

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Lagle-Marie Tamm

***Pseudomonas aeruginosa* kui antibiootikumiresistentsuse siirutaja  
erinevate keskkondade vahel**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Mailis Laht, MSc  
Veljo Kisand, PhD

TARTU 2015

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
1.2 Antibiootikumiresistentsuse teke .....	9
1.2.1 Mutatsioonid .....	9
1.2.2 Horisontaalne geeniülekanne .....	11
1.3 Antibiootikumide kasutamine põllumajanduses .....	14
1.3.1 Antibiootikumide põllumajandusliku kasutamise kaasnevad riskid .....	15
1.4 Plasmiidid .....	19
1.4.1 Klassifikatsioon .....	19
1.4.2 Praktilises osas leitud plasmiidide iseloomustus .....	20
2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....	23
2.1 Töö eesmärgid .....	23
2.2 Materjalid ja meetodid .....	24
2.2.1 Isolaatide kogumine .....	24
2.2.2 <i>P. aeruginosa</i> isoleerimine seafarmide lägast .....	24
2.2.3 DNA eraldamine .....	24
2.2.4 Plasmiidide eraldamine .....	25
2.2.5 Plasmiidijärjestuste otsimine sekveneeritud genoomidest .....	25
2.3 Tulemused ja arutelu .....	27
2.3.1 Isoleerimine .....	27
2.3.2 Plasmiidid .....	28
2.3.3 Järeldused .....	31
KOKKUVÕTE .....	32
SUMMARY .....	33

KASUTATUD KIRJANDUS .....	34
Kasutatud veebiaadressid .....	41
LISA 1. Täielik materjal ja meetodika .....	42
a) Isolaatide kogumine (ABRESIST) .....	42
b) Teiste keskkonnaisolaatide saamine .....	42
c) Isolaatide tuvastamine 16S rRNA geeni järjestuste alusel .....	43
d) Antibiootikumiresistentsuse määramine e-testiga .....	43
e) Puhaskultuuride genoomse DNA sekveneerimine ja assambleerimine .....	44
LISA 2. E-testi tulemused (BLAST vaste andnud isolaadid).....	45
LISA 3. Geelipildid .....	46
TÄNUSÕNAD .....	47
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	<b>48</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

AMK – amikatsiin

bp – *base pair*, aluspaar

CAZ – tseftasidiim

CIP – tsiprofloksatsiin

CST – kolistiin

ESBL – *extended-spectrum beta-lactamase*, laiendatud spektriga beeta-laktamaas

FEP – tsefepiim

GEN – gentamütsiin

IPM – imipeneem

kb – *kilobase pair*, kiloaluspaar

MEM – meropeneem

MIC – *minimum inhibitory concentration*, minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

ORF – *open reading frame*, avatud lugemisraam

ROS – *reactive oxygen species*, reaktiivsed hapnikuühendid

rpm – *revolutions per minute*, pööret minutis

TOB – tobramütsiin

TZP – piperatsilliin/tasobaktaam

## SISSEJUHATUS

Esimesed antibiootikumid, mida 1937. aastal süsteemselt kasutama hakati, olid sulfoonamiidid. Resistentsus neile kirjeldati juba enne 1930ndate lõppu (Davies ja Davies, 2010). Looduses on resistentsus aga ammune nähtus: resistentsusgeene on eraldatud isegi 30 000 aasta vanustest setetest (D'Costa *et al.*, 2011). Viimase 70 aasta jooksul, mil antibiootikume on kasutatud üha suuremates kogustes, kusjuures kogused on eriti suured olnud põllumajanduses, on resistentsusgeenid üha laiemalt levinud. Nagu Knapp *et al.* (2010) leidsid, on resistentsusgeenide hulk mullas selle ajaga mitmekordistunud. Seega on muld ja arvatavasti ka ülejäänud keskkond oluline antibiootikumiresistentsusgeenide reservuaar. Kui lisada juurde veel keskkonda sattuvad antibiootikumid, mis resistentsuse ülekannet ja püsijäämist selekteerivad (Baquero *et al.*, 1998), ei saa resistentsusgeenide üha suuremat levimist välistada. Antibiootikumiresistentsust on patogeenide ja kliiniliste süsteemide kontekstis põhjalikult uuritud, aga keskkonnas leiduv resistentsus (ka looduslik), selle teke, levikuteed ja olulisus meditsiini seisukohalt on alles hiljuti kõrgendatud tähelepanu alla seatud.

*Pseudomonas aeruginosa* on bakter, kes võib asustada mitmesuguseid elupaiku, alustades mullast ja veest ning lõpetades inimese naha ja haiglaseadmetega. Tervishoiu seisukohalt on ta olulise tähtsusega oportunistlik patoogen, ohustades eelkõige nõrgenenud organismiga indiviide nagu intensiivravipatsiendid ja tsüstilise fibroosi haiged ning omades suurt resistentsust erinevatele antibiootikumidele ja võimet resistentsusgeene ka omastada (Kerr ja Snelling, 2009; Stover *et al.*, 2000). See loob talle eeldused resistentsusgeenide levimisvektorina toimimiseks.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida *Pseudomonas aeruginosa* esinemist keskkonnas, võimalusi resistentsuse levimiseks, põllumajandusliku antibiootikumikasutuse rolli selles ja plasmiidide levikut *P. aeruginosal*.

Märksõnad: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiootikumiresistentsus, keskkond, plasmiidid, plasmiididest järjestused genoomis

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1872. aastal kirjeldas (kuid ei isoleerinud) J. Schröter keedetud kartulil kasvanud bakteri, kes eritas vees lahustuvat sinakasrohelist pigmenti ja andis talle nimeks *Bacterium aeruginosus*. 1894. aastal pakkus W. Migula välja perekonnanime *Pseudomonas* ja kirjeldas perekonda täpsemalt. 1900. aastal liigitas ta *B. aeruginosuse*, uue nimega *Pseudomonas aeruginosa* perekonda *Pseudomonas* ja nimetas ta tüüpliigiks (Hugh, 1964). *P. aeruginosa* on oksüdaaspositiivne Gram-negatiivne 1,5–3 µm pikkune ühe viburiga (monotrihh) pulkbakter (Coutinho *et al.*, 2008).

**Kasvutingimused.** *P. aeruginosa* on väga mitmekülgne bakter, kelle peamine elupaik on keskkonnas (muld, vesi, Khan *et al.* (2007) leidsid teda isegi ookeanist), kuid kes suudab ka taimi ning loomi (sealhulgas inimest) koloniseerida. Selline suure hulga kasvukeskkondade sobivus on tingitud tema suhteliselt vähesest nõudlikkusest substraatide ja kasvutingimuste suhtes: suudab kasutada erinevaid süsinikuallikaid; kuigi valdavalt aeroobne, suudab anaeroobsetes tingimustes (näiteks tsüstilise fibroosi haigete kopsus moodustunud biokiles) kasutada NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> või arginiini terminaalse elektroniaktseptorina substraadi tasemel fosforüleerimises; kasvab erinevalt teistest pseudomonaadidest temperatuuridel kuni 42 °C (Hassett *et al.*, 2009; Kung, Ozer, & Hauser, 2010). On kirjeldatud, et *P. aeruginosa* on võimeline isegi aktiivselt kasvama destilleeritud vees (Macko ja Allen, 1962).

**Tähtsus haigustekitajana.** Inimese seisukohast on ta üks olulistest patogeenidest (Pendleton *et al.*, 2013; Talbot *et al.*, 2006). Eriti tähtis on *P. aeruginosa* just haiglas saadud nakkusjuhtude puhul. Oportunistliku patogeeni ohustab *P. aeruginosa* indiviide, kelle organismi on nõrgestanud juba mingi haigus (nagu vähk, HIV, tsüstiline fibroos), näiteks põhjustab ta baktereemiat (elus bakterite sattumine verre, mis võib kaasa tuua sepsise ja surma) põletushaavadega patsientidel. Haiglatarvikutel biokiledes kasvades põhjustab kateetritega patsientidel kuseteede põletikke, hingamisaparaati kasutatavatel haigetel kopsupõletikku (Stover *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* on ka kõige levinum krooniliste nakkuste tekitaja tsüstilise fibroosi haigetel, tõstes oluliselt patsientide varajast suremust (Ren *et al.*, 2012).

**Püotsüaniin.** Sinakasroheline pigment, mida Schröter kirjeldas, on just *P. aeruginosale* iseloomulik püotsüaniin. Kuigi kõik tüved seda ei sünteesi (mõni üldse mitte, mõni ainult

kindlas pigmendi sünteesi soodustavas söötmes), kasutatakse püotsüaniini tekitatud sinakasrohelist koloonia värvust isoleerimisel määramistunnusena (Reyes *et al.*, 1981; ISO 16266 : 2008). Püotsüaniin põhjustab hiirtes kopsunakkuse korral kemokiinide ja tsütokiinide tootmise vähenemist, mille toimele jõuab patogeeni esimesena võitlusse astuvaid neutrofiile kopsu vähem ja samuti suureneb neutrofiilide apoptoos. Selle toimele väheneb patogeeni populatsiooni likvideerimise efektiivsus kopsust (Allen *et al.*, 2005). Püotsüaniin on *P. aeruginosa* kasulik ka seetõttu, et tal on antibakteriaalne toime (põhjuseks pakutakse püotsüaniini juuresolekul suuremal hulgal toodetavate  $O_2^-$  ja  $H_2O_2$  toksilisust), mis annab talle konkurentsieelise teiste mikroobide suhtes (Hassan ja Fridovich, 1980).

**Mitmekesisuse genoomsed põhjused.** Põhjuseid *P. aeruginosa* suurele mitmekülgsusele võib otsida tema genoomist. Esiteks on tema genoom küllaltki suur: esimesena sekveneeritud tüve PAO1 genoom koosneb 6,3 miljonist aluspaarist (eri tüvede genoomisuurused jäävad vahemikku 5,5-7 miljonit aluspaari) ja selles on 5570 ORF (*open reading frame*, avatud lugemisraam). Suuruse põhjus on pigem geenide mitmekesisus, kui duplikatsioonid (Klockgether *et al.*, 2011; Stover *et al.*, 2000). Suur genoom mahutab palju reguleerivaid (üle 500), välis- (umbes 150) ja tsütoplasma membraani (umbes 300) valke kodeerivaid gene (Silby *et al.*, 2011). See võimaldab hakkama saada mitmesugustes keskkondades. *P. aeruginosa* välismembraan on antibiootikumidele 100 korda vähem läbitav kui *Escherichia coli* oma, tagades koos teiste mehhanismidega, nagu pidevalt ekspresseeritavad laia substraadispetsiifikaga pumbad (näiteks MexAB-OprM) ja AmpC  $\beta$ -laktamaas, loomuliku resistentsuse mitmetele struktuurilt erinevatele antibiootikumidele (Iwahi *et al.*, 2001; Strateva ja Yordanov, 2009).

**Aksessuaargenoom.** Lisaks loomulikule resistentsusele on *P. aeruginosa*, nagu teisedki bakterid, võimeline resistentsuse omandama. Uued geenid moodustavad tuumikgenoomi (geenid, mis on olemas peaaegu kõigil tüvedel, kõrgelt konserveerunud) kõrvale aksessuaargenoomi (*accessory genome*). Selle hulka kuuluvad nii plasmiidid kui ka genoomi lülitunud uue materjali alad (genoomisaared) (Kung *et al.*, 2010). Eri tüvedel on nende alade arv ja suurused erinevad: tüüpiline PAO1 genoom sisaldab ainult kuni 14 000 aluspaari pikkusi inserte, tüve LESB58 genoom sisaldab aga genoomisaari ja inserteerunud profaage suuruses kuni 111 000 aluspaari (Klockgether *et al.*, 2011). See võib olla põhjus, miks LES-tüved tsüstilise fibroosi haigete infektsioonide tekitajatena nii edukad on: Inglismaal ja Walesis isoleeritakse neid haigete kopsudest kõige sagedamini. Nad suudavad põhjustada superinfektsioone (koloniseerida haigeid, kellel on varasemalt juba mõne teise *P. aeruginosa*

tüve nakkus), peavad kuivadel pindadel kaua vastu, toodavad eriti suures koguses biokilet, üleekspressseerivad varases kasvufaasis hulgatunnetuse reguloni, milles on ka sekreteeritavad virulentsusfaktorid LasA, elastaas ja püotsüaniin (Winstanley *et al.*, 2009).

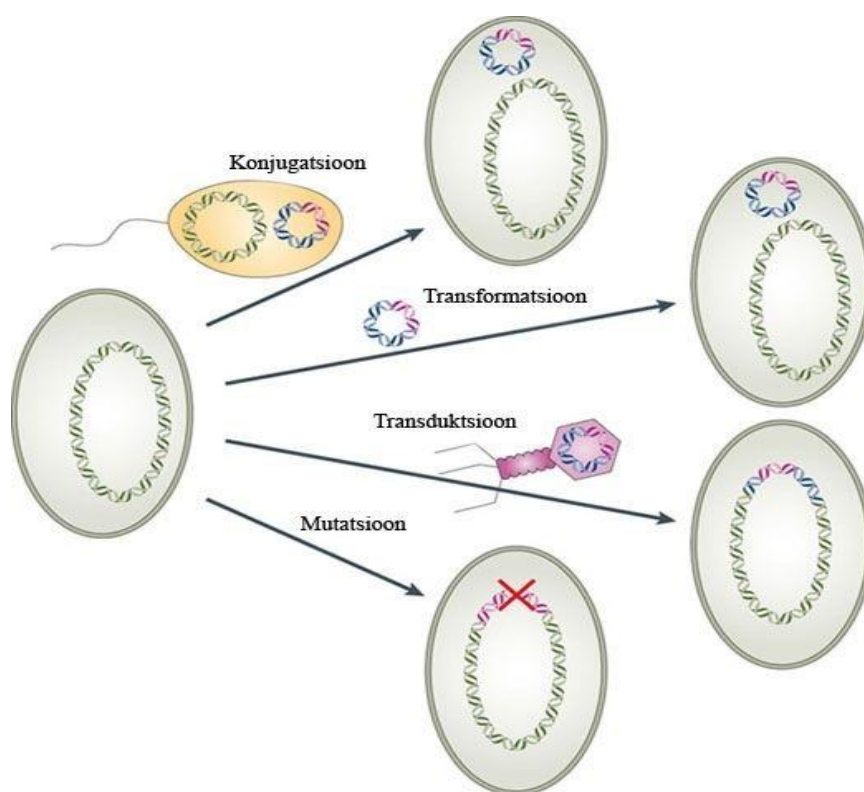
**Biokile.** Lisavõimekust annab *P. aeruginosa* biokiles elamine. Biokile koosneb bakterirakkudest ja neid ümbritsevast maatriksist, mille moodustavad eksopolüsahhariidid (*P. aeruginosa* puhul on olulised vähemalt kolm: alginaat, Psl ja Pel), rakuväline DNA (osaleb rakkudevahelises suhtluses) ja valgud (Ghafoor *et al.*, 2011). Biokiles kasvamine on levinud nii looduslikus ja tehiskeskkonnas kui ka näiteks tsüstilise fibroosi haigete kopsudes. Biokile pakub bakteritele lisakaitset antibiootikumide ja peremehe immuunvastuse eest (alginaat kaitseb neutrofiilide toodetud reaktiivsete hapnikuühendite eest, fagotsütoos on maatriksi tõttu takistatud) (Ciofu ja Bjarnsholt, 2010). Lisaks on biokiled resistentsed ka näiteks bakteriofaagidele ja amööbidele. Kaitstuse tagavad arvatavasti mitmed mehhanismid: mikroobivastaste ainete väiksem difusioon rakkudeni, osa biokilet asustavate rakkude seiskunud kasv toitainete vähesuse tõttu (enamik antibiootikume toimivad kasvavatele rakkudele) ja võib-olla ka osal rakkudel tekkiv eriline pinnal kasvamisele omane fenotüüp (Costerton, 1999). Samuti on biokile horisontaalse geeniülekanne tulipunkt (Sørensen *et al.*, 2005).

**Keskkonnatüved.** Kuna *P. aeruginosa* on niivõrd oluline patogeen, on teda suhteliselt palju uuritud kliinilises kontekstis, samas on vähe tähelepanu jagunud keskkonna kui tema peamise elupaiga uurimisele. Pirnay *et al.* (2005), kes uurisid *P. aeruginosat* jõevees, leidsid, et kuigi võrreldes haiglaisolaatidega olid jõest isoleeritud tüved vähem resistentsed, leiti jõe reostunumast osast (jökke toimus reovee sissevool) tüvi W15Dec14. See tüvi omas resistentsust mitmetele antibiootikumidele ja kuulus klonaalsesse kompleksi G, mille liikmed on laialt levinud nii haiglates kui ka keskkonnas ning omavad võimet kiiresti kohaneda ja toime tulla nii antibiootikumide, raskmetallide kui ka muude kahjulike ühenditega (pestitsiidid, detergendid). Nagu Pirnay *et al.* (2005) arutlesid, näib, et inimesi nakatavad *P. aeruginosa* tüved pole mitte spetsialiseerunud patogeenid, vaid sobivat juhust ära kasutavad keskkonnatüved, millel on evolutsioneerunud omadused reostunud keskkonnas toime tulemiseks.



## 1.2 Antibiootikumiresistentsuse teke

Nii loomuliku kui ka omandatud resistentsuse tagamiseks on bakteritel neli tähtsat strateegiat: antibiootikumi märklaua muundamine, mille tõttu tema afiinsus märklaua suhtes kaob või väheneb; antibiootikumi kahjutuks muutva ensüümi tootmine; Gram-negatiivsetel bakteritel välismembraani vähem läbitavaks muutmine poriinide arvu alandamise või nende diameetri vähendamise teel ja antibiootikumide rakust väljapumpamine (Courvalin, 2008). Antibiootikumiresistentsus võib tekkida mutatsioonide toimetel või resistentsusgeenide horisontaalsel omastamisel keskkonnast (Joonis 1).



**Joonis 1.** Antibiootikumiresistentsuse tekkeviisid. Keskkonnas leiduv resistentsusgeeni (roosa) sisaldav DNA võib doonorilt retsipienti kanduda horisontaalse geeniülekanega konjugatsiooni, transduktsiooni või transformatsiooni teel. Samuti võib resistentsus tekkida mutatsiooni tõttu (punane rist) (Andersson ja Hughes, 2010).

### 1.2.1 Mutatsioonid

Vaatamata suurele loomulikule resistentsusele on mitmed antibiootikumid *P. aeruginosa* vastu efektiivsed. Mutatsioonid on tavaolukorras küllaltki haruldased (Courvalin, 2008). Samas võib antibiootikumide leidumisel bakteri kasvukeskkonnas mutatsioonide sagedus suurenedada (Baquero *et al.*, 1998).

Resistentsus fluorokinoloonidele võib tekkida näiteks tänu mutatsioonidele *gyrA* geenis, mis muudab topoisomeraas II ja mutatsioonile *parC* geenis, mis muudab topoisomeraas IV. Mõlemad topoisomeraasid on fluorokinoloonide märklauad. Pumpade, nagu MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ja MexXY-OprM tootmise intensiivistamisel tagatakse esimesel juhul muuhulgas parem fluorokinoloonide, penitsilliinide ja tsefalosporiinide välja transportimine, MexCD-OprJ ja MexEF-OprN puhul parem fluorokinoloonide ja mõnede  $\beta$ -laktaamide ning MexXY-OprM puhul aminoglükosiidide väljutamine. Resistentsust aminoglükosiididele seostatakse ka nende vähese raku pääsemisega. Karbapeneemidele tekib resistentsus poriin *oprD* kadumisel (Livermore, 2002). AmpC  $\beta$ -laktamaasi efektori AmpD mutatsioon põhjustab suuremat  $\beta$ -laktamaasi tootmist (Breidenstein *et al.*, 2011).

### 1.2.1.1 Hüpermuteeruvad *P. aeruginosa* tüved

Pidevalt muutuv ja heterogeenne keskkond tsüstilise fibroosi haigete kopsudes koos immuunsüsteemi ja antibiootikumikuuride tekitatud stressiga soosib hüpermuteeruvate *P. aeruginosa* tüvede teket. Hüpermuteeruvateks nimetatakse bakteritüvesid, kellel on mutatsioonide toimumise sagedus märgatavalt suurem kui teistel tüvedel (vähemalt 20 korda suurem kui PAO1 puhul või isegi kuni 1000 korda). Nende tüvede ja antibiootikumiresistentsuse vahel on leitud tugev seos (Kenna *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2000). Hüpermuteeruvaid tüvesid leitakse suure osa tsüstilise fibroosi patsientide rögest (Oliver *et al.* (2000) – 36,7%, Ciofu *et al.* (2005) – 54,4%). Selliste tüvede tekke peapõhjuseks arvatakse olevat neutrofiilide toodetud ROS (*reactive oxygen species*, reaktiivsed hapnikuühendid) tekitatud oksüdatiivset stressi, mille tulemusel mutatsioonide sagedus kasvab, ja reparatsioonisüsteemide mittetoimimist *mutS*, *mutL* või *uvrD* geenide muteerumise tagajärjel (Ciofu *et al.*, 2005; Kenna *et al.*, 2007; Luján *et al.*, 2011).

Kui Ciofu *et al.* (2005) väitsid, et kroonilise infektsiooni tekkest läheb tükk aega (viis aastat), enne kui tsüstilise fibroosi haige kopsudest hüpermuteeruvaid tüvesid leitakse (pakuti, et biokile kaitseb ROS eest), leidsid Kenna *et al.* (2007), et ka keskkonnast ja varases kopsuinfektsiooni staadiumis tsüstilise fibroosi haigetest isoleeritud *P. aeruginosa* tüvede hulgas on kõrgema mutatsioonisagedusega tüvesid. Seega ei ole hüpermuteeruvad tüved tõenäoliselt antibiootikumiresistentsuse tekke seisukohast arvestatavad mitte ainult tsüstilise fibroosi haige kopsus, vaid ka keskkonnas.

Kuigi näiteks Auerbach *et al.* (2014) ei leidnud seost hüpermuteeruvate tüvede esinemise ja raskemalt kulgeva kopsuhaiguse vahel tsüstilise fibroosi patsientidel, tuleks, nagu nad ise ka

soovitavad, läbi viia pikaajalisemaid uuringuid, et täpsemalt tundma õppida hüpermuteeruvate tüvede mõju kopsuinfektsioonide kulule.

### **1.2.2 Horisontaalne geeniülekanne**

Horisontaalse geeniülekanne all mõistetakse geneetilise info ühelt organismilt teisele ülekandumist mittereproduktiivsel teel. Kuigi horisontaalsel teel hangitud geenide hulka on üsna raske määrata (uude genoomi integreerunult alluvad algselt näiteks erineva koodonikasutusega geenid samadele mutatsiooniprotsessidele nagu bakterid oma geenid ja kaua aega tagasi hangitud gene ei ole enam võimalik horisontaalsel teel saadutena määratleda), on hinnatud, et kõigist bakterid geenidest on 0,5–32,6% horisontaalselt omandatud (Boto, 2010; Nakamura *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* tüüpiline PAO1 puhul hinnati, et hiljuti horisontaalsel teel omandatud gene on 10,7% (Nakamura *et al.*, 2004).

Mitte kõik geenid ei kandu ühesuguse tõenäosusega horisontaalselt edasi. Bakterid geenid jagatakse laias laastus kaheks: harva ülekanduvad nn informatsioonilised geenid (replikatsioon, transkriptsioon, translatsioon) ja tihti ülekanduvad nn operatsioonilised geenid (metabolism) (Nakamura *et al.*, 2004). Nakamura *et al.* (2004), kes uurisid hiljuti omandatud geneetilise materjali tuvastamiseks rohkem kui sadat bakterigenoomi statistiliselt nukleotiidse koostise alusel, leidsid oma töös, et horisontaalselt ülekantavate geenid funktsioonid on enamasti seotud rakupinna, DNA sidumise ja patogeensusega. Patogeensete bakteritega (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) tehtud võrdlevad genoomiuuringud on näidanud, et virulentsust ja antibiootikumiresistentsust tõstvad geenid on tihti omandatud just horisontaalselt (Norman *et al.*, 2009).

Horisontaalset geeniülekanne võimaldavad kolm protsessi: konjugatsioon, transduktsioon ja transformatsioon.

#### **1.2.2.1 Konjugatsioon**

Kõige rohkem uuritud horisontaalse geeniülekanne viis on konjugatsioon, mille käigus kandub geneetiline materjal üle ühelt bakterilt teisele. Konjugatsiooni toimumiseks on vajalik rakkude kontakt ja enamasti kandub üle plasmiidne, harvem kromosomaalne DNA. Konjugatsioon võib toimuda nii ühest liigist bakterite kui ka eri liiki bakterite vahel. Teadaolevalt on paljud bakteriliigid, nii Gram-negatiivsed kui ka Gram-positiivsed, võimelised konjugatsiooniks (Thomas ja Nielsen, 2005). Näiteks Musovic *et al.* (2006) leidsid, uurides tihedalt bakteritega asustatud ja seepärast konjugatsiooni tulipunktiks olevat

risosfääri, et konjugatsioon toimub ka fülogeneetiliselt teineteisest kaugel asuvate rühmade vahel (risosfääri viidud Gram-negatiivselt doonorilt *Pseudomonas putida*lt toimus laia peremeesringiga plasmidi ülekande muuhulgas ka Gram-positiivsetele aktinobakteritele). Konjugatsiooni spetsiifilisuse määrab kõigepealt ristuva paari kompleksi moodustumine, aga plasmidi retsipienti püsimajäämiseks on oluline retsipiendi peremeesring, st millises peremees replitseerumine toimub (Sørensen *et al.*, 2005; Thomas ja Nielsen, 2005).

Konjugatsiooni võivad soodustada keskkonnas leiduvad antibiootikumid. Leiti näiteks, et subinhibitoorsed antibiootikumikontsentratsioonid suurendavad plasmidse DNA ülekannet *Escherichia coli*lt *Staphylococcus aureuse*le ja *Listeria monocytogenese*le (Trieu-Cuot *et al.*, 1993). Lisaks soodustab konjugatsiooni toitainete lisamine ja bakterite suur arvukus (Sengeløv *et al.*, 2003), nii et näiteks farmide läga koosseisus põllule viidavad antibiootikumid, toidained ja bakterid loovad resistentsusgeenide horisontaalseks ülekandeks soodsad olud.

#### 1.2.2.2 Transduktsioon

Transduktsioon on DNA ülekande ühelt bakterilt teisele bakteriviiruste ehk faagide abil. Üldise transduktsiooni käigus pakib faag oma kapsiidi ükskõik millise osa bakteri genoomist, spetsialiseeritud transduktsiooni korral aga võtab lüsogeenne faag bakteri genoomist väljumisel kaasa kindla geeni faagi insertsioonisaadi kõrvalt (Balcazar, 2014).

Kuigi seni suhteliselt vähe uuritud, on transduktsioonil tõenäoliselt keskkonnas oluline roll geneetilise materjali ülekandumises. Seda juba seetõttu, et faagide arvukus biosfääris on väga suur:  $10^{30}$ – $10^{32}$  (Balcazar, 2014). Colomer-Lluch *et al.* (2011) uurisid veiste, sigade ja lindude väljaheiteproovides ja väljaheiteid sisaldava reovee proovides sisalduvat faagide DNAd  $\beta$ -laktamaasi kodeerivate geenide *bla*<sub>CTX-M</sub> ja *bla*<sub>TEM</sub> ning penitsilliini siduvat valku kodeeriva geeni *mecA* suhtes ning leidsid *mecA* ja *bla*<sub>CTX-M</sub> geeni enamikust, *bla*<sub>TEM</sub> geeni lausa kõigist proovidest. Faagide võime vesikeskkonnas suhteliselt kaua püsida muudab nad oluliseks antibiootikumiresistentsusgeenide reservuaariks (Colomer-Lluch *et al.*, 2011). Mazaheri Nezhad Fard *et al.* (2011) näitasid eksperimentaalselt, et faagide abil kandub gentamütsiini ja tetratsükliini resistentsus üle nii liigisiselt kui ka eri enterokokiliikide vahel. Ripp *et al.* (1994) näitasid, et faag UT1 kannab ühelt *P. aeruginosa* tüvel teisele nii kromosomaalset kui ka plasmidset DNAd. Geeniülekannet üldise transduktsiooni teel on täheldatud USAs põllumajanduses kasutatava antibiootikumi *carbadox* mõjul (Bearson *et al.*, 2014).

### 1.2.2.3 Transformatsioon

Transformatsiooni käigus omandab kompetentne bakter keskkonnast seal vabalt leiduvat DNAd. DNA võib sattuda keskkonda nii passiivsel teel surnud rakkudest kui ka aktiivse sekretsiooni teel elavatest, samuti väljaheidete või faagide koosseisus (Nielsen *et al.*, 2007). Rakuväline DNA on ka oluline biokile komponent (Wei ja Ma, 2013). On näidatud, et madalad  $\beta$ -laktaamide kontsentratsioonid soodustavad DNA sekretsiooni ja biokile moodustumist (Kaplan *et al.*, 2012).

Loomulik transformatsioon koosneb kahest etapist: DNA keskkonnast rakku sisenemine ja DNA integratsioon genoomi enamasti homoloogilise rekombinatsiooni abil. DNA on fosfaatide (tihti keskkonnas kasvu limiteeriv substraat) ja energia allikas. See võib olla üks põhjus, miks bakterid DNAd keskkonnast omastavad (Overballe-Petersen ja Willerslev, 2014). Kui aga rakku sisenenud DNAd ei degradeerita, võib see siseneda kromosoomi ja tõsta bakteri virulentsust ning aidata tal paremini kohaneda muutuvate keskkonnatingimustega (Johnston *et al.*, 2014).

Pikka aega arvati, et transformatsiooni seisukohalt on olulised ainult pikemad DNA jupid (terviklik geen kandub üle). Need aga ei püsi keskkonnas eriti kaua, kahjustada saavad nad näiteks kiirguse, nukleaside ja erinevate keemiliste ühendite toimel. Nüüd on teada, et bakteri genoomi võivad transformatsiooni käigus siseneda isegi ainult 20 aluspaari pikkused DNA molekulid. Kahjustatud DNA juppide integreerumisel bakteri genoomi võivad sageda replikatsioonivead (Overballe-Petersen ja Willerslev, 2014). Need võivad omakorda viia antibiootikumiresistentsuse tekkeni.

### 1.3 Antibiootikumide kasutamine põllumajanduses

Antibiootikumide kasutamine on põllumajanduses laialt levinud. Loomade ja lindude intensiivne tihedalt koos kasvatamine loob soodsad tingimused bakterite, sealhulgas patogeensete, levikuks. Suurema kahju ärahoidmiseks rakendatakse muuhulgas antibiootikume: terapeutiliselt (haiguste ravimine), profülaktiliselt (haiguste ennetamine) ja subterapeutiliselt (kasvu soodustamine) (Landers *et al.*, 2012).

1996. aastal kasutati Euroopa Liidus umbes pool enam kui 10 000 tonnist tarbitud antibiootikumidest ära põllumajanduses, kas nakkuste raviks, ennetamiseks või loomade ja lindude kasvu soodustamiseks (Kümmerer, 2003). Antibiootikumide kasutamise eesmärgina käsitatakse kasvu soodustamist juhul, kui neid manustatakse tervetele loomadele väiksemates kontsentratsioonides kui 200 grammi tonni sööda kohta rohkem kui 14 päeva jooksul (Graham ja Boland, 2007). Antibiootikumide kasutamine loomade kasvu soodustamiseks keelati Euroopa Liidus täielikult 2006. aastal (Martinez, 2009). Siiski on antibiootikumide põllumajanduses kasutamise osakaal suur: Saksamaal antakse 85% kõigist kasutatud antibiootikumidest loomadele (Meyer *et al.*, 2013). Kuigi näiteks Hollandis on täidetud eesmärk vähendada 2013. aastaks antibiootikumide tarbimist põllumajanduses võrreldes 2009. aastaga poole võrra, ei ole probleem sellega lahendatud. Veterinaarmeditsiinis kasutusel olevad antibiootikumiklassid, näiteks penitsilliinid, tetratsükliinid ja makroliidid, on olulised ka inimeste bakternakkuste ravimisel (Bondt *et al.*, 2012).

USAs ei ole siiani antibiootikumide kasutamist loomade kasvu soodustajatena keelustatud. Sealjuures kasutatakse antibiootikume, mis on tähtsad inimeste ravimisel: 2013. aastal moodustasid meditsiinis olulised antibiootikumiklassid kõigist põllumajanduses tarbimiseks müüdud antibiootikumidest 62% (sellest tetratsükliinid 71% ja penitsilliinid 9%). Võrreldes 2009. aastaga kasvas meditsiinis oluliste antibiootikumide müük 20%, samal ajal kui kogu põllumajanduslikuks kasutuseks müüdud antibiootikumide hulk kasvas 17%. Mitmed antibiootikumid on kättesaadavad veterinaari loata (US Food and Drug Administration, 2015). Kuigi erinevad raportid (WHO, FAO, FDA jt) juhivad tähelepanu inimeste ravimiseks kasutatavate antibiootikumide põllumajandusliku tarbimise ohtudele ja kutsuvad üles tarbimist, eriti vale kasutamist, vähendama ja lõpetama antibiootikumide kasutamise kasvu soodustajatena, on USAs selline regulatsioon endiselt soovituslikul tasemel (US Food and Drug Administration, 2012).

Lisaks Euroopa Liidule on Maron *et al.* (2013) andmetel antibiootikumide kasvusoodustajatena kasutamine keelatud veel Taiwanis ja 15 erandiga Mehhikos, veterinaari luba antibiootikumide kasutamiseks on vaja lisaks nendele riikidele ka Jaapanis, Hong Kongis ja Brasiilias.

Kuigi võrreldes teiste Euroopa riikidega ei ole Eesti põllumajandusliku antibiootikumikasutuse poolest esimeste seas, tõusis antibiootikumide kasutus aastatel 2006–2014 peaaegu kaks korda (ligi viielt tonnilt veidi üle üheksa tonnini) (Ravimiamet, 2015).

### 1.3.1 Antibiootikumide põllumajandusliku kasutamisega kaasnevad riskid

#### 1.3.1.1 Resistentsuse teke

Igasugune antibiootikumide leidumine keskkonnas tekitab selektiivse surve resistentsuse tekkele. Eriti soodsad olud loob madal antibiootikumide kontsentratsioon pikema aja vältel (Marshall ja Levy, 2011). Madal kontsentratsioon on tüüpiline antibiootikumide kasvusoodustajatena kasutamisel. Kui antibiootikume manustatakse loomadele toiduga ja nad saavad vastavalt oma soovile kas süüa või mitte süüa, on antibiootikumide kontsentratsioonid nende organismis madalad ja kõikuvad, luues soodsad tingimused resistentsuse tekkimiseks (Love *et al.*, 2011).

##### 1.3.1.1.1 Resistentsus mitmele antibiootikumile

Ühe antibiootikumi tekitatud selektiivne surve ei pruugi tekitada resistentsust mitte ainult sellele konkreetsele antibiootikumile, vaid ka teistele sama sihtmärki omavatele ainetele. Sellist nähtust nimetatakse ristresistentsuseks (*cross-resistance*). Tabelis 1 on toodud mõned näited ristresistentsusest põllumajanduses ja meditsiinis kasutatavate antibiootikumide puhul.

**Tabel 1.** Näiteid ristresistentsusest (Marshall ja Levy, 2011; kohandatud)

Antibiootikum	Klass	Kasutusala	Annab ristresistentsuse	Kasutusala
avopartsiin	glükopeptiid	kasvusoodustaja (EL-s keelatud alates 1997)	vankomütsiin	meditsiin
neomütsiin	aminoglükosiid	kasvusoodustaja, ravi (USAs kasutusel)	gentamütsiin jt aminoglükosiidid	meditsiin
tetratsükliinid	tetratsükliin	kasvusoodustaja, mitmete haiguste ravi (EL-s ei kasutatata, USAs küll)	kõik tetratsükliinid	meditsiin

Seetõttu ei ole oluline mitte ainult inimeste ravis kriitiliste antibiootikumide vastutustundlik kasutamine, vaid tuleb jälgida ka neile sarnaste ainete kasutust.

Kaasresistentsus (*co-resistance*) tekib, kui korraga omandatakse geenid mitme antibiootikumi vastu. Eriti kehtib see resistentsusgeenide kohta, mis asuvad mingi integroni koosseisus samas geenikassetis. Integronid on geneetilised süsteemid, mis sisaldavad integraasi kodeerivat geeni *intI*, *att* rekombinatsioonisaite ja geenikassette, milles tavaliselt asuvad antibiootikumiresistentsusgeenid. Integraasi abil toimub geenikassettide insertsioon *attI* saiti integronisisese promotori järele. Seetõttu ekspresseeritakse kassetis asuvaid gene korraga (Rowe-Magnus ja Mazel, 2002, 2001). Li *et al.* (2013) leidsid Hiinas turul müüdavalt lihalt eraldatud *Salmonella sp.* puhul, et kõik leitud antibiootikumiresistentsuskassetti sisaldavad integronid tagasid resistentsuse vähemalt kahele antibiootikumiklassile. Haiglatest isoleeritud *P. aeruginosa* puhul leidsid Fonseca *et al.* (2005) küll integrone ainult mitmele antibiootikumile resistentsetest tüvedest, aga siiski üle poole sellistest tüvedest ei sisaldanud integrone. Ühestki keskkonnaisolaadist (20 tükki) Ruiz-Martínez *et al.* (2011) oma uuringus integrone ei leidnud. On kindlasti tarvis läbi viia lisauuringuid, aga praegu võib oletada, et tõenäoliselt ei oma integronid *P. aeruginosa* puhul multiresistentsuse tekkel suurt rolli, aga võivad siiski koos teiste mehhanismidega resistentsuse tekkesse panustada.

Kui tüvi on resistentne antibiootikumidele kolmest või rohkemast klassist, nimetatakse seda multiresistentseks (Cantón ja Ruiz-Garbajosa, 2011). *P. aeruginosa* on multiresistentsus väga iseloomulik ja tekitab nakkuste ravimisel probleeme.

### **1.3.1.2 Resistentsuse levimine**

Antibiootikumiresistentsus võib levida loomadelt inimestele nii otsesel kui ka kaudsel teel. Otsese levimise käigus satuvad resistentsusgeeni kandvad bakterid antibiootikumidega kokku puutunud loomadelt nendega tegelevatele inimestele (farmide ja tapamajade töötajad, loomaarstid), kellelt nad võivad omakorda uutele peremeestele või näiteks haiglatesse sattuda. Seal võib toimuda resistentsusgeenide ülekande patogeenidele (Marshall ja Levy, 2011). Selline resistentsete bakterite kandumine loomadelt nendega kokku puutuvatele inimestele on suhteliselt hästi tõestatud. Näiteks Wardyn *et al.* (2015) leidsid oma USAs Iowa osariigis läbi viidud suureskaalalise uuringu käigus, et sigadega kokku puutunud farmitööstel on kuus korda suurem tõenäosus kanda antibiootikumiresistentseid *Staphylococcus aureus* tüvesid.



Leidub ka näiteid, kus varasemalt terve inimene on saanud väljaspool haiglat *P. aeruginosa* nakkuse, kusjuures *P. aeruginosa* põhjustatud kopsupõletik on küllaltki suure suremusega (kuni 52%). Kuigi seda juhtub suhteliselt harva, näitab see siiski *P. aeruginosa* võimalikku kandumist keskkonnast inimesele, kus võib toimuda ka resistentsusgeenide ülekanne inimese normaalse mikrofloora bakteritele (Zhang *et al.*, 2012; Tsuji *et al.*, 2014).

Tänapäeval, kui kaubavahetus toimub vabalt paljude eri riikide vahel ja reisimine on üha lihtsam ja odavam, on üha tõenäolisem ka resistentsete bakteritüvede levimine pikkade vahemaade taha, ka kontinentidevaheliselt. Ike *et al.* (1999) võtsid proove erinevatest maadest Jaapanisse imporditud kanalihalt ja leidsid vankomütsiinile resistentseid enterokokke Prantsusmaalt ja Taist pärit kanalihalt (resistentsuse teket vankomütsiinile seostatakse avopartsiiini kasutamiseiga kasvusoodustajana põllumajanduses, kuni 1997. aastani oli avopartsiin Prantsusmaal kasutuses). Veel mitmete uuringute käigus on lihalt isoleeritud resistentseid baktereid. Näiteks Skov *et al.* (2007) võrdlesid Taanis toodetud ja Taani sisse toodud liha ning isoleerisid imporditud lihalt esiteks rohkematest proovidest *Salmonella spp.* (11,4% sisse toodud lihalt ja 1,4% Taanis kasvatatud lihalt võetud proovidest) ja teiseks leidsid, et nii resistentsust kui ka multiresistentsust esines imporditud lihalt isoleeritud tüvedel rohkem. Colibar ja Morvay (2012) isoleerisid lihalt biokilest muu hulgas ka *P. aeruginosa*. Seega on oluline karmistada piiranguid antibiootikumide kasutamisele üle maailma.

Tarbitud antibiootikume ja antibiootikumiresistentseid baktereid satub väljaheidetega sõnnikusse ja seda kasutatakse omakorda väetisena. Nii satuvad antibiootikumid, nende osalised laguproduktid, resistentsed bakterid ja resistentsusgeenid mulda ja sealt mitmeid teid pidi edasi. Knapp *et al.* (2010) eraldasid DNA arhiveeritud Hollandi põllumuldadest (proovid võetud vahemikus 1940–2008) ja leidsid, et arvatavasti antibiootikumide kasutamise tõusu tõttu on resistentsusgeenide hulk mullas kasvanud mitmekordseks. Suurem resistentsusgeenide hulk mullas suurendab tõenäosust, et mõni bakter resistentsusgeeni mullas omastab. Lisaks, nagu Hamscher *et al.* (2002) tetratsükliini puhul näitasid, satub sõnnikuga väetamisel põllumulda ka antibiootikume, mis mullal olevates sõnnikukihtides võivad olla isegi nii kõrgetes kontsentratsioonides, et kardetakse ohtu mulla mikroobikoosluse liigirikkusele. Kui aga mullas on antibiootikume madalas kontsentratsioonis, võib see soodustada resistentsusgeenide ülekannet ja püsijäämist. On ka näidatud antibiootikumide jõudmist mullast vette ja taimedesse (Bassil *et al.*, 2013; Blackwell *et al.*, 2007).

### 1.3.1.3 Resistentsuse püsimine

Resistentsusgeene seostatakse kohasuse langusega ja selektiivse surve kadumisel peaks kaduma ka resistentsust kandvad bakterid, sest antibiootikumidele tundlikud, ilma resistentsusgeenita tüved jääksid kasvukiiruses peale. Paljud eksperimendid on aga näidanud, et antibiootikumisurve kadumisel ei kao resistentsus oodatult kiiresti, vaid jääb püsima. Arvatakse, et seda põhjustab kompenseerivate mutatsioonide teke. Samuti leidub resistentsust tagavaid mutatsioone, mis ei ole bakterile kulukad (Marcusson *et al.*, 2009). Enne *et al.* (2004) leidsid koguni, et sulfoonamiidi resistentsusgeeni kandev plasmiid p9123, mis ei kodeeri resistentsust ühelegi kasutuses olevale antibiootikumile (seega on välistatud koselektsiooni võimalus), omab bakterile kohasust tõstvat mõju ja plasmiidiga tüved on kiirema kasvuga kui ilma plasmiidita tüved. Samas on haiglates näidatud, et pärast antibiootikumiravi lõppu langeb resistentsete bakterite hulk suhteliselt kiiresti eelnenud tasemele. Sellest lähtuvalt väidetakse, et kompenseerivad mutatsioonid ei ole reaalses elus nii levinud, kui laborikatsetes näida võib (MacLean ja Vogwill, 2014).

Samas ei pruugi konkreetse antibiootikumi vastasest resistentsusest lahti saada ainult selle antibiootikumi kasutuse lõpetamisega. Iseäranis horisontaalsel teel hangitud geenide puhul, mis paiknevad üksteise lähedal ja on seetõttu geneetiliselt aheldunud (näiteks resistentsusgeenide kassetid integronides, mitme resistentsusgeeniga plasmiidid), toimub koselektsioon. Kuigi antibiootikumiga enam kokkupuudet ei ole ja resistentsusgeen võiks kaduda, ei alane geeni esinemissagedus, sest kõrvalasuvat resistentsusgeeni selekteeritakse edasi (Andersson ja Hughes, 2010, 2011). Seega on probleem kompleksne ja vajab kindlasti edasi uurimist.

## 1.4 Plasmiidid

Plasmiidid on ekstrakromosomaalsed mobiilsed geneetilised elemendid, mis sisaldavad bakterile eluliselt mittevajalikke geene, mille abil omandab bakter uusi funktsioone ja suudab asustada uusi elukeskkondi, näiteks antibiootikumiresistentsust kandva plasmiidi puhul antibiootikume sisaldavat keskkonda. Plasmiidid on olulised resistentsusgeenide bakterite vahelise ülekandumise vektorid (Bennett, 2008).

Enamik kirjeldatud plasmiididest on tsirkulaarsed, aga suuruse poolest varieeruvad nad suurtes piirides: paari geeni sisaldavatest 2–3 kb elementidest suurte mitutsada geeni sisaldavate süsteemideni (Bennett, 2008). Eriti suure plasmiidi näitena võib tuua *P. aeruginosa* plasmiidi pOZ175 (kirjeldatakse lähemalt allpool), mis ennustuste kohaselt sisaldab koguni 618 ORFi ja on üle 500 000 bp (*base pair*, aluspaar) pikk (Xiong *et al.*, 2013).

### 1.4.1 Klassifikatsioon

Plasmiidid jagunevad konjugatiivseteks ja mittekonjugatiivseteks. Mittekonjugatiivsed plasmiidid on väikese suurusega (tihti alla 10 kbp (*kilobase pair*, kiloaluspaar)) ja vajavad ühest bakterist teise ülekandumiseks samas doonorrakus oleva konjugatiivse plasmiidi abi. Konjugatiivsed plasmiidid on suuremad (üle 30 kbp) ja kodeerivad ise konjugatsiooniks vajalikke valke (Bennett, 2008). Konjugatsioon võib toimuda lähedalt suguluses olevate bakterite (kitsa peremehespetsiifikaga plasmiidid), aga ka paljude eri liikide vahel (laia peremehespetsiifikaga plasmiidid). Peremehespetsiifika määravad ülekandumise ja replikatsiooni võimalikkus uues peremes. Replikatsiooni toimumiseks on olulised mitmed valk-DNA ja valk-valk seosed plasmiidi ja peremehe vahel. Kui need ei toimi, ei saa plasmiid bakteris replitseeruda ja läheb kaduma (Zhong *et al.*, 2005).

Samuti on oluline plasmiidi mittesobivusgrupp: sama *ori* järjestusega (replikatsiooni alguspunkt) plasmiidid kuuluvad ühte mittesobivusgruppi ega saa korraga asuda samas bakterirakus, sest konkurents replikatsioonifaktorite pärast viib aeglasema replikatsiooniga plasmiidide (näiteks suuremad plasmiidid) kadumisele. Samas näitasid Velappan *et al.* (2007), et sama mittesobivusgrupi suure koopiaarvuga plasmiidid võivad küllaltki kaua (ligikaudu 50 põlvkonda) ühes rakus koos eksisteerida, enne kui aeglasemalt replitseeruvad rakust ära kaovad. Kui rakendada antibiootikumiselektiooni, võivad ka väikese koopiaarvuga plasmiidid küllalt kaua koos rakus püsida (Velappan *et al.*, 2007). Ajal, kui mitu plasmiidi asub samas bakterirakus, võib tänu mobiilsetele elementidele toimuda plasmiidide vaheline

horisontaalne geeniuülekannet, mis võib viia näiteks resistentsusgeenide levikule rakku alles jääva plasmidi kaudu.

## **1.4.2 Praktilises osas leitud plasmiidide iseloomustus**

### **1.4.2.1 pKLC102**

pKLC102 on suur, 103 532 bp pikkune konjugatiivne plasmid, mis leidub ühe erandiga kõigis *P. aeruginosa* kloon C tüvedes (Klockgether *et al.*, 2004). Kloon C on üks kõige laiemalt levikuga *P. aeruginosa* kloonidest, see on levinud vesikeskkonnas üle maailma ja nakatab edukalt tsüstilise fibroosi haigeid (Dinesh *et al.*, 2003; Römling *et al.*, 2005). pKLC102 on üks vähestest näidetest, kus plasmid asub bakteris korraka genoomi integreerunult ja vabalt, samas võib see esineda tüves ka ainult vabalt või ainult genoomi koosseisus. Seda võimaldavad faagi päritoluga geenid, näiteks integraas (Klockgether *et al.*, 2004). Samuti leiti homologia *Azotobacter vinelandii*, *P. syringae*, *P. fluorescens* ja *Burkholderia spp.* geenidega. Kõik need bakterid on seotud risosfääriga, seega arvatakse, et pKLC102 on evolutsioneerunud taimedega seotud keskkonnas (Klockgether *et al.*, 2004).

pKLC102 omab kõiki vajalikke gene konjugatsiooniks. Lisaks sisaldab ta piliine kodeerivat geeniklastrit ja *chvB* geeni, mis kodeerib suure tõenäosusega tsüklilist  $\beta$ -(1,2)-glükaani süntetaasi, mis on oluline suhtluses eukarüootse peremehega. Seega tõstavad need geenid arvatavasti peremeestüve virulentsust (Klockgether *et al.*, 2004).

### **1.4.2.2 pUM505**

pUM505 on kliinilisest *P. aeruginosa* tüvest eraldatud konjugatiivne 123 322 bp pikkune plasmid. Koosneb kahest eristatavast regioonist: üks kodeerib virulentsusfaktoreid nagu *pil* ja *vir* geenid ja teine arvatavate mobiilsete elementide vahel anorgaanilise elavhõbeda ning kromaadi resistentsusgene. Esimest regiooni võib pidada patogeensussaareks, sest 78 ORFist 64 on iseloomulikud *P. aeruginosa* patogeense tüve PA14 patogeensussaartele PAPI-1 ja PAPI-2 (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011). Patogeensussaares on 10–200 kb (*kilobase pair*, kiloaluspaar) pikkused regioonid patogeensetes bakteritüvedes ja mitmed asjaolud (tihti ülejäänud genoomist erinev GC sisaldus, otstes kordusjärjestused, mobiilsuselementide esinemine) viitavad nende horisontaalsele päritolule (Hacker ja Kaper, 2000). pUM505 patogeensussaar omab sarnasust ka pKLC102 *pil*, DNA replikatsiooni ja virulentsusgeenidega (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

pUM505 teadaolevalt antibiootikumiresistentsusgeene ei sisalda, aga katsed pUM505 kandva *P. aeruginosa* tüvega PU21 näitasid, et plasmiidiga tüve MIC (*minimum inhibitory concentration*, minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon) tsiprofloksatsiini suhtes oli rohkem kui 0,4 µg/ml kõrgem kui plasmiidita tüvel (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011). Selle põhjuseid tuleb veel uurida.

#### 1.4.2.3 pOZ176

pOZ176 isoleeriti haiglast eraldatud *P. aeruginosa* 96 multiresistentsest tüvest (Xiong *et al.*, 2013). pOZ176 on 500 839 bp pikkune ja sellega kõige pikem sekveneeritud plasmiid, kusjuures plasmidi replikatsiooni, stabiilsust ja ülekannet sünteesivad regioonid on teistest sekveneeritud plasmiididest küllaltki erinevad. Sisaldab kahte multiresistentsusintegroni, millest üks kodeerib resistentsust aminoglükosiididele ja karbapeneemidele ning teine aminoglükosiididele, klooramfenikoolile ja karbenitsilliinile, transposoon Tn5-le sarnast resistentsusgeenide ala, kahte *pil* geenide operoni ja mobiilsuselemente. Tn5-sarnane ala sisaldab aminoglükosiidide (neomütsiin, bleomütsiin ja streptomütsiin) resistentsusgeene. Samuti sisaldab telluriidiresistentsusgeenide operoni (Xiong *et al.*, 2013). Resistentsus telluriidi vastu on huvitav fenomen, sest keskkonnas on telluriidiühendid haruldased, aga telluriidiresistentsusgeene leidub paljudel bakteritel, kes omavahel otseselt suguluses ei ole. Nende geenide täpne funktsioon pole teada, aga kuna neid on leitud mitmetelt patogeenidelt, arvatakse, et need kaitsevad bakterit peremehe immuunsüsteemi eest (Taylor, 1999).

Erinev koodonikasutus lubab oletada, et karbapenemaasi kodeeriv *bla*<sub>IMP</sub> geen on hiljuti horisontaalsel teel omandatud ja mitmete mobiilsete elementide olemasolu viitab horisontaalse geeniülekanne olulisusele pOZ176 evolutsioonis (Xiong *et al.*, 2013).

#### 1.4.2.4 *E. coli* plasmiid p1658/97

Haiglatüvest isoleeritud 125 491 kb pikkune konjugatiivne plasmiid (leiduvad konjugatsiooni tagavad geenid *tra* ja *trb*) p1658/97 sisaldab ESBL (*extended-spectrum beta-lactamase*, laiendatud spektriga beeta-laktamaas) kodeerivat geeni *bla*<sub>SHV-5</sub> (pärit tõenäoliselt *Klebsiella pneumoniae* kromosoomist), mis on küllaltki laialt levinud ja mida on leitud, kuigi harva, ka *P. aeruginosast* (Zienkiewicz *et al.*, 2007; Livermore, 1995). p1658/97 jaotub sarnasuse alusel teistele DNA molekulidele kahte ossa: esimene osa on sarnane *E. coli* konjugatiivsetele plasmiididele F (fertiilsusfaktor, konjugatsioon) ja R100 (resistentsusplasmiid) ning teine osa, mis on mosaiikse struktuuriga, omades sarnasust mitmete bakterite kromosoomide ja plasmiididega. F ja R100 plasmiidiga sarnane osa kodeerib plasmidi replikatsiooniks,

konjugatsiooniks ja rakus säilitamiseks olulisi valke ning võib arvata, et neil kolmel plasmiidil on ühine eellane (Zienkiewicz *et al*, 2007).

14% kogu plasmiidist moodustavad mobiilsed elemendid: erinevad IS-lemendid (transponeerivad elemendid, mis kodeerivad ainult transpositsiooniks vajalikke valke) ja transposoonid (sisaldavad lisaks muid, näiteks resistentsusgeene). Peale *bla*<sub>SHV-5</sub> leidub plasmiidis veel resistentsusgeene, mis asuvad kõik ühes integronis ja annavad resistentsuse kõigile meditsiinis kasutatavatele aminoglükosiididele (Zienkiewicz *et al*, 2007).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Keskkond on oluline antibiootikumiresistentsuse reservuaar. Põllumajanduses kasutatavad antibiootikumid loovad selektiivse surve antibiootikumiresistentsete tüvede tekkeks ja levimiseks. Vähe on uuritud, milliseid teid pidi ja kui suurel määral resistentsus põllumajanduskeskkonna (loomad, läga, põld) ja inimeste ning haiglate vahel levib.

*P. aeruginosa* kui väga paljudes keskkondades kasvada suutev ja suure resistentsusvõimekusega bakter võib omada antibiootikumiresistentsuse levimise seisukohast olulist rolli põllumajandus- ja meditsiinikeskkonna ühendamisel. Kui kliinilisi andmeid *P. aeruginosa* kohta leidub, siis keskkonnas on teda suhteliselt vähe uuritud.

Plasmiidid on olulised antibiootikumiresistentsusgeenide ülekandevektorid. Plasmiidides sisalduvate resistentsusgeenide abil võib bakter omandada resistentsuse väga erinevate antibiootikumiklasside suhtes.

Käesoleva töö eksperimentaalse osa eesmärk oli

- *P. aeruginosa* tüvede isoleerimine inimtegevusega (põllumajandus ja reoveepuhastid) lähedases kontaktis olevast keskkonnast, et saada isolaatide kollektsioon edasisteks uuringuteks;
- kollektsioonis, kuhu lisati veterinaarsed ning meditsiinilised isolaadid, uuriti plasmiidide olemasolu, et leida ühiseid resistentsusgeenide kandjaid.

## 2.2 Materjalid ja meetodid

### 2.2.1 Isolaatide kogumine

Töö autor proovide võtmisel isiklikult ei osalenud. Seafarmidest saadud lägaproovid (kokku 13), millest töö autor *P. aeruginosa*t eraldas, kogus Veljo Kisand. Ülejäänud keskkonna-, veterinaar- ja haiglaisolaadid koguti projekti ABRESIST („Antibiootikumiresistentsuse levikuteed“ TerVe) raames (Lisa 1a).

### 2.2.2 *P. aeruginosa* isoleerimine seafarmide lägast

Läga hoiti 50 ml plastknõudes 4 °C juures. *P. aeruginosa* isoleerimiseks kasutati kohandatud EVS-EN ISO 16266:2008 standardit. Steriilses filtersüsteemis filtreeriti paralleelselt kaks proovi. Filtersüsteem steriliseeriti autoklaavimisega (15 min, 121 °C). Enne filtreerimist loksutati 10 ml läga 60 ml füsioloogilises lahuses toatemperatuuril 30 minutit. Et vältida filtri ummistumist, filtreeriti lägalahus kõigepealt läbi steriilse 100 µm ja 20 µm avaga võrgu. Edasi filtreeriti 1 ml (algselt 10 ml, kogust otsustati vähendada, sest kasv oli liiga tihe) lahust 0,45 µm avaläbimõõduga filtrile ja asetati filter söötmele. Kasutati Pseudomonas P (Merck), PSA (Scharlau), KingB (Scharlau) ja 10 µg/ml ampitsilliiniga rikastatud CN (Scharlau) söödet: lägalahust filtreeriti kokku 81 filtrile, millest 39 asetati Pseudomonas P, 28 ampitsilliiniga rikastatud CN söötmele, 12 King B ja 2 PSA söötmele. 28 tassi hoiti üle öö 37 °C juures ja 53 tassi 42 °C juures.

Filtritelt määrati visuaalselt kõik rohelised kolooniad, lisaks punakaspruunid, mis võiksid olla püotsüaniini mitteprodutseerivad tüved. Rohelised potentsiaalsed *P. aeruginosa* kolooniad külvati edasi samale selekteerivale söötmele ja kasvatati 42 °C juures üle öö. Järgmisena külvati need LB söötmele. Punakaspruunidele tüvedele tehti standardi järgi kinnitustestid (fluorestseerumine UV-valguses, KingB söötmel, oksüdaastest, atsetamiidsöötmele ammooniumi produtseerimise määramine Nessleri reagentiga). Ükski punakaspruun koloonia *P. aeruginosa*saks ei osutunud. Isolaatidest (kõik püotsüaniini tootvad) tehti säilituskultuurid (250 µl vedelkultuuri, 750 µl 60% glütserooli), mis hoiustati –80 °C juures. Bakterirakkude massist eraldati DNA, amplifitseeriti 16S rRNA geenifragment (Lisa 1c) ja 16S rRNA geen sekveneeriti Sangeri meetodil (Lisa 1c). Samuti määrati isolaatide antibiootikumiresistentsus E-testiga (Lisa 1d) ja sekveneeriti isolaatide kogu genoom (Lisa 1e).

### 2.2.3 DNA eraldamine

DNA eraldamisega tegelesid mitmed töörühma liikmed, töö autor osales keskkonnaisolaatidest DNA eraldamisel. DNA eraldati GuSCN-räni meetodil (Boom *et al.*,



1990), millele lisati mehhaaniline purustamise etapp. Keskkonna isolaatide puhul eraldati DNA rakkude pelletist (üksik koloonia külvati LB vedelsöötmesse, kasvatati üle öö 37 °C juures 200 rpm (*revolutions per minute*, pööret minutis) loksutil, 900 µl bakterisuspensiooni tsentrifuugiti 13 000 rpm, supernatant eemaldati), veterinaar- ja haiglaisolaatide puhul üksikust agaril kasvanud kolooniast. Meetod oli lühidalt järgmine: rakud või pellet suspendeeriti 570 µl TE (pH 7,6) puhvril, lisati 30 µl 10% SDS lahust ja umbes 0,5 g tsirkooniumipuru (läbimõõt 0,1 mm, põletatud 2 t 500 °C juures), proove töödeldi 5 minutit spetsiaalse veskiga (Biospec products, Minibead beater). Seejärel tsentrifuugiti proove 10 000 rpm juures 1 minut. Lüüsimiseks lisati lüüsipuhvrit L6 (5.25 M GuSCN, 100 mM Tris-HCl pH 6.4, 20 mM EDTA, 1.3% Triton X-100) ja 40 µl ränisuspensiooni. Pärast 5 minutit lüüsimist toatemperatuuril tsentrifuugiti proove 5000 rpm juures 10 sekundit. Supernatant eemaldati ja pelletit loputati L2 puhvri (5 M GuSCN) ja 50% etanooliga. Seejärel lasti pelletil kuivada, suspendeeriti uuesti destilleeritud vees (milli-Q) ja säilitati –20 °C juures.

#### **2.2.4 Plasmiidide eraldamine**

Kõigist seafarmi lägast saadud *P. aeruginosa* isolaatidest ja juhuslikult valitud ABRESIST isolaatidest (52 isolaati) prooviti eraldada plasmiidid Invisorb Spin Plasmid Mini Two kitiga (Stratec) ja kontrolliti agarosgeelil (1,2%, 90 V, marker Fastruler HighRange DNA Ladder (Fermentas)). Selleks külvati tüved kõigepealt säilituskultuurist välja LB tardsöötmele ja kasvatati 37 °C juures üle öö. Seejärel külvati üks koloonia edasi LB vedelsöötmesse ja kasvatati üle öö. Plasmiidid eraldati vastavalt kiti protokollile, välja arvatud viies etapp, kus tsentrifuugiti suure limahulga tõttu kuni 10 minutit kauem, et oleks võimalik eraldada supernatant. Eluatsioonil kasutati suurte plasmiidide saagise suurendamiseks 70 °C eluatsioonilahust. Plasmiidid lõigati geelist välja (Stratec Invisorb Spin DNA Extraction kiti protokoll järgi) ja sekveneeriti samamoodi nagu genoomsed DNA proovid (Illumina HiSeq 2500). Sekveneerimine kahjuks tulemusi ei andnud. Tüvedest, kust oli selle Stratec kitiga leitud plasmide, prooviti eraldada plasmiidid Qiagen Spin Miniprep kitiga. Tulemused ei paranenud. Lisaks ei andnud tulemusi ka Heringa *et al.* (2006) välja töötatud meetodi kasutamine.

#### **2.2.5 Plasmiidijärjestuste otsimine sekveneeritud genoomidest**

Keskkonna-, veterinaar- ja haiglaisolaatide esialgseid assambleeritud genoome (*draft genomes*) võrreldi lokaalselt NCBI BLAST programmi alaprogrammi blastn abil kõigist GenBank andmebaasis leiduvatest *Pseudomonase* liikide ning eraldi *P. aeruginosa* plasmiidijärjestustest moodustatud andmebaasiga. Andmebaas sisaldas 1754

plasmidijärjestust, sealhulgas 602 *P. aeruginosa* plasmidi. Hiljem selgus, et kuigi plasmidijärjestuste otsimisel GenBank leheküljel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) kasutati otsingusõnadena „pseudomonas“ ja „aeruginosa“, sattus kõigi järjestuste korraga allalaadimisel sinna hulka ka vähesel määral muude organismide, näiteks *E. coli*, plasmide. Saadud vasted järjestati kattunud ala suuruse järgi ja edasiseks analüüsiks valiti välja üle 20 000 aluspaari pikkused vasted, sest lühikeste vastete osakaal oli suur. Oluline oli ka identsusprotsent, mis kõigil juhtudel, välja arvatud *E. coli* plasmid (96,8%), oli üle 97%.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Isoleerimine

Kuigi *P. aeruginosa* suudab väga erinevates keskkondades kasvada ja teda leidub nii vees, mullas, loomadel kui ka taimedel, ei osutunud tüvede keskkonnast isoleerimine nii lihtsaks ülesandeks, kui oodata võiks. Töö käigus prooviti erinevaid *Pseudomonase* tüvede isoleerimiseks mõeldud selektiivseid söötmeid (Pseudomonas P, PSA, CN, KingB), lisaks oli eelnevalt testitud 41 meditsiinilise patogeense tüve koloonia morfoloogiat Pseudomonas P ja GSP agaril (Merck). GSP agarit edasistes isoleerimiskatsetes ei kasutatud, sest söötme punase värvuse tõttu oli moodustunud värvitud kolooniaid (ka Pseudomonas P söötmel püotsüaniini produtseerivad kolooniad) raske eristada.

*Pseudomonas spp.* isoleerimiseks mõeldud söötmed töötavad reeglina iseloomulike pigmentide (püotsüaniin, püoverdiin, fluorestsein) sünteesi soodustamise põhimõttel. Teiste bakterite kasvu piiramiseks võib tänu *P. aeruginosa* suurele resistentsusele erinevate antibiootikumide suhtes lisada ka antibiootikumi. Nagu käesoleva töö käigus selgus, ei piisa *P. aeruginosa* selekteerimiseks lägast ainult pigmenti tootmise soodustamisest, sest lägas on teiste bakterite arvukus nii suur, et filtreerimisel kasvab filter täis ja madala arvukusega *P. aeruginosat* ei ole võimalik eristada. Enamik lägast saadud isolaate saadi ampitsilliiniga rikastatud CN söötmelt (Tabel 2). Filtreeritud kogus on Pseudomonas P ja CN agari puhul suurem kui teiste söötmete puhul, sest algselt, kui proove filtreeriti 10 ml kaupa (neli proovi), kasutati ainult neid söötmeid. On näha, et Pseudomonas P ei sobi üldse *P. aeruginosa* eraldamiseks lägast, PSA söötmega on tulemused kas paljulubavad või juhuslikud, nii et seda söödet tuleb veel testida.

**Tabel 2.** Seafarmide lägast (13 proovi) saadud isolaadid

Sööde	Filtreeritud kogus (ml)	Isolaatide arv
Pseudomonas P	117	0
PSA	2	2
CN (+ampitsilliin)	106	7
King B	18	0

Autori hüpotees oli ka, et *P. aeruginosa* isoleerimist on võimalik kergendada kasvatamisel 42 °C juures, sest on teada, et erinevalt paljudest teistest keskkonnas leiduvatest mikroobidest, kaasa arvatud teised *Pseudomonas spp.* suudab *P. aeruginosa* kasvada isegi kuni 42 °C juures (Bühlmann *et al.*, 1961). Saadud andmed seda ei näidanud (Tabel 3).

**Tabel 3.** Isoleeritud tüved (13 lägaproovi) vastavalt temperatuurile

Isoleerimistemperatuur	Filtreeritud kogus (ml)	Isolaatide arv
37 °C	60	6
42 °C	143	3

Rakendatud standardmeetodi (ISO 16266 : 2008) efektiivsust on kindlasti võimalik tõsta. Edasistes uuringutes võib testida teisi selektiivsõotmeid, lisandina kasutada ampitsilliini asemel teisi antibiootikume. Ampitsilliin sobib selle poolest selekteerivaks aineks hästi, et enamik (uuringutes tihti ka kõik) *P. aeruginosa* tüvesid on ampitsilliinile resistentsed (Ali ja Zgair, 2014; Anomohanran ja Ehwareme, 2014; Narten *et al.*, 2012). Kui lisada söötmesse antibiootikumi madalimas kontsentratsioonis kui bakteri MIC, saab takistada tundlike liikide kasvu, samal ajal kui uuritava resistentsel bakteri kasvu ei mõjutata. Antibiootikumiselektiooni kasutamise puudus on muidugi see, et juhul, kui keskkonnas leidub sellele antibiootikumile tundlikke *P. aeruginosa* tüvesid, ei õnnestu neid eraldada ja koosluse kohta saadav info jääb puudulikuks. Vastavalt uuringu eesmärgile (näiteks kas eraldada kõik leiduvad bakterid või ainult esindajad) tuleb leida sobiv selektsioonimeetod.

### 2.3.2 Plasmiidid

Plasmiidide eraldamisel *P. aeruginosast* suudeti tõenäoliselt eraldada ainult üks suur plasmiid (üle 20 000 bp), mis oleks konjugatiivne (võimeline ise üle kanduma) (Bennett, 2008). Kas sellele aitas kaasa eralduskiti protokollis soovitatud eluatsioonilahuse soojendamise 70 °C juurde, ei saa väikse andmehulga tõttu väita. Suur plasmiid suudeti eraldada ainult Qiageni kitiga. Alla 20 000 bp pikkusi plasmide leiti kuus: üks umbes 3000 bp, kaks üle 4000 bp ja kolm umbes 2000 bp pikkust plasmidi, neist üks 2000 kb plasmiid leiti haiglast eraldatud ja ülejäänud Tartu reoveepuhastusjaama väljavoolu suublast eraldatud tüvedest, kusjuures kahest reoveeisolaadist saadi nii lühem kui ka pikem alla 20 000 bp plasmiid (Lisa 3). Haiglast isoleeritud tüvi HUM-291, kust eraldati nii lühike, umbes 2000 bp plasmiid kui ka suur plasmiid, andis ka BLAST analüüsil vaste suurele konjugatiivsele plasmiidile pUM505.

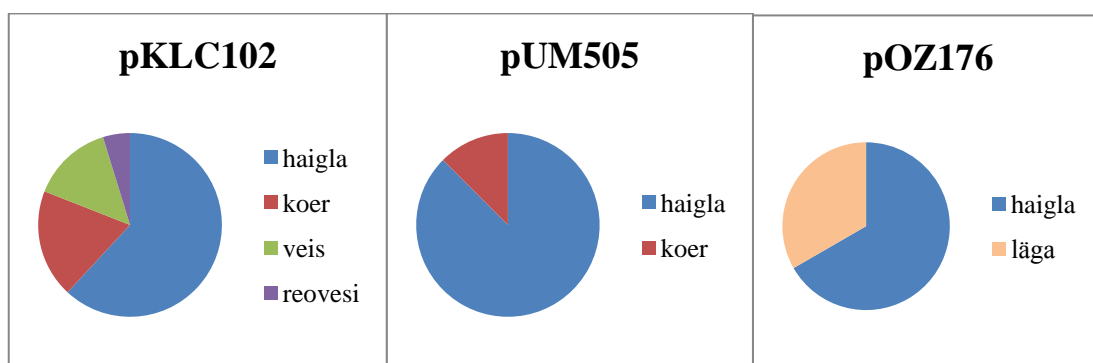
Plasmiidide eraldamine oli raskendatud tüvede suure limahulga tõttu, edaspidi tasuks uurida, milline võiks olla limahulka vähendav etapp. Võiks näiteks testida, kas eksopolüsahhariide lagundavate ensüümidega töötlemine annaks paremaid tulemusi.

Plasmiidide geelist puhastamise saagis oli väike – alla 10% ja arvatavasti seetõttu plasmiidide sekveneerimine tulemusi ei andnud.

### 2.3.2.1 Plasmiidijärjestuste otsimine sekveneeritud genoomidest

#### 2.3.2.1.1 Plasmiidide jaotumine isolaaditi

Üle 20 000 bp pikkuseid vasteid leiti 41 isolaadist. Neist 21 juhul oli tegu *P. aeruginosa* plasmiidiga pKLC102, 16 juhul *P. aeruginosa* plasmiidiga pUM505, kolmel juhul *P. aeruginosa* plasmiidiga pOZ176 ja ühel juhul leiti *E. coli* plasmiid p1658/97. Leitud plasmiidide jaotus isolaatide vahel on näidatud joonisel 2. *E. coli* plasmiid p1658/97 leiti haiglaisolaadist.



**Joonis 2.** Plasmiidide isolaatidevaheline jaotus. pKLC102 leiti 13 korral haiglast (haavadega, kuseteede ja hingamisteede põletikuga patsiendid), neljal korral koertelt (väliskõrvapõletik), kolmel korral veistelt (udarpõletik, ühel korral veremürgitus) ja ühel korral Tartu reoveepuhastusjaama väljavoolu suublast isoleeritud tüvest. pUM505 leiti 14 korral haiglast ja kahel korral koertelt, pOZ176 kahel korral haiglast ja ühel korral lögast isoleeritud tüvest.

Tulemustest nähtub, et pKLC102 on leitud plasmiididest kõige laialdasema levikuga. Haiglaisolaatide suurem esindatus on ilmselt tingitud ka sellest, et neid oli kollektsioonis rohkem kui keskkonna- ja veterinaarisolaate. Saadud tulemuste põhjal ei saa siiski teha järeldusi plasmiidide horisontaalse ülekande kohta eri keskkondade vahel, sest uuritud isolaatide valim on selleks liiga väike.

#### 2.3.2.1.2 Resistentus

E-testi tulemused on olemas 36 isolaadi kohta (Lisa 2). Need näitasid multiresistentsust 36,6% tüvedest (15 tüve). Kõik multiresistentsed tüved olid haiglaisolaadid. Et haiglaisolaatide hulgas leidub multiresistentseid tüvesid rohkem, on ootuspärane, sest haiglates on antibiootikumisurve pidevalt suur. Kõige rohkem multiresistentseid tüvesid sisaldas plasmiidi pUM505 (9 tüve). pUM505 ise teadaolevalt resistentusgeene ei sisalda, nii

et see võib olla juhuslik. Samas võib pUM505 kui konjugatiivne plasmiid teoreetiliselt vahendada väiksemate resistentsusplasmiidide ülekannet. Ühest multiresistentsest pUM505 plasmidi kandvast haiglaisolaadist isoleeriti käesolevas töös ka üks umbes 2000 kb plasmiid. Kas see plasmiid resistentsusgeene kandis, ei ole teada.

Testitud kümnest antibiootikumist leidis resistentsust kõige rohkem piperatsilliin/tasobaktaami (15 isolaati), tsiprofloksatsiini (15 isolaati), imipeneemi (13 isolaati) ja meropeneemi (11 isolaati) suhtes. Kõrge karbapeneemiresistentsus (imipeneem, meropeneem) on kooskõlas andmetega, et Eestis on karbapeneemiresistentsus üle Euroopa keskmise, teiste antibiootikumiklasside kohta puuduvad piisavad andmed (European Centre for Disease Prevention and Control, 2011).

Kuidas isolaatide resistentsus eri antibiootikumidele plasmiiditi jaotus, on näidatud tabelis 4 (arvukamalt esinenud plasmiidid pKLC102 ja pUM505). Kuigi andmehulk on liiga väike, et suuremaid järeldusi teha, võib näha, et plasmidi pUM505 kandvad isolaadid on kokkuvõttes kaks korda resistentsamad kui pKLC102 kandvad isolaadid (tüvede keskmine resistentsus vastavalt 34,1% ja 15,8%). Ilmselt tuleb edasi uurida, kas ja kuidas pUM505 peremehe resistentsust suurendab, sest resistentsusgeene otseselt plasmiidist sekveneerimisel ei leitud, kuid tundlikku tüvesse viimisel tõstis pUM505 tüve resistentsust tsiprofloksatsiini suhtes (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011). Ka E-testi tulemustest on näha, et tsiprofloksatsiin on üks antibiootikumidest, millele on pUM505 sisaldavate isolaatide resistentsus suhteliselt suur (61,5% isolaatidest resistentsed).

**Tabel 4.** Resistentsuse jaotus plasmiiditi. Näidatud on plasmide pKLC102 ja pUM505 kandvate tüvede resistentsus E-testiga testitud antibiootikumidele (CAZ – tseftasidiim, FEP – tsefepiim, MEM – meropeneem, TZP – piperatsilliin/tasobaktaam, AMK – amikatsiin, GEN – gentamütsiin, CIP – tsiprofloksatsiin, TOB – tobramütsiin, CST – kolistiin, IPM – imipeneem) arvuliselt ja protsentuaalselt.

	CAZ		FEP		MEM		TZP		AMK		GEN		CIP		TOB		CST		IPM	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>pKLC102</b>	15	2	13	2	13	3	13	4	15	2	14	2	11	5	16	0	16	0	10	5
15,75%	11,8%		13,3%		20%		23,5%		11,8%		12,5%		31,3%		0%		0%		33,3%	
<b>pUM505</b>	11	4	10	3	5	6	6	9	12	2	10	3	5	8	11	2	12	1	6	7
34,1%	26,7%		23,1%		54,5%		60%		14,3%		23,1%		61,5%		15,4%		7,7%		53,8%	

Isolaat HUM-306, kust leiti vaste *E. coli* plasmiidile p1658/97, milles on muuhulgas tsefalosporiinidele resistentsust tekitavat ESBL kodeeriv geen *bla<sub>SHV-5</sub>*, oli E-testi andmetel resistentne mõlemale testitud tsefalosporiinile (tseftasidiim, tsefepiim). Siiski ei pruugi resistentsus tekkinud olla just tänu sellele plasmiidile, sest neile mõlemale antibiootikumile resistentseid tüvesid oli veel. Lisaks ei olnud plasmiidiga isolaat resistentne aminoglükosiididele, kuigi p1658/97 sisaldab sekveneerimisel saadud andmetel integroni, milles on aminoglükosiidiresistentsusgeenid (Zienkiewicz *et al*, 2007).

Plasmiidi pOZ176 kandnud tüvedel esines resistentsust kõigi antibiootikumide suhtes, välja arvatud tsefepiim, kolistiin ja imipeneem. Xiong *et al.* (2013) Leidsid sekveneerimisel plasmiidist pOZ176 multiresistentsusintegroni, mis muuhulgas sisaldas resistentsusgeeni karbapeneemidele, sealhulgas imipeneemile (ka E-test kinnitas), nii et võib spekuloida, et see konkreetne integron on käesolevas töös analüüsitud isolaatidest kadunud. Edaspidises töös võib programmiga BLAST vaadata, kas isolaatide sekveneeritud genoomist on võimalik leida vaste sellele integronile. Ainuke lägast isoleeritud tüvi, millest leiti vaste plasmiidile (pOZ176), ühelegi testitud antibiootikumile resistentne ei olnud.

### 2.3.3 Järeldused

Kindlasti on oluline jätkata teemaga tegelemist ja koguda rohkem isolaate, et oleks võimalik teha kaugeleulatuvamaid järeldusi keskkonna olulisuse kohta antibiootikumiresistentsuse levikus. Selleks tuleb eelkõige täiustada isoleerimismetoodikat, et oleks *P. aeruginosa* võimalik efektiivsemalt eraldada (näiteks testida selekteeriva komponendina erinevaid antibiootikume). Samamoodi tuleb täiustada plasmiidide eraldamise metoodikat.

Keskkonna- ja haiglaisolaatidest leiti BLAST programmiga ühiseid DNA fragmente plasmiididega. Kas tegu on ühiselt eellaselt pärit plasmiididega või on need horisontaalselt omandatud, ei ole käesoleva töö tulemuste põhjal võimalik väita. Vajalikud on lisauuringud. Samuti oleks huvitav uurida plasmiidi pUM505 resistentsust tekitavaid mehhanisme, kuna sekveneerimisel Ramírez-Díaz *et al.* (2011) resistentsusgeene ei leidnud, aga pUM505 sisaldavad isolaadid näitasid suuremat resistentsust erinevatele antibiootikumidele ja olid ka kõige suuremal määral multiresistentsed. Kas suurem resistentsus on saavutatud tänu plasmiidile, vajab lisakontrolli.

## KOKKUVÕTE

Kuna *P. aeruginosa* on üks olulistest patogeenidest, on teda ja tema antibiootikumiresistentsust kliinilises kontekstis palju uuritud. Vähe tähelepanu on aga pööratud keskkonna kui *P. aeruginosa* peamise elupaiga ja olulise resistentsusgeenide reservuaari uurimisele. Resistentsusgeenide hulk, nagu Knapp *et al.* (2010) mulla puhul näitasid, on keskkonnas antibiootikumide kasutuselevõtu järel mitmekordistunud. Peale meditsiini kasutatakse antibiootikume ka põllumajanduses ja tihti koguseliselt rohkem kui inimeste ravimisel (Meyer *et al.* 2013). See põhjustab farmides ja farmidega kokkupuutuvatel aladel selektsiooni antibiootikumiresistentsete tüvede tekkeks ja levimiseks.

Plasmiidid on olulised horisontaalse geeniülekanne vektorid. Resistentsusgeene võivad kanda nii suured kui ka väikesed plasmiidid. Ühelt bakterilt teisele võivad suured konjugatiivsed plasmiidid kanduda iseseisvalt, väikesed mittekonjugatiivsed vajavad aga, et doonorrakus oleks olemas ka konjugatiivne plasmiid. Käesolevas töös leiti samu suuri plasmiide (üle 20 000 bp) nii haigla- kui ka keskkonnaisolaatidest. Kas tegu on horisontaalse geeniülekandega, vajab edasist uurimist. Ühest kõrgema resistentsusega haiglatüvest leiti nii suur kui ka väike plasmiid (alla 20 000 bp). Kuna Ramírez-Díaz *et al.* (2011) sekveneerimisel suurest plasmiidist pUM505 potentsiaalseid resistentsusgeene ei leidnud, tuleb edaspidistes uuringutes vaadata, kas väike plasmiid võiks sisaldada resistentsusgeene. Samuti võib kontrollida, kas pUM505 on horisontaalsel teel uusi geene omastanud.

Põhjalikemate järelduste tegemiseks tuleb eelkõige täiustada *P. aeruginosa* keskkonnast isoleerimise meetodikat, et oleks võimalik saada suurem andmehulk. Samuti vajab täiustamist plasmiidide eraldamise protokoll.



# ***P. aeruginosa* as a Vector of Antibiotic Resistance between Environments**

Lagle-Marie Tamm

## **SUMMARY**

Although antibiotic resistance is a phenomenon that dates back to the early ages it has become increasingly important since the introduction of antibiotics to human medicine and not long afterwards to agriculture. The presence of antibiotics in the environment creates a selective pressure towards the development and spread of resistance genes. As an important opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* might serve as a vector of resistance spread between its different habitats.

*P. aeruginosa* is highly resistant to different classes of antibiotics. Moreover, it, like other bacteria, can acquire resistance via horizontal gene transfer. In agricultural or related settings the antibiotics used in food animals can provide selective pressure to increase the rate of gene transfer (Bearson *et al.*, 2014; Trieu-Cuot *et al.*, 1993).

Plasmid mediated gene transfer is an important mechanism of horizontal gene transfer. In the current work it was attempted to isolate plasmids from environmental and hospital isolates of *P. aeruginosa*. With commercial kits we were able to isolate only small plasmids with one exception (potentially pUM505). The search for large plasmid hits from the sequenced genomes of *P. aeruginosa* isolates with NCBI BLAST showed that strains from different growth environments harbor the same plasmids (*P. aeruginosa* plasmids pKLC102, pUM505 and pOZ176 and *E. coli* plasmid p1658/97 were found). If this is a result of horizontal gene transfer is yet to be determined.

For future studies it is necessary to improve the method for *P. aeruginosa* isolation from the environmental settings as well as for the isolation of plasmids from the strains. There is still much work to be done in determination of the role of environment in relation to antibiotic resistance in the clinical settings.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Ali, M. N. and Zgair, A. K. (2014). Antibiotic Susceptibility of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Exp Biosci*, 2(1): 1–5.
- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Lee, D. G., Cornelis, P., Hellewell, P. G. and Whyte, M. K. B. (2005). Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses *In Vivo*. *J Immunol*, 174(6): 3643–3649.
- Andersson, D. I. and Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 8(4): 260–71.
- Andersson, D. I. and Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5): 901–11.
- Anomohanran, E. E. and Ehwarieme, D. A. (2014). Evaluating the Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* to Various Brands of Ampicillin and Amoxicillin Available in Nigeria. *Am J Agric Biol Sci*, 9(4): 503–509.
- Auerbach, A., Kerem, E., Victor, M., Picard, E. and Bar-meir, M. (2014). Is infection with hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* clinically significant? *J Cyst Fibr*, 7–12.
- Balcazar, J. L. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathog*, 10(7): 1–4.
- Baquero, F., Negri, M. C., Morosini, M. I. and Blázquez, J. (1998). Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis*, 27 Suppl 1(Suppl 1): S5–11.
- Bassil, R. J., Bashour, I. I., Sleiman, F. T. and Abou-Jawdeh, Y. A. (2013). Antibiotic uptake by plants from manure-amended soils. *J Environ Sci Heal B*, 48(7): 570–4.
- Bearson, B. L., Allen, H. K., Brunelle, B. W., Lee, I. S., Casjens, S. R., & Stanton, T. B. (2014). The agricultural antibiotic carbadox induces phage-mediated gene transfer in *Salmonella*. *Front Microbiol*, 5: 1–8.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Brit J Pharmacol*, 153 Suppl (January): S347–S357.
- Blackwell, P. a, Kay, P. and Boxall, A. B. A. (2007). The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere*, 67(2): 292–9.
- Bondt, N., Puister, L., Ge, L., Veen, H. Van Der, Bergevoet, R. and Douma, B. (2012). Trends in veterinary antibiotic use in the Netherlands LEI project team, 11: 1–26.
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc Biol Sci/ R Soc*, 277(1683): 819–827.
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C. and Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, 19(8): 419–26.

- Bühlmann, X., Vischer, W. A. and Bruhin, H. (1961). Identification of Apocyanogenic Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 82(5): 787–788.
- Cantón, R. and Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*, 11(5): 477–85.
- Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in Cystic Fibrosis. *Future Microbiol*, 5: 1663–1674.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Enghusen, H., Høiby, N. and Poulsen, H. E. (2005). Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(6): 2276–2282.
- Colibar, O. and Morvay, A. A. (2012). Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from meat surface biofilm. *Romanian Biotechnol Lett*, 17(4): 7483–7492.
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J. and Muniesa, M. (2011). Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(10): 4908–4911.
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418): 1318–1322.
- Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med*, 264(1): 4–16.
- Coutinho, H. D. M., Falcão-Silva, V. S. and Gonçalves, G. F. (2008). Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *Int Arch Med*, 1(1): 24.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C. and Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365): 457–461.
- Davies, J. and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev : MMBR*, 74(3): 417–433.
- Dinesh, S. D., Grundmann, H., Pitt, T. L. and Römling, U. (2003). European-wide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C. *Clin Microbiol Infect*, 9(12): 1228–1233.
- EESTI STANDARD EVS-EN ISO 16266 : 2008 Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Method by membrane filtration Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Method by membrane filtration. (2008).
- Enne, V. I., Bennett, P. M., Livermore, D. M. and Hall, L. M. C. (2004). Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J Antimicrob Chemother*, 53(6): 958–963.
- Fonseca, E. L., Vieira, V. V., Cipriano, R. and Vicente, A. C. P. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Imm Med Microbiol*, 44(3): 303–309.

- Ghafoor, A., Hay, I. D. and Rehm, B. H. A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol*, 77(15): 5238–5246.
- Graham, J. P. and Boland, J. J. (2007). Growth Promoting Antibiotics in Food Animal Production : An Economic Analysis, *Public Health Rep*, 122(2): 79–87.
- Hacker, J. and Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Ann Rev Microbiol*, 54: 641–679.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H. and Nau, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 74(7): 1509–1518.
- Hassan, H. M. and Fridovich, I. (1980). Mechanism of the Antibiotic Action of Pyocyanine. *J Bacteriol*, 141(1): 156–163.
- Hassett, D. J., Sutton, M. D., Schurr, M. J., Herr, A. B., Caldwell, C. C. and Matu, J. O. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol*, 17(3): 130–8.
- Hugh, R. (1964). The Proposed Neotype Strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*, 14(2): 69–84.
- Ike, Y., Tanimoto, K., Ozawa, Y., Nomura, T., Fujimoto, S. and Tomita, H. (1999). Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet*, 353(9167): 1854.
- Iwahi, T., Nakao, M. and Noji, Y. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* Reveals High Intrinsic Resistance to Penem Antibiotics : Penem Resistance Mechanisms and Their Interplay. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7): 1964–1971.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. and Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol*, 12(3): 181–96.
- Kaplan, J. B., Izano, E. a, Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L. and Bayles, K. W. (2012). Low Levels of beta-Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 3(4): 2–9.
- Kenna, D. T., Doherty, C. J., Foweraker, J., Macaskill, L., Barcus, V. A. and Govan, J. R. W. (2007). Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiol*, 153: 1852–1859.
- Kerr, K. G. and Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Inf*, 73(4): 338–44.
- Khan, N. H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, M. and Kogure, K. (2007). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol*, 53(2): 173–86.

- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F. and Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*, 2(7): 150.
- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K. and Tu, B. (2004). Sequence Analysis of the Mobile Genome Island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C Sequence Analysis of the Mobile Genome Island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol*, 186(2): 518–534.
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. a I., & Graham, D. W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Tech*, 44(2): 580–587.
- Kung, V. L., Ozer, E. A. and Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev: MMBR*, 74(4): 621–41.
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother*, 52(1): 5–7.
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E. and Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep*, 127(1): 4–22.
- Li, R., Lai, J., Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Liu, K. and Wu, C. (2013). Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *Int J Food Microbiol*, 163(1): 14–18.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Antimicrob Res*, 34: 634–640.
- Love, D. C., Davis, M. F., Bassett, A., Gunther, A. and Nachman, K. E. (2011). Dose imprecision and resistance: Free-choice medicated feeds in industrial food animal production in the United States. *Environ Health Perspect*, 119(3): 279–283.
- Luján, A. M., Maciá, M. D., Yang, L., Molin, S., Oliver, A. and Smania, A. M. (2011). Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS ONE*, 6(11): e27842.
- Macko, V. and Allen, P. J. (1962). *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in Distilled Water from Hospitals. *Science*, 173(1): 1962–1964.
- MacLean, R. C. and Vogwill, T. (2014). Limits to compensatory adaptation and the persistence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Evol, Med, Public Health*, 2015(1): 4–12.
- Marcusson, L. L., Frimodt-Møller, N. and Hughes, D. (2009). Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog*, 5(8): e1000541.
- Maron, D. F., Smith, T. J. S. and Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization Health*, 9(1), 48.
- Marshall, B. M. and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*, 24(4): 718–733.

- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Poll*, 157(11): 2893–902.
- Mazaheri Nezhad Fard, R., Barton, M. D. and Heuzenroeder, M. W. (2011). Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett Appl Microbiol*, 52(6): 559–564.
- Meyer, E., Gastmeier, P., Deja, M. and Schwab, F. (2013). Antibiotic consumption and resistance: data from Europe and Germany. *Int J Med Microbiol: IJMM*, 303(6-7): 388–95.
- Musovic, S., Oregaard, G., Kroer, N. and Sørensen, S. J. (2006). Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 72(10): 6687–6692.
- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H. and Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet*, 36(7): 760–766.
- Narten, M., Rosin, N., Schobert, M. and Tielen, P. (2012). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. *Curr Microbiol*, 64(1), 7–16.
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D. and Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA. *Environ Biosafety Res*, 6: 37–53.
- Norman, A., Hansen, L. H. and Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos T Roy Soc B*, 364(1527): 2275–2289.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. and Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288(5): 1251–1254.
- Overballe-Petersen, S. and Willerslev, E. (2014). Horizontal transfer of short and degraded DNA has evolutionary implications for microbes and eukaryotic sexual reproduction. *BioEssays*, 36: 1005–1010.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P. and Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti-Infe*, 11(3): 297–308.
- Pirnay, J. P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J. and Cornelis, P. (2005). Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol*, 7(7): 969–980.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. and Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid*, 66(1): 7–18.
- Ren, C. L., Konstan, M. W., Yegin, A., Rasouliyan, L., Trzaskoma, B., Morgan, W. J. and Regelman, W. (2012). Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung function decline in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibr*, 11(4): 293–9.

- Reyes, E. A. P., Bale, M. J., Cannon, W. H. and Matsen, J. M. (1981). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by Pyocyanin Production on Tech Agar. *J Clin Microbiol*, 13(3): 456–458.
- Rowe-Magnus, D. A. and Mazel, D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol*, 292(2): 115–125.
- Rowe-Magnus, D. A. and Mazel, D. (2001). Integrons: Natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol*, 4(5): 565–569.
- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J. P. and Viñas, M. (2011). Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, 38(5): 398–402.
- Römling, U., Kader, A., Sriramulu, D. D., Simm, R. and Kronvall, G. (2005). Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ Microbiol*, 7(7): 1029–1038.
- Sengeløv, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S. B., Andersen, J. S. and Jensen, L. B. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ Int*, 28(7): 587–95.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B. and Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*, 35(4): 652–80.
- Skov, M. N., Andersen, J. S., Aabo, S., Ethelberg, S., Aarestrup, F. M., Sørensen, A. H. and Baggesen, D. L. (2007). Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans, Denmark. *Emerg Infect Dis*, 13(4): 638–641.
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol*, 3(9): 700–710.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J. and West, E. A. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(8): 959–964.
- Strateva, T. and Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*, 58(9): 1133–48.
- Zhang, Q., Smith, J. C., Zhu, Q., Guo, Z. and MacDonald, N. E. (2012). A five-year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children hospitalized at a single center in southern China. *Int J Infect Dis*, 16(8): e628–e632.
- Zhong, Z., Helinski, D. and Toukdarian, A. (2005). Plasmid host-range: Restrictions to F replication in *Pseudomonas*. *Plasmid*, 54(1): 48–56.
- Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards, J. E., Gilbert, D., Scheld, M. and Bartlett, J. G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 42(5): 657–68.
- Taylor, D. E. (1999). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol*, 7(3): 111–115.

- Thomas, C. M. and Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3(9): 711–721.
- Trieu-Cuot, P., Derlot, E. and Courvalin, P. (1993). Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett*, 109(1): 19–23.
- Tsuji, S., Saraya, T., Tanaka, Y., Makino, H., Yonetani, S., Araki, K. and Goto, H. (2014). Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in previously healthy patients. *JMM Case Reports*, 1(2): e000281–e000281.
- Wardyn, S. E., Forshey, B. M., Farina, S. a., Kates, a. E., Nair, R., Quick, M. K. and Smith, T. C. (2015). Swine Farming Is a Risk Factor for Infection With and High Prevalence of Carriage of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 1–8.
- Wei, Q. and Ma, L. (2013). Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*, 14(10): 20983–21005.
- Velappan, N., Sblattero, D., Chasteen, L., Pavlik, P. and Bradbury, A. R. M. (2007). Plasmid incompatibility: More compatible than previously thought? *Prot Eng, Design, Select*, 20(7): 309–313.
- Winstanley, C., Langille, M. G. I., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F. and Levesque, R. C. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res*, 19(1): 12–23.
- Xiong, J., Alexander, D. C., Jennifer, H. M., Dérasp, M., Low, D. E., Jamieson, F. B. and Roy, P. H. (2013). Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase incp-2 plasmid encoding imp-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(8): 3775–3782.



## **Kasutatud veebiaadressid**

European Centre for Disease Prevention and Control. (2011) Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC.

[http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111\\_SUR\\_AMR\\_data.pdf.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.pdf.pdf) (12.05.15)

US Food and Drug Administration. (2013) Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals,

[www.fda.gov/downloads/ForIndustry/.../UCM440584.pdf](http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/.../UCM440584.pdf) (09.05.15)

US Food and Drug Administration. (2012) The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals,

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf> (10.05.15)

Ravimiamet. (2015) Antibiootikumide kasutamise statistika.

<https://sisu.ut.ee/sites/default/files/amr/files/2015ravimiamet.pdf> (13.05.15)

## **LISA 1. Täielik materjal ja meetodika**

Ei teostanud töö autor.

### **a) Isolaatide kogumine (ABRESIST)**

Proove isolaatide eraldamiseks koguti antibiootikumidele resistentsete bakterite leviku kindlaks tegemise projekti ABRESIST raames üheaegselt (2012–2014) inimestelt, loomadelt ja keskkonnast. Uuringugruppidesse kuulusid haiglaravil olevad patsiendid, terved vabatahtlikud (koeraomanikud, veterinaarid, farmide töötajad), farmi- ja lemmikloomad. Keskkonnaproove koguti kohtadest, mida peetakse olevat antibiootikumiresistentsuse leviku suhtes kõrgendatud riskiga, näiteks reoveepuhasti väljavooluga seotud veekogud; põllumullad, kus on väetamiseks kasutatud läga; põldude drenaažikraavid.

#### **Keskkonnaisolaadid**

Projekti ABRESIST raames koguti proove lägahoidlatest (4 farmi, 17 proovi, 7 isolaati), mullaproove põllult (14 proovi, 3 isolaati), veeproove põllukraavidest (10 kogumiskohta, 25 proovi, 5 isolaati), Tartu reoveepuhastusjaama väljavoolu suublast (3 proovi, 10 isolaati) ja Emajões (7 proovi, isolaate ei saadud). Kokku saadi 25 keskkonnast pärinevat isolaati.

#### **Veterinaarisolaadid**

Proove koguti veterinaarse ülevaatuse käigus keskkõrvapõletikuga koertelt ja udarapõletikuga lemadelt. Kokku koguti 62 isolaati. Isolaadid eraldati ja määrati veterinaarlaborites standardmeetodeid kasutades tavapärase diagnoosimise käigus.

#### **Haiglaisolaadid**

Haiglates kogutakse isolaate pidevalt. Neljast haiglast kogutud 147 isolaati määrati haiglates diagnoosimise käigus kliinilises praktikas kasutusel olevate standardmeetodite järgi. Lisaks haiglaisolaatidele koguti projekti ABRESIST raames isolaate tervetelt inimestelt, kes jagunesid kolme gruppi: inimesed, kellel puudus kontakt loomadega, inimesed, kes pidasid lemmiklooma ja veterinaarid. Esimeses grupis testiti 100 inimest ja saadi üks isolaat, veterinaaridelt ei saadud ühtegi isolaati (testiti 65 proovi) ja lemmikloomaomanikelt saadi neli isolaati (172 testitud inimest).

### **b) Teiste keskkonnaisolaatide saamine**

Veeproovid filtreeriti 10 või 100 ml kaupa (olenevalt tahke massi osakaalust) läbi 45 µm avaläbimõõduga filtri. Filtrid asetati CN agarile (Scharlau), millele oli lisatud selektiivsust

tõstvat lisandit (nalidiksiinhapet kontsentratsioonis 0,015 g/l, tsetrimiidi 0,2 g/l) ja glütserooli kontsentratsioonis 10 ml/l. Mulla- ja lägaproovide puhul lisati 10 g homogeniseeritud mulla- või vastavalt lägaproovi 0,9% NaCl lahusele ja loksutati 30 minutit toatemperatuuril. Seejärel tehti suspensioonist lahjendusrida kuni  $10^{-4}$  ja igast lahjendusest külvati 1 ml samale selekteerivale CN agarile. Tasse inkubeeriti 44 tundi 37 °C juures. Rohelised kolooniad külvati puhaskultuuride saamiseks uuesti samale selektiivsele söötmele. Punakaspruunidele potentsiaalsetele tüvedele tehti standardi järgi kinnitustestid. Ükski nendest *P. aeruginosaks* ei osutunud. Neli isolaati saadi *E. coli* eraldamiseks kasutatud ESBL söötmetelt (Oxoid Brilliance ESBL Agar).

### **c) Isolaatide tuvastamine 16S rRNA geeni järjestuste alusel**

Keskkonnaisolaatide lõplikuks määramiseks sekveneeriti nende 16S rRNA geen fragment. Puhaskultuurist eraldatud DNAST tehti kõigepealt 16S rRNA geeni PCR. PCR segu maht ühe reaktsiooni kohta oli 25 µl, millest 12,5 µl oli 2x PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1,5 µl BSA (*bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin) kontsentratsioonis 20 mg/ml (Thermo Scientific), 0,5 µl praimerid pcrI (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG) ja pcrII (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT TT), 9 µl nukleasivaba vett ja 1 µl lahjendatud DNA (keskmine kontsentratsioon 50 ng/µl). PCR programm koosnes järgmistest etappidest: 5 minutit 96 °C, seejärel 32 tsüklit 1 minut 94 °C, 1 minut 47 °C, 2 minutit 72 °C ja lõpuks 5 minutit 72 °C, mille järel viidi temperatuur 4 °C juurde. Enne sekveneerimist tehti PCR produktile Exo-AP töötlus, segu sisaldas ühe reaktsiooni kohta 0,05 µl eksonukleas I (20 ühikut/µl), 1 µl (1 ühik) FastAP temperatuuritundlikku aluselist fosfataasi (Thermo Scientific) ja 0,95 µl nukleasivaba vett (kogu ruumala 2 µl). Reaktsioon toimus 30 minuti jooksul 37 °C juures ja peatati temperatuuri tõstmisega 20 minutiks 80 °C juurde. Reaktsioonid viidi läbi 96 kaevulistes mikrotiiterplaatides kasutades PCR masinat (Eppendorf). Seejärel sekveneeriti 16S rRNA geen Sangeri meetodil. Geenijärjestused assembleeriti programmiga Geneious PRO 5.5.8 ja identifitseeriti NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) programmi alaprogrammiga blastn (*Standard Nucleotide BLAST*).

### **d) Antibiootikumiresistentsuse määramine e-testiga**

Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis määrati E-testidega (Epsilometer test <http://www.biomerieux-diagnostics.com/etest>) isolaatide tundlikkus kümne antibiootikumi suhtes: tseftasidiim, tsefepiim, meropeneem, piperatsilliin/tazobaktaam, amikatsiin, gentamütsiin, tsiprofloksatsiin, tobramütsiin, kolitsiin, imipeneem. Tulemusi hinnati vastavalt EUCAST juhendile (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific

resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 1.0 December 2013  
[http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/)).

**e) Puhaskultuuride genoomse DNA sekveneerimine ja assambleerimine**

*P. aeruginosa* isolaatide kogu genoomne DNA sekveneeriti nn *reversible dye-terminators* meetodiga (Illumina). Kõigepealt mõõdeti Qubit 2.0 fluoromeetriga (Invitrogen) ja TapeStation 2200 masinaga (Agilent Technologies) DNA kontsentratsioon. 1 ng DNAd kasutati Illumina Nextera XT kitiga (Illumina) sekveneerimisraamatukogu tegemiseks, mida seejärel kontrolliti qPCR põhise Kapa raamatukogu kvantifitseerimiskitiga (Kapa Biosystems). Raamatukogud sekveneeriti 96 kaupa ühel rajal HiSeq2500 masinaga (Illumina). Tulemused eraldati CASAVA 1.8.2 tarkvaraga (Illumina). Genoomid assambleeriti MIRA ja Spades genoomiassambleerimisprogrammidega.

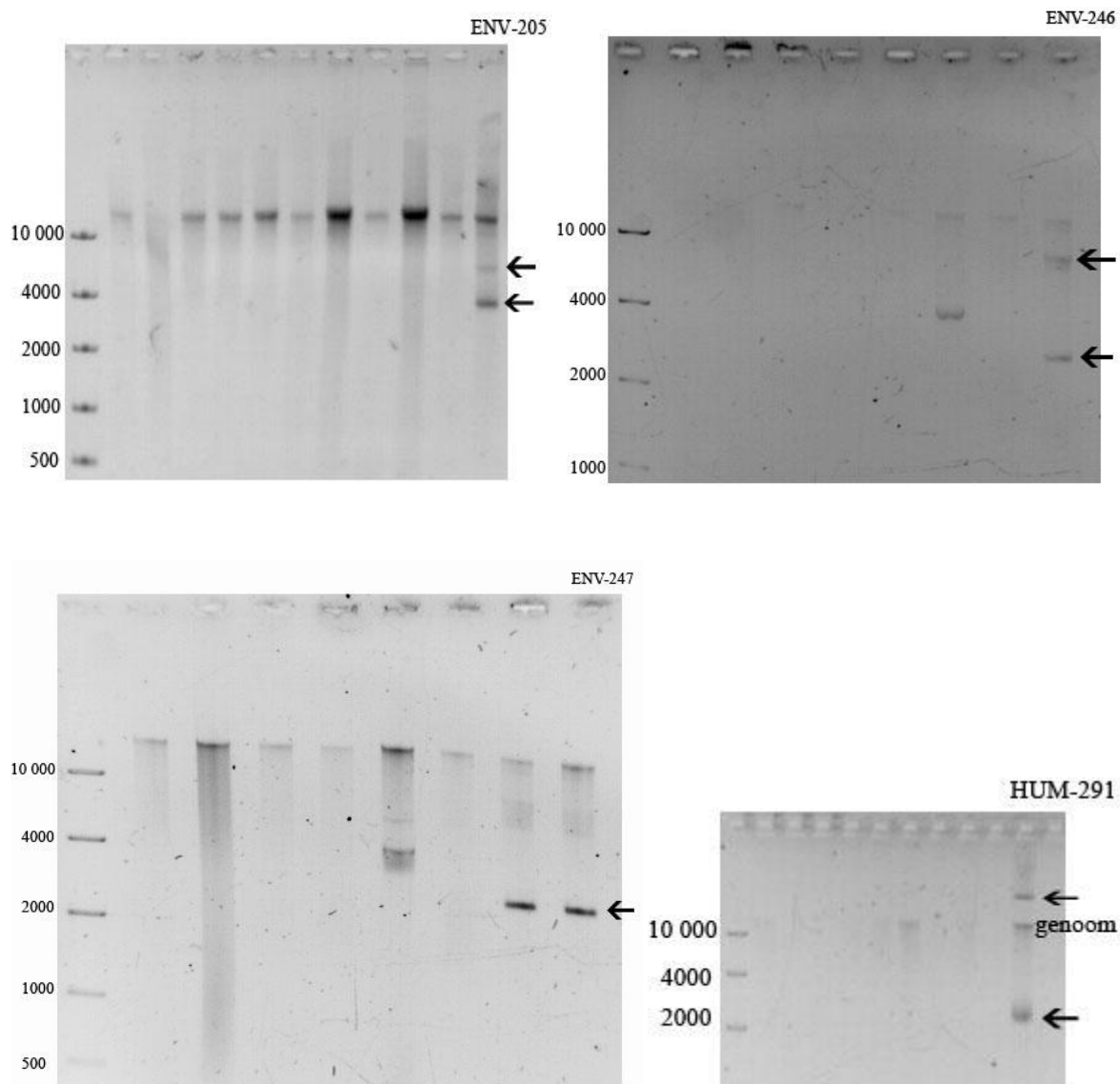
## LISA 2. E-testi tulemused (BLAST vaste andnud isolaadid)

HUM – haiglaisolaat, VET – veterinaarisolaat, ENV – keskkonnaisolaat, CAZ – tseftasidiim, FEP – tsefepiim, MEM – meropeneem, TZP – piperatsilliin/tasobaktaam, AMK – amikatsiin, GEN – gentamütsiin, CIP – tsiprofloksatsiin, TOB – tobramütsiin, CST – kolistiin, IPM – imipeneem, S – tundlik, R – resistentne, I – vahepealne, MR – multiresistentne

Isolaat	CAZ	FEP	MEM	TZP	AMK	GEN	CIP	TOB	CST	IPM	MR
HUM-232	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	JAH
HUM-237	S	R	S	R	I	S	R	S	S	S	JAH
HUM-291	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	JAH
HUM-298	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	EI
HUM-401	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	EI
VET-57	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
VET-58	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
ENV-204	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	EI
HUM-350	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	JAH
HUM-374	S		S	S	S	S	S	S	S	S	EI
HUM-398	R		R	R	R						JAH
VET-69	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
HUM-314-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
HUM-352	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	JAH
HUM-283	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	JAH
HUM-236	R	S	I	R	S	S	R	S	S	S	JAH
HUM-256	S	S		S	S	R	S	S	S	R	EI
HUM-295	S		S	S	S						EI
HUM-266	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	JAH
HUM-286	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	EI
HUM-305	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	EI
HUM-258	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	EI
HUM-276	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	EI
HUM-306	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	JAH
HUM-289	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	EI
HUM-300	S		S	R	S						JAH
HUM-231	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	JAH
HUM-310	R		S	R	S						JAH
HUM-322-1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	EI
HUM-254	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	JAH
HUM-272	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	JAH
VET-47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
VET-40	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
ENV-683	S		S	S	S	S	S	S	S	S	EI
VET-42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI
VET-122	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	EI

### LISA 3. Geelipildid

Nooltega on näidatud kõik isoleerimisel saadud plasmiidid.



## **TÄNUSÕNAD**

Töö autor soovib tänada oma juhendajaid Mailis Lahte ja Veljo Kisandit nõuannete ja toreda koostöö eest, samuti esialgset juhendajat Veiko Voolaidi laboritöö tutvustamise ja rohketele küsimustele vastamise eest. Lisaks tänan ka teisi laboritöötajaid, kes alati vajadusel aitasid ja läga haisu ära kannatasid.

## LIHTLITSENTS

Mina, Lagle-Marie Tamm (sünnikuupäev: 07.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „*Pseudomonas aeruginosa* kui antibiootikumiresistentsuse siirutaja erinevate keskkondade vahel“,

mille juhendajad on Mailis Laht ja Veljo Kisand

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25. mail 2015