

## SIPIKARJALLE TAUTIA AIHEUTTAVAT *ESCHERICHIA COLI* -BAKTEERIT

Kaisa Törmikoski

Pro Gradu -tutkielma

Ravitsemus- ja elintarvikebiotekniikka

Biotieteiden laitos

Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta

Kuopion yliopisto

Toukokuu 2008

KUOPION YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta  
Biotieteiden laitos  
Ravitsemus- ja elintarvikebiotekniikka  
TÖRMIKOSKI KAISA J.: Siipikarjalle tautia aiheuttavat *Escherichia coli* -bakteerit  
Pro gradu -tutkielma 71 sivua  
Tutkielman ohjaajat: ELL Tarja Pohjanvirta, EVIRA ja ELL Paula Hyvönen, KY  
Toukokuu 2008

---

Avainsanat: APEC, *Escherichia coli*, fylogeneettinen ryhmä, siipikarja, virulenssitekijä, zoonoosi

Pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli tutkia suomalaisesta siipikarjasta ja siipikarjanlihatuotteista eristettyjen *Escherichia coli* -bakteerien ominaisuuksia. Tutkimuksessa haluttiin selvittää kolikantojen fylogeniaa, virulenssitekijöitä, ja geneettistä samankaltaisuutta. Mielenkiinnon kohteena oli myös kantojen kulkeutuminen tuotantoketjussa, sekä mahdollinen siirtyminen isäntäsupolvekseen toiseen. Virulenssiominaisuuksia ja epidemiologiaa selvittämällä haluttiin tarkastella siipikarjan kolikantojen mahdollista zoonoottista potentiaalia.

Tutkimuksessa oli mukana 1256 *Escherichia coli* -kantaa, jotka oli eristetty sairaista linnuista (817 kantaa), terveen siipikarjan ulosteista tai elimistä (220 kantaa) ja siipikarjanlihatuotteista (219 kantaa) Suomessa vuosina 2003-2007. Kantojen fylogeniaryhmät ja kymmenen virulenssitekijän esiintyminen niissä selvitettiin polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvien menetelmien avulla. Tutkitut virulenssigeenit olivat APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) -bakteereilta aikaisemmin tunnistetut K1-kapselin geeni *kps MT K1*, *ibeA*-invasiinin geeni *ibeA*, EAST1- ja *vat*-toksiineja koodittavat *astA*- ja *vat*-geenit, bakteerisolun raudansitomiskykyyn vaikuttavat *irp2*- ja *iucD*-geenit, kiinnittymistekijöitä koodittavat *papC*- ja *tsh*-geenit, kolisiini V-plasmidiin liittyvä *cva*-geeni sekä seerumiresistenssiin liittyvä *iss*-geeni. Pulssikenttägeelielektroforeesin (PFGE) avulla genotyyppitettiin 161 *E. coli* -kantaa.

Sairaista linnuista eristetyt kolikannat kuuluivat pääasiassa fylogeniaryhmään B2 (54,4 %), joista suurin osa (74,1 %) alaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29, terveistä linnuista eristetyt kannat ryhmään A (57,7 %) ja elintarvikkeista eristetyt kannat ryhmään D (47,9 %). Patogeenisimpaan fylogeniaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29 kuului 2 elintarvikkeista eristettyä kantaa. Virulenssitekijöitä oli eniten sairaista linnuista eristetyissä kannoissa, mutta kaikkia virulenssigeenejä löytyi myös terveiden lintujen ja elintarvikkeiden kolikannoista. Sairaiden lintujen kolikannoista noin joka toisella oli K1-kapseli (49,1 %) ja P-fimbria (53,0 %). Elintarvikkeista eristetyissä kolikannoista löytyi merkittävän paljon *astA*- (43,4 %), *iss*- (38,4 %), *irp2*- (44,3 %) ja *iucD*- (56,6 %) geenejä. Genotyyppitetyt kannat olivat geneettisesti hyvin lähellä toisiaan. Lisäksi samaa B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmän genotyyppiä löytyi kaikista broilerin tuotantopolvista ja elintarvikkeista. Tämä tutkimus vahvistaa, että patogeenisia siipikarjan *E. coli* -bakteereja esiintyy elintarvikkeissa. Täten ne voivat olla myös zoonoottinen uhka.

UNIVERSITY OF KUOPIO, Faculty of Natural and Environmental Sciences  
Department of Biosciences  
Degree Programme in Nutrition and Food Biotechnology  
TÖRMİKOSKI KAISA J.: *Escherichia coli* pathogenic for poultry  
Master thesis 71 pages  
Supervisors: DVM Tarja Pohjanvirta, EVIRA and DVM Paula Hyvönen, KY  
May 2008

---

Key words: APEC, *Escherichia coli*, phylogenetic groups, poultry, virulence factors, zoonosis

The aim of this Master thesis was to investigate characteristics of *Escherichia coli* bacteria isolated from Finnish poultry and retail poultry meat. I wanted to find out phylogenetic background, genetic similarity and virulence factors of the *E. coli* strains. I was concerned about how strains drift in poultry production chain and if there occurs transmission of APEC strains from adult birds to their progeny. Zoonotic potential of APEC strains was estimated by analysing virulence characteristics and epidemiology.

There were 1256 *Escherichia coli* strains in this study isolated from diseased poultry (817 strains), healthy poultry faeces and organs (220 strains), and retail poultry meat (219 strains) in Finland between years 2003 and 2007. Phylogenetic groups and prevalence of 10 virulence factors was investigated by polymerase chain reaction (PCR) methods. Studied virulence-associated genes, K1 capsular gene *kps MT K1*, *ibeA* invasin gene, EAST1 and *vat* toxins associated *astA* and *vat* genes, iron regulation genes *irp2* and *iucD*, adhesin genes *papC* and *tsh*, colisin V plasmid gene *cva* and serum resistance associated *iss* gene, have been characterized previously in APEC. 161 *E. coli* strain were classified by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) type.

*Escherichia coli* strains from diseased poultry mainly belonged to phylogenetic group B2 (54,4 %) and most of the strains in that group (74,1 %) belonged to the subgroup B2<sub>1</sub>/ST29. Strains from healthy poultry mainly belonged to group A (57,7 %) and strains from retail food to group D (47,9 %). There were 2 strains isolated from retail poultry meat, which belonged to the highly virulent subgroup B2<sub>1</sub>/ST29. Virulence factors were mostly distributed in strains from diseased poultry, but every virulence gene studied was also found in strains from healthy poultry and retail poultry meat. About half of the strains from diseased poultry had K1 capsule (49,1 %) and P fimbriae (53,0 %). *E. coli* strains from retail food contained considerable number of *astA* (43,4 %), *iss* (38,4 %), *irp2* (44,3 %) and *iucD* (56,6 %) genes. PFGE classified strains were genetically close to each other. In addition the same B2<sub>1</sub>/ST29 genotype was detected in all steps of poultry production chain and in retail food samples. This research showed that there occurs pathogenic *E. coli* -bacteria of poultry in retail poultry meat. That strengthens arguments about zoonotic risk of APEC.

## ESIPUHE

Tämä tutkimus tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto EVIRA:n Kuopion tutkimusyksikössä keväällä ja kesällä 2007. Minulla oli ilo työskennellä tehokkaassa ja asiantuntevassa, mutta myös huumorihenkisessä työyhteisössä. Koen olevani onnekas, kun sain tehdä erittäin mielenkiintoista tutkimustyötä ja samalla tutustua näihin upeisiin ihmisiin, jotka opettivat minulle bakteriologian saloja välillä melkein kädestä pitäen.

Kiitos eläintautibakteriologian tutkimusyksikön johtaja Sinikka Pelkoselle, joka uskoi minuun antamalla tämän haasteellisen tutkimushankkeen tehtäväksi. Kiitos ELL Tarja Pohjanvirralle erittäin asiantuntevasta ja kannustavasta ohjauksesta. Kiitos ELL Paula Hyvöselle kirjoitustyön ohjauksesta ja kannustavasta tuesta koko opiskelujeni ajan.

Kiitos EVIRA:n Kuopion toimipisteen henkilökunnalle. Kiitos tutkija Sirpa Heinikaiselle lukuisista ohjeista työn aikana. Kiitos laboranteille Riikka Luukkaselle, Riitta Liimataiselle ja Sari Airaksiselle paitsi monipuolisesta käytännön laboratoriotyön opettamisesta, myös rempseästä ilmapiiristä, missä oli helppo työskennellä. Kiitos myös biotieteiden opiskelija Ilona Ikoselle, joka auttoi minua selviämään suuresta analyysimäärästä ja jakoi ilot ja ihmetykset laboratoriossa.

Haluan kiittää myös perhettäni, isiä ja äitiä, sisaruksiani Samulia ja Sofiaa, jotka ovat aina uskoneet minuun ja kannustaneet valinnoissani, rakasta kihlattuani Eeroa, joka on jaksanut kärsivällisesti kuunnella paljon asiaa bakteereista, geeneistä ja ravinnosta, sekä tytärtäni Meriä, joka luontaisella elämän uteliaisuudella ja innokkuudella kaivaa minustakin aina esiin sen tutkijansielun.

Kuopiossa huhtikuussa 2008

Kaisa Törmikoski

## LYHENNELUETTELO

- APEC** (Avian pathogenic *Escherichia coli*) = linnuille tautia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit
- ART/TRT/SHS** (avian rhinotracheitis/ turkey rhinotracheitis/swollen head syndrome) = linnuilla pneumoviruksen aiheuttama ylempien hengitysteiden tulehdus, johon voi liittyä *E. coli* -infektio
- CHEF** (clamped homogeneous electric field electrophoresis) = PFGE-laitetyyppi, jossa virtapiiri muodostuu kuusikulmion muotoon asetetuista elektroneista
- ECOR** (The *Escherichia coli* Reference Collection) = *E. coli* -kantakokoelma: 72 erilaista *E. coli* -kantaa, jotka on jaoteltu multilokusentsyymielektroforeesin, patogeenisuuden, isäntäorganismien ja maantieteellisen sijainnin perusteella
- ExPEC** (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*) = ruoansulautuskanavan ulkopuolisia eli ekstraintestinaalisia tulehduksia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit
- LPS** (lipopolysaccharide) = lipopolysakkaridi, rasvan ja suurimolekyylisen hiilihydraatin muodostama molekyyli, jollaisia on etenkin gramnegatiivisten bakteerien ulkokalvolla
- MLEE** (multilocus enzyme electrophoresis) = multilokusentsyymielektroforeesi, epidemiologinen tutkimusmenetelmä
- NMEC** (neonatal /new born meningitis-causing *Escherichia coli*) = vastasyntyneille ihmislapsille aivokalvontulehdusta aiheuttavat *E. coli* -bakteerit
- PAI** (pathogenicity island) = patogeenisuusaareke, alue kromosomaalisessa DNA:ssa, johon on keskittynyt useampia virulenssigeenejä
- PCR** (polymerase chain reaction) = tutkimusmenetelmä, jolla tunnistetaan genomista haluttuja geenejä tai DNA-alueita monistamalla DNA:ta polymeerasientsyymillä avulla
- PFGE** (pulsed field gel electrophoresis, pulssikenttägeelielektroforeesi) = genotyyppitysmenetelmä, jota käytetään epidemiologisissa tutkimuksissa tartuntalähteen ja -reitien selvittämiseksi
- RAPD** (random amplification of polymorphic DNA) = PCR-reaktioon perustuva genotyyppitysmenetelmä, jolla tutkitaan genomien eroja monistamalla satunnaisia DNA-jaksoja
- UPEC** (uropathogenic *Escherichia coli*) = virtsatie-tulehduksia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit

Virulenssitekijöitä, proteiineja ja niitä koodittavia geenejä:

**AC/I-fimbria** (avian *E. coli* I fimbriae) ja sitä koodittava *fac*-geeniklusteri = kiinnittymistekijä, joka mahdollistaa APEC-bakteerin kiinnittymisen linnun henkitorven epiteelisoluihin (Yerushalmi ym. 1990)

**Aerobaktiini** ja sitä koodittava *iuc* (iron uptake chelate)-*iut* (iron uptake transport)-geeniklusteri = sidefori, jota ilmennetään rautaköyhässä ympäristössä (de Lorenzo ym. 1986)

**AFA-fimbria** (afimbrial adhesin) ja sitä koodittava *afa*-geeniklusteri = epiteelisoluihin kiinnittyvä adhesiini (Garcia ym. 1994)

**β-glukuronidaasi** ja sitä koodittava *uidA*-geeni = glukuronideja hajottava entsyymi, yleisesti käytetty *E. coli* merkkigeeni (Martins ym. 1993)

**CDT-toksiini** (cytolethal distending toxin) ja sitä koodittava *cdt*-geeniklusteri = toksiiini, joka tappaa soluja laajentamalla niitä (Pickett ym. 1993)

**ChuA** (Outer membrane hemin receptor) ja sitä koodittava *chuA*-geeni = hemiraudan kuljetukseen ja hyväksikäyttöön liittyvä solun ulkopinnan proteiini (Torres & Payne 1997)

**CNF 1 ja 2 -toksiinit** (cytotoxic necrotizing factor) ja niitä koodittavat *cnf 1 ja 2* -geeniklusterit = kaksi erilaista iholle nekroottista toksiiinia (Falbo ym. 1993)

**ColV** (colisin V) ja sitä koodittava *cva*-geeniklusteri = ekstrasellulaarinen antibioottinen *E. coli* -bakteerien erittämä proteiini (Gilson ym. 1990)

**Crl-adhesiini** (curli fibre) ja sitä koodittava *crl*-geeni = fibronektiineihin kiinnittyvä adhesiini (Arnqvist ym. 1992)

**EAST1-toksiini** (Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1) ja sitä koodittava *astA/east 1* -geeni = toksiiini, joka löydettiin alun perin EAEC-kannoista (McVeigh ym. 2000)

**F1-fimbria** ja sitä koodittava *fim*-geeniklusteri = kiinnittymistekijä, tyyppi 1 (Vandemaele ym. 2003)

**Feo** (ferrous iron transport system) ja sitä koodittava *feo*-geeniklusteri = raudansitomissysteemi ferroraudan ottamiseen solun sisään anaerobiosuhteissa (Kammler ym. 1993)

**Flagella** ja sitä koodittava *fliC*-geeni = liikkumiselin, flagella-antigeeni, H-antigeeni (Reid ym. 1999)

**GimB-invasiini** (genetic island associated with newborn meningitis) ja sitä koodittava *gimB*-geeni = invaasioproteiini, joka liittyy erityisesti NMEC-kantoihin liitettyyn patogeenisuussaarekkeeseen (Ewers ym. 2006)

**Hemolysiini A** ja sen eritykseen liittyvä *hly*-geeniklusteri = punasoluja hajottava proteiini (Hess ym. 1986)

**Hra-adhesiini** (heat-resistant agglutinin) ja sitä koodittava *hra*-geeni = kiinnittymistekijä (Ewers ym. 2006)

**IbeA-invasiini** (= GimA, Ibe10, invasion of brain endothelial cells from 10A-23) ja sitä koodittava *ibeA*-geeni = invaasioproteiini, joka edistää bakteerin pääsyä aivojen mikrovaskulaarisiin endoteelisoluihin (Germon ym. 2005)

**Iha-adhesiini** (iron-regulated gene A homologue adhesin) ja sitä koodittava *iha*-geeni = kiinnittymistekijä, patogeenisuussaareke CFT073:n merkkigeeni (Tarr ym. 2000)

**IreA** (iron-responsive element) ja sitä koodittava *ireA*-geeni = raudan hankintaan liittyvä proteiini, joka liittyy erityisesti UPEC-kantoihin (Russo ym. 2001)

**IroN** (Catecholate siderophore receptor) ja sitä koodittava *iroN*-geeni = sidefori, joka on alun perin köydetty *Salmonella*-bakteereilta (Bäumler 1998)

**Iss** (increased serum survival) ja sitä koodittava *iss*-geeni = proteiini, jonka on arveltu liittyvän lisääntyneeseen seerumiresistenssiin (Chuba ym. 1989)

**Kapseliantigeenit** ja niitä koodittava *kps*-geeniklusteri = bakteerin ulkopinnan antigeenejä

**K1-kapseli** ja sitä koodittava *kps-neu*-geeniklusteri = bakteeria suojaava hapan N-asetyylineuramiinipolysakkaridikerros (Siitonen & Vaara 2004)

**M-agglutiini** (blood-group-M-specific agglutinin) ja sitä koodittava *bma*-geeniklusteri = kiinnittymistekijä, joka sakkauttaa M-veriryhmäantigeenia ilmentävät punasolut (Rhen ym. 1986)

*malX* = patogeenisuussaareke CFT073:n merkkigeeni, joka koodittaa fosfotransferaasientsyymisysteemin entsyymi II:sta, mikä liittyy muun muassa maltoosiin ja maltodekstraasin sisäänottoon ja kuljetukseen soluun (Guyer ym. 1998; Reidl & Boos 1991)

*neuC* = geeni, joka koodittaa K1-kapselin polysiaalihapon synteesiin osallistuvaa P7-proteiinia (Zapata ym. 1992)

**O-antigeenipolymeraasi** ja sitä koodittava *rfc*-geeni = entsyymi, joka syntetisoi O-antigeenia (Lukomski ym. 1996)

**OmpA** (outer membrane protein A) ja sitä koodittava *ompA*-geeni = solun ulkokalvolla sijaitseva proteiini (Beck & Bremer 1980)

**OmpT** (outer membrane protein T) ja sitä koodittava *ompT* = solun ulkokalvolla sijaitseva proteaasi, joka tunnetaan nimillä proteaasi 7, proteaasi VII, omptiini ja proteaasi A (Vandeputte-Rutten 2001)

**P-** tai **Pap-fimbria** (pyelonephritis-associated pili) ja sitä koodittava *pap*-geeniklusteri = kiinnittymistekijä, jonka on todettu liittyvän bakteerin kiinnittymiseen erityisesti virtsateiden epiteelisoluihin (Vergier ym. 2007)

**Pic** ja sitä koodittava *pic*-geeni = seriiniproteaasientsyymi, joka liittyy muun muassa seerumiresistenssiin ja bakteerin kolonisoitumiseen suolistoon (Henderson ym. 1999)

**Sat-toksiini** (secreted autotransporter toxin) ja sitä koodittava *sat*-geeni = munuaisen ja virtsarakon soluille toksinen seriiniproteaasi (Guyer ym. 2000)

**S-fimbria** (S fimbrial adhesin) ja sitä koodittava *sfa*-geeniklusteri = kiinnittymistekijä, jonka avulla *E. coli* voi tarttua eukaryoottisolujen siaalihappoa sisältäviin reseptoreihin (Moch ym. 1987)

**SitABCD** (*salmonella* iron transport system) ja sitä koodittava *sit*-geeniklusteri = raudan ja mangaanin kuljetukseen liittyvä systeemi (Sabri ym. 2006)

**Stg-fimbria** (fimbrial gene cluster of *Salmonella enterica* serovar Typhi) ja sitä koodittava *stg*-geeni = kiinnittymistekijä, ei varsinainen virulenssigeeni, spesifinen fylogeniaryhmille B1 ja D (Lymeropoulos ym. 2006)

**svg** (ORF specific for virulent subgroup) = DNA-fragmentti, jota käytetään fylogenia-PCR:ssä tunnistamaan erityisen virulentti B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmä (Bidet ym. 2007)

**Tia-invasiini** (toxigenic invasion determinant) ja sitä koodittava *tia*-geeni = adhesiini ja invaasioproteiini (Mammarappallil & Elsinghorst 2000)

**TraT** ja sitä koodittava *traT*-geeni = seerumiresistenssiin liittyvä kalvoproteiini bakteerin ulkokalvolla (Moll ym. 1980)



**Tsh** (temperature sensitive hemagglutinin) ja sitä koodittava *tsh*-geeni = **Hbp** (hemoglobiinin proteaasi) ja sitä koodittava *hbp*-geeni = proteiini, joka toimii kiinnittymiskantajana, ja proteinaasientsyyminä (Provence & Curtiss 1994; Otto ym. 1998)

**TSPE4.C2** = DNA-fragmentti, jota käytetään *E. coli* -bakteerin fylogeneettisen ryhmän määrittämiseen fylogenia-PCR:ssä (Clermont ym. 2000)

**Vat-toksiini** (vacuolating autotransporter toxin) ja sitä koodittava *vat*-geeni = autotransportteriproteiini, joka käynnistää sytotoksisten vakuolien muodostumisen solun sisään (Parreira & Gyles 2003)

*yjaA* = *E. coli* K-12 genomista identifioitu geeni, jonka toimintaa ei toistaiseksi tunneta, käytetään fylogenia-PCR:ssä fylogeniaryhmän määrittämiseen (Clermont ym. 2000)

**Yersiniabaktiini**, jota koodittaa *fyuA-irp*-geeniklusteri = sidefori, jota ilmennetään rautaköyhässä ympäristössä (Schubert ym. 1998)

## SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	2
ABSTRACT.....	3
ESIPUHE.....	4
LYHENNELUETTELO.....	5
SISÄLLYSLUETTELO.....	10
1. JOHDANTO.....	12
2. TEORIATAUSTA	
2.1 ExPEC-bakteerit.....	14
2.2 APEC-bakteerit.....	15
2.3 APEC-bakteerien serotyypitys.....	17
2.4 APEC-bakteerien virulenssitekijät.....	18
2.4.1 Kolisiini V -plasmidi.....	19
2.4.2 Kiinnittymistekijät.....	20
2.4.3 ibeA-invasiini.....	21
2.4.4 Seerumiresistenssi.....	22
2.4.5 K1-kapseli.....	22
2.4.6 Raudansitomistekijät.....	23
2.4.7 Toksiinit.....	24
2.4.8 Autotransporteriproteiinit.....	24
2.5 ECOR-kantakokoelma ja fylogeniaryhmät.....	25
2.6 Ihmisen ExPEC-bakteerien ja APEC-bakteerien yhtäläisyydet.....	26
2.7 ExPEC-bakteerit elintarvikkeissa.....	29
2.8 Pulssikenttägeelielektroforeesi genotyypitysmenetelmänä.....	30
2.9 APEC-bakteerien epidemiologia.....	32
2.10 Siipikarjantuotanto Suomessa.....	33

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	35
4. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	36
4.1 <i>Escherichia coli</i> -bakteerikannat.....	36
4.2 PCR-tutkimukset.....	37
4.2.1 Fylogenia-PCR.....	38
4.2.2 APEC MP 8 -PCR.....	40
4.2.3 K1-PCR.....	42
4.2.4 ibeA-PCR.....	43
4.3 Pulssikenttägeelelektroforeesi.....	44
4.4 Tulosten tilastollinen käsittely.....	46
5. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....	47
5.1 Fylogeniaryhmät.....	47
5.2 Virulenssitekijät.....	48
5.3 PFGE.....	52
6. POHDINTA.....	55
LÄHDELUETTELO.....	60

## 1. JOHDANTO

*Escherichia coli* -bakteerit ovat yleisiä ympäristön ja suoliston fakultatiivisesti anaerobeja gram-negatiivisia enterobakteereita (Russo & Johnson 2000 Smithin ym. 2007 mukaan). *E. coli* -bakteerit jaetaan kolmeen ryhmään sen mukaisesti, mikä on niiden merkitys ihmiselle: kommensaaleihin, patogeeneisiin intestinaalisiin (enteeriset ja ripulia aiheuttavat) ja patogeeneisiin ekstraintestinaaleihin kantoihin (ExPEC, extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*). Suurin osa ulosteiden *E. coli* -bakteereista on kommensaaleja kantoja, jotka eivät yleensä aiheuta tautia (Neil ym.1994; Russo & Johnson 2003 Smithin ym. 2007 mukaan). Kommensaalit kannat voivat aiheuttaa taudin immuniteetiltään heikoille isännille (Picard ym.1999; Russo & Johnson 2003 Smithin ym. 2007 mukaan). Patogeeniset intestinaaliset kannat aiheuttavat lähes aina ruoansulatuskanavan tulehduksen isännässään. Suolistoinfektioita ja ripulia aiheuttaviin kantoihin kuuluvat enterotoksiset (ETEC), enterohemorragiset (EHEC), enteroinvasiiviset (EIEC), enteropatogeeniset (EPEC), enteroaggregatiiviset (EAEC), diffuse-adherent- (DAEC) ja cell-detaching (CDEC) -patotyypit (Fratamico & Smith 2006; Guerrant & Thielman 1995 ja Nataro & Kaper 1998 Smithin ym. 2007 mukaan, Siitonen & Vaara 2004). Ekstraintestinaaliset kannat eivät aiheuta tautia ruoansulatuskanavassa, vaikka ne voivatkin kommensalisoida suoliston (Johnson & Russo 2002; Russo & Johnson 2000, 2003, Smithin ym. 2007 mukaan). Sen sijaan ne voivat aiheuttaa tulehduksen ruoansulatuselimistön ulkopuolella.

APEC-bakteerit (avian pathogenic *Escherichia coli*) ovat linnuille tautia aiheuttavia ekstraintestinaalisia *E. coli* -bakteereita. Ne aiheuttavat siipikarjatiloiilla kolibasilloosia, joka on yhteisnimitys erilaisille kolibakteerin aiheuttamille taudeille. *E. coli* -bakteerin aiheuttamat infektiot ovat yksi merkittävistä siipikarjan kuolleisuutta ja tuotantotappioita aiheuttavista tekijöistä Suomessa (Perko-Mäkelä ym. 2005). Ne ovat myös yleisimpiä syitä antibioottien käytölle siipikarjan tuotannossa. Suomessa siipikarjan tuotantorakenne on pyramidimainen (Schild 2004). Kaikki broileriemot ovat Skotlannista tuotujen isovanhempien jälkeläisiä, ja tuotantopolven linnut ovat näiden broileriemojen jälkeläisiä. Kalkkunoilla vanhempaispolven maahantuojia on kolme. Pyramidimaisen tuotantorakenteen vuoksi ongelmat vanhempaispolvissa

leviävät nopeasti myös tuotantopolviin (Perko-Mäkelä ym. 2005). Toisaalta tämän vuoksi ongelmia voitaisiin myös kontrolloida helpommin.

APEC-kantojen on arveltu toimivan vaarallisten tautigeenien reservinä ihmisen ekstraintestinaalisille koleille (Ewers ym. 2007) ja siksi ne ovat erityisesti elintarvikeketjuun päätyessään mahdollinen zoonoottinen uhka. Ihmiselle patogeenisia ekstraintestinaalisia *E. coli* -bakteereita ovat muun muassa virtsatietulehduksia aiheuttavat UPEC (uropathogenic *Escherichia coli*) -bakteerit ja vastasyntyneille aivokalvontulehdusta aiheuttavat NMEC (neonatal meningitis-causing *Escherichia coli*) -bakteerit (Vaara ym. 1996). APEC-bakteereilla ja ihmisen ExPEC-bakteereilta on löydetty paljon yhtäläisyyksiä (Johnson ym. 2007; Moulin-Schouleur 2007) ja bakteerien on todettu infektoivan eri lajien isäntiä (Johnson ym. 2003). Siipikarjanlihaelintarvikkeiden on todettu sisältävän yleisesti lintujen ulosteista peräisin olevia *E. coli* -bakteereja (van den Bogaard ym. 2001; Töyrylä 2006). Nämä bakteerit voivat esimerkiksi ruoanlaiton yhteydessä kontaminoida leikkuupintoja keittiössä ja siirtyä ihmiseen (Johnson ym. 2003).

Tässä tutkimuksessa selvitettiin suomalaisesta siipikarjasta kerättyjen *Escherichia coli* -bakteerien virulenssitekijöitä, sekä kantojen jakaantumista fylogeneettisiin ryhmiin. Lisäksi selvitettiin kantojen epidemiologiaa tyypittämällä niitä pulssikenttägeelielektroforeesin avulla.

## 2. TEORIATAUSTA

### 2.1 ExPEC-bakteerit

Tautia aiheuttavat *Escherichia coli* -bakteerit jaotellaan niiden taudinaiheutuskyvyn mukaisesti kahteen ryhmään: enteeriisiin ja ekstraintestinaalisiin *E. coli* -bakteereihin (Smith ym. 2007). Enteeriset *E. coli* -bakteerit aiheuttavat tulehduksia ruoansulatuselimistössä ja ekstraintestinaaliset *E. coli* -bakteerit sen ulkopuolella, kuten virtsateissä, vatsakalvolla tai keuhkoissa. ExPEC-kannat eroavat suoliston normaaliflooran ja ruoansulatuselimistön tulehduksia aiheuttavista *E. coli* -kannoista geneettisesti (Sorsa 2007). Niillä on erilaisia virulenssitekijöitä, jotka mahdollistavat niiden sopeutumisen ympäristöönsä. ExPEC-kannoilla virulenssitekijöitä ovat muun muassa erilaisten toksiinien tuottaminen, ympäristön raudan sitomiskyky erilaisin systeemein, sekä elimet, jotka mahdollistavat bakteerien kiinnittymisen erilaisiin pintoihin ja soluihin. APEC-bakteerit kuuluvat pääasiassa ekstraintestinaalisiin kolibakteereihin.

ExPEC-bakteerit aiheuttavat tautia ihmisille, tuotantoeläimille ja kotieläimille, minkä vuoksi niistä koituu suuria kustannuksia (Smith ym. 2007). Tavallisin *E. coli* -bakteerin ihmiselle aiheuttama infektio on UPEC-bakteerien aiheuttama virtsatieinfektio (Vaara ym. 1996). Vastasyntyneille ExPEC:t voivat aiheuttaa vakavan septisen yleisinfektion, mihin liittyy aivokalvontulehdus. Russon & Johnsonin mukaan (2003) ekstraintestinaalisilla *E. coli* -bakteereilla on merkittäviä taloudellisia vaikutuksia terveydenhuollossa ja ne aiheuttavat myös kuolemia erityisesti immuniteetiltaan heikommille henkilöille, kuten lapsille ja vanhuksille. ExPEC-bakteerit liittyvät erityisesti erilaisiin virtsatie- ja munuaistulehduksiin, keuhkokuumeeseen, leikkausinfektioihin ja verenmyrkytyksiin. Antibioottiresistenttien kantojen lisääntyessä *E. coli* -bakteerin aiheuttamien infektioiden merkityksen arvellaan edelleen kasvavan.

## 2.2 APEC-bakteerit

Linnuille tautia aiheuttavat *E. coli* -bakteerit on luokiteltu avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) -bakteereiksi (Dho-Moulin & Fairbrother 1999). APEC-bakteerit aiheuttavat linnuille ja siipikarjalle pääasiassa ruoansulatuskanavan ulkopuolisia (extraintestinal) tulehduksia, kuten hengityselinten tulehduksia, sydänpussintulehdusta ja perihepatiittia. Merkittävin APEC-bakteerien aiheuttamista sairauksista on hengitysteistä alkava tulehdus, joka voi johtaa ilmapussintulehdukseen (aerosacculitis) tai ilmapussitautiin (the air sac disease) ja levitä tästä muihin kudoksiin. Täysikasvuisilla linnuilla APEC-bakteerit voivat aiheuttaa akuutteja verenmyrkytyksiä, sydänlihastulehdusta, vatsakalvontulehdusta ja niihin liittyviä leesioita (elimen rakenteen tai toiminnan sairaalloinen muutos, vaurio) sekä maksavaurioita. Munivilla linnuilla APEC-bakteerit voivat infektoida munatorven, joka voi johtaa munanjohtimentulehdukseen (salpingitis) ja munintakyvyn menetykseen. Munatorvesta alkanut tulehdus voi myös levitä vatsakalvoon ja aiheuttaa kuoleman. APEC-bakteerit voivat aiheuttaa siipikarjalle *swollen head* -syndroomaa eli ylempien hengitysteiden tulehdusta TRT (turkey rhinotracheitis) -virusinfektion yhteydessä. APEC-bakteerien on todettu liittyvän myös selluliittiin eli ihonalaiskudoksen tulehdukseen ja nekroottiseen ihotulehdukseen alavatsan ja reisien alueella, mikä johtaa siipikarjatuotannossa ruhon hylkäämiseen ja aiheuttaa näin taloudellisia menetyksiä. *E. coli* -bakteerin siipikarjalle aiheuttamia infektioitauteja on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Siipikarjan koli-infektiot (Shane 2001a,b, Suomen Siipikarjaliitto ry 2007)

Tauti	Altistavat tekijät	Muuta
Ilmapussintulehdus	virukset ja mykoplasmat immunosuppressio huono ilmanlaatu korkea ammoniakkipitoisuus	kasvatuskauden kahdella viimeisellä kolmanneksella
Systeeminen kolibasilloosi	patogeenisten kolien esiintyminen pehkussa ja juomavedessä immunosuppressio virustaudit	aiheuttaa äkkikuolemia 2-3 viikon ikäisillä untuvikoilla kuolleisuus voi olla 20 %
Selluliitti	ihovauriot immunosuppressio kasvatustilojen ahtaus vähähöyheniset kannat	ihonalaistulehdus vatsan ja reisien alueella johtaa teurasruhon hylkäykseen
Swollen head -syndrooma	pneumovirus ilmasto, jossa lämpötila vaihtelee ja ilmankosteus on alhainen	ihonalainen tulehdus ja nesteen kertyminen pään alueelle nielemisvaikeudet
Salpingiitti ja peritoniitti	lattiakasvatus linnun leukoosivirus	nouseva infektio yhteissuolesta munanjohtimeen ja edelleen vatsakalvolle munivilla yksilöillä
Omphaliitti ja alentunut kuoriutumisen	munan kuoren kontaminoituminen patogeeneilla bakteereilla	johtaa alkion kuolemaan tai hengissä kuoriutuvilla navan ja ruskuaispussin tulehdukseen seurauksena ns. non-starter eli linnut eivät juo eivätkä syö, ja kuolevat 3-5 pv:n ikäisinä
Koligranulooma	alentunut hygienia lattiakasvatus	aikuisilla linnuilla aiheuttaa infektiopesäkkeitä (granuloomia) varsinkin maksaan ja suoleen



Suomessa lihasiipikarjan tuotannossa tärkeimpiä *E. coli* -bakteerin aiheuttavia tauteja ovat alentunut kuoriutumisen ja non-starter, systeeminen kolibasilloosi ja joissakin tuotantolaitoksissa selluliitti (ELL Tarja Pohjanvirta, suullinen tiedonanto). Emoja hoidetaan antibiooteilla, tuotantopolven lintuja ei hoideta.

Ulostteet ja pöly ovat suurin patogeenisten *E. coli* -bakteerien lähde siipikarjakasvattamoissa, myös saastunut juomavesi on potentiaalinen tartuntalähde (Gross 1994). Koliformiset bakteerit selviytyvät erityisesti kuivalla (kosteus 5-10 %) alustalla. Ympäristöstä johtuva stressi lisää siipikarjalla hengitysinfektioiden määrää. Usein *E. coli* -bakteeri liittyy sekundaarisiin infektioihin muiden bakteeri- tai virusinfektioiden yhteydessä (Shane 2001a).

APEC-bakteereita on karakterisoitu määrittämällä niiden seroryhmiä ja virulenssitekijöitä, tarkastelemalla biokemiallisia ominaisuuksia ja geneettistä samankaltaisuutta sekä testaamalla eläinkokein APEC-bakteerien patogeenisuutta.

### 2.3 APEC-bakteerien serotyypitys

*E. coli* -kannat serotyypitetään O-, K- ja H-antigeenien mukaan (Vaara ym. 1996). Serotyyppi ilmaistaan jokaisen antigeenin osalta erikseen, esimerkiksi O1:K1:H7. Erilaisia O-antigeneja tunnetaan 173, H-antigeneja 56 ja K-antigeneja 80 (Orskov & Orskov 1992). O-antigeeni eli O-polysakkaridi on yksi bakteerin ulkopinnan lipopolysakkarideista. Suurin osa APEC-bakteereista kuuluu O-seroryhmiin O1, O2 ja O78 (Dho-Moulin & Fairbrother 1999). Melko yleisiä seroryhmätyyppejä APEC-bakteereille ovat myös O8, O15, O18, O35, O88, O109 ja O115. Nämä eivät ole yleisiä seroryhmiä terveiden lintujen *E. coli* -bakteereilla. Suuri osa APEC-kannoista ei kuitenkaan kuulu mihinkään tavallisimmista O-seroryhmistä, ja niitä kutsutaan tyypittymättömiksi (Gross 1994). Useimmilla invasiivisia infektioita aiheuttavilla kolikannoilla on K-antigeeni eli polysakkaridikapseli (Vaara ym. 1996). Useimmat kolibakteerit ilmentävät myös liikkumisen mahdollistavaa flagellaa eli H-antigeenia.

## 2.4 APEC-bakteerien virulenssitekijät

Virulenssitekijä on ominaisuus, joka lisää bakteerin taudinaiheuttamiskykyä eli virulenssia. Mikään tunnettu virulenssitekijä ei yksin mahdollista taudinaiheutuskykyä, mutta lisääntynyt virulenssitekijöiden määrä lisää bakteerin patogeenisuutta. APEC-bakteerien virulenssitekijöitä ovat muun muassa tartuntakyky hengitysteiden epiteelisoluihin, vastustuskyky elimistön immuunipuolustukselle, jakaantumiskyky solunesteissä missä rautapitoisuus on alhainen, ja toksiinien tuotanto (Dho-Moulin & Fairbrother 1999). Virulenssi profiilit vaihtelevat saman lajin bakteereilla, mistä johtuen puhutaan erilaisista virotyypeistä. Jotkut virulenssitekijät liittyvät oleellisesti bakteerikannan pinta-antigeeneihin ja ovat serotyypispesifisiä (Vaara 1996).

Suurin osa virulenssiominaisuuksista sijaitsee kromosomaalisessa DNA:ssa (Vaara 1996). Monet tärkeät taudinaiheutuskykyä parantavat geenit sijaitsevat kuitenkin niin sanotuissa liikkuvissa geneettisissä elementeissä, kuten plasmideissa, patogeenisuusaarekkeissa (PAI, pathogenicity island) ja transposoneissa (Sorsa 2007). Patogeenisuusaarekkeiksi kutsutaan alueita kromosomaalisessa DNA:ssa, joissa sijaitsee lähemmäksi useita virulenssigeenejä (Schmidt & Hensel 2004). Patogeeniset bakteerit voivat siirtää konjugaatiossa virulenssiominaisuuksiaan plasmidien välityksellä muihin bakteereihin. Tämä mahdollistaa bakteerien nopean sopeutumisen erilaisiin ympäristöihin.

Monet APEC-bakteerien virulenssitekijöistä sijaitsevat suurissa plasmideissa (Doetkott ym. 1996; Ike ym. 1992 Tivendalen ym. 2004 mukaan). Tällaisia plasmideja ovat muun muassa pVM01-plasmidi (Ginns 2000) ja kolisiini V -plasmidit (ColV), (Waters & Crosa 1991). APEC-bakteereille tyypillinen ColV-plasmidi on esimerkiksi Johnsonin ym (2004) karakterisoima pTJ100-plasmidi. Muun muassa APEC-O2-ColV-plasmidin on arveltu siirtäneen virulenssitekijöitä ihmiselle virtsatieinfektioita aiheuttaviin UPEC-kantoihin (Skyberg ym. 2006). Joidenkin virulenssigeenien on todettu sijaitsevan sekä kromosomaalisessa DNA:ssa, että plasmideissa (Johnson ym. 2006). APEC-bakteerien virulenssitekijöitä on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. APEC-bakteerien virulenssitekijöitä

Virulenssitekijä	Merkitys patogeenisissä	Geenit ja sijainti (kromosomissa / plasmidissa)
<u>Kiinnittymistekijät</u> F1, P, AC/1, curli, Tsh	Kiinnittyminen eukaryoottisolujen glykoreseptoreihin	<i>fim</i> -geenit (kromosomissa) <i>pap</i> -geenit (kromosomissa) <i>fac</i> -geenit (kromosomissa) <i>crl</i> -geeni (kromosomissa) <i>tsh</i> -geeni (plasmidissa)
<u>Invasiini</u>  ibeA	Edistää bakteerin pääsyä verenkiertoon ja aivojen mikrovaskulaarisiin endoteelisoluihin	<i>ibeA</i> -geeni (kromosomissa)
<u>Protektiinit</u>  K1, ompA, TraT, Iss	Immuuni-puolustukselta suojautuminen	<i>kps</i> - ja <i>neu</i> -geenit (kromosomissa) <i>ompA</i> -geeni (kromosomissa ja plasmidissa) <i>TraT</i> -geeni (plasmidissa) <i>Iss</i> -geeni (plasmidissa)
<u>Raudan sitomistekijät</u>  aerobaktiini, yersiniabaktiini	Raudan kelatointi rautaköyhässä ympäristössä	<i>iuc</i> -geenit (kromosomissa ja plasmidissa) <i>irp</i> -geenit (kromosomissa)
<u>Toksiinit</u>  vat, EAST 1	Toksiset vaikutukset eukaryoottisoluille	<i>vat</i> -geeni (kromosomissa) <i>astA</i> -geeni (plasmidissa)

#### 2.4.1 Kolisiini V -plasmidi

Kolisiini V (ColV) -plasmidit ovat suuria plasmideja, joissa koodataan kolisiini V -proteiinin geenejä (Waters & Crosa 1991). Kolisiinit ovat ekstrasellulaarisia antibioottisia *E. coli* -bakteerien erittämiä proteiineja, joilla ne tappavat muita saman tai läheisten lajin kantoja (Pattus ym. 1990). Kolisiini V on proteiini, jota on löydetty ainoastaan eläimille ja ihmisille virulenteista *E. coli* -kannoista (Waters & Crosa 1991). Kolisiini V -plasmidit on liitetty patogeenisuuteen,

sillä niistä on löydetty useita virulenssigeenejä, muun muassa aerobaktiini-raudansitomissysteemin geenejä, lisääntyneeseen seerumiresistenssiin liittyvä *iss*-geeni, fagosytoosiresistenssigeenejä ja erilaisia kiinnittymistekijöitä. Kolisiini V -plasmidit ovat kuitenkin kooltaan (80 - 180 kb) ja genomiltaan erilaisia plasmideja, joiden yhteisenä piirteenä on vain kolisiini V -proteiinin ilmentäminen.

#### 2.4.2 Kiinnittymistekijät

*E. coli* -bakteereilla on monenlaisia fimbrioita ja adhesiineja, joiden avulla ne kiinnittyvät erilaisiin pintoihin ja kudoksiin (Siitonen & Vaara 2004). Kiinnittyminen mahdollistaa bakteerin kolonisaation. Jotkin kiinnittymistekijät ovat lähes kaikilla *E. coli* -kannoilla, kuten tyypin 1 fimbriat (F1-fimbria). Joidenkin kiinnittymistekijöiden on todettu liittyvän lisääntyneeseen patogeenisuuteen. Tärkeimmät APEC-bakteereilta tunnistetut kiinnittymistekijät ovat F1-, P- eli Pap-fimbriat (pyelonephritis-associated pili, pyelonephritis = munuaistulehdus) ja AC/I (avian *E. coli* I) -fimbriat (Vidotto ym. 1997; Babai ym. 2000; Maurer ym. 1998 Delicaton ym. mukaan 2003). Muita APEC-bakteereista tunnistettuja kiinnittymistekijöitä ovat *curli*-kiinnittymistekijä (*curli fibre*), *thin aggregative surface fibre* -kiinnittymistekijä, tsh (temperature-sensitive hemagglutinin) -kiinnittymistekijä (Vidotto ym. 1997; Babai ym. 2000; Maurer ym. 1998 Delicaton ym. mukaan 2003) ja Stg-fimbria (fimbrial gene cluster of *Salmonella enterica* serovar Typhi) (LyMBERopoulos ym. 2006).

Eri kiinnittymistekijät tunnistavat erilaisia molekyyylejä, joihin ne kiinnittyvät (Ott ym. 1988). Nämä ovat usein erilaisia glykoreseptoreja. Esimerkiksi P-fimbria tunnistaa  $\alpha$ -D-galaktosyyli-(1-4)- $\beta$ -D-galaktosireseptorin, F1-fimbria tunnistaa  $\alpha$ -D-mannoosia sisältävät reseptorit ja S-fimbria  $\alpha$ -sialyyli-(2-3)- $\beta$ -D-galaktosia sisältävät reseptorit. Joidenkin kiinnittymistekijöiden on todettu olevan isäntäspesifisiä, eli bakteeri voi kiinnittyä adhesiin avulla vain tietyn isäntälajin soluihin (Ron 2006). Joitakin adhesiineja on löydetty eri isäntälajeja infektoivista kannoista, esimerkiksi P-fimbriaa tuottavat APEC-kantojen lisäksi UPEC- ja NMEC-kannat.

Joillakin *E. coli* -kannoilla on useita kiinnittymistekijöitä, joita ilmennetään eri vaiheissa infektiota (Pourbakhsh ym. 1997). Esimerkiksi F1- ja P-fimbrioita on löydetty samoista UPEC-kannoista, mutta niiden on todettu ilmentyvän aina eri aikaan PapB-proteiinin inhiboidessa F1-fimbriageenien ekspressiota. P-fimbriat ovat kiinnittymistekijöitä, joiden avulla *E. coli* -bakteerit voivat tarttua tietynlaisiin glykolipideihin (globotetrasyylikeramidi, triheksosyylikeramidi), joita on erityisesti virtsatie-epiteelissä (Siitonen & Vaara 2004). F1-fimbrioiden on todettu liittyvän siipikarjalla hengitystieinfektioiden alkuvaiheeseen (Dozois ym. 1994) ja P-fimbrioiden on arveltu liittyvän infektion myöhempisiin vaiheisiin, sillä niiden on todettu ilmentyvän ilmapusseissa ja muissa sisäelimissä, mutta ei henkitorvessa (Pourbakhsh ym. 1997). Tsh (temperature sensitive hemagglutinin) -adhesiinilla on todettu olevan merkitystä erityisesti kolonisaation alkuvaiheissa hengitystie-infektioissa (Dozois ym. 2000; Altekruuse ym. 2002). *Tsh*-geenin on osoitettu esiintyvän merkittävästi APEC-kannoissa, mutta ei terveistä linnuista eristetyissä *E. coli* -kannoissa, mikä viittaa *tsh*-geenin virulenssiominaisuuksiin siipikarjan *E. coli* -bakteereilla.

AC/I-fimbria, joka kuuluu S-fimbrioihin, kiinnittyy lintujen epiteelikudokseen (Babai ym. 1997 ja Yerushalmi ym. 1990 LyMBERopoulos ym. 2006 mukaan). Tätä kiinnittymistekijää on löydetty seroryhmän O78 APEC-kannoista, kuten myös Stg-fimbriaa, joka on liitetty vähemmän patogeenisiin APEC-kantoihin (LyMBERopoulos ym. 2006).

#### 2.4.3 IbeA-invasiini

Invasiinit ovat proteiineja, jotka auttavat bakteeria tunkeutumisessa solun sisään (Vaara 1996). IbeA-proteiinia koodaavaa *ibeA*-geeniä on löydetty 33–44 % ihmisen vastasyntyneille aivokalvontulehdusta aiheuttavista NMEC-kannoista (Johnson ym. 2001b Vidotton ym. 2001 mukaan). Germon ym. (2005) ja Vidotto ym. (2007) ovat osoittaneet, että *ibeA*-geeniä löytyy APEC-kannoista, kun taas terveiden lintujen *E. coli* -kannoissa se on harvinainen. *IbeA*-geeni löytyi 26 % Germonin ym. (2005) tutkimissa APEC-kannoista, 4 % Vidotton ym. tutkimissa

Brasilialaisissa APEC-kannoista ja 3 % *E. coli* -referenssikantakokoelman kannoista, mikä sisältää *E. coli* -kantoja eri lähteistä (Johnson ym 2001). IbeA-proteiinin toimintaa ei vielä tarkkaan tunneta, mutta sen tiedetään edistävän bakteerin pääsyä verenkiertoon (Germon ym. 2005) ja aivojen mikrovaskulaarisiin endoteelisoluihin (Huang ym. 2001) ligandi-reseptori vuorovaikutuksen kautta (Vidotto ym. 2007).

#### 2.4.4 Seerumiresistenssi

Seerumiresistenssi auttaa bakteereja selviytymään elossa seerumissa, mikä sisältää runsaasti erilaisia vasta-aineita. Seerumiresistenssiä aiheuttavat bakteerin ulkopinnan lipopolysakkaridit (LPS) ja kalvoproteiinit (outer membrane proteins, OMPs) (Ellis ym 1988; Montenegro ym. 1985 La Ragione & Woodward 2002 mukaan), jotka voivat hämätä isäntäorganismien immunitettia ja estää komplementtikaskadin aktivoitumisen (Vaara 1996). Mellatan ym. (2002) mukaan seerumiresistenssi syntyy monien eri proteiineja tuottavien geenien toiminnasta. Tällaisia proteiineja ovat ainakin K1-antigeeni, OmpA ja ColV-plasmidissa koodattavat TraT ja Iss (increased serum survival).

Solun ulkokalvon Iss-proteiinia koodaavan *iss*-geenin on oletettu liittyvän kasvaneeseen seerumiresistenssiin (Gross 1994 Mellatan ym. 2002 mukaan), mutta Mellata ym. (2002) ovat kyseenalaistaneet tämän. Joka tapauksessa *iss*-geenin on todettu liittyvän kasvaneeseen virulenttiuteen APEC -kannoilla (Pfaff-McDonough ym. 2000; Altekruuse ym. 2002).

#### 2.4.5 K1-kapseli

K1 (kapseliantigeeni 1) -kapseli on virulenssiominaisuus, mikä auttaa *E. coli* -bakteeria suojautumaan ympäristöltä (Siitonen & Vaara 2004). K1-antigeenin omaavat kannat erittävät ympärilleen hapanta N-asetyylineuramiinipolysakkaridia (siaalihappo), mistä rakentuu bakteeria

fagocytoosilta ja muilta isännän immuunipuolustuksen hyökkäyksiltä suojaava kapseli. K1-kapselin on arveltu liittyvän myös seerumiresistenssiin (Stawski ym. 1990 La Ragione & Woodward 2002 mukaan). Monilla invasiivisia infektoita aiheuttavilla kolikannoilla on K-antigeeni, suolistoinfektioita aiheuttavilta kolikannoilta se useimmiten puuttuu (Siitonen & Vaara 2004). K1-kapselilla on todettu olevan yhteys vastasyntyneiden aivokalvontulehdukseen (Xie ym. 2004). Yli puolessa neonataalimeningiittitapauksista on aiheuttajana *E. coli*, jonka kapselityyppi on K1 (Siitonen & Vaara 2004).

#### 2.4.6 Raudansitomistekijät

Bakteerit vaativat lisääntyäkseen tietyn vapaan raudan pitoisuuden (n.  $10^{-6}$  mol/l) elinympäristössään (Dho-Moulin & Fairbrother 1999). Koska eläinten fysiologisissa nesteissä rautapitoisuus on alhainen (n.  $10^{-18}$  mol/l), ovat useat patogeeniset bakteerit kehittäneet itselleen raudansitomissysteemin, jolla he voivat kilpailla vapaista ferri-ioneista isäntäsolun kanssa ja tyydyttää raudantarpeensa.

*E. coli* -bakteerit sitovat rautaa erittämällä ympäristöönsä pienimolekyylisiä raudansitojayhdisteitä (enterobaktiinit), joilla on suuri affiniteetti rautaan (Vaara ym. 2005). Ulkomembraanissa sijaitsevat proteiinit sitovat puolestaan rauta-enterobaktiini-kompleksin ja rauta kuljetetaan aktiivisesti bakteerisolun sisään.

Useamman tutkimuksen mukaan enemmistöllä APEC-kannoista on aerobaktiinivälitteinen raudanhankintakyky, kun taas kommensaalit kannat tuottavat aerobaktiinia harvemmin (Dozois ym. 1992; Emery ym. 1992; Linggood ym. 1987 Dho-Moulin & Fairbrotherin 1999 mukaan). Aerobaktiinin operonigeenit (*iuc*-geenit) sijaitsevat kolisiini V -plasmideissa (Williams 1979), mutta myös kromosomaalisten geenien on arveltu osallistuvan raudan kuljetukseen soluihin. Irp (iron-repressible protein) -proteiinit liittyvät yersiniabaktiini-sideforin syntetaasiin (Shubert ym. 1998). Ne on liitetty myös kasvaneeseen virulenssiin (Kawano ym. 2006).

#### 2.4.7 Toksiinit

Toksiinien erittäminen ei vaikuta olevan merkittävä virulenssiominaisuus APEC-bakteereilla, toisin kuin intestinaalisia tulehduksia aiheuttavilla *E. coli* -bakteereilla. Blancon ym. (1997) tutkimuksessa 7 % testatuista APEC-bakteereista muodosti toksiineja. APEC-bakteerien on todettu erittävän vain muutamaa erilaista toksiinia. Truscott (1973) raportoi APEC-serotyypin O2, O45 ja O109 erittävän kananpoikia tappavaa eksotoksiinia (chicken lethal exotoxin), Salvadori ym. (2001) osoittivat APEC-bakteerien erittävän sytotoksista vat-toksiinia. Vat-toksiinin on osoitettu liittyvän ekstraintestinaalisten APEC-kantojen patogeenisuuteen (Parreira & Gyles 2003).

*AstA*-geenin koodaama EAST1-toksiini (enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable toxin 1) on liitetty ihmiselle ripulia aiheuttaviin kolikantoihin (Veilleux & Dubreuil 2005). *AstA*-geeniä on löydetty EAEC-, EHEC-, ETEC-, DAEC- ja EPEC-kannoista, sekä muun muassa Salmonella-bakteereista. Se on liittynyt myös *E. coli* -bakteerin aiheuttamiin ripuliepidemioihin muun muassa Japanissa, Espanjassa, Yhdysvalloissa ja Suomessa.

#### 2.4.8 Autotransporteriproteiinit

Autotransporterit ovat gram-negatiivisten bakteerien itsenäisesti erittyviä proteiineja, jotka ilmentävät erilaisia virulenssiin liittyviä toimintoja (Dozois ym. 2000). Autotransporteriproteiinit voivat olla esimerkiksi kiinnittymistekijöitä, proteaaseja, sytotoksiineja tai invaasioproteiineja. Suurin osa autotransporteriproteiineja koodaavista geneistä sijaitsee plasmideissa.

APEC-bakteerien erittämä autotransporteriproteiini on Tsh-proteiini, joka toimii paitsi kiinnittymistekijänä, myös hemoglobiinia pilkkovana proteinaasina. Tässä merkityksessä Tsh-proteiinista käytetään nimitystä Hbp (hemoglobin protease) (Otto ym. 1998). Hbp-proteiinin on arveltu hajottavan jotain spesifistä substraattia ilmapussisolujen infektiossa (Dozois ym. 2000).



## 2.5 ECOR-kantakokoelma ja fylogeniaryhmät

Ochman ja Selander julkaisivat vuonna 1984 kantakokoelman *E. coli* -bakteereista, joka sisälsi 72 erilaista multilokusentsyymielektroforeesin (MLEE, multilocus enzyme electrophoresis), patogeenisuuden, isäntäorganismien ja maantieteellisen sijainnin perusteella jaoteltua kantaa (Ochman & Selander 1984). Kantakokoelman oli tarkoitus tarjota tutkijoille edustava kokoelma erilaisista *E. coli* -genotyypeistä. Kantakokoelmaa on myöhemmin kutsuttu ECOR (The *Escherichia coli* Reference Collection) -kantakokoelmaksi. Kantakokoelma ei sisällä linnuista eristettyjä kantoja.

Goulet ja Picard (1989) jaottelivat Ochmanin ja Selanderin (1984) referenssikantakokoelman kuuteen fylogeniaryhmään (A, B1, B2, C, D ja E) niiden esteraasien ja muiden entsyymien elektroforeettisen monimuotoisuuden perusteella. Myöhemmät tutkimukset ovat osoittaneet, että tärkeimmät fylogeniaryhmät ovat A, B1, B2 ja D ja että tautia aiheuttavat ekstraintestinaaliset *E. coli* -bakteerit kuuluvat enimmäkseen ryhmään B2 ja jossain määrin ryhmään D (Clermont ym. 2000). Fylogeniaryhmästä B2 on erotettu ribotyypityksen perusteella edelleen alaryhmä B<sub>21</sub>, joka multilokussekvenssityypityksessä vastaa sekvenssityyppiä 29 (Bidet ym. 2007). Tämä B<sub>21</sub>/ST29-ryhmä on merkittävin ihmiselle tautia aiheuttava ekstraintestinaalikulien fylogeniaryhmä. Se sisältää muun muassa virtsatieinfektioita ja neonataalimeningiittiä aiheuttavia kantoja. Kommensaalit kannat, jotka eivät tavallisesti aiheuta tautia terveelle isännälle, on luokiteltu pääasiassa fylogeniaryhmiin A ja B1 (Picard ym. 1999; Russo & Johnson 2000 Smith ym. 2007 mukaan). Niissä on todettu esiintyvän myös vähemmän virulenssitekijöitä. Patogeeniset intestinaaliset kannat kuuluvat pääasiassa ryhmiin A, B1 ja D (Russo & Johnson 2000 Smith ym. 2007 mukaan).

Fylogeniaryhmän on todettu APEC-kannoilla liittyvän myös serotyyppiin. Moulin-Schouleur ym. (2007) tutkimuksessa serotyyppeihin O1, O2 ja O18 kuuluvat APEC-kannat kuuluivat pääasiassa fylogeniaryhmään B2, kun taas O78 seroryhmän APEC-kannat jakaantuivat fylogeniaryhmiin B1 ja D. B<sub>21</sub>/ST29-ryhmän kannat kuuluvat seroryhmiin O1, O2, O18 ja O45:K1 (Bidet ym. 2007).

## 2.6 Ihmisen ExPEC-bakteerien ja APEC-bakteerien yhtäläisyydet

Ihmisen ja lintujen ekstraintestinaalisten *Escherichia coli* -bakteerien väliltä on löydetty useita yhtäläisyyksiä (Smith ym. 2007). Tämän vuoksi on esitetty arveluja APEC-bakteerien mahdollisesta zoonoottisesta uhasta. APEC-bakteerit kuuluvat ekstraintestinaalisiin *E. coli* -bakteereihin, kuten ihmiselle tautia aiheuttavat UPEC- ja NMEC-bakteerit (Johnson ym. 2007). Näillä bakteereilla on yhteisiä seroryhmiä ja virulenssigeenejä ja tietyt kannat näyttävät olevan fylogeneettisesti hyvin lähellä toisiaan. Samojen *E. coli* -kantojen on myös useissa kokeellisissa tutkimuksissa todettu aiheuttavan tautia eri eläinlajeille eli ne eivät ole lajispesifisiä (Johnson ym. 2003).

Serotyypin O2 ja O78 *E. coli* -kantojen on todettu olevan vastuussa suurimmasta osasta APEC-kantojen siipikarjalle aiheuttamista taudeista (Ron 2006; Smith 2007) Näiden serotyypin on todettu liittyvän myös ihmisen verenmyrkytyksiin, virtsatieinfektioihin ja vastasyntyneiden aivokalvontulehdukseen (Ron 2006). Rodriguez-Siek ym (2005b) vertailivat APEC- ja UPEC-kantoja, ja totesivat seroryhmän O2 liittyvän molempiin kantoihin. Korhosen ym. (1985) tutkimuksessa APEC-bakteereille yleinen seroryhmä O18 liittyi vastasyntyneille aivokalvontulehdusta aiheuttaviin NMEC-kantoihin.

APEC-bakteereilta ja ihmisen ExPEC-bakteereilta on löydetty useita yhteisiä virulenssitekijöitä. Tällaisia ovat muun muassa raudansitomiskykyyn liittyvä aerobaktiini, F1-, P- ja S-fimbriat, fagosytoosilta suojaava K1-kapseli, ibeA-invasiini, autotransportteriproteiini Tsh, CDT (cytolethal distending toxin) -toksiini ja hemolysiini F (Moulin-Schouleur ym. 2007). Muun muassa Ewers ym. (2006) ja Rodriguez-Siek ym. (2005) ovat tutkineet virulenssigeenien esiintymistä ihmisen ExPEC-kannoissa ja APEC-kannoissa. Useat virulenssigeenit löytyvät niin APEC-, UPEC- kuin NMEC-kannoistakin (taulukot 3 ja 4.)

Taulukko 3. APEC-, UPEC- ja NMEC-kantojen yhteisiä virulenssigeenejä Ewers ym. (2006) mukaan

Geeni	Positiivisia %		
	APEC (n = 455)	UPEC (n = 66)	NMEC (n = 26)
<u>Kiinnittymistekijät</u>			
<i>afa</i>	1,3	6,1	3,8
<i>crl</i>	92,7	97,0	96,2
<i>fimC</i>	94,9	100,0	100,0
<i>hra</i>	23,5	53,0	30,8
<i>iha</i>	3,1	22,7	30,8
<i>papC</i>	24,6	50,0	65,4
<i>sfa</i>	8,8	50,0	26,9
<i>tsh</i>	54,9	4,5	11,5
<u>Raudansitomistekijät</u>			
<i>chuA</i>	50,3	81,8	96,2
<i>fyuA</i>	66,4	56,1	69,2
<i>ireA</i>	41,3	19,7	34,6
<i>iron</i>	83,7	72,7	69,2
<i>irp2</i>	68,8	81,8	96,2
<i>iucD</i>	79,3	33,3	65,4
<i>sitB</i> chromosomal	31,6	56,1	69,2
<i>sitB</i> episomal	73,2	21,2	42,3
<u>Protektiinit</u>			
<i>cva</i>	72,3	12,1	26,9
<i>iss</i>	84,0	25,8	57,7
<i>neuC</i>	29,5	9,1	92,3
<i>ompA</i>	99,1	92,4	100,0
<i>traT</i>	81,3	50,0	76,9
<u>Toksiinit</u>			
<i>EAST-1</i>	20,0	6,1	0
<i>cnf1/2</i>	0,9	31,8	23,1
<i>sat</i>	0,4	21,2	34,6
<i>vat</i>	39,8	54,5	50,0
<u>Invasiinit</u>			
<i>gimB</i>	23,7	9,1	61,5
<i>ibeA</i>	26,2	18,2	38,5
<i>tia</i>	23,7	31,8	46,2
<u>Muut</u>			
<i>malX</i>	39,6	65,2	73,1
<i>pic</i>	11,2	33,3	7,7

Taulukko 4. APEC- ja UPEC-kannoille yhteiset virulenssigeenit Rodriguez-Siek ym. (2005) mukaan

Geeni	Positiivisia %	
	APEC (n = 524)	UPEC (n = 200)
<u>Kiinnittymistekijät</u>		
<i>afa</i>	8,0	10,0
<i>bmaE</i>	0,4	2,0
<i>fimH</i>	98,1	99,0
<i>iha</i>	2,9	26,5
<i>papA</i>	7,4	49,5
<i>papC</i>	38,7	51,5
<i>papEF</i>	37,6	51,3
<i>papG</i> alleeli I	0,4	32,0
<i>papG</i> alleeli II	39,1	24,0
<i>papG</i> alleeli III	0,6	25,5
<i>sfa</i>	4,2	31,5
<i>sfaS</i>	3,6	26,0
<i>tsh</i>	63,2	39,5
<u>Raudansitomistekijät</u>		
<i>iucC</i>	77,7	39,0
<i>iutA</i>	80,2	33,5
<i>sitA</i>	86,5	85,5
<i>iroN</i>	86,6	40,0
<i>feoB</i>	99,4	99,0
<i>fyuA</i>	58,6	80,0
<i>ireA</i>	46,2	24,0
<i>irp2</i>	57,4	83,5
<u>Protektiinit</u>		
<i>kpsMT</i> K1	15,8	30,7
<i>kpsMT</i> II	24,8	77,5
<i>kpsMT</i> III	1,5	6,5
<i>rfc</i>	0,6	8,0
<i>cvaC</i>	66,8	7,5
<i>iss</i>	81,5	60,5
<i>traT</i>	77,7	70,5
<u>Toksiinit</u>		
<i>cdtB</i>	1,1	8,0
<i>cnf-1</i>	1,1	27,5
<i>hlyD</i>	0,8	31,0
<u>Muut</u>		
<i>fliC</i> (H7)	4,8	20,0
<i>ibeA</i>	14,7	30,0
<i>ompT</i>	70,0	83,5
<i>malX</i> (PAI)	16,6	74,5

Monien APEC-bakteerien ja ihmisen ExPEC-bakteerien yhteisten virulenssigeenien on todettu sijaitsevan suurissa plasmideissa (Ewers ym. 2007; Stehling ym. 2007). APEC-bakteerien onkin arveltu siirtävän virulenssigeenejä muihin bakteereihin erityisesti plasmidien välityksellä. Myös muun muassa antibioottiresistenssien on epäilty leviävän APEC-bakteerien välityksellä tällä tavoin (Johnson ym. 2003).

Suurin osa sekä linnuille että ihmisille patogeenisista ExPEC-kannoista kuuluu fylogeniaryhmään B2 (Johnson ym. 2002b). Moulin-Schouleur ym. (2007) tutkivat APEC-kantojen fylogeneettistä taustaa myös tässä tutkimuksessa käytetyn PCR-menetelmän (Clermont ym. 2000) ja MLST (multilocus sequence typing) -analyysin avulla ja osoittivat tiettyjen ihmisen ja lintujen ExPEC-kantojen olevan fylogeneettisesti hyvin lähellä toisiaan. Samanlaisen johtopäätöksen tekivät myös Johnson ym. (2007), jotka totesivat erään APEC O1 -kannan olevan geneettisesti hyvin lähellä ihmisen UPEC-kantaa.

## 2.7 ExPEC-bakteerit elintarvikkeissa

*E. coli* -bakteerit ovat yleisiä ympäristön ja suoliston bakteereita, ja siksi niitä esiintyy myös elintarvikkeissa. Suurin osa näistä on kuitenkin harmittomia kommensaaleja kantoja. Ekstraintestinaalisia patogeenisiä *E. coli* -bakteereja on löydetty varsinkin siipikarjanlihatuotteista. Vuonna 2000 Johnson ym. (2003) tutkivat Minneapolisin ja St. Paulin alueella Yhdysvalloissa 169 broilerinäytettä, joista 150 näytteessä (88,8 %) oli *E. coli* -bakteeria. Näytteistä 55 analysoitiin tarkemmin, ja näistä 38,2 % löytyi ExPEC-bakteereja. Johnson ym. (2005a) tutkivat samalla alueella vuosina 1999–2000 myös vihannes-, hedelmä- ja lihatuotteista. *E. coli* -bakteereita löytyi 15,8 % vihanneksista, 5,4 % hedelmistä ja kaikista lihanäytteistä. ExPEC-bakteereita löytyi ainoastaan kalkkunanlihasta. Johnson ym. (2005b) tutkivat myös antibioottiresistenttien *E. coli* -kantojen esiintymistä elintarvikkeissa ja totesivat myös näiden liittyvän pääasiassa raakaan lihaan, erityisesti siipikarjanlihaan.

Siipikarjanlihan on arveltu olevan kulkeutumisreitti ihmiselle tautia aiheuttaville ExPEC-kannoille. Muun muassa van den Bogaard ym. (2002) ja Johnson ym. (2003) ovat osoittaneet, että *E. coli* -kannan siirtyminen siipikarjanlihasta ihmiseen on mahdollista. Ihmiseen siirtyessään ExPEC-kannat voivat paitsi aiheuttaa tautia, myös välittää virulenssigeenejä (Ron 2006) tai antibioottiresistenssigeenejä (Johnson ym. 2003) muille bakteereille.

## 2.8 Pulssikenttägeelielektroforeesi genotyyppitysmenetelmänä

Bakteerikantoja tyypitetään epidemiologisissa tutkimuksissa tartuntalähteen ja -reitien selvittämiseksi. Pulssikenttägeelielektroforeesi (PFGE) -menetelmällä voidaan tyypittää kaikkia bakteereita, tosin joidenkin *Clostridium difficile* -kantojen tyypittämisen on todettu olevan hankalaa (Tenover ym. 1997). PFGE-menetelmällä on todettu olevan erinomainen erotuskyky verrattuna moniin muihin biokemiallisiin ja molekylaarisiin tyypitysmenetelmiin (Olive & Bean 1999). Sillä on myös hyvä toistettavuus. PFGE on kuitenkin menetelmänä melko hidas, sen suorittaminen vie yleensä vähintään 2-3 päivää. Hitaus johtuu pitkistä käsittely- ja ajoajoista, itse työvaiheet eivät vie paljon aikaa.

DNA-molekyylejä voidaan erotella koon perustella elektroforeettisesti kuljettamalla niitä kiinteässä elementissä kohti positiivista sähkövarausta (Birren & Lai 1993). Negatiivisen varauksen omaavat DNA-molekyylit liikkuvat tällöin kohti anodia nopeudella, mikä on riippuvainen niiden koosta. Pulssikenttägeelielektroforeesin avulla voidaan erotella suuria (> 20 kbp) DNA-molekyylejä.

PFGE-menetelmässä bakteerin kromosomaalinen DNA pilkotaan restriktionensyymien avulla palasiksi, jotka erotellaan koon perusteella sähkövirran avulla agarosigeelillä (Birren & Lai 1993). Näin saadaan jokaiselle bakteerikannalle tyypillinen PFGE-profiili. Menetelmässä bakteerisolut valetaan agarosiin ja DNA:n käsittely tapahtuu agarosipalan sisällä. Tällä estetään DNA:n pilkkoutuminen ennen restriktiokäsittelyä. Solut hajotetaan proteinaasientsyymien

avulla, ja solu- ja proteiinijäte poistetaan dialyysissä, jolloin agarosipalan sisään jää vain DNA. DNA pilkotaan eli digestoidaan harvakseltaan restriktioentsyymillä, jolla saadaan sopivan kokoisia (10 - 800 kep) DNA-fragmentteja (Tenover 1997). Digestion jälkeen agarosipalat valetaan geelin sisään ja tehdään PFGE-ajo (Birren & Lai 1993).

PFGE-ajossa pilkotut DNA-fragmentit erotellaan sähkövirran avulla, jolloin rakentuu kullekin bakteerikannalle ja käytetylle restriktioentsyymille tyypillinen PFGE-profiili (Birren & Lai 1993). Ajossa sähkövirran suunta muuttuu pulsseittain. Sähkökenttien suunnan välistä kulmaa kutsutaan reorientoitumiskulmaksi. DNA-molekyylit kulkeutuvat sähkövirran suuntaisesti, kunnes virran suunta muuttuu. Tällöin DNA-fragmentit orientoituvat uuden sähkövirran suuntaisesti. Reorientoitumiseen kuluva aika riippuu DNA:n koosta; pienet DNA-molekyylit muuttavat konformaatiota nopeammin kuin suuret. Tällöin pienet DNA-molekyylit kulkeutuvat myös geelissä nopeammin kuin suuret, mikä johtaa vyöhykkeiden erottumiseen koon mukaisesti. DNA-vyöhykkeistä koostuvat profiilit voidaan kuvata värjäämällä geeli etidumbromidilla ja kuvaamalla geeli UV-valossa, jolloin DNA-vyöhykkeet näkyvät fluoresenssi-ilmion ansiosta.

PFGE-profiilit voidaan tallentaa tietokoneelle, ja niitä voidaan käsitellä ja vertailla tarkoitukseen kehitetyillä ohjelmilla (Olive & Bean 1999). PFGE-profiileista voidaan myös luoda tietokantoja, joihin uusia tai tutkittavia kantoja voidaan verrata ja arvioida niiden fylogeneettisiä suhteita. Tällaiset tietokannat mahdollistavat laboratorioden välisen kantojen vertailun.

Samanlaisen PFGE-profiilin omaavat bakteerit ovat samaa kantaa. On todettu, että bakteerien DNA:ssa tapahtuu luonnollista muuntautumista, joka kohdistuessaan restriktioentsyymien tunnistuskohtiin, saattaa muuttaa PFGE-profiileja muutamassa kuukaudessa (Tenover 1997). Tenover ym (1997) ovat esittäneet, että jos profiilissa on poikkeavia vyöhykkeitä 1-3, kannat ovat läheistä sukua toisilleen, jos poikkeavia vyöhykkeitä on 4-6, kannat ovat mahdollisesti sukua toisilleen ja jos poikkeavia vyöhykkeitä on enemmän, kannat ovat erillisiä.

Ensimmäisen PFGE-laitteen kehittivät Schwartz ja Cantor vuonna 1982 (Schwartz ym. 1982). Tämän jälkeen on kehitelty erilaisia laitesovelluksia (ks. Syrjäläinen 2004). Chu ym. (1986) kehittivät käytetyimmän CHEF (clamped homogeneous electric field electrophoresis) -tyypin PFGE-laitteen, jossa virtapiiri muodostuu kuusikulmion muotoon asetetuista elektroneista. CHEF-laitteistolla geelille muodostuu homogeeninen sähkökenttä ja DNA-molekyylit kulkeutuvat suoraan alaspäin, mikä mahdollistaa useiden näytteiden erottelemisen samanaikaisesti (Birren & Lai 1993).

## 2.9 APEC-kantojen epidemiologia

APEC-kantojen molekyyli-epidemiologiaa on tutkittu niukasti. Menetelmänä on perinteisesti ollut multilokusentsyymielektroforeesi (MLEE), mutta erilaisten PCR-menetelmien ja PFGE:n käyttö ovat lisääntyneet (Perko-Mäkelä ym. 2005). MLEE-tutkimuksissa on todettu, että rajallinen määrä APEC-klooneja aiheuttaa tautitapauksia (da Silveira ym. 2006, Ngeleka ym. 1996). Kuitenkin on todettu, ettei mikään spesifinen serotyyppi tai genotyyppi ole vastuussa kolibasilloositapauksista (Carvalho de Moura ym. 2001).

PFGE-menetelmällä APEC-kantoja ovat tyypittäneet muun muassa Ewers ym. (2004). Heidän tutkimuksessaan 150 Saksasta 12 vuoden aikana kerättyä kantaa jakaantuivat kahteen pääkloonin, joiden samankaltaisuus oli 60,9 %. Suurin osa kannoista kuului samaan kloonin, jonka kantojen geneettinen samankaltaisuus oli 80 %. Jeffrey ym. (2004) tyypittivät yli 300 siipikarjalle selluliittia aiheuttavaa kantaa, jotka oli kerätty viideltä tilalta Yhdysvalloissa, ja löysivät 7 kloonin, joiden geneettinen samankaltaisuus oli noin 90 %. Jeffrey ym. arvelivat, että tietyt APEC-kannat ovat pysyviä kasvatushalleissa, sillä niitä esiintyi kasvatuserästä toiseen kasvatuksilajien perusteellisesta puhdistuksesta huolimatta.

On esitetty arveluja siitä, että APEC-kannat siirtyisivät linnuilla sukupolvesta toiseen. Giovanardi ym. (2005) raportoivat, että samaa kolibasilloosia aiheuttavaa *E. coli* -kantaa esiintyi kahdessa



tapauksessa sekä broileriemoilla että heidän jälkeläisillään. Kannat tyypitettiin RAPD (random amplification of polymorphic DNA) -tyypityksellä. Teollisessa broilerintuotannossa broileriemot eivät ole kosketuksissa jälkeläisiinsä muuten kuin munan välityksellä, ja niiden kasvatus tapahtuu eri tiloissa. Näin ollen on mahdollista, että *E. coli* -kannat siirtyvät jälkeläisiin munan välityksellä. Samanlainen tulos saatiin myös tämän tutkimuksen aineistosta EELA:ssa vuosina 2003 - 2004 kerätyistä broilerin APEC-kannoista (ELL Tarja Pohjanvirta, suullinen tiedonanto). Genotyypiltään samaa kolibasilloosia aiheuttavaa APEC-kantaa (serotyypin O1:K1, virulenssiprofiili *cva*, *vat*, *iucD*, *papC*, *irp2*, *iss*) tyypitettiin isovanhempaispolven, vanhempaispolven ja tuotantopolven linnuista kahdelta eri emokasvattamolta ja kahdelta eri tuotantotilalta.

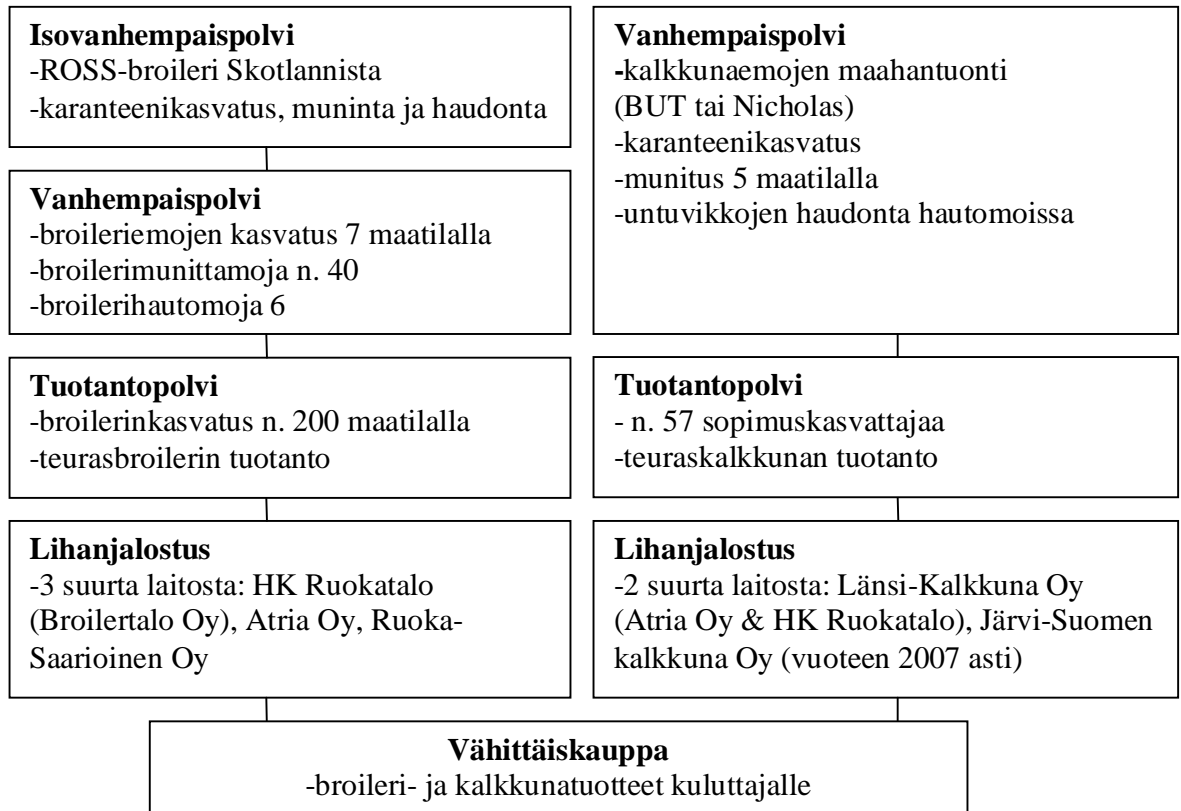
Van den Bogaard ym. (2001) osoittivat PFGE-menetelmällä, että antibioottiresistentit *E. coli* -kannat siirtyvät siipikarjasta ihmiseen. He tunnistivat saman *E. coli* -kannan kalkkunaa ja kalkkunankasvattajan ulosteesta, sekä broilerin ja broilerinkasvattajan ulosteesta. Lisäksi he löysivät kolmea samaa *E. coli* -kantaa sekä kalkkunalihasta että -ulosteesta.

## 2.10 Siipikarjantuotanto Suomessa

Suomalaisen lihasiipikarjan eli broilerin ja kalkkunaa tuotanto on pääasiassa sopimustuotantoa (Suomen siipikarjaliitto ry. 2007). Siipikarjan kasvattajat kasvattavat broilerit tai kalkkunat sopimuksen ohjeiden ja määräysten mukaisesti lihanjalostusteollisuudelle, mikä jalostaa tuotteet kauppoihin kuluttajille. Siipikarjan tuotantorakenne on pyramidimainen ja tarkkaan valvottu. Lihasiipikarjan tuotantorakenne on esitetty broilerin ja kalkkunaa osalta kuvassa 1.

## BROILERI

## KALKKUNA



Kuva 1. Lihasiipikarjan tuotantorakenne Suomessa (Suomen siipikarjaliitto ry, 2007)

Suomessa siipikarjan lihahygienia ja eläinten terveys ovat hyvällä tasolla (Suomen siipikarjaliitto ry, 2007). Tuotannon laatua valvotaan kaikissa tuotantoketjun vaiheissa. Suomessa ja Ruotsissa noudatetaan EU:ssa poikkeuksellista kansallista salmonellavalvontaohjelmaa, minkä ansiosta salmonellaa esiintyy hyvin vähän. Myös muut vakavat siipikarjataudit ovat Suomessa harvinaisia.

Lihasiipikarja kasvatetaan Suomessa lattiakasvatuksessa tuotantohalleissa (Suomen siipikarjaliitto ry, 2007). Tuotantotilat pestään ja desinfioidaan kasvatuserien välillä. Kasvatusolosuhteita säädellään ilmanvaihdon, lämpötilan, kosteuden, pehkun hoidon ja valon

avulla. Juomavettä on aina saatavilla ja sen puhtautta valvotaan. Ruokinnassa käytetään pääasiassa vehnää, ohraa, kauraa ja soijaa. Rehuissa käytetään entsyymejä ja maitohappobakteereita edistämään lintujen suolistoterveyttä, kasvutekijöitä tai hormoneja ei käytetä. Rehuissa käytetään kasvukauden alkuvaiheessa kokkidiostaattia *Eimeria*-sukuisten loisten aiheuttamien tautien ennaltaehkäisyyn. Broileriemot rokotetaan kokkidioosia vastaan.

### 3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämä tutkimus liittyy elintarviketurvallisuusvirasto EVIRA:n hankkeeseen *E. coli* -bakteerit eläintautien ja zoonoosien aiheuttajina. Hankkeen tarkoituksena on kerätä tietoa *E. coli* -bakteerista eläintautien aiheuttajana ja zoonoosina selvittämällä muun muassa siipikarjan kolibasilloosin epidemiologiaa sekä ihmisten ja siipikarjan ekstraintestinaalisten *E. coli* -bakteerien yhteisiä ominaisuuksia.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää siipikarjanäytteistä eristettyjen *E. coli* -bakteerien fylogeniaryhmät, tutkia kymmenen eri virulenssitekijän esiintymistä niissä, ja selvittää näin kantojen geneettistä samankaltaisuutta. Mielenkiinnon kohteena oli kolikantojen mahdollinen kulkeutuminen isäntäsuolpolvesta toiseen siipikarjassa. Virulenssitekijöitä ja fylogeniaa selvittämällä sekä kantoja tyypittämällä haluttiin tarkastella myös siipikarjan kolikantojen mahdollista zoonoottista potentiaalia. Siipikarjan kolibakteereiden ominaisuuksia ei ole aiemmin tutkittu Suomessa.

## 4. AINEISTO JA MENETELMÄT

### 4.1 *Escherichia coli* -bakteerikannat

Tutkimusaineistona oli 1256 *Escherichia coli* -kanta, jotka oli eristetty kolmesta erilaisesta lähteestä: kolibasilloosiin kuolleista linnuista (817 kantaa), terveen siipikarjan ulosteista tai elimistä (220 kantaa), sekä siipikarjanlihatuotteista (219 kantaa). Tutkimushankkeen *Bakteriologinen ja epidemiologinen tutkimus lihasiipikarjan koli-infektioista ehkäisemisen tueksi* (Perko-Mäkelä ym. 2005) puitteissa oli kerätty vuodesta 2003 lähtien 817 lihasiipikarjan *E. coli* -kanta kuolleista sairaista linnuista, joita siipikarjan tuottajat olivat toimittaneet EVIRA:n (ennen toukokuuta 2006 EELA) toimipisteisiin ruumiinavausta varten. Näiden APEC-kantojen mukana oli myös 88 kantaa, jotka oli kerätty terveiden lintujen ulosteista tai elimistä. FINRES-Vet 2005 -tutkimuksen yhteydessä (Myllyniemi ym. 2007) oli eristetty terveiden broilereiden ulosteista n. 350 *E. coli* -kanta, joista tutkittiin 10 virulenssitekijän ja fylogeniaryhmän osalta 132 kantaa. Elintarvikkeista eristettyjä kantoja oli 219. Siipikarjanlihatuotteet oli hankittu vähittäismyyntikaupoista Helsingistä ja Seinäjoelta. Tutkitut kannat kasvatettiin TSA (tryptoni-soija-agar) -maljoilla ja ne oli pakastettu ennen tutkimusta -70 °C:een.

Sairaista linnuista kerätyt näytteet (817 kantaa) oli eristetty Suomessa kasvatetuista kanoista (broilerit ja broileriemot 572 kantaa), kalkkunoista (229 kantaa) ja fasaaneista (16 kantaa). Näytteitä oli isovanhempaispolvesta (20 kantaa), vanhempaispolvesta (264) ja tuotantopolvesta (455), 78 kannan osalta ei saatu tietoa tuotantosukupolvesta. Sairaista linnuista eristetyt kannat oli kerätty eri elimistä, elimistön nesteistä tai eritteistä: maksa (186 kantaa), sydän (152 kantaa), perna (102 kantaa), keuhkot (99 kantaa), ohutsuoli (60 kantaa), ruskuaispussi (48 kantaa), umpisuoli (36 kantaa), uloste (8 kantaa), aivot (6 kantaa), iho (6 kantaa), munuainen (6 kantaa), munasarja (5 kantaa), elinonteloneste (3 kantaa), munanjohdin (2 kantaa), ilmapussi (2 kantaa), anturapaise (1 kanta), jännetuppi (1 kanta), henkitorvi (1 kanta) ja veri (1 kanta). Osasta kannoista (92 kantaa) puuttui tieto, mistä elimestä kanta oli eristetty. Sairailta linnuilla oli diagnosoitu ruumiinavauksen yhteydessä kolibasilloosi (589 kantaa), kolibasilloosi ja non-starter

(poikanen ei ole aloittanut kiinteän rehun syömistä (ELL Tarja Pohjanvirta, suullinen tiedonanto)) (17 kantaa), selluliitti (47 kantaa), nekroottinen enteriitti (28 kantaa), muun kuin *E. coli* -bakteeriin aiheuttama tulehdus (72 kantaa) tai ei-tulehduksellinen sairaus (64 kantaa).

Terveiden lintujen *Escherichia coli* -kannat (220 kantaa) oli eristetty Suomessa kasvatetuista kanoista (broileri ja broileriemot, 158 kantaa) ja kalkkunoista (62 kantaa). Kannat oli eristetty pääasiassa ulosteesta (188 kantaa), mutta myös ohutsuolesta (10 kantaa), ruskuaispussista (10 kantaa), keuhkoista (4 kantaa), umpisuolesta (2 kantaa), maksasta (2 kantaa), pernasta (2 kantaa), ja sydäimestä (1 kanta). Isovanhempaispolven linnuista oli 4, vanhempaispolven linnuista 29 ja tuotantopolven linnuista 155 kantaa. Osasta kannoista (32 kantaa) puuttui tuotantosukupolvitieto.

Elintarvikkeista kerätyt kannat oli eristetty maustamattomista ja marinoiduista, nahallisista ja nahattomista broileri- ja kalkkunavalmisteista. Siipikarjanliha oli pääasiassa kotimaista ja peräisin kolmelta suurelta suomalaiselta siipikarjanteurastamolta (162 näytettä ja eristettyä kantaa), 32 kantaa oli eristetty elintarvikkeista, joiden valmistajat käyttävät raaka-aineena pääasiassa ulkomaista tuontilihaa, 25 näytteestä alkuperää ei varmasti tiedetty. Tuontiliha oli peräisin Tanskasta, Saksasta ja Brasiliasta.

#### 4.2 PCR-tutkimukset

PCR (polymerase chain reaction) -menetelmällä tutkittiin kymmenen erilaisen virulenssitekijän esiintymistä *E. coli* -kannoissa, sekä määritettiin kantojen kuuluminen fylogeniaryhmiin A, B1, B2, B2<sub>1</sub>/ST29 ja D. PCR-reaktiot tehtiin UNO II Thermocycler- (Biometra, Saksa), TGRADIENT Thermocycler (Biometra, Saksa) ja PTC-0200 DNA Engine -PCR-laitteilla (MJ Research, Yhdysvallat) ja PCR-tuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Elektroforeesilaitteistona käytettiin Pharmacia Biotechin (Yhdysvallat) elektroforeesikammiota Pharmacia LKB GNA 200 ja virtalähteitä EPS 200 ja -600. Ajogeelit valmistettiin Seakem LE-agarosista (Cambrex Bio Science, Yhdysvallat) ja 1 x TAE-puskurista (40 mM Tris-asetatti; 1

mM EDTA, pH 8,0). Geelit kuvattiin UV-valon avulla Alpha DigiDoc™ -laitteella (Alpha Innotech, Yhdysvallat). Tuloksien merkittävyys testattiin Pearsonin  $\chi^2$ -testillä SPSS for Windows 13.0 -ohjelman (SPSS Inc., Yhdysvallat) avulla.

Pakastetut *E. coli* -näytteet viljeltiin TSA-maljoille ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Maljalta otettiin 1-3 pesäkettä, jotka suspensoitiin 100 µl steriiliä aktiivihiihliuodatettua vettä näytesuspensioksi.

#### 4.2.1 Fylogenia-PCR

*E. coli* -kantojen kuuluminen tärkeimpiin fylogeniaryhmiin A, B1, B2 ja D, sekä erittäin virulenttiin alaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29 määritettiin PCR-menetelmällä, joka perustui Clermontin ym. (2005) ja Bidetin ym. (2007) kehittämiin fylogenia-PCR-menetelmiin. PCR:ssä käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Fylogenia-PCR:n alukkeet *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2* (Clermont ym. 2000), *svg*, *uidA* (Bidet ym. 2007) ja monistustuotteet

aluke	emäsjärjestys (5' → 3')	monistustuotteen koko (ep)
<i>svg1</i>	TCC GGC TGA TTA CAA ACC AAC-	434
<i>svg2</i>	CTG CAC GAG GTT GTA GTC CTG	
<i>chuA1</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	279
<i>chuA2</i>	TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	
<i>yjaA1</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	211
<i>yjaA2</i>	ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	
<i>uidA1</i>	TAT GAA CTG TGC GTC ACA GCC	186
<i>uidA2</i>	CAT CAG CAC GTT ATC GAA TCC	
<i>TspE4.C2.1</i>	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA	152
<i>TspE4.C2.2</i>	CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	

EVIRA:ssa käytössä olevia *E. coli* -kontrollikantoja käytettiin fylogenia-PCR:n positiivikontrollina seuraavasti: ba 2742 (*uidA*), vr 288/1 (*uidA*, *chuA*), RS 228 (*TspE4.C2*, *uidA*, *yjaA*, *chuA*, *svg*), *E. coli* ATCC 25922/97 (*TspE4.C2*, *uidA*, *yjaA*, *chuA*).

PCR-menetelmä optimoitiin osana tutkimusta. PCR-reaktioseos (25 µl) sisälsi 2 µl näytesuspensiota, PCR-reaktiopuskuria (Roche, sis. 20 mM MgCl<sub>2</sub> tai Qiagen, sis. 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,8 mM dNTP-seosta (0,2 mM kutakin, Finnzymes, Espoo), PCR-alukkeita 15 pmol, paitsi *TspE4.C2*-alukkeita 30 pmol, 1 U DNA-polymeraasientsyymiä (FastStart Taq, Roche Applied Science, Sveitsi tai HotStarTaq, Qiagen, Saksa) sekä steriiliä vettä. PCR-olosuhteet olivat seuraavat:

alkudenaturaatio 95 °C / 15 minuuttia

denaturaatio 94 °C / 45 sekuntia

alukkeiden kiinnittyminen 55 °C / 1 minuutti

synteesi 72 °C / 1,5 minuuttia

loppupidennys 72 °C / 10 minuuttia.

Sykli, joka muodostui denaturaatiosta, alukkeiden kiinnittymisestä ja synteesivaiheesta, toistettiin 35 kertaa. PCR-monistumistuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesin (2 % geeli sis. 15 ml (1%) EtBr, 90 min 140 V) avulla.

Entsyiminä käytettiin sekä Rochen FastStart Taq-entsyymiä että Qiagenin HotStar -entsyymiä. Aluksi käytettiin FastStart Taq -entsyymiä, mutta sitten havaittiin, että toisinaan myös nollanäytteissä, missä ei ollut mukana *E. coli* -bakteeria, näkyi hentoja vyöhykkeitä elektroforeesikuvassa, mikä kertoo *E. coli* -jäämistä näytteessä. *E. coli* -jäämien epäiltiin olevan peräisin FastStart Taq-entsyymistä, mikä on eristetty *E. coli* -bakteerista, sillä muita entsyymejä käytettäessä ei havaittu samaa ilmiötä. Vyöhykkeet olivat kuitenkin niin hentoja, että ne eivät häirinneet kuvien tulkintaa.

#### 4.2.2 APEC MP 8 -PCR

APEC MP 8 PCR -menetelmällä (käytössä EVIRA:ssa) määritettiin *E. coli* -kannoista kahdeksan eri virulenssitekijän esiintyminen. Virulenssigeenit olivat *astA* (heat-stable cytotoxin associated with enteroaggregative *E. coli*), *irp2* (iron-repressible protein), *papC* (pilus associated with pyelonephritis), *iss* (increased serum survival), *iucD* (aerobactin synthesis), *tsh* (temperature-sensitive haemagglutinin), *cva* (structural genes of colicin V operon) ja *vat* (vacuolating autotransporter toxin).

Anita Lampinen (Kuopion yliopisto) oli määrittänyt aikaisemmin LuK-työnään sairaista linnuista eristettyjen kolikantojen virulenssitekijöitä tällä menetelmällä. Aineistoa käytettiin hyväksi tässä tutkimuksessa. Tässä tutkimuksessa määritettiin virulenssitekijät terveiden broilereiden ulosteista ja elintarvikenäytteistä eristetyistä *E. coli* -kannoista. Entsyymeinä käytettiin Qiagenin HotStar Taq ja HotStarTaq *Plus* -entsyymejä sekä Rochen FastStart -entsyymiä. PCR:ssä käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 6.



Taulukko 6. APEC MP 8 -PCR:n alukkeet ja monistustuotteet (Ewers ym. 2005)

aluke	emäsjärjestys (5' → 3')	monistustuotteen koko (ep)
<i>astA 1</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC	116
<i>astA 2</i>	TCAGGTCGCGAGTGACGGC	
<i>iss 1</i>	ATCACATAGGATTCTGCCG	309
<i>iss 2</i>	CAGCGGAGTATAGATGCCA	
<i>irp2 1</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	413
<i>irp2 2</i>	AACTCCTGATACAGGTGGC	
<i>papC 1</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	501
<i>papC 2</i>	CCGGCCATATTCACATAA	
<i>iucD 1</i>	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	714
<i>iucD 2</i>	CCTGATCCAGATGATGCTC	
<i>tsh 1</i>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824
<i>tsh 2</i>	CTTCCGATGTTCTGAACGT	
<i>vat 1</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG	981
<i>vat 2</i>	GTGTCAGAACGGAATTGT	
<i>cva A/B</i>	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	1181
<i>cvi cva C</i>	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	

APEC MP 8 -PCR:ssä käytettiin positiivikontrollina EVIRA:ssa käytössä olevia *E. coli* -kontrollikantoja seuraavasti: EC 110 (*astA*, *irp2*, *papC*), EC 206 (*iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *cva*) ja EC 252 (*iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *vat*, *cva*).

PCR-reaktioseos (25 µl) sisälsi 1 µl näytesuspensiota, PCR-reaktiopuskuria (Roche sis. 20 mM MgCl<sub>2</sub> tai Qiagen sis. 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTP-seosta (0,2 mM kutakin, Finnzymes), PCR-alukkeita 5 pmol, paitsi *iss*- ja *cva*-alukkeita 10 pmol, 1 U entsyymiä (FastStart Taq, Roche tai HotStarTaq, Qiagen) tai 0,75 U HotStarTaq *Plus* -entsyymiä ja steriiliä vettä.

PCR-olosuhteet olivat seuraavat:

alkudenaturaatio 95 °C / 15 minuuttia

denaturaatio 94 °C / 45 sekuntia

alukkeiden kiinnittyminen 58 °C / 45 sekuntia

synteesi 72 °C / 1 minuutti

loppupidennys 72 °C / 10 minuuttia.

Sykli, joka muodostui denaturaatiosta, alukkeiden kiinnittymisestä ja synteesivaiheesta, toistettiin 30 kertaa. PCR-monistumistuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesin (2 % geeli sis. 15 ml (1%) EtBr, 90 min 140 V) avulla.

#### 4.2.3 K1-PCR

Polysakkaridikapselin aiheuttavan K1-antigeenin esiintyminen *E. coli* -kannoissa tutkittiin EVIRA:ssa käytössä olevan K1-PCR-menetelmän avulla. PCR:ssä käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. K1-PCR:n alukkeet ja monistustuotteet (Johnson & Stell 2000)

aluke	emäsjärjestys (5' → 3')	monistustuotteen koko (ep)
<i>kps MT</i> K1 1	TAGCAAACGTTCTATTGGTGC	153
<i>kps MT</i> K1 2	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	

K1-PCR:ssä käytettiin positiivikontrollina EVIRA:ssa käytössä olevaa RS 228 -kontrollikantaa. PCR-reaktioseos (25 µl) sisälsi 1 µl näytesuspensiota, 5 pmol PCR-alukkeita, sekä DyNazyme™ DNA Polymerase Kitin (Finnzymes) reagensseja: PCR-reaktiopuskuria (sis. 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,8 mM dNTP-seosta (0,2 mM kutakin) ja 1 U DNA-polymeraasientsyymiä ja steriiliä vettä.

PCR-olosuhteet olivat seuraavat:

alkudenaturaatio 95 °C / 5 minuuttia

denaturaatio 94 °C / 1 minuutti

alukkeiden kiinnittyminen 61 °C / 1 minuutti

synteesi 72 °C / 1 minuutti

loppupidennys 72 °C / 5 minuuttia.

Sykli (denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen ja synteesi) toistettiin 30 kertaa. PCR-monistumistuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesin (1,5 % geeli sis. 15 ml (1%) EtBr, 40 min 140 V) avulla.

#### 4.2.4 *ibeA*-PCR

Aivokalvontulehdusta aiheuttaviin ExPEC-kantoihin liittyvän *ibeA*-geenin esiintyminen siipikarjan *E. coli* -kannoissa tutkittiin EVIRA:ssa käytössä olevan *ibeA*-PCR-menetelmän avulla. PCR:ssä käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. *IbeA*-PCR:n alukkeet ja monistumistuotteet (Johnson & Stell 2000)

aluke	emäsjärjestys (5' → 3')	monistustuotteen koko (ep)
<i>ibeA 1</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170
<i>ibeA 2</i>	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	

*IbeA*-PCR:ssä käytettiin positiivikontrollina EVIRA:ssa käytössä olevaa A56 -kontrollikantaa. PCR-reaktioseos (25 µl) sisälsi 1 µl näytesuspensiota, 10 pmol alukkeita, sekä DyNazyme™ DNA Polymerase Kit:in (Finnzymes) reagensseja: PCR-reaktiopuskuria (sis. 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,8 mM dNTP-seosta (0,2 mM kutakin) ja 1 U DNA-polymeraasientsyymiä sekä steriiliä vettä.

PCR-olosuhteet olivat seuraavat:

alkudenaturaatio 95 °C / 5 minuuttia

denaturaatio 94 °C / 1 minuutti

alukkeiden kiinnittyminen 68 °C / 1 minuutti

synteesi 72 °C / 1 minuutti

loppupidennys 72 °C / 5 minuuttia.

Sykli (denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen ja synteesi) toistettiin 30 kertaa. PCR-monistumistuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesin (1,5 % geeli sis. 15 ml (1%) EtBr, 40 min 140 V) avulla.

#### 4.3 Pulssikenttägeelielektroforeesi

PFGE-menetelmällä, joka perustuu Pulsenet USA:n (1994) ohjeeseen, genotyyppitettiin 161 siipikarjan *E. coli* -kanta. Genotyyppityksessä haluttiin tarkastella erityisesti patogeeniseen B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmään kuuluvien kantojen geneettistä samankaltaisuutta ja näiden kantojen kulkeutumista tuotantoketjussa. Lisäksi haluttiin selvittää kantojen mahdollista siirtymistä isäntäsuolvesta toiseen. Tyypitetyistä kannoista 106 kantaa luokiteltiin kuuluvaksi patogeeniseen fylogeniaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29, 19 fylogeniaryhmään B2, 19 fylogeniaryhmään A, 6 fylogeniaryhmään D ja 4 fylogeniaryhmään B1. Tutkituista kannoista 16 oli peräisin isovanhempaispolven, 60 vanhempaispolven ja 59 tuotantopolven linnuista. Sairaista linnuista oli eristetty 146 kantaa, terveistä linnuista 13 kantaa ja elintarvikkeista 2 kantaa. Kalkkunoista oli peräisin 29 kantaa ja loput kannat oli eristetty kanoista.

Pakastetuista bakteereista tehtiin puhtasviljelmät TSA-maljoille ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Kasvustosta tehtiin bakteerisuspensio CSB (cell suspension buffer: 100 mM Tris; 100 mM EDTA; pH 8,0) -liuokseen, jonka absorbanssi oli aallonpituudella 610 nm noin 1,7.

Bakteerisuspensioon sekoitettiin saman verran sulaa agarosia (1 % Seakem Gold (Rockland, Yhdysvallat) + 1 % SDS (sodiumdodekyylisulfaatti) TE-puskurissa (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)) ja proteinaasi K-entsyymiä (0,5 mg/ml), ja seos valettiin 100 µl kokosiin muotteihin. Agarosipaloja inkuboitiin yli 4 tuntia vesihauteella 54 °C:ssa CLB (cell lysis buffer: 50 mM Tris; 50 mM EDTA; pH 8,0 + 1 % sarkosiini) -liuoksessa, joka sisälsi 0,1 mg/ml proteinaasi K-entsyymiä. Tämän jälkeen näytepaloja säilytettiin 0,5 M EDTA-liuoksessa (pH 8,0) jääkaapissa.

Proteinaasientsyymikäsittelyn jälkeen näytepaloista leikattiin pieni pala (noin 2/5), joka laitettiin dialyysiin TEN (10 mM Tris, pH 7,4; 1mM EDTA; 50 mM NaCl)-puskuriin jääkaappilämpötilaan 2-3 vuorokaudeksi. Dialyysin jälkeen näytteen DNA digestoitettiin *XbaI* - restriktioentsyymillä avulla 150 µl:n reaktiilavuudessa 37 °C:n lämpötilassa 16,5 h. Reaktioseos sisälsi 20 U *XbaI* -entsyymiä (New England Biolabs Inc., Yhdysvallat) yksinkertaista NEB 2 -puskuriliuosta, 0,1 µg/µl BSA:ta (bovine serum albumin) ja ultrapuhdasta vettä. Reaktio pysäytettiin lisäämällä näytteisiin 20 µl 0,5 M EDTA-liuosta.

PFGE-ajo tehtiin CHEF-DR® III System -laitteella (Biorad, Yhdysvallat). Kontrollikantoina käytettiin *Salmonella* Braenderup H9812 -kantoja, jotka oli käsitelty samalla tavoin kuin näytteet. Ajogeelinä käytettiin 1 % SeaKem Gold -agarosigeeliä (Rockland, Yhdysvallat), joka oli valmistettu 0,5 x TBE-puskuriin (45 mM Tris-boraatti; 1 mM EDTA, pH 8,0). Näytepalat valettiin geelin sisään. Ajopuskurina käytettiin 0,5 x TBE-puskuria. Geeliä tasapainotettiin ajopuskurissa noin puoli tuntia ennen ajon käynnistämistä. Ajoparametrit olivat: ajoaika 19 h, lämpötila 13,5 °C, jännite 6 V/cm, pulssiaika 2,2 - 54,2 s ja reorientoitumiskulma 120 °. Ajon jälkeen geeli värjättiin etidiumbromidilla (0,5 µg/ml) ja kuvattiin UV-valossa Alpha DigiDoc™ -laitteella (Alpha Innotech, Yhdysvallat).

Seitsemän *E. coli* -kannan genotyyppitys ei onnistunut käytettäessä TBE-puskuria, joten kannat tyypitettiin käyttämällä Hepes-ajopuskuria (Promega, Yhdysvallat). Näistä viiden kannan genotyyppitys onnistui, kaksi jäi edelleen tyypittämättä.

#### 4.4 Tulosten tilastollinen käsittely

PCR-analyysien tulokset käsiteltiin SPSS for Windows 13.0 -ohjelmalla (SPSS Inc., Yhdysvallat). Eri lähteistä eristettyjen *E. coli* -kantojen jakautumista fylogeniaryhmiin, virulenssitekijöiden esiintymistä niissä, ja fylogeniaryhmän yhteyttä virulenssitekijöihin tarkasteltiin ristiintaulukoinnin avulla. Tulosten tilastollinen merkittävyys testattiin Pearsonin  $\chi^2$ -testillä.

PFGE-genotyyppityksen tulokset analysoitiin Bionumerics-ohjelmalla (Applied Maths, Belgia). Optimoinnin arvo oli 1,00 % ja toleranssin 1,5 – 1,75 %.

## 5. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

### 5.1 Fylogeniaryhmät

Fylogeniaryhmä määritettiin PCR-menetelmällä *Escherichia coli* -kannoista, jotka oli eristetty 817 sairaasta linnusta, 220 terveestä linnusta ja 219 elintarvikkeesta. Suurin osa kannoista saatiin luokiteltua tiettyyn fylogeniaryhmään fylogenia-PCR:n perusteella, mutta 21 kannalle (1,7 %) fylogeniaryhmä jäi epäselväksi. Näissä kannoissa monistui PCR:ssä ylimääräisiä vyöhykkeitä tai monistumista ei tapahtunut lainkaan. *Uida*-geenin puuttuessa osaa näistä kannoista ei voitu varmistaa *Escherichia coli* -kannoiksi. Muut epäselvät kannat kuuluivat luultavasti fylogeniaryhmiin A tai B1. Kantojen sijoittuminen fylogeniaryhmiin on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Sairaista ja terveistä linnuista sekä elintarvikkeista eristettyjen *Escherichia coli* -kantojen jakaantuminen fylogeniaryhmiin fylogenia-PCR:n perusteella

	sairas lintu (n = 817)	terve lintu (n = 220)	elintarvike (n = 219)
A	204 (25,0 %)	127 (57,7 %)	78 (35,6 %)
B1	73 (8,9 %)	32 (14,5 %)	5 (2,3 %)
D	89 (10,9 %)	46 (20,9 %)	105 (47,9)
B2 muut	115 (14,1 %)	13 (5,9 %)	16 (7,3 %)
B2 <sub>1</sub> /ST29	329 (40,3 %)	1 (0,5 %)	2 (0,9 %)
epäselvä	7 (0,9 %)	1 (0,5 %)	13 (5,9 %)

Ristiintaulukoinnin tulos on tilastollisesti merkitsevä ( $p \leq 0,001$ ).

Marinadin tai mausteiden yhteyttä *E. coli* -kantojen fylogeniaryhmiin elintarvikkeista eristetyissä kannoissa on tarkasteltu taulukossa 10.

Taulukko 10. Mausteiden merkitys *Escherichia coli* -kantojen fylogeniaryhmiin siipikarja-tuotteista eristetyissä kannoissa.

	maustettu / marinoitu n = 40	maustamaton n = 166
A	21 (52,5 %)	57 (34,3 %)
B1	1 (2,5 %)	4 (2,4 %)
D	15 (37,5 %)	90 (54,2 %)
B2	3 (7,5 %)	13 (7,8 %)
B2 <sub>1</sub> /ST29	0 (0 %)	2 (1,2 %)

Ristiintaulukoinnin tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä ( $p \leq 0,281$ ).

## 5.2 Virulenssitekijät

Virulenssitekijöitä määritettiin PCR-menetelmällä *Escherichia coli* -kannoista, jotka oli eristetty 817 sairaasta linnusta, 220 terveestä linnusta ja 219 elintarvikkeesta. Virulenssigeenien esiintyminen eri lähteistä eristetyissä kannoissa on esitetty taulukossa 11.

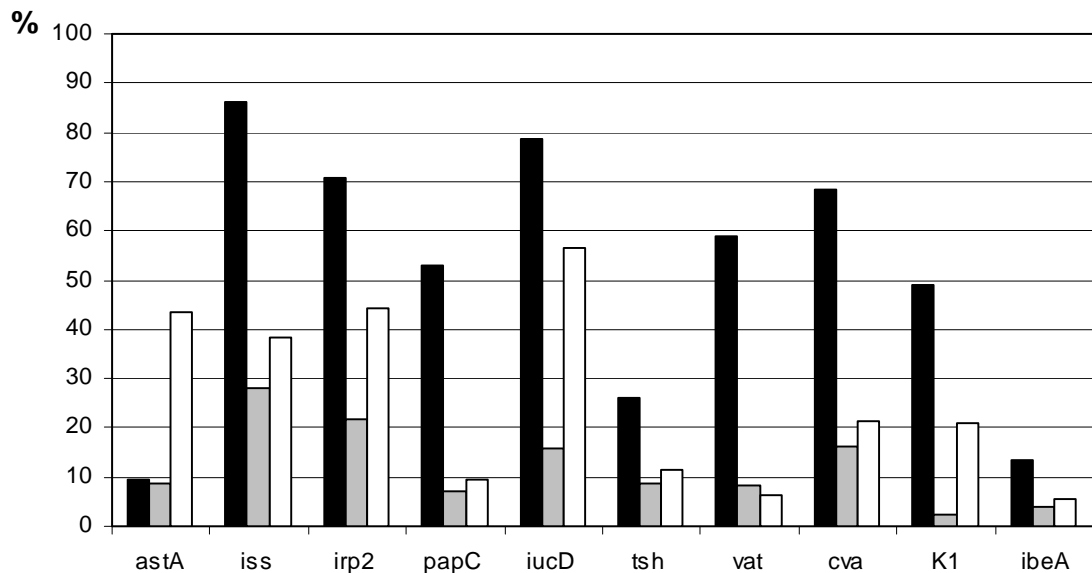
Taulukko 11. Virulenssigeenien esiintyvyys sairaista ja terveistä linnuista, sekä elintarvikkeista eristetyissä *Escherichia coli* -kannoissa

	sairas lintu (n = 817)	terve lintu (n = 220)	elintarvike (n = 219)
<i>astA</i> ***	78 (9,5 %)	19 (8,6 %)	95 (43,4 %)
<i>iss</i> ***	704 (86,2 %)	62 (28,2 %)	84 (38,4 %)
<i>irp2</i> ***	577 (70,6 %)	48 (21,8 %)	97 (44,3 %)
<i>papC</i> ***	433 (53,0 %)	16 (7,3 %)	21 (9,6 %)
<i>iucD</i> ***	643 (78,7 %)	35 (15,9 %)	124 (56,6 %)
<i>tsh</i> ***	214 (26,2 %)	19 (8,6 %)	25 (11,4 %)
<i>vat</i> ***	481 (58,9 %)	18 (8,2 %)	14 (6,4 %)
<i>cva</i> ***	557 (68,2 %)	36 (16,4 %)	47 (21,5 %)
<i>kps MT K1</i> ***	401 (49,1 %)	5 (2,3 %)	46 (21,0 %)
<i>ibeA</i> ***	111 (13,6 %)	9 (4,1 %)	12 (5,5 %)

\*\*\* Ero on tilastollisesti merkittävä ( $p \leq 0,001$ )



Virulenssiprofiilit ovat erilaiset sen mukaan, onko kanta eristetty sairaasta linnusta, terveestä linnusta vai elintarvikkeesta. Kuvasta 2 voidaan tarkastella positiivisten kantojen osuutta kymmenen virulenssigeenin suhteen eri lähteistä eristetyistä kannoista.



Kuva 2. Positiivisten *Escherichia coli* -kantojen osuus prosentteina kymmenen virulenssigeenin suhteen, kun kannat on eristetty sairaista linnuista ■, terveistä linnuista ■, tai elintarvikkeista □.

Kaikkia tutkittuja virulenssitekijöitä esiintyy sairaista ja terveistä linnuista, sekä elintarvikkeista eristetyissä kannoissa. Virulenssitekijöiden esiintyminen on suurinta sairaista linnuista eristetyissä kannoissa. Erityisesti seerumiresistenssiin liittyvää *iss*-proteiinia koodittavaa *iss*-geeniä, solun rautapitoisuuden säätelyyn osallistuvia proteiineja koodittavia *irp2*- ja *iucD*-geenejä, kapseliantigeeni K1:stä koodittavaa *kps MT* -geeniä, *pap*- ja *tsh*-kiinnittymistekijöitä koodittavia *papC*- ja *tsh*-geenejä, kolisiini V -proteiinia koodittavaa *cva*-geeniä, *ibeA*-invasiinia koodittavaa *ibeA*-geeniä ja *vat*-toksiinia koodittavaa *vat*-geeniä esiintyy merkittävästi enemmän sairaiden lintujen kolikannoissa. Sen sijaan EAST1-toksiinia koodittavaa *astA*-geeniä esiintyi lähes saman verran kuin terveiden lintujen kolikannoissa.

Siipikarjanlihaelintarvikkeista eristetyt *E. coli* -kannat poikkeavat virulenssiprofiililtaan niin sairaista kuin terveistä linnuistakin eristetyistä kannoista. Elintarvikkeiden kolikannoissa esiintyy merkittävästi enemmän *astA*-, *iss*-, *irp2*-, *iucD*- ja *kps MT* -geenejä kuin terveiden lintujen kannoissa. Vain *vat*-geeniä esiintyy vähemmän kuin terveiden lintujen kannoissa. EAST1-toksiinia koodittavaa *astA*-geeniä esiintyy jopa yli 43 % kannoista, kun sairaiden lintujen kolikannoissa sitä on vain 9,5 % kannoista.

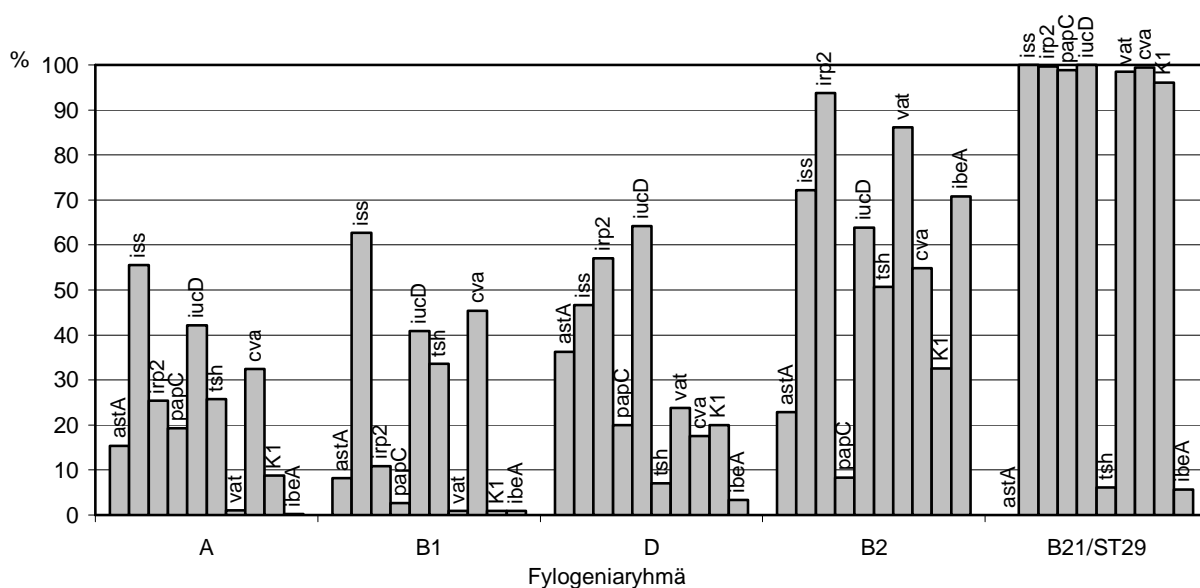
Virulenssitekijät liittyvät lisääntyneeseen patogeenisuuteen. Taudinaiheutuskykyisten APEC-kantojen on todettu kuuluvan pääasiassa fylogeniaryhmiin B2 ja D, ja ryhmän B2<sub>1</sub>/ST29 koostuvan erityisen virulenteista kannoista, kun taas A- ja B1-ryhmien kantojen on todettu olevan lähinnä kommensaaleja kantoja. Näin ollen virulenssitekijöitä oletetaan olevan enemmän fylogeniaryhmien B2 ja D kannoissa. Taulukossa 12 on esitetty kymmenen virulenssitekijän esiintyminen eri fylogeniaryhmien kannoissa.

Taulukko 12. Virulenssitekijöiden yleisyys fylogeniaryhmissä A, B1, D, B2 ja B2<sub>1</sub>/ST29

	A (n = 409)	B1 (n = 110)	D (n = 240)	B2 (n = 144)	B2 <sub>1</sub> /ST29 (n = 332)
<i>astA</i> ***	63 (15,4 %)	9 (8,2 %)	87 (36,3 %)	33 (22,9 %)	0 (0 %)
<i>iss</i> ***	227 (55,5 %)	69 (62,7 %)	112 (46,7 %)	104 (72,2 %)	332 (100 %)
<i>irp2</i> ***	104 (25,4 %)	12 (10,9 %)	137 (57,1 %)	135 (93,8 %)	331 (99,7 %)
<i>papC</i> ***	79 (19,3 %)	3 (2,7 %)	48 (20,0 %)	12 (8,3 %)	328 (98,8 %)
<i>iucD</i> ***	172 (42,1 %)	45 (40,9 %)	154 (64,2 %)	92 (63,9 %)	332 (100 %)
<i>tsh</i> ***	105 (25,7 %)	37 (33,6 %)	17 (7,1 %)	73 (50,7 %)	20 (6,1 %)
<i>vat</i> ***	4 (1,0 %)	1 (0,9 %)	57 (23,8 %)	124 (86,1 %)	327 (98,5 %)
<i>cva</i> ***	133 (32,5 %)	50 (45,4 %)	42 (17,5 %)	79 (54,9 %)	330 (99,4 %)
<i>kps MT</i> K1***	36 (8,8 %)	1 (0,9 %)	48 (20,0 %)	47 (32,6 %)	319 (96,1 %)
<i>ibeA</i> ***	1 (0,2 %)	1 (0,9 %)	8 (3,3 %)	102 (70,8 %)	19 (5,7 %)

\*\*\* Ero on tilastollisesti merkittävä (p ≤ 0,001)

Kuvasta 3. nähdään hyvin kymmenen virulenssitekijän yleisyys eri fylogeniaryhmissä. Siitä nähdään myös fylogeniaryhmien patogeenisuus, jos oletetaan, että näiden virulenssitekijöiden määrä on verrannollinen patogeenisuuteen. Tietyt virulenssitekijät näyttävät liittyvän tiettyihin fylogeniaryhmiin. Esimerkiksi *astA*-geeniä ei ole lainkaan virulentin B2-alaryhmän B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmän kannoilla, mutta se löytyy noin 23 %:lta muiden B2-fylogeniaryhmän kannoilta, kuten myös muiden fylogeniaryhmien kannoilta. Erityisen paljon sitä esiintyy fylogeniaryhmän D kannoilla (36,3 %). Myös invasiivisuuteen liittyvä *ibeA*-geeni on yleinen B2-ryhmän kannoilla (n. 71 %), kun taas B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmän kannoilla se on harvinainen (n. 6%). Sama koskee *tsh*-geeniä. Kaiken kaikkiaan tutkitut virulenssigeenit ovat yleisempiä ryhmässä B2, seuraavaksi yleisempiä ryhmissä D ja B1 ja harvinaisempia ryhmässä A. Kuitenkin kaikissa fylogeniaryhmissä tavattiin kaikkia virulenssigeenejä, paitsi *astA* -geeniä B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmässä.

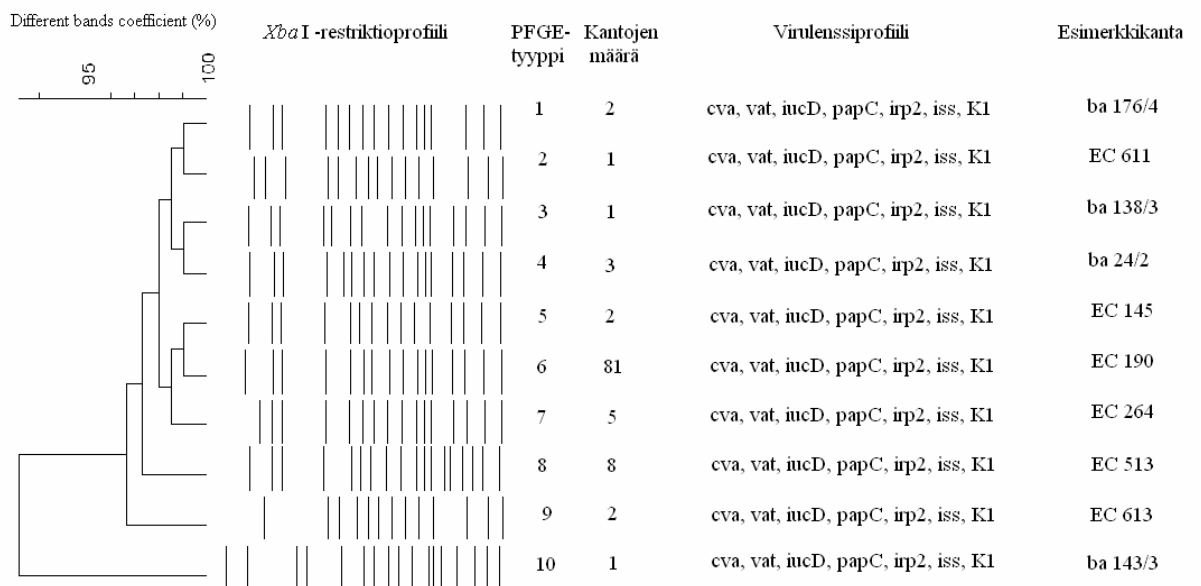


Kuva 3. Positiivisten *Escherichia coli* -kantojen osuus prosentteina kymmenen virulenssigeenin suhteen, kun kannat on luokiteltu eri fylogeniaryhmiin fylogenia-PCR:n (Bidet ym. 2007) perusteella. Bakteerikannat ovat peräisin sairaista linnuista, terveistä linnuista ja siipikarjanlihatuotteista.

### 5.3 PFGE

Pulssikenttägeelielektroforeesin avulla genotyyпитettiin 161 *Escherichia coli* -kanta, joista 106 kuului patogeeneeseen fylogeniaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29.

Fylogeniaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29 kuuluvat kannat jakautuvat pulssikenttägeelielektroforeesin perusteella kymmeneen erilaiseen PFGE-genotyyppiin (kuva 4.), jotka ovat hyvin lähellä toisiaan (Different bands coefficient 93,06 %, Dice coefficient 78,77 %). Suurin osa (76,4 %) B2<sub>1</sub>/ST29-kannoista on samaa genotyyppiä (kuvassa 4, PFGE-tyyppi 6). Kaikkien tyyppien virulenssigeeniprofiili on samanlainen.



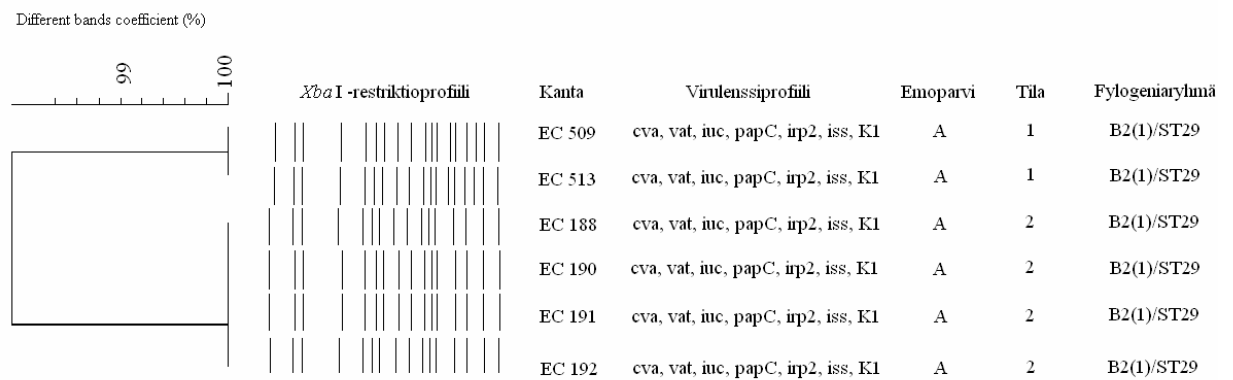
Kuva 4. Fylogeniaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29 kuuluvien siipikarjasta eristettyjen *Escherichia coli* -kantojen jakautuminen kymmeneen PFGE-tyyppiin. PFGE-profiileja analysoitiin Bionumerics-ohjelman (Applied Maths, Belgia) avulla. Optimoinnin arvo oli 1,00 % ja toleranssin 1,5 - 1,75 %.

PFGE-tyyppiä 6 (B2<sub>1</sub>/ST29/6) olevat kannat oli eristetty 23 siipikarjatilalta vuosina 2003–2006 erilaisista lähteistä. Näiden ominaisuudet on kuvattu taulukossa 13.

Taulukko 13. PFGE-tyypin 6 *Escherichia coli* -kantojen lähteet

Kanta eristetty	Kantojen määrä	
Lähde:	Sairas broileri	75
	Sairas kalkkuna	4
	Elintarvike	2
Tuotantopolvi:	Isovanhempaispolvi (1 tila)	11
	Vanhempaispolvi (13 tilaa)	44
	Teuraspolvi (10 tilaa)	21
Elin:	Maksa	27
	Sydän	13
	Perna	12
	Keuhko	7
	Munasarja	3
	Ruskuaispussi	1
	Ohutsuoli	1
	Aivot	1
Sairaus:	Systeminen kolibasilloosi	67
	Salpingoperitoniitti	6
	Kannibalismi	3
	Non starter	1
	Selluliitti	1
	Tulehdus ( <i>E. durans/coli</i> )	1

Kahdelta eri tilalta oli eristetty samanlaisen virulenssiprofiilin omaavia *Escherichia coli* -kantoja kalkkunoista, jotka olivat saman emoparven jälkeläisiä. Kannat tyypitettiin, sillä oli aihetta epäillä kantojen sukupolvesta toiseen siirtymistä. Kannat olivat myös genotyypiltään hyvin lähellä toisiaan (Different bands coefficient 98,01 %, Dice coefficient 94,12 %), mutta osoittautuivat kuitenkin eri kannoiksi. Näiden kantojen *Xba*I -restriktioprofiilit, dendogrammi ja virulenssiprofiili on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Saman emoparven jälkeläisistä eri tiloilta eristettyjen *Escherichia coli* -kantojen restriktioprofiilit ja dendogrammi. PFGE-profiileja analysoitiin Bionumerics-ohjelman (Applied Maths, Belgia) avulla. Optimoinnin arvo oli 1,00 % ja toleranssin 1,5 - 1,75 %.

## 6. POHDINTA

Eläinperäiset elintarvikkeet ovat yksi tärkeimmistä zoonoositartunnan eli eläimestä ihmiseen tarttuvan taudin lähteistä. Siipikarjan lihan on todettu sisältävän usein *Escherichia coli* -bakteeria, minkä vuoksi on aiheellista pohtia, onko niistä ihmiselle vaaraa. Siipikarjan APEC-bakteerien on todettu muistuttavan monilta ominaisuuksiltaan ihmisen ExPEC-bakteereja ja useiden arvioiden mukaan APEC-kannat välittävät virulenssigeenejä muun muassa ihmisen UPEC- ja NMEC-kantoihin. Virulenssitekijät tekevät bakteerista taudinaiheutuskykyisen. Kun bakteeri saa sopivat virulenssitekijät, se voi kiinnittyä isäntäsoluun, lisääntyä ja kolonisoitua, infektoida soluja, välttää elimistön puolustusmekanismeja, tuottaa toksineja ja aiheuttaa kudostuhoja. Eläimelle patogeeninen bakteeri voi olla myös ihmiselle patogeeninen, jos sillä on sopivat virulenssitekijät. *E. coli* -bakteerin ei ole osoitettu olevan erityisen isäntäspesifinen.

Tämän tutkimuksen aineisto oli laaja ja *E. coli* -kantoja saatiin tutkimukseen kattavasti erilaisista lähteistä, mikä mahdollisti aineiston monipuolisen tarkastelun ja vertailun. Kyseinen aineisto ei kuitenkaan ollut täydellinen, vaan jätti muutamia kysymyksiä, mitkä on syytä huomioida tulosten tarkastelussa. APEC-kannat oli eristetty sairaista linnuista, mutta kantojen virulenssia ei erikseen testattu. Näin ollen myös APEC-kantojen joukossa oli mahdollisesti vähemmän virulenteja kommensaaleja kantoja. Terveiden lintujen *E. coli* -kannat oli eristetty pääasiassa suolistosta, vain 18 kantaa oli eristetty elimistä suoliston ulkopuolelta. Suolistossa voi olla erityyppisiä *E. coli* -kantoja kuin muualla elimistössä. Tästä ei kuitenkaan saatu viitteitä vertaamalla terveiden lintujen suolistosta eristettyjä kantoja elimistä eristettyihin kantoihin. Jakaantuminen fylogeniaryhmiin oli samanlainen ja virulenssitekijöiden esiintyminen oli samanlaista lukuun ottamatta *cva*- ja *iss*-geenejä. Näiden virulenssigeenien osalta positiivisia oli tilastollisesti merkittävästi enemmän elimistä eristetyissä kannoissa. *cva*-geeni on kolisiini V -plasmidin rakennegeeni ja *iss*-geenin on todettu sijaitsevan kolisiini V -plasmideissa, joten näyttää siltä, että kolisiini V -plasmidia esiintyi useammin elimistä eristetyissä kannoissa.

Kaikkia tutkittuja virulenssitekijöitä esiintyi sairaista ja terveistä linnuista sekä elintarvikkeista eristetyissä kannoissa. Tämä kertoo siitä, että virulenssigeenit ovat varsin yleisiä siipikarjan kolibakteereilla. Myös niin sanotut kommensaalit kannat sisältävät vaihtelevasti erilaisia virulenssigeenejä, ja on mahdollista, että ne siirtävät virulenssigeenejä toisiin kantoihin. Sairaista linnuista eristettyjen APEC-bakteerien virulenssigeenien esiintyvyys vastasi pääosin aikaisempien tutkimuksien tuloksia. Ewersin ym. (2007) tutkimukseen verrattuna P-fimbriaa, vat-toksiinia ja K1-kapselia esiintyi enemmän tämän tutkimuksen APEC-kannoissa, ja tsh-kiinnittymistekijää, *ibeA*-invasiinia ja EAST1-toksiinia vähemmän. Rodriguez-Siekin ym. (2005) tutkimukseen verrattuna tämän tutkimuksen APEC-kannoissa esiintyi enemmän P-fimbriaa ja K1-kapselia ja tsh-kiinnittymistekijää vähemmän.

Siipikarjanlihaelintarvikkeista eristetyissä *E. coli* -kannoissa esiintyi yllättävän paljon virulenssigeenejä. Vaikka liha on oletettavasti peräisin terveistä linnuista, kaikkia tutkittuja virulenssigeenejä, vat-toksiinia koodittavaa geeniä lukuun ottamatta, löytyi enemmän elintarvikkeiden kolikannoista kuin terveiden lintujen kolikannoista. Erityisesti EAST1-toksiinin, iss-proteiinin ja K1-antigeenin geenejä, sekä rautaa kelatoivia sideforeja koodaavia *irp2*- ja *iucD*-geenejä esiintyi merkittävästi enemmän. EAST1-toksiinia koodittavaa *astA*-geeniä löytyi yli 43 %:lla kannoista, mikä oli merkittävästi enemmän kuin sairaiden lintujen kolikannoissa (9,5 %). On vaikea sanoa, mistä virulenssigeenien runsaus johtuu. On mahdollista, että *E. coli* -bakteereja päätyy siipikarjanlihaan teurastusvaiheessa tai sen jälkeen. Siipikarjanlihaelintarvikkeet pakataan yleensä suojakaasuun ja säilytetään viileässä, mitkä voivat olla selektiotekijöitä tietyn tyyppisille *E. coli* -kannoille. Myös mausteet ja marinadit voivat olla bakteerien lähteenä, mutta tästä ei saatu viitteitä.

*AstA*-geenin runsaus elintarvikenäytteissä näyttää liittyvän fylogeniaryhmään. Elintarvikkeiden kolibakteereista 69,5 %:lla fylogeniaryhmään D kuuluvista kannoista oli *astA*-geeni, kun A-ryhmän kannoista se oli 25,6 %:lla, B2-ryhmän kannoista 12,5 %:lla eikä yhdelläkään B1-ryhmän kannoista. Myös sairaiden ja terveiden lintujen kolikannoissa *astA*-geeni liittyi fylogeniaryhmään D. Huomattavaa on, että erityisen virulentin B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmän kannoista yhdessäkään ei ollut



*astA*-geeniä. *astA*-geeniä on aiemmissa tutkimuksissa löydetty runsaasti intestinaalisista *E. coli* -kannoista, kuten EHEC, EPEC ja EAEC-kannoista (Sousa 2003). Sen on arveltu liittyvän ripulia aiheuttaviin kantoihin, mutta yhteyttä ei ole vahvistettu.

B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmän kannat poikkesivat virulenssiprofiililtaan muista B2-ryhmän kannoista. *astA*-geenin lisäksi harvinaisia virulenssigeenejä olivat invasiivisuuteen liittyvä *ibeA*-geeni ja kiinnittymistekijää koodaava *tsh*-geeni, jotka olivat yleisiä muilla B2-ryhmän kannoilla. Muita virulenssigeenejä esiintyi enemmän B2<sub>1</sub>/ST29-ryhmän kannoissa. Erityisesti P-fimbrian, K1-antigeenin ja kolisiini V -plasmidin geenejä esiintyi merkittävästi enemmän tässä ryhmässä.

*E. coli* -kantojen fylogeniaryhmät testattiin PCR-menetelmällä (Bidet ym. 2007), jossa määritettiin neljän virulenssigeenin esiintymistä bakteerien genomissa. Menetelmä on nopea ja tarkka, mutta ei kuitenkaan täydellinen. Kaikista kannoista ei voida varmuudella sanoa, kuuluvatko ne ryhmään A vai B1. Clermontin ym. (2000) (jotka kehittivät alkuperäisen kolmen geenin fylogenia-PCR:n) mukaan 91 %:lla B1-ryhmään kuuluvista kannoista on TspE4.C2-fragmentti, mutta 9 %:lta se puuttuu. A- ja B1-ryhmä erotetaan toisistaan tämän fragmentin perusteella, joten näin ollen jotkut tämän PCR:n perusteella fylogeniaryhmään A luokiteltavat kannat saattavat kuulua fylogeniaryhmään B1. Fylogeniaryhmää on määritetty aiemmin multilokusentsyymielektroforeesin ja ribotyypityksen avulla, ja epäselvät tapaukset olisi voitu varmistaa näillä menetelmillä. Myös *stgC*-geenin on todettu erottavan A ja B1 fylogeniaryhmät toisistaan (Lymeropoulos ym. 2006), sillä *stgC*-geenin on raportoitu esiintyvän vain fylogeniaryhmien B1 ja D kannoissa. Myös tämän geenin esiintyminen olisi voitu tutkia PCR:n avulla. Mutta koska tämän tutkimuksen mielenkiinto kohdistui lähinnä virulentteihin fylogeniaryhmiin, ja aineisto oli laaja, tarkempaan analyysiin ei katsottu tarvetta.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että APEC-kannat, kuten muutkin ekstraintestinaaliset kolikannat, kuuluvat pääasiassa fylogeniaryhmiin B2 ja D. (Moulin-Schouleur ym. 2007, Picard y. 1999, Russo & Johnson 2000, 2003 Smith ym. 2007 mukaan) Myös tässä tutkimuksessa suurin osa (54,4 %) APEC-kannoista kuului fylogeniaryhmään B2, mutta jakaantuminen muihin

fylogeniaryhmiin oli tasaisempaa. APEC-kannoista 25 % luokiteltiin fylogeniaryhmään A, vain 11 % ryhmään D ja 9 % ryhmään B1. A-ryhmään kuuluvien kantojen osuutta voi nostaa se, että sairaista linnuista eristettyjen kantojen joukossa saattoi olla myös kommensaaleja kantoja. Terveistä linnuista eristetyistä kannoista luokiteltiin fylogeniaryhmään B2 kuuluvaksi 6,4 % ja elintarvikkeista eristetyistä kannoista 8,2 %. Määrä on merkittävästi pienempi kuin sairaista linnuista eristetyissä kannoissa, mikä vahvistaa B2-ryhmän liittyvän virulenttiuteen, mutta paljastaa myös, että patogeenisia kantoja voi esiintyä ihmisravinnossa. Lähes puolet (48 %) elintarvikkeista eristetyistä kannoista määritettiin kuuluvaksi fylogeniaryhmään D. Elintarvikkeiden kannoista yhteensä vain noin 38 % määritettiin kuuluvaksi fylogeniaryhmiin A ja B1, joiden on todettu liittyvän harmittomampiin kommensaaleihin kantoihin. Samansuuntaisen tuloksen olivat aiemmin saaneet myös Johnson ym. (2003), jotka tutkivat siipikarjanlihaelintarvikkeiden ExPEC-bakteereita Minneapolisin ja St. Paulin alueella Yhdysvalloissa. Heidän tutkimuksessaan 73,9 % ExPEC-bakteereista kuului fylogeniaryhmiin B2 tai D.

Tyypitettäessä *E. coli* -kantoja PFGE-menetelmällä patogeenisempaan fylogeniaryhmään B2<sub>1</sub>/ST29 kuuluvia kantoja oli 10 erilaista genotyyppiä. Kaikki tyypitetyt B2<sub>1</sub>/ST29-kannat olivat restriktioprofiililtaan hyvin lähellä toisiaan ja 76,4 % oli samaa genotyyppiä (B2<sub>1</sub>/ST29/6). Tätä kantaa oli eristetty kaikista tuotantopolven vaiheista: isovanhempaispolvesta, vanhempaispolvesta, sekä teuraslinnuista. On mahdollista, että kanta kulkeutuu sukupolvelta toiselle, mutta tätä ei voitu vahvistaa, sillä tarkkaa tietoa kasvatuseristä ei saatu, eikä tiettyjä vanhempia voitu yhdistää tiettyihin tuotantopolven lintuihin. B2<sub>1</sub>/ST29/6-kantaa oli eristetty sekä broilereista että kalkkunoista, ja sitä löytyi myös kahdesta elintarvikenäytteestä. Näytteet oli eristetty vuosina 2003–2006 23 siipikarjatilalta tai kasvattamolta. Linnuille B2<sub>1</sub>/ST29/6-kanta oli aiheuttanut pääasiassa kolibasilloosia, mutta myös muita tulehduksia. B2<sub>1</sub>/ST29/6-kannan löytyminen elintarvikenäytteistä kertoo siitä, että patogeeniset *E. coli* -kannat voivat päätyä elintarvikkeisiin ja välittyä ihmisille tätä kautta. Tämä vahvistaa elintarvikkeiden olevan mahdollinen leviämisreitti vaarallisille mikrobeille. Kolikantojen geneettinen samankaltaisuus kertoo siitä, että siipikarjan geneettinen samankaltaisuus pyramidimaisessa tuotantoketjussa voi

suosia tiettyjen bakteerikantojen leviämistä. Tulosten perusteella tällainen laajalle levinnyt kanta on patogeeninen B2<sub>1</sub>/ST29-kanta (virulenssiprofiili: *cva*, *vat*, *iucD*, *papC*, *irp2*, *iss*, *K1*), joka on aiheuttanut siipikarjatiloiilla paljon kolibasilloosia.

Kuinka vaarallinen *Escherichia coli* sitten on? Onko se zoonoottinen uhka? Täytyy muistaa, että *E. coli* on myös isännälleen hyödyllinen. Se muodostaa suolistoon normaaliflooran, joka estää patogeenisempien mikrobien kolonisaatiota. Se tuottaa myös K-vitamiinia. Infektioita *E. coli* aiheuttaa yleensä vain immuunipuolustukseltaan heikentyneessä isännässä. Väestörakenteen vanhetessa on tosin mahdollista, että *E. coli* -bakteerien aiheuttamat infektiot tulevat lisääntymään. *E. coli* on erittäin muuntautumiskykyinen, mikä johtunee sen yleisyydestä, nopeasta lisääntymisestä ja transformaatio-ominaisuuksista. Ihmisten ja lintujen kantojen on todettu olevan ominaisuuksiltaan paikoin hyvinkin samanlaisia. Tämä saa pohtimaan, miten lähellä ihmisten kantoja ovatkaan muiden eläinten *E. coli* -kannat. Teoreettisesti on mahdollista, että siipikarjan *E. coli* -kantojen joukossa kehittyy ihmiselle vaarallinen zoonoottinen kanta. On myös mahdollista, että tämä välittyisi elintarvikkeiden välityksellä. Siipikarjan lihaa on kuitenkin totuttu käsittelemään huolellisesti *Salmonella*-bakteerien välttämiseksi, ja tämä varmasti ehkäisee myös *E. coli* -bakteerin leviämistä. Tutkimuksen siipikarjanlihaelintarvikkeissa tavattiin *E. coli* -bakteeria, ja yllättävän suuri osa kannoista luokiteltiin patogeenisempiin fylogeniaryhmiin B2 ja D. Kaikkia tutkittuja virulenssitekijöitä esiintyi elintarvikkeista eristetyissä kannoissa. Lisäksi patogeenistä B2<sub>1</sub>/ST29/6-kantaa löytyi kahdesta elintarvikenäytteestä. Tämä antaa aihetta tarkkailla siipikarjan *E. coli* -kantoja jatkossakin.

## LÄHDELUETTELO

- Altekruse S.F, Elvinger F, DebRoy C, Pierson F.W, Eifert J.D & Sriranganathan N, 2002. Pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains from turkeys in a commercial operation. *Avian Dis* 46: 562-569.
- Andreishcheva & Vann, 2006. Gene products required for de novo synthesis of polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* 188(5): 1786-1797.
- Arnqvist A, Olsén A, Pfeifer J, Russell D.G & Normark S, 1992. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol Microbiol* 6(17): 2443-2452.
- Babai R, Blum-Oehler G, Stern B.E, Hacker J, & Ron E. Z, 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol Lett* 149: 99-105.
- Babai R, Stern B.E, Haecker J & Ron E.Z, 2000. New fimbrial gene cluster of S-fimbrial adhesion family. *Infect Immun* 68: 5901-5907.
- Beck E & Bremer E, 1980. Nucleotide sequence of the gene *ompA* coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 8(13): 3011–3027.
- Blanco J.E, Blanco M, Mora A & Blanco J, 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol* 35: 2953-2957.
- Bidet P, Metais A, Mahjoub-Messai F, Durand L, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Nassif X & Bonacorsi S, 2007. Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among B2 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73(7): 2373-2377.
- Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J & Denamur E, 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 177: 642-650.
- Birren B & Lai E, 1993. Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. Academic Press. San Diego.
- Bäumler A.J, Norris T.L, Lasco T, Voigt W, Reissbrodt R, Rabsch W & Heffron F, 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 180(6): 1446-1453.

- Carvalho de Moura A, Irino K, Vidotto M.C, 2001. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian Dis* 45(1): 173-181
- Chuba P.J, Leon M.A, Banerjee A & Palchaudhuri S, 1989. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Mol Gen Genet* 216: 287-292.
- Clermont O, Bonacorsi S and Bingen E, 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4555-4558.
- da Silveira W.D, Lancellotti M, Ferreira A, Solferini V.N, de Castro A.F, Stehling E.G & Brocchi M, 2003. Determination of the clonal structure of avian *Escherichia coli* strains by isoenzyme and ribotyping analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50(2): 63-69.
- de Lorenzo V, Bindereif A, Paw B.H, Neilands J.B, 1986. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 165(2): 570-578.
- Delicato E.R, de Brito B.G, Gaziri L.C.J & Vidotto M.C, 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 59: 79-87.
- Dho-Moulin M & Fairbrother J.M, 1999. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 30: 299-316.
- Doetkott D.M, Nolan L.K, Giddings C.W & Berryhill D.L, 1996. Large plasmids of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis* 40: 927-930.
- Dozois C.M, Fairbrother J.M, Harel J & Bossé M, 1992. *Pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* 60: 2648-2656.
- Dozois C.M, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C & Fairbrother J.M, 1994. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* 46: 713-716.
- Dozois C.M, Dho-Moulin M, Bree A, Fairbrother J.M, Desautels C & Curtiss III R, 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect immune* 68: 4145-4154.
- Ellis M.G, Arp L.H & Lamont S.J, 1988. Serum resistance and virulence of *E. coli* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* 46: 2034-2037.
- Emery D.A, Nagaraja K.V, Shaw D.P, Newman J.A & White D.G, 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chicken and turkeys. *Avian Dis* 36: 504-511.

- Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguéne C and Denamur E, 2004. A specific genetic background is required for acquisition expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21(6): 1085-1094.
- Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp H.C & Wieler L.H, 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* 104(1-2): 91-101.
- Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp H.C & Wieler L.H, 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis* 49(2): 269-273.
- Ewers C, Li G, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão E-M, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp H-C and Wieler L.H, 2007. Avian pathogenic, uropathogenic and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int J Med Microbiol* 297(3): 163-176.
- Falbo V, Pace T, Picci L, Pizzi E & Caprioli A, 1993. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 61(11): 4909-4914.
- Fratamico P.M & Smith J.L, 2006. *Escherichia coli* –infections. Teoksessa: H Riemann, D Cliver (toim.), *Foodborne infections and Intoxications*, 3rd edition. s.205-258. 520 s. Elsevier, New York.
- Garcia MI, Labigne A, Le Bouguenec C, 1994. Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking IS1 insertion sequences. *J Bacteriol* 176(24): 7601-7613.
- Germon P, Chen Y, He L, Blanco J.E, Brée A, Schouler C, Huang S & Moulin-Schouler M, 2005. IbeA, a virulence factor of avian *Escherichia coli*. *Microbiology* 151: 1179-1186.
- Gilson L, Mahanty H.K & Kolter R, 1990. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J* 9(12): 3875-3884.
- Ginns C.A, Benham M.L, Adams L.M, Whithear K.G, Bettelheim K.A, Crabb B.S & Browning G.F, 2000. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect Immun* 68: 1535-1541.
- Giovanardi D, Campagnari E, Ruffoni L.S, Pesente P, Ortali G & Furlattini V, 2005. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathol* 34(4): 313-318.

Gross W.G, 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. Teoksessa: C.L. Gyles (toim.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, s. 239-259. 666 s. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Guerrant R.L & Thielman N.M, 1995. Types of *Escherichia coli* enteropathogens. Teoksessa: M.J Blaser, P.D Smith, J.I Ravdin, H.B Greenberg and R.L Guerrant (toim.), *Infections of the Gastrointestinal Tract*. s. 687-707. 1319s. Raven Press, New York.

Guyer D. M., Kao J-S & Mobley H.L.T, 1998. Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. *Infect Immun* 66(9): 4411-4417.

Guyer D.M, Henderson I.R, Nataro J.P & Mobley H.L, 2000. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 38(1): 53-66.

Henderson I.R, Czczulin J, Eslava C, Noriega F & Nataro J.P, 1999. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 7(11): 5587-5596.

Herrero M, de Lorenzo V & Neilands J.B, 1988. Nucleotide sequence of the *iucD* gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *lacZ* gene fusions. *J Bacteriol* 170(1): 56-64.

Hess J, Wels W, Vogel M & Goebel W, 1986. Nucleotide sequence of a plasmid-encoded hemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence. *FEMS Microbiol Lett* 34: 1-11.

Huang S.H, Wan Z.S, Chen Y.H, Jong A.Y & Kim K.S, 2001. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression. *J Infect Dis* 183: 1071-1078.

Ike K, Kawahara K, Danbara H & Kume K, 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J Vet med Sci* 54: 1091-1098.

Jeffrey J.S, Singer R.S, O'Connor R & Atwill E.R, 2004. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in the broiler house environment. *Avian Dis* 48 (1): 189-195.

Johnson J.R & Stell A.L, 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181: 261-272.

- Johnson J.R, Delavari P & O'Bryan T, 2001a. *Escherichia coli* O18:K1:H7 isolates from acute cystitis and neonatal meningitis exhibit common phylogenetic origins and virulence factor profiles. *J Infect Dis* 183: 425-434.
- Johnson J.R, Delavari P, Kuskowski M & Stell A.L, 2001b. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 183: 78-88.
- Johnson J.R & Russo T.A, 2002a. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*." *J Lab Clin Med* 139: 155-162.
- Johnson J.R, Oswald E, O'Bryan T.T, Kuskowski M.A & Spanjaard L, 2002b. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* 185: 774-784.
- Johnson J.R, Murray A.C, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski M.A & Smith K.E, 2003. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2161-2168.
- Johnson, J.R, Delivari P, O'Bryan T.T, Smith K.E, Tatini S, 2005a. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathol Dis* 2: 38-49.
- Johnson J.R, Kuskowski M.A, Smith K, O'Bryan T.T. & Tatini S, 2005b. Antimicrobial-resistant and extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Retail Foods. *J Infect Dis* 191: 1040-1049.
- Johnson T.J, Skyberg J & Nolan L.K, 2004. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Dis* 48(2): 351-360.
- Johnson T.J, Johnson S.J & Nolan L.K, 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia colis* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol* 188(16): 5975-5983.
- Johnson T.J, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson S.J, Doetkott C, Skyberg J.A, Lynne A.M, Johnson J.R & Nolan L.K, 2007. Genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human ExPEC genomes. *J Bacteriol* 189(8): 3228-3236.
- Kammler M, Schön C, Hantke K, 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175(19): 6212-6219.



Kawano M, Yaguchi K & Osawa R, 2006. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiol Immunol* 50(12): 961-966.

Kiviruusu S, Rossow L, Perko-Mäkelä P, Helynranta E, Kaukonen E, Wiro P, Daka J, Raukola I, Sainmaa S, Kortensniemi P & Nauholz H, 2007. Vastustussuunnitelma muiden kuin lakisääteisesti vastustettavien siipikarjatautien varalta. Siipikarjautivastustusstrategiatyöryhmän mietintö. Verkkodokumentti. Päivitetty: 26.6.2007.

Saatavilla: [http://www.ett.fi/tiedostot/pdf/siipikarjan\\_tautivastustussuunnitelma.pdf](http://www.ett.fi/tiedostot/pdf/siipikarjan_tautivastustussuunnitelma.pdf).

Viitattu: 21.8.2007.

Korhonen T.K, Valtonen M.V, Parkkinen J, Väisänen-Rhen V, Finne J, Orskov F, Orskov I, Svenson S.B & Mäkelä P.H, 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* 48: 486–491.

La Ragione R.M & Woodward M.J, 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* 73: 27-35.

Linggood M.A, Roberts M, Ford S, Parry S.H & Williams P.H, 1987. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J Gen Microbiol* 133: 835-842.

Lukomski S, Hull R.A & Hull S.I, 1996. Identification of the O antigen polymerase (*rfc*) gene in *Escherichia coli* O4 by insertional mutagenesis using a nonpolar chloramphenicol resistance cassette. *J Bacteriol* 178(1): 240-247.

Lymberopoulos M.H, Houle S, Daigle F, Léveillé S, Brée A, Moulin-Schouleur M, Johnson J.R & Dozois C.M, 2006. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol* 188(18): 6449–6459.

Mammarappallil J.G. & Elsinghorst E.A, 2000. Epithelial cell adherence mediated by the enterotoxigenic *Escherichia coli* Tia protein. *Infect Immun* 68(12): 6595–6601.

Martins M.T, Rivera I.G, Clark D.L, Stewart M.H, Wolfe R.L & Olson B.H, 1993. Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Appl Environ Microbiol* 59(7): 2271–2276.

Maurer J.J, Brown T.P, Steffens W.L & Thayer S.G, 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 42: 106-118.

- McVeigh A, Fasano A, Scott D.A, Jelacic S, Moseley S.L, Robertson D.C & Savarino S.J, 2000. IS1414, an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun* 68(10): 5710–5715.
- Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois C.M, Curtiss R III, Brown P.K, Arné P, Brée A, Desautels C & Fairbrother J.M, 2002. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* 71: 536-540.
- Moch T, Hoschützky H, Hacker J, Kröncke K.D & Jann K, 1987. Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(10): 3462-3466.
- Moll A, Manning P.A & Timmis K.N, 1980. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 28(2): 359-367.
- Montenegro M.A, Bitter-Suerman D, Timmis J.K, Agüero M.E, Cabello F.C, Sanyal S.C & Timmis K.N, 1985. *TraT*-gene sequence, serum resistance, and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 131: 1511-1527.
- Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D & Schouler C, 2007. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45(10): 3366-3376.
- Myllyniemi A-L, Pitkälä A, Kaartinen L, Koppinen J, Pyörälä S, Ruoho O, 2007. FINRES-Vet 2001-2005. Eläimistä eristettyjen bakteerien mikrobilääkeresistenssi ja mikrobilääkkeiden käyttö eläimillä. *Eviran julkaisuja* 3/2007. 27 s. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Helsinki.
- Nataro J.P & Kaper J.B, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
- Neil M.A, Tarr P.I, Taylor D.N and Trofa A.F, 1994. *Escherichia coli*. Teoksessa: Y.H Hui, J.R Gorham, K.D Murrell and D.O Cliver (toim.), *Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria*, vol.1, s. 169-213. 613 s. Marcel Dekker, New York.
- Ngeleka M, Kwaga J.K, White D.G, Whittam T.S, Riddell C, Goodhope R, Potter A.A & Allan B, 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun* 64(8): 3118-3126.
- Ochman H and Selander R.K, 1984. Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations. *J Bacteriol* 157: 690-693.

- Olive D.M & Bean P, 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *J Clin Microbiol* 37(6): 1661-1669.
- Orskov I, Orskov F, Jann B & Jann K, 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 41(3): 667-710.
- Orskov F & Orskov I, 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 38(7): 699-704.
- Ott M, Hoschützky H, Jann K, Van Die I & Hacker J, 1988. Gene Clusters for S Fimbrial Adhesin (*sfa*) and F1C Fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: Comparative Aspects of Structure and Function. *J Bacteriol* 170(9): 3983-3990.
- Otto B.R, van Dooren S.J, Nuijens J.H, Luirink J, & Oudega B, 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J Exp Med* 188: 1091-1103.
- Parreira V.R & Gyle C.L, 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* 71: 5087-5096.
- Pavelka M.S. Jr, Wright L.F, Silver R.P, 1991. Identification of two genes, *kpsM* and *kpsT*, in region 3 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* 173: 4603-4610.
- Perko-Mäkelä P, Pohjanvirta T, Pelkonen S, Helynranta E, Kaukonen E, Viro P & Lehtonen J, 2005. Bakteriologinen ja epidemiologinen tutkimus lihasiipikarjan koli-infektioista ehkäisemisen tueksi. Hanke-suunnitelma. 8 s. EELA.
- Picard B, Garcia J.S, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J and Denamur E, 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *Infect Immun* 67: 546-553.
- Pickett C.L, Cottle D.L, Pesci E.C, Bikah G, 1994. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.* 62: 1046-1051.
- Pattus F, Massotte D, Wilmsen H.U, Lakey J, Tsernoglou D, Tucke A & Pasrker M.W, 1990. Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* 46(2): 180-192.
- Pfaff-McDonough S.J, Horne S.M, Giddings C.W, Ebert J.O, Doetkott C, Smith M.H & Nolan L.K, 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis* 44(1): 23-33.
- Pourbakhsh, S.A, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Martineau-Doize B & Fairbrother J.M, 1997. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally

inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 22: 331–341.

Provence D.L. & Curtiss III R, 1994. Isolation and characterisation of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 24: 562-564.

PulseNet USA, 2004. One-Day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.pulsenet-europe.org/docs.htm>. Viitattu:1.2.2008.

Reidl J & Boos W, 1991. The *malX malY* operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J Bacteriol* 173(15): 4862–4876.

Reid S.D, Selander R.K & Whittam T.S, 1999. Sequence diversity of flagellin (fliC) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(1):153-160.

Rhen M, Väisänen-Rhen V, Saraste M & Korhonen T.K, 1986. Organization of genes expressing the blood-group-M-specific hemagglutinin of *Escherichia coli*: identification and nucleotide sequence of the M-agglutinin subunit gene. *Gene* 49: 351-360.

Rodriguez-Siek K.E, Giddings C.W, Doetkott C, Johnson T.J, Fakhr M.K. & Nolan L.K, 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151: 2097-2110.

Ron E.Z, 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr Opin Microbiol* 9: 28-32.

Russo T.A & Johnson J.R, 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. *J Infect Dis* 181: 1753-1754.

Russo T.A, Carlino U.B & Johnson J.R, 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 9(10): 6209-6216.

Russo T.A & Johnson J.R, 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5: 449-456.

Sabri M, Léveillé S & Dozois C. M, 2006. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology* 152: 745-758.

- Salvadori M.R, Yano T, Carvalho H.F, Parreira V.R & Gyles C.L, 2001. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis 45: 43-51.
- Schildt M, 2004. Broilerituotteiden kampakylobakteerit kesällä 2003. Syventävien opintojen tutkielma. 59 s. Elintarvike- ja ympäristöhygienian laitos, Helsingin yliopisto, Helsinki.
- Schmidt H & Hensel M, 2004. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. Clin Microb Rev 17(1): 14-56.
- Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E & Heesemann J, 1998. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect Immun 66: 480-485.
- Schwartz D.C, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M & Cantor C.R, 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 47: 189-195.
- Shane S, 2001a. Coliform infections are responsible for heavy losses. World Poult 17(9): 58-59.
- Shane S, 2001b. Significant *E. coli* related conditions of poultry. World Poult 17(10): 35-37.
- Siitonen A & Vaara M, 2004. Mikrobiologia ja infektiosairaudet: *Escherichia coli*. Kustannus Oy Duodecim 2005. Verkkodokumentti. Saatavilla:  
[http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat\\_tmp.Naytaartikkeli?p\\_artikkeli=mbi00085](http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat_tmp.Naytaartikkeli?p_artikkeli=mbi00085).  
 Viitattu: 21.8.2007.
- Skyberg J.A, Johnson T.J, Johnson J.R, Clabots C, Logue C.M & Nolan L.K, 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. Infect Immun 74(11): 6287-6292.
- Smith J.L, Fratamico P.M and Gunther N.W, 2007. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis 4(2): 134-163.
- Sorsa J, 2007. Characterization of genomic diversity in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) and development of a diagnostic DNA microarray for the differentiation of ExPEC isolates causing urinary tract infections. 91 s. PhD thesis. University of Helsinki, Faculty of Biosciences and University of Munich, Faculty of Medicine. Helsinki.
- Sousa C.P, 2003. East1 toxin and its presence in a changing microbial world. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 9(1): 4-52.

Stawski G, Nielsen L, Orskov F & Oskov I, 1990. Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 98: 828-838.

Stehling E.G, Campos T.A, Azevedo V, Brocchi M & Silveira W.D, 2007. DNA sequencing of a pathogenicity-related plasmid of an avian septicemic *Escherichia coli* strain. *Genet Mol Res* 6(2): 331-337.

Suomen Siipikarjaliitto ry, 2007. Verkkodokumentti. Saatavilla: [www.siipi.net](http://www.siipi.net). Viitattu: 27.9.2007.

Syrjäläinen S, 2004. Shigatoksisten *Escherichia coli* -bakteerien esiintyminen ja leviäminen välikasvattamovasikoissa. Pro gradu -tutkielma. 91 s. Biokemian laitos, Kuopion yliopisto, Kuopio.

Tarr P.I, Bilge S.S, Vary J.C Jr, Jelacic S, Habeeb R.L, Ward T.R, Baylor M.R & Besser T.E, 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68(3): 1400-1407.

Tenover F.C, Arbeit R.D & Goering R.V, 1997: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection control and hospital epidemiology* 18: 426-439.

Tivendale K.A, Allen J.L, Ginns C.A, Crabb B.S & Browning G.F, 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 72: 6554-6560.

Torres A.G, Payne S.M, 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 23(4): 825-833.

Truscott R.B, 1973. Studies on the chicken-lethal toxin of *Escherichia coli*. *Can J Comp Med* 38: 160-167.

Töyrylä E, 2006. Kampsylobakteerit ja *Escherichia coli* siipikarjatuotteissa kesällä 2006. Syventävien opintojen tutkielma. 42 s. Elintarvike- ja ympäristöhygienian laitos, Helsingin yliopisto, Helsinki.

Vaara M, 1996. Mikä tekee bakteerista patogeenin? Teoksessa: A.S Tiilikainen, M Vaara & A Vaheri (toim.), *Lääketieteellinen mikrobiologia*, s. 265-269. 765 s. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.

Vaara M, Jahkola M & Siitonen A, 1996. *Enterobacteriaceae*-heimo (gramnegatiivisia sauvoja), *Escherichia coli*. Teoksessa: A.S Tiilikainen, M Vaara & A Vaheri (toim.), *Lääketieteellinen mikrobiologia*, s. 380-384. 765 s. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.

- Vaara M, Skurnik M & Sarvas M, 2004. Mikrobiologia ja infektiosairaudet: Bakteerien metabolia. Kustannus Oy Duodecim 2005. Verkkodokumentti. Saatavilla: [http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat\\_tmp.Naytaartikkeli?p\\_artikkeli=mbi00032](http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat_tmp.Naytaartikkeli?p_artikkeli=mbi00032). Viitattu: 21.8.2007.
- Vandemaele F, Vandekerchove D, Vereecken M, Derijcke J, Dho-Moulin M & Goddeeris B.M, 2003. Sequence analysis demonstrates the conservation of *fimH* and variability of *fimA* throughout avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 34(2): 153-163.
- van den Bogaard A.E, London N, Driessen C & Stobberingh E.E, 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 47: 763-771.
- Vandeputte-Rutten L, Kramer R.A, Kroon J, Dekker N, Egmond M.R, Gros P, 2001. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J* 20(18): 5033-5039.
- Veilleux S & Dubreuil J.D, 2006. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet Res* 37: 3-13.
- Verger D, Bullitt E, Hultgren S.J & Waksman G, 2007. Crystal structure of the P pilus rod subunit *PapA*. *PLoS Pathog* 3(5):e73.
- Vidotto M.C, Navarro H.R & Gaziri L.C.J, 1997. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 59: 79-87.
- Vidotto M.C, Queiroz M.B, de Lima N.C.S & Gaziri L.C.J, 2007. Prevalence of *ibeA* gene in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Mic* 119: 88-89.
- Waters V.L & Crosa J.H, 1991 Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* 55(3): 437-450.
- Williams P.H, 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 26(3): 925-932.
- Xie Y, Kim K.J & Kim K.S, 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocations of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 271-279.
- Yerushalmi Z, Smorodinsky N.I, Naveh M.W. & Ron E.Z, 1990. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infect Immun* 58: 1129-1131.
- Zapata G, Crowley J.M & Vann WF, 1992. Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product. *J Bacteriol* 174(1): 315-319.