiin 4 µl:lla Southern-pysäytysliuosta. Katkaistut plasmidit ajettiin agarosielektroforeesissa 0,8

%:ssa geelissä 70 V jännitteellä 3 tunnin ajan. Molekyylikomarkkerina käytettiin Lambda/Hind III - Phi-X174/Hae III (Thermo Scientific). Geeli kuvattiin UV-valossa.

3.9 MLST

Patogeeniset suoliston ulkopuolisia infektiota aiheuttavat siipikarjan *E. coli* -bakteerit kuuluvat yleisimmin fylogeniaryhmiin B2 tai D (Clermont ym., 2000). MLST-analyysillä haluttiin tutkia näihin fylogeniaryhmiin kuuluvia AmpC-positiivisia *E. coli* -kantoja. Siipikarjasta eristettyjä *E. coli* -bakteereja oli määritetty fylogeniaryhmiin aiemmin (Törmikoski 2008). MLST-analyysissä monistetaan PCR:n avulla *E. coli* -bakteerin genomissa esiintyvää seitsemää ylläpitogeneeniä, jonka jälkeen DNA sekvensoidaan. Tutkittavat geenit olivat *adk* (adenylaattikinaasi), *fumC* (fumaraatti hydrataasi), *gyrB* (DNA gyraasi), *icd* (isositraatti dehydrogenaasi), *mdh* (malaatti dehydrogenaasi), *purA* (adenylosukkinaatti dehydrogenaasi) ja *recA* (ATP/GTP sitova motiivi) (Wirth ym., 2006).

PCR-reaktioita varten bakteereista eristettiin genomista DNA:ta. Eristystä varten *E. coli* -bakteerit viljeltiin sorbitoli-Mac-Conkey maljoille ja kasvatettiin + 37 °C:ssa yön yli. Bakteereista tehtiin noin 2 McFarland suspensio 500 µl:aan steriiliä vettä. Suspensioita keitettiin 10 minuuttia ja sentrifugoitiin 13 000 kierrosta minuutissa 10 minuutin ajan huoneenlämmössä. Supernatantti otettiin talteen PCR-templaatiksi.

MLST-PCR alukkeiden sulamislämpötilat poikkesivat toisistaan, joten PCR-ohjelman alukkeiden kiinnittymislämpötiloja piti säätää. PCR-reaktiot saatiin onnistumaan viidessä erillisessä ohjelmassa. PCR-reaktiot ajettiin TC-Plus-laitteessa (Techne). Negatiivikontrollina käytettiin steriiliä vettä. PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet löytyvät taulukosta 13 (Wirth ym., 2006, Nicolas-Chanoine ym., 2008 ja THL, julkaisematon). Pipetointiohjeet on esitetty Taulukossa 14 ja PCR-ohjelma Taulukossa 15.

Taulukko 13. MLST-PCR-alukkeet

Alukkeet	5'-3' emäsjärjestys	PCR-tuote
adk F	GAAATGCGTATCATTCTGCT	630 ep (THL)
adk R	CAGATCAGCGCGAACTTCAG	
fumC F	CCACCTCACTGATTCATGCG	806 ep (THL)
fumC R	CGGTGCACAGGTAATGACTG	

Alukkeet	5'-3' emäsjärjestys	PCR-tuote
gyrB F	CGGGTCACTGTAAAGAAATTATCG	880 ep (THL)
gyrB R	GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	
icd F	CGGCAAACACTCAACGTTCC	825 ep (Nicholas-
icd R	GTCTTTAAACGCTCCTTCGG	Chanoine + Wirth)
mdh F	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	799 ep (Wirth)
mdh R	CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	
purA F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	817 ep (Wirth)
purA R	CATACGGTAAGCCACGCAGA	
recA F	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	734 ep (Wirth)
recA R	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	

Taulukko 14. MLST-PCR:n pipetointikaavio, 1 x reaktio. Jokaiselle alukeparille tehtiin oma reaktioseos.

reagenssi	µl
eristettyä DNA:ta	5
2x Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific)	25
alukkeet adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA tai recA (20 pmol/µl, Oligomer)	2 x 1
H ₂ O (Gibco)	18

Taulukko 15. MLST-PCR-ohjelma. Alukkeiden kiinnittymislämpötiloissa on eroja.

2 min	98° C	
30 s	98 °C	
30 s	59 °C (adk, icd), 62 °C (fumC), 63 °C (mdh, purA), 67 °C (gyrB) ja 68 °C (recA)	30 sykliä
1 min 15 s	72 °C	
5 min	72 °C	

Ajon jälkeen PCR-tuotteet pipetoitiin 1,5 %:lle agarosigeelille. Molekyylikomarkkereina käytettiin Generuler™ 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas).

PCR-tuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesissa 140 V jännitteellä 45 minuutin ajan. Tämän jälkeen geeli kuvattiin UV-valossa. MLST-PCR-tuotteet puhdistettiin sekvensointia varten käyttäen MinElute PCR purification kit -reagenssipakettia (Qiagen). DNA eluoiitiin lopuksi 10 µl:aan EB-eluointipuskuria. DNA-pitoisuus mitattiin Qubit-fluorometrillä. Puhdistetut näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi Macrogenille Hollantiin, jossa DNA sekvensoitiin molempiin suuntiin. MLST-tulokset analysoitiin samaan tapaan kuin pMLST-tulokset. Sekvenssitiedot syötettiin MLST-tietokantaa vastaan osoitteessa <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>. Alleelivarianttien numerojen yhdistelmä antoi sekvenssityypin.

4 Tulokset

4.1 Konjugaatio

Tehdyn konjugaatiokokeen avulla voitiin testata resistenssiplasmidien konjugaatioherkkyyttä luonnollisia olosuhteista vastaavissa oloissa. Näin saatiin myös aikaan transkonjugantteja *E. coli* -kantoja, joista osa sisälsi vain yhteen Inc-tyyppiin kuuluvia plasmideja, jotka voitiin eristää jatkotutkimuksia varten. Konjugaatiokokeesta selvisi, että 40/43 (93 %) broilerin tuotantoketjun eri vaiheista ja lihasta eristetyistä AmpC-positiivisesta *E. coli* -bakteereista konjugoivat plasmidin tai plasmideja vastaanottajakannalle annetuissa olosuhteissa. Koirista eristetyistä bakteereista puolestaan vain kaksi yhdestätoista (18 %) konjugoivat plasmideja vastaanottajalle (Taulukko 16).

4.2 CIT-PCR ja Inc-tyypitys

Kaikki tutkittavat transkonjugantit sisälsivät CIT-PCR:n mukaan plasmidin, jonka AmpC-geeni kuului CIT-ryhmään (Taulukko 16). Transkonjuganttien *E. coli* -kantojen plasmidit tyypitettiin PCR:n avulla myös Inc-tyyppihin. Inc-tyypitys-PCR:n mukaan broilereiden tuotantoketjusta ja broilerinlihasta eristettyjen *E. coli* -bakteerien konjugoituvat plasmidit kuuluivat Inc-tyyppihin FIB, K ja/tai I1. Suurin osa isovanhempaispolvesta, emoista ja tuotantopolvesta eristetyistä *E. coli* -plasmideista kuului IncI1-tyyppiin. Vähittäismyyntilihan transkonjuganteissa oli puolestaan suurimmaksi osaksi IncK-tyypin plasmideja. Koirista eristettyjen transkonjuganttien *E. coli* -kantojen plasmidit olivat IncI1-tyyppiä. Konjugatiivisten plasmidien Inc-tyypit on esitetty Taulukossa 16.

Taulukko 16. Alkuperäiset *E. coli* -kannat, kantojen eristysvuosi sekä *E. coli* DA11782 -kantaan konjugaatiossa siirtyneiden plasmidien ominaisuuksia.

kantanumero	eristysvuosi	AmpC-ryhmä	Inc-tyyppi	pMLST
isovanhempaispolvi				
sively	2011	CIT	I1	12
2705/2				
2701/1	2011	CIT	I1	12

kantanumero	eristysvuosi	AmpC-ryhmä	Inc-tyyppi	pMLST
567/3	2011	ei konjugoidu		
571/2	2011	CIT	I1,K	
4901/3	2011	ei konjugoidu		
4031	2012	CIT	I1,K,FIB	
4033	2012	CIT	I1,K,FIB	
isovanhempaispolvi				
aluspaperi				
6448	2011	CIT	I1	12
6450	2011	ei konjugoidu		
emopolvi				
6959	2011	CIT	I1	12
8036	2011	CIT	I1	12
8040	2011	CIT	I1	12
6936	2011	CIT	I1,FIB	
857	2012	CIT	I1,K	
2350	2012	CIT	I1	12
59	2012	CIT	I1	12
tuotantopolvi				
3940	2011	CIT	I1	12
3363	2011	CIT	I1	12
6327	2011	CIT	I1	12
6957	2011	CIT	I1	12
7291	2011	CIT	I1	12
7458	2011	CIT	I1	12
8154	2011	CIT	I1	12
5558	2011	CIT	I1	12
5560	2011	CIT	K	
6010	2011	CIT	I1	12
6953	2011	CIT	K,FIB	
7019	2011	CIT	I1	12
7268	2011	CIT	I1	12

kantanumero	eristysvuosi	AmpC-ryhmä	Inc-tyyppi	pMLST
7623	2011	CIT	I1	12
7625	2011	CIT	I1	12
6009	2011	CIT	K	
7634	2011	CIT	K	
7841	2011	CIT	I1	12
vähittäismyyntiliha				
293	2011	CIT	K	
55	2011	CIT	K	
147	2012	CIT	K	
225	2012	CIT	K	
227	2012	CIT	K	
476	2012	CIT	K	
879	2012	CIT	K	
480	2012	CIT	I1	12
479	2012	CIT	K+?	
koira				
E131	2010/11	ei konjugoidu		
E133	2010/11	ei konjugoidu		
E157	2010/11	ei konjugoidu		
E238	2010/11	ei konjugoidu		
E241	2010/11	ei konjugoidu		
E252	2010/11	ei konjugoidu		
E242	2010/11	ei konjugoidu		
E299	2010/11	ei konjugoidu		
E302	2010/11	ei konjugoidu		
E320	2010/11	CIT	I1	?
E525	2010/11	CIT	I1	12

4.3 IncI1-plasmidien pMLST

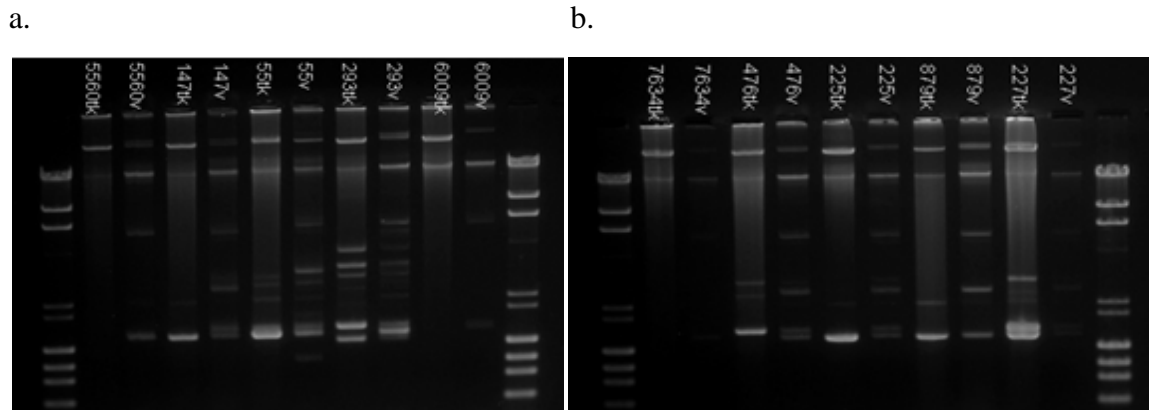
pMLST-tyypitysmenetelmän avulla tutkittiin plasmidien samankaltaisuutta viiden hyvin konservoituneen ylläpitogeenin suhteen. pMLST-analyysistä selvisi, että kaikki paitsi yksi koirasta eristetty IncI1-plasmidi kuuluivat samaan sekvenssityyppiin 12 (Taulukko 16). IncI1-plasmideilla oli jokaisesta tutkittavasta geenistä, muutamia pistemutaatioita lukuun ottamatta, samanlainen alleelivariantti (Taulukko 17). Yksi plasmidi, joka oli eristetty koiran *E. coli* -kannasta, sisälsi *ardA*-geenistä sellaisen alleelivariantin, jonka alleelivarianttien yhdistelmälle ei löydy sekvenssityyppiä tietokannasta. Tutkittavat plasmidit ovat kuitenkin siis näiden viiden geenin suhteen hyvin samanlaisia.

Taulukko 17. pMLST alleelivariantit ja sekvenssityyppi

	repI	ardA	trbA	SogS	pilL	ST
kaikki broilerit + koira E525	1	4	3	4	1	12
koira E-320	1	14	3	4	1	?

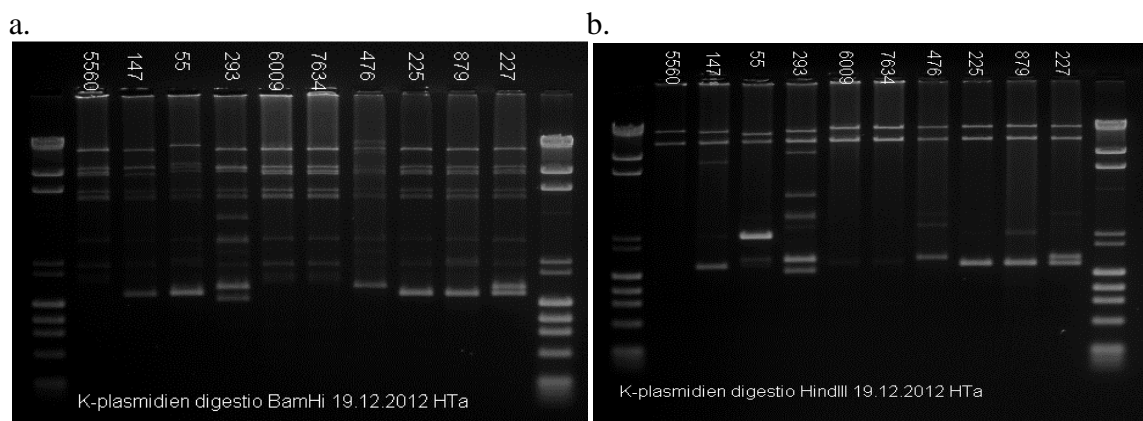
4.4 IncK-plasmidien eristys ja restriktioentsyymianalyysi

Transkonjugantit *E. coli* -kannat, joissa todettiin olevan vain IncK-tyyppiin kuuluvia plasmideja, eristettiin kaupallisella reagenssipaketilla. Eristyksen onnistuminen tarkastettiin ajamalla näytteet agarosigeelielektroforeesissa. Koska joillakin kannoilla nähtiin geelillä IncK-plasmidien lisäksi muita plasmideja, transkonjuganttien ja villikantojen plasmidieristykset ajettiin geelillä rinnakkain (Kuva 1). Todettiin, että joihinkin kantoihin siirtyi konjugaatioissa vain haluttu IncK-plasmidi, mutta joihinkin siirtyi myös villikannassa olleita pienempiä plasmideja, joita ei voitu tunnistaa Inc-tyypitys-PCR:n avulla. IncK-plasmidi on suurikokoinen, joten plasmidi pystytään kuitenkin erottamaan kokonsa puolesta pienistä plasmideista.



Kuva 1 a. ja b. Geelikuva IncK-plasmidieristyksistä. Kuvissa transkonjuganttien (tk) ja villikantojen (v) plasmidieristykset rinnakkain. IncK-plasmidi näkyy kuvissa ylhäällä geelikaivojen alapuolella kahtena juovana (eri konformaatioissa). IncK-plasmidien lisäksi geelillä näkyy pieniä tunnistamattomia plasmideja. Kuvien ensimmäisessä ja viimeisessä kaivossa molekyylikomarkeri Lambda/Hind III - Phi-X174/Hae III.

IncK-plasmidit katkaistiin BamHI- ja HindIII-restriktioentsyymeillä, jotta voitaisiin vertailla plasmidien samankaltaisuutta. IncK-plasmidin restriktiojuovien lisäksi restriktioprofiileissa on myös nähtävissä pieniä plasmideja (Kuva 2), jotka ovat konjugaatiossa siirtyneet luovuttajalta vastaanottajakantaan. Plasmidieristyskuvia ja restriktioprofiilikuvia vertailemalla pienet plasmidit pystytään kuitenkin erottamaan restriktiojuovista. IncK-plasmidien pilkkoutumista vertailemalla on havaittavissa ainakin viisi erilaista plasmidityyppiä. Kannoilla 5560, 6009, 7634, 225, 879 ja 227 vaikuttaa olevan samanlaisesti pilkkoutunut IncK-plasmidi. Kantojen 147, 55, 293 ja 476 plasmidit sen sijaan poikkeavat hieman toisistaan ja muista kannoista. IncK-plasmidien BamHI- ja HindIII-restriktioprofiilit ovat nähtävissä Kuvassa 2.



Kuva 2 a. ja b. Geelikuva IncK-plasmidien restriktioprofiileista. Kuvassa a. IncK-plasmidin BamHI-restriktioprofiili ja kuvassa b. HindIII-restriktioprofiili. Kuvassa on nähtävissä myös pieniä plasmideja, jotka ovat siirtyneet konjugaatiossa villintyyppin bakteereista transkonjugantteihin. Molekyylikomarkerina molempien kuvien ensimmäisessä ja viimeisessä kaivossa Lambda/Hind III - Phi-X174/Hae III.

4.5 MLST

Virulentimpiin fylogeniaryhmiin kuuluvia AmpC-positiivisia *E. coli* -bakteereja tyypitettiin MLST-analyysin avulla. Fylogeniaryhmään B2 kuuluvat *E. coli*-kannat kuuluivat MLST-analyysin mukaan sekvenssityypiin 131 ja fylogeniaryhmään D kuuluvat *E. coli*-kannat kuuluivat sekvenssityypiin 38. Yhden näytteen MLST-tyyppiä ei pystytty määrittelemään. MLST-analyysin tulokset eli sekvenssityypit on esitetty Taulukossa 18.

Taulukko 18. *E. coli* -kantojen fylogeniaryhmät ja MLST analyysin tulokset

kantanumero	fylogeniaryhmä	MLST
emopolvi		
8036	B2	131
59	B2	131
857	D	38
tuotantopolvi		
3940	B2	131
8154	B2	131
5560	D	38
vähittäismyyntiliha		
227	D	38
229	D	38
480	D	-
879	D	38
476	D	38
147	D	38
225	D	38
479	D	38
293	D	38

5 Tulosten tarkastelu

5.1 Konjugaatio

Horisontaalinen geenien siirtyminen plasmidien mukana on merkittävä syy antibioottiresistenssin nopeaan leviämiseen. Konjugaatiokokeella pyrittiin saamaan aikaan kantoja, jotka sisältävät vain yhden resistenssiplasmidityypin jatkotutkimuksia varten, mutta samalla pystyttiin tutkimaan, ovatko plasmidit helposti konjugoituvia sellaisessa lämpötilassa, joka vallitsee tasalämpöisten eläinten suolistossa. Tässä työssä tutkittujen broilerituotannon ja broilerinlihan *E. coli* -kannat osoittautuivat olevan hyvin konjugoituvia, sillä lähes kaikki luovuttajakannat siirsivät plasmideja vastaanottajakannalle. Tämä osoittaa, että resistenssiplasmidit voivat helposti levitä bakteerista toiseen esimerkiksi linnun suolistossa. Tiedetään, että plasmidit voivat siirtyä myös bakteerilajista toiseen. Siipikarjassa yleisen CMY-2 geenin on tutkittu siirtyneen muun muassa *Salmonella*- ja *E. coli* -bakteerien välillä tuotantoeläimistä eristetyissä bakteereissa (Winokur ym., 2001). Resistenssiplasmidit voivat siirtyä myös bakteereihin, jotka ovat patogeenisia, mutta alun perin herkkiä antibiooteille. Ihmisistä ja eläimistä onkin löydetty huolestuttavan paljon patogeenisia laajakirjoisille beetalaktaameille resistenttejä *E. coli* -kantoja erilaisten tautiepidemioiden yhteydessä ja määrät kasvavat jatkuvasti (EFSA 2011). Antibioottiresistenttiys hankaloittaa infektion hoitamista ja mahdollistaa bakteerin tehokkaamman leviämisen. Myös koirien *E. coli* -bakteereista löytyi konjugoituvia plasmideja, mutta suhteessa huomattavasti vähemmän. Tästä voidaan päätellä, että koirien *E. coli* -bakteerien plasmidit eivät välttämättä leviä yhtä tehokkaasti kuin broilerintuotannon ja broilerinlihan. Toisaalta tulosta ei voi yleistää, koska tutkimusaineisto oli melko suppea. Jotta koirien plasmideja voitaisiin jatkossa tutkia paremmin, voitaisiin ei-konjugoituvia plasmideja yrittää siirtää vastaanottajakantaan konjugaation sijaan esimerkiksi elektroporaation avulla. Elektroporaatio on transformaatiomenetelmä, jossa bakteeriin solukalvon läpäisevyys muutetaan ulkoisen sähkökentän avulla, jolloin bakteeri pystyy ottamaan sisäänsä geneettistä materiaalia ympäristöstään (Dower ym., 1988).

Plasmidieristyksissä huomattiin, että tunnettujen Inc-tyyppien lisäksi vastaanottajakantaan siirtyi konjugaatiossa myös pienempiä tunnistamattomia plasmideja. Näitä plasmideja ei ollut kuitenkaan kaikilla kannoilla. Plasmidieristystä vertailtaessa voitiin todeta, että pienet plasmidit olivat peräisin villityypin bakteerista. Nämä pienet plasmidit ovat luultavasti mobilisoituvia plasmideja, jotka eivät pysty itsenäiseen konjugaatioon, mutta siirtyvät konjugoituvan plasmidin mukana (ks. yleiskatsaus Waters 1999).

5.2 AmpC-geeni ja Inc-tyypit

AmpC-entsyymejä tuottavien bakteerien on todettu olevan yleisiä siipikarjatuotannossa ja siipikarjatuotteissa ympäri Eurooppaa, mutta ESBL-entsyymejä tuottavat bakteerit ovat monin paikoin yleisempiä (EFSA 2011). AmpC-geenin uskotaan levinneen suomalaiseen broilerintuotantoketjuun Skotlannista tuontilintujen mukana (Evira julkaisematon). Ruotsalaisesta ja tanskalaisesta broilerinlihasta on kuitenkin löytynyt huomattavasti enemmän ESBL-entsyymejä tuottavia bakteereja kuin Suomesta, vaikka maat käyttävät samoja isovanhempaispolven lintuja (Börjesson ym., 2013b). Suomessa AmpC-positiivisten *E. coli* -bakteerien määrä broilerintuotannossa ja broilerinlihassa on myös pienempi kuin monissa muissa Euroopan maissa. ESBL-geenien vähäisyys ja AmpC-geenien vähäisempi leviäminen voivat johtua Competitive Exclusion -menetelmän käytöstä suomalaisessa broilerintuotannossa (keskustelu Tarja Pohjanvirta). Menetelmä perustuu poikasten suolistoflooran vahvistamiseen heti kuoriutumisen jälkeen (Orion Pharma). Menetelmä ei ole laajasti käytössä Ruotsissa eikä muissa Euroopan maissa.

Suomalaisen broilerituotannon eri vaiheiden, broilerinlihan ja koirien *E. coli* -bakteerien AmpC-geenit kuuluivat kaikki CIT-ryhmään. Myöhemmissä tutkimuksissa selvisi, että geeni on CMY-2. CMY-2 on selvästi yleisin AmpC-geeni ja sitä on löydetty siipikarjan bakteereista useista maista (EFSA 2011). Tässä työssä tutkittujen broilerin tuotantoketjun *E. coli* -bakteerien CMY-2-geeni sijaitsi useimmiten IncI1-plasmidissa. IncI1-plasmidi on yhdistetty IV-tyypin pilukseen, joka saattaa olla yhteydessä konjugaatioon ja virulenssiin ja jota tavataan useimmiten patogeenisissä bakteereissa (Johnson ym., 2007b). IncI1-tyypin plasmidin säilymisen ja leviämisen taustalla saattavat siis olla myös muut tekijät kuin antibioottiresistenssi. Suomalaisesta broilerinlihasta löydetty *E. coli* -bakteerien plasmidit, jotka sisälsivät CMY-2 geenin, kuuluivat muista tuotantovaiheista poiketen pääsääntöisesti

IncK-tyyppiin. IncK-plasmidi on liitetty CMY-2-geeniin broilereissa myös aiemmin (Dierikx ym., 2010; Börjesson 2013b).

Ruotsissa sekä broilerin tuotantoketjun AmpC-positiiviset näytteet että broilerinliha sisälsivät ainoastaan IncK-tyypin plasmideja (Börjesson ym., 2013b). Tästä pääteltiin, että resistenssiplasmidit ovat siirtyneet broilereista lihaan broilerintuotantoketjussa. Suomessa tilanne ei luultavasti ole näin yksiselitteinen, sillä broilerinlihasta eristetyt plasmidit kuuluivat suurimmaksi osaksi eri Inc-tyyppisiin kuin tuotantopolven plasmidit. Tässä tutkimuksessa ei seurattu tietyn isovanhempaiserän, emojen, tuotantopolven ja niistä teurastettujen lihojen *E. coli* -bakteereja, mutta koska broilerintuotantoketjun näytteistä löytyi myös IncK-tyypin plasmideja, voivat broilerinlihan plasmidit olla peräisin näistä kannoista. Koirien *E. coli* -bakteerien IncI1-plasmidit eivät todennäköisesti ole peräisin ainakaan suomalaisesta broilerinlihasta, sillä lihasta löydetty *E. coli* -bakteerit sisälsivät IncK-plasmideja. Koirien *E. coli* -bakteerien plasmideista on kuitenkin vaikea tehdä laajempaa yleistystä, sillä tässä tutkimuksessa tarkasteltavana oli vain kaksi kantaa.

5.3 pMLST ja restriktioentsyymianalyysi

Resistenssiplasmidien yhtäläisyyksiä tutkittiin tarkemmin pMLST-tyypityksen ja restriktioentsyymianalyysin avulla. Broilerintuotantoketjun eri vaiheista ja broilerinlihasta eristettyjen *E. coli* -bakteerien IncI1-plasmidit osoittautuivat kaikki samanlaisiksi tutkittujen konservoituneiden geenien suhteen. pMLST soveltuu hyvin plasmidien sukulaisuussuhteiden arvioimiseen, sillä muutokset ylläpitogeeneissä tapahtuvat yleensä vasta pitkän ajan kuluessa. Tässä työssä tarkastelujakso oli varsin lyhyt, joten muutoksia ei ole ehtinyt tapahtumaan ja plasmidit ovat läheistä sukua keskenään. Tuloksista voidaan päätellä, että plasmidit ovat luultavasti peräisin yhdestä lähteestä. Tämä tukee hypoteesia, jonka mukaan resistenssiplasmidit olisivat tulleet isovanhempaispolven lintujen mukana Skotlannista ja siirtyneet sitten vertikaalisesti broilerintuotantoketjussa alaspäin. Plasmidit ovat mahdollisesti myös levinneet bakteeripopulaatioissa horisontaalisesti konjugaation välityksellä.

Tutkitut IncI1-plasmidit kuuluivat sekvenssityyppiin 12, jota on tavattu ympäri maailmaa *E. coli*- ja *Salmonella* -bakteereissa (pubMLST). Yhdysvalloissa vuonna 2009 tehdyssä tutkimuksessa broilerintuotannon ja broilerinlihan *Salmonella* -bakteereista eristetyt CMY-

2-geenin sisältävät IncI1-tyypin plasmidit kuuluivat suurimmaksi osaksi sekvenssityyppiin 12 (Folster ym., 2010; Folster ym., 2012). Samaa tyyppiä löydettiin myös ihmisistä eristetyistä *Salmonella* -bakteereista. Italiassa sekvenssityyppiin 12 kuuluvia IncI1-tyyppiin plasmideja on löydetty siipikarjan *E. coli*-bakteereista (Accogli ym., 2013). Suomalaisessa broilerintuotannossa esiintyvät IncI1-plasmidit voivat olla sukua näille maailmalla yleisesti levinneille IncI1-plasmideille. pMLST-tulosten perusteella koirien *E. coli* -bakteerien plasmidit olivat hieman erilaisia. Tämä johtuu mutaatioista *ardA*-geeninssä, sillä plasmidit poikkesivat ainoastaan tämän geenin suhteen. Toinen plasmideista kuului selvästi sekvenssityyppiin 12, mutta toiselle plasmidille ei pystytty määrittämään sekvenssityyppiä. Luultavasti plasmidit ovat kuitenkin läheistä sukua toisilleen. Plasmidien alkuperästä ei kuitenkaan pystytä tekemään tarkempia päätelmiä sekvenssityypin perusteella, sillä tutkittavia kantoja oli vain kaksi.

Koska IncK-plasmideja ei voida tyyppittää pMLST-analyysin avulla, tutkittiin kyseisiä plasmideja restriktioentsyymianalyysin avulla. Analyysistä selvisi, että IncK-plasmideissa on jonkin verran eroavaisuuksia. Broilerinlihasta löytyneet IncK-plasmidit eivät olleet keskenään samanlaisesti pilkkoutuneita, mutta isovanhempaispolvesta ja tuotantopolvesta löydetty plasmidit olivat samanlaisia. Osa broilerinlihoista eristetyistä plasmideista oli toisaalta pilkkoutunut samalla tavalla kuin isovanhempaispolven ja tuotantopolven plasmidit. Restriktioentsyymianalyysi ei kuitenkaan ole kovin tarkka menetelmä plasmidien samanlaisuuden arvioimiseen, sillä yksittäiset pistemutaatiot saattavat muuttaa restriktioentsyymien katkaisukohdan. pMLST:n avulla saadaan tarkemmin määritettyä samanlaisuutta, sillä siihen yksittäiset pistemutaatiot eivät vaikuta samalla tavalla. Koska IncK-plasmideissa ei kuitenkaan ole nähtävissä suuria eroja, voidaan päätellä, että nekin ovat melko läheistä sukua keskenään. Kuten IncI1-plasmidit, myös IncK-plasmidit ovat luultavasti siirtyneet vertikaalisesti broilerintuotantoketjussa, sillä samanlaisesti pilkkoutuneita plasmideja löydettiin tuotantoketjun kaikista vaiheista sekä broilerinlihasta.

Koska samanlaisia AmpC-geenejä ja plasmidityyppejä sekä bakteerikantoja on löydetty niin ihmisistä kuin tuotantoeläimistä, on hyvin todennäköistä, että plasmidit ovat siirtyneet jossain vaiheessa bakteerien mukana ruoan välityksellä ihmiseen (Voets ym., 2013). Suomessa potilaiden veriviljelyistä ei ole löytynyt 1990–2010 välillä kuin yksi plasmidivälitteinen AmpC-geenin sisältävä kanta (Lyytikäinen 2013). Näytteissä

yleisempiä olivat ESBL-geenit, jotka kuuluivat CTX-M-ryhmään. ESBL-geenit eivät kuitenkaan ole yleisiä suomalaisessa broilerinlihassa. ESBL/AmpC-kantajuutta terveissä suomalaisissa ihmisissä ei sen sijaan ole tutkittu, joten ei voida tietää, ovatko ihmiset näiden resistenssigeenien kantajia. Ruotsissa tehdyssä tutkimuksessa broilerinlihan ja ihmisten kliinisistä AmpC-positiivisista *E. coli* -näytteistä ei löydetty fylogeneettisiä tai geneettisiä yhtäläisyyksiä (Börjesson ym., 2013a). Riski resistenttien bakteerien siirtymiseen broilerinlihasta ihmiseen on kuitenkin olemassa, ja riskiä Suomessa lisää se, että Suomeen tuodaan broilerinlihaa ulkomailta. Ihmiset voivat saada ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavia bakteereja myös lemmikkieläimistä, sillä lemmikit elävät läheisessä kontaktissa omistajansa kanssa (ks. yleiskatsaus Guardabassi ym., 2004). Koirien resistenssitaakkaa täytyy kuitenkin tutkia tarkemmin, ennen kuin voidaan tehdä päätelmiä resistenssigeenien alkuperästä ja mahdollisesta siirtymisestä bakteerien välityksellä ihmisiin.

5.4 MLST

Virulentteihin fylogeniaryhmiin B2 ja D kuuluvien AmpC-positiivisten *E. coli* -bakteerien koko genomia tutkittiin MLST-menetelmän avulla. Tutkittavat kannat jakaantuivat selvästi kahteen eri sekvenssityyppiin fylogeniaryhmien mukaan. Suomalaisesta broilerintuotantopolvesta ja emoista löydetty ST131-*E. coli* -kanta on liitetty aikaisemmin moniin ESBL/AmpC-geeneihin kuten CTX-M-15 ja CMY-2 myös ihmisissä (Rogers ym., 2011). Euroopassa ESBL/AmpC tuottavia ST131-*E. coli* -klooneja on löydetty myös eläimistä (ks. yleiskatsaus Ewers ym., 2012). ST131 on yleinen suoliston ulkopuolisia infektioita aiheuttavissa ExPEC-bakteereissa maailmanlaajuisesti. Onkin huolestuttavaa, että AmpC-entsyymejä tuottavia ST131-*E. coli* -kantoja löytyy myös suomalaisesta broilerituotannosta. Suomalaisessa broilerinlihassa esiintyvää ST38-*E. coli* -kloonina on myös löydetty maailmanlaajuisesti ESBL-entsyymejä tuottavista *E. coli* -bakteereista ihmisistä ja eläimistä (ks. yleiskatsaus Ewers ym., 2012). Ruotsissa ST38 oli myös yleisin broilerinlihasta löydetty *E. coli* -bakteerien sekvenssityyppi (Börjesson ym., 2013b). Se on luultavasti samaa alkuperää kuin suomalaisesta broilerinlihasta löydettyt AmpC-positiiviset *E. coli* -bakteerit, sillä Suomessa ja Ruotsissa isovanhempaispolven linnut tulevat samoista yrityksistä. ST38 on aiemmin liitetty CTX-M-, OXA- ja NDM-geeneihin (ks. yleiskatsaus Ewers ym., 2012). CTX-M-entsyymejä tuottavia ST38-*E. coli* -kantoja on löydetty

ihmisten kliinisistä näytteistä ainakin Japanista, Hollannista, Koreasta ja Tansaniasta (Pitout 2012). ST38-*E. coli* -bakteeria ei kuitenkaan ole liitetty AmpC-entsyymejä tuottaviin patogeeneisiin *E. coli* -bakteereihin ihmisissä. Tämä sekvenssityyppi on kuitenkin yleistymässä. Suomalaisesta broilerituotannosta siis löytyy sellaisia *E. coli* -bakteereja, joiden sekvenssityyppi on liitetty ihmisissä suoliston ulkopuolisia infektiota aiheuttaviin ExPEC-bakteereihin. Erityisesti ST131-*E. coli* on uhka ihmisten terveydelle, sillä se on erittäin virulentti ja usein resistentti monille antibioottiryhmille. Tämän kloonin nopea leviäminen ihmisistä toiseen ja mahdollisesti myös eläinten ja ruoan välityksellä ihmisiin asettaa haasteita infektioiden ennaltaehkäisylle ja hoidolle.

5.5 Tulosten hyödyntäminen

ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavien bakteerien leviämistä suomalaisessa broilerintuotannossa voidaan pyrkiä ehkäisemään vain, jos tunnetaan antibioottiresistenssitilanne ja tiedetään, miten resistenssigeenit leviävät ja mistä ne tulevat. Tietoa beetalaktamaasigeenejä sisältävien bakteerien ja plasmidien alkuperästä sekä levittäytymisestä voidaan tulevaisuudessa hyödyntää suunniteltaessa toimenpiteitä, jotka tähtäävät antibioottiresistenssin kasvun ehkäisemiseen suomalaisessa broilerintuotantoketjussa. Tällaisia toimenpiteitä voivat olla muun muassa eläinten tuonnin kontrollointi ja tuontieläinten tutkiminen resistenssigeenien/plasmidien/bakteerien varalta. Lisäksi voidaan suunnitella tarkemmin antibioottien käyttöä siipikarjan hoidossa. Vaikka Suomessa ei käytetä siipikarjan hoidossa kefalosporiineja, voi muiden beetalaktaamiantibioottien, kuten amoksisilliinin, käyttö kuitenkin edistää ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavien bakteerien kasvua. Koska plasmidit sisältävät usein resistenssigeenejä monia antibioottiryhmiä vastaan, voi beetalaktaamien käyttö suosia näin muidenkin resistenssigeenien yleistymistä. Tällä hetkellä resistenssitilanne suomalaisen broilerintuotantoketjun eri vaiheissa on hyvä, mutta seuranta ja tutkimustyötä tarvitaan ehdottomasti tulevaisuudessakin.

5.6 Yhteenveto

Suomalaiseen broilerintuotantoketjuun ja broilerinlihaan on levinnyt AmpC-entsyymejä tuottavia *E. coli* -bakteereja luultavasti tuontilintujen mukana. AmpC-geeni on CMY-2 ja

se ilmenee suurimmaksi osaksi konjugatiivisissa plasmideissa, jotka kuuluvat pääasiassa IncII- ja IncK-tyyppisiin. Broilerintuotannossa IncII-plasmidit olivat IncK-plasmideja yleisempiä ja ne osoittautuivat samanlaisiksi pMLST-tyypityksen mukaan. Tästä voidaan päätellä, että ne ovat levinneet vertikaalisesti yhteisestä lähteestä broilerintuotantoketjussa alaspäin. Broilerinlihassa IncII-plasmideja oli kuitenkin huomattavasti vähemmän ja yleisin plasmidityyppi oli IncK. Lihan plasmidit eivät kuitenkaan olleet restriktioentsyymianalyysin mukaan täysin samanlaisia. Broilerintuotannon eri vaiheista ja lihasta eristetyistä plasmideista kuitenkin löytyi samanlaisia restriktioprofiileja. Voidaan ajatella, että plasmidit ovat siirtyneet *E. coli* -bakteerin siirtyessä vertikaalisesti broilerintuotantoketjussa myös broilerinlihaan. Konjugaation avulla plasmidit ovat pystyneet levittämään myös horisontaalisesti tuotantoketjun eri vaiheissa, mikä lisää positiivisten löydösten määrää. Resistentit bakteerit voivat siirtyä ruuan välityksellä myös ihmisiin. Koska resistenttiys siirtyy plasmidien välityksellä tehokkaasti, on huolena, että nämä plasmidit leviävät harmittomista bakteereista patogeenisiin bakteereihin ja sairastuttavat ihmisiä. Osa tutkituista *E. coli* -bakteereista kuului potentiaalisesti virulentimpiin fylogeniaryhmiin. Broilerintuotannosta löytyi *E. coli* -bakteereja, jotka kuuluvat ihmiselle erittäin virulenttiin ST131-tyyppiin. ST131-*E. coli* aiheuttaa ihmisille suoliston ulkopuolisia infektioita ja on usein resistentti monille antibiooteille. Resistenssitilannetta on syytä tulevaisuudessakin seurata, jottei se pääse pahenemaan. Tilanne Suomessa on tällä hetkellä kuitenkin melko hyvä, sillä muualla maailmassa yleisiä ESBL-entsyymejä tuottavia *E. coli* -bakteereja on suomalaisessa broilerintuotannossa erittäin vähän.

6 Lähdeluettelo

- Accogli, M., D. Fortini, M. Giufre, C. Graziani, M. Dolejska, A. Carattoli ja M. Cerquetti. 2013. IncII plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:E238-240.
- Agerso, Y., T. Hald, B. Helwigh, B. Brock Hog, L.B. Jensen, V. Frokjaer Jensen, H. Korsgaard, L.S. Larsen, A.M. Seyfarth ja T. Struve. 2012. DANMAP 2011—use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Technical University of Denmark (Statens Serum Institut), Lyngby, Denmark.
- Birnas, L., M.A. Moreno, M. Zarazaga, C. Porrero, Y. Saenz, M. Garcia, L. Dominguez ja C. Torres. 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2056–2058.
- Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933–951.
- Börjesson, S., C. Jernberg, A. Brolund, P. Edquist, M. Finn, A. Landén, B. Olsson-Liljequist, K. Tegmark Wisell, B. Bengtsson ja S. Englund. 2013a. Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:E309–311.
- Börjesson, S., M. Egervärn, M. Lindblad ja S. Englund. 2013b. Frequent occurrence of extended-spectrum beta-lactamase- and transferable AmpC beta-lactamase producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:2463–2466.
- Cantón, R. ja T. M. Coque. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:466–475.
- Cantón, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero ja T. M. Coque. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:144-153.
- Carattoli, A. 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5:113–122.
- Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins ja E. J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 63:219–228.
- Clermont, O., S. Bonacorsi ja E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4555–4558.
- Couturier, M., F., Bex, P.L. Bergquist ja W.K. Maas. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52:375–395.
- Dierikx, C., A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, H. Smith ja D. Mevius. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* 145:273–278.
- Dierikx, C., J. van der Goot, T. Fabri, A. van Essen-Zandbergen, H. Smith ja D. Mevius. 2013. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:60–67.
- Dionisio, F., I. Matic, M. Radman, O.R. Rodrigues ja F. Taddei. 2002. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics.* 162:1525–1532.

- Dower, W.J., J.F. Miller ja C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127–6145.
- Essack, S.Y. 2001. The Development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm. Res.* 18:1391–1399.
- Eläintautien torjuntayhdistys ETT ry. http://www.ett.fi/sites/default/files/user_files/terveydenhuolto/Siipit/Vertailu%202007-12%20mikrobil%C3%A4%C3%A4kkeiden%20k%C3%A4ytt%C3%B6%20siipikarjanlilhantuotantoketjussa.pdf. viitattu 28.3.2014.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*. doi:10.2903/j.efsa.2011.2322.
- Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther ja L.H. Wieler. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:646–655.
- Fiett, J., A. Pałucha, B. Miaczyńska, M. Stankiewicz, H. Przondo-Mordarska, W. Hryniewicz, ja M. Gniadkowski. 2000. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiellae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1499-505.
- Folster, J.P., G. Pecic, A. Singh, B. Duval, R. Rickert, S. Ayers, J. Abbott, B. McGlinchey, J. Bauer-Turpin, J. Haro, K. Hise, S. Zhao, P.J. Fedorka-Cray, J. Whichard ja P.F. McDermott. 2012. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009. *Foodborne Pathog. Dis.* 9:638–645
- Folster, J.P., G. Pecic, S. Bolcen, L. Theobald, K. Hise, A. Carattoli, S. Zhao, P.F. McDermott ja J.M. Whichard. 2010. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans in the United States. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:181–187
- García-Fernández, A., G. Chiaretto, A. Bertini, L. Villa, D. Fortini, A. Ricci, ja A. Carattoli. 2008. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:1229–1233
- García-Fernández, A., D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius ja A. Carattoli. 2009. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:274–281.
- Georgopapadakou, N.H. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2045–53.
- Gibson, J.S., R.N. Cobbold ja D.J. Trott. 2010. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. *J. Med. Microbiol.* 59:592-598.
- Grave, K. J. Torren-Edo ja David Mackay. 2010. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2037–2040
- Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D. H. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:321–332.
- Gupta, V. 2007. An update on newer beta-lactamases. *Indian J. Med. Res.* 126:417-427
- Holmes, R.K. ja M.G. Jobling. 1996. *Medical Microbiology* 4th edition. University of Texas Medical Branch, Galveston.
- Hordijk, J., A. Schoormans, M. Kwakernaak, B. Duim, E. Broens, C. Dierikx, D. Mevius ja J.A. Wagenaar. 2013. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2013.00242.

- Jacoby, G.A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:161–182
- Jaurin, B., T. Grundström, T. Edlund ja S. Normark. 1981. The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 290:221–225.
- Johnson, J.R., M. R. Sannes, C. Croy, B. Johnston, C. Clabots, M.A. Kuskowski, J. Bender, K.E. Smith, P.L. Winokur ja E.A. Belongia. 2007a. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products Minnesota and Wisconsin 2002–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 13:838–846.
- Johnson, T.J., Y.M. Wannemuehler, S.J. Johnson, C.M. Logue, D.G. White, C. Doetkott ja L.K. Nolan. 2007b. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1976–1983.
- Kluytmans, J.A., I.T. Overdeest, I. Willemsen, M.F. Kluytmans-van den Bergh, K. van der Zwaluw, M. Heck, M. Rijnsburger, C.M. Vandenbroucke-Grauls, P.H. Savelkoul, B.D. Johnston, D. Gordon ja J.R. Johnson. 2013. Extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin. Infect. Dis.* 56:478–87.
- Koulu, M. ja J. Tuomisto. 2001. Farmakologia ja toksikologia 6.painos. Kustannus Medicina Oy.
- Lanka, E. ja B.M. Wilkins. 1995. DNA Processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* 64:141–169.
- Leverstein-van Hall, M.A., C.M. Dierikx, J. Cohen Stuart, G.M. Voets, M.P. van den Munckhof, A. van Essen-Zandbergen, T. Platteel, A.C. Fluit, N. van de Sande-Bruinsma, J. Scharinga, M.J.M. Bonten ja D.J. Mevius. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:873–880.
- Lyytikäinen, O. 2013. Huononeva ESBL-tilanne puhutti SIRO-päivillä 2.10.2012. Suomen Sairaalahygienialehti. 31:12–16.
- Maiden, M.C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, ja B.G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:3140–3145.
- Maron, D.F., T.J. Smith ja K.E. Nachman. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: An international regulatory and economic survey. *Global. Health.* doi: 10.1186/1744-8603-9-48.
- Nicolas-Chanoine M.H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M.P. Alonso, M.M. Caniça, Y.J. Park, J.P.Lavigne, J. Pitout ja J.R. Johnson. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:273–81.
- Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1831–1836
- Normark, B.H ja S. Normark. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252:91–106.
- Orion Pharma. <http://www.orionvet.fi/siipikarja>. viitattu 28.3.2014
- Paterson, D.L. ja R.A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657–686.
- Pérez-Pérez, F.J. ja N.D. Hanson. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2153–2162.

- Peter-Getzlaff, S., S. Polsfuss, M. Poledica, M. Hombach, J. Giger, E.C. Böttger, R. Zbinden ja G.V. Bloemberg. 2011. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 49:2924–2932.
- Pitout, J.D. 2012 Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2012.00009.
- Platell, J.L., J.R. Johnson, R. N. Cobbold ja D. J. Trott. 2011. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet. Microbiol.* 153:99–108
- Poole, K. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:2200–2223.
- pubMLST. <http://pubmlst.org/plasmid/>. viitattu 31.3.2014
- Reisbig, M.D., A. Hossain ja N.D. Hanson. 2003. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of *Enterobacter* origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1141–1151.
- Rodríguez-Martínez, J.M., A. Pascual, I. García ja L. Martínez-Martínez. 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:703–706.
- Rogers B.A., H.E. Sidjabat ja D.L. Paterson. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1–14.
- Schmidtke A.J. ja N.D. Hanson. 2006. Model system to evaluate the effect of *ampD* mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2030–2037.
- Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, L. Herman, F. Haesbrouck ja P. Butaye. 2009. Broad-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:295–316.
- Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, B. Catry, L. Herman, E. Haesebrouck ja P. Butaye. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:1238–1243.
- Spratt, B.G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.* 264:388–394.
- Suomen Siipikarjaliitto ry ja Suomen Broileryhdistys ry. www.siipi.net. viitattu 14.5.2014.
- Teshager, T., L. Domínguez, ja M. A. Moreno. 2000. Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3483–3484.
- Thomas, C.M. ja K.M. Nielsen. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:711–721
- Toleman, M.A., K. Rolston, R.N. Jones ja T.R. Walsh. 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2859–2893.
- Törmikoski, K. 2008. Siipikarjalle tautia aiheuttavat *Escherichia coli* -bakteerit. Pro gardu -tutkielma. Biotieteiden laitos, Kuopion yliopisto, Kuopio.
- Urwin, R ja M.C. Maiden. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11:479-487.
- Voets, G.M., A.C. Fluit, J. Scharringa, C Schapendonk, T. van den Munckhof, M.A. Leverstein-van Hall ja J.C. Stuart . 2013. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 167:359–362.

Walther-Rasmussen, J. ja Højby N. Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. 2002. *Can. J. Microbiol.* 48:479–493.

Waters, V.L. 1999 Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front. Biosci.* 4:D433–456.

Willets, N. 1988. Conjugation. *Methods Microbiol.* 21:49–75.

Winokur, P.L., D. L. Vonstein, L. J. Hoffman, E. K. Uhlenhopp ja G. V. Doern. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2716–2722.

Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L.H. Wieler, H. Karch, P.R. Reeves, M.C. Maiden, H. Ochman ja M. Achtman. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60:1136–1151.