

Were Nyandoto

ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyys kananmunissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan ko.

Opinnäytetyö

31.10.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Were Nyandoto ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan <i>Escherichia coli</i> - bakteerin esiintyvyys kananmunissa 32 sivua 31.10.2016
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan ko.
Ohjaaja(t)	Yliopistonlehtori Annamari Heikinheimo Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>ESBL- ja AmpC-β-laktamaasientsyymiä tuottavat <i>Escherichia coli</i> -bakteerit aiheuttavat lisääntyvästi infektioita ihmisillä. Kyseiset bakteerit ovat resistenttejä penisilliineille, toisen ja kolmannen polven kefalosporiineille sekä voivat kehittää resistenssin myös karbapeneemeille. ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavat <i>E. coli</i> -bakteerit voivat olla myös vastustuskykyisiä muiden resistenssimekanismien kautta esimerkiksi fluorokinoloneille. Resistenssigeenit, jotka sijaitsevat plasmideissa, voivat levitä tehokkaasti patogeenisten bakteerikantojen välillä, mikä mahdollistaa niiden tehokkaan leviämisen myös ympäristöön ja eläimiin. ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavat <i>E. coli</i> -bakteerit ovatkin levinneet ympäri maailmaa. Tuotantoeläimistä niitä esiintyy erityisesti broilerituotannossa</p> <p>Suomessa on raportoitu ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavien <i>E. coli</i> -bakteerien esiintyvyydeksi broilerituotannossa vain 8 %. Esimerkiksi osassa Keski-Euroopan maissa esiintyvyydeksi on arvioitu huomattavasti yli puolet tutkituista linnuista. Suomen alhaisen esiintyvyyden muihin Euroopan maihin verrattuna epäillään johtuvan siitä, ettei Suomen tuotantopölvien broilereilla käytetä mikrobilääkkeitä. Kananmunat ovat myös mahdollinen ESBL-AmpC-tuottavan <i>E. coli</i> -bakteerin kontaminaation kohde. Ei ole olemassa tarkkaa tietoa voiko kyseinen bakteeri levitä kanasta munaan esimerkiksi suoraan infektoituneesta yksilöstä ennen munintaa tai kontaminoituneesta ympäristöstä muninnan jälkeen munankuoreen ja edelleen penetroitua kuoren ilmakehän läpi munan sisäosiin.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavien <i>E. coli</i> -bakteerien esiintyvyyttä 100:ssä vähittäismyynnin kananmunasta pinta- ja kuorimurskanäytteistä. Bakteerien eristys suoritettiin Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA:n protokollan mukaan. Isolaateille määritettiin antibioottiherkkyysprofiilit kiekkodiffuusiomenetelmällä. Hypoteesina oli, että esiintyvyyttä ei havaita tai se on hyvin pieni. Lisäksi työssä määritettiin kokonaisbakteerimäärä 10:stä munasta pinnasta ja kuorimurskasta sekä tutkittiin <i>E. coli</i> -bakteerin esiintyvyyttä. Munien pinnasta oletettiin löytyvän enemmän bakteereja kuin kuorimurskasta.</p> <p>Työssä tutkituista kananmunista ei löytynyt ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavia <i>E. coli</i> -bakteereita, jota saattoi myös odottaa Suomessa bakteerin alhaisen esiintyvyyden vuoksi. <i>E. coli</i> -bakteeria esiintyi 6 %:ssa tutkituista munista. Bakteereita esiintyi myös oletetusti enemmän kananmunan pinnassa kuin kuorimurskanäytteissä.</p>	
Avainsanat	ESBL, AmpC, <i>Escherichia coli</i> , kananmuna, β -laktamaasi

Author(s) Title Number of Pages Date	Were Nyandoto Investigation of ESBL and AmpC producing <i>Escherichia coli</i> in chicken eggs 32 pages 31. October 2016
Degree	Batchelor of Laboratory Services
Degree Programme	Degree Programme in Laboratory Sciences
Instructor(s)	Annamari Heikinheimo, DVM, PhD University lecturer Jarmo Palm, Head of Degree Programme in Laboratory Sciences, Senior Lecturer
<p>ESBL and AmpC β-lactamase producing <i>Escherichia coli</i> -bacterias are increasingly causing infections in humans. They are resistant to penicillins as well as to 2nd and 3rd generation cephalosporins. Some strain may also create resistance towards carbapenems and sometimes towards fluoroquinolones via different resistance mechanisms. Since the genes encoding resistance are often located in plasmids, they can easily be distributed between bacterial strains and species. In production animals, these bacteria have spread globally especially in broiler production.</p> <p>Only 8 % of Finnish broilers have been reported to carry ESBL and AmpC producing <i>E. coli</i> -bacteria. The number is notably lower than in many central European countries. Low rate in Finland is suspected to derive from the fact that antimicrobials are not used in broilers. Chicken eggs may also be contaminated straight from infected mother-bird before laying the egg or after laying by contaminated environment. After egg shell is contaminated, bacteria may penetrate into the egg content through egg shell's pores.</p> <p>In this study 100 commercial chicken eggs were investigated through egg shell- and shell crush samples. Isolation of bacteria was accomplished by following laboratory protocol recommended by the European Food Safety Authority. Hypothesis for the study is that the presence of ESBL and AmpC producing <i>E. coli</i> -bacteria is low or none is found. Presence of <i>E. coli</i> -bacteria and total bacterial count were also investigated in this study. The number of bacteria on egg shell is expected to be higher than in shell crush.</p> <p>Results showed that ESBL and AmpC producing <i>E. coli</i> -bacterias were not found because of the low presence of the bacteria in Finnish broilers. <i>E. coli</i> was present in 6 % of investigated eggs. Total bacterial count results also showed that the microbes appeared a lot more on the egg shell than in the shell crush as expected.</p>	
Keywords	ESBL, AmpC, <i>Escherichia coli</i> , chicken egg, β -lactamase

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Kananmunan rakenne	2
2.2	β -laktaamit	4
2.3	β -laktamaasit	5
2.3.1	ESBL- β -laktamaasit	6
2.3.2	AmpC- β -laktamaasit	7
2.4	<i>Enterobacteriaceae</i> -heimo	7
2.5	<i>Escherichia coli</i>	8
2.5.1	Esiintyminen elintarvikkeissa	9
2.5.2	ESBL/AmpC- <i>E. coli</i> -bakteerin esiintyvyys siipikarjalla	9
2.5.3	Leviäminen eläinten, elintarvikkeiden ja ihmisten välillä	10
2.6	ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan <i>Escherichia coli</i> -bakteerin osoittaminen	10
2.6.1	<i>Escherichia coli</i> lajinmääritys	10
2.6.2	Mikrobilääkeherkkyyden osoittaminen	11
3	Tutkimuksen tarkoitus	12
4	Materiaalit ja menetelmät	12
4.1	Näytteet	12
4.1.1	Kananmunan pintanäytteet	13
4.1.2	Kananmunan kuorimurskanäytteet	13
4.2	Kananmunan aistinvarainen tutkiminen	14
4.3	Esirikastus	14
4.3.1	Pintanäytteen esirikastus	14
4.3.2	Kuorimurskanäytteen esirikastus	14
4.4	Kokonaisbakteerimäärä	14
4.5	<i>Escherichia coli</i> -bakteerin esiintyvyys	15
4.6	ESBL/AmpC-entsyymiä tuottavan <i>Escherichia coli</i> -bakteerin esiintyvyys	16
4.7	Lajinmääritys	16
4.8	Mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen	16
5	Tulokset	19

5.1	Aistinvarainen tutkiminen	19
5.2	Kokonaisbakteerimäärä	19
5.3	<i>Escherichia coli</i> –bakteerin esiintyvyys	20
5.4	ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan <i>Escherichia coli</i> -bakteerin esiintyvyys kananmunan pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä	21
5.5	Mikrobilääkeherkkyysmäärittelyn tulokset	23
6	Tulosten tulkinta	24
6.1	Kokonaisbakteerimäärä	24
6.2	<i>Escherichia coli</i> -bakteerin esiintyvyys	26
6.3	ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan <i>Escherichia coli</i> -bakteerin esiintyvyys kananmunan pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä	26
6.4	Mikrobilääkeherkkyysmäärittely	27
7	Johtopäätökset	27
	Lähteet	29

Lyhenteet

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL/AmpC- β -laktamaasit	Laajakirjoiset β -laktamaasientsyymit. Ominaisuuteen voidaan liittää moniresistenttisyys
HUS	Hemolyyttinen ureeminen syndrooma
ECOFF-arvot	epidemiological cut-off values
MCC+CTX	MacConkey + kefotaksiimi
CTX	Kefotaksiimi
TAZ	Keftatsidiimi
FOX	Kefoksiitiini
FEB	Kefepiimi
MERO	Meropeneemi
CTX+C	Kefotaksiimi + klavulanaatti
TAZ+C	Keftatsidiimi + klavulanaatti

1 Johdanto

ESBL ja AmpC β -laktamaaseja (laajakirjoiset β -laktamaasit) tuottavat *Escherichia coli* -kannat ovat olleet viime vuosina suuri ongelma erityisesti ihmislääketieteessä. ESBL ja AmpC-*E. coli* -bakteerin aiheuttamat komplikaatiot ja tulehdukset potilaissa eivät useimmiten vastaa tavallisiin penisilliini- tai kefalosporiinihoitoihin (EFSA BIOHAZ Panel 2011). ESBL ja AmpC resistenssimekanismeja koodaavat geenit sijaitsevat bakteerien plasmideissa, jonka vuoksi ne pystyvät leviämään melko helposti bakteerien välillä. Jotkin *E. coli* -kannat pystyvät kehittämään resistenssin myös karbapeneemeille, jotka ovat ainoa tehoava lääke tietyille ESBL/AmpC-*E. coli* -kannoille. ESBL/AmpC-*E. coli* on pääosin aiheuttanut aiemmin sairaalainfektioita, mutta 2000-luvulla CTX-M-tyyppin geenin omaavat kannat ovat lisääntyneet huomattavasti avohoitopotilailla (EFSA BIOHAZ Panel 2011, Paterson 2000).

ESBL/AmpC β -laktamaaseja tuottavia *E. coli* -bakteereita on havaittu esiintyvän myös tuotantoeläinten normaalin bakteeriflooran seassa. Erityisesti tuotantobroilerit ovat osoittautuneet merkittäviksi kantajiksi, ja useassa maassa sitä on havaittu suurissa määrin myös broilerin lihassa. Ihmisten välillä tapahtuneet ESBL/AmpC-*E. coli* -tartunnat ovat merkittäviä, mutta erityisesti avohoidon tapausten yleistyminen saattaa viitata myös muuhunkin tartunnanlähteeseen. Esimerkiksi siihen, voiko ihminen saada ESBL/AmpC-*E. coli* -tartunnan syömällä broilerinlihaa tai pystyvätkö bakteerikannat siirtymään kanasta suoraan kananmuniin. Tutkimukset ovat osoittaneet, että Suomessa ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteerin esiintyvyys broilereissa on melko alhaista, vain 8 %. Ruotsissa esiintyvyys on huomattavasti korkeampi, jopa 54 %, vaikka Suomen ja Ruotsin broilerituotanto on hyvin samankaltaista. Suomessa on luovuttu mikrobilääkkeiden käytöstä tuotantopolven broilereilla useita vuosia sitten. Mikrobilääkkeitä käytetään myös Ruotsissa harvoin (Geser ym. 2012, Laube ym 2013, Nauholz ym. 2014, SVARM 2012, Swerdres-Svarm 2015).

Kananmunat sisältävät runsaasti tärkeitä proteiineja, aminohappoja, välttämättömiä vitamiineja ja mineraaleja, joita ihminen tarvitsee pysyäksensä terveenä. Kananmunan kuori voi kontaminoitua joko jo munan muodostuessa kanan yhteissuolessa (cloacae) tai ympäristön vaikutuksesta muninnan jälkeen. Tutkimukset osoittavat, että bakteerit kananmunan pinnalla kykenet läpäisemään munankuoren siinä olevien ilmakanavien kautta ja edelleen kontaminoimaan munan sisäosan (Chaemsanit 2015, Theron 2003).

Kananmunankuoren mikroflooraa hallitsevat pääasiassa Gram-positiiviset bakteerit. Kananmunankuoren kontaminoi useiten *Staphylococcus-suvun* bakteerit (Chaemsanit 2015). Gram-negatiivisilla bakteereilla on kuitenkin paremmat mekanismit läpäistä kananmunan sisäiset anti-mikrobiset vaikutukset. Vaurioituneista kananmunista on löytynyt mm. *E. coli*-, *Enterobacter spp.*-, *Citrobacter spp.*-, *Klebsiella spp.*-, *Alcaligenes spp.*-, *Aeromonas spp.* ja *Pseudomonas spp.* -bakteereita. Edellä mainitut bakteerit kykenevät pilaamaan kananmunan ja pystyvät leviämään ruokaketjuun munien kautta ja aiheuttamaan ruokamyrkytyksiä (Stepien-Pysniak 2010). Suurinosa kananmunan tutkimuksista keskittyy *Salmonella* -bakteerin esiintyvyyteen kananmunan kuorella sekä munan sisälmyksissä, koska *Salmonella enteritidis* -bakteerin aiheuttamat infektiot, jotka ovat peräisin kananmunista, ovat suuri terveysriski (Abdullah 2010, Theron 2003).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa *Escherichia coli* -bakteerin ja ESBL/AmpC β -laktamaaseja tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyyttä vähittäismyyntin kananmunissa. Suomessa esiintyvyyttä kananmunissa ei ole aikaisemmin tutkittu eikä kyseisestä aiheesta ole muualla maailmalla julkaistu monia artikkeleita, joista laajaa dataa esiintyvyydestä saisi. Suomessa broilerien alhaisen ESBL/AmpC β -laktamaaseja tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyyden vuoksi, oletuksena on että, ESBL/AmpC -kantoja ei löydy tai esiintyvyyttä on erittäin pieni (Päivärinta ym 2015). Työssä tutkittiin myös kokonaisbakteerimäärä kananmunan pinnasta ja kuorimurskasta. Työ suoritettiin Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisessä tiedekunnassa elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osaston tutkimuslaboratoriossa

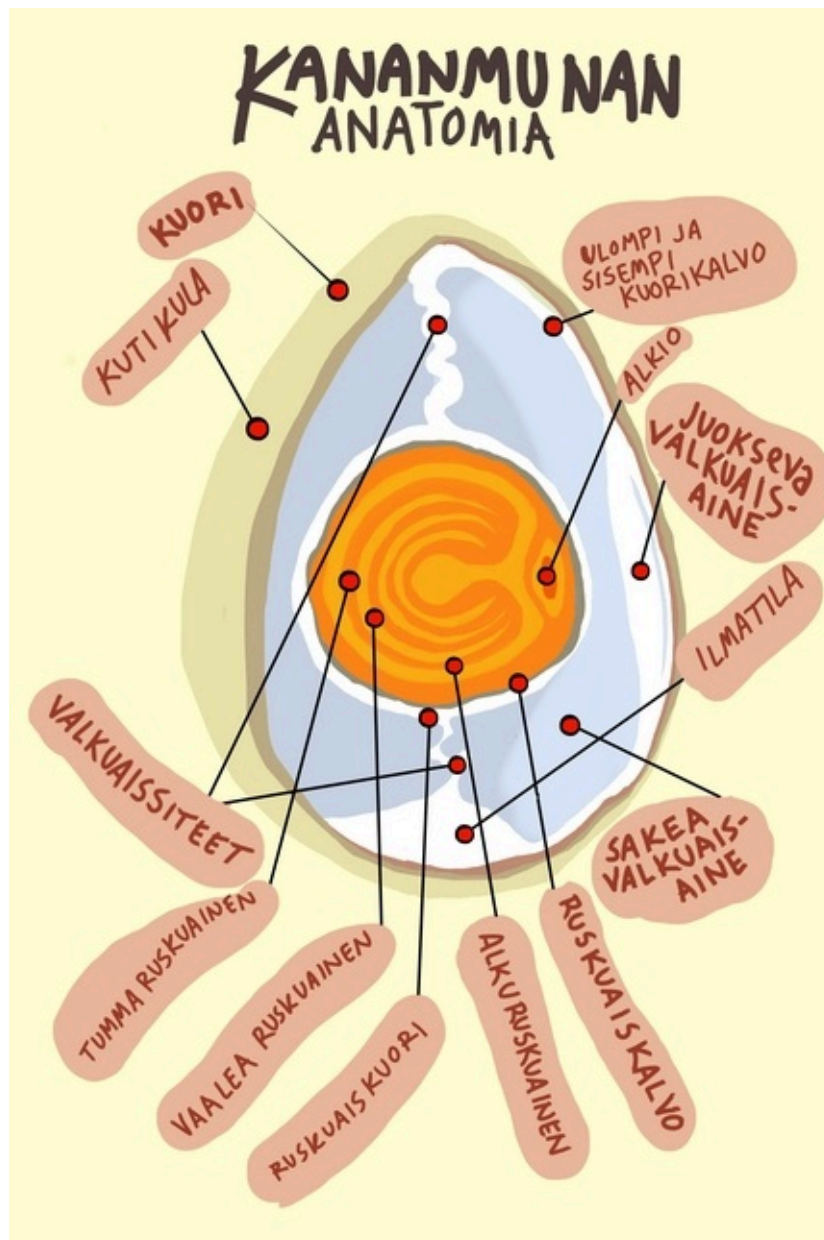
2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kananmunan rakenne

Kananmuna koostuu kutikulasta, ilmatilasta, valkuaisiteistä, huokosista kananmunan ulkokuorella, sakeasta valkuaisesta, juoksevasta valkuaisesta, keltuaiskalvosta, alkiolevystä, alkukeltuaisesta, tummasta keltuaisesta, vaaleasta keltuaisesta, kuoresta sekä ulommasta- ja sisemmästä kuorikalvosta (farmit, Hincke 2012).

Kutikula on kananmunan uloin erittäin ohut vahamainen kalvo, jonka tehtävänä on estää bakteerien penetraatio munan sisään. Kananmunan kuori koostuu pääosin kalsiumkarbonaatista ja voi olla ruskean tai valkean värinen. Kananmunankuoren värillä ei ole vaikutusta munanlaatuun, makuun tai ruoanvalmistusominaisuuksiin eikä kuoren paksuuteen. Kananmunan ilmakehät muodostavat näkyviä huokosia kuoreen, joiden tehtävänä on päästää munaan ilmaa ja mahdollistaa veden haihtuminen munasta pois. Ulompi- ja sisempi kuorikalvo ympäröivät valkuaisista ja kalvot estävät tehokkaasti bakteerien penetraatiota kananmunan sisään. Keltuaiskalvo ympäröi kananmunan keltuaista, joka vanhetessaan heikkenee. Munan valkuaisiteiden rooli on pitää keltuainen kasassa ja oikeassa paikassa sekä asennossa kananmunan keskellä. Ilmatila muodostuu ulomman- ja sisemmän kuorikalvon väliin kananmunan paksumpaan päähän, johon kananmunan sisällön konsentraation muutoksista kananmunan viiletessä muninnan jälkeen. Ilmatila kasvaa kun kananmuna vanhenee. Ilmatilaa tarkastelemalla voidaan arvioida kananmuna ikää ja kuntoa. Juokseva valkuaisaine on lähimpänä kananmuna kuorta ja levittäytyy sakean valkuaisaineen ympärille täydellisesti hyvälaatuisessa kananmunassa. Kananmunan ikääntyessä sakea valkuaisaine muuttuu vetisemmäksi ja alkaa muistuttamaan enemmän juoksevaa valkuaisainetta. Yhdessä valkuaisaineet suojaavat kananmunan keltuaista bakteereilta (farmit, Hincke 2012).

Kananmunan valkuaisessa olevalla albumiinilla on runsas antimikrobinen vaikutus erilaisten bakteerien kasvun kannalta kananmunan sisällä. Lysotsyymi on yksi tärkeimmistä albumiiniproteiineista, joka estää mikrobien kasvua. Ovomusiini on myös eräs tärkeä albumiinin proteanaasi, joka estää bakteerin kykyä käyttää valkuaisaineessa olevia proteiineja (Chaemsanit 2015). Kananmunan rakenne on esitetty kuvassa 1.



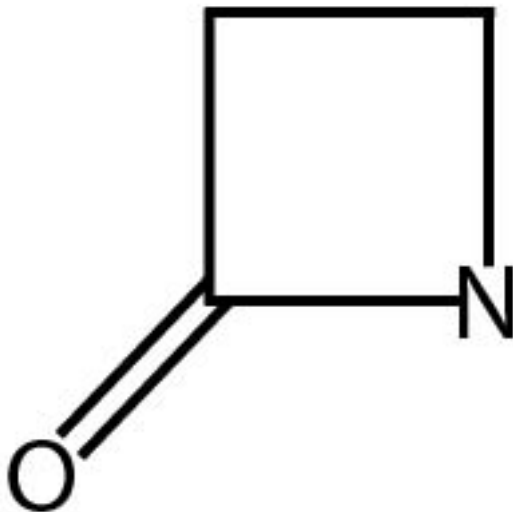
Kuva 1. Kananmunan rakenne (kanatieto).

2.2 β -laktaamit

β -laktaamit ovat mikrobilääkkeitä, jotka estävät bakteerin soluseinän synteesiä, jolloin transpeptidaatioreaktio inhiboituu ja bakteeri kuolee. β -laktaamit sitoutuvat PBP-proteiineihin (penicillin-binding proteins), jotka sijaitsevat bakteerin soluseinässä. Jotta lääkkellä olisi vaikutusta on sen läpäistävä ensin bakteerin uloin kerros poriinikanavien kautta. Esimerkiksi Gram-negatiivisilla bakteereilla soluseinän ulkokalvo on ensin läpäistävä, jotta lääke kykenee saavuttamaan proteiinin, johon se voi kiinnittyä. Gram-

positiiviset bakteerit ovatkin usein herkempiä β -laktaameille ohuemman soluseinän ulkokalvon takia (Papich & Riviere 2009).

β -laktaamiantibiootit rakentuvat β -laktaaminelirenkaasta. Nelirengas muodostuu kolmesta hiiliatomista, yhdestä typpiatomista ja yhteen hiiliatomeista on kiinnittynyt happiatomi kaksoissidoksella. Mikäli nelirengas pääsee hydrolysoitumaan ja hajomaan, on lääkemolekyylillä tehoton (Papich & Riviere 2009). Osa bakteereista kykenee tuottamaan β -laktamaasientsyymiä, joka hajottaa lääkemolekyylin nelirenkaan. β -laktaamiantibiootit voidaan karkeasti jaotella penisillineihin, karbapeneemeihin, monobaktaameihin sekä 1.-4. polven kefalosporiineihin (Männistö & Tuominen 2012b, Papich & Riviere 2009). β -laktaaminelirenkaan rakenne on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. β -laktaaminelirenkaan rakenne (science.unctv.org).

2.3 β -laktamaasit

Osa *E. coli* -bakteerikannoista pystyy tuottamaan β -laktamaasientsyymejä, joilla bakteeri pystyy vastustamaan β -laktaamiantibioottien bakterisidisiä vaikutuksia. β -laktamaasientsyymit hydrolysoivat β -laktaamin nelirenkaan, jolloin sen antimikrobinen vaikutus katoaa. *E. coli*:n tuottama β -laktamaasientsyymi on bakteerin tärkein resistenssimekanismi, jolla se pystyy tuhoamaan penisillinejä sekä ensimmäisen ja

toisen polven kefalosporiineja. ESBL/AmpC-tyypin β -laktamaasit kykenevät myös hydrolysoimaan kolmannen polven kefalosporiineja. Metallo- β -laktamaasit sekä tietyt seriini- β -laktamaasit pystyvät hajottamaan kefalosporiinien lisäksi myös karbapeneemejä (Bush & Jacoby 2010, EFSA BIOHAZ Panel 2011, Männistö & Tuominen 2012b.).

β -laktamaasit luokitellaan usein ryhmiin A–D niiden molekyyliarakenteen perusteella, mutta ne voidaan luokitella myös ryhmiin 1–3 perustuen siihen, mitä mikrobilääkettä entsyymi inhiboi ja mikä on entsyymin vaste tiettyihin inhibiittoreihin. ESBL- β -laktamaasit luokitellaan ryhmiin A ja D tai ryhmään 2. AmpC- β -laktamaasit luokitellaan ryhmään C tai 1 (Ambler 1980, Bush & Jacoby 2010, Huovinen ym. 1988, Jaurin & Grundström 1981).

β -laktameille vastustuskykyinen bakteeri on usein vastustuskykyinen myös monille muille mikrobilääkkeille, koska β -laktamaaseja koodaavat geenit sijaitsevat usein suurten plasmidien integronissa, missä sijaitsevat myös monet muutkin mikrobilääkeresistenssiä aiheuttavat geenit. Tämän takia kyseiset bakteerit ovat usein myös resistenttejä aminoglykosideille, tetrasykliineille, sulfoamideille, trimetopriimille ja kloramfenikolille (Hanson ym 1999, Jacoby & Munoz-Price 2005).

2.3.1 ESBL- β -laktamaasit

ESBL- β -laktamaaseille on vuosien kuluessa annettu erilaisia määritelmiä. Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen (EFSA) määritelmän mukaan ESBL- β -laktamaasit ovat entsyymejä, joita tuottavat bakteerikannat ovat vastustuskykyisiä penisilliineille, 2.-4. polven kefalosporiineille sekä monobaktaameille, mutta ovat yleensä kuitenkin herkkiä karbapeneemeille ja kefamysiineille. Klavulaanihappo inhiboi bakteerin resistenssimekanismissa tämän määritelmän mukaan. *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereista ESBL-entsyymin tuotantoa esiintyy tyypillisimmin *E. coli*- ja *K.pneumoniae* -bakteereilla, joiden tuotantoa ohjaa niiden plasmideissa olevat geenit. 1900-luvun lopulla SHV- ja TEM-geeniperheet olivat ihmisillä yleisimmät ESBL-entsyymitypit (EFSA BIOHAZ Panel 2011).

Tunnettuja ESBL-geeniperheitä ovat muun muassa SHV, TEM, CTX-M, OXA, PER, VEB, GES, IBC, SFO ja TLA (Jacoby & Munoz-Price 2005). Bakteerin perimästä voi myös löytyä useampia eri geeniperheisiin kuuluvia ESBL-entsyymiä koodaavia geenejä. (Patterson ym. 2003). 2000-luvulla *E. coli* on noussut yleiseksi ESBL-

tuottajaksi ja sairaaloiden ulkopuoliset ESBL-infektiot ovat yleistyneet suuresti ja CTX-M:stä on tullut tyypillisin ESBL-geeniperhe. Uusia ESBL geeniperheitä tunnistetaan jatkuvasti (Livermore ym. 2007).

2.3.2 AmpC- β -laktamaasit

AmpC- β -laktamaasit ovat kefalosporinaaseja, joita esiintyy bakteerin kromosomaalisessa DNA:ssa. Erityisesti niitä löytyy Gram-negatiivisista bakteereista, mutta ei kuitenkaan esimerkiksi *Klebsiella*- tai *Salmonella*-sukujen bakteereilta. AmpC- β -laktamaasientsyymiä tuottavat bakteerit ovat vastustuskykyisiä penisillineille sekä toisen ja kolmannen polven kefalosporiineille. AmpC entsyymiä tuottavat bakteerit eivät kuitenkaan ole yleensä vastustuskykyisiä neljännen polven kefalosporiineille ja karbapeneemeille. Esimerkiksi kloksasilliini inhiboi AmpC- β -laktamaaseja, ja tätä ominaisuutta voidaan käyttää AmpC-entsyymien havainnoimisessa. Ihmisillä yleisimmin havaittu AmpC-geeni on *bla*_{CMY-2}, joka kuuluu CIT geeniperheeseen. Muita tunnettuja AmpC-geeniperheitä ovat esimerkiksi FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX, CFE ja DHA (ESFSA BIOHAZ Panel 2011, Jacoby 2009).

2.4 *Enterobacteriaceae*-heimo

Enterobacteriaceae-heimoon kuuluu bakteerilajeja, jotka ovat pääasiallisia ja opportunistisia taudinaiheuttajia. Heimoon kuuluu myös tautia aiheuttamattomia lajeja, joita esiintyy myös normaalisti ruoansulatuskanavassa. Useat heimoon kuuluvista lajeista liikkuvat uintisiimojen avulla. *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluu yli 40 eri bakteerisukua ja yli 180 eri lajia. Bakteerit ovat oksidaasinegatiivisia, katalaasipositiivisia ja Gram-negatiivisia sauvoja, jotka kykenevät fermentoimaan glukoosia ja lajista riippuen myös muita sokereita. Osa heimoon kuuluvista lajeista pystyvät myös muuttamaan nitraattia nitriitiksi. *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvat lajit sietävät hapellisia ja myös melko hyvin hapettomia olosuhteita kasvaessaan eivätkä ne tuota itiöitä (Quinn ym. 2011).

Osa *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereista kuuluvat suoliston normaaliflooraan ja ne ovatkin levinneet ympäri maailman ihmisten ja eläinten suolistojen toimiessa niiden kantajina. Ulosteen mukana bakteerit voivat myös kontaminoida maaperää, vettä ja kasvillisuutta. Patogeeniset *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerit taas leviävät pääosin

infektoituneen yksilön ulosteen mukana. Patogeenisiä *Enterobacteriaceae*-heimon lajeja ovat muun muassa tietyt *E. coli*-, *Salmonella*- ja *Yersinia*-kannat, jotka pystyvät aiheuttamaan kliinisiä oireita niin ruoansulatuskanavassa kuin muuallakin elimistössä ihmisillä ja eläimillä (Quinn ym. 2011).

2.5 *Escherichia coli*

E. coli on *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluva bakteerilaji. Se on yleensä liikkuva bakteeri, joka fermentoi laktoosia ja useita muita sokereita (Quinn ym. 2011). Bakteerin kasvuolosuhteet vaihtelevat kannoista riippuen ja bakteerin sietämät kasvu- ja elämislämpötilat vaihtelevat noin 7-8 °C:ssa. *E. coli* kykenee myös kasvamaan melko korkeissa lämpötiloissa verrattuna useaan muuhun bakteerilajiin, jopa 44-46 °C:ssa. Ideaalinen kasvu- ja elämislämpötila *E. coli* -bakteerille on 35-40 °C. *E. coli* säilyy jääkaappilämpötiloissa pitkään ja kestää myös pakastusta. Kasvuolosuhteiden suhteen *E. coli* ei ole vaativa ja kasvuolosuhteista voidaan saada happamimmillaan pH 4,4 ja emäksisimmillään pH 9,0. Ihanteellisin pH *E. coli* -kasvuun on 6-7 (ICMSF 1996).

Vastasyntynyt yksilö saa pian *E. coli*:n suoliston bakteeristoon, koska *E. coli* kolonisoii useimpien selkärankaisten ileumin ja paksusuolen pian syntymän jälkeen. *E. coli* -kantoja, jotka aiheuttavat suolistotulehduksia, ei kuitenkaan yleensä löydy kuin ainoastaan kliinisesti tai subkliinisesti infektoituneilta yksilöiltä. Patogeenisten *E. coli* -kantojen leviämisen eläimillä yksilöstä toiseen aiheuttaa yleisesti erittäin suuri populaatiokokoo pienessä tilassa, stressi ja huonot hygieniakäytännöt. Alle viikon ikäisillä yksilöillä on suurempi riski saada infektio, sillä niiden suoliston normaalifloora ei ole vielä täysin kehittynyt (Quinn ym. 2011).

Useimmilla *E. coli* -kannoilla ei ole merkittävää virulenssia. Varsinaiset patogeeniset *E. coli* -kannat pystyvät kolonisoimaan limakalvoja ja siten edelleen sairastuttamaan yksilöitä virulenssitekijöidensä ansiosta. Yksilön heikko immuunipuolustusjärjestelmä altistaa herkemmin patogeenisten kantojen kolonisaatiolle. Bakteerin kolonisaatiota edistää myös tietynlainen ruokavalio ja etenkin patogeenin suuri määrä ympäristössä. *E. coli* -bakteerin virulenssitekijöihin kuuluvat kapseli, endotoksiini, adherenssiin ja kolonisaatioon vaikuttavat rakenteet sekä enterotoksiinit ja muut bakteerin erittämät yhdisteet. Endotoksiinin lisäksi *E. coli* -bakteerin patogeenisyys johtuu pääasiassa enteroto-, shiga- tai verotoksiinien tai CNF1:n (cytotoxic necrotizing factor 1) tuotannosta.

E. coli on ihmisillä ja eläimillä tyypillisin syyppää virtsatientulehduksiin ja bakteremiaan (Quinn ym. 2011).

2.5.1 Esiintyminen elintarvikkeissa

Ulosteen mukana *E. coli* kykenee leviämään käytännössä minne tahansa ympäristössä. Sitä esiintyy lisäksi ristikontaminaatioina teurastamoilla ja lypsytiloilla, joilta se voi levitä edelleen elintarvikkeisiin. Myös kontaminoituneen kasteluveden käyttö syötävien kasvien yhteydessä voi aiheuttaa elintarvikkeiden saastumista. Pääosin *E. coli* -bakteerin EHEC -kannat aiheuttavat elintarvikeketjuun yhdistettävät *E. coli* -infektiot. *E. coli* kykenee myös kehittämään nopeasti aikaisemmin tuntemattomia patogeenisia kantoja. EHEC -kannoista *E. coli* O157:H7 on viimeisten vuosikymmenien aikana kehittynyt erittäin suureksi ruokamyrkytusepidemioiden aiheuttajaksi. *E. coli* O157:H7 –kanta on löydetty mm. vihanneksista, hedelmistä, lihatuotteista, mehuista ja maidosta sekä lisäksi sitä on havaittu myös ulosteella kontaminoituneesta juoma- ja uimavedestä. 1980-luvulla EHEC-tartuntojen infektiolähteeksi tutkimusten mukaan osoittautui hyvin usein naudanliha, mutta nykyään on havaittu, että melkein minkä tahansa märehitjän ulosteella kontaminoitunut vehikkeli voi aiheuttaa tartunnan. EHEC-infektioiden oireisiin kuuluu mm. voimakas veriripuli, joka voi johtaa pahimmillaan jopa kuolemaan. Muita merkittäviä oireita ovat muun muassa hemolyyttinen ureeminen syndrooma (HUS), johon yhdistyy munuaisten vajaatoiminta, hemolyyttinen anemia ja trombosytopenia. Euroopassa kärsittiin keväällä 2011 epidemia, jossa HUS-oireita esiintyi sadoilla potilailla, erityisesti Saksassa. Taudin aiheuttaneen *E. coli* -kannan O104:H4, todettiin tuottavan myös CTX-M-tyyppin ESBL-β-laktamaasia. Epidemian todettiin olevan peräisin iduista (Buchholz ym. 2011, Newell ym. 2010).

2.5.2 ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteerin esiintyvyys siipikarjalla

ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteerin esiintyvyyttä eläimillä eri maiden välillä on paikoin hyvin hankala vertailla toisiinsa, sillä bakteerin eristykseen ja entsyymituotannon tunnistukseen käytetyt protokollat saattavat vaihdella erittäin suuresti. Kaikista eniten yksittäisistä eläinlajeista ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteeria on löydetty broilereista. Alankomaissa vuonna 2014 esiintyvyydeksi määriteltiin 64 % ja vuosina 2009-2011 Sveitsissä jopa 63 %. Saksassa esiintyvyyden on havaittu lisääntyvän 56 %:sta 76 %:n kasvukauden edetessä. Korkean esiintyvyyden selittää se, että kaikissa edellä mainituissa maissa käytetään mikrobilääkkeitä (Geser ym. 2012, Laube ym. 2013, MARAN 2015). Mielenkiin-

toista on kuitenkin, että Ruotsissa ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteerin on havaittu levinneen huomattavasti laajemmalle kuin Suomessa, vaikka Ruotsissa tuotantopolven broilereita ei myöskään lääkittä lähes ollenkaan mikrobilääkkeillä (Swedres-Svarm 2015). Suomalaisen suotuisan tilanteen taustalla saattaa olla myös suomalaisen keksinnön Broilactin käyttö. Broilact on tuote, jota suomalainen Orion valmistaa ja myy. Tuote sisältää terveen kukon umpisuolen sisältöä. Broilact:ia syötetään juuri kuoriutuneille untuvikoille. Menetelmä on ollut menestyksellinen *Salmonellan* torjunnassa. *E. coli* -bakteerien, jotka kantavat ESBL-geenejä, on havaittu myös levinneen broileritilojen lähiympäristöön ja esimerkiksi karpäsiin (Blaak ym. 2014, Laube ym. 2014).

2.5.3 Leviäminen eläinten, elintarvikkeiden ja ihmisten välillä

Plasmidit mahdollistavat ESBL/AmpC-resistenssigeenien leviämisen bakteerien välillä. Kyseiset geenit leviävät pääosin IncFII-, IncA/C-, IncL/M-, IncN-, IncK- ja IncI1 -ryhmiin kuuluvien plasmidien välityksellä (Carattoli 2009). ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteereiden leviämistä eläinten, elintarvikkeiden ja ihmisten välillä voidaan tutkia plasmideja tarkastelemalla. Kun ihmiseltä ja eläimeltä löydetään sama ESBL/AmpC-geenin sisältävä plasmidi, voidaan epäillä ihmisen ja eläimen bakteerien välistä geenien vaihtoa.

Suomalaisilla ja ruotsalaisilla broilereilla vaikuttaa olevan sama vallitseva resistenssigeeni, joka on AmpC-tyypin *bla*_{CMY-2}, mutta ihmisillä sitä havaitaan kuitenkin todella vähän. Ihmisten infektioissa vallitseva resistenssigeeni on *bla*_{CTX-M-15} (Börjensson ym. 2013a, Päivärinta ym 2015, Seittenranta-Vekkelä 2012). Keski-Euroopassa esiintyy enemmän myös ESBL-tyypin geenejä. Esimerkiksi Alankomaissa broilereissa havaitaan usein *bla*_{CT-M1}- tai *bla*_{TEM-52}-geeniä kantavia *E. coli* -bakteereja (Leverstein-van Hall ym. 2011, Overdeest ym. 2011).

2.6 ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin osoittaminen

2.6.1 *Escherichia coli* lajinmääritys

MacConkey-agaria käytetään usein Gram-negatiivisten ja *Enterobacteriaceae*-heimon eristämiseen ja erotteluun. Se on elatusaine, joka sisältää kristallivioletta ja sappisuoloja, jotka estävät yhdessä Gram-positiivisten ja kasvuolosuhteiden osalta erityisen vaativien Gram-negatiivisten bakteerien kasvun. *E. coli* -bakteeri kasvaa MacCon-

key-maljalla pinkkeinä pesäkkeinä, koska *E. coli* kykenee fermentoimaan laktoosia, jolloin reaktiossa muodostuu happoa. Reaktio laktoosin kanssa voi näkyä maljalla myös pinkkinä huntuna bakteeripesäkkeen ympärillä. *E. coli* -bakteerin muodostamat pesäkkeet MacConkey-agarilla eivät ole yleensä limaisia, mikä helpottaa tunnistamista esimerkiksi *Klebsiella*- ja *Enterobacter*-sukujen bakteereista (Allen 2013). *E. coli* -bakteerin kyky kasvaa jopa + 44 °C:ssa, helpottaa bakteerin eristämistä esimerkiksi useimmista muista koliformisista bakteereista (Bartram & Pedley 1996).

Enterobacteriaceae-heimon lajimääritykseen on tarjolla useita erilaisia testejä. Tässä tutkielmassa käytetty API20E™-testiliuska on suunniteltu tunnistamaan *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereita ja muita Gram-negatiivisia sauvoja 21 biokemiallisen testin avulla (bioMérieux).

2.6.2 Mikrobilääkeherkkyyden osoittaminen

Bakteereiden mikrobilääkeherkkyyden määrittämiseksi käytetään hyvin usein kiekkodiffuusiomenetelmiä. Kiekkodiffuusiomenetelmän suuria etuja ovat sen yksikertaisuus sekä edullisuus, mutta siitä saatu tulos on lähinnä kvalitatiivinen. Testissä valmistetaan bakteerisuspensiota esimerkiksi natriumkloridiliuokseen, joka levitetään tasaisesti 4 mm:n paksuisen Müller-Hinton-agarin pinnalle. Agarille asetellaan antibioottiekko, joka sisältää vakiodun määrän mikrobilääkettä. Viljelmää inkuboidaan yön yli + 35 °C:ssa, jonka jälkeen mitataan esimerkiksi viivaimella tai työntömitalla millimetrin tarkkuudella kiekon ympärille muodostuneen estovyöhykkeen halkaisija. Saatu estovyöhykkeen halkaisija tulkitaan yleisesti tunnustettujen laboratoriodien määrittämien kriteereiden mukaisesti, jonka perusteella bakteeri voidaan tulkita mikrobilääkkeelle herkäksi tai vastustuskykyiseksi (Jorgensen & Ferraro 2009).

EU-valtioissa tuotantoeläimillä ja lihassa esiintyvien ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteerien seurannassa käytetään useimmiten EUCAST:in raja-arvoja. EUCAST on julkaissut mikrobilääkkeen ja bakteerin yhdistelmille kliiniset raja-arvot ja ECOFF-raja-arvot (epidemiological cut-off values). ECOFF-arvoja käytettäessä mikrobilääkeresistenssiä kutsutaan mikrobiologiseksi resistenssiksi. ECOFF-arvoja käytetään, kun halutaan tunnistaa alkava resistenssi ja resistenssitason nousu bakteeripopulaatiossa mahdollisimman varhaisessa vaiheessa (EFSA & ECDC 2015).

EFSA:n ohjeistuksen mukaan herkkyysmäärittämisessä tulee käyttää kolmannen polven kefalosporiineista kefotaksiimia sekä keftatsidiimia ja kefoksitiinia. ESBL-entsyymin tuotannon tutkimiseksi täytyy testata myös synergiaa klavulaanin kanssa käyttämällä kefotaksiimia ja keftatsidiimia sisältäviä yhdistelmäkiekkoja. Estovyöhykettä näiden kahden mikrobilääkekiekon välillä verrataan toisiinsa. Mikäli niiden ero on > 5 mm, yhdistelmäkiekkotesti tulkitaan positiiviseksi synergian suhteen. AmpC-entsyymin tuotanto osoitetaan EFSA:n ohjeiden mukaan neljännen polven kefalosporiinia kefepiimiä käyttäen. Herkkyys karbapenemaaseille määritetään käyttämällä meropeneemi mikrobilääkekiekkoa (EFSA BIOHAZ Panel 2011).

3 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa *Escherichia coli*:n ja ESBL/AmpC β -laktamaaseja tuottavan *Escherichia coli*:n esiintyvyys vähittäismyynnin kananmunissa. Tutkielman näyteotos antaa pientä osviittaa siitä, pääseekö ESBL- tai AmpC-entsyymejä tuottavia *E. coli* -bakteereita kananmunien puhdistusprosessin jälkeen läpi kuluttajille myytäviin kananmuniin. ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin eristys suoritettiin pääosin EFSA -laboratorioprotokollan mukaisesti.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Näytteet

Tutkielmassa tutkittiin yhteensä 100 vähittäismyynnin kananmunaa, jotka on esitetty taulukossa 1. Tutkimukseen valittiin 9 erilaista kuluttajapakkausta. Ne sisälsivät vapaan kanan munia, luomukanojen munia, ulkokanojen munia, virikehäkkikanalan munia sekä lattiakanojen munia. Jokaisesta kananmunasta tutkittiin pintanäytteet ja kuorimurska näytteet sekä 10:stä kananmunasta tutkittiin kokonaisbakteerimäärä. Kananmunia käsiteltiin ainoastaan hanskat kädessä pakkauksen avaamisesta lähtien.

Taulukko 1. Pinta- ja kuorimurskanäytteiden jakautuminen tuottajittain (- = ei tutkittu).

Tuottaja	Tutkitut pinnanäytteet (lkm)	Tutkitut kuorimurskanäytteet (lkm)	Pinnanäytteistä tutkittu kokonaisbakteerimäärä (lkm)	Kuorimurskanäytteistä tutkittu kokonaisbakteerimäärä (lkm)
1. (vapaan kanan munia)	10	10	10	10
2. (vapaan kanan munia)	10	10	-	-
3. (luomukanojen muna)	15	15	-	-
4. (ulkokanojen munia)	10	10	-	-
5. (vapaan kanan munia)	12	12	-	-
6. (vapaan kanan munia)	10	10	-	-
7. (virikehäkikanalan munia)	13	13	-	-
8. (virikehäkikanalan munia)	10	10	-	-
9. (lattiakanojen munia)	10	10	-	-
Yhteensä	100	100	10	10

4.1.1 Kanamunan pinnanäytteet

Työssä tutkittiin yhteensä 100 kananmunan pinta. Munat oli ostettu vähittäismyynnistä. Kanamunia oli yhteensä 9:ltä eri tuottajalta.

4.1.2 Kanamunan kuorimurskanäytteet

Kuorimurskanäytteitä tutkittiin yhteensä 100:sta kananmunasta, joista oli myös tutkittu pinta. Kanamunat oli ostettu vähittäismyynnistä ja olivat peräisin 9:ltä eri tuottajalta.

4.2 Kananmunan aistinvarainen tutkiminen

Kaikki 100 kananmunaa tarkistettiin silmämääräisesti ennen tutkimukseen ottamista. Mukaan otettiin vain ehjiä munia, joiden kuorissa ei ollut halkeamia tai muita merkittäviä poikkeamia. Kaikissa mukaan valituissa kuluttajapakkauksissa oli myös eräpäivä vielä voimassa eivätkä tutkielmaan valitut munat olleet pilaantuneita.

4.3 Esirikastus

4.3.1 Pintanäytteen esirikastus

Kananmunat siirrettiin kuluttajapakkauksesta hanskat kädessä minigrip mini -pussiin, jonka jälkeen pussiin pipetoitiin 10 ml puskuroitua peptoni-vettä. Pussi suljettiin tiiviisti ja kananmunaa pyöriteltiin noin minuutin ajan, jotta puskuroitu peptoni-vesi oli varmasti pyyhkinyt koko kananmunan kuoripinnan. Tämän jälkeen kananmuna poistettiin minigrip pussista puhtaat hanskat kädessä ja laitettiin puhtaaseen astiaan odottamaan seuraavaa vaihetta. Minigrip pussit inkuboitiin + 37 °C:ssa 18 – 22 tuntia.

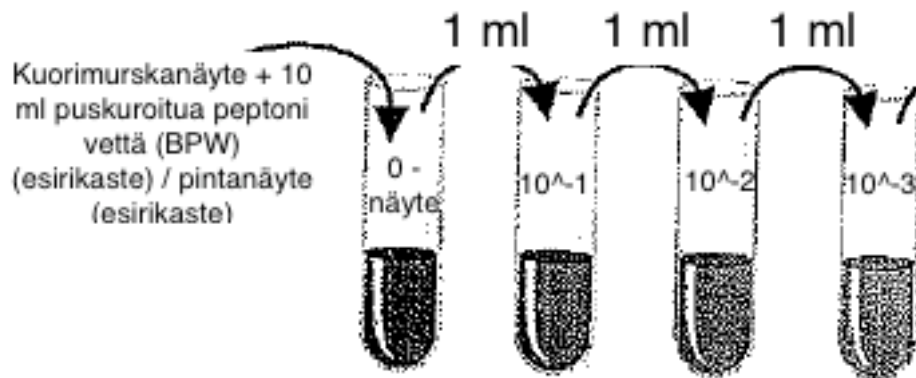
4.3.2 Kuorimurskanäytteen esirikastus

Kananmunan kuoreen tehtiin pieni reikä steriileillä saksilla ja kananmunan sisältö valutettiin ulos. Kananmuna huuhdeltiin PBS:llä (phosphate buffered saline), jotta albumiini saatiin varmasti poistettua munan sisältä. PBS -huuhtelu suoritettiin steriiliä ruiskua käyttäen. Huuhtelua jatkettiin, kunnes kananmunasta ulos kaadettu PBS -liuos oli kirkasta. Huudeltu kananmuna murskattiin pieneksi 50 ml:n putkeen pienen spaattelin avulla. Lopuksi putkeen pipetoitiin 10 ml puskuroitua peptoni-vettä ja korkit laitettiin löysästi kiinni, jotta ilma pääsisi vaihtumaan. Putket inkuboitiin + 37 °C:ssa 18 – 22 tuntia.

4.4 Kokonaisbakteerimäärä

Kokonaisbakteerimäärän tutkimista varten valmistettiin 9 ml puskuroitua peptoni-vettä sisältäviä koeputkia laimennossarjoja varten. Kokonaisbakteerimäärä tutkittiin 10:stä kananmunasta sekä pinnasta että kuorimurskasta. Laimennoksia valmistettiin aina 10^{-3}

saakka. Laimennossarja valmistettiin kuvan 3 mukaisesti ja kuorimurska- ja pintanäytteen esirikasteet toimivat 0-näytteinä ennen inkubointia.



Kuva 3. Laimennossarjan teko kokonaisbakteerimäärän tutkimiseksi (Karvonen & Leinonen 2013).

Laimennossarjat valettiin sulaan PCA-agariin (plate count agar). Maljalle kaadettiin silmämääräisesti noin 15 ml PCA-agaria, jonka jälkeen sekaan pipetoitiin 100 µl bakteerilaimennossuspensiota. Maljalla tehtiin kahdeksikkokuviota pöydällä, jotta bakteerisuspensio sekoittuisi agariin tasaisesti. Maljojen annettiin jäähmettyä noin 15 minuuttia, jonka jälkeen niitä inkuboitiin + 30 °C:ssa kolme päivää. Tuloksia laskettaessa huomioon otettiin maljat, joissa kasvoi enimmillään 250 pesäkettä ja vähimmillään 25 pesäkettä.

4.5 *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyys

18 - 22 tuntia inkuboiduista kananmunan pinta- ja kuorimurskanäytteiden esirikasteista pipetoitiin 100 µl MacConkey-agarille ja tehtiin 10 µl:n silmukalla hajotusviljelmä. MacConkey-maljoja (MCC-malja) inkuboitiin 18 - 22 tuntia + 44 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen maljoilta valittiin jatkokon *E. coli* -bakteerille tyypillinen laktoosiposiitivinen pinkki pesäke ja se viljeltiin 10 µl:n silmukalla jatkokon hajotusviljelynä TSA-agar-maljalle. TSA-maljaa inkuboitiin + 37 °C:ssa 18 - 22 tuntia. Mikäli MacConkey-maljalla ei kasvanut *E. coli* -bakteerille tyypillistä pesäkettä, näytteen tutkimuksia ei jatkettu.

4.6 ESBL/AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyys

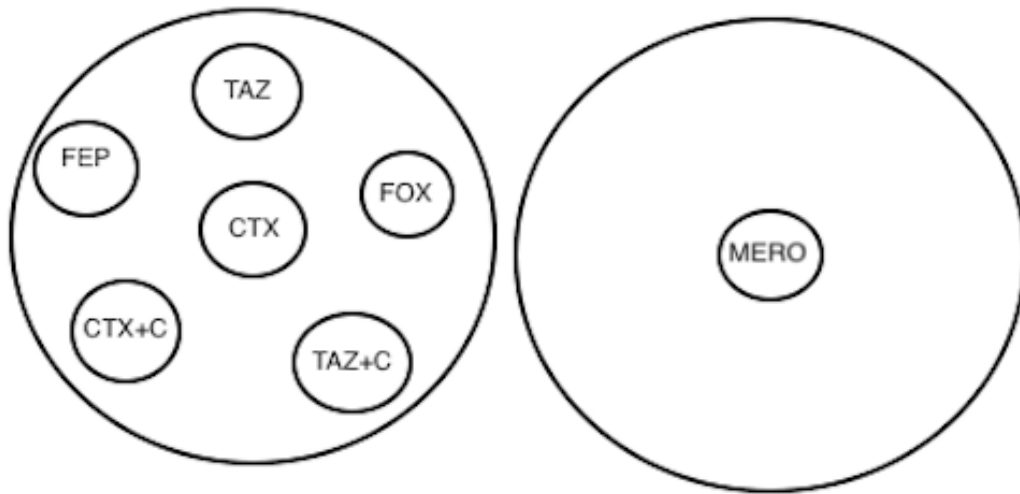
Esirikastettua pinta- ja kuorimurskanäytettä pipetoitiin 100 µl MacConkey-agarille, johon oli lisätty 1 mg/l kefotaksiimia (MCC+CTX-malja), ja tehtiin hajotusviljelmä 10 µl:n silmukalla. Kefotaksiimia oli valmistettu 1 mg/ml stokkiliuoksia valmiiksi ja 1 ml stokkiliuosta lisättiin 1 litraan MacConkey-agaria autoklavoinnin jälkeen ennen maljojen valamista. MacConkey-maljoja inkuboitiin + 44 °C:ssa 18 - 22 tuntia. Inkuboinnin jälkeen maljalta valittiin pesäkemorfologian mukaan yksi *E. coli* -bakteerille tyypillinen laktoosiposiitivinen pinkki pesäke, ja se viljeltiin hajotusviljelynä TSA-maljalle. Jos MacConkey-maljalla ei havaittu *E. coli* -bakteerille tyypillistä pesäkettä, näytteen tutkimuksia ei jatkettu (Hasman ym. 2015).

4.7 Lajinmääritys

Jokaiselle pesäkemorfologian mukaan jatkokon valitulle isolaatille, MCC- ja MCC + CTX-maljalta, tehtiin TSA-maljalta oksidaasitesti ja Gram-värijäys. Oksidaasinegatiivisille ja Gram-negatiivisille sauvoille tehtiin lajimääritys Api20E™-testillä valmistajan ohjeiden mukaan. Testi tulkittiin apiweb™-tietokannassa. Isolaatin tutkimuksia jatkettiin, jos apiweb™ tunnisti isolaatin *E. coli* -bakteeriksi sanallisella arviolla ”acceptable”, ”good”, ”very good” tai ”excellent identification” (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Ranska).

4.8 Mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen

MCC + CTX -maljoilta jatkotutkimuksiin valituille kannoille tehtiin mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen kiekkodiffuusiomenetelmällä. Müller-Hinton-agarista valmistettiin 4 mm:n paksuisia maljoja, jolle levitettiin tasaisesti kolmesta erisuunnasta natriumkloridibakteerisuspensiota vanupuikolla. Kiekkodiffuusiomenetelmässä käytettiin kefotaksiimi-, keftatsidiimi-, kefepiimi- ja kefoksitiimi-antibioottikiekkkoja. Synergiaa tarkastellessa käytettiin kefotaksiimi ja keftatsidiimi yhdistelmäkiekkoja klavulaanin kanssa. Karbapenemaasi-tuottajien tunnistamiseksi erilliselle maljalle muista kiekkoista asetettiin myös meropenemi-kiekkko. Menetelmä suoritettiin EUCAST:in standardin mukaan ja kannan herkkyys määritettiin vertaamalla estovyöhykkeen halkaisijaa ECOFF-arvoihin (EUCAST 2015a). Antibioottikiekkot asetettiin paikalleen steriileillä pinseteillä. Antibioottikiekkkojen asettelutapa on esitetty kuvassa 4.

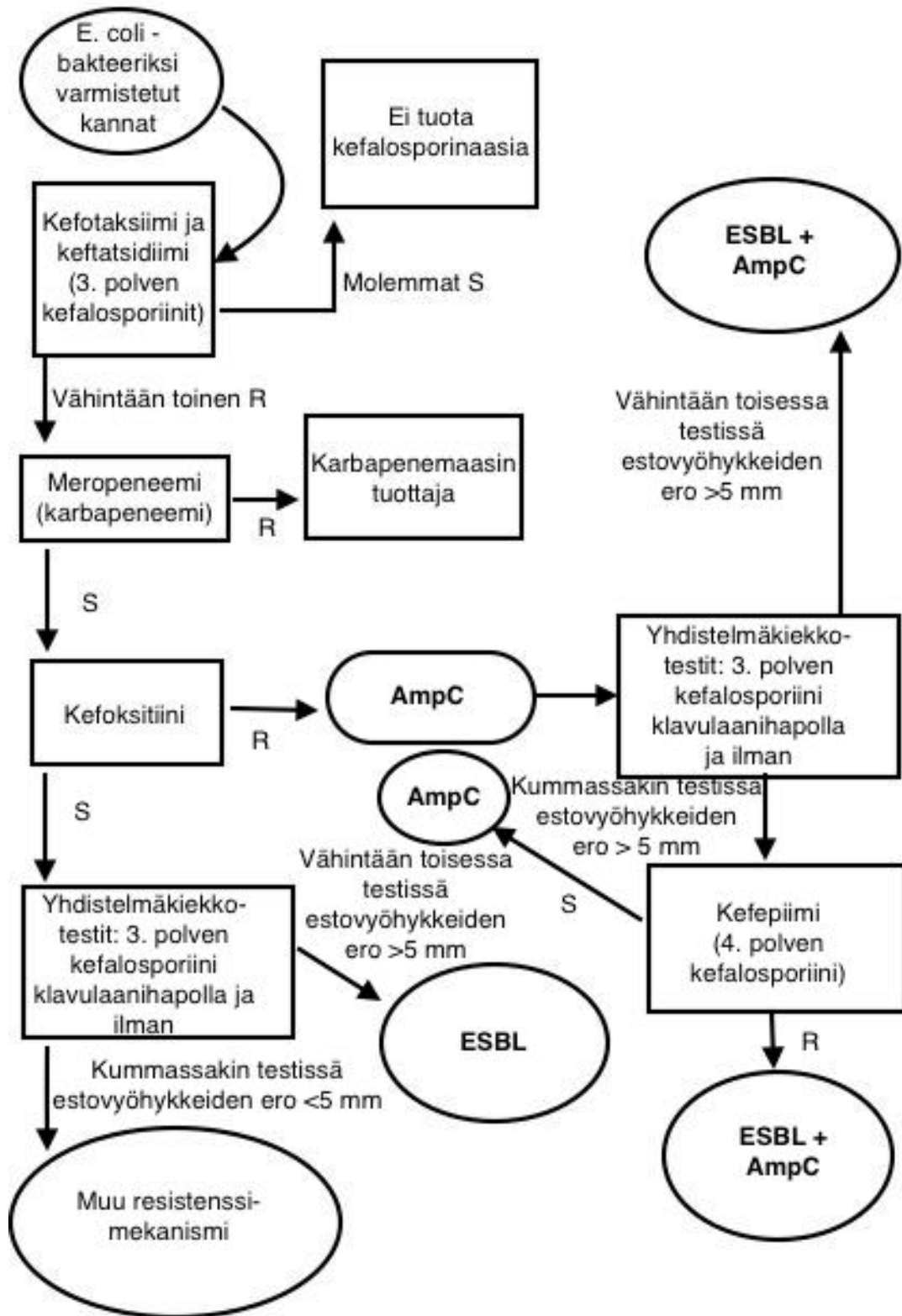


Kuva 4. Antibioottikiekkodiffuusimenetelmän toteutus.

Taulukko 2. Käytetyt mikrobilääkkeet, raja-arvot ja valmistajatiedot.

Lääkeaine	Vahvuus	Valmistaja	ECOFF - raja-arvo <i>E. coli</i> - bakteerille (mm)
Kefotaksiimi	5 µg	OXOID	23
Keftatsidiimi	30 µg	Rosco Diag- nostica	22
Kefoksitiini	30 µg	Rosco Diag- nostica	19
Kefepiimi	30 µg	Rosco Diag- nostica	28
Keftatsidiimi + klavula- naatti	30 µg + 10 µg	Rosco Diag- nostica	-
Kefotaksiimi + klavula- naatti	30 µg + 10 µg	Rosco Diag- nostica	-

Taulukossa 2 on esitetty tutkielmassa käytetyt mikrobilääkkeiden estovyöhykkeiden raja-arvot *E. coli* -bakteerille, mikrobilääkkeet ja mikrobilääkkeiden valmistajat. Kannan mikrobilääkeherkkyysprofiilin selvittäminen on havainnollistettu kaaviossa 1. Herkkyysprofiilin määrittämisessä käytettiin referenssikantoina *E. coli* ATCC25922 sekä kahta ESBL-entsyymiä tuottavaa *E. coli* -kantaa, joista toinen kantoi bla_{CMY-2}-geeniä ja toinen bla_{CTX-M-14}-geeniä.



Kaavio 1. Herkkyysoprofilin määrittämisessä käytetty kaavio. S = herkkä, R = vastustuskykyinen.

5 Tulokset

5.1 Aistinvarainen tutkiminen

Aistinvaraisessa tutkimisessa kananmunissa ei esiintynyt eroavaisuutta kananmunien välillä. Kaikki 100 kananmunaa olivat ehjiä, eikä kuorissa havaittu silmämääräisesti paksuuseroja, halkeamia tai poikkeavia värimuutoksia. Hajun perusteella kananmunat olivat myös kunnossa, eivätkä olleet pilaantuneet.

5.2 Kokonaisbakteerimäärä

Taulukko 3. Kokonaisbakteerimäärän tulokset.

Näyte. P = pintanäyte, M = kuorimurskanäyte	Laimennos 10 ⁰ (pmy)	Laimennos 10 ⁻¹ (pmy)	Laimennos 10 ⁻² (pmy)	Laimennos 10 ⁻³ (pmy)
P1.1	> 250 (~ 556)	76	< 25 (21)	< 25 (2)
M1.1	< 25 (14)	-	-	-
P1.2	> 250 (~960)	113	< 25 (11)	< 25 (2)
M1.2	46	< 25 (2)	-	-
P1.3	220	37	< 25 (1)	-
M1.3	< 25 (6)	-	-	-
P1.4	> 250 (~886)	101	< 25 (9)	< 25 (1)
M1.4	56	< 25 (9)	< 25 (2)	-
P1.5	> 250 (289)	51	< 25 (5)	
M1.5	32	-	-	-
P1.6	> 250 (262)	31	-	-
M1.6	< 25 (2)	-	-	-
P1.7	196	51	< 25 (6)	-
M1.7	< 25 (8)	-	-	-
P1.8	191	31	< 25 (3)	-
M1.8	< 25 (3)	-	-	-
P1.9	157	< 25 (17)	-	-
M1.9	< 25 (8)	< 25 (2)	-	-
P1.10	> 250 (~1230)	> 250 (322)	95	< 25 (15)
M1.10	37	< 25 (4)	-	-

Kokonaisbakteerimäärityksen tulokset ovat esitetty taulukossa 3. Kokonaisbakteerimäärä tutkittiin yhteensä 10:stä kananmunasta sekä pintanäytteistä että kuorimurskanäytteistä.

5.3 *Escherichia coli* –bakteerin esiintyvyys

Taulukko 4. *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyyden tulokset pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä.

Näyte. P = pintanäyte, M = kuorimurskanäyte	Oksidaasitesti	Gram-värjäys	API20E
M1.3	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
P3.1	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Vibrio fluvialis</i>
P3.12	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Escherichia coli</i>
M4.2	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Escherichia coli</i>
P4.4	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Escherichia coli</i>
P5.11	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Escherichia coli</i>
M5.12	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
M7.11	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Escherichia coli</i>
P9.3	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Escherichia coli</i>

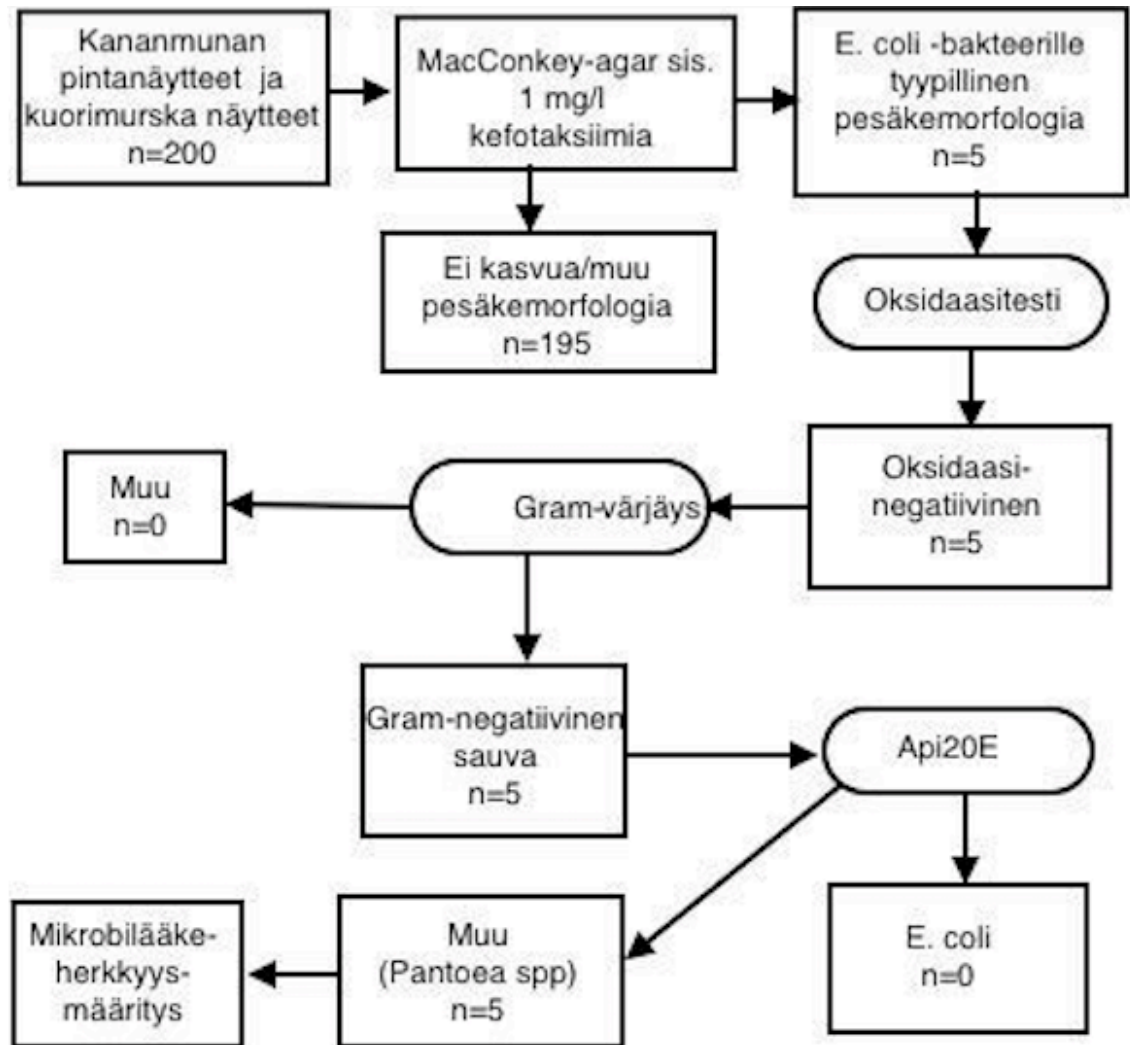
Escherichia coli -bakteerin esiintyvyyden tulokset pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä on esitetty taulukossa 4. Kuvassa 5 on esitetty esimerkki *E. coli* -bakteerin muodostamasta tyypillisestä pesäkkeestä MacConkey-agarilla.



Kuva 5. Esimerkki *E. coli* -bakteerin muodostamasta laktoosipositiivisesta pinkistä pesäkkeestä (Were Nyandoto).

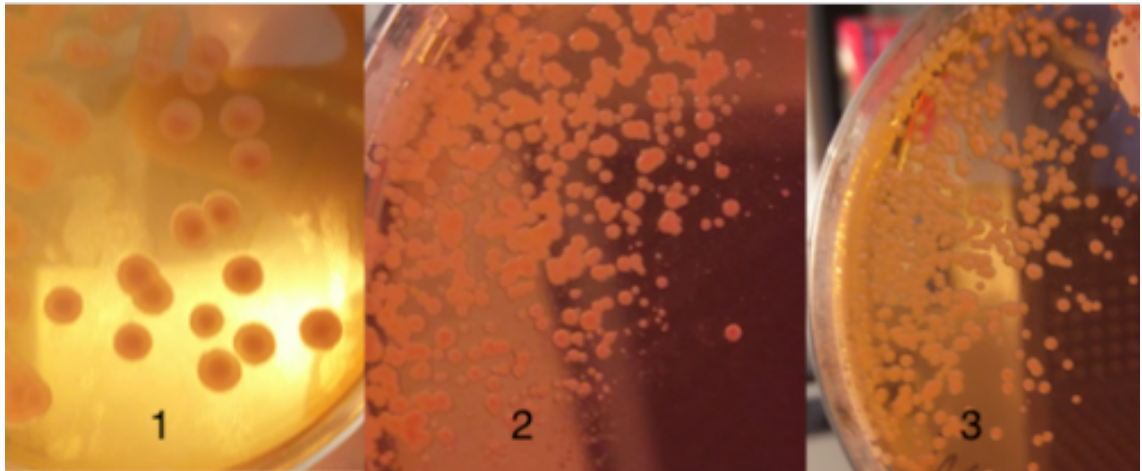
5.4 ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyys kananmunan pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä

Kaaviossa 2 on havainnollistettu pintanäytteiden, kuorimurskanäytteiden sekä niistä eristettyjen isolaattien jakautumista laboratoriotutkimuksen eri vaiheissa. ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyyden tulokset pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä on esitetty taulukossa 5.



Kaavio 2. Kananmunan pintanäytteiden, kuorimurskanäytteiden ja niistä eristettyjen isolaattien jakautuminen laboratoriotutkimuksen erivaiheissa. n=näytteiden/isolaattien määrä.

Kolme yleisimmin esiintynyttä pesäkemorfologiaa on esitetty kuvassa 6. Pesäkkeille, jotka eivät muistuttaneet *E. coli* -bakteerin laktoosiposiivisia pinkkejä pesäkkeitä MacConkey + kefotaksiimi-maljoilla, ei suoritettu jatkotutkimuksia.



Kuva 6. Kolme erilaista pesäkemorfologiaa, joita esiintyi eniten kananmuna näytteissä MacConkey + kefotaksiimi-maljoilla (Were Nyandoto).

Taulukko 5. Tulokset ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *E. coli* -bakteerin esiintyvyys pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä.

Näyte. P = pintanäyte, M = kuorimurskanäyte	Oksidaasitesti	Gram- värjäys	Api20E
P2.7	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Pantoea</i> <i>spp</i>
M5.4	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Pantoea</i> <i>spp</i>
P5.7	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Pantoea</i> <i>spp</i>
M5.7	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Pantoea</i> <i>spp</i>
P7.11	Negatiivinen	Negatiivinen sauva	<i>Pantoea</i> <i>spp</i>

5.5 Mikrobilääkeherkkyysmäärittämisen tulokset

Taulukossa 6 on esitetty mikrobilääkeherkkyysmäärittämisen tulokset kiekkodiffuusiometelmää käyttäen.

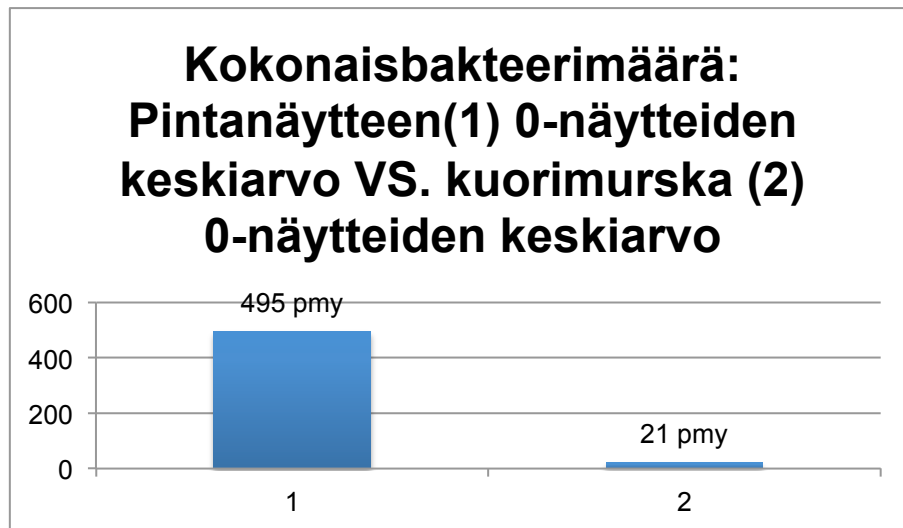
Taulukko 6. MikrobilääkeherkkyySMäärityksen tulokset (* = estovyöhykettä ei muodostunut antibioottikiekon ympärille).

Näyte	CTX (mm)	TAZ (mm)	FOX (mm)	FEP (mm)	MERO (mm)	CTX+C synergia (+/-)	TAZ+C synergia (+/-)
P2.7	15	14	28	25	38	+	-
M5.4	22	16	32	25	39	+	-
P5.7	*	*	*	*	*	-	-
M5.7	19	14	31	23	36	+	-
P7.11	10	*	11	13	15	+	-

6 Tulosten tulkinta

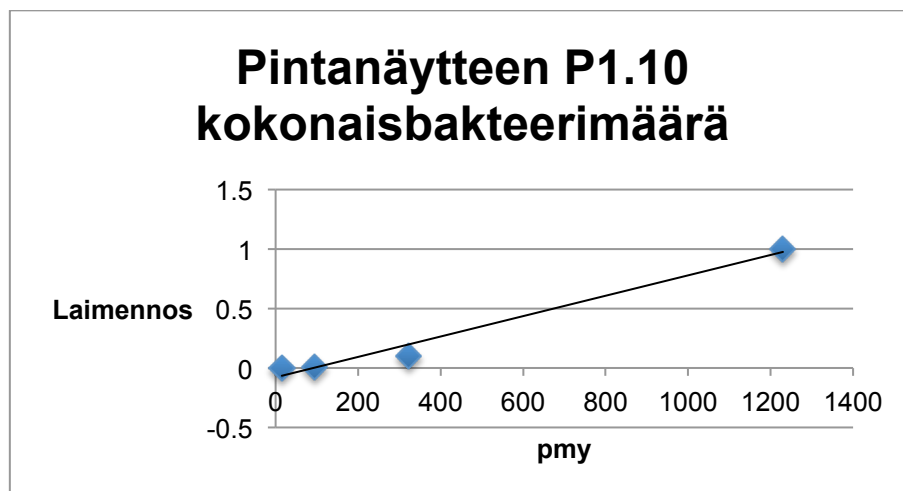
6.1 Kokonaisbakteerimäärä

Kokonaisbakteerimäärää tutkittaessa tuloksista voitiin heti huomata, että kananmunan pintanäytteissä oli huomattavasti enemmän bakteereita, kuin kuorimurskanäytteissä. Pintanäytteiden suuremmat bakteerimäärät olivatkin odotetumpia, koska kananmunan pinta on kosketuksissa koko ajan ilman kanssa. Kananmunan sisällä bakteerimäärä oli huomattavasti pienempi, koska kananmunan vahva kuori ja erilaiset kalvot estävät tehokkaasti bakteerien penetraatiota kananmunan sisäisiin osiin. Vaikka bakteeri pääsisi kuoren läpi, ei se välttämättä pystyisi kasvamaan siellä. Kananmunan valkuaisaineen albumiinilla on erittäin inhihoiva vaikutus mikrobien kasvuun. Kaaviossa 3 on havainnollistettu kananmunan pinta 0-näytteiden ja kuorimurska 0-näytteiden pesäkemääriä keskiarvojen avulla.



Kaavio 3. Pinta 0-näytteiden keskiarvo VS. kuorimurska 0-näytteiden keskiarvo. Pylväs 1 kuvaa pintanäytteitä ja pylväs 2 kuorimurskanäytteitä.

Kokonaisbakteerimäärän tuloksista voi myös huomata, että laimennossarjat ovat onnistuneet, koska pesäkemäärät nousevat tasaisesti kymmenpotenssien mukaisesti. Tuloksista näkee myös, että laimennossarjoja tehtiin tarpeeksi, eikä tarvetta laimeampien bakteerisuspensioiden valmistamiselle ollut. Bakteerien pesäkemäärät vaihtelivat kokonaisbakteerimäärätuloksissa pintanäytteissä 10^3 ja 10^0 välillä. Kuorimurskanäytteissä kokonaisbakteerimäärä vaihteli 10^1 ja 10^0 välillä. Kaaviossa 4 on esitetty pintanäytteen P1.10 kokonaisbakteerimäärä tulos pistediagrammin avuin mihin on lisätty trendiviiva havainnollistamaan pesäkemäärien nousua laimennospotenssin vaihtuessa.



Kaavio 4. Pintanäytteen P1.10 kokonaisbakteerimäärän tulosten käyrä. Kaavion ensimmäinen piste on laimennos 10^{-3} , toinen piste on 10^{-2} , kolmas piste on 10^{-1} ja viimeinen piste on laimentamaton 10^0 . X-akselin yksikkö on pmy ja y-akselin yksiköt kuvaavat laimennoksen vahvuutta.

Kuorimurskanäytteissä, etenkin 0-näytteiden kohdalla, tulosten tulkintaa häiritse kuorimurskasta jääneet hiutaleet, jotka muistuttivat paljon bakteeripesäkkeitä. Kananmunan pintanäytteiden kohdalla vastaavaa ongelmaa ei ollut, koska munanpinnasta ei rikasteen joukkoon irronnut juuri mitään.

6.2 *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyys

E. coli -bakteerin esiintyvyyttä tutkittiin yhteensä 100:sta kananmunasta. Bakteeria etsittiin pintanäytteistä ja kuorimurskanäytteistä. Api20E™ -testillä *E. coli* -bakteeria löytyi kuitenkin vain 6 %:sta munista. *E. coli* -bakteeria löytyi enemmän pintanäytteistä kuin kuorimurskanäytteistä. Pintanäytteissä 100:sta tutkitusta kananmunasta *E. coli* -bakteeri löytyi 4 %:sta ja kuorimurskanäytteissä esiintyvyys oli 2 %. *E. coli* -bakteerin suurempi esiintyvyys pintanäytteissä olikin oletetumpaa, koska bakteeri voi levitä kananmunan pintaan esimerkiksi suoraan kananulosteesta tai jo aikaisemmin kanan umpisuolesta.

E. coli -bakteerin esiintyvyyttä tutkittaessa, kananmunasta löytyi myös muita bakteerilajeja, jotka muistuttivat MacConkey-agarilla *E. coli* -bakteerin pesäkemorfologiaa. Kananmunan pintanäytteistä tunnistettiin myös *Vibrio fluvialis*. Kuorimurskanäytteistä tunnistettiin *Chryseobacterium indologenes* ja *Klebsiella pneumoniae*. *V. fluvialis*-, *C. indologenes*- ja *K. pneumoniae* -bakteereita esiintyi 1 %:lla 100:sta tutkitusta kananmunasta.

6.3 ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *Escherichia coli* -bakteerin esiintyvyys kananmunan pintanäytteissä ja kuorimurskanäytteissä

ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavaa *E. coli* -bakteeria tutkittiin yhteensä 100 kananmunan pinnasta ja kuorimurskasta. Tutkimuksissa MCC + CTX -maljoilla *E. coli* -bakteerin pesäkemorfologiaa muistuttaneet isolaatit eivät olleet *E. coli* -bakteeria, mutta olivat kuitenkin oksidaasi- ja Gram-negatiivisia sauvoja. ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavia *E. coli* -bakteereita ei esiintynyt missään 100:ssa tutkitussa kananmunassa. 5 isolaattia, jotka MCC + CTX -maljoilla muistuttivat *E. coli* -bakteerin pesäkemorfologiaa, paljastuivat Api20E™ -testillä *Pantoea spp* -bakteereiksi. *Pantoea spp* -bakteerin esiintyvyys pintanäytteissä oli 3 % ja kuorimurskanäytteissä 2 %.

6.4 Mikrobilääkeherkkyysmäärittäminen

Viidelle löytyneelle *Pantoea spp* -bakteerille päätettiin tehdä mielenkiinnon vuoksi antibioottikiekkodiffuusiotestit, koska tutkimuksissa mahdollisia ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavia *E. coli* -bakteereita ei löytynyt. EUCAST ei ole julkaissut ECOFF-raja-arvoja *Pantoea spp* -bakteerille, joten isolaattien tulkinta herkiksi tai vastustuskykyisiksi kyseisille mikrobilääkkeille ei onnistunut. Mielenkiintoista tuloksissa oli kuitenkin pintanäyte P5.7, johon ei muodostunut lainkaan estovyöhykettä antibioottikiekkon ympärille. Edellä mainitulla näytteellä bakteerikasvusto kasvoi aivan antibioottikiekkoon kiinni, eikä kasvussa ollut havaittavissa minkäänlaista inhibitiota edes meropeneeminkiekkon kohdalla. *Pantoea spp*:n luontainen resistenssi testatuille mikrobilääkkeille saattaa aiheuttaa kyseisen ilmiön.

7 Johtopäätökset

Tämän tutkielman 100 kananmunan otos ei anna kokonaisvaltaista kuvaa Suomen ESBL- ja AmpC-entsyymiä tuottavan *E. coli* -bakteerin esiintyvyydestä. Tutkielma antaa kuitenkin suuntaa siihen, että esiintyvyys olisi melko alhainen tai olematon. Mikäli antibiootteja aletaan käyttää broilereilla Suomessa niin ESBL voi lisääntyä edelleen, jonka seurauksena ehkä kananmunatkin voivat kontaminoitua helpommin. Näin ollen kananmunien kontaminoituminen kyseisillä bakteereilla on paljon todennäköisempää tulevaisuudessa.

Esiintyvyys siipikarjalla on kuitenkin Suomessa hyvin vähäistä verrattaessa moneen muuhun EU-maahan. Suomessa puhtaat hallit, Broilact-valmisteen käyttö untuvikoilla ja tiukat tautisuojaukset sekä mikrobilääkkeiden erittäin vähäinen käyttö ovat osaltaan estämässä vastustuskykyisten bakteereiden suurempaa leviämistä. Tällaista linjaa on syytä edelleen pyrkiä jatkamaan muillakin eläinlääkinnän osa-alueilla, koska kaikenlainen mikrobilääkepaine edistää ESBL/AmpC-entsyymejä tuottavien bakteereiden lisääntymistä ympäristössämme jolloin myös infektoriskit suurenevät. Tutkimukset tuloksista on tärkeää myös havaita, että löydetty bakteerilajit *E. coli* -bakteerin esiintyvyyttä tutkittaessa, kykenevät muodostamaan vastustuskyvyn useille mikrobilääkkeille. Jos Suomen siipikarjatuotannon mikrobilääkepolitiikkaa lisätään, saattaa vastustuskykyisten bakteerien määrä nousta erittäin nopeasti. Tämän vuoksi olisikin erittäin mielenkiintoista saada kananmunatutkimuksista lisää tutkimustuloksia ESBL- ja AmpC-E.

coli -bakteerin esiintyvyydestä. Vastuullista mikrobilääkepolitiikkaa tulisi harjoittaa myös koko EU-alueen laajuisesti sillä runsas lääkitseminen tuotantopyramidin huipulla edistää ESBL/AmpC-*E. coli* -bakteerien leviämistä myös Suomeen.

Lähteet

Abdullah IN. Isolation and identification of some bacterial isolates from table egg. Dep. of Pathology-Collage of Veterinary Medicine/ Alqadysia University. Al-Anbar J. Vet.Sci., Vol.: 3 No. (2), 2010.

Ambler RP. The structure of β -lactamases. Phil Trans R soc Lond 1980, B 289: 321-331.

http://anniesbiozone.blogspot.com.es/2010_10_01_archive.html

Bartram J, Pedley S. Chapter 10 – Microbiological Analyses. Teoksessa: Bartram J, Blance R (toim.) Water quality Monitoring – A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes. UNEP/WHO, 1996.

bioMerieux. API 20E, pakkauseloste.

Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek AHAM, de Heer L, de Ronda Husman AM, Schets FM. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* on Flies at Poultry Farms. Appl Environ Microbiol 2014, 80: 239-246.

Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschidt C, Wilking H, Delere Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Luber P, Rosner B, Stark K, Kühne M. German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts. New Engl J Med 2011, 365: 1763-1770.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Ch 2010, 54: 969-976.

Börjensson 2013 S, Jernberg C, Brolund A, Edquist P, Finn M, Landen A, Olsson-Liljequist B, Tegmark Wisell K, Bengtsson B, Englund S, Pappas G. Characterization of plasmid mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human Clinical isolates. Clin Microbiol Infect 2013a, 19: E309-E311.

Carrattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Ch 2009, 53: 2227-2238.

Chaemsanit S, Akbar A, Anal AK. Isolation of total aerobic and pathogenic bacteria from table eggs and its contents. Food and Applied Bioscience Journal 2015, 3 (1):1-9.

EFSA BIOHAZ Panel. Andreoletti O, Budka H, Bunic S, Collins JD, Griffin J, Hald T, Havelaar AH J, Hope J, Klein G, Koutsumanis K, McLauchlin J, Müller-Graf C, Nguyen-The C, Noerrung B, Peixe L, Prieto Maradona M, Ricci A, Sofos J, Threlfall J, Vågsholm I, Vanopdenbosch E. Scientific Option on the public health risk of bacterial

strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal 2011, 9: 2322.

EFSA & ECDC. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal 2015, 13: 4036.

Geser N, Stephan R, Hächler H, Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res 2012, 8: 21.

Hanson ND, Thomson KS, Smith Moland E, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. J Antimicrob Chemother 1999, 44: 377-380.

Hasman H, Agerso Y, Hendriksen R, Cavaco LM (DTU food), Guerra-Roman B (external expert). Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from caecal samples Laboratory Protocol, version 3, 2015.

Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Rodriguez-Navarro AB. The eggshell: structure, composition and mineralization. Frontiers in Bioscience 2012.

<http://www.farmit.net/kotielain/kana/kanamuna/kanamunan-rakenne-ja-munan-muodostus>

<http://www.kanatieto.fi/suomen-kanalat/kanamunan-rakenne>

<http://www.science.unctv.org/content/all-timing>

Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. Sequence of PSE-2 β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1988, 32: 134-136.

ICMSF. Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens. 2. p. Blackie Academic & Professional, Lontoo, UK 1996.

Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2009, 22: 161-182.

Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. N Engl J Med 2005, 352: 380-391.

Jrgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin Infect Dis 2009, 49: 1759-1755.

Jaurin B, Grundström T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78: 4897-4901.

Karvonen A, Leinonen S. Likvorin CXCL 13-määrittelyn validointi – uusi työkalu neuroborreliainfektion diagnostiikkaan, opinnäytetyö, Turun ammattikorkeakoulu, 2013.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. Longitudinal Monitoring of extended-Spectrum-Beta-Lactamase/AmpC-Producing *Escherichia coli* at German Broiler Chicken Fattening Farms. *Appl Environ Microb* 2013, 79: 4815-4820.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Rösler U. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 2014, 172: 519-527.

Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJM, Mevius DJ, on behalf of the national ESBL surveillance group. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17:873-880.

Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N, CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J antimicrob Chemother* 2007, 59: 165-174.

Männistö PT, Tuominen RK. 52. Soluseinämaa heikentävät bakteerilääkkeet. Teoksessa: Koulumäki M, Mervaala E, Tuomisto J (toim.) *Farmakologia ja toksikologia*. 8. uud. p. Kustannusosakeyhtiö Medicina, Kuopio 2012b: 877-897.

Nauholz H, Kaukonen E, Nykäsenoja S, Yli-Soini P. Antimicrobial Use in Meat Poultry Production in Finland 2007-2012.

Newell D, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, Van Der Giessen J, Kruse H. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol* 2010, 139: 3-15.

Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. Extended-Spectrum β -lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, The Netherlands, *Emerg Infect Dis* 2011, 17: 1216-1222.

Papich MG, Riviere JE. β -lactam Antibiotics: Penicillins, Cephalosporins, and Related Drugs. Teoksessa: Papich MG, Riviere JE (toim.) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9. p. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa 2009: 865-893.

Patterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47: 3554-3560.

Päivärinta M, Pohjola L, Fredriksson-Ahomaa M, Heikinheimo A, Low prevalence of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in Finnish Food-producing animals. Käsikirjoitus 2015.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary microbiology and microbial disease. 2. p. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK 2011.

Seitteranta-Vekkele S. ESBL-kantojen genotyyppien kartoitus multiplex PCR:llä (opin- näytetyö 2012). Metropolia Ammattikorkeakoulu 2012.

Stepien-Physniak D. Occurrence of Gram-negative bacteria in hen's eggs depending on their source and storage conditions. Department of Birds Disease, Institute of Biological Fundamentals of Animal Diseases, Veterinary Faculty, University of Life Sciences in Lubin, Poland. Polish Journal of Veterinary Sciences vol. 13, No 3, 2010, 507-513.

SVARM. Bengtsson B, Greko C, Nilsson O, Landen A (toim.) SVARM 2011. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. 1 p. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Ruotsi 2012.

Swedres-Svarm. Hellman J, Aspevall O, Bengtsson B, Pringle M (toim.) Swedres-Svarm 2014. Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. 1 p. Public Health Agency of Sweden and National Veterinary Institute, Solna/Uppsala, Ruotsi 2015.

Theron H, Venter P, Lues JFR. Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. Food Research International volume 36 issues 9-10, 2003: 969-975.