

**Pro gradu -tutkielma**

**Ympäristön ravinnepitoisuuden vaikutus  
konjugatiivisten ESBL-plasmidien kykyyn pelastaa  
antibiooteille alttiita bakteereja tappavassa  
antibioottipitoisuudessa horisontaalisen  
geeninsiirron avulla**

**Timo Tuononen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

23.10.2019

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Solu- ja molekyylibiologia

Timo Tuononen	Ympäristön ravinnepitoisuuden vaikutus konjugatiivisten ESBL-plasmidien kykyyn pelastaa antibiooteille alttiita bakteereja tappavassa antibioottipitoisuudessa horisontaalisen geeninsiirron avulla
Pro gradu -tutkielma:	22 s.
Työn ohjaajat:	Tohtori Sari Mattila, Tohtori Ville Ojala
Tarkastajat:	Elina Laanto PhD, Varpu Marjomäki Dos.
Lokakuu 2019	

---

Hakusanat: antibioottivastustuskyky, horisontaalinen geeninsiirto, konjugaatio, konjugatiivinen plasmidi, vastustuskykygeeni

Antibioottivastustuskyvyn leviäminen bakteerikantojen välillä horisontaalisen geeninsiirron avulla on merkittävä ja kasvava maailmanlaajuinen ongelma ihmisten terveydelle. Siirtämällä konjugaation avulla laajakirjoisia  $\beta$ -laktamaasi (ESBL)-geenejä tuottavia plasmideja vastustuskykyiset bakteerikannat pystyvät pelastamaan antibiooteille alttiita bakteereja myös tappavassa antibioottialtistuksessa. Tämä tutkimus pyrkii selvittämään mikä on bakteerien ympäristön ravinnepitoisuuden vaikutus tähän pelastuskykyyn. Viittä eri ESBL-plasmideja sisältävää JM109 *E.coli*-kantaa kasvatettiin yhdessä ampisilliinille alttiin HMS174 *E.coli*-kannan kanssa 5% ja 100% ravinnetasossa sekä ilman antibioottia, että tappavassa ampisilliinikonsentraatiossa. Ampisilliinivastustuskyvyn siirtymistä ESBL-plasmidien mukana tutkittiin kasvattamalla näytteitä kasvatuksista ampisilliiniä ja rifampisiiniä sisältävillä maljoilla joilla vain ESBL-plasmidin sisältävät HMS174 transkonjugantit pystyvät kasvamaan. Tulokset osoittivat että eri plasmidien kyky siirtyä bakteerikantojen välillä vaihtelee merkittävästi. Ravinteiden määrä, antibioottivalinta ja plasmidien ominaisuudet, kuten niiden koko, vaikuttavat voimakkaasti konjugaatiotehokkuuteen. Tutkimuksen tulokset voivat auttaa ymmärtämään antibioottiresistenssin evoluutiota ESBL-bakteerien infektoimissa potilaissa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Cell and molecular biology

Timo Tuononen                      Relevance of nutrition in ESBL-plasmid's ability to rescue susceptible bacteria via horizontal gene transfer in lethal antibiotic concentrations  
MSc thesis:                              22 p.  
Supervisors:                              Sari Mattila PhD, Ville Ojala PhD  
Inspectors:                                Elina Laanto PhD, Varpu Marjomäki Dos.  
October 2019

The spread of antibiotic resistance between bacterial strains by plasmid-mediated conjugative horizontal gene transfer is a significant and growing global threat to human welfare. Resistant bacterial strains can rescue susceptible bacteria by conjugative transfer of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-genes containing plasmids in lethal antibiotic concentrations. This study aims to investigate how the nutritional level of the environment effects this rescue potential. Five different ESBL-plasmid containing JM109 *E.coli*-strains were grown together with an ampicillin susceptible HMS174 *E.coli*-strain in 5% and 100% nutritional levels with and without antibiotic selection. The transfer of ampicillin resistance was studied by growing samples on plates containing ampicillin and rifampicin, on which only the ESBL-plasmid containing HMS174 transconjugants could grow. The ability of these plasmids to transfer themselves conjugatively between bacterial strains varied significantly. The amount of nutrients, antibiotic selection and the properties of the plasmids, such as their size, have a strong effect on the efficiency of conjugational gene transfer. The results of the study may help to understand the evolution of resistance in patients infected by ESBL-bacteria.

## Sisällysluettelo

1	JOHDANTO .....	1
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	9
2.1	Materiaalit .....	9
2.2	Menetelmät .....	10
3	TULOKSET .....	11
4	TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	14
	KIITOKSET .....	18
	KIRJALLISUUS .....	18

# 1 JOHDANTO

Antibiootit ovat bakteereja tuhoavia, tai niiden kasvua estäviä molekyylejä, joita käytetään bakteri-infektioiden hoidossa. Niitä käytetään ihmisten ja eläinten tautien lääkinnässä, sekä kasvitautien hoidossa. Monet lääketieteelliset toimenpiteet, kuten elinsiirrot ja muut leikkaukset, ovat riippuvaisia antibiooteista, jotka estävät leikkaushaavojen infektoita. Antibiootteja käytetään tautien lääkinnän lisäksi ruoan tuotannossa tuotantoeläinten ja -kasvien kasvun tehostamiseksi. Valitettavasti, kun patogeeniset bakteerit altistetaan uusille antibiooteille, kehittyi myös näille antibiooteille vastustuskykyisiä bakterikantoja (Davies ja Davies, 2010). Antibioottien käyttö lisääntyi maailmanlaajuisesti 65 % vuosien 2000 ja 2015 välillä (Klein ym. 2018). Erityisesti kefalosporiinien lisääntynyt käyttö on huolestuttavaa, koska se lisää laajakirjoisten  $\beta$ -laktamaasi (ESBL, eng. extended spectrum  $\beta$ -lactamase) bakterikantojen syntymistä (Paterson ja Bonomo 2005). Myös karpabeneemien ja kolistiinin, joita käytetään muiden antibioottien ollessa tehottomia vastustuskykyisiä bakteereja vastaan, käyttö on lisääntynyt huolestuttavasti (Klein ym. 2018). Ongelmaa pahentaa se että antibiootteja myydään, varsinkin kehittyvissä maissa, ilman reseptiä tai muuta valvontaa. Antibioottien käytön lisääntyminen on tehnyt antibioottiresistenssin leviämisestä maailmanlaajuisen uhan ihmisten terveydelle.

Uusia antibiootteja voidaan joko eristää luonnosta tai tuottaa synteettisesti. Ensimmäisiä lääketieteessä käytettyjä antibiootteja olivat synteettiset sulfonamidit ja *Penicillium-homesienestä* eristetty bentsyylipenisilliini. Antibiootit vaikuttavat bakterisolujen toimintaan pääasiassa estämällä rakenteiden, nukleiinihappojen tai proteiinien synteesiä tai vaikuttamalla niiden energia-aineenvaihduntaan (van Hoek ym. 2011).  $\beta$ -laktaamiantibiootit ovat laajasti käytettyjä ja tehokkaita antibiootteja, jotka aiheuttavat vain harvoin haitallisia sivuoireita, kuten allergisia reaktioita. Esimerkiksi jopa 65% USA:ssa käytetyistä antibiooteista ovat  $\beta$ -laktaamiantibiootteja ja näistä  $\beta$ -laktaamiantibiooteista lähes puolet ovat

kefalosporiineja (Bush ja Bradford 2016).  $\beta$ -laktaamit estävät bakteerien soluseinän muodostusta sitoutumalla kovalenttisesti soluseinän peptidoglykaaneja yhteen liittäviin entsyymeihin, eli penisilliiniä sitoviin proteiineihin (PBP, eng. penicillin binding proteins) sekä Gram-negatiivisissa, että Gram-positiivisissa bakteereissa. Ensimmäisiä kliiniseen käyttöön otettuja  $\beta$ -laktaameja olivat penisilliinit, jotka kuitenkin ovat alttiita penisilliiniä hydrolysoiville  $\beta$ -laktamaaseille, eli penisillinaaseille. Kefalosporiinit ovat paremmin penisillinaaseja kestäviä  $\beta$ -laktaameja jotka ovat yhä laajasti käytössä. Kefalosporiinit jaetaan ensimmäisen, toisen, kolmannen ja neljännen sukupolven molekyyleihin niiden löytöajankohdan, antimikrobisten ominaisuuksien ja  $\beta$ -laktamaasien kestokyvyn perusteella (El-Shaboury ym. 2007). Karpabeneemit ovat laajakirjoisia ja tehokkaita  $\beta$ -laktaameja jotka ovat vastustuskykyisiä useimmille  $\beta$ -laktamaaseille lukuun ottamatta erityisesti Gram-negatiivisissa bakteereissa yleistyviä karpabenemaaseja (Bush 2013). Monobaktaamit ovat laajakirjoisille  $\beta$ -laktamaaseille (ESBL) alttiita antibiootteja (Bush ja Bradford 2016).  $\beta$ -laktaamien tehoa voidaan lisätä käyttämällä niiden kanssa  $\beta$ -laktamaasi-inhibiittoreita. Ensimmäinen inhibiittori oli klavulaanihappo (Reading ja Cole 1977). Muita  $\beta$ -laktamaasi-inhibiittoreita ovat muun muassa sulbactam ja tazobactam.

Myös glykopeptidit ovat bakteerien soluseinän synteesiä häiritseviä antibiootteja. Muita tärkeitä antibiootteja ovat muun muassa bakteerien RNA-synteesiä estävät antibiootit, kuten rifampisiini, joka sitoutuu bakteerin RNA-polymeraasiin estäen RNA-synteesin etenemisen (Campbell ym. 2001), sekä bakteerien DNA-synteesiä estävät antibiootit, kuten quinolonit ja fluoroquinolonit. Aminoglykosidit ja tetrasykliinit häiritsevät bakteerien proteiinisynteesiä (Chopra ja Roberts, 2001) ja esimerkiksi sulfonamidit ja trimetropriimi muuntavat bakteerien energiametaboliaa.

Bakteerien vastustuskykygeenit antavat bakteereille vastustuskykyä antibiootteja vastaan. Tämä vastustuskyky saavutetaan useilla eri mekanismeilla. Muutokset bakteerin soluseinän rakenteessa voivat estää antibiootin pääsyn solun sisään tai

antibiootti voidaan aktiivisesti poistaa bakteerisolusta solukalvon proteiinien avulla. Antibioottia voidaan muuntaa tai hajottaa entsyymaattisesti. Bakteeri voi muuttaa antibiootin inhiboimia metaboliareittejä. Bakteeri voi myös muuttaa antibiootin kohdemolekyyliä tai tuottaa sitä ylimäärin (van Hoek ym. 2011). Antibioottiresistenssi on hyvin vanha ilmiö joka on syntynyt kauan ennen kuin ihmiset aloittivat antibioottien käytön lääkkeinä. Esimerkiksi seriini  $\beta$ -laktamaasientsyymit ovat olleet olemassa noin 2,4 miljardia vuotta ja ne siirtyivät horisontaalisesti Gram-positiivisiin bakteereihin jo 800 miljoonaa vuotta sitten (Hall ja Barlow 2004). Antibioottiresistenssigeenit ovat voineet syntyä alun perin antibiootteja tuottavissa mikrobeissa, jotta ne eivät vahingoittaisi itseään, tai ne ovat antaneet kilpailuedun esimerkiksi maaperän antibioottirikkaissa ympäristöissä (Finley ym. 2013). Tämän lisäksi antibioottiresistenssigeeneillä on voinut olla joku toinen ensisijainen tehtävä. Esimerkiksi penisillinaasit on yhdistetty bakteerin soluseinän uudentumiseen (Jacobs ym. 1994). Antibioottiresistenssigeenien ensisijainen tehtävä saattoi liittyä solujen väliseen viestintään ja vuorovaikutukseen tai hajottaviin metaboliareitteihin (Davies ym. 2006). Myös solukalvon läpi molekyyliä siirtävät pumppuproteiinit ovat saattaneet vaihtaa substraattiaan antibiootiksi (Poole 2005). Muuttuneessa ympäristössä, antibiootikonsentraatiossa tai isäntäbakteerissa, nämä geenit toimivat antibioottiresistenssigeeneinä (Martines ja Baquero 2014).

Pian penisilliinin käyttöön oton jälkeen penisillinaasit muodostuivat ongelmaksi potilaiden hoidossa. Jokaisen  $\beta$ -laktaamiantibiootin käyttöön ottoa seurasi pian  $\beta$ -laktamaasin löytyminen joka pystyi hydrolysoimaan kyseistä  $\beta$ -laktaamia. Uusia vakaampia, tehokkaampia ja laajakirjoisempia  $\beta$ -laktaamiantibiootteja kehitettiin mutta joka kerta  $\beta$ -laktamaasien ja niitä tuottavien bakteerikantojen evoluutio löysi keinon suojautua niiltä.  $\beta$ -laktamaasientsyymi hydrolysoi  $\beta$ -laktaamirenkaan jolloin antibiootti muuttuu tehottomaksi.  $\beta$ -laktamaasit jakaantuvat metalli-  $\beta$ -laktamaaseihin ja seriini-  $\beta$ -laktamaaseihin entsyymin aktiivisen kohdan rakenteen mukaan. Metall-  $\beta$ -laktamaasit tarvitsevat sinkkiä  $\beta$ -laktamin hajottamiseksi ja

seriini-  $\beta$ -laktamaaseilla on aktiivisessa kohdassaan seriini joka osallistuu vuorovaikutukseen substraatin kanssa (Bush 2013).  $\beta$ -laktamaasit voidaan luokitella molekulaarisen rakenteensa mukaisesti luokkiin A, B, C ja D ja toiminnallisten ominaisuuksiensa mukaan ryhmiin 1-4, sekä niiden alaryhmiin. Tämän tutkimuksen kannalta oleellisimpia ovat alaryhmä 2be joka sisältää ESBL-entsyymejä sisältävät entsyymiperheet SVH, TEM ja CTX-M, sekä ryhmä 2d:n sisältämät OXA ESBL-entsyymit (Paterson ja Bonomo 2005). ESBL-entsyymille ei ole täysin yksiselitteistä määritelmää, mutta voidaan sanoa että ESBL-entsyymi on entsyymi joka pystyy hydrolysoimaan penisilliinejä sekä ensimmäisen-, toisen- ja kolmannen luokan kefalosporiineja ja monobaktaameja (Paterson ja Bonomo 2005). TEM- ja SVH-entsyymit on tunnettu vuosikymmenten ajan, mutta 80-luvulta alkaen muun muassa ampisilliinia hydrolysoivista TEM-1 ja SVH-1  $\beta$ -laktamaeista kehittyi ESBL-entsyymejä. Pistemutaatioiden vaikutuksesta näiden entsyymien substraattispesifisyys muuttui niin että ne pystyvät hydrolysoimaan kolmannen sukupolven kefalosporiineja (Kliebe ym. 1985). CTX-M-perheen ESBL:t ohittivat TEM- ja SVH-ESBL:t yleisimmin tavattavina ESBL-entsyymeinä varhaisella 2000 luvulla (Doi ym. 2017) ESBL:n tuottajat ovat pääasiassa gram-negatiivisia enterobakteereita jotka voivat aiheuttaa infektioita keskushermostossa, alahengitysteissä, verenkierrossa, ruuansulatuskanavassa ja virtsateissä (Brolund 2014). Tärkeimmät ESBL tuottavat enterobakteerit ovat *E. coli* ja *K. pneumoniae*, joista *E. coli* aiheuttaa erityisesti virtsatietulehduksia ja *K. pneumoniae* keuhkokuumetta, verenkierron infektioita sekä myös virtsatietulehduksia (Brolund 2014). *E. coli* bakteerit ovat osa normaalia suoliston bakteeriflooraa. Vastustuskykygeeni voi lisääntyä ja levitä tehokkaasti klonaalisen lisääntymisen avulla kun sillä on sopiva isäntäbakteeri. Esimerkiksi CTX-M-tyypin ESBL-entsyymejä tuottava *E. coli* ST 131 (sekvenssityyppi 131) on levinnyt suureen osaan maailmaa (Banerjee ja Johnson 2014).

Vastustuskykygeeni voi levitä myös horisontaalisen geeninsiirron välityksellä liikkuvien geneettisten elementtien avulla. Horisontaalinen geeninsiirto tapahtuu



transduktion, transformaation tai konjugaation avulla (Dröge ym. 1998). Transduktiossa DNA siirtyy bakteerisoluuun bakteriofagin avulla. Bakteriofageilla on rajallisesti tilaa proteiiniukuessaan, joten ne pystyvät kuljettamaan rajallisen määrän DNA:ta. Myös bakteriofageille sopivien kohdebakteerien skaala on kapea. Transformaatiossa bakteeri ottaa sisäänsä ympäristössä olevaa DNA:ta. Transformaation avulla bakteeri voi potentiaalisesti ottaa suurenkin määrän DNA:ta sisäänsä, mutta DNA tuhoutuu helposti solun ulkopuolisessa ympäristössä muun muassa ympäristön nukleaaasien ja raskasmetallien vuoksi. Tärkein horisontaalisen geeninsiirron tapa on bakteerien välinen konjugaatio (Dröge ym. 1998). Kun liikkuvat geneettiset elementit kuten integronit ja transposonit liittyvät osaksi bakteerisolujen välillä liikkuvaa geneettistä elementtiä, kuten konjugatiivista plasmidia, ne voivat levittää geneettistä informaatiota jopa kaukaista sukua olevien bakteerien välillä. Prokaryootit eivät lisäänty suvullisesti, eikä geenien seksuaalista rekombinaatiota tapahdu, joten horisontaalisen geeninsiirron merkitys prokaryoottien geneettiselle muuntelevuudelle on suuri. Jain ym. (2003) osoittivat että horisontaalinen geeninsiirto eri bakteerilajien välillä on lisännyt uusien geenien siirtymistä prokaryootteihin ainakin 10000 kertaiseksi. Prokaryoottien genomit ovat kompakteja ja niiden geenit ovat usein järjestäytyneet tiiviiksi toiminnallisiksi ryhmiksi. Liikkuvat geneettiset elementit voivat tehokkaasti siirtää näitä suhteellisen pienikokoisia toiminnallisia ryhmiä sekä solun sisällä, että solujen välillä. Integronit ja transposonit voivat siirtää geenejä osaksi plasmideja jotka voivat siirtyä prokaryootista toiseen konjugaation avulla. Plasmidi on sirkulaarinen tai lineaarinen kaksijuosteinen DNA-molekyyli, joka pystyy lisääntymään itsenäisesti (Carattoli 2011). Osa plasmideista pystyy siirtymään bakteerista toiseen itsenäisesti. Nämä ovat konjugatiivisia plasmideja joilla on sekä MOB (mobility)-geenit että MPF (Mating pair formation)-geenit. Plasmidit jotka käyttävät solun toisen geneettisen elementin MPF-kompleksia ovat mobilisoitavia plasmideja (Smillie ym. 2010). Ei-mobilisoitavat plasmidit leviävät vain transformaation, transduktion tai klonaalisen leviämisen avulla. MOB-geenit sisältävät *oriT* (origin of transfer)-sekvenssin, relaksaasigeenin ja T4CP (Type IV coupling protein)-

geenin. MPF-geenit tuottavat T4SS (Type IV secretion channel)-kompleksin jonka kautta plasmidi siirtyy solujen välillä.

Konjugaation aluksi relaksaasi tunnistaa *oriT*-sekvenssin, katkaisee plasmidin toisen juosteen sen kohdalta ja sitoutuu siihen. Relaksaasiin sitoutunut DNA-juoste kahdentuu ja T4CP liittää sen T4SS:n. T4SS siirtää relaksaasin ja siihen sitoutuneen DNA:n vastaanottavaan soluun piluksen avulla proteiiniinsiirtokanavan läpi (Koraimann ja Wagner 2014). Pilus on plasmidin luovuttavan solun solukalvon uloke joka kiinnittyy vastaanottavaan soluun ja saattaa ne kontaktiin toistensa kanssa. Jotkut pilukset muodostuvat tehokkaasti nestesuspensiossa ja toiset esimerkiksi biofilmeissä (Bradley ym. 1980).

Plasmidit eivät yleensä sisällä solun toiminnalle välttämättömiä geneejiä (Frost ym. 2005). Plasmidit lisääntyvät autonomisesti. Niiden genomien replikaatio (rep)-moduuli säätelee plasmidin lisääntymistä ja niiden yhteydessä oleva cop-alue säätelee plasmidikopioiden määrää solussa. Plasmidien määrä ei saa kasvaa niin suureksi että se aiheuttaisi kohtuuttoman suuren metabolisen taakan isäntäsolulle ja toisaalta se ei saa laskea niin alhaiseksi että jokin isäntäsolun jälkeläisistä jäisi ilman plasmidia tai toinen plasmidi saisi kilpailuedun (Paulsson 2002). Konjugatiiviset plasmidit sisältävät konjugatiivisen koneiston tuottamiseen tarvittavan geneettisen tiedon, joten ne ovat suhteellisen suuria plasmideja. Vähentääkseen isäntäsolulle koituvaa metabolista taakkaa konjugatiivisten plasmidien kopioiden määrä solussa on yleensä suhteellisen pieni (alle 10) (Paulsson 2002). Jotta suuri ja alhaisen kopiomäärän plasmidi säilyisi solulinjassa sillä täytyy olla plasmidin vakautta parantavia moduuleita, jotka entisestään lisäävät plasmidin kokoa. Solun jakaantumisen yhteydessä aktiivisen jakamisen mekanismi jakaa plasmidit syntyviin tytärsoluihin. Toinen plasmidin vakautta lisäävä mekanismi on niin sanottu addiktiosysteemi, TA(toxin-antitoxin)-systeemi tai PKS (post segregational killing). Näissä systeemeissä yksi, vakaampi, geenituote aiheuttaa solun kuoleman tai kasvun pysähtymisen ja toinen, vähemmän vakaa, geenituote estää nämä vaikutukset (Fernández-García 2016). Kun molemmat geenit,

ja niiden mukana konjugatiivinen plasmidi, siirtyvät tytärsoluihin pysyvät nämä solulinjat hengissä. Myös itse konjugaatio parantaa plasmidin vakautta bakteeripopulaatiossa. Jos plasmidi siirtyy horisontaalisen geeninsiirron avulla uusiin isäntäsoluihin useammin kuin isäntäbakteeri jakautuu, jo pelkkä konjugaation avulla tapahtuva lisääntyminen pitää plasmidin isäntäsolupopulaatiossa.

Useimmissa plasmideissa on isäntäsolun toimintaan vaikuttava adaptiivinen moduuli joka usein sisältää eri alkuperää olevia IS-sekvenssejä, transposoneja ja integroneja (Norman ym. 2009). Adaptiivinen moduuli voi sisältää geenejä jotka hyödyttävät isäntäsolua muun muassa hyödyntämällä uusia aineenvaihdunta reittejä tai antamalla isäntäsolulle vastustuskykyä antibiootteja tai raskasmetalleja vastaan. Prokaryoottien genomi on kompakti, eikä siis sisällä normaalioloissa tarpeetonta geneettistä materiaalia. Liikkuvat geneettiset elementit mahdollistavat nopean mukautumisen muuttuneeseen ympäristöön, esimerkiksi antibiootihoidon aikana. Plasmidin tuottama hyöty uuden valintapaineen alla voi olla suurempi kuin lisääntyneen metabolisen taakan tuoma haitta ja niin plasmidi leviää isäntäsolupopulaatiossa. Plasmideilla on toisaalta itsekään geneettisen elementin piirteitä kuten PSK, ja toisaalta altruistisia piirteitä kuten MPF-moduuli joka auttaa siirtämään myös mobilisoitavia plasmideja sekä auttaa biofilmien muodostamisessa (Norman ym. 2009). Puhtaasti parasitiittisen plasmidin täytyy siirtyä suhteellisen usein horisontaalisesti uusiin isäntiin säilyäkseen populaatiossa. Yllättäen suuri osa tutkituista plasmideista on ei-mobilisoitavissa olevia plasmideja joten plasmidit ovat usein enemmänkin symbioottisessa suhteessa isäntäsoluunsa (Smillie ym. 2010).

Plasmidit jotka jakavat saman replikaatiomekanismin eivät säily samassa solulinjassa (Frost ym. 2005). Nämä plasmidit kuuluvat samaan inkompatibiliteetti (Inc)-ryhmään. Inc-ryhmä antaa tietoa plasmidien sukulaisuussuhteista ja mahdollisista isäntäsoluista. Replikoni on plasmidin alue jonka geenit vaikuttavat replikaation aloitukseen, kontrolliin ja plasmidi kopioiden määrään (Brolund 2014).

Tarkempi ja yksinkertaisempi replikonin mukainen jaottelu on korvannut Inc-ryhmien mukaisen jaottelun. Plasmidin tyyppi voi vaikuttaa antibioottiresistenssigeenin menestykseen. Esimerkiksi Enterobakteerien IncF plasmidit ovat hyvin yleisiä ja ne usein kantavat ESBL-geenejä. IncF plasmideja löytyy myös bakteereista joilla ei ole antibioottiresistenssiä, joten ESBL-geenit ovat voineet liittyä menestyksekkäästi levinneeseen plasmidiin joka on parantanut myös näiden ESBL-geenien leviämistä (Bengtsson ym. 2012). Enterobakteereista tunnetaan 28 plasmidien replikonityyppiä joista yleiset (IncF, IncI, IncA/C, IncL (ennen IncL/M), IncN ja IncH) kantavat suurimman valikoiman resistenssigeenejä (Rozwandowicz ym. 2018). Yhdessä plasmidissa voi olla useita eri replikoneja.

Alhaiset antibioottipitoisuudet bakteerien ympäristössä riittävät luomaan valintapaineen joka säilyttää resistenssiplasmidin bakteeripopulaatiossa (Gullberg ym. 2014). Antibiootteja kulkeutuu ympäristöön muun muassa jätevesien mukana, eläinten lannasta, kasvitautien hoidon yhteydessä, kalankasvattamoista, lääkkeiden valmistuksesta ja sairaaloista (Finley ym. 2013). Esimerkiksi yli kolme neljäsosaa USA:n antibiooteista käytetään eläinten kasvatuksessa (Hollis ja Ahmed 2013). Tuotantoeläimet ja lemmikit ovat siis merkittävä potentiaalinen resistenssiplasmidien lähde, erityisesti koska eläimiin käytetään usein samoja antibiootteja kuin ihmisiin (Finley ym. 2013). Antibioottien ei-terapeuttinen käyttö joka altistaa eläimet pitkäaikaisesti matalille antibioottipitoisuuksille (alle minimi inhibitiokonsentraation) on haitallista koska se luo valintapaineen joka synnyttää resistenttejä bakteerikantoja (Gullberg ym. 2011). Maaperän bakteereissa on runsaasti  $\beta$ -laktamaaseja ja muita resistenssigeenejä ja ne voivat siirtyä ihmisten patogeeneihin (Allen ym. 2010). Antibioottiresistenssi leviää ympäri maailmaa ihmisten, koti- ja villieläinten liikkeessa (Cantas ym. 2013).

Kun bakteerikanta on kerran tullut vastustuskykyiseksi antibiootille, resistenssin hävittäminen on vaikeata (Andersson ja Hughes 2011). Vaikka plasmidi yleensä lisää isäntäsolun metabolista taakkaa tämä ei kaikissa tapauksissa pidä paikkaansa (Michon ym. 2011). Samassa plasmidissa on usein useita resistenssigeenejä, joten

yhteen geeniin kohdistuva valinta säilyttää myös muut resistenssigeenit (Hernando-Amado ym. 2017). Plasmidi voi myös lisätä biofilmien muodostusta, virulenssigeenien toimintaa tai kompensoivat mutaatiot voivat poistaa plasmidin aiheuttaman negatiivisen valintapaineen myös antibioottivapaissa ympäristöissä (Hernando-Amado ym. 2017).

Antibioottihoidossa antibiootin määrä pyritään pitämään tarpeeksi korkeana jotta vastustuskykyisten mutanttien selviäminen olisi mahdollisimman epätodennäköistä. Kuitenkin horisontaalisen geeninsiirron avulla resistentit bakteerit voivat pelastaa antibiootille alttiit bakteerit myös tappavan antibioottialtistuksen aikana (Ojala ym. 2014). Konjugaatio vaatii bakteerilta energiaa ja resursseja, joten bakteerin ympäristön ravinnepitoisuus voi vaikuttaa konjugaation onnistumiseen. Tässä tutkimuksessa käytettiin sairaalasta eristettyjä ESBL-plasmideja joiden kykyä pelastaa alttiita bakteereita tappavassa  $\beta$ -laktaamikonsentraatiossa tutkittiin eri ravinnetasoissa. Tutkimuksen hypoteesina on että ympäristön ravinteiden määrä vaikuttaa bakteerien kykyyn pelastaa antibiootille alttiita bakteereita tappavassa antibioottialtistuksessa. Tutkimuksen tulokset voivat auttaa ymmärtämään antibioottiresistenssin evoluutiota ESBL-bakteerien infektoimissa potilaissa.

## 2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1 Materiaalit

Kokeissa käytettiin *Escherichia coli* bakteerikantoja K-12 JM109(pSU18), jossa oleva plasmidi antaa vastustuskyvyn kloramfenikolille, sekä K-12 HMS174, jolla on vastustuskyky rifampisiinille. Ampisilliinille vastustuskyvyn antavat pEC-plasmidit oli saatu Turun yliopistolliselta keskussairaualta saaduista *E. coli* kannoista 10UU11258, 57253, 55027, 56895 ja 57361 jotka oli nimetty samassa

järjestyksessä EC3, EC13, EC14, EC15 ja EC16. Plasmidit oli siirretty K-12 JM109(pSU18) kantaan. Käytettäviä K-12 JM109(pSU18) kantoja oli yhteensä kuusi. Viisi pEC-plasmideja sisältävää kantaa jotka oli nimetty pEC3, pEC13, pEC14, pEC15 ja pEC16, sekä kontrollina käytettävä kanta JM109 joka ei sisältänyt pEC-plasmideja.

## 2.2 Menetelmät

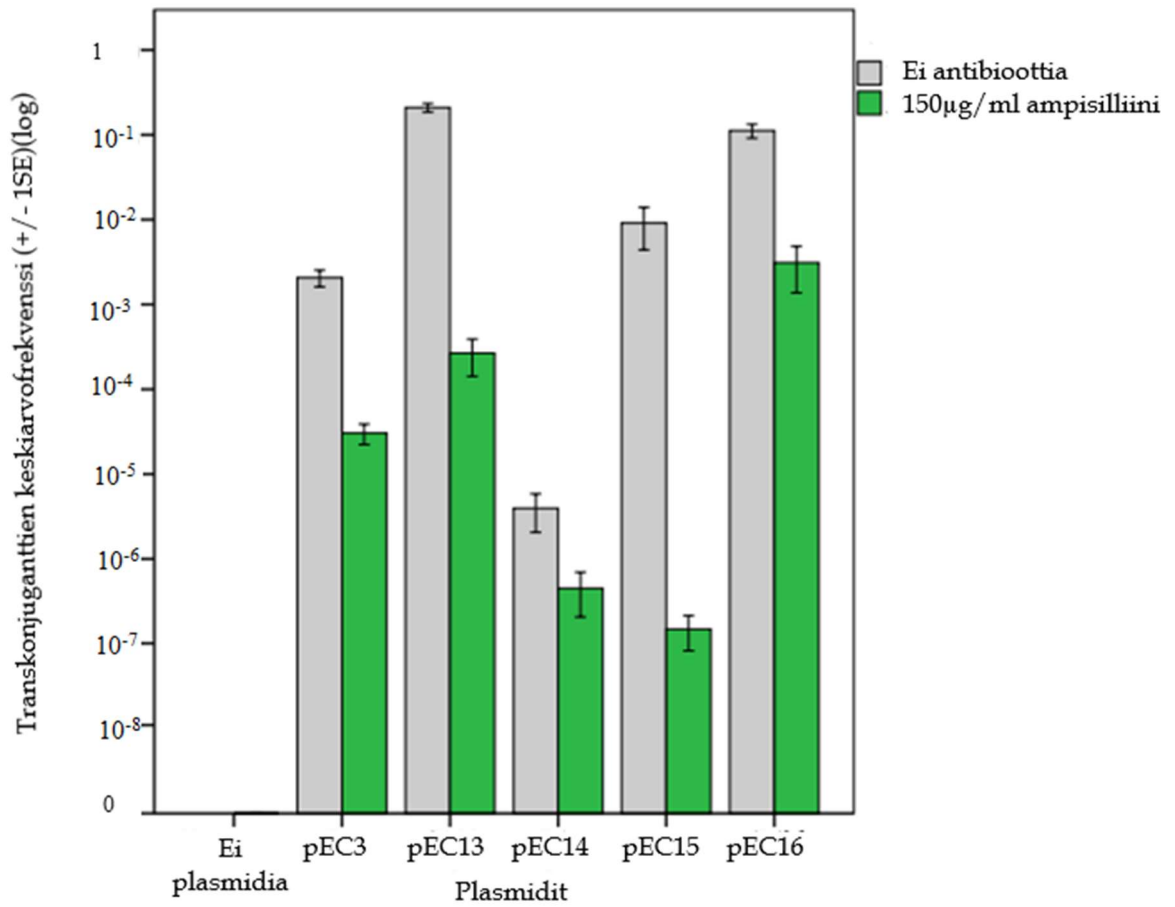
ESBL-geenejä kantavien pEC-plasmidien siirtymistä *E. coli* K-12 JM109(pSU18) bakteerikannasta K-12 HMS174 kantaan tappavassa antibioottialtistuksessa tutkittiin erilaisissa resurssitasoissa. Kokeissa käytettävät 100%:n ja 5%:n ravinnetason ravintoliuokset valmistettiin lisäämällä koeputkiin 5ml laimentamatonta tai 5%:n laimennettua LB-ravinneliuosta. Kokeita varten bakteereista tehtiin nestekasvatuksia yön yli +37 °C ravistelussa (200rpm). Nestekasvatukset tehtiin koeputkissa joissa oli 5 ml LB-ravinneliuosta sekä sopivia antibiootteja. Siis pEC-plasmideja sisältävien JM109 kantojen kanssa 5 µl 150 mg/ml ampisilliinia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) sekä 5 µl 25 mg/ml kloramfenikolia (Sigma-Aldrich), pelkän JM109 kannan kanssa 5 µl 25 mg/ml kloramfenikolia, ja HMS174 kannan kanssa 5 µl 50 mg/ml rifampisiinia (Sigma-Aldrich). Kokeissa jokaista pEC-plasmideja sisältävää bakteerikantaa kohden tehtiin viisi toistoa molemmissa resurssitasoissa, sekä antibioottialtistuksessa että ilman. Antibioottialtistuskokeissa LB-ravinneliuosputkeen pipetoitiin ensin antibiootti (5 µl 150 mg/ml ampisilliini), seuraavaksi antibiootille altis bakteeri (HMS174) ja viimeiseksi antibiootille vastustuskykyinen bakteeri (pEC-plasmidin sisältävä JM109), tai kontrollikokeessa tavallinen JM109 bakteeri. Bakteereita lisättiin 5 µl nestekasvatuksista. Bakteereiden annettiin kasvaa 24 tuntia ravistelussa (200rpm) +37 °C lämmössä. Tämän jälkeen näistä koekasvatuksista siirrettiin laimennettuja näytteitä 150 µg/ml ampisilliinia ja 50 µg/ml rifampisiinia sisältäville LB-agarosigeelimaljoille sekä LB-agarosigeelimaljoille. Antibiootteja sisältävillä maljoilla kasvoi siis ainoastaan rifampisiinille vastustuskykyisiä HMS174 kannan

bakteereita jotka olivat saaneet vastustuskyvyn ampisilliinille JM109 kannalta saadusta pEC-plasmidista. Maljoilla bakteereita kasvatettiin +37 °C lämmössä yösalaisin käännettynä yön yli. Tämän jälkeen maljoilta laskettiin bakteeripesäkkeiden määrä. Pesäkkeiden määrästä laskettiin koekasvatusten transkonjuganttien HMS174 kannan bakteerien frekvenssi.

Plasmidien sekvenssianalyysi suoritettiin käyttäen useita työkaluja. Sekvenssit oli annotoitu ensin NCBI:n Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) ohjelmalla jonka jälkeen niitä tutkittiin käyttäen Geneious ohjelman versiota 9.0.5. BLAST-ohjelmalla (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) etsittiin tutkittavia sekvenssejä muistuttavia sekvenssejä. Plasmidien inkompatibiliteettiryhmät (Inc) määritettiin käyttämällä PlasmidFinder-ohjelmaa (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). Antibioottiresistenssigeenit määritettiin käyttämällä ResFinder-ohjelmaa (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

### 3 TULOKSET

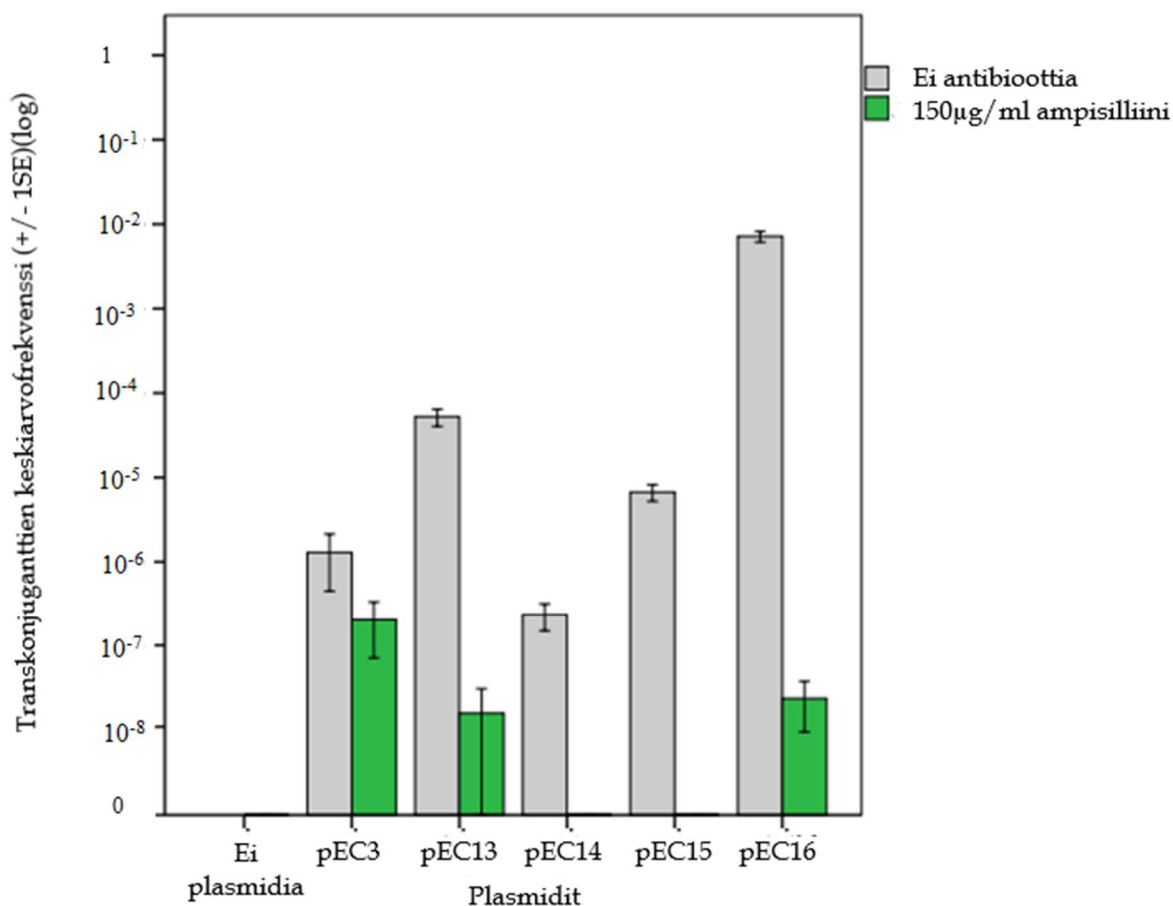
ESBL-geenejä kantavien pEC-plasmidien konjugatiivisen siirtymisen tehokkuutta bakteerikannasta toiseen tappavassa antibioottialtistuksessa tutkittiin eri ravintoainepitoisuuksissa. Ampisilliinille alttiita *E. coli* K-12 HMS174 kannan bakteereita kasvatettiin yhdessä ESBL-plasmideja sisältävien *E. coli* K-12 JM109(pSU18) kantojen kanssa sekä tappavassa antibioottialtistuksessa, että ilman antibioottialtistusta. Transkonjuganttien, eri pEC-plasmideja onnistuneesti vastaan ottaneiden ja hengissä selvinneiden, HMS174 kannan bakteerien osuus koekasvatuksessa 100%:n ravinnetasossa on nähtävissä kuvassa 1.



Kuva 1. ESBL-geenejä sisältävien pEC-plasmidien konjugaatiotehokkuus 100% ravintoainepitoisuudessa sekä ilman antibioottia että ampisilliinin kanssa (150 µg/ml).

Transkonjuganttien osuus 5%:n ravinnetasossa on nähtävissä kuvassa 2.





Kuva 2. ESBL-geenejä sisältävien pEC-plasmidien konjugaatiotehokkuus 5% ravintoainepitoisuudessa sekä ilman antibioottia että ampicilliinin kanssa (150 µg/ml).

Plasmidien sekvenssejä tutkittiin Geneious-, BLAST-, PlasmidFinder- ja ResFinder-ohjelmilla. Plasmidien ominaisuuksia on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. pEC-plasmidien ominaisuudet.

Plasmidi	Koko (emäsparia)	Inc-ryhmät	Tunnistetut β-laktamaasit	Muut resistenssigeenit	Konjugatiivisuus
pEC3I	91 885	IncB/O/K/Z	blaTEM-1C	strA, strB, sul2	Kyllä
pEC3II	59 192	IncI2	-	-	Kyllä
pEC13I	71 656	IncFII	blaCTX-M-14	-	Kyllä

pEC14I	143 590	IncFII, IncQ1, IncP, IncFIB(AP001918)	blaTEM-1B	strA, strB, aadA1, mph(B), sul1, sul2, tet(A), dfrA1	Kyllä
pEC14II	87 848	IncI1	-	-	Kyllä
pEC14III	80 057	IncFII	-	-	Kyllä
pEC15I	87 811	IncI1	-	-	Kyllä
pEC15II	38 611	IncX1	blaTEM-52B	-	Kyllä
pEC16I	94 325	IncI1	blaSHV-12	-	Kyllä
pEC16II	7 939	ColRNAI	-	-	Ei

#### 4 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään kuinka ympäristön ravinnepitoisuus vaikuttaa antibiottiresistenssin siirtymiseen liikkuvien geneettisten elementtien mukana vastustuskykyisestä bakteerikannasta antibiootille alttiiseen kantaan tappavassa antibioottialtistuksessa. Viidestä *E.coli*-kannasta (EC3, EC13, EC14, EC15 ja EC16) oli eristetty kymmenen plasmidia (pEC3I, pEC3II, pEC13I, pEC14I, pEC14II, pEC14III, pEC15I, pEC15II, pEC16I ja pEC16II, jossa pECX on alkuperäisen plasmidin isäntäkannan nimi) joiden siirtymistä tappavassa antibioottialtistuksessa *E.coli* K-12 JM109(pSU18)-kannasta antibiootille alttiiseen *E.coli* K-12 HMS174-kantaan tutkittiin 100% ja 5% ravinnetasoissa. Myös plasmidien sekvenssejä tutkittiin eri ohjelmilla.

Ilman antibioottia kasvatettaessa 100% ravinnepitoisuudessa plasmidit pEC13 ja pEC16 siirtyivät parhaiten. Plasmidit pEC3 ja pEC15 siirtyivät hieman heikommin

ja pEC14 selvästi heikoimmin. pEC14 koostuu kolmesta suuresta plasmidista. Suuret plasmidit siirtyvät konjugatiivisesti heikommin kuin pienet (Smillie ym. 2010). Antibiootti heikensi konjugaation onnistumista kaikilla kannoilla. Vaikka pEC15 siirtyi hyvin ilman antibioottia, sen konjugaatiokyky romahti selvästi muita kantoja enemmän antibioottialtistuksessa. Se siirtyi jopa 4 kertaluokkaa huonommin kuin pEC16.

5% ravinnetasossa kaikkien kantojen konjugaatiokyky oli merkittävästi heikompi sekä ilman antibioottia että sen kanssa. Kannat pEC14 ja pEC15 eivät pystyneet siirtämään antibioottiresistenssiä lainkaan antibioottialtistuksessa ja kanta pEC13 erittäin heikosti. Suhteessa toisiinsa kantojen konjugaatiokyky heikkeni jotakuinkin samalla tavalla kuin 100% ravinnetasossa mutta konjugaatiokyky kaiken kaikkiaan oli heikompi 5% ravinnetasossa. Ympäristön ravinteiden määrä siis vaikuttaa merkittävästi konjugaatiotehokkuuteen.

Koska plasmidit aiheuttavat metaboista taakkaa isäntäsolulle voi ravinnerikas ympäristö auttaa vastaamaan plasmidin ylläpidosta aiheutuneisiin lisääntyneisiin kustannuksiin. Plasmidit voivat lisätä solun ravinnevaatimuksia (Klemperer ym. 1979), joten vähäravinteisessa ympäristössä plasmidin vastaan ottaminen ei olisi bakteerille edullista. Ravinteikas ympäristö lisää bakteerin metabolista aktiivisuutta (Musovic ym. 2010) ja bakteerin konjugaatiolle tarpeelliset *tra*-geenit aktivoituvat ainoastaan edullisissa oloissa (Koraimann ja Wagner, 2014).

Ravinteikas ympäristö mahdollistaa paremman solujen välisen kontaktin (Musovic ym. 2010). Piluksen ja MPF-kompleksin muodostaminen vaatii resursseja. Bakteerit muodostavat biofilmejä joissa MPF-kompleksit muodostavat kontakteja bakteerien välillä ja mahdollistavat konjugaation. Biofilmit muodostuvat paremmin ravinnerikkaissa ympäristöissä (Machineni ym. 2017). Konjugatiiviset plasmidit ylläpitävät biofilmien rakennetta luomalla bakteerien välisiä kontakteja MPF-kompleksien avulla (Ghigo 2001). Biofilmit ovat usein vastustuskykyisempiä

antibiooteille kuin yksittäiset bakteerit ja antibioottiresistenssigeenit leviävät biofilmeissä tehokkaasti (Stewart 2002).

Ravinteita ja antibiootteja sisältävät ympäristöt ovat erityisen suotuisia paikkoja resistenssigeenien yleistymiselle. Maataloudessa ravinteita vapautuu ympäristöön muun muassa peltojen lannoituksesta ja eläinten lannasta. Erityisesti antibiooteilla hoidettujen eläinten lanta on hyvä ympäristö resistenssigeenien rikastumiselle (Udikovic-Kolic ym. 2014). Maaperä on valtava resistenssigeenien varasto (Allen ym. 2010). Ihmisten patogeenisten bakteerien ja maaperän bakteerien resistenssigeenit ovat usein hyvin samanlaisia, joten resistenssigeenejä on luultavasti siirtynyt horisontaalisen geeninsiirron avulla maaperästä ihmisen patogeenisiin bakteereihin (Forsberg ym. 2012).

Ravinteita ja antibiootteja kulkeutuu vesitöihin maatalouden valuma-alueilta, jätevedenpuhdistuslaitoksista, sairaaloista ja kalankasvatuksen yhteydessä (Kümmerer 2009). Jätevesien puhdistus ei täysin poista antibiootteja jätevedestä (Michael ym. 2013), mutta menetelmät kuten kemiallinen desinfektointi, UV käsittely ja suodattimet voivat vähentää resistenttien bakteerien ja antibioottien määrää jätevesissä (Cantas ym. 2013). Rokotukset ja eläinten ruoan pre- ja probiootit voivat vähentää tarvetta antibioottien käyttöön maataloudessa ja kalankasvatuksessa (Pérez-Sánchez ym. 2018). Eläinten terveyden ja hygienian parantaminen vähentää myös tarvetta antibioottien käyttöön.

Tutkittujen plasmidien Inc-ryhmät ovat yleisiä ihmisten sairauksia aiheuttavien bakteerien keskuudessa, erityisesti niin sanotut epideemiset plasmidit IncF ja IncI (Rozwandowicz ym. 2018). Plasmidien  $\beta$ -laktamaasit (TEM, SHV ja CTX-M) edustavat hyvin ihmisten sairauksia aiheuttavien bakteerien keskuudessa yleisiä  $\beta$ -laktamaaseja (Bush 2013 ja Hagel ym. 2019).  $\beta$ -laktamaaseja sisältävät plasmidit yleistyvät maailman laajuisesti ja ne ovat kasvava ongelma terveydenhuollossa (Brolund ym. 2014 ja Bush 2013).  $\beta$ -laktamien laaja käyttö luo valintapaineen resistenttien bakteerien hyväksi. Myös terveet ihmiset kantavat resistenttejä

bakteereita. Maailmanlaajuisesti 14% prosenttia ihmisistä kantaa ESBL tuottavia enterobakteereita ja esimerkiksi läntisen Tyynenmeren alueella jopa 46% ja kaakkois-Aasiassakin 22% (Karanika ym. 2016). Suolisto on merkittävä resistenttien bakteerien elinympäristö jossa ne voivat lisääntyä ja josta ne voivat levitä edelleen (Donskey 2004). Antibioottihoidon aikana patogeeniset bakteerit voivat hankkia itselleen resistenssin horisontaalisen geeninsiirron avulla suoliston muilta bakteereilta. Antibioottiresistenssin leviämisen kannalta bakteerien yhteisö jonka kanssa patogeeniset bakteerit vaihtavat geneettistä materiaalia on siis merkittävässä asemassa. Bakteerien horisontaalista geeninsiirtoa estävät menetelmät voivat estää resistenssin leviämistä antibioottihoidon aikana. Konjugaatiota voidaan estää eri kemikaaleilla sekä bakteereista, homeista ja sienistä eristetyillä aineilla tai estämällä relaksaasiensyömin toimintaa vasta-aineiden avulla (Williams ja Hergenrother 2008). Plasmidin replikaatiota voidaan estää pienten molekyylien avulla hyödyntämällä replikonien inkompatibiliteettia ja plasmidien TA-systeemiä hyödyntämällä voidaan aiheuttaa bakteerin kuolema (Williams ja Hergenrother 2008). Konjugaatiota voidaan estää myös plasmidien konjugaatiosysteemille spesifisten bakteriofaagien tai bakteriofaagien osien avulla (Jalasvuori ym. 2011 ja Lin ym. 2011).

Antibioottiresistenssin leviämistä horisontaalisen geeninsiirron avulla voidaan rajoittaa seuraamalla resistenssin leviämistä mikrobiologisen diagnostiikan avulla ruokaketjussa, ympäristössä ja sairaaloissa (Brolund ym. 2014). Antibioottien käyttöä voidaan ohjata ja rajoittaa, ja myös uusien antibioottien kehitykseen tulisi panostaa. Sairaaloissa vakavien infektioiden hoidossa tehokkaan hoidon aloittaminen toimivalla antibiootilla on tärkeää hoidon onnistumisen kannalta (Giske ym. 2008), joten paikallisen epidemiologian tuntemus on tärkeää. Resistenssin syntymistä voidaan estää käyttämällä antibiootteja syklisesti (Hernando-Amado ym. 2017), ja käyttämällä yhdistelmää antibiootteja joilla on eri vaikutusmekanismi (Davies ja Davies 2010).

Tutkimus osoittaa että ESBL-plasmidien kyky pelastaa bakteereja horisontaalisen geeninsiirron avulla vaihtelee kannasta toiseen eri ravinnetasoissa ja antibioottialistuksessa. Jos ESBL-plasmidit voidaan tunnistaa ennen hoidon aloittamista, voidaan hoitoa muokata niin että plasmidin konjugatiivinen siirtyminen ja patogeenisen bakteerikannan pelastuminen ovat mahdollisimman epätodennäköisiä.

## KIITOKSET

Haluan kiittää Matti Jalasvuorta, Sari Mattilaa ja Ville Ojalaa työhön kuuluneen laboratorio-osuuden ohjauksesta sekä avusta ja ohjauksesta tutkielman kirjoittamisen kanssa.

## KIRJALLISUUS

- Allen H.K., Donato J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J. & Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 8(4):251-9.
- Andersson D.I. & Hughes D. 2011. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev.* 35(5):901-11.
- Banerjee R. & Johnson J.R. 2014. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(9):4997-5004.
- Bengtsson S., Naseer U., Sundsfjord A., Kahlmeter G. & Sundqvist M. 2012. Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic *Escherichia coli* devoid of phenotypically detectable resistance. *J Antimicrob Chemother.* 67(1):69-73.
- Bush K. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. *Ann NY Acad Sci* 1277: 84-90.
- Bush K. & Bradford P.A. 2016.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1;6(8).

- Bradley D.E., Taylor D.E. & Cohen D.R. 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 143(3):1466-70.
- Brolund A. 2014. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol.* 1;4.
- Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A. & Darst S.A. 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell.* 104:901-912.
- Cantas L., Shah S.Q., Cavaco L.M., Manaia C.M., Walsh F., Popowska M., Garelick H., Bürgmann H. & Sørum H. 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol.* 4:96.
- Carattoli A. 2011. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 301(8):654-8.
- Chopra I. & Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews.* p. 232-260.
- Davies J., Spiegelman G.B. & Yim G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.* 9(5):445-53.
- Davies J. & Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3):417-33.
- Doi Y., Lovleva A. & Bonomo R.A. 2017. The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine, Vol 24, Suppl 1, S44-S51.*
- Donskey C.J. 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis.* 39(2):219-26.
- Dröge, M., Pühler A. & Selbitschka W. 1998. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *J. Biotechnol.* 64:75-90.
- El-Shaboury S.R., Saleh G.A., Mohamed F.A. & Rageh A.H. 2007. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal.* 45(1):1-19.
- Finley R.L., Collignon P., Larsson D.G., McEwen S.A., Li X.Z., Gaze W.H., Reid-Smith R., Timinouni M., Graham D.W. & Topp E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis.* 57(5):704-10.
- Fernández-García L., Blasco L., Lopez M., Bou G., García-Contreras R., Wood T. & Tomas M. 2016. Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. *Toxins (Basel).* 8(7). pii: E227.

- Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O. & Dantas G. 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. 337(6098):1107-11.
- Frost L.S., Leplae R., Summers A.O., Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. 3(9):722-32.
- Ghigo J.M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 412:442-445.
- Giske C.G., Monnet D.L., Cars O., Carmeli Y. & ReAct-Action on Antibiotic Resistance. 2008. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(3):813-21.
- Gullberg E., Cao S., Berg O.G., Ilbäck C., Sandegren L., Hughes D. & Andersson D.I. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*. 7(7):e1002158
- Gullberg E., Albrecht L.M., Karlsson C., Sandegren L. & Andersson D.I. 2014. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio*. 5:e01918-14.
- Hagel S., Makarewicz O., Hartung A., Weiß D., Stein C., Brandt C., Schumacher U., Ehricht R., Patchev V. & Pletz M.W. 2019. ESBL colonization and acquisition in a hospital population: The molecular epidemiology and transmission of resistance genes. *PLoS One*. 14(1):e0208505.
- Hall B.G. & Barlow M. 2004. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat*. 7(2):111-23.
- Hernando-Amado S., Sanz-García F., Blanco P. & Martínez J.L. 2017. Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. *Essays in Biochemistry* 61 37-48.
- Hollis A. & Ahmed Z. Preserving antibiotics, rationally. 2013. *N Engl J Med* 369:2474-6.
- Jacobs C., Huang L.J., Bartowsky E., Normark S. & Park J.T. 1994. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J*. 13(19):4684-94.
- Jain R., Rivera M.C., Moore J.E. & Lake J.A. 2003. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol*. 20(10):1598-602.
- Jalasvuori M., Friman V.P., Nieminen A., Bamford J.K. & Buckling A. 2011. Bacteriophage selection against a plasmid-encoded sex apparatus leads to the loss of antibiotic-resistance plasmids. *Biol Lett*. 7(6):902-5.
- Karanika S., Karantanos T., Arvanitis M., Grigoras C. & Mylonakis E. 2016. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 63(3):310-8.



- Klein E. Y., Van Boeckel T. P., Martinez E. M., Pant S., Gandra S., Levin S. A., Goossens H. & Laxminarayan R. 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(15): E3463–E3470.
- Klemperer R.M., Ismail N.T. & Brown M.R. 1979. Effect of R plasmid RPI on the nutritional requirements of *Escherichia coli* in batch culture. *J. Gen. Microbiol.* 115:325–231.
- Kliebe C., Nies B.A., Meyer J.F., Tolxdorff-Neutzling R.M. & Wiedemann B. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 28(2):302-7.
- Koraimann G. & Wagner M.A. 2014. Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:54.
- Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere.* 75:435–441.
- Lin A., Jimenez J., Derr J., Vera P., Manapat M.L., Esvelt K.M., Villanueva L., Liu D.R. & Chen IA. 2011. Inhibition of bacterial conjugation by phage M13 and its protein g3p: quantitative analysis and model. *PLoS One.* 6(5):e19991.
- Machineni L., Rajapantul A., Nandamuri V. & Pawar P.D. 2017. Influence of Nutrient Availability and Quorum Sensing on the Formation of Metabolically Inactive Microcolonies Within Structurally Heterogeneous Bacterial Biofilms: An Individual-Based 3D Cellular Automata Model. *Bull Math Biol.* 79(3):594-618.
- Martinez J.L. & Baquero F. 2014. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups J Med Sci.* 119(2):68-77.
- Michael I., Rizzo L., McArdell C.S., Manaia C.M., Merlin C., Schwartz T., Dagot C. & Fatta-Kassinos D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 47(3):957-95.
- Michon A., Allou N., Chau F., Podglajen I., Fantin B. & Cambau, E. 2011. Plasmidic *qnrA3* enhances *Escherichia coli* fitness in absence of antibiotic exposure. *PLoS ONE* 6, e24552
- Musovic S., A. Dechesne A., Sørensen J. & Smets B.F. 2010. Novel assay to assess permissiveness of a soil microbial community toward receipt of mobile genetic elements. *Appl. Environ. Microb.* 76:4813–4818.
- Norman A., Hansen L.H. & Sorensen S.J. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364(1527):2275-89.
- Ojala V. Mattila S., Hoikkala V., Bamford J.K. & Jalasvuori M. 2014. Evolutionary rescue of bacteria via horizontal gene transfer under a lethal  $\beta$ -lactam concentration. *J Glob Antimicrob Resist.* 2(3):198-200.

- Paulsson J. 2002. Multileveled selection on plasmid replication. *Genetics*. 161(4):1373-84.
- Paterson P. L. & Bonomo R. A. 2005 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 18(4): 657-686.
- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B. & Balcázar J.L. 2018. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends Microbiol*. 26(11):896-903.
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 56(1):20-51.
- Reading C. & Cole M. 1977. Clavulanic acid: A  $\beta$ -lactamase inhibitor from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 11: 852-857.
- Rozwandowicz M., Brouwer M.S.M., Fischer J., Wagenaar J.A., Gonzalez-Zorn B., Guerra B., Mevius D.J. & Hordijk J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 73(5):1121-1137.
- Smillie C., Garcillán-Barcia M.P., Francia M.V., Rocha E.P., de la Cruz F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74(3):434-52.
- Stewart P.S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol*. 292:107-113.
- Udikovic-Kolic N., Wichmann F., Broderick N.A. & Handelsman J. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 111:15202-15207
- Van Hoek A.H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P. & Aarts H.J.M. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol*. 2:203.