

LuK-tutkielma

**CRICON-plasmidisysteemin siirtyminen kliinisiin
ESBL-bakteerikantoihin**

Emilia S. Lintilä, Anni A. Maja ja Sanna M. Vacker



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Biologia

03.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Biologia

Emilia Lintilä, Anni Maja ja Sanna
Vacker:
Kandidaatin tutkielma:
Tutkielman ohjaajat:

CRICON-plasmidisysteemin
siirtyminen kliinisiin ESBL-kantoihin
38 s, 2 liitettä (6 s.)
FT Reetta Penttinen ja dos. Matti
Jalasvuori

Joulukuu 2021

Hakusanat: Antibioottiresistenssi, CRISPR-Cas9, konjugatiivinen plasmidi

Bakteerit ovat kehittäneet useita erilaisia mekanismeja, joiden avulla ne voivat suojautua antibiootteja ja muita toksisia yhdisteitä vastaan. Tähän tarkoitukseen toimiva keino on vieraan DNA:n hankinta horisontaalisen geeninsiirron avulla, ja myös antibioottiresistenssigeenit leviävät tehokkaasti esimerkiksi konjugatiivisten plasmidien mukana. ESBL (engl. extended spectrum beta-lactamase) -bakteerit kykenevät tuottamaan betalaktamaasi-entsyymejä, jotka hajottavat useita erilaisia bakteeri-infektioiden hoitoon käytettyjä betalaktaamiantibiootteja, minkä vuoksi ne ovat suuri ongelma terveydenhuollolle. CRICON on kahden plasmidin muodostama, konjugaation avulla liikkuva CRISPR-Cas9 -plasmidisysteemi, joka voidaan ohjelmoida sekvenssispesifisesti katkaisemaan antibioottiresistenssi- kuten ESBL-geenejä. Sen on aiemmin tutkittu poistavan tehokkaasti betalaktamaasigeenejä bakteeripopulaatioista, kun kohteena käytetään, *Escherichia coli* -laboratoriokantoja. Ei kuitenkaan tiedetä, kuinka hyvin se soveltuu antibioottiresistenssigeenien poistamiseen luonnollisista bakteeri-isolaateista. Tämän tutkimuksen tarkoituksena olikin selvittää, kuinka tehokkaasti CRICON siirtyy *E. coli* -bakteerista kliinisiin ulostenäytteistä eristettyihin ESBL-bakteerikantoihin ja millaiset geneettiset tekijät vastaanottajabakteerissa siihen vaikuttavat. CRICON-systeemin siirtymistä tutkittiin konjugaatiokasvatuksilla, joissa CRICON-transkonjugantit selektoitiin antibioottivalinnan avulla. Lopuksi tutkittiin myös millaiset geneettiset tekijät vastaanottavassa ESBL-bakteerissa mahdollisesti vaikuttavat CRICON-systeemin leviämistehokkuuteen. CRICON-systeemi onnistuttiin siirtämään useaan ESBL-kantaan, joiden joukossa oli usea *E. coli* -kanta, kaksi *Klebsiella pneumoniae* -kanta ja yksi *Proteus hauseri* -kanta. Tutkimuksen perusteella näytti myös siltä, että usean plasmidin esiintyminen kohdebakteerissa heikensi CRICON-systeemin siirtymistä. Tutkimuksen tuloksia voidaan tulevaisuudessa käyttää CRICON-systeemin kehittämiseen ESBL-bakteerien poistamiseksi suolistomikrobiomista.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science

Biology

Emilia Lintilä, Anni Maja ja Sanna
Vacker:
Kandidaatin tutkielma:
Tutkielman ohjaajat:

CRICON-plasmidisysteemin
siirtyminen kliinisiin ESBL-kantoihin
38 p., 2 supplements ([6] p.)
FT Reetta Penttinen ja dos. Matti
Jalasvuori

December 2021

Keywords: Antibiotic resistance, CRISPR-Cas9, conjugative plasmids, ESBL

Bacteria have developed multiple different mechanisms to protect themselves against antibiotics and other toxic compounds. A practical way to do that is by acquiring foreign DNA via horizontal gene transfer and antibiotic resistance genes also spread efficiently along with conjugative plasmids. ESBL (extended spectrum beta-lactamase) -bacteria produce beta-lactamases, enzymes that can degrade multiple different beta-lactam antibiotics, and their global prevalence poses a significant concern to health care. CRICON is a CRISPR-Cas9 plasmid system composed of two plasmids that move via conjugation. Its CRISPR-system can be programmed to produce sequence specific DNA nicks to antibiotic resistance genes like ESBL-genes. It has been previously found to eradicate resistance genes efficiently from bacterial populations when using *Escherichia coli* laboratory strains as a target. However, it is not known whether it is applicable for removing antibiotic resistance genes from natural bacterial isolates. The aim of this study was to study the transfer efficiency of CRICON system from *E. coli* donor strain to ESBL-recipient strains that were isolated from fecal samples and to examine which genetic traits of the recipient impact on the transfer of the system. Conjugation efficiency of CRICON was examined by conjugation cultivations from which the CRICON transconjugants were selected via antibiotic selection. At the end of the study, we examined which genetic traits, such as conjugative plasmids already present in the recipient ESBL-bacteria, affected the CRICON system dispersal. In this study, CRICON system was successfully transferred to multiple ESBL strains representing species such as *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus hauseri*. The study also indicated that multiple plasmids carried by the recipient strain had a negative effect on the CRICON transfer efficiency. In the future, these results can be utilized for more efficient optimization of CRICON system to eradicate ESBL-producing bacteria from microbial communities such as gut microbiome.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
2 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	7
2.1 Bakterikannat ja kasvatusolosuhteet	7
2.3 Antibioottiresistenssin ja inhibition testaus	14
2.4 CRICON:in siirtymisen testaus ESBL-bakteereihin kuoppalevyllä.....	15
2.5 CRICON-konjugaatiokokeet.....	16
3 TULOKSET	17
3.1 Antibioottiresistenssitesti.....	17
4 TULOSTEN TARKASTELU	25
4.1 Antibioottiresistenssin testaus.....	26
4.2 CRICON konjugaatio.....	26
KIITOKSET.....	33
KIRJALLISUUS.....	34
LIITE 1: PlasmidFinder2.1- ja ResFinder4.1-ohjelmistojen www-sivut	39
LIITE 2. ESBL-kantojen kasvu antibioottiselektiomaljoilla antibioottiresistenssitestissä.....	40

SANASTO JA LYHENTEET

SANASTO

<i>Bla</i>-geeni	Geeneistä, jotka koodaavat betalaktamaaseja käytetään nimeä <i>bla</i> , jota seuraa tietyn entsyymin nimi
CRICON-systeemi	Ruotsalainen ym. (2019) kehittämä termi muunnelluille konjugatiivisille ja/tai mobilisoitaville plasmideille, jotka sisältävät CRISPR-Cas9 -systeemin
pCRISPR	Plasmidi, joka sisältää <i>Streptococcus pyogenes</i> -bakteerilta saadun CRISPR-Cas9 -systeemin
RP4	IncP-tyypin konjugatiivinen plasmidi
Transkonjugantti	Vastaanottajabakteeri, johon halutun plasmidin siirto on onnistunut

LYHENTEET

Cas9	engl. <i>CRISPR Associated protein 9</i>
CFU	engl. <i>Colony forming unit</i> , pesäkkeen muodostava yksikkö
CRISPR	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
ESBL	engl. <i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i> , laajakirjoinen betalaktamaasi

1 JOHDANTO

Antibioottien löytäminen on yksi ihmisten historian käännekohtista, sillä antibioottien käyttö mullisti lääketieteen ja niiden käyttö on pelastanut lukemattomien ihmisten henkiä. Antibioottien käytön seurauksena niille resistenttejä bakteerikantoja alkoi kuitenkin ilmestyä nopeasti (Davies & Davies 2010). Antibioottiresistenssillä tarkoitetaan bakteerien kykyä puolustautua antibiootteja vastaan. Se on kehittynyt bakteereille miljardien vuosien saatossa keinona suojautua muiden mikrobien erittämiltä antimikrobiaalisilta aineilta. Antibioottien pitkäaikainen ja runsas käyttö esimerkiksi lääketieteessä ja karjataloudessa on johtanut antibioottiresistenssin yleistymiseen, mikä on maailmanlaajuisesti suuri ongelma, koska antibioottien käyttö antaa resistentille bakteereille kilpailuedun ja resistenssigeenit yleistyvät populaatioissa (Bennett 2008; Van Boeckel ym. 2015).

Bakteereilla on merkittävä geneettinen plastisuus, mikä mahdollistaa niiden reagoinnin monenlaisiin ympäristöuhkiin, kuten antibioottien läsnäoloon. Bakteereilla on mekanismeja, joiden avulla niiden perimä voi sopeutua antibiootteihin. Ensimmäinen mekanismi on geenien mutaatiot niissä geneissä, jotka liittyvät antibiootin vaikutusmekanismeihin. Toinen mekanismi on horisontaalinen geeninsiirto, jossa bakteeri hankkii ympäristöstään vierasta DNA:ta, joka koodaa resistenssigeeniä. Geenien mutaatiosta aiheutuva resistenssi syntyy, kun bakteereille kehittyy mutaatioita geneissä, jotka voivat vaikuttaa antibiootin toimintaan (Manson ym. 2010). Mutaatiot perustuvat DNA:n emäsmuutoksiin, deleetioihin ja inversioihin, jolloin bakteeriin ei siirry DNA:ta ympäristöstä (Bennett 2008). Tämä johtaa bakteerisolujen selviytymiseen, vaikka antibioottia olisi ympäristössä. Resistentin mutantin ilmaantuessa antibiootti tappaa sensitiiviset bakteerit, jolloin resistentit bakteerit saavat muihin nähden

kilpailuedun. Mutaatiot, jotka johtavat resistenssin syntymiseen, muuttavat antibiootin vaikutusta erilaisilla mekanismeilla. Antibiootin kohteessa tapahtuvia muutoksia ovat esimerkiksi affiniteetin heikentyminen antibioottia kohtaan ja lääkkeen sisäänoton väheneminen sekä efflux-mekanismien aktivointi, joka on kuljetusmekanismi haitallisten molekyylien poistamiseksi solusta (Manson ym. 2010).

Vieraan DNA:n hankinta horisontaalisen geenin siirron avulla (HGT) on yksi tärkeimmistä bakteerien evoluutiota ohjaavista tekijöistä. Se on usein myös syynä antibioottiresistenssin leviämiseen (Manson ym. 2010). Horisontaalisen geeninsiirron avulla bakteerit pystyvät vaihtamaan keskenään geneettistä materiaalia ja se voi myös tapahtua eri lajien välillä (Le Roux & Blokesch 2018). Bakteerit hankkivat vierasta geneettistä materiaalia pääasiassa kolmella eri keinolla: transformaatiolla, transduktiolla ja konjugaatiolla (Manson ym. 2010). Transformaatiossa bakteeri ottaa vastaan vierasta DNA:ta, jolloin sen genomi muuttuu ja täydentyy uudella DNA:lla. Teoriassa tämä vaatii ainoastaan elinkykyisen vastaanottajasolun (Chen & Dubnau 2004). Transduktiossa DNA:ta kulkeutuu bakteriofaagien välityksellä bakteerilta toiselle, kun faagi replikoituu ja uusien faagien genomiin voi jäädä osia isännän perimästä (Norman ym. 2009). Konjugaatiossa DNA:ta kuljetetaan bakteerilta toiselle solujen väliin muodostuvaa kanavaa, pilusta pitkin. (Turnbaugh ym. 2010).

Plasmidit ovat sirkulaarisia, kaksijuosteisia DNA-molekyyliä, jotka sisältävät vaihtelevan määrän genejä muutamasta jopa satoihin. Plasmidit ovat erillisiä bakteerin muusta perimästä eli kromosomista ja ne kykenevät itsenäiseen monistumiseen (Bennett 2008). Plasmidit ovat tärkeitä vektoreita horisontaalisessa geeninsiirrossa ja ne voivat kantaa muun muassa antibioottiresistenssigeenejä (Smillie ym. 2010). Itsestään siirtyvät eli konjugatiiviset plasmidit voivat auttaa myös ei-konjugatiivisia plasmideja siirtymään bakteerista toiseen. Yleensä konjugatiivisten plasmidien runko on suurilta osin hyvin konservoitunut (Norman ym. 2009). Plasmidit usein myös kantavat mukanaan niin sanottuja 'accessory

elementtejä', jotka koodaavat erilaisia isäntäsolulle hyödyllisiä ominaisuuksia (Eberhard 1990). Konjugaatiota varten plasmidilla täytyy olla *Tra*-operoni, joka koodaa useimpia bakteerikonjugaatioon tarvittavia proteiineja, sekä *oriT*-alue (Lu ym. 2018; Frost & Koraimann 2010).

Yksi tapa luokitella plasmideja on jakaa ne Inc (engl. incompatibility) -ryhmiin, jotka kuvaavat plasmidien yhteensopimattomuutta. Kaksi plasmidia, jotka kilpailevat solussa samasta replikaatiokoneistosta ovat yhteensopimattomia ja kuuluvat näin ollen samaan Inc-ryhmään, eivätkä pysy stabiilisti samassa isäntäsolussa (Novick 1987). Resistenssigeenejä kantavat plasmidit voidaan jakaa kahteen pääryhmään, joita kutsutaan kapean isäntäkirjon omaavaksi ryhmäksi ja laajan isäntäkirjon omaavaksi ryhmäksi. Kapean isäntäkirjon plasmidit kuuluvat yleisimmin IncF-ryhmään ja laajan isäntäkirjon plasmidit IncA/C-, IncL/M- tai IncN-ryhmään (Mathers ym. 2015). IncF-ryhmä on heterogeeninen joukko plasmideja, joita on usein löydetty *E. coli* -bakteereista, ja ne ovat merkittävässä roolissa antibioottiresistenssigeenien leviämisessä enterobakteereilla (Carattoli 2009). Osa tämän ryhmän plasmideista on liitetty geeneihin, jotka antavat resistenssin betalaktaameille (Marcadé ym. 2009).

Konjugaatiossa antibioottiresistenssigeenit leviävät tehokkaasti konjugatiivisten plasmidien välityksellä, joita löytyy useilta luonnosta eristetyiltä bakteereilta. Plasmidit voivat antaa bakteereille hyödyllisiä geenejä ja parantaa niiden elinkykyä. Vaikka antibioottien käyttö lopetettaisiin, konjugatiiviset plasmidit, jotka ovat valikoituneet aiemmin käytettyjen antibioottien perusteella, voivat silti säilyä bakteeripopulaatiossa tai siirtyä uusiin bakteerikantoihin (Dionisio ym. 2005). Plasmidivälitteiseen horisontaaliseen geeninsiirtoon vaikuttavat erilaiset ympäristötekijät kuten antibiootit, raskasmetallit ja nanopartikkelit (Zhang ym. 2018).

Betalaktaamit ovat ryhmä antibiootteja, jotka vaikuttavat bakteerisolun soluseinään inhiboiden sen elintärkeän rakenneosan, peptidoglykaanin, synteesiä (Eckburg ym. 2019). Bakteerien resistenssi betalaktaameja vastaan on luultavasti yleistynyt

yksittäisistä resistenteistä bakteerisoluihin. Resistenssistä on tullut kilpailuetu betalaktaamien käytön yleistyessä, jolloin se on myös levinnyt bakteeripopulaatiossa hyödyllisenä ominaisuutena. Betalaktamaasit ovat betalaktaamiantibiootteja hajottavia, gram-negatiivisten bakteerien tuottamia entsyymejä, joita resistenssigeenit koodaavat (D'Costa ym. 2011). Betalaktaamiresistenssi pohjautuu hydrolyyttisten betalaktamaasientsyymien tuotantoon ja nämä entsyymit estävät amidisidoksen muodostumista betalaktaamin betalaktaamirenkaassa, tehden antibiootista tehottoman (Poole 2004). Betalaktamaasit yleistyivät 1980-luvun alussa runsaan ja laajalle levinneen betalaktaamiantibioottien käytön seurauksena, ja ne ovat osoittautuneet suureksi ongelmaksi bakteeri-infektioiden hoidossa. Betalaktaamiantibiootteja on kehitetty siten, että ne ovat resistenttejä spesifisesti betalaktamaasien aiheuttamaa hydrolyyttistä toimintaa vastaan. Kuitenkin potilaiden hoidossa käytettyjä betalaktaamiantibiootteja kohtaan bakteereilla on kehittynyt uusia betalaktamaaseja, jotka aiheuttavat resistenssin kyseisille lääkkeille (Bradford 2001).

Geeneistä, jotka koodaavat betalaktamaaseja käytetään yleensä nimeä *bla*, jota seuraa tietyn entsyymin nimi. *bla*-geenejä on löydetty kromosomeista tai ne voivat sijaita MGE:issä, (engl. mobile genetic elements eli liikkuvat geneettiset elementit) kuten plasmideissa. Geenivariantteja on tähän mennessä löydetty yli 1000. Yleisesti käytössä on kaksi tapaa luokitella betalaktamaaseja. Molekyyleihin perustuva luokittelutapa perustuu aminohapposekvensseihin ja se jakaa betalaktamaasit luokkien A, C ja D entsyymeihin, jotka käyttävät seriiniä betalaktaamin hydrolyysiin. Luokan B metalloentsyymit vaativat kaksiarvoisia sinkki-ioneja substraatin hydrolyysiin. Toiminnallisen luokittelun mukaan betalaktamaasit jaetaan kolmeen pääryhmään, jotka jakautuvat vielä alaryhmiin. Luokittelu perustuu betalaktamaasien hydrolyysin nopeuteen verrattuna tiettyihin ennalta määrättyihin lääkkeisiin (Bush & Jacoby 2010).

ESBL (engl. extended spectrum beta-lactamase) on bakteerin hankkima tai sen kromosomissa valmiiksi oleva geneettinen ominaisuus, jonka avulla se kykenee tuottamaan betalaktamaasi-entsyymejä, jotka pilkkovat useita eri betalaktaamiantibiootteja ja antavat bakteereille resistenssin niitä kohtaan (Bush ym. 1995). ESBL-geenit, jotka koodaavat betalaktamaaseja on luokiteltu 12:een eri rakenteelliseen ja evolutiiviseen luokkaan, joita kutsutaan myös geeniperheiksi. Luokat ovat TEM, SHV, IRT, CMT, CTX-M, GES, PER, VEB, BEL, TLA, SFO ja OXY. Nykyään CTX-M-luokan entsyymit ovat yleisimmin löydettyjä ja CTX-M-15-varianttia esiintyy maailmanlaajuisesti. Aiemmin suurimmat luokat muodostuivat TEM- ja SHV-entsyymeistä, jotka ovat läheistä sukua keskenään (Castanheira ym. 2021). Suurin osa ESBL:istä ovat johdannaisia laajalle levinneistä, laajakirjoisista TEM-1- ja SHV-1-tyypin betalaktamaaseista (Bradford 2001). OXA-geeniperheen entsyymit muodostavat nykyään toiseksi suurimman betalaktamaasien perheen. Muita hieman harvinaisempia ESBL-tyyppejä ovat BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 sekä jotkin PER- ja VEB-geeniperheiden jäsenet (Bush & Jacoby 2010).

CRISPR (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) -lokus yhdessä *cas* (CRISPR-associated) -geenien kanssa on bakteerien puolustusmekanismi vieraita nukleiinihappoja, kuten bakteriofaageja ja plasmideja vastaan (Moineau ym. 2010). CRISPR on bakteerien genomissa spesifinen alue, joka muodostuu toistojaksoista ja niin kutsutuista 'spacer'-sekvensseistä (Ishino ym. 1987). CRISPR:n toistojaksojen väleihin jäävät spacer-sekvenssit ovat homologisia joidenkin bakteriofaagien genomien sekä liikkuvien geneettisten elementtien kanssa eli ne sisältävät samanlaisen DNA:n emäsjärjestyksen (Bolotin ym. 2005). Spacerit ovat noin 21–72 emäsparia pitkiä ja ne muodostuvat bakteerin genomien ulkopuolelta tulleesta DNA:sta (Moineau ym. 2010). Tunkeutuva DNA tunnistetaan Cas-proteiinin avulla, se pilkkotaan ja sisällytetään spacer-jaksoon. Hyödyntämällä crRNA:ssa olevan spacer-sekvenssin homologiaa vieras DNA tunnistetaan ja katkaistaan (Bolotin ym. 2005). Luonnollisesti esiintyvässä tyypin II CRISPR-Cas -systemissä voi esiintyä useita spacereita, joista jokainen käsitellään itsenäiseksi crRNA (CRISPR RNA) -molekyyliseksi (Brouns ym. 2008). crRNA-opas

sitoutuu Cas9-kompleksiin crRNA:n aktivointiprosessin aikana. Liittymiseen tarvitaan RNAaasi III -entsyymiä sekä lyhyelle crRNA:lle komplementaarinen RNA:n mallijuoste, tracrRNA (Jiang ym. 2013). tracrRNA toimii systeemissä Cas9:n kiinnittymispintana (Doudna ym. 2014). Cas9 on kaksijuosteista DNA:ta pilkkova endonukleaasi, joka katkaisee kohdesekvenssin oppaana toimivan crRNA:n sekvenssin perusteella (Deltcheva ym. 2011).

CRISPR-Cas9 -systeemi on vasta melko hiljattain kehitetty muokkaamaan DNA:n kaksoiskierrettä tekemällä siihen spesifisiä katkoksia. Sitä voidaan käyttää genomin editoimista varten tai tekemään suoraa kohdistettua transkriptionaalista säätelyä (Kabadi ym. 2014). Yksi etu Cas9:n avulla tehtävässä genomin muokkaamisessa on mahdollisuus ohjelmoida nukleaasi crRNA-oppaan avulla erilaisten kromosomaalisten ja plasmidisekvenssien haluttuun kohtaan, jolloin kohteelta voidaan poistaa esimerkiksi antibioottiresistenssigeenejä (Bikard ym. 2014).

Tässä kandidaattityössä käytettävä CRICON (CRISPR via conjugation) on Jyväskylän yliopistossa suunniteltu CRISPR-Cas9 -systeemiin perustuva geneettinen työkalu, jota voidaan käyttää katkaisemaan bakteerien resistenssigeeni sekvenssispesifisesti crRNA:n ohjaamana. CRICON hyödyntää horisontaalista geeninsiirtoa, jossa CRISPR-Cas9 -systeemiä koodaava geenialue siirretään konjugatiivisen plasmidin ohjaamana vastaanottajalle piluksen kautta. CRICON koostuu konjugatiivisesta IncP α -ryhmään kuuluvasta RP4-plasmidista ja pCRISPR-plasmidista, joka liikkuu RP4-plasmidin mukana siihen liitetyn *oriT*-alueen ansiosta. pCRISPR sisältää *Streptococcus pyogenes* -bakteerilta saadun CRISPR-Cas9-systeemin. Cas9:n avulla CRISPR-systeemi voidaan kohdistaa resistenssigeenejä vastaan ja saada ESBL-positiiviset bakteerikannat menettämään resistenssinsä antibiootteja kohtaan (Ruotsalainen ym. 2019).

Ruotsalainen ym. (2019) ovat onnistuneet siirtämään CRICON-systeemin *E. coli*-laboratoriokantojen välillä ja Kovanen & Shemeikka (2019) *Salmonella* Typhimurium -bakteeriin, mutta systeemin siirtymistä ei ole vielä testattu kliinisillä bakteerikannoilla, jotka kantavat useita plasmideja ja ovat usein kilpailukykyisiä

sekä voivat inhiboida muiden bakteerien kasvua. Tämän tutkimuksen tarkoituksena onkin tutkia, millaisiin moniresistentteihin ESBL-bakteerikantoihin CRICON-systeemi voi siirtyä ja millaiset vastaanottajabakteerin geneettiset tekijät siirtymiseen vaikuttavat. CRICON-systeemin siirtymistä tutkittiin konjugaatiokokeilla, joissa CRICON-systeemiä kantavaa *E. coli* -bakteeria kasvatettiin yhteiskasvatuksessa ESBL-bakteerien kanssa. Tutkielman bioinformatiikan osuudessa selvitettiin ESBL-bakteerien sekvenssitietojen perustella tiedot resistenssigeeneistä ja plasmideista. Näiden avulla voidaan selvittää, millaisia kantoja vastaan CRICON-systeemiä voidaan käyttää ja millaisia geneettisiä tekijöitä vastaanottajakannoissa on, jotka voivat estää tai mahdollistaa CRICON-systeemin siirtymisen. Hypoteesina tutkimuksessa on, että CRICON-systeemi onnistutaan siirtämään ainakin joihinkin sellaisiin ESBL-kantoihin, joihin RP4-plasmidi on saatu siirrettyä aiemmissa tutkimuksissa. Oletuksena on myös, että osalla ESBL-kannoista on valmiiksi useita plasmideja, joiden kantaminen on kuormittavaa, jolloin CRICON ei välttämättä ole suotuisa kyseisille bakteereille. CRICON-systeemin siirtäminen antibioottiresistentteihin bakteerikantoihin on erittäin tärkeä tutkimuskohde, sillä antibioottiresistenssin poistaminen mahdollistaa bakteerien aiheuttamien sairauksien hoitamisen antibiooteilla, jotka eivät ole tehonneet bakteerien resistenssin takia.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Bakteerikannat ja kasvatusolosuhteet

Tutkimuksessa käytetyt ESBL-bakteerikannat oli saatu Turun yliopistollisesta keskussairaalaista, jossa ne oli eristetty ulostenäytteistä (VSSH:n tutkimuslupa T300/2020). Kerätyt ESBL-bakteerit ovat resistenttejä usealle antibiootille. Resistenssi rifampisiinia kohtaan oli varmistettu ennen tutkimusta altistamalla ESBL-bakteereja kyseiselle antibiootille. Suurin osa tutkimuksessa käytetyistä bakteereista kuului *Escherichia coli* -lajiin mutta joukossa oli myös muutamia

Klebsiella pneumoniae ja *Enterobacter cloacae* -kantoja sekä muutamia muita yksittäisiä kantoja (*Enterobacter xiangfangensis*, *Proteus hauseri* ja *Enterobacter hormaechei*) (Taulukko 1).

CRICON-luovuttajakantana toimi HB-CC eli *E. coli* K-12 HB101 (RP4-ampdel)(pCRISPR-*oriT*). RP4-ampdel on systeemin konjugatiivinen plasmidi, jossa on resistenssi kanamysiinille ja siitä on poistettu ampisilliiniresistenssi eli osa *bla*-geenistä. RP4-plasmidin mukana kulkee pCRISPR-plasmidi, eli pCas9-plasmidi, johon on lisätty *oriT*-alue ja jossa on kloramfenikoliresistenssi. CRICON:in lisäksi tutkimuksessa testattiin myös pelkän muokkaamattoman RP4-plasmidin siirtymistä, jonka luovuttajakantana toimi *E. coli* K-12 JE2571(RP4).

HB-CC- ja JE2571(RP4)-kantoja kasvatettiin L-liemessä (Lennox ES. 1955), 37 °C lämpötilassa yön yli (16–20 h), 210 rpm ravistelijassa. L-agar 1 % ja L-soft-agar 0,7 % kasvatusmaljoilla kasvatetut ESBL-bakteerit, HB-CC- ja JE2571-kannat kasvatettiin 37 °C lämpötilassa yön yli. Kasvatusalustoihin lisättiin tarvittaessa antibiootteja seuraavissa konsentraatioissa: kloramfenikoli 25 µg/ml, kanamysiini 25 µg/ml, rifampisiini 50 µg/ml ja streptomysiini 25 µg/ml.

2.2 Resistenssigeenien ja plasmidien tutkiminen bioinformatiikan avulla

Tutkimuksessa käytettyjen ESBL-bakteerikantojen genomit oli aiemmin sekvensoitu ja niistä oli käytettävissä kootut, pidemmät DNA-sekvenssit, kontigit. Bakteerien sekvenssien avulla selvitettiin, millaisia resistenssigeenejä ja plasmideja ne kantoivat. Tähän käytettiin Center for Genomic Epidemiology -sivuston ylläpitämiä ResFinder 4.1 ja PlasmidFinder 2.0 -ohjelmistoja (Liite 1).

Resfinder 4.1 -ohjelmistossa kaikilla kannoilla resistenssigeenien etsimiseksi valittiin "Acquired antimicrobial resistance genes" sekä *E. coli* ja *Klebsiella pneumoniae* -kannoille valittiin lisäksi "Chromosomal point mutations", sillä

kromosaomaaliset mutaatiot oli tutkittavissa vain näillä lajeilla. Molemmilla työkaluilla "threshold for %ID" oli 90 % ja "minimum length" 60 %.

PlasmidFinder 2.0 "Database" käytettiin Enterobacteriaceae, "Threshold for minimum % identity" oli 95 % ja "minimum coverage" oli 60 %. "Readtype" oli Assembled or drift genome/contigs.

Tarkasteltavina olivat resistenssigeenit betalaktaameja, aminoglykosideja ja kloramfenikolia vastaan (Taulukko 1). CRICON-systeemin mukana siirtyy resistenssi kanamysiiniä ja kloramfenikolia vastaan, joten tutkimuksessa käytettävillä lajeilla ei saa olla valmiiksi kyseisille antibiooteille resistenssigeenejä. ESBL-kantojen kantamat plasmidit haluttiin selvittää, koska ei ollut varmuutta kantoivatko ne jo muita plasmideja. Kannoilta löydetyt plasmidit on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt ESBL-bakteerit ja niiden antibioottiresistenssigeenit.

Näyte	Laji	Betalaktaami	Aminoglykosidit	Kloramfenikoli
4B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
7B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
8B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-27	-	-
12B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
17B2	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15 <i>bla</i> TEM-1B <i>bla</i> OXA-1	<i>aadA1</i>	<i>catA1</i>
21B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> TEM-1B <i>bla</i> CTX-M-27	<i>mdf(A)</i> <i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(6)-Id</i> <i>aadA5</i>	-
26B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
27B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> TEM-1B <i>bla</i> CTX-M-14	<i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>aac(6')-Ib3</i>	<i>cmlA1</i>
29B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> TEM-1C <i>bla</i> CTX-M-14	<i>mdf(A)</i> <i>aph(6)-Id</i> <i>aph(3'')-Ib</i>	-
31B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> TEM-52C	<i>mdf(A)</i>	-
35B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> TEM-1B <i>bla</i> CTX-M-14	<i>aph(3'')-Ib</i> <i>aadA5</i> <i>aac(3)-IId</i> <i>aph(6)-Id</i>	-
39B1	<i>Escherichia coli</i>	N/A	N/A	N/A
40B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
41B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
41B2	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15	-	-
42B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15 <i>bla</i> TEM-1B	-	-
43B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> TEM-1B <i>bla</i> CTX-M-15	<i>aac(3)IId</i> <i>mdf(A)</i> <i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(6)-Id</i>	-
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> ACT-7 <i>bla</i> TEM-1B	<i>aadA1</i> <i>aadA2</i>	<i>cmlA1_M64556</i>
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> CTM-M-15 <i>bla</i> SHV-11/67 <i>bla</i> OXA-1 <i>bla</i> TEM-1B	<i>armA</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>OqxA</i> <i>OqxB</i> <i>catB3</i>

50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-11/67</i> <i>blaOXA-1</i> <i>blaTEM-1B</i> <i>blaCTX-M-15</i>	<i>armA</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>catB3</i> <i>OqxA</i> <i>OqxB</i>
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	<i>hugA</i>	-	-
54B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaACT-4</i>	-	-
58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaACT-7</i>	-	-
59B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaCTX-M-15</i> <i>blaTEM-1B</i>	-	-
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaACT-15</i>	-	-
69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaACT-7</i>	-	-
72B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaTEM-1B</i> <i>blaCTX-M-14</i>	-	-
73B1	<i>Enterobacter</i> <i>xiangfangensis</i>	<i>blaACT-7</i>	-	-
74B1	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i>	<i>blaACT-7</i>	-	-
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaACT-7</i>	-	-
77B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaCTX-M-15</i>	-	-
78B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaCTX-M-15</i>	-	-

Taulukko 2. Käytettyjen ESBL-kantojen plasmidit ja niiden vastaavuudet.

Näyte	Laji	Plasmidi	Samankaltaisuus (%)	Geneettisen alueen pituus (bp)
4B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918)	96,63	682/682
		IncFII(29)	99,61	259/259
		IncFII(pCoo)	99,62	262/262
		Col156	98,59	142/154
7B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIA	99,74	388/388
		IncFIB(AP001918)	99,71	682/682
		IncFII(pRSB107)	100	261/261
		Col156	98,59	142/154
8B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918)	96,63	682/682
		IncFII(29)	99,61	259/259
		IncI1-I(Gamma)	100	142/142
		Col156	98,59	142/154
12B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
17B2	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918)	96,77	682/682
		IncFII(pCoo)	95,08	264/262
		IncFII(pRSB107)	95,4	261/261
		IncI1-I(Alpha)	97,89	142/142
21B1	<i>Escherichia coli</i>	Col156	97,89	142/154
		IncFIA	100	388/388
		IncFIB(AP001918)	97,95	682/682
		IncFII	99,24	262/261
		IncFII(pRSB107)	100	261/261
26B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFII	100	261/261
27B1	<i>Escherichia coli</i>	IncB/O/K/Z	100	160/160
		IncFIA	99,74	388/388
		IncFIB(AP001918)	98,39	682/682
		Col(BS512)	100	233/233
		Col156	98,59	142/154
29B1	<i>Escherichia coli</i>	Col156	98,05	154/154
		Col156	96,1	154/154
		Inc/O/K/Z	100	151/151
		Inc/O/K/Z	100	160/160
		IncY	99,74	765/765
31B1	<i>Escherichia coli</i>	IncI1-I(Alpha)	99,3	142/142
		Col156	100	154/154
35B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIA	100	388/388
		IncFIB(AP001918)	97,95	682/682
		IncI1-I(Alpha)	100	142/142
		Col(BS512)	100	233/233
		Col156	98,59	142/154

39B1	<i>Escherichia coli</i>	N/A	N/A	N/A
40B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFII(pCoo) IncY	96,56 98,92	262/262 765/765
41B1	<i>Escherichia coli</i>	Col(BS512) IncFIB(H98- PhagePlasmid)	100 100	233/233 1000/1000
41B2	<i>Escherichia coli</i>	IncFIC(FII) IncFIB(H89- PhagePlasmid)	96,03 100	505/499 1000/1000
42B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIC(FII) Col(BS512)	96,03 100	504/499 207/233
43B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918) IncFII	97,65 97,7	682/682 261/261
46B1	<i>Escherichia coli</i>	Col156 IncFIA	98,59 100	142/154 388/388
49B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918) IncFII(29)	97,95 95,77	682/682 260/259
50B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	IncFIB(AP001918) IncX1	98,83 98,93	682/682 374/374
52B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IncFII(K)	98,65	148/148
54B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IncFII(K)	98.65	148 / 148
58B1	<i>Proteus hauseri</i>	-	-	-
59B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(K)	98.57	560 / 560
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Col(pHAD28)	96.61	118 / 131
69B1	<i>Escherichia coli</i>	Col156	98.59	142 / 154
72B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Col(pHAD28)	96.12	129 / 131
73B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
74B1	<i>Escherichia coli</i>	Col(KPHS6) IncB/O/K/Z IncFIA	100 96,69 99,48	178/178 151/151 388/388
76B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918) IncM1	97,65 97,71	682/682 742/739
77B1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	-	-
77B1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	-	-
77B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
77B1	<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(AP001918) IncFII(pRSB107)	98,39 100	682/682 261/261

2.3 Antibioottiresistenssin ja inhibition testaus

Antibioottiresistenssitestissä tutkittiin kaikkien kantojen antibioottiresistenssit kloramfenikolia, kanamysiiniä, rifampisiinia ja streptomysiiniä vastaan kuoppalevykasvatuksilla. Aluksi jokaista ESBL-bakteerikantaa ja HB-CC- sekä JE2571(RP4)-luovuttajakantaa kasvatettiin 96-kuoppalevyllä kolme replikaattia. Kuoppalevykasvatuksia varten jokaiseen tarvittavaan kaivoon mitattiin 200 µl L-lientä, minkä jälkeen jokaiseen kaivoon lisättiin yksi bakteeripesäke maljalta. Kuoppalevykasvatuksia kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa.

Yön yli kasvaneet bakteerikasvatukset maljattiin antibioottimaljoille replikoimalla kasvatusta jokaisesta 96-kuoppalevyn kaivosta TSP lidin (Thermo Fisher Scientific, Massachusett, USA) avulla ja painamalla se kevyesti antibioottitestauksia varten valmistetuille L-agarmaljoille, joiden L-agar kasvualusta sisälsi yhtä seuraavista antibiooteista: streptomysiini, rifampisiini, kanamysiini ja kloramfenikoli. Antibioottia sisältäville agarmaljoille replikoinnin lisäksi bakteerit replikoitiin myös pelkkää L-lientä sisältävälle agarmaljalle. Agarmaljoja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa.

Inhibitiotestissä haluttiin selvittää, inhiboivatko jotkin ESBL-kannat CRICON-luovuttajakantana toimivan HB-CC-kannan kasvua. 6 ml L-soft-agarina ja 300 µl yön yli kasvanutta HB-CC-kasvatusta sekoitettiin ja siitä valettiin bakteerimatto L-agarmaljan päälle inhibitiotestausta varten. Soft-agarkerroksen päälle painettiin TSP lidin avulla 96-kuoppalevyllä yön yli kasvatetut ESBL-bakteerikasvatukset kuten yllä. Maljoja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa.

Seuraavana päivänä maljoja tarkasteltiin silmämääräisesti. Jokaista kantaa oli kasvatettu kolme replikaattia (Liite 2). Jos antibioottiresistenssitestissä kolmesta replikaatista yhdenkään ei havaittu kasvaneen, tulkittiin, että bakteerit ovat sensitiivisiä kyseiselle antibiootille. Mikäli edes yksi replikaatti kolmesta oli

kasvanut, oletettiin bakteerien olevan resistenttejä antibiootille. Jos inhibiitotestauksessa kahdella tai kolmella maljalla havaittiin heikentyneitä kasvuja, mikä nähtiin kirkkaana renkaana pesäkkeen ympärillä, tulkittiin, että ESBL-bakteerit inhiboivat HB-CC-kannan kasvua.

2.4 CRICON:in siirtymisen testaus ESBL-bakteereihin kuoppalevyllä

Kuoppalevykasvatusten avulla haluttiin seuraavaksi selvittää, siirtyykö CRICON-systeemi ESBL-bakteereihin. Koska CRICON-systeemin pCRISPR-plasmidi kantaa kloramfenikoliresistenssigeeniä, valittiin tutkimukseen ne ESBL-kannat, jotka olivat antibioottiresistenssitestien mukaan kloramfenikolille sensitiivisiä. Siirtymisen testaamista varten HB-CC-kantaa laitettiin kasvamaan yksi pesäke 5 ml L-liemeen, joka sisälsi kloramfenikolia ja kanamysiiniä, ja sitä kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Myös JE2571(RP4)-kantaa laitettiin kasvamaan yksi pesäke 5 ml L-liemeen, joka sisälsi kanamysiiniä, yön yli 37 °C:seen.

Kasvatettuja HB-CC- ja JE2571(RP4)-kantoja laimennettiin molempia 1:1000 L-liemellä. Molemmille luovuttajakannoille valmistettiin myös omat 96-kuoppalevyt. Jokaiseen kuoppaan laitettiin 170 µl laimennettua luovuttajabakteeria, sekä 30 µl ESBL-bakteerikantaa. Jokaisesta konjugaatiokasvatuksesta tehtiin kolme replikaattia. Kuoppalevyjä kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

Kuopista replikoitiin bakteerit replikaattorin avulla selektiomaljoille kuten antibioottiresistenssitestissä. Antibioottiselektiomaljoja oli kahdenlaisia: kloramfenikoli-rifampisiini sekä kanamysiini-rifampisiini. CRICON-transkonjugantit replikoitiin molemmille selektiomaljoille ja RP4-transkonjugantit replikoitiin vain kanamysiini-rifampisiiniselektiomaljalle. CRICON-systeemi sisältää pCRISPR-plasmidin, joka tuo resistentin kloramfenikolia vastaan, sekä RP4-plasmidin, joka tuo resistenssin kanamysiiniä vastaan. Tämän vuoksi CRICON-systeemin sisään otaneita bakteereita eli transkonjugantteja voidaan selektoida kyseisten antibioottimaljojen avulla. RP4-plasmidin siirtymisen selektointiin riittää kanamysiiniä sisältävä selektiomalja. Rifampisiinia käytettiin selektiossa,

koska ESBL-bakteerit olivat sille resistenttejä ja HB-CC-bakteerit sensitiivisiä eli sen avulla voitiin selektoida alkuperäiset HB-CC-bakteerit pois. Selektiomaljoja kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

2.5 CRICON-konjugaatiokokeet

Tutkimukseen otettiin ne ESBL-kannat, jotka olivat antibioottiresistenssitestissä osoittautuneet kloramfenikolille sensitiivisiksi. CRICON-systeemi antaa onnistuneesti siirtyessään bakteerille resistenssin kloramfenikolia vastaan (pCRISPR-plasmidin kautta), joten kloramfenikolia käytettiin indikaattorina sen siirtymiselle.

Tutkimuksessa käytetyt ESBL-kannat kasvatettiin L-liemessä, johon lisättiin ampisilliinia 150 µg/ml. CRICON-kanta kasvatettiin L-liemessä, johon oli lisätty kanamysiiniä 25 µg/ml ja kloramfenikolia 25 µg/ml. JE2571(RP4) kasvatettiin L-liemessä, joka sisälsi kanamysiiniä 25 µg/ml. Kantoja kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

CRICON-kannasta valmistettiin konjugaatiokasvatusta varten jokaiselle ESBL-kannalle kaksi eri kasvatusputkea. Molemmat konjugaatiokasvatukset sisälsivät 5 ml L-lientä ja CRICON-luovuttajabakteeria 5 µl ($7,0 \times 10^8$ CFU/ml). Ensimmäinen kasvatus, jossa ei ollut antibioottia, merkittiin KL-merkinnällä. Lisäksi toiseen konjugaatiokasvatukseen lisättiin kanamysiiniä 2,5 µg/ml ja se merkittiin KK-merkinnällä. Kasvatusputkiin lisättiin 50 µl ESBL-vastaanottajabakteeria. Konjugaatiokasvatuksia kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

CRICON-transkonjugantit selektoitiin kloramfenikoli-rifampisiinimaljauksilla, sillä näin voitiin valita ne transkonjugatit, joihin kloramfenikoliresistenssin tuova CRICON-systeemi on siirtynyt. Yön yli kasvanutta konjugaatiokasvatusta laimennettiin 10^{-1} ja sitä maljattiin 100 µl transkonjuganttien selektoimiseksi. CRICON-transkonjugantit maljattiin kanamysiini-rifampisiini- ja kloramfenikoli-rifampisiinimaljoille, joita kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Syntyneiden transkonjuganttien bakteeritiheydet (CFU/ml) laskettiin seuraavalla kaavalla:

$$CFU/ml = \frac{1 \text{ ml}}{\text{Maljalle lisätty bakteerikasvatus (ml)}} \times X \times 10^{|Z|} \quad (1)$$

jossa X = bakteeripesäkkeiden määrä ja Z = laimennoskerroin. CRICON-systeemin konjugaatiotehokkuus laskettiin kaavalla:

$$\text{konjugaatiotehokkuus} = \frac{\text{CRICON – transkonjuganttien bakteeritiheys (CFU/ml)}}{\text{luovuttajakannan bakteeritiheys (CFU/ml)}} \quad (2)$$

Kloramfenikoli-rifampisiinimaljalla kasvatetuista CRICON-transkonjuganteista valittiin yksittäisesäkkeitä (2–16 kpl), joista tehtiin puhtasviljelmät kloramfenikoli-rifampisiinimaljoille. Maljoja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Niistä transkonjuganteista, jotka olivat kasvaneet kloramfenikoli-rifampisiinimaljoilla, tehtiin uudet puhtasviljelmät kloramfenikoli-kanamysiinimaljoille, joita kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

3 TULOKSET

3.1 Antibioottiresistenssitesti

CRICON-systeemin siirtymistä ESBL-bakteereihin testattiin antibioottivalinnan avulla, joten ensimmäisenä täytyi selvittää mille antibiooteille kukin ESBL-kanta oli resistentti tai sensitiivinen (Taulukko 3). Antibioottiresistenssitestauksessa testattiin kantojen resistenssiä kanamysiiniä, kloramfenikolia, rifampisiinia sekä streptomysiiniä vastaan. CRICON-systeemin pCRISPR-plasmidi tuo kantajalleen resistenssin kloramfenikolia vastaan ja RP4-plasmidi tuo resistenssin kanamysiiniä vastaan. Jatkoon valittiin sellaiset kannat, jotka olivat kloramfenikolille sensitiivisiä.

Yksikään ESBL-kannoista (Taulukko 3), lukuun ottamatta kantaa 46B1 ja HB-CC-luovuttajakantaa, ei kasvanut kasvatusmaljalla, johon kloramfenikolia oli lisätty. Kaikki vastaanottajakannat olivat resistenttejä rifampisiinille ja luovuttajakannat sensitiivisiä sille. Suurin osa kannoista oli sensitiivisiä kanamysiinille. Vain kuusi kantaa oli resistenttejä sille (Taulukko 3). Antibioottiresistenssitestauksessa oli

myös mukana streptomysiini, vaikka sitä ei käytetty kantojen selektoimiseen tässä tutkimuksessa.

Taulukko 3. ESBL-bakteerikantojen antibioottiresistenssi. Antibioottiresistenssi testattiin kasvattamalla ESBL-bakteereja neliömaljalla, jonka kasvatusalusta sisälsi streptomysiiniä (25 µg/ml), kanamysiiniä (25 µg/ml) ja kloramfenikolia (25 µg/ml) sekä rifampisiinia (50 µg/ml). Jokaisesta bakteerikannasta valmistettiin kolme kasvatusta ja tulokset tiivistettiin taulukoksi. Jos edes yhdessä replikaatissa havaittiin kasvua, merkittiin tulokseksi +, kuitenkin yksittäiset pesäkkeet merkittiin (+). Taulukossa – tarkoittaa ei kasvua.

Näyte	Laji	Strep.	Rif.	Kana.	Cam.
4B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
7B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
8B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
12B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
17B2	<i>Escherichia coli</i>	(+)	+	-	-
21B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
26B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
27B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	-
29B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
31B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
35B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	(+)	-
39B1	<i>Escherichia coli</i>	(+)	+	-	-
40B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
41B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
41B2	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
42B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	(+)
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-
49B2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-
50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	-	+	-	-
54B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-
59B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-
69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-
72B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
73B1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	+	-	-
74B1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	+	-	-
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-
77B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
78B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-

Antibioottiresistenssitestin jälkeen haluttiin selvittää, pystyvätkö jotkin ESBL-kannat kasvamaan CRICON-selektiomaljoilla eli kanamysiini-rifampisiini- ja kloramfenikoli-rifampisiinimaljoilla, jolloin CRICON-systeemin siirtymistä ei pystyttäisi havaitsemaan kyseisillä kannoilla. CRICON-selektiomaljoilla kasvatetuista ESBL-kannoista vain 27B1 kasvoi kloramfenikoli-rifampisiinimaljalla. Suurin osa kannoista ei myöskään kasvanut kanamysiini-rifampisiinimaljalla. Kyseisellä maljalla kasvoivat vain kannat 27B1, 43B1, 49B1, 49B2 ja 50B1.

Konjugaatiokokeissa haluttiin selvittää mille kannoille CRICON-systeemi saadaan siirrettyä. RP4-plasmidin sekä CRICON-systeemin siirtymistä luovuttajabakteereilta vastaanottajabakteereille pystyttiin arvioimaan kasvattamalla kuoppalevyllä replikoitua CRICON-konjugaatiokasvatusta kanamysiini-rifampisiini- ja kloramfenikoli-rifampisiinimaljoilla ja RP4-konjugaatiokasvatusta kanamysiini-rifampisiinimaljalla. Taulukosta 4 voi huomata, että noin puolet kannoista ovat saaneet RP4-plasmidin mukana resistenssin kanamysiiniä vastaan. HB-CC-luovuttajabakteerin kantama CRICON-systeemi sisälsi kaksi plasmidia, joista RP4-plasmidissa on resistenssigeeni kanamysiiniä vastaan ja pCRISPR-plasmidissa kloramfenikolia vastaan. Yhdeksällä kannalla havaittiin kasvua sekä kanamysiini-rifampisiini, että kloramfenikoli-rifampisiinimaljoilla (Taulukko 4). Kannoilla 43B1, 49B1 ja 50B1 kasvua havaittiin vain kanamysiini-rifampisiinimaljalla ja kannoilla 4B1, 8B1, 26B1, 31B1, 39B1, 42B1, 58B1, 63B1, 69B1, 74B1, 77B1 ja 78B1 vain kloramfenikoli-rifampisiinimaljalla. Kannoilla 7B1, 12B1, 21B1, 41B1, 41B2, 54B1, 59B1, 73B1 ja 76B1 kasvua ei havaittu kummallakaan maljalla.

Taulukko 4. CRICON- ja RP4-plasmidien konjugaatio ESBL-kantoihin. ESBL-kantoihin siirrettiin CRICON-systeemi, jota selektoitiin kanamysiini-rifampisiini ja kloramfenikoli-rifampisiinimaljoilla, sekä pelkkä RP4-plasmidi, jota selektoitiin kanamysiini-rifampisiinimaljalla. Taulukossa + tarkoittaa kasvua maljalla, (+) yksittäisiä pesäkkeitä ja - ei kasvua.

Näyte	Laji	CRICON (RP4+pCRISPR)		RP4
		Kana-Rif	Cam-Rif	Kana-Rif
4B1	<i>Escherichia coli</i>	-	(+)	+
7B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
8B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+
12B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+
17B2	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
21B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
26B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
27B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
29B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
31B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
35B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
39B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
40B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
41B1	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
41B2	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
42B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
43B1	<i>Escherichia coli</i>	(+)	-	+
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+
49B2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	-	+	-
54B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-
59B1	<i>Escherichia coli</i>	-	(+)	-
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+
69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-
72B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
73B1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	-	-
74B1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	+	-
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-
77B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
78B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
HB-CC	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
JE257	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-

Konjugaatiokokeen jälkeen tehtiin uudet konjugaatiokasvatukset (Taulukko 5) kaikista sellaisista kannoista (yhteensä 31 kantaa), joista transkonjugantteja näytti syntyneen (Taulukko 4). Jotta konjugaatiokasvatuksista pystyi selektoimaan CRICON-transkonjugantteja, tehtiin niistä ensin 10^{-1} -laimennokset. Tämän jälkeen laimennokset maljattiin kloramfenikoli-rifampisiini ja kanamysiini-rifampisiinimaljoille, jotta maljoilta pystyttiin seuraavana päivänä laskemaan syntyneet yksittäispesäkkeet sekä niiden avulla syntyneiden transkonjuganttien bakteeritiheydet kaavalla 1 ja konjugaatiotehokkuus (Taulukko 5) kaavalla 2.

Taulukko 5. CRICON-plasmidisysteemin konjugaatiotehokkuus ESBL-bakteereihin. Konjugaatiotehokkuus laskettiin syntyneiden transkonjuganttien suhteena CRICON-luovuttajabakteerien bakteeritiheyteen. ~ tarkoittaa arvioitua konjugaatiotehokkuutta, koska tarkkaa transkonjuganttien tiheyttä ei pystytty määrittämään.

Kanta	Laji	Konjugaatiotehokkuus	
		KL Cam -Rif	KK Kana-Rif
4B1	<i>Escherichia coli</i>	0	1,93x10 ⁻⁷
7B1	<i>Escherichia coli</i>	0	0
8B1	<i>Escherichia coli</i>	1,56x10 ⁻⁷	3,13x10 ⁻⁷
12B1	<i>Escherichia coli</i>	1,88x10 ⁻⁶	6,25x10 ⁻⁷
17B2	<i>Escherichia coli</i>	0	7,81x10 ⁻⁷
21B1	<i>Escherichia coli</i>	0	0
26B1	<i>Escherichia coli</i>	0	0
29B1	<i>Escherichia coli</i>	4,89x10 ⁻⁵	2,52x10 ⁻⁵
31B1	<i>Escherichia coli</i>	3,13x10 ⁻⁷	9,38x10 ⁻⁷
35B1	<i>Escherichia coli</i>	3,09x10 ⁻⁶	1,54x10 ⁻⁶
39B1	<i>Escherichia coli</i>	1,16x10 ⁻⁶	5,79x10 ⁻⁷
40B1	<i>Escherichia coli</i>	4,69x10 ⁻⁷	9,38x10 ⁻⁷
41B1	<i>Escherichia coli</i>	1,56x10 ⁻⁷	0
41B2	<i>Escherichia coli</i>	0	0
42B1	<i>Escherichia coli</i>	0	0
43B1	<i>Escherichia coli</i>	0	0
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	~1,93x10 ⁻⁴	~3,86x10 ⁻⁴
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,86x10 ⁻⁷	2,70x10 ⁻⁶
50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,16x10 ⁻⁶	2,51x10 ⁻⁶
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	~2,90x10 ⁻³	~1,93x10 ⁻³
54B1	<i>Escherichia coli</i>	3,86x10 ⁻⁷	1,93x10 ⁻⁷
58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,20x10 ⁻⁵	3,86x10 ⁻⁶
59B1	<i>Escherichia coli</i>	0	0
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,12x10 ⁻⁴	1,54x10 ⁻⁶
69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	3,13x10 ⁻⁵	2,66x10 ⁻⁶
72B1	<i>Escherichia coli</i>	1,27x10 ⁻⁵	1,45x10 ⁻⁵
73B1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	0	0
74B1	<i>Esnterobacter hormaechei</i>	~3,13x10 ⁻⁵	~3,13x10 ⁻⁵
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	~3,13x10 ⁻⁵	~3,13x10 ⁻⁷
77B1	<i>Escherichia coli</i>	3,13x10 ⁻⁷	1,47x10 ⁻⁵
78B1	<i>Escherichia coli</i>	3,28x10 ⁻⁶	3,64x10 ⁻⁵

Konjugaatiokasvatuksissa syntyneistä, oletetuista CRICON-transkonjuganteista valittiin seuraavaksi yksittäispesäkkeitä, joista tehtiin sektorimaljoille puhdasviljelmät. Taulukossa 6 on selektiomaljoille syntyneiden pesäkkeiden määrä

puhdasviljelmissä, sekä varmistettujen CRICON-transkonjuganttien osuus kaikista kasvatetuista pesäkkeistä. Niistä kannoista, joissa ei havaittu kasvua (Taulukko 5) ei tehty puhdasviljelmää. Taulukossa 6 on myös eroteltu kanamysiiniä sisältävässä L-mediumissa (KK) ja pelkässä L-mediumissa (KL) kasvatettujen transkonjuganttien pesäkkeistä tehdyt puhdasviljelmät. Kloramfenikolirifampisiinimaljauksilla pystyttiin havaitsemaan pesäkkeiden lukumäärä niistä transkonjuganteista, joihin CRICON-systeemin pCRISPR-plasmidi on siirtynyt ja kloramfenikoli-kanamysiinimaljauksilla pystyttiin havaitsemaan niiden transkonjuganttien pesäkemäärät, joihin molemmat CRICON-systeemin plasmidit ovat siirtyneet.

Tutkimuksessa haluttiin myös selvittää, inhiboivatko jotkin ESBL-vastaanottajakannat CRICON-luovuttajakannan kasvua, mikä voisi estää konjugaation tapahtumisen ja CRICON-systeemin siirtymisen. Inhibitiotestin tulokset saatiin silmämääräisesti havainnoimalla, oliko pesäkkeen ympärille muodostunut inhibition aiheuttama kirkkaampi vyöhyke. Taulukosta 6 voidaan huomata, että inhibitiota on tapahtunut joillakin *E. coli* -bakteereilla, mutta suurimmalla osalla kannoista sitä ei ole tapahtunut. Inhibitiota oli havaittavissa kahdeksalla *E. coli* -kannalla (4B1, 7B1, 8B1, 21B1, 26B1, 27B1, 43B1 ja 54B1).

Taulukko 6. Varmistettut CRICON-transkonjugantit. Konjugaatiokokeiden pesäkkeiden lukumäärä, joista valmistettiin puhdasviljelmät ensin kloramfenikolirifampisiinimaljoille ja siitä kloramfenikoli-kanamysiinimaljoille, sekä varmistettujen CRICON-transkonjuganttien osuus kaikista testatuista. KL sarakkeessa on pelkässä L-mediumissa kasvatetut transkonjugantit. KK sarakkeessa kanamysiiniä sisältävässä L-mediumissa kasvatetut transkonjugantit. Taulukossa myös ESBL-kantojen ja CRICON-luovuttajakannan välinen inhibitio (i) sekä ESBL-bakteerien kantamat plasmidit. Varmistettujen transkonjuganttien määrä [% (kasvaneet pesäkkeet / kasvatetut pesäkkeet)].

Kanta	Laji	Varmistettujen CRICON-transkonjuganttien osuus testatuista cam-kana-maljalla		Inhibitio	Plasmidit
		KL	KK		
39B1	<i>Escherichia coli</i>	100 (6/6)	100 (3/3)	-	N/A
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100 (2/2)	100 (14/14)	-	IncFII
50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100 (6/6)	100 (13/13)	-	IncFII
54B1	<i>Escherichia coli</i>	100 (2/2)	100 (10/10)	i	IncFIB
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	100 (8/8)	100 (8/8)	-	-
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	100 (8/8)	100 (8/8)	-	Col
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	100 (8/8)	100 (8/8)	-	IncFIB IncX1
58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)	-	Col
35B1	<i>Escherichia coli</i>	81,25 (13/16)	62,5 (5/8)	-	IncFIA IncFIB Incl1-l Col Col156
12B1	<i>Escherichia coli</i>	41,6 (5/12)	25,0 (¼)	-	-
40B1	<i>Escherichia coli</i>	33,00 (1/3)	16,66 (1/6)	-	IncFII IncY
72B1	<i>Escherichia coli</i>	50 (4/8)	75 (6/8)	-	
4B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/0)	100 (1/1)	(i)	IncFIB IncFII Col156
77B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/2)	10 (1/10)	-	IncFIB IncFII
7B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/3)	0 (0/0)	i	IncFIA IncFIB Col156

69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (0/8)	0 (0/8)	-	-
74B1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0 (0/8)	0 (0/8)	-	-
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (0/8)	0 (0/8)	-	-
78B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/8)	0 (0/8)	-	IncFII
29B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/8)	0 (0/8)	-	Col156 Inc/O/K/Z IncY
8B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/1)	0 (0/2)	i	IncFIB IncFII Incl1-l
17B2	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/0)	0 (0/5)	-	IncFIB IncFII Incl1-l
31B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (N/A/2)	0 (0/8)	-	Incl1-l Col156
41B1	<i>Escherichia coli</i>	0 (0/1)	0(0/0)	-	Col IncFIB IncFIC

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkimuksessa testattiin CRICON-plasmidisysteemin siirtymistä 33:een kliiniseen ESBL-isolaattiin. Tutkimuksen tärkein tulos oli, että CRICON-systeemi onnistuttiin siirtämään useaan ESBL-kantaan (Taulukko 6), sillä puhtasviljelmissä varmistettuja CRICON-transkonjugantteja syntyi yhteensä 14:llä eri kannalla. Yksi näistä kannoista (46B1) oli kuitenkin antibioottitestausten mukaan kloramfenikolille resistentti (Taulukko 3) ja kahdella kannalla (49B1 ja 50B1) oli resistenssigeenejä kloramfenikolia vastaan (Taulukko 1), joten varmistettuja transkonjugantteja syntyi 11:llä kannalla. Suurin osa kannoista, joihin CRICON-systeemi siirtyi, kuului RP4-plasmidin isäntäkirjoon.

4.1 Antibioottiresistenssin testaus

Tutkimuksen kannalta oli oleellista ensimmäisenä selvittää vastaanottajabakteereina toimivien ESBL-bakteerien resistenssit tutkimuksessa käytettäviä antibiootteja vastaan. Antibioottiresistenssitestissä selvitettiin mille kokeemme kannalta merkityksellisille antibiooteille eri bakteerit olivat resistenttejä tai sensitiivisiä (Taulukko 3). Antibioottiresistenssin tutkiminen oli välttämätöntä työn kannalta, koska antibioottiselektiota käytettiin tutkimuksessa osoittamaan ESBL-kannat, joihin CRICON-systeemi siirtyi eli muodostuneet transkonjugantit. Koska CRICON-systeemiä kantava pCRISPR-plasmidi kanto mukanaan resistenssigeeniä kloramfenikolia vastaan, sitä käytettiin selektoimaan transkonjugantteja, joihin CRICON olisi mahdollisesti siirtynyt. Vastaavasti pCRISPR-plasmidia mukanaan kuljettava konjugatiivinen RP4-plasmidi kanto mukanaan resistenssigeeniä kanamysiiniä vastaan, joten sitä käytettiin selektoimaan transkonjugantteja, joihin RP4-plasmidi on siirtynyt.

Kaikki ESBL-bakteerit lukuun ottamatta 46B1 olivat sensitiivisiä kloramfenikolille, joten kaikki kannat otettiin mukaan seuraaviin tutkimuksiin. Kuitenkin kannat 27B1, 40B1, 40B2, 43B1 ja 50B1 (Taulukko 3) olivat esikokeiden perusteella resistenttejä kanamysiinille. Kyseisten kantojen kohdalla kanamysiinin avulla ei voinut selektoida niitä transkonjugantteja, joihin RP4 olisi siirtynyt.

4.2 CRICON konjugaatio

Konjugaatiokokeessa testattiin CRICON-systeemin (pCRISPR- ja RP4-plasmidit) siirtymistä luovuttajabakteereilta vastaanottajabakteereille, sekä pelkän RP4-plasmidin siirtymistä. Konjugaatiokokeen perusteella kahdeksalle kannalle näyttäsi siirtyneen CRICON-systeemin molemmat plasmidit ja myös RP4-plasmidi yksin (Taulukko 4). Näistä kuitenkin kannat 27B1, 35B1 ja 49B2 ovat mahdollisesti kanamysiinille resistenttejä, joten RP4-plasmidin siirtymisestä ei voida olla näiden kantojen kohdalla varmoja.

CRICON-systeemin siirtyminen ESBL-bakteereihin haluttiin varmistaa, joten konjugaatiokasvatuksista valmistettiin puhtasviljelmät valitsemalla selektiomaljoilta yksittäispesäkkeitä sektorimaljoille (Taulukko 6). Puhtasviljelmän tarkoitus oli varmistaa, että kaikki tutkimuksissa syntyneet CRICON-transkonjugantit ovat ottaneet molemmat CRICON-systeemiin kuuluvat plasmidit sisäänsä. Tämä haluttiin varmistaa, sillä aiemmissa tutkimuksissa on käynyt ilmi, että pCRISPR-plasmidi ei aina siirry konjugatiivisen RP4-plasmidin kanssa (Ruotsalainen ym. 2014). Kloramfenikoli-kanamysiinimaljan puhtasviljelmässä pitäisi kasvaa vain ne transkonjugantit, joihin molemmat CRICON-systeemin plasmidit ovat siirtyneet.

CRICON-konjugaatiokokeen ja siitä tehtyjen puhtasviljelmien perusteella CRICON-systeemin siirto näyttäisi onnistuneen osalle kliinisistä ESBL-bakteereista. Näiden kantojen joukossa näyttäisi olleen useita eri lajeja kuten *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus hauseri* ja *Enterobacter cloacae* (Taulukko 6). Seitsemällä kannalla 33:sta kannasta (21 % tutkimuksen kannoista) muodostui CRICON-transkonjugantteja maljojen jokaiselle sektorille (Taulukko 6). Alle puolella kannoista (30 % kaikista kannoista) sektorimaljoilla ei havaittu kasvua ja lopuilla (24 % kaikista kannoista) vain osasta konjugaatiokokeista otetuista pesäkkeistä on havaittavissa kasvua kloramfenikoli-kanamysiinisektorimaljalla. On kuitenkin mahdollista, että myös näistä kannoista on muodostunut transkonjugantteja. 15 % kaikista kannoista oli sellaisia, joista puhtasviljelmää ei tehty, sillä konjugaatiokokeissa niissä ei havaittu kasvua selektiomaljoilla. Saaduilla tuloksilla täyttä varmuutta syntyneiden transkonjuganttien määrästä ei voi saada, koska kasvaneiden bakteerien sekvenssejä ei tutkittu. CRICON-plasmidien siirtyminen voitaisiin tulevaisuudessa varmistaa esimerkiksi PCR:n tai sekvensoinnin avulla.

Siirtymisen onnistumisesta kliinisiin ESBL-bakteereihin tukee kuitenkin samankaltaiset tutkimukset, joissa CRICON-systeemi on onnistuttu siirtämään bakteerilta toiselle. Aiemmin Kovanen & Shemeikka (2019) ovat siirtäneet CRICON-systeemin *Salmonella Typhimurium* -bakteereihin ja Ruotsalainen ym.

(2019) onnistuivat siirtämään systeemin *E. coli* -bakteerilta toiselle *E. coli* -kannalle. Näissä tutkimuksissa käytettiin kuitenkin bakteerien laboriokantoja, eikä kliinisiä bakteerikantoja kuten tässä tutkimuksessa.

Siirtymisen onnistumista osalle kliinisistä ESBL-kannoista tukee kuitenkin myös aiemmat RP4-plasmidin isäntäkirjoa tarkastelevat tutkimukset, sillä konjugatiivisen plasmidin isäntäkirjo määrittelee myös CRICON-systeemin isäntäkirjoa. RP4-plasmidilla on laaja isäntäkirjo ja se pystyy siirtymään yli 30 gram-negatiiviseen bakteerilajiin. RP4:n kopionumero eli plasmidikopioiden keskimääräinen lukumäärä bakteerisolussa on 4–7 ja se säilyy hyvin vakaana ympäristössä, jossa siihen ei kohdistu valintapaineita (Gerlitz ym. 1990). RP4-plasmidi kuuluu IncP-ryhmään, ja kyseisen ryhmän plasmideja löytyy luonnollisesti ainakin kolmesta proteobakteerien luokasta: Alfa-, Beta- ja Gammaproteobakteereista (Suzuki ym. 2010). Esimerkiksi *E. coli* kuuluu RP4-plasmidin isäntäkirjoon (Caspi ym. 2001).

Fan ym. (2019) tutkivat RP4-plasmidin siirtymistä maaperän bakteereilla. Luovuttajakantana tutkimuksessa toimi *Pseudomonas putida* KT2442 (RP4) ja RP4-transkonjugantteja havaittiin syntyneen yli viidessätoista pääjaksossa, joista proteobakteerien pääjaksossa transkonjugantteja oli eniten. Fan ym. (2019) havaitsivat RP4-plasmidin siirtyvän muun muassa Bacteroidetes-, Firmicutes- ja Actinobacteria-pääjaksoihin ja nämä neljä pääjaksoa pitivätkin sisällään 95,6 % kaikista syntyneistä RP4-transkonjuganteista. RP4-plasmidin havaittiin myös siirtyneen joihinkin mahdollisesti patogeeneisiin lajeihin kuten *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas mendocina* ja *Staphylococcus aureus* (Fan ym. 2019). RP4-plasmidi määrittää CRICON-systeemin isäntäkirjoa, mikä selittää myös tässä tutkimuksessa CRICON-systeemin siirtymisen muun muassa kahdelle *Enterobacter cloacae* -kannalle (Taulukko 6).

CRICON-systeemi saatiin siirrettyä myös kahdeksaan *E. coli* -kantaan, kahteen *Klebsiella pneumoniae* -kantaan ja yhteen *Proteus hauseri* -kantaan. Fan ym. (2019) raportoivat tutkimuksessaan RP4-plasmidin siirtyneen muun muassa *Klebsiella*-suvun bakteereille, joten *Klebsiella*-suvun kuuluminen RP4-plasmidin isäntäkirjoon

voi selittää CRICON-systeemin tehokkaan siirtymisen tässäkin tutkimuksessa *Klebsiella pneumoniae* -kannoille. Lajien joukossa, joihin CRICON-systeemiä ei saatu siirrettyä oli seitsemän *E. coli* -kantaa, kaksi *Enterobacter cloacae* -kantaa ja yksi *Enterobacter hormaechei* -kanta.

Matalassa antibioottikonsentraatioissa kasvattamisen on havaittu tehostavan resistenssigeenejä sisältävän RP4-plasmidin siirtymistä konjugaation avulla *E. coli* -luovuttajabakteerilta vastaanottajabakteereille (Cairns ym. 2018). Tätä tutkittiin suorittamalla konjugaatiokokeet L-liemen lisäksi myös L-liemessä, johon oli lisätty kanamysiiniä. Konjugaatiokokeessa syntyneiden CRICON-transkonjuganttien selektiomaljausten avulla pystyttiin myös tutkimaan, tehostiko matalassa kanamysiinikonsentraatioissa kasvattaminen transkonjuganttien syntymistä verrattuna pelkässä L-liemessä kasvatettuihin transkonjugantteihin. L-liemessä ja laimeassa antibioottikonsentraatioissa kasvatettujen transkonjuganttien bakteeritiheyksien välillä havaittiin pientä vaihtelua, mikä vaikutti myös konjugaatiotehokkuuteen (Taulukko 5). Joillakin kannoilla (4B1, 8B1, 17B2, 31B1, 40B1, 72B1, 77B1 ja 78B1) transkonjugantteja näytti syntyneen enemmän matalassa antibioottikonsentraatioissa kuin ilman antibioottia.

Odotuksista poiketen konjugaatiokokeissa osalla kannoista (39B1, 41B1, 41B2, 52B1, 58B1, 59B1, 69B1, 74B1 ja 76B1) näytti olevan kasvua kloramfenikolimaljalla, mutta ei kanamysiinimaljalla. Tämän ei pitäisi olla mahdollista, sillä pCRISPR-plasmidi, joka kantaa resistenssigeeniä kloramfenikolia vastaan, ei ole konjugatiivinen plasmidi. Se ei siis pysty liikkumaan ilman konjugatiivista RP4-plasmidia (Ruotsalainen ym. 2019) eli kloramfenikoliresistenssin on tultava jostakin muualta.

Kloramfenikoli on antibiootti, joka inhiboi bakteerien proteiinisynteesiä. Se toimii tarttumalla ribosomaalisen RNA:n 50S alueelle 23S silmukkaan, joka on vuorovaikutuksessa siirtäjä-RNA:n vastaanottajapään kanssa ja estää näin peptidisidoksen muodostumista (Clark 2009). Resistenssi kloramfenikolille voi perustua eri resistenssimekanismeihin, joita useat geenit ja mutaatiot määrittävät (Kehrenberg 2005). Bakteereiden yleisin resistenssimekanismi kloramfenikolia

vastaan on entsyymaattinen asetylaatio kloramfenikoliasetyylitransferaasien (CATs) avulla, joiden monomeereja *cat*-geenit koodaavat (Schwarz ym. 2004). On mahdollista, että osalla tutkimuksen *E. coli* -bakteereista esimerkiksi entsyymaattinen asetylaatio selittäisi resistenssin synnyn, koska joillakin kannoilla oli perimässään *cat*-geenejä (17B2, 49B1, 50B1). Kaikki kloramfenikolimaljalla kasvaneet ESBL-kannat eivät kuitenkaan kantaneet perimässään kyseisiä resistenssigeenejä, joten tämä mekanismi ei kykene selittämään kaikkia spontaaneja resistenssejä.

Kannoilta 49B1 ja 50B1 löytyi *cat*-geenin lisäksi myös *OqxA*- ja *OqxB*-geenit, jotka koodaavat monille antimikrobiaalisille aineille kuten kloramfenkolille resistenssiä aiheuttavaa efflux-pumppua (Hansen ym. 2005). Kyseiset kannat eivät kuitenkaan olleet spontaanisti kloramfenikoliresistenssin saaneiden kantojen joukossa. Kannoilta 46B1 ja 27B1 löytyi *cmlA1*-resistenssigeeni, joka myös koodaa aineita ulos solusta välittävää efflux-pumppua (Nogrady ym. 2005). 46B1-kannasta kasvoi yksittäispesäkkeitä kloramfenikolimaljalla ja 27B1-kanta kasvoi kloramfenikolirifampisiinimaljalla. Tarkkoja resistenssimekanismeja kaikille resistenssin kehittäneille kannoille on kuitenkin mahdotonta selvittää tämän tutkimuksen puitteissa, joten tarkempaa tutkimusta resistenssien syntymekanismeista tarvitaan tulevaisuudessa.

Kun tarkastellaan ESBL-kantojen kantamia plasmideja, CRICON-systeemi näyttäisi siirtyneen tehokkaammin sellaisiin kantoihin, joilla on valmiiksi enintään kaksi plasmidia sisällään. Niistä kannoista, joista syntyneiden CRICON-transkonjuganttien osuus kaikista testatuista oli 100, kannalla 52B1 ei näyttäisi olevan yhtäkään plasmidia perimässään (Taulukko 2). Kannoilla 54B1 ja 63B1 on vain yksi plasmidi ja kannalta 39B1 ei ollut sekvenssitietoja saatavilla. Näiden kantojen kantamat plasmidit olivat IncFIB(K) ja Col(pHAD28) (Taulukko 2). Plasmidit Col156, IncFIA, IncFIB(AP001918) ja IncY löytyivät useammalta kuin yhdeltä sellaiselta ESBL-kannalta, joihin CRICON-systeemi ei tutkimuksen perusteella näyttänyt siirtyneen.

Inc-ryhmien lisäksi sekä plasmidien määrä että koko vaikuttavat bakteerien elinkykyyn, sillä plasmidien ylläpitäminen kuluttaa resursseja bakteerilta. Jos bakteerilla on valmiiksi useita tai suuria plasmideja, CRICON-systeemin plasmidit voivat olla liian suuri lisätaakka bakteerille. Tällöin CRICON-systeemi voi siis siirtyä bakteeriin, mutta bakteeri ei välttämättä selviä elinkykyisenä. On siis mahdollista, että CRICON on siirtynyt useampaan bakteeriin, kuin taulukon 7 tulokset osoittavat, mutta plasmidien tuoman suuren taakan vuoksi bakteerilla ei ole ollut resursseja selvitä hengissä kasvatusalustalla. Sekvenssidata koostui pienistä osista plasmidien sekvenssejä ja näiden pohjalta PlasmidFinder-ohjelma teki oletuksen bakteerin kantamista plasmideista, joten niiden koko sekvenssiä tai kokoa ei ole saatavilla.

Kahdeksan ESBL-kannan havaittiin myös inhiboivan HB-CC-kannan kasvua. Vain kahdella inhibitiota ilmentävästä kannasta havaittiin kasvua CRICON-antibioottiselektiomaljoilla (Taulukko 6), joten on mahdollista, että CRICON-systeemin siirtymiseen on vaikuttanut kantojen välinen inhibitio (Taulukko 6). Toisaalta tulos myös osoittaa, että CRICON-systeemi voi siirtyä joillekin ESBL-kannoille inhibitiosta huolimatta.

Vaikka CRISPR-Cas9 -teknologian käyttämisestä esimerkiksi antibioottiresistenssin poistamiseen on saatu lupaavia tutkimustuloksia ja se on osoittanut suurta potentiaalia, on siinä havaittu joitakin tulevaisuudessa kohdattavia haasteita. Tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, ettei kahden plasmidin systeemissä pCRISPR-plasmidi aina siirry konjugatiivisen plasmidin kanssa (Ruotsalainen ym. 2019). Tämä voitaisiin kuitenkin korjata kahdella tavalla. Ensimmäisessä CRISPR-systeemi yhdistettäisiin konjugatiiviseen plasmidiin, sillä CRISPR-Cas9-systeemin on todettu konjugoituvan bakteeriin tehokkaammin, jos systeemi koostuu kahden plasmidin sijaan vain yhdestä (Hamilton ym. 2019). Toisessa tavassa käytettäisiin apuna toksiini-antitoksiinisysteemiä, jossa pCRISPR-plasmidi kantaisi antitoksiinigeeniä ja sitä kuljettava plasmidi toksiinigeeniä, jolloin vastaanottajasolun olisi pakko vastaanottaa molemmat plasmidit välttyäkseen

toksiinin aiheuttamalta sytotoksiselta reaktiolta ja solukuolemalta (Ruotsalainen ym. 2019).

Uribe ym. (2021) ovat raportoineet, että yksi suurimmista haasteista CRISPR-Cas9-tekniologian käytössä ovat bakteerit, jotka pystyvät pakenemaan systeemiä. Heidän tutkimuksessaan *E. coli* -bakteerien huomattiin kykenevän pakenemaan CRISPR-Cas9 -systeemiä koodaamalla episomaalisesti CRISPR-Cas -antibakteerisia yhdisteitä. Bakteerien resistenssi systeemiä vastaan johtuu potentiaalisesti mutaatioista CRISPR-Cas -efektoriproteiineissa, crRNA:ssa tai kohdesekvenssissä (Uribe ym. 2021).

Koeasetelmaa voisi parantaa tulevaisuudessa lisäämällä konjugaatiokasvatusten replikaattien määrää. Mitä useampi replikaattikasvatus kannoista saataisiin tutkimuksen resurssien puitteissa tehtyä, sitä varmemmin voitaisiin arvioida, millaisille bakteerille CRICON-systeemi saadaan siirrettyä ja millaisiin bakteereihin se ei siirry. Koeasetelmaa voisi parantaa myös lyhentämällä bakteerien konjugaatioaikaa, joka tässä kokeessa oli yön yli. Näin ollen kasvatuksen muut bakteerit eivät ehdi syrjäyttää transkonjugantteja, jotka ovat mahdollisesti heikompia kilpailijoita kuin muut ja kasvavat näin ollen hitaammin. Tällöin pesäkkeiden määrää olisi helpompi laskea ja arvioida.

4.3 Yhteenveto

Tutkimuksen tarkoitus oli tutkia CRICON-plasmidisysteemin siirtymistä moniresistentteihin ESBL-bakteereihin ja selvittää millaiset geneettiset tekijät bakteereilla vaikuttivat siirtymiseen. Tämän tutkimuksen tärkein tulos oli se, että CRICON-systeemi siirtyi usealle moniresistentille ESBL-kannalle. Tutkimuksen perusteella CRICON-systeemin siirtämisessä ESBL-kantoihin saattaa kuitenkin olla joitakin haasteita. CRICON-systeemin siirtymiseen saattoi vaikuttaa joidenkin ESBL-kantojen inhibitio CRICON-luovuttajakantana toiminutta HB-CC-kantaa kohtaan sekä ESBL-kantojen kantamien plasmidien määrä. Lisäksi osa ESBL-kannoista kehitti spontaanisti resistenssin kloramfenikolia vastaan, mikä vaikeutti

CRICON-systeemin vastaan ottaneiden transkonjuganttien löytämistä. Tämä kertoo siitä, että tarvitaan tehokkaampia keinoja plasmidien siirtymisen tutkimiseen. Tulevaisuuden menetelmä voi olla esimerkiksi bakteerien yksisolumenetelmät, joka voi olla tehokas keino tiettyjen geneettisten ominaisuuksien havaitsemiseen bakteeripopulaatiosta yhden solun tarkkuudella. Bakteerien antibioottiresistenssi on maailmanlaajuisesti suuri ongelma ja se yleistyy nopeasti antibioottiresistenssigeenien siirtyessä bakteerilta toiselle konjugatiivisten plasmidien välityksellä. Tämän takia on tärkeää kehittää ja tutkia uusia menetelmiä, joilla antibioottiresistenssi voidaan poistaa bakteeripopulaatiosta.

KIITOKSET

Suuret kiitokset ohjaajillemme Reetta Penttiselle ja Matti Jalasvuorelle tutkimuksen mahdollistamisesta sekä tuesta tutkimuksen jokaisessa vaiheessa. Tutkimuksen rahoitus saatiin Reetta Penttisen tutkijatohtorirahoituksesta Suomen akatemiasta sekä Matti Jalasvuoren projektirahoituksesta, jota rahoittaa Suomen akatemia sekä Jane ja Aatos Erkon säätiö. Kiitokset myös jokaiselle kandidaattitutkielman tekoon osallistuneelle ryhmäläiselle.

KIRJALLISUUS

- Bennett P. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153: 347, doi:10.1038/sj.bjp.0707607.
- Bikard D., Euler C.W., Jiang W., Nussenzweig P.M., Goldberg G.W., Duportet X., Fischetti V.A. & Marraffini L.A. 2014. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol* 32: 1146-1150, doi:10.1038/nbt.3043.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A. & Ehrlich S.D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin.(Author Abstract). *Microbiology* 151: 2551, doi:10.1099/mic.0.28048-0.
- Bradford P.A. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951, doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.
- Brouns S.J.J., Jore M., Lundgren M., Westra E., Slijkhuis R., Snijders A., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V. & Oost v. d. J. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)* 321: 960, doi:10.1126/science.1159689.
- Bush K. & Jacoby G.A. 2010. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 969-976, doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Bush K., Jacoby G., Medeiros A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233. PMID: 7574506
- Cabezón E., de la Cruz F. & Arechaga I. 2017. Conjugation Inhibitors and Their Potential Use to Prevent Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *Frontiers in microbiology* 8: 2329, doi:10.3389/fmicb.2017.02329.
- Cairns J., Ruokolainen L., Hultman J., Tamminen M., Virta M. & Hiltunen T. 2018. Ecology determines how low antibiotic concentration impacts community composition and horizontal transfer of resistance genes. *Communications biology* 1: 35, doi:10.1038/s42003-018-0041-7.
- Carattoli A. 2009. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents and Chemother* 53: 2227-2238, doi:10.1128/AAC.01707-08.
- Caspi R., Pacek M., Consiglieri G., Helinski D.R., Toukdarian A. & Konieczny I. 2001. A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *EMBO J* 20: 3262-3271, doi:10.1093/emboj/20.12.3262.

- Castanheira M., Simner P.J. & Bradford P.A. 2021. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance* 3: dlab092, doi:10.1093/jacamr/dlab092.
- Chen I. & Dubnau D. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 241-249, doi:10.1038/nrmicro844.
- Clark D.P. 2009. *Molecular Biology*. Elsevier Science & Technology.
- Davies J. & Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 417-433, doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-461.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. *et al.* CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Dionisio F., Conceição I.C., Marques A.C.R., Fernandes L. & Gordo I. 2005. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biology letters* (2005) 1: 250-252, doi:10.1098/rsbl.2004.0275.
- Doudna J.A. & Charpentier E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)* 346: 1258096, doi:10.1126/science.1258096.
- Eberhard WG. 1990. Evolution in Bacterial Plasmids and Levels of Selection. *Q Rev Biol* 65: 3-22, doi:10.1086/416582.
- Eckburg P.B., Lister T., Walpole S., Keutzer T., Utley L., Tomayko J., Kopp E., Farinola N. & Coleman S. 2019. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Drug Interaction Potential of SPR741, an Intravenous Potentiator, after Single and Multiple Ascending Doses and When Combined with β -Lactam Antibiotics in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 63, doi:10.1128/AAC.00892-19.
- Fan X., Li H., Chen Q., Zhang Y., Ye J., Zhu Y. & Su J. 2019. Fate of Antibiotic Resistant and Broad Host Range Plasmid in Natural Soil Microcosms. *Frontiers in microbiology* 10: 194, doi:10.3389/fmicb.2019.00194.
- Fernandez-Lopez R., Machon C., Longshaw C.M., Martin S., Molin S., Zechner E.L., Espinosa M., Lanka E. & de la Cruz F. 2005. Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation. *Microbiology (Society for General Microbiology)* 151: 3517-3526, doi:10.1099/mic.0.28216-0.
- Frost L.S. & Koraimann G. 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future microbiology* 5: 1057-1071, doi:10.2217/fmb.10.70.

- García-Cazorla Y., Getino M., Sanabria-Ríos D.J., Carballeira N.M., de la Cruz F., Arechaga I. & Cabezón E. 2018. Conjugation inhibitors compete with palmitic acid for binding to the conjugative traffic ATPase TrwD, providing a mechanism to inhibit bacterial conjugation. *The Journal of biological chemistry* 293: 16923-16930, doi:10.1074/jbc.RA118.004716.
- Gerlitz M., Hrabak O. & Schwab H. 1990. Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J Bacteriol* 172: 6194, doi:10.1128/jb.172.11.6194-6203.1990.
- Hamilton T.A., Pellegrino G.M., Therrien J.A., Ham D.T., Bartlett P.C., Karas B.J., Gloor G.B., Edgell D.R. 2019. Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat Commun* 10: 4544, doi:https://doi.org/10.1038/s41467-019-12448-3
- Hansen L.H., Sørensen S. J., Jørgensen H. S. & Jensen L. B. 2005. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb Drug Resist* 11: 378-382.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. & Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *The Journal of Bacteriology* 169: 5429, doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F. & Marraffini L.A. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31: 233-239, doi:10.1038/nbt.2508.
- Kabadi A.M., Ousterout D.G., Hilton I.B. & Gersbach C.A. 2014. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Res* 42: e147, doi:10.1093/nar/gku749.
- Kehrenberg C., Schwarz S., Jacobsen L., Hansen L.H. & Vester B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 57: 1064-1073, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x.
- Kovanen S. & Shemeikka S. 2019. CRISPR-Cas9- plasmidisysteemin konjugaatiotekijätekijät vaikuttavat tekijät. LuK-tutkielma, Jyväskylän Yliopisto.
- Le Roux, F., and Blokesch, M. (2018). Eco-evolutionary dynamics linked to horizontal gene transfer in *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 89–110. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062148
- Lu J., Peng Y., Wan S., Frost L.S., Raivio T. & Glover J.N.M. 2019. Cooperative Function of TraJ and ArcA in Regulating the F Plasmid *tra* Operon. *J Bacteriol* 201, doi:10.1128/JB.00448-18.
- Manson J.M., Hancock L.E. & Gilmore M.S. 2010. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial

- resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 107: 12269-12274, doi:10.1073/pnas.1000139107.
- Marcadé G., Deschamps C., Boyd A., Gautier V., Picard B., Branger C., Denamur E. & Arlet G. 2009. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 63: 67-71, doi:10.1093/jac/dkn428.
- Mathers A.J., Peirano G. & Pitout J.D.D. 2015. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews* 28: 565-591, doi:10.1128/CMR.00116-14.
- Moineau S., Garneau J.E., Dupuis M., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P. & Magadán A.H. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature (London)* 468: 67-71, doi:10.1038/nature09523.
- Nogrady N., Gado I., Zsolt Fekete P. & Paszti J. 2005. Chloramphenicol resistance genes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from human and animal sources in Hungary. *Veterinárni medicína* 50: 164-170, doi:10.17221/5609-VETMED.
- Norman A., Hansen L.H. & Sørensen S.J. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. London, A* 364: 2275-2289, doi:10.1098/rstb.2009.0037.
- Novick R.P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51: 381.
- Poole K. 2004. Resistance to [beta]-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 2200-23, doi:<http://dx.doi.org.ezproxy.jyu.fi/10.1007/s00018-004-4060-9>.
- Ruotsalainen P., Penttinen R., Mattila S. & Jalasvuori M. 2019. Midbiotics: conjugative plasmids for genetic engineering of natural gut flora. *null* 10: 643-653, doi:10.1080/19490976.2019.1591136.
- Schwarz S, Kehrenberg C., Doublet B. & Cloeckaert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28: 519-542, doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001.
- Shaw W.V. 1967. The Enzymatic Acetylation of Chloramphenicol by Extracts of R Factor-resistant *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 242: 687-693.
- Smillie C., Garcillan-Barcia M.P., Francia M.V., Rocha E.P.C. & de la Cruz F. 2010. Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 434, doi:10.1128/MMBR.00020-10.

- Suzuki H, Yano H, Brown C.J. & Top E.M. 2010. Predicting Plasmid Promiscuity Based on Genomic Signature. *J Bacteriol* 192: 6045-6055, doi:10.1128/JB.00277-10.
- Turnbaugh P.J., Quince C., Faith J.J., McHardy A.C., Yatsunencko T., Niazi F., Affourtit J., Egholm M., Henrissat B. & Knight R. 2010. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:7503-7508. doi:10.1073/pnas.1002355107.
- Uribe R.V., Rathmer C., Jahn L.J., Ellabaan M.M.H., Li S.S. & Sommer R.O.A. 2021. Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials. *Sci Rep* 11: 17267, doi:10.1038/s41598-021-96735-4.
- Van Boeckel T.P, Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A. & Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 112: 5649-5654, doi:10.1073/pnas.1503141112.
- Zhang Y., Ma Q., Su B., Chen R.R., Lin J., Lin Z., Wang D. & Yu Y. 2018. A study on the role that quorum sensing play in antibiotic-resistant plasmid conjugative transfer in *Escherichia coli*. *Ecotoxicology (London)* 27: 209-216, doi:10.1007/s10646-017-1886-0.

LIITE 1: PlasmidFinder2.1- ja ResFinder4.1-ohjelmistojen www-sivut

<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>

<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

LIITE 2. ESBL-kantojen kasvu antibioottiselektiomaljoilla antibioottiresistenssitestissä

Laji	Kanta	Strep	Strep	Strep	Rif	Rif	Rif
4B1	<i>Escherichia coli</i>	-	1 pes	-	+	+	+
7B1	<i>Escherichia coli</i>		1 pes	-	+	+	+
8B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
12B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
17B2	<i>Escherichia coli</i>	1 pes	4 pes	2 pes	+	+	+
21B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
26B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
27B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
29B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
31B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
35B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
39B1	<i>Escherichia coli</i>	-	(+)	(+)	+	+	+
40B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	(+)
41B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
41B2	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
42B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
43B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	1 pes	-	+	+	+
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	+
49B2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	+
50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	+
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	-	-	-	+	+	(+)
54B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+
59B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+
69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+
72B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
73B1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	-	-	+	+	+
74B1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	-	-	+	+	+
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+
77B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+

78B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
HB-CC	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-
JE2571	<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-

Laji	Kanta	Kana	Kana	Kana	Cam	Cam	Cam
4B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
7B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	2 pes	-	-	-
8B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
12B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
17B2	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
21B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
26B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
27B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-
29B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
31B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
35B1	<i>Escherichia coli</i>	(+)	(+)	(+)	-	-	-
39B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
40B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
41B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
41B2	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	1 pes	-	?
42B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
43B1	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-
46B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	1 pes	3 pes
49B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-
49B2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-
50B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-
52B1	<i>Proteus hauseri</i>	-	-	-	-	-	-
54B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	1 pes	-	-

58B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-
59B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
63B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-
69B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-
72B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
73B1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	-	-	-	1 pes	-
74B1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	-	-	-	-	-
76B1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	(+)	-
77B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
78B1	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
HB-CC	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
JE2571	<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-
