

DISS. ETH NO. 19349

**CONSTRUCTION AND APPLICATION OF A NOVEL pRE25-DERIVED PLASMID TO
MONITOR HORIZONTAL TRANSFER OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES FROM
ENTEROCOCCUS FAECALIS TO FOOD AND GUT ASSOCIATED MICROBES IN A
COLONIC FERMENTATION MODEL**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MARTINA CLAUDIA HAUG

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born November 10, 1981
citizen of Aeugst am Albis, ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Leo Meile, examiner
Prof. Dr. Christophe Lacroix, co-examiner
Prof. Dr. Ingolf F. Nes, co-examiner

2010

SUMMARY

The worldwide emergence of antibiotic resistances (ABR) in bacteria poses a serious risk for public health. Horizontal gene transfer (HGT) of ABR determinants, mainly via mobile genetic elements such as plasmids and transposons, contributes for a large extent to the increasing prevalence of bacteria resistant to a single or to multiple antibiotics. The genus *Enterococcus* has an exceptional ability to acquire and transmit ABR genes and is considered to be a major player in the dissemination of ABR genes worldwide. What makes this genus even more suspicious is its emergence as a significant cause of nosocomial and community-acquired infections. However, enterococci belong to the normal gut microflora of humans and animals and are frequently encountered in food products. In this thesis, the hypothesis that an antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* strain can transmit its food-related ABR plasmid to *Listeria monocytogenes* and to commensal bacteria of the human gut microbiota in a continuous colonic fermentation system was investigated.

The gut ecosystem is continuously confronted with incoming bacteria from the environment, mainly via ingested food. Especially fermented food, e.g. cheese and sausages, can often harbor high concentrations of antibiotic resistant enterococci (ARE). The high tolerance of enterococci against adverse conditions enables ARE to survive the passage through the gastrointestinal tract. ARE reaching the large intestine might then transfer their resistance genes to members of the gut microbiota, thereby contributing to the spread of ABR genes.

The human gut microbiota, consisting of up to several hundred different species and 10^{14} bacterial cells, is assumed to serve as a reservoir of ABR genes. In Chapter 2, the prevalence of the tetracycline and erythromycin resistance genes *tet(M)* and *erm(B)* in infant fecal samples was determined using quantitative real-time PCR. Both genes were present at average log copy numbers of 7.12 and 6.58 per gram of feces, and even in infants younger than 2 weeks, both genes were detected at high numbers. This high background of ABR genes complicates monitoring of antibiotic gene transfer in the gut ecosystem.

Hence, a suitable ABR donor strain had to be evaluated. The dry sausage isolate *Enterococcus faecalis* SL5.7 was shown to encode the *tet(M)* gene on a 40-kb conjugative plasmid as well as in the chromosome (Chapter 2). The tetracycline resistance was transferable *in vitro* to *E. faecalis* JH2-2 at the high frequency of 7.04×10^{-3} transconjugants per donor cell. The nucleotide sequence of *tet(M)* and the flanking regions revealed 100% homology to Tn916-like elements in *Staphylococcus* and *Streptococcus* isolates.

The high homology of ABR genes in different genera as well as the high ABR gene background in infant feces thus requisite new molecular tools to enable monitoring the fate of a donor strain and the corresponding ABR determinant in complex environments, i.e. the human colonic microflora. The construction of such a tool is described in Chapter 3. The conjugative multiresistance plasmid pRE25 from the *E. faecalis* food isolate RE25 was used as model plasmid for this construction. Plasmid pRE25, previously transferred via filter mating to *Lactococcus lactis* Bu2-60 where it integrated in the chromosome, was genetically marked by the integration of *tet(M)* and two short random sequences. The marked plasmid, named pRE25*, was then transferred by filter mating to *E. faecalis* CG110/*gfp*, a strain genetically tagged in the chromosome with a *gfp* gene. The constructed strain, designated *E. faecalis* CG110/*gfp*/pRE25*, showed similar conjugation behavior as RE25 and, since both the chromosomal and the plasmid marker were stable for at least 200 generations, this strain is an applicable donor strain in horizontal ABR gene transfer experiments.

In Chapter 4 the HGT potential of pRE25* was assessed using a continuous intestinal fermentation model mimicking the infant proximal colonic ecosystem. In a first fermentation, the *E. faecalis* donor strain was co-immobilized with the human pathogen *Listeria monocytogenes* 10403S and feces from a healthy infant in gellan-xanthan beads. Plating of effluent samples during the 8 day fermentation revealed that plasmid pRE25* was transferred to *L. monocytogenes* in the presence of the competing microflora. Fermentation 2 was performed to investigate whether conjugal transfer of the multiresistance plasmid pRE25* occurs to commensal colonic bacteria. *E. faecalis* CG110/*gfp*/pRE25* was co-immobilized

SUMMARY

with feces from a healthy infant but without a defined recipient. To monitor the conjugational behavior of pRE25* during the 16-days fermentation, DNA was extracted from effluent daily. The *gfp* marker, only present in donor cells, and the marked plasmid pRE25* were quantified using real-time PCR during the fermentation and the ratio of pRE25* to the *gfp* gene was calculated to assess conjugal transfer of pRE25*. The pRE25*/*gfp* ratio increased 60% from day 1 to day 16, a clear indication for transfer of pRE25* to commensal fecal bacteria. Transconjugants were isolated on selective media and sequencing of the 16S rRNA genes revealed that pRE25* was transferred to the opportunistic pathogen *Enterococcus avium*. The results described in this thesis clearly confirm that horizontal ABR gene transfer from *E. faecalis* to *L. monocytogenes* and to commensal bacteria can occur in the presence of competing fecal microbiota in a colonic fermentation. Since this model mimics the dense and diverse microbial environment in the human gut, it can be assumed that gene transfer also takes place *in vivo*. Since fermented foods often contain a high load of antibiotic resistant bacteria, the food chain might play a crucial role in the dissemination of ABR genes and this clearly reinforces the requirements for starter- and protective cultures and probiotic products free from transferable ABR genes.

ZUSAMMENFASSUNG

Die weltweite Zunahme von Antibiotika-resistenten Bakterien stellt eine ernstzunehmende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar. Gene, welche für Antibiotikaresistenz (ABR) kodieren, sind häufig auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden und Transposons zu finden. Dies trägt massgeblich zur steigenden Verbreitung von Bakterien bei, welche einfach oder mehrfach gegen Antibiotika resistent sind. Der Genus *Enterococcus* besitzt besonders aussergewöhnliche Fähigkeiten, Resistenzgene aufzunehmen und auch weiterzugeben. Enterokokken werden deshalb als Hauptakteure in der Verbreitung von ABR-Genen verdächtigt. Was diesen Genus zusätzlich bedenklich macht, ist seine Bedeutung als Erreger von nosokomialen wie auch ambulant erworbenen Infektionen. Enterokokken gehören zur natürlichen Darmflora von Mensch und Tier. Der menschliche Darm wird stetig mit Bakterien aus der Umwelt, besonders aus der aufgenommenen Nahrung, konfrontiert. Antibiotika-resistente Enterokokken (ARE) sind sehr häufig in fermentierten Lebensmitteln wie Käse und Würsten zu finden. Die ausgeprägte Toleranz von Enterokokken gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen befähigt diese Bakterien, die Passage durch den Verdauungstrakt zu überleben. Wenn ARE in den Dickdarm gelangen, können sie möglicherweise ihre Resistenzgene an andere Darmbewohner weitergeben, womit sie massgeblich zur Verbreitung von ABR Genen beitragen würden.

In dieser Doktorarbeit wurde deshalb folgende Hypothese untersucht: Nahrungsmittel-assoziierte ARE können ihre ABR-Gene an Krankheitserreger oder natürlich vorkommende Bakterien der menschlichen Darmflora in einem kontinuierlichen Darmmodell weitergeben.

Es wird vermutet, dass die menschliche Darmflora, bestehend aus mehreren hundert verschiedenen Spezies und bis zu 10^{14} Bakterien, ein Reservoir für ABR-Gene darstellt. In Kapitel 2 dieser Dissertation wurde daher die Verbreitung des Tetrazyklin-Resistenzgens *tet(M)* und des Erythromycin-Resistenzgens *erm(B)* in Fäzesproben von Säuglingen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion (englisch: real-time PCR) bestimmt. Beide Gene wurden mit durchschnittlichen Log-Kopienzahlen von 7.12 und 6.58 pro Gramm Fäzes

gefunden. Selbst in Stuhlproben von Säuglingen, welche weniger als 2 Wochen alt waren, wurden beide Gene in hoher Konzentration detektiert. Diese hohe Prävalenz von ABR Genen erschwert daher die Untersuchung von horizontalem Gentransfer (HGT) im intestinalen Ökosystem.

Als möglicher Donor für HGT Experimente wurde *E. faecalis* SL5.7, ein aus einer Rohwurst isolierter Stamm, evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm das *tet(M)* Gen sowohl auf einem 40-kb grossen konjugativen Plasmid als auch integriert im Chromosom trägt. Die Resistenz gegen Tetrazyklin konnte *in vitro* auf *E. faecalis* JH2-2 mit einer hohen Frequenz von 7.04×10^{-3} Transkonjuganten pro Donor übertragen werden. Die Nukleotidsequenz des *tet(M)* Gens sowie der angrenzenden DNA-Regionen zeigte 100% Übereinstimmung mit Tn916-ähnlichen Elementen in Staphylokokken wie auch in Streptokokken. Die hohe Übereinstimmung von ABR Genen in verschiedenen Genera sowie die hohe Verbreitung von ABR Determinanten in Fäzesproben von Säuglingen verlangten deshalb neue molekulare Werkzeuge, welche das Verhalten eines ABR Donorstamms sowie des konjugativen Plasmids in der komplexen Darmflora ermöglichen. Die Konstruktion eines solchen Werkzeuges ist in Kapitel 3 beschrieben. Das konjugative Multiresistenz-Plasmid pRE25 aus dem Lebensmittelisolat *E. faecalis* RE25 wurde als Ausgangsplasmid für Konjugationsexperimente ausgewählt. Das Plasmid pRE25 wurde dafür durch das Einbringen des *tet(M)*-Gens sowie zwei kurzen DNA Fragmenten, welche eine Zufallssequenz aufweisen, genetisch markiert. Das markierte Plasmid mit dem Namen pRE25* wurde anschliessend durch Konjugation mittels "Filter-mating" in den Stamm *E. faecalis* CG110/*gfp* transferiert. Dieser Stamm ist genetisch durch ein chromosomal integriertes *gfp*-Gen markiert. Der neu konstruierte Stamm CG110/*gfp*/pRE25* zeigte ein dem Stamm RE25 vergleichbares Konjugationsverhalten. Zusätzlich waren sowohl der chromosomale Marker wie auch der Plasmidmarker über einen Zeitraum von 200 Generationen stabil. Daraus wurde gefolgert, dass der Stamm CG110/*gfp*/pRE25* ein geeigneter Donorstamm für Konjugationsversuche in komplexen Systemen ist.

In Kapitel 4 wird das HGT-Potenzial von pRE25* in einer kontinuierlichen Intestinalfermentation, welche den aufsteigenden Dickdarm eines Säuglings simuliert, untersucht. In einer ersten Fermentation wurde der *E. faecalis* Donorstamm mit einem humanpathogenen *Listeria monocytogenes* Stamm und der Fäkalflora eines gesunden Säuglings immobilisiert. Mittels Ausplattieren auf Selektivmedien während der 8-tägigen Fermentation konnte gezeigt werden, dass pRE25* trotz der konkurrierenden Fäkalflora auf *L. monocytogenes* übertragen worden ist. Das Ziel der zweiten Fermentation war es, konjugativen Transfer von pRE25* auf kommensale Darmbakterien zu untersuchen. Der Stamm CG110/*gfp*/pRE25* wurde mit Fäzes eines gesunden Säuglings immobilisiert. Um das Konjugationsverhalten des markierten Plasmids pRE25* während der 16-tägigen Fermentation zu überwachen, wurde täglich DNA aus den Fermenterproben extrahiert. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde sowohl das *gfp* Gen, welches nur im Donorstamm vorhanden ist, als auch das markierte Plasmid pRE25* quantifiziert. Der Verlauf des Verhältnisses von pRE25* zum *gfp*-Gen sollte folglich Aufschluss über den horizontalen Transfer von pRE25* geben. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis von pRE25* zu *gfp* zwischen Tag 1 und Tag 16 um 60% erhöht hat, was klar auf einen konjugativen Transfer von pRE25* auf Darmbakterien hinweist. Mittels Selektivmedien konnten Transkonjuganten isoliert werden, welche durch Sequenzierung der 16S rRNA Gene als *Enterococcus avium* identifiziert wurden.

Die in dieser Dissertation beschriebenen Resultate zeigen zum ersten Mal, dass horizontaler Transfer von ABR Genen von *E. faecalis* sowohl auf pathogene als auch auf kommensale Bakterien in Gegenwart einer kompetitiven Darmflora in einer Intestinalfermentation stattfinden kann. Da dieses Intestinalmodell das dichte und komplexe mikrobielle Ökosystem des Dickdarms simuliert, deuten diese Resultate darauf hin, dass ein solcher Gentransfer auch *in vivo* stattfinden kann. Die teilweise hohe Belastung von fermentierten Lebensmitteln mit Antibiotika-resistenten Bakterien lässt deshalb vermuten, dass die Nahrungskette eine bedeutende Rolle in der wachsenden Verbreitung von ABR Genen spielen könnte, was die

ZUSAMMENFASSUNG

Forderungen unterstreicht, dass Starter- und Schutzkulturen sowie probiotische Produkte frei von transferierbaren ABR Genen sein müssen.