



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017
30 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Identifikasjon av bredspektret β -laktam resistens (ESBL og Karbapenemaser) i bakterielle isolater fra miljøet ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser.

Identification of broad-spectrum β -lactam resistance (ESBL and Carbapenemases) in bacterial isolates from the environment by molecular biology and phylogenetic investigations.

Elahe Abbasi og Maria Simonsen
Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven ble utført som et avsluttende prosjekt ved mastergradsstudie i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Utførelsen av den praktiske delen av studien ble utført ved NMBU, Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM).

Først og fremst vil vi takke Professor Bjørn-Arne Lindstedt for god veiledning under masteroppgaven både med det praktiske arbeidet og tiden benyttet til databehandling av sekvenser. Vi ønsker å rette en stor takk til Overingeniør Ahmed Abdelghani for svært god hjelp og veiledning på laboratoriet. En ekstra takk gis til Postdoktor Davide Porcellato for all tid brukt til hjelp med databehandling av sekvenser, og Overingeniør Zhian Salehian som tok seg tid til å hjelpe oss med å optimalisere PCR-kjøringene. Til sist vil vi takke Stipendiat Misti Dawn Finton for hjelpen vi fikk til sekvensering.

Denne oppgaven markerer slutten på et flott studieløp og har vært både utfordrende og lærerik. Utfordrende fordi det har krevd mye arbeidsinnsats med prøving og feiling underveis, og i videre skriveprosess. Vi har hatt et stort læringsutbytte av oppgaven både med praktisk arbeid på laboratoriet og samarbeid underveis i skriveprosessen.

Ås, 11. mai 2017

Elahe Abbasi

Maria Simonsen

Sammendrag

Denne masteroppgaven er en del av prosjektet “Karakterisering av høynivå antibiotikaresistens mekanismer i matkjeden”. Prosjektet ble startet opp i 2016 og ble utført ved Norges-miljø og biovitenskapelige Universitet (NMBU), fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Formålet med oppgaven var å undersøke forekomst av kodende gener med β -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL), og karakterisere disse gjennom å undersøke jordprøver fra nærmiljøet. Ved å studere utbredelsen av ESBL-produserende bakterier og typer av ESBL-gener i jord vil man få en bedre forståelse av deres opprinnelse. Videre ble det undersøkt om det finnes likheter og ulikheter mellom genene funnet i jord, dyr og pasienter i Norge, og hvordan disse genene kan spre seg til dyr, mennesker og miljøet.

Da antibiotika først ble introdusert på 1950-tallet var ikke resistens et tema, men da penicillinet ble introdusert ble resistens oppdaget. Antibiotikaresistens utvikler seg i en enorm hastighet, i motsetning til utviklingen av nye antimikrobielle midler. Det er derfor desto viktigere at dagens midler brukes riktig og med omhu. Det er spesielt stor bekymring blant de gram-negative bakteriene som bærer karbapenemaser og ESBL.

I denne studien ble det samlet inn 19 jordprøver fra ulike områder ved NMBU, Campus i Ås. Fylogenetiske- og molekylære metoder ble benyttet for å påvise og bekrefte funn av resistens i prøvene. Dette inkluderer selektive skåler (Oxoid Brilliance, ESBL og skåler for Karbapenem resistente Enterobacteriaceae (Oxoid Brilliance CRE), multipleks-PCR, gelelektroforese, samt første-, andre- og tredje-generasjons sekvensering ved henholdsvis Sanger, Illumina Miseq og Oxford Nanopore MinION.

Resultatene viste tilstedeværelse av antibiotikaresistensgener i jordsmonn i Norge. Av totalt 17 rendyrkede prøver med vekst, ble tolv analysert i dette prosjektet. Det ble påvist resistensgener fra genfamiliene SHV, TEM og VIM ved multipleks-PCR og gelelektroforese. Tilstedeværelse av disse genene bekreftes ved tredje-generasjons sekvensering, men denne metoden oppdaget også resistensgener fra andre genfamilier som CTX-M, OXA og GES. Ved første-generasjons sekvensering ble det påvist bakterier som er typisk å finne i jord: *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Achromobacter* spp., og *Ochromobacter* spp.

Funnene er oppsiktsvekkende da Norge ikke har blitt vurdert som et potensielt reservoar for antibiotikaresistens. Dette gjelder spesielt med tanke på at flere av genfamiliene tilhører gruppen ESBL_{KARBA}, som er resistens mot de fleste typer tilgjengelige antimikrobielle midler. Påvisning av resistens fra miljøet kan tilsi at det er en fare for smitte med resistente

bakterier i Norge, og at risikoen ikke kun er knyttet til ferie eller innleggelse på utenlandske sykehus.

Abstract

The Master Thesis is part of the project "Characterization of high-level antibiotic resistance mechanisms in the food chain". The project was initiated in 2016 and was carried out at the Norwegian Environment and Life Sciences University (NMBU), the Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science (KBM). The purpose of this research has been to examine and characterize for possible occurrence of ESBL coding genes in soil samples collected in the local community. By examining the prevalence of ESBL-producing bacteria and types of ESBL genes in soil, it will be possible to get a better understanding of their origins. Furthermore, it was examined for similarities and dissimilarities in the genes found in soil, animals and patients in Norway, and how these genes can spread to other animals, humans, or to the environment.

When antibiotics were first introduced in the 1950s, researchers were not aware of resistance. However, shortly after the introduction of the penicillin, resistance was detected. Antibiotic resistance is currently rapidly increasing, at a speed not matching with development of new antimicrobial medicine. It is therefore even more important that antibiotics we have today are used appropriately and with care. It is of especial concern among the gram-negative bacteria, which carry carbapenamases and extended-beta β -lactamases (ESBL).

In this research, 19 soil samples were collected from different areas at NMBU Campus in Ås. Phylogenetic and molecular methods were used to detect and confirm findings of resistance in the samples. This includes selective media (Oxoid Brilliance, ESBL and carbapenem-resistant-*Enterobacteriaceae* (CRE)), multiplex PCR, gel electrophoresis, and first, second and third generation sequencing with Sanger, Illumina Miseq and Oxford Nanopore Technologies MinION.

The research results indicate that antibiotic-resistant genes are present in Norwegian soil. Out of 17 cultivated samples with growth on selective media, twelve were analyzed. Resistance genes from the gene families SHV, TEM and VIM were detected by multiplex PCR and gel electrophoresis. This was confirmed by third generation sequencing, but this method also detected resistance genes from other gene families such as CTX-M, OXA and GES. At the first generation sequencing, bacteria that are typically found in soil were detected: *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Achromobacter* spp., and *Ochromobacter* spp.

The research findings are striking, as Norway never have been considered as a potential reservoir for antibiotic resistance before. This is especially true considering that several of the genetic families belong to the ESBL_{KARBA} group, which is resistant to most types of antimicrobials available. Detection of resistance from the local environment can indicate that there is a risk of infection with resistant bacteria in Norway. This demonstrates that the risk is not only linked to going on vacation or admission to foreign hospitals.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	IV
1.0 INNLEDNING	1
2.0 TEORI	3
2.1 ANTIBIOTIKARESISTENS	3
2.1.1 Resistens hos dyr	4
2.1.2 Resistens i mat	4
2.1.3 Resistens i naturlig miljø	5
2.1.4 Resistens i humanpopulasjonen	5
2.2 RESISTENSENZYMER	6
2.2.1 β -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL)	6
2.2.2 Karbapenemaser	7
2.2.3 Påviste resistensenzymmer fra kliniske isolater og dyr i Norge	9
2.3 BAKTERIESTAMMER FUNNET I JORDPRØVER	11
2.3.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	11
2.3.2 <i>Bordetella</i> spp.	12
2.3.3 <i>Achromobacter</i> spp.	13
2.3.4 <i>Ochrobactrum</i> spp.	14
2.4 ANTIMIKROBIELLE MIDLERS VIRKEMÅTER	15
2.4.1 Inhibering av celleveggsyntese	15
2.4.2 Inhibering av proteinsyntese	16
2.4.3 Inhibering av nukleinsyresyntese	16
2.5 SPREDNING AV ANTIBIOTIKARESISTENS	17
2.5.1 Spredning av resistens hos dyr	17
2.5.2 Spredning av resistens i mat	17
2.5.3 Spredning av resistens i naturlig miljø	18
2.6 MEKANISMER FOR ANTIBIOTIKARESISTENS	20
2.6.1 Inaktivering av det antimikrobielle midler	20
2.6.2 Efflukspumpe	20
2.6.3 Modifisering av målsetet	21
2.7 MEKANISMER FOR OVERFØRING AV ANTIBIOTIKARESISTENS	21
2.7.1 Overføring av antibiotikaresistens via konjugasjon	21
2.7.2 Overføring av antibiotikaresistens via transformasjon	22
2.7.3 Overføring av antibiotikaresistens via transduksjon	22
2.8 MOBILE GENETISKE ELEMENTER (MGE)	22
2.8.1 Plasmider	22
2.8.2 Transposoner	23
2.8.3 Integroner	24
2.9 TILTAK MOT RESISTENSUTVIKLING	24
2.9.1 Generelle nasjonale tiltak	24
2.9.2 Generelle globale tiltak	25
3.0 METODISK TEORI	27
3.1 SELEKTIVE SKÅLER FOR ESBL OG KARBAPENEMASE	27
3.2 DNA-ISOLERING OG EKSTRAHERING MED GENÉLUTE™ SOIL DNA ISOLATION KIT	29

3.3	KVANTIFISERING AV DNA	29
3.4	POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	30
3.4.1	Denaturering (denaturation)	30
3.4.2	Hybridisering (primer annealing)	30
3.4.3	Polymerisering (extension)	31
3.5	GELELEKTROFORESE	32
3.5.1	Agarosegel	33
3.5.2	Tris Acetate-EDTA buffer (TAE-buffer)	33
3.5.3	Gel-loading buffer	34
3.6	MÅLRETTET SEKVENSERING	34
3.6.1	Første-generasjons sekvensering	34
3.6.2	Andre-generasjons sekvensering	35
3.7	TREDJE-GENERASJONS SEKVENSERING	36
4.0	MATERIALER OG METODER	37
4.1	FORBEREDELSE	37
4.2	FORBEREDELSE AV RENDYRKEDE PRØVER TIL PCR OG SEKVENSERING	37
4.3	FORBEREDELSE AV RENSEDE JORDPRØVER TIL PCR OG SEKVENSERING	41
4.3.1	DNA-isolering og ekstrahering	43
4.3.2	DNA-isolering og ekstrahering med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit	43
4.4	PÅVISNING AV ANTIBIOTIKARESISTENSGENER MED POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	45
4.5	GELELEKTROFORESE	48
4.5.1	Tillaging av TAE-buffer (Tris acid EDTA)	48
4.5.2	Tillaging av agarosegel 1,5 %	48
4.6	FORBEREDELSE OG 16S ANDRE-GENERASJONS SEKVENSERING	49
4.6.1	Nanodrop	49
4.6.2	Qubit	49
4.6.3	16S andre-generasjons sekvensering	49
4.7	FORBEREDELSE OG 16S FØRSTE-GENERASJONS SEKVENSERING	51
4.7.1	Påvisning av 16S-gen ved bruk av Polymerase Chain Reaction (PCR)	51
4.8	FORBEREDELSE OG HELGENOM TREDJE-GENERASJONS SEKVENSERING	54
4.9	DATANALYSER	54
4.9.1	16S andre-generasjons sekvensering	54
4.9.2	16S første-generasjons sekvensering	54
4.9.3	Helgenom tredje-generasjons sekvensering	54
4.10	PRØVEOVERSIKT	55
5.0	RESULTATER	57
5.1	PÅVISNING AV ANTIBIOTIKARESISTENS PÅ SELEKTIVE SKÅLER	57
5.2	PÅVISNING AV ANTIBIOTIKARESISTENSGENER AV RENDYRKEDE PRØVER VED PCR OG GELELEKTROFORESE	62
5.3	PÅVISNING AV BAKTERIEIDENTITET AV RENDYRKEDE PRØVER VED 16S FØRSTE-GENERASJONS SEKVENSERING	67
5.4	PÅVISNING AV BAKTERIEIDENTITET OG RESISTENSGENER I RENDYRKEDE PRØVER VED HELGENOM TREDJE-GENERASJONS SEKVENSERING	68
5.5	PÅVISNING AV MIKROBIOTA I RENSEDE PRØVER VED 16S ANDRE-GENERASJONS SEKVENSERING	70
6.0	DISKUSJON	75
6.1	ANTIBIOTIKARESISTENS VED BRUK AV SELEKTIVE SKÅLER	75
6.2	ANTIBIOTIKARESISTENSGENER VED BRUK AV PCR OG GELELEKTROFORESE	76
6.3	SAMMENHENG AV METODER FOR BAKTERIEIDENTITET	79
6.4	PÅVISNING AV MIKROBIOTA	80
6.5	PCR-BETINGELSER	82
6.6	BETINGELSER VED PÅVISNING AV 16S-GEN	82
7.0	KONKLUSJON	83

8.0 VIDERE ARBEID.....	84
-------------------------------	-----------

REFERANSER

VEDLEGG

<i>Vedlegg 1</i>	<i>i</i>
<i>Vedlegg 2</i>	<i>iii</i>
<i>Vedlegg 3</i>	<i>v</i>
<i>Vedlegg 4</i>	<i>vii</i>

1.0 Innledning

Antibiotikaresistens er et økende problem nasjonalt og internasjonalt, og utgjør en alvorlig trussel mot global helse (Regjeringen 2013, Norsk landbrukssamvirke 2016). Antibiotikaresistens er et naturlig fenomen som enten er forårsaket av mutasjoner i bakteriegener eller spredning av resistensgener ved horisontal genoverføring (ECDC 2015). Den viktigste årsaken til antibiotikaresistens er overforbruk av antimikrobielle midler. Sannsynligheten for utvikling av antibiotikaresistens øker med økt bruk av antibiotika og verdens helseorganisasjon har karakterisert dette som den største helsetrusselen vi står overfor i dag, da problemet er økende og alvorlig over hele verden (FN 2016).

En annen viktig årsak er spredningen av antibiotikaresistente bakterier mellom mennesker, dyr og mennesker, samt dyr og miljø. Bakterier kan utvikle flere resistensmekanismer mot antimikrobielle midler (multiresistens) (ECDC 2015). Det finnes allerede i dag bakterier som har utviklet resistens mot all antibiotika (Norsk landbrukssamvirke 2016). Dette resulterer i at vi risikerer en fremtid uten effektive antibiotika, der infeksjoner som i dag regnes som ufarlige kan få dødelige utfall (Regjeringen 2015). Analyser fra European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) anslo i 2009 at infeksjoner forårsaket av resistente bakterier er ansvarlig for 25 000 dødsfall årlig i Europa, og med den enorme økningen vi har av resistente bakterier, er tallet mest sannsynlig betydelig høyere i dag (Regjeringen 2013).

Det finnes flere måter bakterier kan bli resistente på. En av disse er β -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL). ESBL-holdige bakterier kan inaktivere flere av de viktigste antibiotikatyperne vi har i dag. ESBL produseres i hovedsak av gram-negative tarmbakterier, men kan også produseres av gram-positive bakterier. I Norge er ESBL-holdige bakterier delt inn i tre grupper: ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA}. Resistensegenskapene hos ESBL_{KARBA}-holdige bakterier gjør bakteriene svært resistente (Folkehelseinstituttet 2017 b), og det er en dramatisk økning i forekomsten av ESBL-holdige bakterier både internasjonalt og i Norge (Folkehelseinstituttet 2017a).

Antibiotikaresistens finnes i alle økologiske nisjer hvor det finnes bakterier. Et naturlig miljø består av flere ulike bakteriesamfunn i for eksempel ferskvann, sjø, sedimenter og jord, som per dags dato kun er delvis undersøkt (Bruseti 2008). Det er manglende

kunnskap om hvordan og i hvilken grad bakterier i naturlige miljøer bidrar til resistensutvikling. Bakterier i disse miljøene er ofte ikke dyrkbare, men karakteriseres via metagenom-analyser som viser at det finnes resistens i naturlige miljøer (Regjeringen 2013). Tidligere ble det antatt at spredning av resistens hovedsakelig skjer fra menneskeskapte til naturlige miljøer, og at lavere grad av denne type eksponering ga en lavere forekomst av resistens. Nyere forskning har indikert at naturlige miljøer kan være kilde til spredning av resistens til kliniske miljøer (Brusetti 2008, Regjeringen 2013). Beskrivelsen av antibiotikaresistens i det ikke-kliniske miljøet har tradisjonelt blitt begrenset til miljøet som er viktig for folkehelsen, slik som husdyr, fiskeanlegg, kloakk, drikkevann, forurensede elver og mat (Brusetti 2008).

Formålet med oppgaven var å undersøke forekomst av kodende gener med β -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL) og karakterisere disse gjennom å undersøke jordprøver fra nærmiljøet. Ved å studere utbredelsen av ESBL-produserende bakterier og typer av ESBL-gener i jord vil vi få et større innblikk i deres opprinnelse. Videre har det blitt undersøkt om det finnes likheter og ulikheter mellom genene funnet i jord og genene funnet hos dyr og pasienter i Norge, og hvordan disse genene kan spre seg til dyr, mennesker og miljø.

For å undersøke dette ble det benyttet en kombinasjon av fylogenetiske- og molekylære metoder; jordprøvene ble oppdyrket, rendyrket på agar og rensset for deretter å bli undersøkt for resistensgener ved multipleks-PCR og gelelektroforese. Det ble i tillegg gjort en 16S andre-generasjons sekvensering av mikrobiota i rensede prøver, og en 16S første-generasjons sekvensering av rendyrkede prøver, som ble bekreftet av en tredje-generasjons helgenom-sekvensering. Resultatene vil være svært interessante for videre arbeid med prosjektet i sin helhet.

2.0 Teori

2.1 Antibiotikaresistens

Da antibiotika først ble introdusert på 1950-tallet for behandling av vanlige mikrobielle infeksjoner var resistensutviklingen lite omdiskutert. Det var lite trolig at bakterier i naturen kunne utveksle genetisk informasjon (Davies 1994). Dette var en bekreftelse på manglende kunnskap, forståelse og erfaring for mikroorganismenes evne til å tilpasse seg vår bruk av antibiotika (Helsedirektoratet 2013).

Kun få år etter at penicillinet ble introdusert, ble resistens oppdaget. Mirakelmedisinen hadde allerede blitt ineffektiv mot behandling av bakterielle infeksjoner (Guilfoile 2007), og det finnes allerede bakterier som har utviklet resistens mot all antibiotika vi har i dag (Norsk landbrukssamvirke 2016). En klinisk definisjon av antibiotikaresistens er *“å anse en bakteriestamme som resistent når den tolererer en antibiotikakonsentrasjon som er høyere enn det som er oppnåelig på injeksjonsstedet og med stor risiko for terapiviki”* (Helsedirektoratet 2013).

Det skilles mellom naturlig og ervervet resistens mot et antimikrobielt middel. Naturlig resistens er ofte knyttet til gener i bakteriens kromosom og kan skyldes at bakteriene har iboende gener som koder for bestemte resistensmekanismer, eller at bakterien har mangel på metabolske prosesser og strukturer som middelet er rettet mot (Helsedirektoratet 2013). Naturlig resistens spres ikke videre til andre bakterier og påvirker ikke antibiotikaforbruket slik som ervervet resistens (Norsk landbrukssamvirke 2016). Andre bakterier kan utvikle en resistens som de i utgangspunktet ikke har, kalt ervervet resistens. Denne typen resistens er forbeholdt genetiske forandringer som kan oppstå ved tilførsel av nytt DNA eller ved mutasjoner (Helsedirektoratet 2013).

Resultatet av den raske utviklingen av antibiotikaresistente bakterier de senere årene, er at en stadig er på jakt etter å utvikle nye antimikrobielle midler. De siste årene har derimot utviklingen av nye typer antibiotika stagnert (Guilfoile 2007), det er derfor ingen selvfølge at nye typer antibiotika kommer på markedet de nærmeste årene. Det er dermed viktig å bruke de midlene vi har riktig og med omhu (Helsedirektoratet 2013). Bax og Griffin (2012) har undersøkt nasjonale data fra USA som viser at multiresistente, sykdomsfremkallende bakterier har økt og spredd seg i en urovekkende hastighet de siste tiårene. Det er spesielt blant de gram-negative bakteriene som bærer karbapenemaser og β -laktamaser med utvidet

spektrum (ESBL) hvor bekymringen er stor. Dette er fordi det er veldig få antibiotika som er effektive mot bakterier som er multiresistente.

2.1.1 Resistens hos dyr

Rapportering fra NORM-VET (2015) sier at Norge er i en unik situasjon med tanke på resistens i mat og hos norske produksjonsdyr sammenlignet med situasjonen i andre land. Fjørfeproduksjonen er et unntak hvor det har blitt påvist høy forekomst av ESBL-produserende *E.coli* og kinolonresistente *E.coli* (Regjeringen 2013). I enkelte land blir antibiotika brukt som vekstfremmere til friske dyr, noe som er forbudt i Norge og EU. Vekstfremmere bidrar til en bekymringsfull høy antibiotikabruk i landbruket på verdensbasis. Forekomsten av Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) og ESBL må være på lavest mulig nivå for å redusere risikoen forbundet med antibiotikaresistens (Norsk Landbrukssamvirke 2016). Norge sitt klima og geografiske plassering i utkanten av Europa, omgitt av hav og land med relativt lav forekomst av resistens, er viktige faktorer for den gunstige situasjonen hos produksjonsdyr i Norge. I tillegg har vi en relativt liten befolkning sammenlignet med andre land, fravær av smittestoffer, samt begrenset husdyrproduksjon spredd over et stort geografisk område (Regjeringen 2013).

2.1.2 Resistens i mat

Resistente bakterier i matproduksjon er et globalt problem, og forekomsten varierer mye fra land til land. Forskjellene i antibiotikabruk i produksjonsdyr er store, og kunnskap om forekomst av resistente bakterier i norske matvarer er begrenset (Regjeringen 2013). Det viktigste reservoaret for ESBL og AmpC- produserende *Enterobacteriaceae* og kinolonresistente *E.coli* er fjørfe og fjørfeprodukter, sammenlignet med andre animalske produkter. Matlagning og kommersiell foredling kan redusere muligheten for overføring av bakterier i matkjeden til menneske. Bearbeiding av mat, som for eksempel varmebehandling og konserveringsmetoder reduserer antall bakterier i maten og kan begrense denne sannsynligheten. Vitenskapskomiteen for mattrygghet vurderer at det er liten sannsynlighet for at mennesker eksponeres for antimikrobiell resistens fra melkeprodukter, grønnsaker, frukt og bær, storfe- og storfekjøtt, fisk- og sjømatprodukter og drikkevann produsert i Norge (VKM 2015). I tillegg gir global matvarehandel grunnlag for spredning av resistens, og da

særlig ved import av matvarer fra land med høy forekomst av antibiotikaresistens (Regjeringen 2013).

2.1.3 Resistens i naturlig miljø

Antibiotikaresistens finnes i alle økologiske nisjer hvor det finnes bakterier. Bakteriepopulasjoner i naturlige miljøer vil eksponeres for bakterier og DNA fra det menneskeskapte miljøet, og dette gir mulighet for overføring av gener. Et naturlig miljø består av flere ulike bakteriesamfunn i for eksempel ferskvann, sjø, sedimenter og jord (Brusetti et al. 2008). Karakterisering av slike bakteriepopulasjoner med metagenom-analyser viser at det finnes resistens i ulike naturlige miljøer (Regjeringen 2013).

Jordsmonnet består av store deler organisk materiale, dette vil si alt det levende og døde materialet i jorden som omfatter mikroorganismer og planterester. Jordsmonn er en verdifull ressurs til jordens fruktbarhet, og ifølge FNs organisasjon for mat og landbruk kommer 95 % av verdens mat fra jorda (Matmerk 2015).

Studier av jordsmonn som reservoar kan gi en tidlig varslings for fremtidige klinisk relevante resistensmekanismer. De fleste kliniske relevante antibiotika kommer fra jordbakterien *Actinomyces*. Tilstedeværelsen av antibiotika i miljøet har fremmet ervervet resistens i fravær av den naturlige antibiotikaproduksjonen. Jordsmonn kan fungere som et ukjent reservoar for resistens som allerede har oppstått, eller har potensiale for å oppstå i klinisk viktige bakterier (D'Costa et al. 2006).

2.1.4 Resistens i humanpopulasjonen

Infeksjoner som tidligere lett kunne behandles med antibiotika, har i dag blitt svært vanskelig å behandle (Bax og Griffin 2012, EFSA 2016). Dette har resultert i at et stort antall mennesker lider av, eller i verste fall er døende av, disse typer infeksjoner. I 2012 antok Center for Disease Control and Prevention at nesten to millioner mennesker i USA ville bli smittet av bakterielle infeksjoner under sykehusopphold, og at 90 000 av disse sannsynligvis ville dø. Av bakteriene som forårsaker disse infeksjonene vil over 70 % være resistente mot minst en av medisinene som brukes som behandling (Bax og Griffin 2012). På sykehus i EU, Norge og Island vil 5-12 % få en infeksjon i løpet av sykehusoppholdet, og i gjennomsnitt vil

25 000 mennesker dør hvert år på grunn av antibiotikaresistente bakterier (FN 2016; WHO u.å.).

2.2 Resistensenzymmer

2.2.1 β -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL)

ESBL er en forkortelse for β -laktamaser med utvidet spektrum og er en resistensmekanisme som inaktiverer flere av de viktigste antibiotikatyper som brukes til behandling mot infeksjoner (Folkehelseinstituttet 2015). Siden første gang ESBL ble identifisert på 1980-tallet, har det resultert i utvidet antibiotikaresistens. β -laktamaser er en av de mest heterogene gruppene av resistensenzymmer (Perez et al. 2007). Denne resistensmekanismen produseres oftest av bakterier i familien *Enterobacteriaceae* som *E. coli* og *Klebsiella*, og er for det meste plasmid-medierte enzymer. Vekst av bakterier med denne type resistensmekanisme har økt kraftig i løpet av de siste årene, og blir ansett som en svært alvorlig patogen på verdensbasis (Salam & Haque 2010; Chaudhary & Aggarwal 2004).

Enzymene har evne til å hydrolysere og inaktivere et bredt spekter av betalaktamaser, samt ulike typer penicillin (Chaudhary og Aggarwal 2004; Perez et al. 2007). Enzymene ble tidligere dannet som et resultat av mutasjoner av både TEM og SHV. Dette er ulike β -laktamase-enzymmer som finnes i familien *Enterobacteriaceae*, og som kan danne et høyt nivå av resistens mot penicillin (Chaudhary og Aggarwal 2004). I senere tid har man oppdaget at CTX-M-enzymmer er de ESBL som begynner å bli mest utbredt i kliniske isolater, men det er *K. pneumoniae* karpabenamaser (KPC) som utgjør den største risikoen. KPC er et ESBL-lignende enzym som gir resistens til cefalosporiner med utvidet spektrum og karpabenamaser (Perez m. fl. 2007).

2.2.1.1 Klassifisering og ulike ESBL-gener

Det er foreløpig ikke enighet internasjonalt om betegnelsene rundt ESBL, men i Norge deles ESBL-holdige bakterier inn i tre grupper: ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA}. De to førstnevnte gruppene er resistente mot penicilliner og andre cefalosporiner, men ikke karpabenemer. ESBL_{KARBA}-holdige bakterier derimot, er resistente mot alle β -laktam antibiotika, inkludert penicilliner, cefalosporiner og karpabenemer (Folkehelseinstituttet 2017b). I den første gruppen, ESBL_A, finner man de oftest funnet CTX-M-, SHV- og TEM-

genene. Disse er horisontalt overførbare og degraderes av klauvulansyre. I ESBL_M finnes diverse ESBL hvor ervervet AmpC representerer den vanligste typen. I ESBL_{KARBA} er det enzymer med karbapenemaseresistens, som for eksempel metallo- β -laktamer og KPC (Brolund 2014).

TEM-1 er det mest forekommende β -laktamase-genet i gram-negative bakterier. Opptil 90 % av all ampicillinresistens i *E. coli* er forårsaket av produksjon av TEM-1. TEM-1 har evne til å hydrolysere penicilliner og cefalosporiner (Bradford 2001). Siden første gang TEM ble oppdaget har det blitt påvist mer enn 150 typer TEM-gener (Brusetti et al. 2008). Noen av disse er inhibitor-resistente enzymer, men flesteparten er β -laktamaser med utvidet spektrum (Bradford 2001).

SHV-1 er det β -laktamase-genet som oftest påvises i *K. pneumoniae*. I flere av *K. pneumoniae* artene er SHV-1 eller lignende gener integrert i bakteriekromosomet. I motsetning til TEM-genet finnes det ikke like mange varianter av SHV (Bradford 2001). SHV er resistent mot penicillin som ampicillin, tigecycline og piperacilling og det antas at SHV-1- β -laktamase er ansvarlig for opp til 20 % av plasmid-mediert ampicillinresistens i *K. pneumoniae* arter (Shaikh et al. 2015).

GES ble først oppdaget i et *K. pneumoniae* isolat fra en nyfødt innlagt på sykehus. Genene i denne familien kan hydrolysere penicilliner og cefalosporiner med utvidet spektrum, men ikke karbapenemer. GES-genene blir i tillegg inhibert av β -laktam inhibitorer (Shaikh 2015).

På 1980- og 1990-tallet ble ESBL hovedsakelig funnet hos *Klebsiella*-arter hos sykehuspasienter, men de siste årene er de også funnet hos *E. coli*. Det er i større grad gram-negative tarmbakterier enn gram-positive bakterier som kan produsere ESBL, og ESBL er funnet i *Salmonella*, *Proteus mirabilis* og *Pseudomonas aeruginosa*, samt andre *Enterobacteriaceae*. I Norge ble ESBL-produserende *E. coli* påvist i 1997, og det første utbruddet i norske sykehus ble rapportert i 2004 (Folkehelseinstituttet 2017b).

2.2.2 Karbapenemaser

Karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* er en viktig og økende trussel mot den globale helsen. Både spredning ved kolonisering og plasmid-mediert overføring bidrar til den stadige økningen i forekomsten av slike bakterier (Duin & Doi 2017).

Karbapenemaser er den mest allsidige familien av β -laktamaser. Til tross for at den er kjent som "karbapenemase", kan den gjenkjenne nesten alle hydrolyserbare β -laktamaser, og

de fleste er motstandsdyktige mot β -laktamase-inhibitorer (Queenan & Bush 2007). Den første karbapenemaseprodusenten i *Enterobacteriaceae* (NmCA) ble identifisert i 1993, og siden den gang har en stor gruppe av Karbapenemaser blitt identifisert. De deles inn i fire klasser av β -laktamaser, og karbapenemasene som gir resistens mot karbapenemer finnes i tre av disse: klasse A, B og D (Nordmann et al. 2011).

I klasse A Karbapenemaser finnes Karbapenemaser som både er kromosomkodet og plasmidkodet, men alle Karbapenemaser som tilhører klasse A kan effektivt hydrolysere karbapenemer og blir delvis inhibert av klauvulansyre. KPC er det enzymet som mest hyppig oppstår klinisk blant klasse A (Nordmann et al. 2011).

I 1996 ble den første KPC-produsenten, KPC-2 i *K. pneumoniae*, identifisert i USA. Innen få år hadde KPC-produsentene spredt seg globalt til blant annet Puerto Rico, Colombia, Israel samt flere land i Europa og Sør-Amerika. De fleste KPC det er rapportert om har oppstått på sykehus, og stammer for det meste fra *K. pneumoniae*, og i noen få tilfeller også fra *E. coli* (Nordmann et al. 2011).

Klasse B metallo- β -laktamaser (MBL) består for det meste av Verona integronkodede metallo- β -laktamaser (VIM) eller varianter av IMP. Nylig har det blitt oppdaget flere tilfeller av New Delhi metallo- β -laktamaser (NDM-1), og siden midten av august 2010 har NDM-1-produserende bakterier blitt identifisert på alle kontinenter med unntak av Sentral- og Sør-Amerika. Nylige funn anslår at Balkanlandene og Midtøsten er et sekundært reservoar for NDM-1-produserende bakterier. Disse enzymene hydrolyserer alle β -laktamer, med unntak av aztreonam, og de inhiberes av EDTA. Den første MBL som ble rapportert var IMP-1 i *Serratia marcescens* i Japan i 1991 og siden 1991 har MBL blitt oppdaget på verdensbasis. Endemiske forhold tilknyttet VIM- og IMP-enzymene har blitt rapportert i både Hellas, Taiwan og Japan. Utbrudd og enkelttilfeller har derimot oppstått i mange flere land. De fleste MBL-produsenter finnes i sykehusmiljø og er multiresistente *K. pneumoniae* (Nordmann et al. 2011).

I klasse D er OXA-48 det mest kjente enzymet som kan hydrolysere karbapenemer, og den ble først identifisert i Tyrkia i 2003 fra en stamme av *K. pneumoniae*. OXA-48 har siden den gang stadig blitt rapportert som en kilde til sykehusutbrudd i Tyrkia. I dag finnes disse enzymene i flere europeiske land, i sør- og østlige deler av Middelhavet, samt i Afrika. Et lignende enzym, OXA-181, har blitt identifisert i stammer fra India. Overføring av innlagte sykehuspasienter fra sykdoms-endemiske områder har resultert i sykehusutbrudd der bakterier som kan produsere OXA-48 i økende grad er blitt identifisert. Dette gjelder blant annet i Frankrike, Tyskland, Spania, Storbritannia og Nederland. Både OXA-48 og OXA-181 kan

svakt hydrolysere karbapenemer og cefalosporiner. De blir derimot verken inhibert av EDTA eller klauvulansyre. Genfamilien OXA er blitt rapportert fra flere enterobakterielle arter, men OXA-48 produseres for det meste av *K. pneumoniae* og *E. coli*. Utbredelsen til OXA-48 er trolig undervurdert, da den er en av Karbapenemasene som er vanskeligst å identifisere (Nordmann et al. 2011).

2.2.3 Påviste resistenszymer fra kliniske isolater og dyr i Norge

2.2.3.1 Påviste ESBL_{KARBA}-gener fra kliniske isolater i Norge

I 2013 ble totalt tolv ESBL_{KARBA}-produserende isolater identifisert, hvor syv av disse var ESBL_{KARBA}-produserende *Enterobacteriaceae*. Av de syv som ble påvist var et fra KPC-familien, tre fra OXA-familien og tre fra NDM-familien. Mesteparten av disse er forårsaket av reising eller sykehusinnleggelse utenlands, men det finnes også tilfeller som ikke viser noen klar link mellom reising eller sykehusinnleggelse (NORM/NORM-VET 2013).

I 2014 ble totalt tolv ESBL_{KARBA}-produserende *Enterobacteriaceae* fra elleve pasienter identifisert. Av de ulike familiene karbapenemaser som ble påvist var det fire gener fra NDM-familien, tre fra OXA-familien, tre fra KPC-familien, et VIM-gen og et IMP-gen. Majoriteten av disse tilfellene var assosiert med import, noe som tilsier at Norge er med på den globale spredningen av ESBL_{KARBA}-produserende gram-negative bakterier (NORM/NORM-VET 2014). I 2015 derimot, ble 37 ESBL_{KARBA}-produserende *Enterobacteriaceae* fra 30 pasienter identifisert. Antall pasienter har fra 2014 til 2015 økt med tre ganger så mye. Både i 2014 og 2015 var *K. pneumoniae* og *E. coli* de dominerende ESBL_{KARBA}-produserende artene. Av de ulike familiene karbapenemaser som ble påvist i 2015, var 17 NDM, 16 OXA og to VIM, en betraktelig økning i OXA-gener og en fordobling av VIM-gener. Til tross for at det i 2015 var 30 pasienter som fikk påvist bakterier med antibiotikaresistensgener er tallet fortsatt lavt sammenlignet med andre land. Økningen fra elleve til 30 pasienter i 2015 er derimot noe som gir grunnlag for bekymring. Det er blitt observert en lignende trend i Sverige, hvor det ble identifisert resistens hos 115 pasienter i 2015 mot 46 pasienter i 2014 (NORM/NORM-VET 2015).

2.2.3.2 Påviste ESBL_{A/M}-gener fra kliniske isolater i Norge

For 2015 rapporterte NORM-NORM VET at 6,5 % av undersøkte *E. coli* i blodkulturer var ESBL-positive, noe som er en økning fra 5,8 % i 2014. Av disse 127 ESBL-positive isolatene ble en stor andel karakterisert som CTX-M, og de resterende fikk påvist blant annet AmpC og SHV. Undersøkelse av *Klebsiella* spp i blodkulturer viste 2,9 % ESBL-positive, med funn av CTX-M.

Undersøkelser av *E.coli* i urin hos pasienter viste at 48 isolater (3,1%) var ESBL-positive, hvor det i 37 av isolatene ble påvist CTX-M. I de resterende isolatene ble det blant annet påvist AmpC. Av *Klebsiella* spp. i urin som ble undersøkt var 3,3 % var ESBL-positive med tilstedeværelse av CTX-M og SHV (NORM/NORMVET 2015).

I 2014 var det tre utbrudd forårsaket av ESBL_{A/M}-produserende bakterier, to fra pleiehjem og et fra sykehus. Utbruddene i pleiehjemmet var forårsaket av *E.coli*. Siden 2010 er det registrert ti utbrudd forårsaket av ESBL-produserende bakterier, og kun en av disse har vært karbapenem-produserende (NORM/NORMVET 2014). I 2004 opplevde sykehuset i Stavanger Skandinavias første utbrudd med ESBL av typen CTX-M, og noen år senere oppstod et nytt utbrudd på nyfødtavdelingen som berørte 58 barn (Regjeringen 2013).

2.2.3.3 Påviste ESBL-gener fra dyreisolater i Norge

I 2013 ble det resistentestet *E. coli* i blant annet hund (191 isolater), eggproduserende høner (204 isolater), kalkunflokker (131 isolater) og kalkunkjøtt (156). Tilstedeværelse av resistente *E. coli* var moderat hos hund, moderat til høy hos høns, og høy i både kalkunflokkene samt kalkunkjøttet. I hundeisolatene ble det påvist ESBL-produserende *E. coli* i fire av isolatene, der to tilhørte genfamilie CTX-M. Det ble ikke påvist ESBL-produserende *E. coli* i isolatene fra høner, og i kalkunflokk og kalkunkjøtt ble det påvist henholdsvis to og fire isolater som blant annet var AmpC- og CMY-gener (NORM/NORM-VET 2013).

I 2014 ble 210 prøver fra blindtarm hos kylling, og 201 prøver fra kyllingfilet testet for antibiotikaresistens. Ved selektive metoder ble det påvist ESBL-produserende *E. coli* i 35,5 % av blindtarmsprøvene og i 28,9 % av kyllingfiletene. Det ble kun påvist fenotyper av AmpC og CMY-gener (NORM/NORM-vet 2014).

I 2015 ble det brukt selektive metoder for påvisning av resistens i storfe og svin, i hovedsak mot tredje-generasjons cefalosporiner. Fra storfe ble det påvist resistens mot cefotaksim og/eller ceftazidim i en blindtarmsprøve og tre kjøttprøver, og i svin ble det påvist

i 29 blindtarmsprøver og to kjøttprøver. I flesteparten av isolatene som inneholdt resistens var det på grunn av kromosomale mutasjoner i promotorregionen til AmpC-genet. Det ble derimot også funnet resistensgener som CTX-M i to isolater fra storfekjøtt og tre fra svin (NORM/NORM-VET 2015). I tillegg ble de samme isolatene undersøkt for tilstedeværelse av karbapenemaseproduserende *E. coli*. Det ble ikke funnet, noe som sannsynligvis kommer av at karbapenemer ikke er tillatt for bruk i husdyrproduksjon i europeiske land (NORM/NORM-VET 2015).

2.3 Bakteriestammer funnet i jordprøver

I denne oppgaven fokuseres det på *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Ochromobacter* spp. og *Achromobacter* spp. på grunnlag av hva som ble påvist ved sekvensering.

2.3.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. tilhører familien *Pseudomonaceae*. Disse bakteriene er rette- og/eller kurvede stavbakterier. Genuset *Pseudomonas* består av 60 arter, og de tre best karakteriserte gruppene deles inn i henhold til egenskaper som tilstedeværelse av poly-B-hydroxybutyrate (PHB), produksjon av fluoriserende pigment, patogenitet, tilstedeværelse av arginin-dihydrolase og glukoseutnyttelse. Den fluoriserende subgruppen akkumulerer ikke PHB og produserer et vannløselig, gul-grønt pigment som fluoriserer under UV-stråling. Gruppen består blant annet av *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, og *Pseudomonas syringae* (Willey et al. 2009).

Pseudomonas spp. blir funnet naturlig i overflatevann, innsjøer og elver, men sjeldent funnet i drikkevann. *Pseudomonas* spp. kan overleve i både rike- og næringsfattige miljøer. De er kjent for å ha flere iboende og ervervede resistensgener, være vert for flere mobile genetiske elementer, og utveksle dem med andre gram-negative familier som *Enterobacteriaceae* (Kittinger et al. 2016). *P. aeruginosa* er en av seks multiresistente bakterier som er mest utbredt og ansvarlig for to tredjedeler av alle infeksjoner i helseinstitusjoner (Coates 2012). I tillegg til denne vil også *P. putida* og *P. fluorescens* forårsake infeksjoner (Kittinger et al. 2016).

P. putida er typisk å finne i jord, vann og på dyrets overflate (Molina et al. 2014;

Marchiaro et al. 2014), og er en opportunistisk bakterie (Marchiaro et al. 2014) *P. putida* kan kolonisere fuktige overflater, og på sykehus kan det føre til infeksjoner hos pasienter. Til tross for at denne bakterien forårsaker helseproblemer, mangler det klinisk data om *P. putida* på grunn av lavere virulens og høyere antimikrobiell følsomhet sammenlignet med andre *Pseudomonas* arter, spesielt *P. aeruginosa* (Kim et al. 2012). Stammer av denne arten har tidvis blitt isolert fra pasienter på sykehus i Japan, USA, Italia og Frankrike. Infeksjoner av disse mikroorganismene har blitt rapportert å være knyttet til innsetting av kateter eller dreneringsrør. En av isolatene funnet på sykehus i Frankrike (HB3267), dreper insekter og er resistens mot en stor del av antibiotika brukt på laboratorier og sykehus (Molina et al. 2014). Nylig har det vært en økning i multiresistens og karbapenem-resistens *P. putida*, men tilfellene av multiresistente *P. putida* har ikke blitt grundig nok undersøkt (Kim et al. 2012).

2.3.2 *Bordetella* spp.

Bordetella spp. er gram-negative, aerobe kokkobaciller og tilhører familien *Alcaligenaceae*. *Bordetella* er kjemoorganotrof og krever organisk svovel og nitrogen for vekst. *Bordetella* spp. er bakterier som finnes i pattedyr, og som enkelt kan formere seg i luftveiene (Willey et al. 2009). Genus *Bordetella* består av ni arter (Stark et al. 2007, Carleton et al. 2014, Zelazny et al. 2012). Den viktigste av de ni artene er *Bordetella pertussis*, som er årsaken til sykdommen kikhoste. Bakterien forårsaker blant annet 195 000 dødsfall årlig, der 90 % av dødsfallene er i utviklingsland og flesteparten av dødsfallene rammer spedbarn. *Bordetella parapertussis* ligner på *B. pertussis* og det blir antatt at det er en variant av samme art. Denne kan føre til sykdom som ligner på en mildere variant av kikhoste. *B. pertussis* blir raskt påvirket av miljøforandringer og overlever kun i en svært kort periode utenfor de menneskelige luftveiene (Ryan & Ray 2014, Stark et al. 2007).

Det er forøvrig en fellesnevner blant *Bordetella* spp. at de er avhengig av menneske som vert og ikke overlever lenge utenfor verten, og *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella ansportsii*, *Bordetella hinzii* og *Bordetella trematum* er alle humane patogener. Når det gjelder *Bordetella petrii* derimot, er den unik og skiller seg fra de andre artene i genus. *B. petrii* er en opportunistisk patogen fakultativ anaerob bakterie, og er i stand til å overleve i miljøet uten en vert (Carleton et al. 2014). *B. petrii* ble først isolert og identifisert fra en miljøkilde i 2001 (Stark et al. 2007). *Bordetella* spp. blir også assosiert med cystisk fibrose, og det er spesielt *B. petrii* som ofte blir påvist fra spytt- og slimprøver hos pasienter med cystisk fibrose. Den kliniske signifikansen til *B. petrii* i cystisk fibrose er

derimot ukjent (Carleton et al. 2014, Zelazny et al. 2012). *Bordetella* spp. har flere virulensgener som uttrykkes, og disse kontrolleres av hovedregulatoren BvgAS. Lipopolysakkarider spiller en signifikant rolle når det gjelder infeksjon forårsaket av *Bordetella* spp. *B. pertussis* lipopolysakkarider mangler O-antigen, men den er tilstede hos *B. parapertussis* og *Bordetella bronchiseptica* (Zelazny et al. 2012).

Zelazny et al. (2012) utførte et klinisk forsøk der de tok fem prøver fra en kvinnelig pasient med bronkitt og lungesykdom assosiert med ikke-tuberkuløse mykobakterier. Det ble tatt fire prøver fra luftveiene underveis i sykdommen, samt en prøve fra milten etter hennes død. Underveis i forsøket ble *B. petrii* isolert fem ganger, *B. petrii* 1-5. Analyse ved gelelektroforese viste at *B. petrii* 1 og 2 ikke kunne skilles fra hverandre. *B. petrii* 3-5 skilte seg fra hverandre med kun ett bånd, som indikerer at de er beslektet, men ikke identiske. Stammene i dette forsøket viste økende resistens mot antibiotika, og *B. petrii* 4 og 5 hadde i tillegg redusert vekstrate, noe som indikerer en reduksjon i evnen til å replikere i et slikt miljø. Dette er assosiert med mekanismer mot antibiotikaresistens. Stammene viste også resistens mot cefalosporiner.

2.3.3 *Achromobacter* spp.

Achromobacter spp. tilhører familien *Alcaligenaceae* (Stark et al. 2007), og inkluderer blant annet artene *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter piedchaudii* og *Achromobacter ruhlandii* (Bertrand et al. 2000). Bakteriene er gram-negative staver og bevegelige ved hjelp av flageller. *Achromobacter* spp. er obligat aerobe, ikke-fermentative og finnes i både ferskvann og marine farvann, samt i jord (Garrity 2005). Hos mennesker med svekket immunforsvar eller andre sykdommer, som for eksempel cystisk fibrose, nyresvikt og kreft, kan *Achromobacter* spp. fungere som en opportunistisk patogen. Flere arter i genus er ikke patogene. Det finnes derimot noen arter, spesielt *A. xylosoxidans* og *A. denitrificans*, som kan forårsake sykdom hos allerede syke mennesker.

Bakteriestammen som oftest blir klinisk isolert er *A. xylosoxidans*. Stammen kan infisere en rekke organsystemer og er i økende grad assosiert med smitte av infeksjoner på sykehus. Det er blant annet blitt rapportert om lungebetennelse, bakteriemi, urinveisinfeksjoner og gastrointestinale infeksjoner forårsaket av *Achromobacter* spp., i hovedsak hos pasienter med cystisk fibrose. Pasienter med cystisk fibrose kan smittes med *Achromobacter* spp. gjennom miljøet eller via krysskontaminering og horisontal overføring (Swenson & Sadikot 2015). Der det tidligere ble sett infeksjoner med *S. aureus* og *P.*

aeruginosa hos pasienter med cystisk fibrose, ser man i dag en økning av patogenet *A. xylosoxidans*. Patogenets utbredelse hos cystisk fibrose-pasienter er i dag mellom 2-11 % (Trancassini et al. 2014).

Mellom 2005 og 2010 oppsto det et utbrudd på et senter for cystisk fibrose forårsaket av *A. xylosoxidans*, som resulterte i en studie der virulente trekk fra ulike *A. xylosoxidans*-stammer ble undersøkt. Det ble blant annet sett på deres evne til å danne biofilm og antibiotikaresistens, og det var 57 stammer av *A. xylosoxidans* som ble undersøkt for antibiotikaresistens. Resultatene viste høy resistens mot flere ulike antibiotika, blant annet aztreonam, gentamicin og ciprofloxacin. Det var i tillegg elleve karbapenemresistente stammer, der to av de produserte karbapenemase. Av de 57 stammene var ti resistente mot β -laktam antibiotika. Under sekvensering av *A. xylosoxidans* ble det også funnet to store plasmider med resistensgener (Trancassini et al. 2014).

2.3.4 *Ochrobactrum* spp.

Ochrobactrum spp. er ikke-laktosefermenterende, gram-negative stavbakterier som tilhører familien *Brucella* (Bharucha et al. 2016), som stammer av høy patogenitet (Bathe et al. 2005). Slekten *Ochrobactrum* består av fem arter: *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum tritici*, *Ochrobactrum grignonense* og *Ochrobactrum gallinifaecis*. Det har blitt rapportert at *O. intermedium* er mer knyttet til *Brucella* enn til de andre *Ochrobactrum* artene (Bathe et al. 2005). *Ochrobactrum* spp. finnes stort sett i miljøet, og blir ansett som patogener med lav virulens (Bharucha et al. 2016). *Ochrobactrum* spp. har blitt isolert fra jord, vannkilder på sykehus, antiseptiske midler, kontaminerte legemidler og kan også tenkes å være en del av den normale floraen i tykktarmen. Artene er også blitt isolert fra ris, hvete og potet (Thoma et al. 2009).

Ochrobactrum spp. ansees som en voksende gruppe opportunistiske patogener. De fleste infeksjoner forårsaket av denne typen bakterier er blitt observert hos pasienter med nedsatt immunforsvar, eller i sammenheng med transplantasjoner. Til tross for dette er det flere rapporter som indikerer at *Ochrobactrum* spp. kan forårsake sykdom hos ellers friske mennesker. Den klinisk viktigste arten er *O. anthropi*, men det er også rapportert sporadiske infeksjonstilfeller forårsaket av *O. intermedium*, *Ochrobactrum pseudintermedium*, *Ochrobactrum haematophilum* og *Ochrobactrum pseudogrignonense* (Thoma et al. 2009). Det er lite data på området *Ochrobactrum* spp. og antibiotikaresistens, men noen studier viser at *Ochrobactrum* spp. svært sjeldent responderer på standard behandling med antibiotika, da

bakteriene har evne til å kunne produsere AmpC β -laktamaser. Thoma et al. (2009) testet 103 *Ochrobactrum* spp. isolater for deres evne til antibiotikaresistens, og resultatet viste at alle isolatene av *O. anthropi*, *O. intermedium*, *Ochrobactrum tritici*, *Ochrobactrum grignonense*, *Ochrobactrum lupini*, *O. haematophilum* og *Ochrobactrum oryzae* var svært resistent mot alle β -laktamer.

2.4 Antimikrobielle midlers virkemåter

Antimikrobielle midler fungerer ved at de velger ut et mål, for eksempel en struktur eller en prosess i en bakteriecelle, som de skal angripe (Guilfoile 2007). Antibiotika angriper som regel den bakterielle celleveggen, proteinsyntesen eller nukleinsyresyntesen (Willey et al. 2009).

2.4.1 Inhibering av celleveggsyntese

De mest selektive antimikrobielle midlene er de som inhiberer celleveggsyntesen. β -laktamer som penicillin, karbapenemer og cefalosporiner og glykopeptider, er typer antimikrobielle midler som inhiberer celleveggsyntese. Disse midlene inneholder en β -laktam-ring som er middelets viktigste virkestoff (Willey et al. 2009; Kohanski et al. 2010). Behandling med antibiotika som inhiberer celleveggsyntesen kan resultere i endringer i celleform- og størrelse, indusere cellulær stressrespons eller resultere i cellelysis (Kohanski et al. 2010).

β -laktam har en ringformet struktur som ligner på D-alanyl-D-alanine. Når β -laktam binder seg til det aktive setet på transpeptidasene hvor D-alanyl-D-alanine vanligvis binder seg, vil krysslinkingen av peptidodoglykanenheter hindres (Kohanski et al. 2010). Dette resulterer i at det ikke blir dannet en fullstendig cellevegg, og at den allerede eksisterende celleveggen ødelegges, som igjen forårsaker lysering av bakteriecellen (Willey et al. 2009).

Det har også blitt oppdaget at penicillin kan binde seg til flere periplasmatiske proteiner, bedre kjent som penicillin-bindende-proteiner (PBP), og at de også kan ødelegge bakterier ved å aktivere deres egne autolytiske enzymer (Willey et al. 2009).

2.4.2 Inhibering av proteinsyntese

Flere typer antimikrobielle midler, som blant annet aminoglykosider og tetrasykliner, kan inhibere proteinsyntesen ved å binde seg til det prokaryotiske ribosomet og andre komponenter som inngår i proteinsyntesen. Dette resulterer i at trinn i proteinsyntesen som aminoacyl-tRNA-binding, dannelse av peptidbånd og translokasjon, påvirkes.

Aminoglykosider er en bakteriedrepende type antibiotika, som er svært effektiv mot gram-negative patogene bakterier. Streptomycin og neomycin er ulike typer aminoglykosider, og disse inhiberer proteinsyntesen og forårsaker feillesing av mRNA ved å binde seg til den lille ribosomale subenheten (30S).

Tetrasykliner er bredspektrede, bakteriostatiske antibiotika, noe som vil si at de ikke dreper de patogene bakteriene, men kun hindrer deres vekst. I likhet med aminoglykosider binder tetrasykliner seg til den lille ribosomale subenheten, men hindrer derimot at aminoacyl-tRNA molekylene kan binde seg til ribosomets A-sete (Willey et al. 2009).

2.4.3 Inhibering av nukleinsyresyntese

Antimikrobielle midler som inhiberer nukleinsyresyntesen fungerer på to ulike måter. Den første måten er å inhibere DNA polymerase og DNA helikase, som resulterer i blokkering av replikasjon. Den andre metoden er å hemme RNA polymerase for å blokkere transkripsjon. Kinoloner er bakteriedrepende antibiotika og en viktig antibiotikaklasse som hemmer nukleinsyresyntesen. De blir benyttet i økende grad for behandling av infeksjoner. Kinolonene fungerer ved å hemme DNA gyrase og topoisomerase II. Inhibering av DNA gyrase forstyrrer blant annet DNA-replikasjon og reparasjon. Kinoloner er bredspektrede antibiotika som er svært effektive mot bakterier som *E. coli* og *K. pneumoniae* (Willey et al. 2009).

2.5 Spredning av antibiotikaresistens

Spredningen av antibiotika skjer ved at resistente bakterier spres mellom mennesker, dyr, miljø (figur 2.1), og ved varetransport over landegrensler (Folkehelseinstituttet 2017a). Bruken av antibiotika selekterer for resistente bakterier som øker dosen av resistensgener, og dermed øker sjansen for spredning gjennom horisontal genoverføring (Helsedirektoratet 2013, Guilfoile 2007). Resistensgenene vil bidra til etablering i mobile genetiske elementer som enkelt kan flytte seg mellom ulike bakterier og miljøer (Helsedirektoratet 2013). Ervervet resistens i en bakteriepopulasjon i en bestemt omgivelse kan spres til andre populasjoner i andre miljøer og til andre geografiske områder (Regjeringen 2013).

2.5.1 Spredning av resistens hos dyr

Større, men færre spesialiserte besetninger er en økt trend i Norge. Kontakt mellom besetninger i form av kjøp og salg kan øke risikoen for spredning av resistens. Betydningen av dette, med tanke på resistensreservoar og videre overføring til mennesker, er ukjent. Disse besetningene, i tillegg til økonomiske forhold, har gjort utenlandsk arbeidskraft mer vanlig. Gårdsarbeidere kan komme fra land med en annen forekomst av resistens, og vil kunne overføre resistente bakterier til norske husdyr (Regjeringen 2013). Antibiotikaresistente bakterier vil ofte etablere seg i tarmfloraen, som utgjør størstedelen av normalfloraen (Folkehelseinstituttet 2017a). Antibiotika har som formål å hemme bakterien som forårsaker sykdommen, men normalfloraen vil også bli påvirket. Dette kan føre til bæreegenskaper som gjør spredning av antibiotikaresistens til en bekymring i landbruket (Norsk Landbrukssamvirke 2016, Folkehelseinstituttet 2017a).

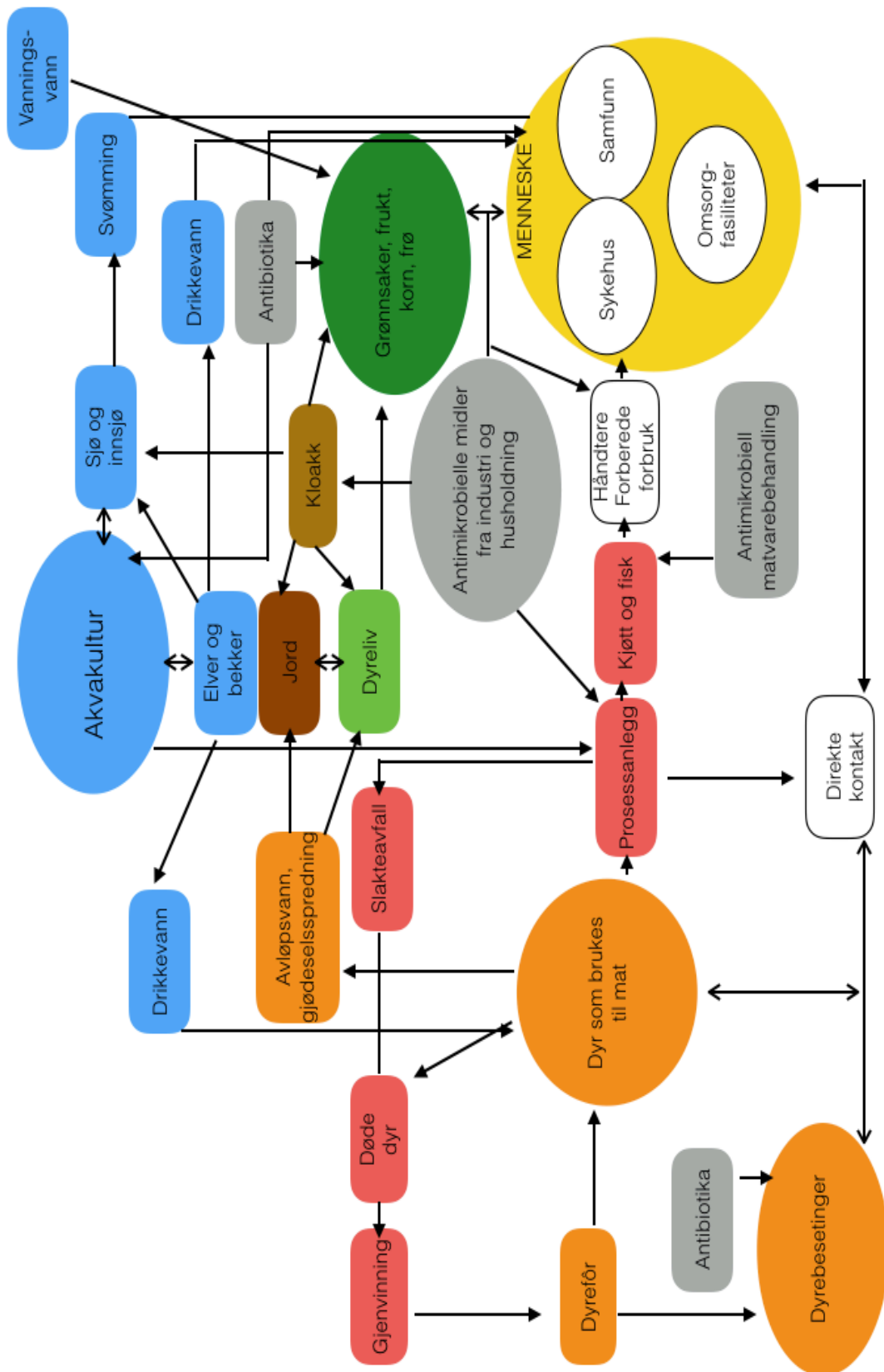
2.5.2 Spredning av resistens i mat

I matproduksjon er antibiotikaforbruket en grunn til bekymring, da spredning av resistens til miljøet er svært uønsket (Folkehelseinstituttet 2017a). Antibiotikaresistens som oppstår hos matproduserende dyr kan spre seg til mennesker via mat, vann, direkte kontakt med dyr og forurensninger i miljøet (EFSA 2016). ESBL-produserende *E. coli* er som nevnt oppdaget og påvist i fjørfe i Norge i 2012 og 2013, men det er uvisst om resistens hos fjørfe kan kontaminere andre matvarer enn fjørfeprodukter, via for eksempel avrenning fra

gjødslede jorder til vanningsvann og videre til grønnsaker. MRSA er kjent hos svin og kan kontaminere svinekjøtt. MRSA kan invadere slimhinner og hud, men smitte via matvarer til mennesker regnes som liten (Regjeringen 2013). Spredning av antibiotikaresistens kan knyttes til global handel, hvor resistens fra matvarer fra blant annet høyendemiske områder spres til områder med lavere prevalens. Reisevirksomhet til disse områdene har vist å øke risikoen for kolonisering av multiresistente bakterier (Regjeringen 2013, Folkehelseinstituttet 2017a).

2.5.3 Spredning av resistens i naturlig miljø

Tidligere ble det antatt at spredning av resistens hovedsakelig kommer fra menneskeskapte til naturlige miljøer, og at lavere grad av denne type eksponering ga en lavere forekomst av resistens. Nyere forskning har indikert at naturlige miljøer kan være kilde til spredning av resistens til kliniske miljøer (Brusetti et al. 2008, Regjeringen 2013). Miljøet utsettes for utslipp av antimikrobielle og farmasøytiske midler, dette kan bidra til spredning av antimikrobiell resistens (Regjeringen, 2013). Sammenhengen mellom avrenning fra husdyrproduksjon og spredning av resistens i jord- og vannmikrobiota er dokumentert. Det er kjent at jordsmonnet består av levende mikroorganismer som produserer antibiotika. Jordsmonnet er et reservoar av resistensdeterminanter som kan mobiliseres og spres til det mikrobielle samfunnet (D'Costa et al. 2006).



Figur 2.1: Figuren viser sammenheng mellom spredning av bakterier og resistensgener mellom mennesker, dyr, jordbruk, matproduksjon og miljø. (Illustrasjon: inspirert fra Regjeringen 2013).

2.6 Mekanismer for antibiotikaresistens

Som tidligere nevnt finnes det mange bakterier som er resistente mot ulike typer antibiotika. Hvilke mekanismer bakterier bruker for antibiotikaresistens kan variere mellom enzymatisk inaktivering av det antimikrobielle middelet, bruk av efflukspumpe eller modifisering av målsetet (Guilfoile 2007).

2.6.1 Inaktivering av det antimikrobielle midler

Flere patogene bakterier motstår effekten av antimikrobielle midler ved kjemisk modifisering av middelet. Bakterier kan produsere β -laktamase. β -laktamase er et enzym som deaktivere det antimikrobielle middelet ved å hydrolysere bånd i β -laktam-ringen. Dette er trolig det beste eksempelet på inaktivering av et antimikrobielt middel (Willey et al. 2009). Penicillin er et av flere midler som består av en kjemisk aktivert β -laktam-ring. Denne har kritisk effekt når det gjelder det antimikrobielle middelets funksjon (Guilfoile 2007).

Når β -laktam-ringen hydrolyseres og åpnes vil ikke lenger det antimikrobielle middelet fungere som PBP (penicillin-bindende proteiner), og dermed vil det antimikrobielle middelet være ubrukelig. Dette skjer ved at bakteriene skiller ut β -laktamase enzymer i periplasmaet før β -laktamet når PBP i cytoplasmamembranen (Walsh 2000). Til tross for at det er utviklet flere strategier for å stoppe denne resistensmekanismen, finnes det i dag mange bakterier som inneholder muterte versjoner av β -laktamase enzymer. Disse muterte enzymer er i stand til å hydrolysere flere av de nyere penicillinene på markedet (Guilfoile 2007).

2.6.2 Efflukspumpe

En annen mekanisme for antibiotikaresistens er efflukspumpe. Efflukspumper finnes hos nesten alle bakteriearter, og gener som koder for disse proteinene er vanligvis lokalisert på et kromosom eller et plasmid (Sun et al. 2009). Efflukspumper er transportproteiner som bidrar til at cellen pumper ut antibiotikumet etter at det er kommet inn i cellen. Disse efflukspumpene er relativt uspesifiske når det gjelder hvilke stoffer de pumper ut, noe som resulterer i at de ofte medfører multiresistens (Webber & Piddock 2003, Willey et al. 2009).

2.6.3 Modifisering av målsetet

Siden ulike antibiotikum virker på et spesifikt målenzym eller på en cellulær struktur, kan antibiotikaresistens oppstå ved å modifisere målsetet (Willey et al. 2009).

Antibiotikaresistens forårsaket av modifisering av målsetet kan oppstå på to ulike måter, enten ved mutasjon i genet som koder for målet for antibiotika, eller ved at et enzym kjemisk modifiserer målet for antibiotika. Et eksempel på dette er penicillin som binder seg til proteiner i den bakterielle celleveggen. Dersom det oppstår mutasjoner i proteinene kan det hindre penicillin i å binde seg ved at proteinene får en mye lavere affinitet til det antimikrobielle middelet, slik at penicillinet ikke vil fungere (Guilfoile 2007).

2.7 Mekanismer for overføring av antibiotikaresistens

Antibiotikabruken i dag er en stor årsak til den store økningen i antibiotikaresistente bakterier, og det at det finnes flere mekanismer for å overføre antibiotikaresistensgener fra en bakterie til en annen er med å bidra til denne økningen. Mekanismene som brukes for horisontal overføring av antibiotikaresistensgener er konjugasjon, transformasjon og transduksjon (Guilfoile 2007).

2.7.1 Overføring av antibiotikaresistens via konjugasjon

Under konjugasjon blir genetisk materiale overført fra et donorbakterium til et mottakerbakterium. Det genetiske materialet som overføres er sirkulære DNA molekyler som kalles plasmider. Plasmidene inneholder ofte antibiotikaresistensgener, noe som fører til at mottakerbakterien mister sin følsomhet overfor antibiotika. Andre genetiske elementer som stadig inneholder antibiotikaresistensgener, kalt transposoner, har evne til å hoppe fra et sete i kromosomet til en annen lokasjon, og også fra en bakteriestamme til en annen. Elementer som kalles integroner er en type transposon som inneholder en rekke antibiotikaresistensgener. De har evne til å hoppe til nye genomer, eller inn i konjugative plasmider, som resulterer i at integronene får en vid spredning (Guilfoile 2007).

2.7.2 Overføring av antibiotikaresistens via transformasjon

Denne overføringsprosessen går ut på at DNA blir absorbert fra væsken som ligger rundt mikroben. Ulike bakterielle patogener, som *Streptococcus pneumoniae* har denne evnen til transformasjon. Dersom DNAet, som blir tatt opp fra den omkringliggende væsken, inneholder resistensgener, kan bakterien inkorporere dette genet i sitt eget genom og dermed miste følsomheten for antibiotika (Guilfoile 2007).

2.7.3 Overføring av antibiotikaresistens via transduksjon

Transduksjon er en overføringsmetode der DNA overføres ved at et bakteriofag (bakterielt virus) ødelegger bakterieceller. Bakteriofaget vil dermed overføre DNA fra en bakterie til en annen, noe som kan føre til en potensiell overføring av resistensgener (Guilfoile 2007).

2.8 Mobile genetiske elementer (MGE)

Mobile genetiske elementer (MGE) er viktige i overføringen av genetisk informasjon i prokaryoter og eukaryoter. MGE er fragmenter av DNA som kan flytte seg til nye steder på kromosomet i samme celle (Malachowa & DeLeo 2010). Plasmider, transposoner og integroner er typer av MGE.

2.8.1 Plasmider

Plasmider er kjent som små, sirkulære, dobbelttrådige DNA-molekyler som er forskjellig fra cellens kromosomale DNA. De er selvreplikerende, ekstrakromosomale og forekommer naturlig i bakterieceller, gjær og noen eukaryote celler (Willey et al. 2009, Lodish et al. 2000, Nature 2014). Mange naturlig forekommende plasmider inneholder gener som gir fordeler til vertscellen i visse miljøer (Willey et al. 2009). For eksempel vil noen plasmider kode for enzymer som inaktiverer antibiotika. Slike resistente plasmider har blitt et stort problem i behandling av flere vanlige patogener (Lodish et al. 2000, Nature 2014).

Bakterier kan overføre plasmider til hverandre gjennom mekanismene konjugasjon, transformasjon eller transduksjon (Willey et al. 2009, Guilfoile 2007). I mange tilfeller bærer disse plasmidene gener som koder for resistens mot antibiotika (Watson et al. 2014).

Plasmider blir ofte klassifisert etter deres eksistens, spredning og funksjon. Konjugative plasmider er særlig lagt merke til, da disse har gener som kan overføre kopier av seg selv til andre bakterier gjennom konjugasjon. Noen konjugative plasmider er R-plasmider (resistensfaktorer, R-faktorer), disse er viktige i forhold til spredning av antibiotikaresistens blant bakterier (Willey et al. 2009). Plasmid resistensgener koder ofte for enzymer som ødelegger eller modifierer medisiner; for eksempel hydrolyse av penicillin eller acetyllering av kloramphenicol-medisner. Fordi et plasmid kan bære gener for resistens til flere medisiner, kan en patogen populasjon bli resistent mot flere antibiotika samtidig, selv om pasienten kun blir behandlet med en medisin (Willey et al. 2009).

2.8.2 Transposoner

Antibiotikaresistensgener kan bli lokalisert på andre genetiske elementer enn plasmider. Transposisjon er en spesifikk form for genetisk rekombinasjon som flytter enkelte genetiske elementer fra et sted på DNA til et annet. Disse mobile genetiske elementene kalles transposoner. Flyttingen skjer gjennom rekombinasjon mellom DNA sekvensen på enden til transposonet og en sekvens i DNAet til vertscellen. Flyttingen kan skje med eller uten duplisering av elementet. De tre prinsipielle klassene av transposoner er DNA-transposoner, virus-liknende transposoner og poly-A retrotransposoner. Transposoner er tilstede i genomet til alle organismer, hvor de kan utgjøre en stor andel av den totale DNA-sekvensen (Watson et al. 2014). De er en vesentlig årsak til mutasjoner og DNA-omorganiseringer, som kan føre til sletting av genmateriale. Transposisjon skjer enten gjennom en “klipp-og-lim” rekombinasjons mekanisme eller gjennom en replikativ mekanisme (Watson et al. 2014, Willey et al. 2009).

Transposoner kan også inneholde andre gener i tillegg til de som trengs for transposisjon, for eksempel antibiotikaresistens eller toksiske gener og kan raskt bevege seg mellom plasmider og gjennom en bakteriepopulasjon. Det er en bekymring at mange transposoner inneholder antibiotikaresistensgener. Transposoner flytter seg fra et plasmid til et annet, og derfor vil resistensgener bli introdusert i mål-plasmidet, som dermed blir til et resistent (R) plasmid. Siden transposoner også kan bevege seg mellom plasmider og kromosomer, kan resistensgener utveksles mellom disse to molekylene, som resulterer i lengre spredning av resistens (Willey et al. 2009).

2.8.3 Integroner

Ofte er flere resistensgener båret sammen som genkassetter i assosiasjon med et genetisk element, kjent som integron (Willey et al. 2009). Integroner er ikke selv i stand til å bevege seg, men fordi de inneholder genkassetter kan de mobiliseres til andre integroner eller til sekundære områder i bakteriegenomet (Fluit og Schmitz 1999). Genkassetter er genetiske elementer som eksisterer som sirkulære, ikke-replikerende DNA når de flyttes fra et sted til et annet. De er vanligvis en lineær del av et transposon, plasmid eller bakteriekromosom. Et integron er satt sammen av et integrase gen og sekvenser for steds spesifikk rekombinasjon. Dermed kan integroner fange opp gener og gen-kassetter. Flere kassetter kan bli integrert sekvensielt i et integron, dermed er integroner viktig i spredning av resistensgener (Willey et al. 2009). Et integron inkluderer genet for en integrase (*int*) og for et sideliggende rekombinasested (*attI*). Genkassetter er ikke nødvendigvis en del av integronet, men når det integreres blir de det. Uttrykkelsen av integronet avhenger av promoteren i integronet, så lenge promoter er en del av integronet (Fluit og Schmitz 1999).

2.9 Tiltak mot resistensutvikling

2.9.1 Generelle nasjonale tiltak

Situasjonen med antibiotikaresistens i Norge er foreløpig begrenset, men kan imidlertid raskt endres ved økt antibiotikabruk, import av mat og spredning av resistente bakterier i matproduksjonen, samt reisevirksomhet (Folkehelseinstituttet 2015). Det voksende problemet med utviklingen av antibiotikaresistens har gjort oss mer bevisste på antibiotikabruk, og for å forebygge og bekjempe utviklingen kreves flere ulike tiltak. Derfor har regjeringen i Norge utviklet en nasjonal tiltaksplan (2015-2020) for å motvirke antibiotikaresistens. Planen har som mål å opprettholde antibiotika som virksomme legemidler også i årene som kommer (Regjeringen 2015).

Trusselen antibiotikaresistens utgjør kan ikke elimineres, men ved å iverksette tiltak kan risikoen for at antibiotikaresistens spres i en voldsom hastighet minimeres. Sammenlignet med andre land er antibiotikabruken i Norge relativt lav, men det er stadig rom for forbedringer (Regjeringen 2015). Strategien inkluderer overordnede mål som blant annet å redusere den totale bruken av antibiotika, bruke antibiotika kun når det trengs, samt å øke

kunnskapen om hva som driver spredningen av antibiotikaresistens. Redusering av den totale bruken av antibiotika ansees som det viktigste forebyggende tiltaket, men å bytte til smalspektrede antibiotika i stedet for bredspektrede antibiotika er også et godt tiltak. Dette er fordi smalspektrede antibiotika påvirker færre bakterietyper, slik at det blir en begrenset resistensutvikling (Folkehelseinstituttet 2017a).

Utviklingen av antibiotikaresistens blir nøye overvåket i Norge, og systemene som benyttes er Meldingssystemet for smittsomme sykdommer (MSIS), Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), og Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober-veterinærmedisin (NORM-VET) (Folkehelseinstituttet 2017a). Kompetansesenter for påvisning av antibiotikaresistens (K-res) er et nasjonalt senter for kompetansebygging innen antibiotikaresistens, og deres arbeid går blant annet ut på å utvikle og utføre fenotypiske og molekylære analyser for påvisning og karakterisering av antibiotikaresistente bakterier som en referansefunksjon for norske mikrobiologiske avdelinger (Simonsen 2008). I tillegg til dette publiserte Helse- og omsorgsdepartementet en handlingsplan mot antibiotikaresistens i helsetjenesten, som viser hvilke tiltak som må gjøres her for å nå målene i den nasjonale tiltaksplanen (Folkehelseinstituttet 2017a).

2.9.2 Generelle globale tiltak

I 2015 publiserte Verdens helseorganisasjon en global handlingsplan mot antibiotikaresistens. Strategien som legges frem baseres seg på fem punkter, og det overordnede målet er å sikre muligheten til å behandle og forhindre infeksjonssykdommer med effektive og trygge medisiner så lenge som mulig (WHO 2015).

Den første strategien går ut på å øke bevisstheten og forståelsen for resistens gjennom kommunikasjon, utdanning og opplæring. Dette skal skje via offentlige kommunikasjonsprogram som er rettet mot ulike målgrupper i menneskehelse, dyrehelse, landbruksvirksomhet og forbrukere, samt implementere antibiotikaresistens i læringsplanen for helse- og veterinærsektoren (WHO 2015).

Strategi nr. 2 innebærer å styrke kunnskap gjennom overvåking og forskning. Her er det blant annet svært viktig med kunnskap om hvordan resistens utvikles og spres, samt hvordan resistens overføres mellom mennesker og dyr, gjennom mat, vann og miljø. Denne kunnskapen er viktig for å utvikle nye retningslinjer og forskrifter for å motvirke resistens (WHO 2015).

Den tredje strategien baserer seg på å redusere forekomsten av infeksjonssykdommer ved å sikre gode sanitære forhold og god hygiene, i tillegg til andre forebyggende tiltak. God hygiene er essensielt for å begrense utvikling og spredning av antibiotikaresistente infeksjoner. På sykehus og andre helseinstitusjoner er det nødvendig med iverksettelse av blant annet hygieniske tiltak som tar sikte på å redusere nosokomial smitte (WHO 2015).

Optimalisering av bruken av antimikrobielle legemidler for mennesker- og dyrs helse er strategi nr. 4. Det er ingen tvil om at antibiotikaresistens øker med økende bruk av antibiotika, og bruken av antibiotika hos mennesker, dyr og landbruk øker stadig globalt. Det er per i dag for få og dårlige reguleringer når det gjelder bruken av antimikrobielle midler, dette gjelder spesielt salg over internett og i land der det ikke kreves resept for slike medisiner (WHO 2015).

Den siste strategien i tiltaksplanen er å øke de økonomiske midlene for bærekraftig investering som tar hensyn til alle lands behov, samt øke investeringen til nye medisiner, diagnostiske verktøy og vaksiner. For å få til dette er det viktig at de økonomiske midlene gjenspeiler behovet for utvikling av nye antimikrobielle midler, verktøy og vaksiner da dette er noe som trengs raskt (WHO 2015).

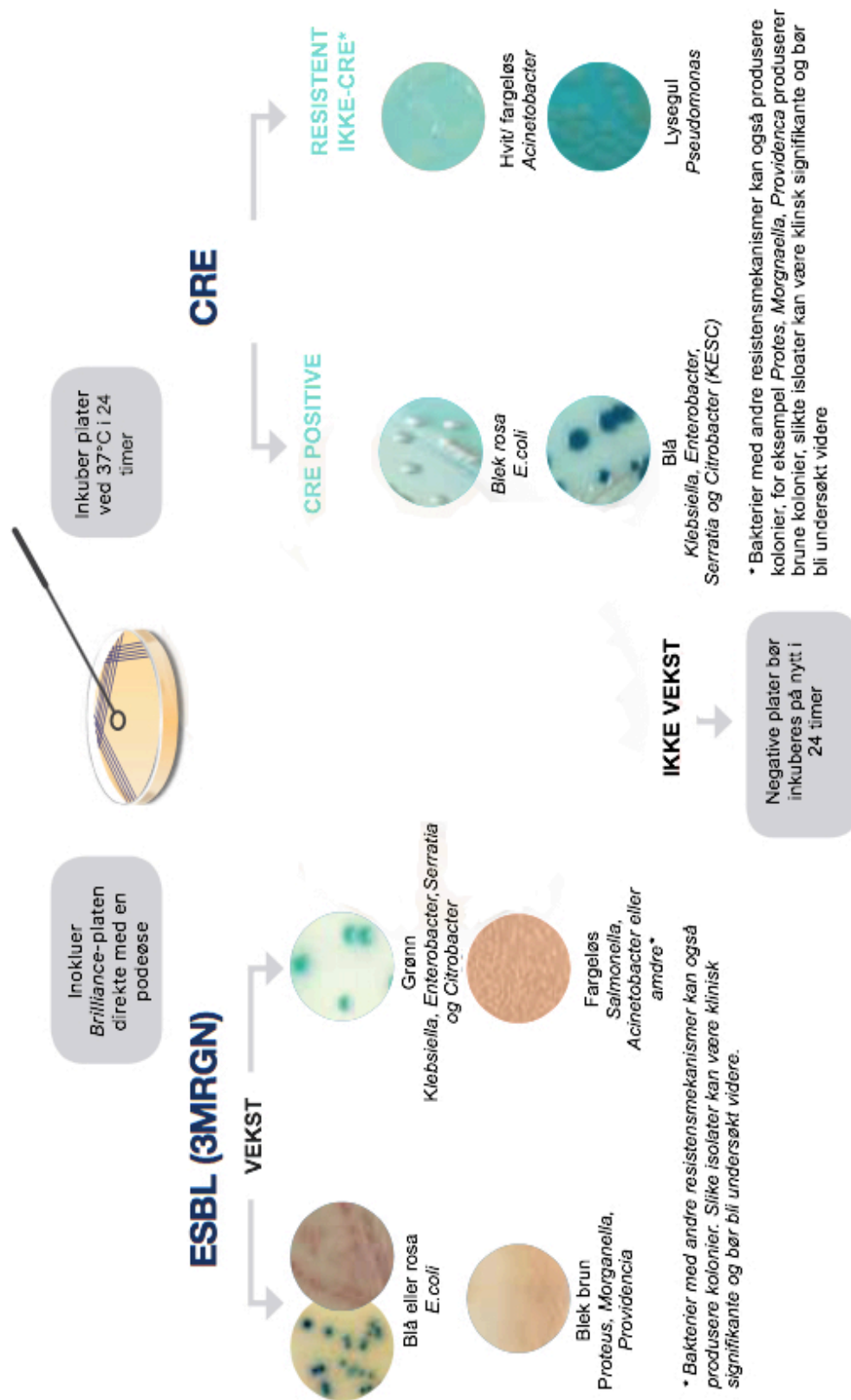
3.0 Metodisk teori

3.1 Selektive skåler for ESBL og Karbapenemase

*Brilliance*TM ESBL Agar er en kromogenetisk screeningskål som detekterer organismer som produserer β -laktamaser med utvidet spektrum. Dette mediet forsikrer presumptivt identifikasjon av ESBL-produserende *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter* (KESC-gruppen), direkte fra kliniske prøver. Oxoid *Brilliance* ESBL agar inneholder cefpodoxime, i kombinasjon med andre antibakterielle midler, for å inhibere ikke-ESBL *Enterobacteriaceae* og undertrykke veksten av AmpC-organismer og andre ikke-ESBL organismer (Thermo Scientific 2013).

*Brilliance*TM CRE Agar brukes for screening av Karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae*, inkludert NDM-1. Skålen inneholder en modifisert karbapenem på et anbefalt nivå, som sikrer et pålitelig resultat med en vid variasjon av CRE, inkludert de med New Delhi Metallo β -laktamase 1 (NDM-1) mekanisme (Thermo Scientific 2016).

Skålene finnes også i en kombinasjon av både *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE Agar. Bi-skålen gjør det mulig å tidlig oppdage og identifisere multiresistente gram-negative bakterier (ESBL- og CRE-produserende organismer). Skålene er tidsbesparende, enkle å bruke, enkle å lese av og kostnadseffektive (Thermo Scientific 2014). Prosedyre for inokulering og fargereaksjoner vises i figur 3.1.



Figur 3.1: Figuren viser prosedyren for inokulering og fargereaksjoner på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE Agar ved positiv vekst. (Illustrasjon: Thermo Scientific 2014).

3.2 DNA-isolering og ekstrahering med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit

GenElute™ Soil DNA Isolation Kit er en metode for påvisning av mikroorganismer fra jordprøver. Alle typer jordprøver kan behandles, både vanlige og vanskelige jordprøver med høyt innhold av huminsyrer, som kompost og gjødsel. Kitet fjerner alle spor av huminsyre ved hjelp av en medfølgende kolonne. En spinnkolonne brukes deretter for å rense ytterligere. Det totale genomiske DNA kan isoleres og renses fra alle mikroorganismer som finnes i jord, som bakterier, sopp og alger. DNAet som er ferdig renses er av høy kvalitet og er fullt kompatibelt for PCR, fordi all huminsyre og PCR inhibitorer blir fjernet under isoleringen (Sigma-Aldrich 2016).

3.3 Kvantifisering av DNA

Et spektrofotometer kan benyttes for å måle konsentrasjonen av DNA i en løsning. DNA absorberer UV-lys ved en bølgelengde på 260 nm og et spektrofotometer vil måle mengden lys som går gjennom prøvematerialet. Jo mer lys som absorberes av prøvematerialet, jo høyere DNA-konsentrasjon vil prøvematerialet ha. En absorbans på 1,0 tilsvarer ca. 50 µg/ml DNA. Ofte måles også absorbans ved 280 nm, og forholdstallet mellom 260 nm/280 nm gjør det mulig å analysere renheten i DNA-løsningen. Det er ønskelig at forholdet mellom 260/280 er større enn 1,8, da en lavere verdi indikerer for høyt innhold av fenoler eller proteiner (Sjøberg 2013).

Dersom det er nødvendig med mer nøyaktige målinger, eller det måles mindre mengder av DNA kan det benyttes et fluorescerende stoff som binder DNA. Deretter vil fluorescens måles ved en gitt bølgelengde. Fordelen ved fluorescerende merking er at DNA-mengder helt ned til 25 pg/ml kan detekteres (Sjøberg 2013).

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode for amplifisering av DNA (figur 3.2), som gjør det mulig å lage et stort antall kopier av en bestemt DNA-sekvens (Sjøberg 2013). For å gjennomføre en PCR kreves DNA-templat, byggesteinene dNTP (nukleotider), et primerpar (F = forward og R = reverse), samt et enzym (DNA Polymerase) (Sjøberg 2013). Disse komponentene blandes sammen, og blir normalt kalt en mastermikse. En standard PCR gjennomføres i tre trinn: denaturering, hybridisering og polymerisering (Integrated DNA Technologies 2011, Sjøberg 2013). Det benyttes i dag ulike varianter av PCR, blant annet Multipleks PCR, kvantitativ PCR (qPCR), Realtime PCR og RT-PCR. I denne oppgaven har vi benyttet Multipleks PCR og qPCR.

I en multipleks PCR benyttes det mange primere slik at flere målgen kan amplifiseres samtidig i en enkelt reaksjon (Sjøberg 2013). qPCR er en type PCR som gjør det mulig å finne ut hvor mye DNA eller RNA som faktisk finnes i en gitt prøve. Dette gjøres normalt ved å tilsette en fluorescerende probe til mastermiksen, for deretter å måle signalene den gir under PCR-trinnene (Willey et al. 2009).

3.4.1 Denaturering (denaturation)

Denatureringsfasen er det første trinnet i en PCR. Denaturering går ut på å denaturere det dobbeltrådig templatet (DNA_{et}) for å gjøre det enkelttrådig slik at det kan åpnes opp for de komplementære sekvensene til primeren. Dette skjer vanligvis ved 95 °C i 1 minutt (Integrated DNA Technologies 2011). Dersom det benyttes et langt DNA-templat kan varigheten av dette trinnet økes til 15 minutter, for å være sikker på at templatet blir denaturert (Sjøberg 2013).

3.4.2 Hybridisering (primer annealing)

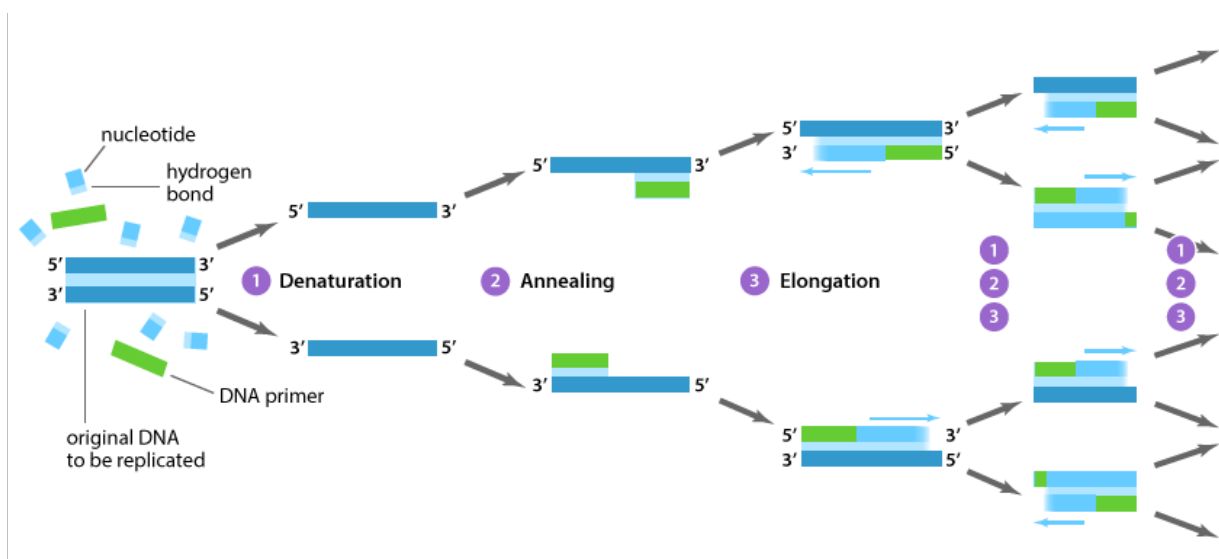
Trinn nr. 2 er hybridisering, og temperaturen som benyttes her avgjøres av primerne. Det skjer vanligvis ved 50 °C, mer nøyaktig til 2 °C lavere enn temperaturen som trengs for at primeren skal smelte, i 30 sekunder (Integrated DNA Technologies 2011). Når temperaturen senkes vil det enkelttrådede primer-DNA binde seg til DNA-templatet. Som nevnt tidligere kopieres kun en bestemt DNA-sekvens og ikke alt DNA som er tilstede i prøvematerialet. Hvilken DNA-sekvens som amplifiseres i en PCR avgjøres av primerparet, der primer

Reverse skal hybridisere til flankerende DNA på den ene siden, og primer Forward skal hybridiseres til flankerende DNA på motsatt side. Størrelsen på en primer er normalt 20-30 basepar, men kan variere (Sjøberg 2013).

3.4.3 Polymerisering (extension)

Det siste trinnet i en PCR er polymerisering. I dette trinnet økes temperaturen til 72 °C, som er optimumstemperaturen til DNA polymerase (Integrated DNA Technologies 2011). Utgangspunktet for DNA-syntesen er primer Reverse og primer Forward som under hybridiseringen blir bundet til hver sin templattråd. Under polymeriseringen oppstår replikasjon av fire nye DNA-tråder. For å starte DNA-replikasjon trenger man DNA polymerase. Under en PCR oppnår man temperaturer opp mot 95 °C. Ved denne temperaturen vil de fleste enzymer denatureres, og det er derfor viktig med et enzym som tåler gjentatte oppvarming. Taq polymerase (isolert fra bakterien *Thermus aqaticus*) er et varmestabilt enzym og benyttes derfor ofte i PCR. Ved DNA polymerasens optimumstemperatur vil DNA-syntesen foregå fra den frie 3'OH-enden på begge primere, med dNTP som byggesteiner (Sjøberg 2013).

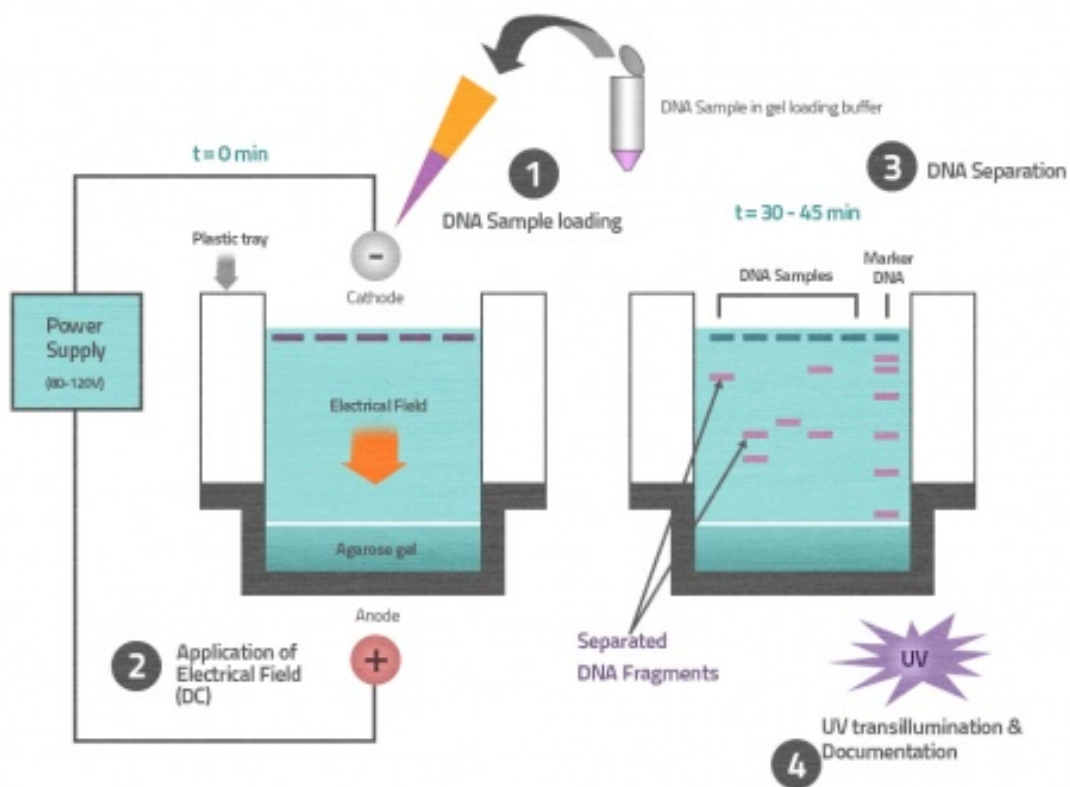
En runde med denaturering, hybridisering og polymerisering kalles for en PCR-syklus, og denne kan gjentas for eksempel opp mot 30 ganger. For hver PCR-syklus vil DNA-trådene dobles i antall (Sjøberg 2013).



Figur 3.2: Viser en PCR-syklus (denaturering, hybridisering og polymerisering) og hvordan veksten av DNA dobles i antall. (Illustrasjon: Abmgood u.å.).

3.5 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode for å identifisere protein eller fragmenter av DNA eller RNA. Dette blir gjort på en gel laget av agarose eller polyakrylamid. I denne oppgaven er det benyttet en agarosegel. Gelen er bygget opp av et nettverk av organiske polymerer som hindrer prøven i å bevege seg for fritt. Enden av gelen er i kontakt med en elektrodebuffer, og prøvene appliseres i brønner i gelen. Molekylene som er negativt ladet på overflaten, vil da vandre mot den positive polen, anoden (figur 3.3). Hastigheten avhenger av molekylstørrelsen, og store molekyler vil bevege seg langsommere enn små, fordi bremses av nettverket i gelen. Det kjøres samtidig en størrelsesmarkør (DNA-ladder) som inneholder en blanding av DNA molekyler med kjent størrelse, for å finne størrelsen av DNA-fragmentene. (Sjøberg 2013)



Figur 3.3: Figuren viser oppsett av gelelektroforese og hvordan DNAet beveger seg mot anoden. (Illustrasjon: LearnLabster u.å.).

3.5.1 Agarosegel

Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. Lav konsentrasjon på agarosegelen brukes dersom hensikten med gelen er å separere store DNA-fragmenter. Dersom ønsket er å separere små DNA-fragmenter, brukes en gel med høy konsentrasjon. I en 2 % agarosegel kan en separere DNA med størrelse på 100-2000 bp, mens det i en 1 % agarosegel kan separere DNA med størrelse på 500-6000 bp (Sjøberg 2013). Det er i denne oppgaven benyttet 1,5 % agarosegel.

Når man kjører PCR-produkter på en gel er det viktig at DNA-båndene er synlig. For å synliggjøre disse båndene tilsettes vanligvis et fluorescerende stoff til gelen, som gjør DNA-båndene synlig for øyet under UV-lys. Dette stoffet vil interkalere inne i DNA-molekylet, som vil si at det binder seg mellom to basepar. Tidligere ble etidiumbromid (EtBr) benyttet til dette formålet (Sjøberg 2013). I dag derimot, brukes gjerne GelRed™ eller GelGreen™. Dette er en ny generasjon av fluorescerende stoffer hvor førstnevnte erstatter EtBr grunnet dens mutagenitet, og sistnevnte erstatter stoffet SYBR da GelGreen™ i stor grad er mer følsomt (Biotium u.å. a). Når det gjelder GelRed™ og GelGreen™ er de begge et stoff som er følsomt, stabilt og trygt å bruke. De kan benyttes til farging av dsDNA, ssDNA eller RNA i både agarosegeler og polyakrylamidgeler. Både GelRed™ og GelGreen™ tilsettes den blandede, flytende agaroseløsningen før gelen blir satt til å stivne i et støpekar (Biotium u.å. b, Biotium u.å. c).

3.5.2 Tris Acetate-EDTA buffer (TAE-buffer)

TAE-buffer er en løsning som er laget av trisbase, eddiksyre og EDTA, og er den bufferen som oftest blir brukt for gelelektroforese. 1 x TAE-buffer er en fortykning av konsentrert TAE-buffer og inneholder 40 mM Tris Acetate og 1 mM EDTA med en pH på ca. 8,5. Bufferen har lav ionisk styrke og lav bufferkapasitet, og den egner seg best for elektroforese av store DNA-fragmenter (> 20 kb) (Phillips 2017). Den fortynnede bufferen brukes både i agarosegelen og som kjørebuffer i gelelektroforesekaret (Thermo Scientific u.å. a).

3.5.3 Gel-loading buffer

Gel-loading buffer brukes for å tilføre farge til prøvene, slik at det skal bli lettere å applisere de over i brønner. Bufferen inneholder i tillegg glyserol, som bidrar til å gi prøvene høyere tetthet slik at de synker ned i brønnene og ikke flyter fritt etter applisering (Thermo Scientific u.å. b). I denne oppgaven brukes Agarose Gel Loading Dye, 6X (Amresco, 3514C390). Det er en blanding av tre fargestoff, noe som gjør det enkelt å estimere hvor langt baseparene har vandret etter endt gelelektroforese. Fargestoffene som brukes er lyseblå, indigo og magenta, disse har ulike egenskaper. Førstnevnte beveger seg 4000 bp i 1 % gel, mens sistnevnte beveger seg ti bp i 1 % agarosegel. Indigo beveger seg med ca. 600 bp i en 1 % agarosegel (Amresco u.å.).

3.6 Målrettet sekvensering

I flere tilfeller når det mistenkes en infeksjonssykdom eller en tilstand blir identifisert, er målrettet sekvensering av spesifikke gener eller genregioner foretrukket (Grada & Weinbrecht 2013). Ved målrettet sekvensering blir en gruppe av gener eller en region av genomet isolert og sekvensert. Denne metoden gjør det mulig for forskere å fokusere på tid, kostnad, samt analysere data av et spesifikt interesseområde (Illumina Inc 2015).

3.6.1 Første-generasjons sekvensering

Første-generasjons sekvensering ble først utviklet i 1997, og den foretrukne metoden innenfor dette feltet er Sanger-metoden. Sekvensering ved Sanger-metoden innebærer syntese av en ny DNA-tråd ved å benytte DNAet som skal sekvenseres som et templat. Under sekvenseringen vil enkle tråder av DNA-templat blandes med primere, DNA-polymerase, fire dNTP og fire ddNTP. Sanger-metoden blir ofte kalt endeterminerings-sekvensering, som vil si at en DNA-tråd syntetiseres helt til en terminerende base blir inkorporert i den voksende kjeden. Dette stopper videre syntetisering av DNA-tråden. Når DNA-syntetiseringen stopper opp vil en sitte igjen med en samling av DNA-fragmenter av ulike lengder. Disse DNA-fragmentene er merket med hver sin fluorescerende farge, og når fragmentene kjøres med gelelektroforese vil en laserstråle kunne fremkalle sekvensen (Willey et. al 2009).

3.6.2. Andre-generasjons sekvensering

Sekvensering av nukleinsyre er en metode som benyttes for å bestemme den nøyaktige rekkefølgen av nukleotider tilstede i et DNA- eller RNA molekyl. I en andre-generasjons sekvensering blir det utført en stor parallellsekvensering, der flere millioner DNA-fragmenter fra en enkelt prøve blir sekvensert samtidig. Denne typen sekvensering gjør det mulig for et helt genom å bli sekvensert i løpet av en dag (Grada & Weinbrecht 2013).

Forberedelse av templat

Det første trinnet i en andre-generasjons sekvensering består av å lage et bibliotek bestående av nukleinsyre, enten DNA eller komplementært DNA, for så å amplifisere biblioteket. Bibliotekene dannes ved å fragmentere de aktuelle DNA-prøvene, for så å binde adaptersekvenser på enden av DNA-fragmentene. Etter dannelse av biblioteket, blir de amplifisert som en forberedelse til sekvenseringen (Grada & Weinbrecht 2013). Deretter dannes cluster-kolonier. Dette skjer ved at biblioteket lastes opp på en chip, der fragmentene fanges opp av overflatebundet oligoer som er komplementære til adapterene i biblioteket. Deretter blir hvert DNA-fragment amplifisert til klonede cluster gjennom bro-amplifisering. Når det er dannet en cluster-koloni, er templatene klare for sekvensering (Illumina Inc 2015).

Sekvensering og bildebehandling

For å oppnå sekvenser av nukleinsyre fra det amplifiserte biblioteket er metoden avhengig av sekvensering ved syntese. Fragmentene som finnes i biblioteket fungerer som et templat, og det er dette templatet det syntetiseres nye DNA-fragmenter fra. Sekvenseringen skjer ved hjelp av flere runder med vasking av fragmentene, der de kjente nukleotidene er i en sekvensiell rekkefølge. Samtidig som nukleotidene inkorporeres i den voksende DNA-kjeden, blir de også digitalt sekvensert. Sekvensering ved Illumina MiSeq baserer seg på påvisning av fluorescens, der et og et nukleotid med fluorescens inkorporeres i den voksende DNA-kjeden (Grada & Weinbrecht 2013).

Dataanalyse

Når sekvenseringen er fullført må rådata samles og sorteres. En generell dataanalyse som brukes i andre-generasjons sekvensering går ut på forbehandling av dataresultatene for å fjerne både adaptersekvenser og sekvenser av dårlig kvalitet (Grada & Weinbrecht 2013).

3.7 Tredje-generasjons sekvensering

Tredje-generasjons sekvensering ved Nanopore-teknologi ble utgitt i 2014, og er en relativt ny metode som kan benyttes til å sekvensere hele genomet. Instrumentet som ble benyttet, Oxford Nanopore MinION, er en liten håndholdt maskin som sekvenserer DNA ved å elektronisk måle forstyrrelser som oppstår i en elektrisk strøm etter hvert som DNA-molekyler passerer gjennom en nanopore (Lee et al. 2016).

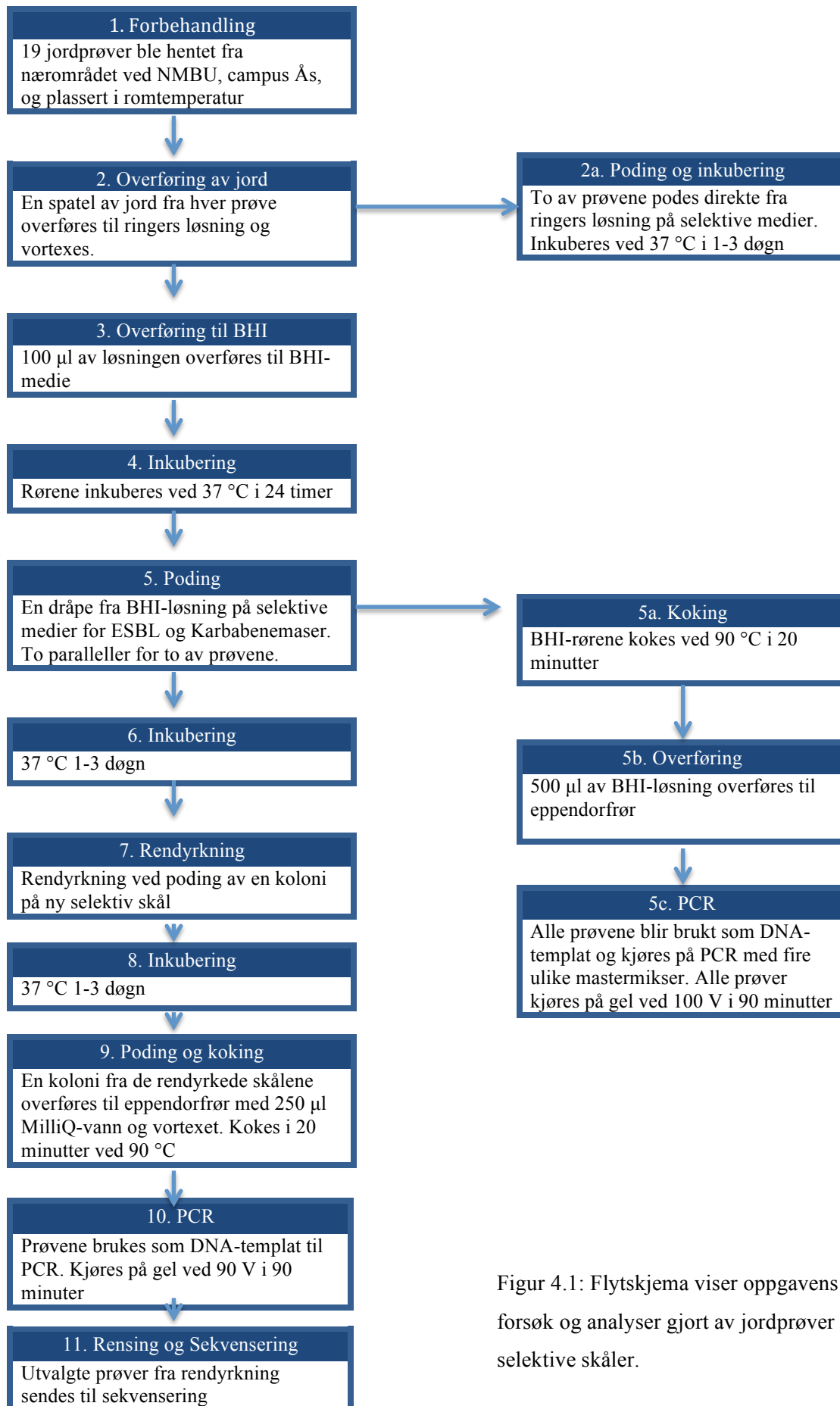
4.0 Materialer og metoder

4.1 Forberedelser

I forkant av laboratoriearbeidet ble det tatt ut jordprøver fra fire ulike områder av Professor Bjørn-Arne Lindstedt (27.10.2016), (KBM), NMBU. Jordprøvene ble hentet fra områder ved Norges miljø- og biovitenskapelige Universitet (NMBU) Campus i Ås. Områdene var Andedammen (A), bekken Niagara (N), Veterinærjordet Nord (VN) og skogholtet ved Veterinærjordet (V). Det ble totalt tatt ut 19 jordprøver, der fem av prøvene var fra Andedammen, fire fra Niagara, fem fra Veterinærjordet Nord og fem fra Veterinærjordet. Kart over uttak finnes i vedlegg 1. Jordprøvene ble bevart i kjøleskap frem til dagen før oppstart på laboratoriet.

4.2 Forberedelser av rendyrkede prøver til PCR og sekvensering

En oversikt over metoder foretatt av jordprøver på selektive skåler er vist i figur 4.1. Det praktiske arbeidet og analysene ble utført på laboratoriet for meieriteknologi og matkvalitet ved NMBU.



Figur 4.1: Flytskjema viser oppgavens gjennomførte forsøk og analyser gjort av jordprøver dyrket opp på selektive skåler.

For tillagning av 1 liter Brain Heart Infusion (BHI) medium ble oppskrift fra produsenten fulgt (Oxoid, 1266049). Flasken ble satt i vannbad ved 90 °C i 20 minutter til agaren ble oppløst og mediet var homogenisert. For raskere oppløsning ble flasken omrørt sporadisk. Mediet ble deretter pipettert over i 100 reagensrør á 10 ml hver og oppbevart i romtemperatur frem til bruk.

Dyrkning på selektive skåler og i BHI-medium

For hver av de 19 jordprøvene ble en spatel med jord overført til et reagensrør med 10 ml ringers løsning. Rørene ble mikset ved hjelp av en vortexmaskin til jorden var fullstendig oppløst. For to av jordprøvene ble det tatt ut to paralleller og podet direkte fra ringers løsning på selektive skåler for ESBL (Oxoid Brilliance ESBL) og Karbapenemase (Oxoid Brilliance CRE). Deretter ble 100 µl av løsningen overført til BHI-mediet og mikset ved hjelp av en vortexmaskin. Rørene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Ved påvist vekst ble en dråpe av løsningen overført til selektive skåler for ESBL og Karbapenemaser, ved hjelp av en podeøse. For to av prøvene ble det tatt ut to paralleller fra BHI-mediet og podet over på selektive skåler. De ble inkubert ved 37 °C i 1-3 døgn. Totalt ble 25 ESBL- og 25 Karbapenemaseskåler inkubert. I tabell 4.1. vises en oversikt over prøvenavn for prøver som ble dyrker opp på selektive skåler.

Tabell 4.1: Tabellen viser en oversikt over prøvenavn for prøver fra selektive skåler. Prøver markert med * ble sådd ut fra ringers løsning, alle andre prøver ble sådd ut fra BHI-medium.

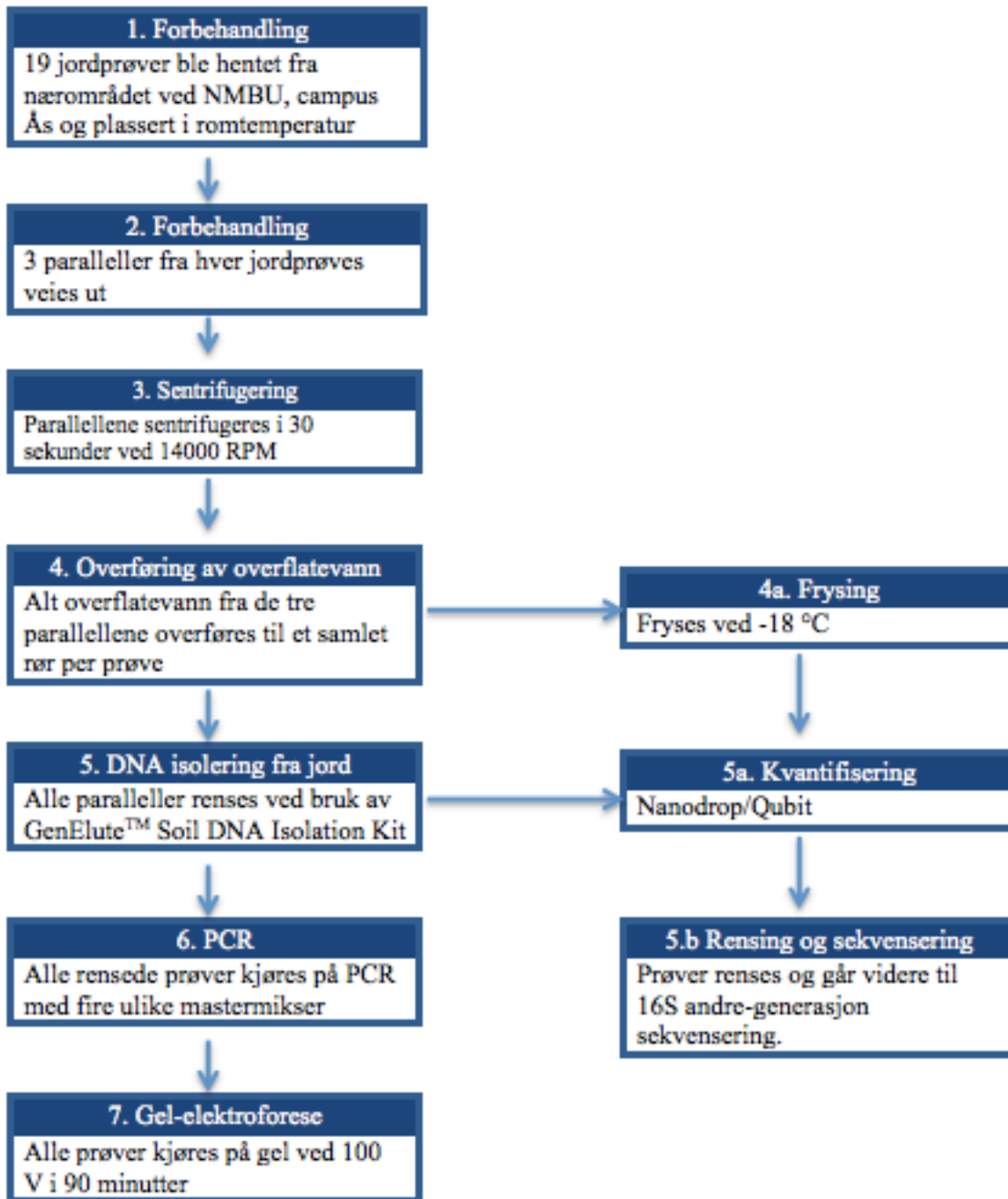
Sted	Parallell 1	Parallell 2
Niagara A	Na1	Na2
Niagara A*	Na1*	Na2*
Niagara B	Nb1	Nb2
Niagara B*	Nb1*	Nb2*
Niagara C	Nc1	-
Niagara D	Nd1	-
Andedammen A	Aa1	-
Andedammen B	Ab1	-
Andedammen C	Ac1	-
Andedammen D	Ad1	-
Andedammen E	Ae1	-
Veterinærjordet A	Va1	-
Veterinærjordet B	Vb1	-
Veterinærjordet C	Vc1	-
Veterinærjordet D	Vd1	-
Veterinærjordet E	Ve1	-
Veterinærjordet Nord A	VNa1	-
Veterinærjordet Nord B	VNb1	-
Veterinærjordet Nord C	VNc1	-
Veterinærjordet Nord D	VNd1	-
Veterinærjordet Nord E	VNe1	-

Etter poding på selektive skåler ble rørene med BHI-medium satt til koking i vannbad ved 90 °C i 20 minutter for å drepe bakteriene i mediet. Deretter ble 500 µl av løsningen overført fra BHI-mediet til eppendorfrør og satt til avkjøling. Avkjølte prøver ble senere benyttet som DNA-templat til PCR.

Skåler med påvist vekst ble reindyrket for å holde eventuelle resistensgener aktive. De ble inkubert ved 37 °C i 1-3 døgn. Fra hver skål ble en koloni overført ved hjelp av en podeøse til eppendorfrør bestående av 250 µl milliQ-vann. Eppendorf-rørene ble kokt i vannbad ved 90 °C i 20 minutter for å drepe bakteriene i løsningen. Prøvene ble senere benyttet som DNA-templat til PCR og sendt videre til 16S første-generasjons sekvensering.

4.3 Forberedelser av rensede jordprøver til PCR og sekvensering

En oversikt over metoder benyttet for rensede jordprøver er vist i figur 4.2. Det praktiske arbeidet og analysene ble utført på laboratoriet for meieriteknologi og matkvalitet ved NMBU.



Figur 4.2: Flytskjema viser oppgavens gjennomførte forsøk og analyser gjort av rensede jordprøver.

4.3.1 DNA-isolering og ekstrahering

Fra hver av de 19 jordprøvene ble det tatt ut tre paralleller á 250 mg og overført til et eppendorfrør. Rørene ble sentrifugert (5424, Eppendorf) i 30 sekunder ved 14000 rpm. Overflatevannet fra parallellene som ble skilt ut etter sentrifugering, ble pipettert ut og samlet i et eppendorfrør per jordprøve og fryst ned. Totalt 19 prøver med overflatevann ble fryst ned.

4.3.2 DNA-isolering og ekstrahering med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit

Ved DNA-isolering og ekstrahering ble det benyttet GenElute™ Soil DNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich, DNB100). En arbeidskonsentrasjon av en vaskeløsning ble forberedt ved å tilsette 42 ml av 96 % etanol til flasken Wash Solution A vedlagt i kitet.

Det ble isolert DNA fra 13 av 19 jordprøver á tre paralleller, der fem var fra Andedammen, fire fra Niagara, og to fra både Veterinærjordet og Veterinærjordet Nord. Totalt ble 39 jordprøver isolert. Oversikt over de rensede prøvene finnes i tabell 4.2.

Fremstilling av Lysat

Prøvematerialet ble resuspendert i 750 µl av Lysis Buffer G. Prøvematerialet og bufferen ble mikset på et vortexapparat før prøvematerialet ble overført til en “bead-tube” ved hjelp av en pipette. Til “bead-tube” ble det tilsatt 100 µl av Lysis Additiv A, før tubene ble vortexet i intervaller på 30 sekunder. Rørene ble deretter sentrifugert i 2 minutter ved 14000 rpm. Etter sentrifugering ble 450 µl av supernatanten overført til eppendorfrør og tilsatt 100 µl binding buffer I. Prøvene ble blandet ved å snu røret et par ganger, før de ble inkubert 5 minutter på is.

Ved endt inkubasjon ble rørene spinnert i 2 minutter ved 14000 rpm. Etter sentrifugering ble 450 µl av supernatanten overført til eppendorfrør og tilsatt 50 µl av OSR Solution. Prøvene ble blandet ved å snu røret et par ganger, før de ble inkubert 5 minutter på is. Rørene ble spinnert i 2 minutter ved 14000 rpm. 450 µl av supernatanten ble så overført til en Humic Acid Removal (kolonne) ved hjelp av en pipette, og kolonnen ble plassert i et samlør. Kolonnen ble spinnert i 1 minutt ved 8000 rpm. 230 µl av 96 % etanol ble tilsatt direkte til innholdet i samlørret.

Binding til kolonne

En spinnkolonne ble satt sammen med et samlerør, og løsningen av etanol og DNA fra trinnet over ble blandet ved hjelp av en pipette. Alt klart lysat med etanol (ca. 630 µl) ble pipettert på kolonnen og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Deretter ble innholdet i samlerøret tømt, før det ble montert tilbake på spinnkolonnen.

Vask av kolonne

500 µl av buffer SK ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Innholdet i samlerøret ble tømt, og samlerøret ble montert tilbake på spinnkolonnen. Kolonnen ble tilsatt 500 µl Wash Solution A og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Innholdet i samlerøret ble tømt, og samlerøret ble montert tilbake igjen til spinnkolonnen. Samlerøret og spinnkolonnen ble deretter sentrifugert i to minutter ved 14000 rpm for å tørke spinnkolonnen, før samlerøret ble kastet.

DNA Eluering og lagring av DNA

For DNA Eluering ble kolonnen plassert i et nytt 1,7 ml elueringsrør og tilsatt 100 µl av elueringsbuffer B. Kolonnen ble inkubert i ett minutt i romtemperatur, før den ble sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. For å forbedre det totale utbyttet av DNA med 20-30 % ble dette trinnet utført to ganger, men med 50 µl elueringsbuffer den andre gangen. Det rensede genomiske DNAet ble lagret i fryser ved -20 °C fram til det skulle bli benyttet til PCR.

Tabell 4.2: Tabellen viser en oversikt over de 39 rensede jordprøvene som ble isolert.

Sted	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
Niagara A	NA1	NA2	NA3
Niagara B	NB1	NB2	NB3
Niagara C	NC1	NC2	NC3
Niagara D	ND1	ND2	ND3
Andedammen A	AA1	AA2	AA3
Andedammen B	AB1	AB2	AB3
Andedammen C	AC1	AC2	AC3
Andedammen D	AD1	AD2	AD3
Andedammen E	AE1	AE2	AE3
Veterinærjordet A	VA1	VA2	VA3
Veterinærjordet B	VB1	VB2	VB3
Veterinærjordet Nord C	VNC1	VNC2	VNC3
Veterinærjordet Nord D	VND1	VND2	VND3

4.4 Påvisning av antibiotikaresistensgener med Polymerase Chain Reaction (PCR)

Det ble utført multipleks-PCR på 78 prøver, hvorav 39 var rensed, 17 var rendyrkede prøver og 19 var fra BHI-mediet. For hver av de fire mastermiksen var det en kontrollprøve som kun inneholdt mastermik.

Før tillaging av primermiks ble det laget en stockløsning av alle primerparene ved å tilsette utregnet mengde avionisert vann til de ulike primerne. Dette ble utført av Misti Dawn Finton, stipendiat ved meieriteknologi og matkvalitet (KBM), NMBU. Det ble deretter laget fire ulike primermiks i eppendorfrør. De ulike primermiksen bestod av tre forskjellige primerpar á ti µl av hver, totalt 60 µl primer per miks. Deretter ble det etterfylt med 440 µl avionisert vann, slik at totalvolumet på primermiksen ble 500 µl. Miksen fikk navnet M1-4. Sammensetningen av primerpar er vist i vedlegg 2.

For tillaging av mastermiks (tabell 4.3) ble oppskriften fra produsenten (QIAGEN) halvert. Med unntak av primerparene var oppskriften lik for alle PCR-programmene. For PCR av de rendyrkede prøvene ble det benyttet 1 μ l templat i stedet for 2 μ l, og totalvolumet ble i de tilfellene 24 μ l. Før tillaging av mastermiks ble de ulike komponentene i oppskriften tatt ut til tining på is, og hver komponent ble spunnet ned.

Tabell 4.3: Ingrediensliste til mastermiks for PCR. Mengdene er beregnet for en reaksjon.

Komponent	Mengde (μl)
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5
10x primer mix (2 uM av hver primer)	2,5
RNase-fritt vann	8
Templat DNA	2 (1)
Totalt	25 (24)

Etter tillaging av mastermiks ble komponentene blandet ved hjelp av en vortexmikser og spunnet ned. Det ble pipettert ut 23 μ l mastermiks til hver brønn på MicroAmp® 8-TubeStrip. Deretter ble hver brønn tilsatt 2 μ l (1 μ l) DNA-templat. Prøvene ble sentrifugert i 20 sekunder på en PCR plate spinner. Etter sentrifugering ble MicroAmp® 8-TubeStrip plassert i temperaturinkubator (SimpliAmp Thermal Cycler) for PCR. Temperatur- og tidsintervallene som ble benyttet var lik for alle typer primer. For rensede jordprøver og prøver fra BHI-mediet ble temperaturprofil 1 benyttet (tabell 4.4). For rendyrkede prøver ble temperaturprofil 2 benyttet (tabell 4.5).

Tabell 4.4: Temperaturprofil (1) for PCR-program som ble benyttet på DNA-templat fra BHI-medium og rensede jordprøver.

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Antall sykluser
Aktivering	95	15:00	1
Denaturering	94	00:30	40
Hybridisering	60	01:30	
Polymerisering	72	01:30	
Sluttpolymerisering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

Tabell 4.5: Temperaturprofil (2) for PCR-program som ble benyttet på DNA-templat fra rendyrkede prøver.

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Antall sykluser
Aktivering	95	15:00	1
Denaturering	94	00:30	35
Hybridisering	62	01:30	
Polymerisering	72	01:30	
Sluttpolymerisering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

4.5 Gelelektroforese

4.5.1 Tillaging av TAE-buffer (Tris acid EDTA)

Det ble laget 1x TAE buffer fra 50x konsentrert TAE buffer. I en målekolbe (50 ml) ble det målt opp 40 ml 50x konsentrert TAE buffer. Dette ble deretter overført i en større målekolbe (2000 ml), og fortynnet med 1960 ml avionisert vann til sluttmengden var 2000 ml.

4.5.2 Tillaging av agarosegel 1,5 %

Det ble benyttet en 1,5 % agarosegel for verifisering av PCR-produkter. Det ble veid opp 3,0 g SeaKem® agarose (LEAgarose, 0000381826) i et veieskip per 200 ml 1x TAE buffer og tilført en 250 ml kolbe. Løsningen ble varmet opp i mikrobølgeovn (600 W, Evalet) til det ble en klar løsning, fri for agarosepartikler. Hvert 30. sekund ble kolben tatt ut for omrøring for å hindre koagulering og overkoking av gelen. Deretter ble løsningen satt til avkjøling i romtemperatur i ca. 10-15 minutter. Løsningen ble omrørt i blant for å unngå geldannelse i kolben. Da løsningen var avkjølt ble den tilsatt ti µl GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, 16G1010), omrørt og deretter helt over i et vatret støpekar. Underveis i prosessen ble GelRed™ brukt opp, og det ble derfor senere benyttet GelGreen™ Nucleic Acid Stain (Biotium, 14G0910). Eventuelle luftbobler ble fjernet ved hjelp av en pipettespiss. Fra før var det plassert kammer i karet for å danne brønner i gelen for applisering av PCR-produkt. Antall brønner ble valgt ut i fra antall prøver. Støpekaret ble dekket med aluminiumsfolie og etter ca. 20 minutter var løsningen stivnet til en gel. Da gelen var stivnet ble den satt i et gelelektroforesekar og dekket med 1x TAE buffer. Før applisering av prøver på gel ble 2 µl Agarose Gel Loading Dye, 6X (Amresco, 3514C390) og 8 µl prøve fra MicroAmp® 8-Tube Strip overført til en 96-brønnsplate, blandet forsiktig ved pipettering og deretter applisert på gel. Første og midterste brønn på begge brønnerader ble tilsatt 6 µl med Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England BioLabs Inc, 0501505) som størrelsesmarkør.

Gelelektroforesekarets anode og katode ble tilkoblet BioRad PowerPac 300. Gelene ble kjørt ved 100 V i 90-120 minutter. Gelene ble fotografert under UV-lys (Molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging System) og bildene ble behandlet ved bruk av programvaren Quantity One v.4.6.7 (Molecular Imager®) for bestemmelse av båndlengde.

4.6 Forberedelser og 16S andre-generasjons sekvensering

4.6.1 Nanodrop

For kvantifisering av de 39 rensede prøvene ble hver prøve avlest på 260 nm og 280 nm ved hjelp av et spektrofotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). For kalibrering av spektrofotometeret ble det applisert 2 µl avionisert vann på den optiske linsen. Det ble applisert 2 µl prøve på spektrofotometerets optiske linse, før programvaren Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific) ble benyttet til avlesning og behandling av data fra kvantifisering.

4.6.2 Qubit

Av de 39 rensede prøvene ble i tillegg tolv prøver kvantifisert ved hjelp av Qubit. Det ble i hovedsak benyttet Qubit® dsDNA BR Assay Kit (LifeTechnologies, 1450916), men på noen av prøvene ble det benyttet Qubit™ HS Assay Kit (LifeTechnologies, 1834719). Protokollen fra produsenten ble fulgt og prøvene ble avlest i en Qubit 2.0 Fluorometer.

4.6.3 16S andre-generasjons sekvensering

16S andre-generasjons sekvensering ble utført i henhold til metoden beskrevet i en tidligere publikasjon av Porcellato & Skeie (2016). Sekvenseringen kan deles inn i to trinn: biblioteksammensetning og sekvensering, og bioinformatisk analyse av 16S-biblioteket. Arbeidet ble gjort i samarbeid med biveileder Davide Porcellato, Postdoktor ved meieriteknologi og matkvalitet (KBM), NMBU. Det ble først utført en qPCR for amplifisering av DNA på de rensede prøvene, med temperaturprofil 3 (tabell 4.6). Maskinen som ble benyttet var en LightCycler® 480 II (Roche), med programvaren LightCycler® 480 Software (Roche). Det ble utført en ny PCR på 19 av de 39 prøvene med nok amplifisering, med temperaturprofil 4 (tabell 4.7). Maskinen som ble benyttet var en C1000™ Thermal Cycler. Prøvene ble deretter sekvensert på en Illumina Miseq platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

Tabell 4.6: Temperaturprofil (3) for qPCR-program som ble benyttet på DNA-templat fra rensede prøver.

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Antall sykluser
Aktivering	98	00:30	1
Denaturering	98	00:15	35
Hybridisering	53	00:30	
Polymerisering	72	00:20	
Sluttpolymerisering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

Tabell 4.7: Temperaturprofil (4) for PCR-program som ble benyttet på PCR-produktet fra qPCR fra rensede prøver.

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Antall sykluser
Aktivering	95	15:00	1
Denaturering	95	00:30	20
Hybridisering	55	01:00	
Polymerisering	72	00:45	
Sluttpolymerisering	72	07:00	1
Avkjøling	4	∞	

4.7 Forberedelser og 16S første-generasjons sekvensering

4.7.1 Påvisning av 16S-gen ved bruk av Polymerase Chain Reaction (PCR)

Før sekvensering ble 17 rendyrkede prøver testet for 16S genet ved bruk av PCR. Dette ble utført for å bekrefte nok DNA tilstede i prøven for optimal første-generasjons sekvensering. For tillaging av Iproof 16S-mastermiks (tabell 4.8) ble det benyttet samme fremgangsmåte som forklart under punkt 4.4. Det ble pipettert ut 37 µl mastermiks til hver brønn på MicroAmp® 8-TubeStrip. Deretter ble hver brønn tilsatt 3 µl DNA-templat. Prøvene ble sentrifugert i en PCR plate spinner i 20 sekunder. Etter sentrifugering ble MicroAmp® 8-TubeStrip plassert i temperaturinkubator (C1000™ Thermal Cycler) for PCR. Temperatur- og tidsintervallene som ble benyttet ble valgt for å passe primerparene (tabell 4.9).

Tabell 4.8: Ingrediensliste til Iproof 16S-mastermiks for PCR. Mengdene er beregnet for en reaksjon.

Komponent	Mengde (µl)
5x Iproof HF buffer	8
Primer forward (5 µM)	2
Primer reverse (5 µM)	2
dNTPs	0,8
RNAse-fritt vann	23,8
Iproof DNA polymerase	0,4
Templat DNA	3
Totalt	40

Tabell 4.9: Temperaturprofil (5) for PCR-program (Iproof) som ble benyttet på DNA-templat fra rendyrkede prøver.

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Antall sykluser
Aktivering	98.0	00:30	1
Denaturering	98.0	00:10	35
Hybridisering	55.0	00:30	
Polymerisering	72.0	00:45	
Sluttpolymerisering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

Iproof 16S-mastermiks og dens PCR-program fungerte ikke optimalt for prøvene og det ble derfor bestemt å prøve en annen type. For tillaging av DreamTaq 16S-mastermix (tabell 4.10) ble det benyttet samme fremgangsmåte som forklart under punkt 4.4. Det ble pipettert ut 18 µl mastermiks til hver brønn på MicroAmp® 8-TubeStrip. Deretter ble hver brønn tilsatt 2 µl DNA-templat. Prøvene ble sentrifugert i en PCR plate spinner i 20 sekunder. Etter sentrifugering ble MicroAmp® 8-TubeStrip plassert i temperaturinkubator (C1000™ Thermal Cycler) for PCR. Temperatur- og tidsintervallene ble tilpasset primerparene (tabell 4.11). Prøvene ble i tillegg fortynnet 10x, 100x, og 1000x, og samme mastermiks og temperaturprofil ble benyttet for PCR på fortynnede prøver. Primere brukt i til Iproof 16S og DreamTaq 16S vises i tabell 4.12.

Tabell 4.10: Ingrediensliste til DreamTaq 16S-mastermiks for PCR. Mengdene er beregnet for en reaksjon.

Komponent	Mengde (µl)
10x Taq buffer	2
dNTP	0,5
Primer forward (5 µM)	1
Primer reverse (5µM)	1
Taq DNA polymerase	0,1
RNase-fritt vann	13,4
Templat DNA	2
Totalt	20

Tabell 4.11: Temperaturprofil (6) for PCR-program (DreamTaq) som ble benyttet på DNA-templat fra rendyrkede prøver.

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Antall sykluser
Aktivering	95.0	05:00	1
Denaturering	95.0	00:5	30
Hybridisering	55.0	00:5	
Polymerisering	72.0	01:30	
Sluttpolymerisering	72.0	05:00	1
Avkjøling	4.0	∞	

Tabell 4.12: Tabellen viser en oversikt over primere benyttet til Iproof 16S og DreamTaq16S til PCR for å bekrefte nok DNA tilstede i prøven for optimal første-generasjons sekvensering.

Målgen	Primer	Sekvens (5' → 3')	Produktstørrelse
16S	1F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	1505 bp
16S	5R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1505 bp

Etter påvisning av 16S-gen ble de 17 rendyrkede prøvene med DNA rensert i henhold til protokoll QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN, 145042904). Det ble deretter utført en Qubit på alle prøvene for å sikre nok innhold av DNA, samt for beregning av riktig mengde av prøve og primer. Fremgangsmåten for bruk av Qubit er forklart i 4.6.2. Mengdene av prøve og primer for forward og right (til sammen 10 µl) ble pipettert over i et nytt halvannen ml eppendorfrør merket med egne koder og sendt til 16S første-generasjons sekvensering. Totalt ble 34 prøver sendt til 16S første-generasjons sekvensering.

4.8 Forberedelser og helgenom tredje-generasjons sekvensering

I forkant av tredje-generasjons sekvensering ble en koloni fra hver rendyrkede skål podet i hvert sitt rør med 10 ml BHI-medium. Rørene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Det ble deretter utført en tredje-generasjons sekvensering med MinION på ti rendyrkede prøver av Misti Dawn Finton med Rapid Barcoding Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies), stipendiat ved meieriteknologi og matkvalitet KBM, NMBU.

4.9 Datanalyser

4.9.1 16S andre-generasjons sekvensering

Behandling av rådata fra sekvenseringen ble utført av Davide Porcellato, Postdoktor ved meieriteknologi og matkvalitet (KBM), NMBU.

4.9.2 16S første-generasjons sekvensering

Behandlingen av rådata fra sekvenseringen ble utført ved bruk av programmet BLAST-Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), hvor NuclotideBLAST ble benyttet. BLAST ble benyttet for å finne regioner av likhet mellom biologiske sekvenser ved å sammenligne nukleotideseqvenser til sekvenser i en database og kalkulert statistisk signifikans (Blast.gov).

4.9.3 Helgenom tredje-generasjons sekvensering

Behandling av rådata ble utført av veileder og Professor Bjørn-Arne Lindstedt, Postdoktor Davide Porcellato og Stipendiat Misti Dawn Finton (KBM), NMBU.

4.10 Prøveoversikt

De 17 renyrkede prøvene ble fordelt mellom deltakerne i denne studien på grunnlag av hvilke prøver som hadde fått positiv vekst på selektive skåler, resultat fra første-generasjons sekvensering og påvisning av resistens-genfamilier ved PCR og gelelektroforese. Prøvene som vektlegges i denne oppgaven vises i tabell 4.13.

Med utgangspunkt i fordelingen av de renyrkede prøvene, ble de rensede prøvene fra andre-generasjons sekvenseringen også fordelt mellom deltakerne i studien. Prøvene som vektlegges vises i tabell 4.14.

Tabell 4.13: Tabellen viser en oversikt over hvilke prøver som vektlegges i denne oppgaven. med Prøver markert med * ble sådd ut fra ringers løsning. Alle andre prøver ble sådd ut fra BHI-medium.

Sted	Parallell 1		Parallell 2	
	ESBL (E)	CRE (C)	ESBL (E)	CRE (C)
Niagara A	Na1 (E)	-	-	-
Niagara A *	Na1* (E)	Na1 (C)	Na2* (E)	-
Niagara B *	Nb1* (E)	Nb1 (C)	-	-
Niagara C	Nc1 (E)	-	-	-
Niagara D	Nd1 (E)	Nd1 (C)	-	-
Andedammen B	Ab1 (E)			
Andedammen C	Ac1 (E)	-	-	-
Andedammen D	Ad1 (E)	-	-	-

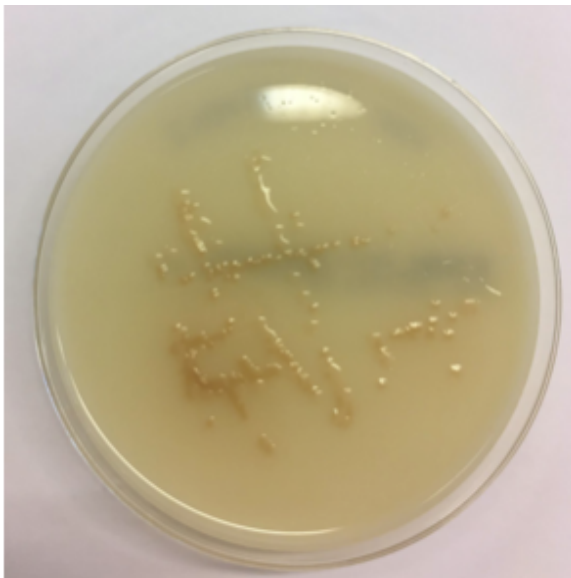
Tabell 4.14: Tabellen viser en oversikt over hvilke av de rensede jordprøvene som vektlegges i denne oppgaven.

Sted	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
Niagara A	NA1	NA2	NA3
Niagara B	NB1	NB2	NB3
Niagara C	NC1	NC2	NC3
Niagara D	ND2	ND2	ND3
Andedammen A	AA1	AA2	AA3
Andedammen B	AB1	AB2	AB3
Andedammen C	AC1	AC2	AC3
Andedammen D	AD1	AD2	AD3

5.0 Resultater

5.1 Påvisning av antibiotikaresistens på selektive skåler

Resultatet fra prøve Na1* (E) (figur 5.1) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Lysebrun fargereaksjon indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*. Prøve Na1*(C) (figur 5.2) viser positiv bakterievekst på Karbapenemase selektiv skål (Oxoid Brilliance CRE). Brun/grå fargereaksjon på skål indikerer vekst av bakterier som *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Serratia* og *Citrobacter*.

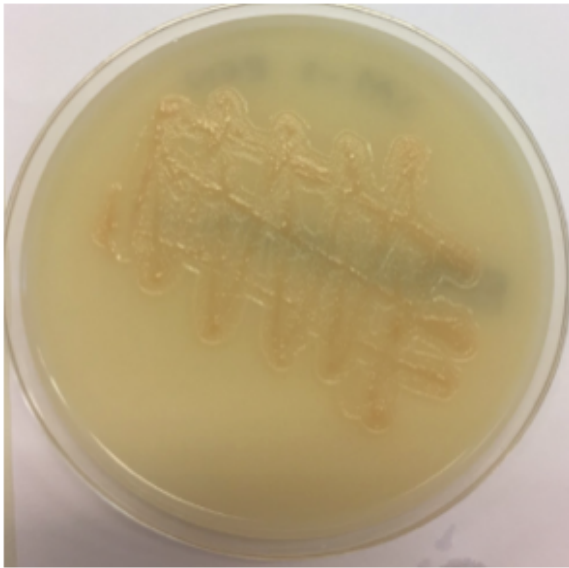


Figur 5.1: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Na1* (E).



Figur 5.2: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Na1* (C).

Resultatet fra prøve Na1 (E) (figur 5.3) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Lysebrun fargereaksjon indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*. Prøve Na2 (E) (figur 5.4) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Lysebrun med oransje-skjær fargereaksjon indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.

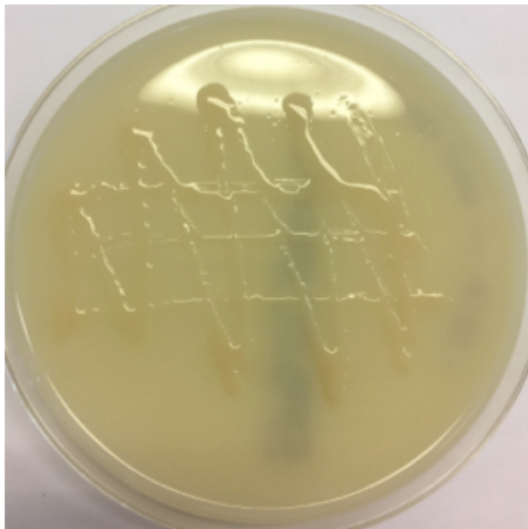


Figur 5.3: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Na1 (E).

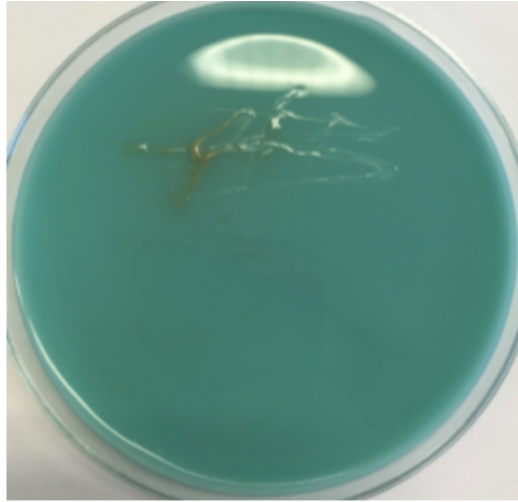


Figur 5.4: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Na2 (E).

Resultatet fra prøve Nb1* (E) (figur 5.5) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Skålens vekst er fargeløs som indikerer bakterier som *Salmonella* og *Acinetobacter*. Nb1* (C) (figur 5.6) viser positiv bakterievekst på Karbapenemase selektiv skål (Oxoid Brilliance CRE). Lysebrun fargereaksjon på CRE-agar kan indikere bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.



Figur 5.5: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Nb1* (E).



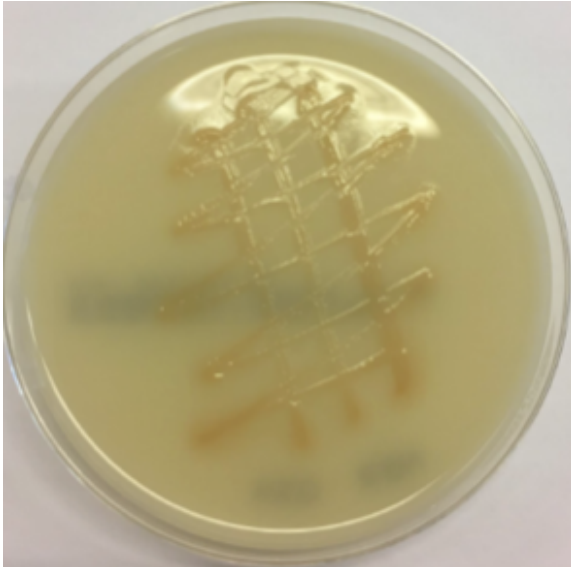
Figur 5.6: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Nb1* (C).

Prøve Nc1 (E) (figur 5.7) viser positiv vekst bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Skålens vekst er lysebrun med skjær av oransje, dette indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.

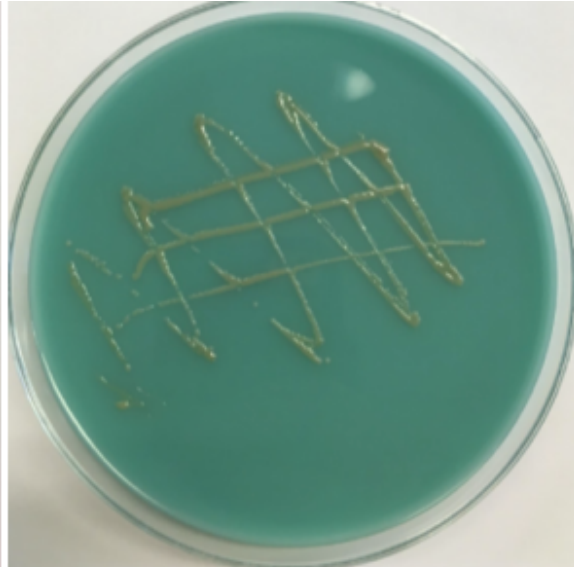


Figur 5.7: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Nc1 (E).

Resultatet fra prøve Nd1 (E) (figur 5.8) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Skålens vekst er lysbrun med skjær av oransje, dette indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*. Nd1 (C) (figur 5.9) viser positiv bakterievekst på Karbapenemase selektiv skål (Oxoid Brilliance CRE). Lysebrun fargereaksjon på CRE-agar kan indikere bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.



Figur 5.8: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Nd1 (E)



Figur 5.9: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Nd1 (C).

Resultatet fra prøve Ab1 (E) (figur 5.10) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Skålens vekst er lysbrun med skjær av oransje, dette indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.

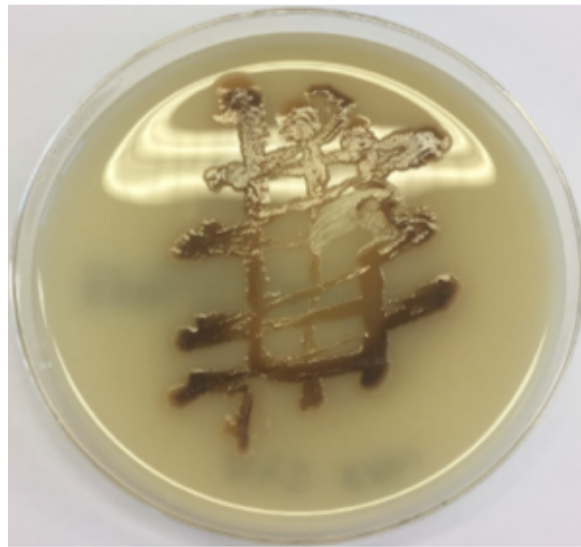


Figur 5.10: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Ab1 (E)

Resultatet fra prøve Ac1 (E) (figur 5.11) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). Skålens vekst er mørk brun som indikerer bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*. Ad1 (E) (figur 5.12) viser positiv bakterievekst på ESBL selektiv skål (Oxoid Brilliance ESBL). I likhet med prøve Ac1 (E) er også denne skålens vekst mørk brun som kan indikere bakterier som *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.



Figur 5.11: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Ac1 (E)



Figur 5.12: Figuren viser positiv bakterievekst for prøve Ad1 (E).

5.2 Påvisning av antibiotikaresistensgener av rendyrkede prøver ved PCR og gelelektroforese

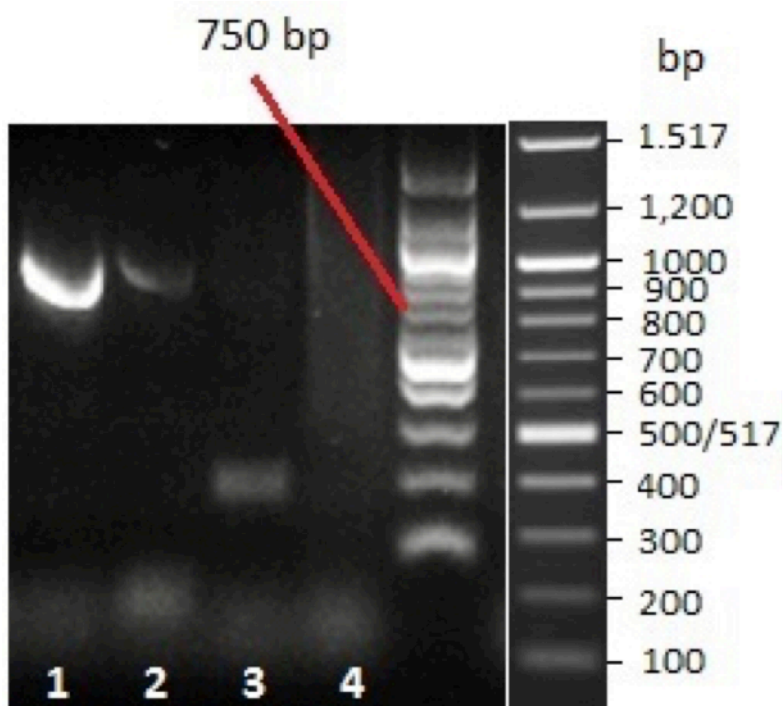
Tabell 5.1 summerer resultatene fra PCR og gelelektroforese for påvisning av resistensgener ved bruk av mastermikros 1-4. Av de tolv prøvene ble SHV-genet påvist i 16,5 %, TEM-genet i 33,3 % og VIM-genet 16,5 % av prøvene. De resterende resistensgenene (CTX-M, OXA, NMD, KPC og OXA-48) ble ikke påvist ved bruk av PCR og gelelektroforese.

Tabell 5.1: Oppsummering av resultater fra PCR og gelelektroforese for påvisning av resistensgener ved bruk av M1, M2, M3 og M4.

12 prøver	M1			M2			M3			M4
	CTX-M	OXA	SHV	CTX-M	CTX-M	TEM	NMD	VIM	KPC	OXA-48
Sum +	0	0	2	0	0	4	0	2	0	0
Sum -	12	12	10	12	12	8	12	10	12	12
Totalt	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
% +	0 %	0 %	16,5 %	0 %	0 %	33,3 %	0 %	16,5 %	0 %	0 %

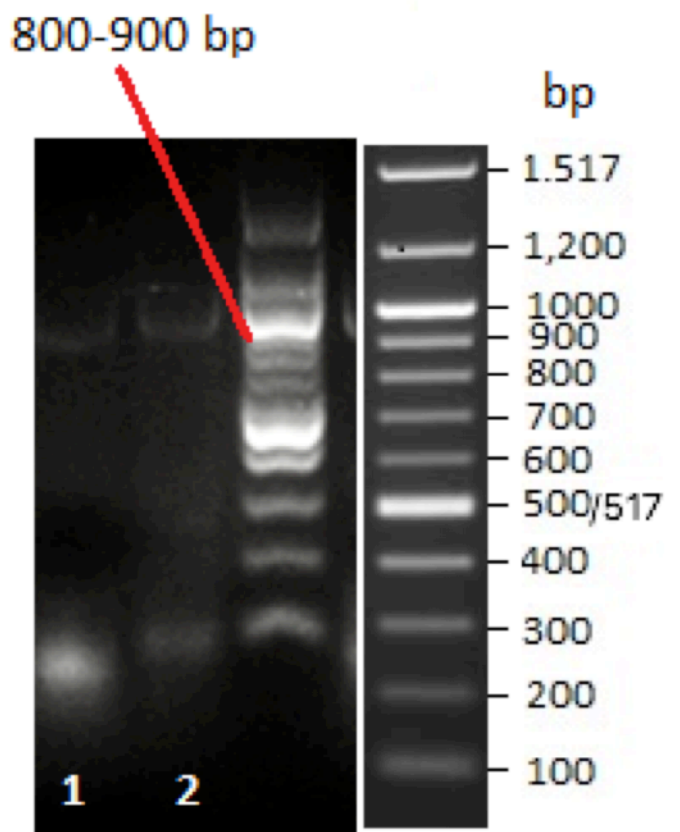
Eksempelbilder fra gelelektroforese

Eksempelbilde for påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av primere med målgen CTX-M, OXA og SHV (mastermiks 1). Produktstørrelse for målgenene er henholdsvis 404 bp, 564 bp og 713 bp. Markøren er en Quik-loadR 100 bp DNA ladder. Figur 5.13 viser påvisning av SHV-gen i brønn 1 og 2. I brønn 3 og 4 ble det ikke påvist målgen.



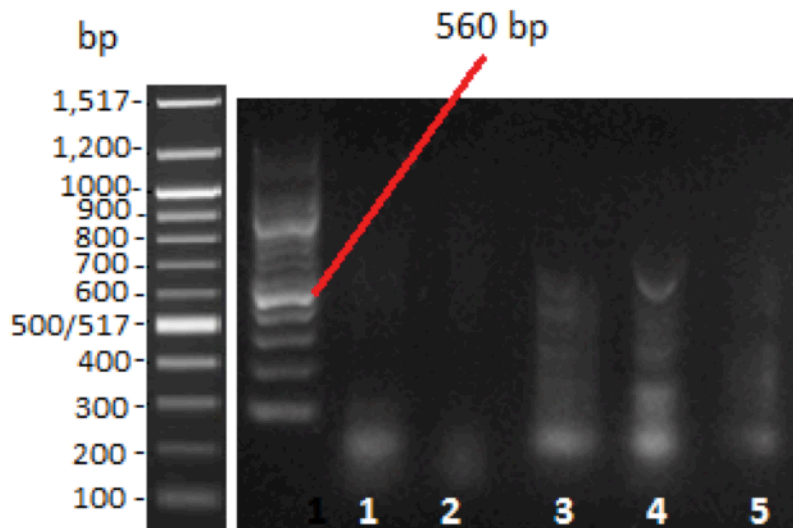
Figur 5.13: Påvisning av innhold av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermiks 1. 1) prøve Na1* (C) 2) prøve Na1* (E) 3) prøve Na2 (E) 4) prøve Na2.

Eksempelbilde for påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av primere med målgene CTX-M, CTX-M og TEM (mastermik 2). Produktstørrelse for målgene er henholdsvis 561 bp, 688 bp og 800 bp. Markøren er Quik-loadR 100 bp DNA ladder. Det ble påvist TEM-gen i brønn 1 og 2 (figur 5.14). Resterende resultater fra påvisning ved bruk av mastermik 2 finnes i vedlegg 3.



Figur 5.14: Påvisning av innhold av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermik 2.
1) Prøve Nd1 (E) 2) Prøve Nd1 (C).

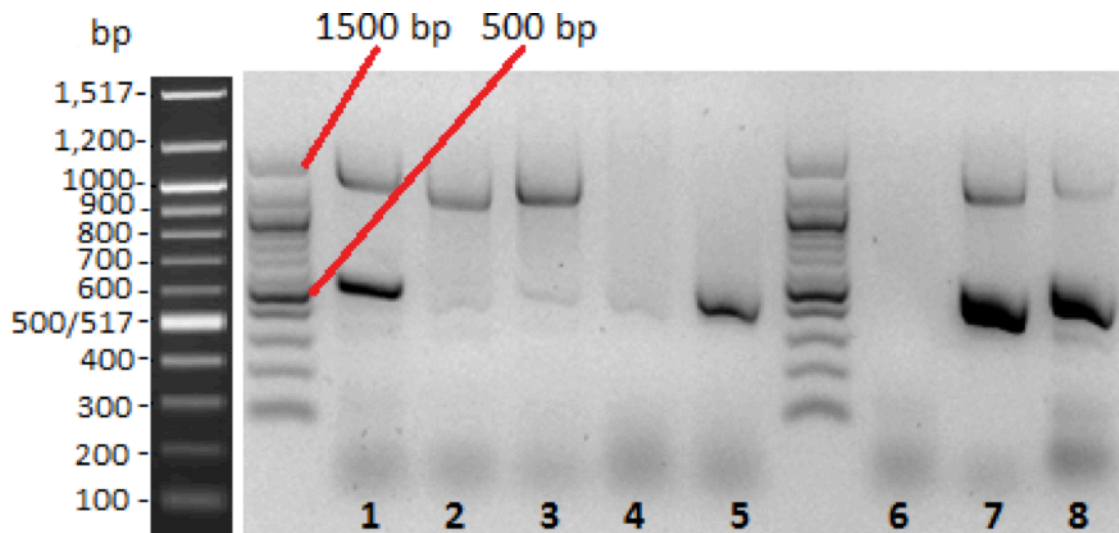
Eksempelbilde for påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av primere med målgen NDM, VIM og KPC (mastermik 3). Produktstørrelse for målgenene er henholdsvis 157 bp, 564 bp og 460 bp. Markøren er Quik-loadR 100 bp DNA ladder. Det ble påvist VIM-gen i brønn 4. Brønn 3 viser antydninger til VIM-gen (figur 5.15).



Figur 5.15: Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermik 3.

1) - 2) - 3) Prøve Nc1 (E) 4) Prøve Nd1 (E) 5) Prøve Nd1 (C). (Brønner merket “-” er prøver som ikke vektlegges i denne oppgaven).

Eksempelbilde for påvisning av genfamilier ved bruk av primere med målgen OXA-48, *Enterobacteriaceae* og 16S (mastermik 4). Produktstørrelse for målgenene er henholdsvis 268 bp, 512 bp og 1505 bp. Markøren er Quik-loadR 100 bp DNA ladder. Det ble påvist *Enterobacteriaceae*-gen i brønn 1, 5, 7 og 8. Det ble påvist 16S-gen i brønn 1-3, 7 og 8 (figur 5.16). Resterende resultater fra påvisning ved bruk av mastermik 4 finnes i vedlegg 3.



Figur 5.16: Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermik 4.

1) Prøve Na1 (E), 2) Prøve Na1* (C), 3) Prøve Na1* (E), 4) Prøve Na2 (E), 5) Prøve Na2 (E), 6) Prøve Nb1*(E) 7) Prøve Nb1* (E). 8) Prøve Nb1* (C).

5.3 Påvisning av bakterieidentitet av rendyrkede prøver ved 16S første-generasjons sekvensering

Det ble påvist bakterieidentitet i ti (83%) av tolv prøver (tabell 5.2). Et utdrag av prøvene med høyest bakterieidentitets-score finnes i vedlegg 4. Halvparten av prøvene fra Niagara viser funn av *Bordetella petrii*, mens det i de resterende prøvene fra Niagara fikk påvist *Pseudomonas putida*, *Achromobacter* spp og *Ochrobactrum* spp. Felles for prøvene fra Andedammen var at det ble påvist *Pseudomonas* spp.

Tabell 5.2: Tabellen viser påvist bakterieidentitet fra rendyrkede prøver ved første-generasjonssekvensering og brukt av programmet BLAST.

Prøvenavn	Bakterieidentitet	%
Na1* (E)	<i>Bordetella petrii</i>	99
Na1* (C)	<i>Pseudomonas putida</i>	99
Na1 (E)	<i>Achromobacter</i> spp.	99
Na2 (E)	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	100
Nb1* (E)	<i>Bordetella petrii</i>	99
Nb1* (C)	<i>Bordetella petrii</i>	99
Nc1 (E)	Ukjent	
Nd1 (E)	<i>Bordetella petrii</i>	100
Nd1 (C)	<i>Bordetella petrii</i>	99
Ab1 (E)	Ukjent	
Ac1 (E)	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
Ad1 (E)	<i>Pseudomonas</i> spp.	99

5.4 Påvisning av bakterieidentitet og resistensgener i rendyrkede prøver ved helgenom tredje-generasjons sekvensering

På grunn av kapasitet ble kun syv av tolv prøver sekvensert ved tredje-generasjons sekvensering. Det ble påvist bakterieidentitet i syv (100 %), og resistensgener i seks (85,7 %), av de syv prøvene som ble sekvensert. Resultatene fra tredje-generasjons sekvensering (tabell 5.3) viser at det ble påvist *Bordetella petrii* i prøve Nb1* (C), Nd1 (E) og Nd1 (C). Prøve Nb1* (C) har fått påvist genene OXA og SHV, og det er trolig en forurensing av *Staphylococcus epidermidis* tilstede i prøven. I Nd1 (E) og Nd1 (C) er det påvist henholdsvis VIM-gen og TEM-gen. *Pseudomonas fluorescens* ble påvist i to prøver, Nc1 (E) og Ad1 (E), hvor det i Nc1 (E) ble funnet OXA, CTX-M, SHV, GES og VIM-gener, og i Ad1 (E) ble genene GES, OXA og CTX-M påvist. Sekvenseringen viser også at det ble påvist *Ochrobactrum anthropi* med VIM-gen i prøve Na1* (C). I prøve Ad1 (E) viser sekvenseringen *Pseudomonas putida*, men det er derimot ikke blitt påvist et resistensgen

Tabell 5.3: Tabellen viser påvist bakterieidentitet og resistensgener fra rendyrkede prøver ved tredje-generasjons sekvensering

Prøvenavn	Bakterieidentitet	Resistensgen familier
Na1* (E)	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Na1* (C)	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	VIM
Na1 (E)	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Na2 (E)	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Nb1* (E)	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Nb1* (C)	<i>Staphylococcus epidermidis/ Bordetella petrii</i>	OXA SHV
Nc1 (E)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	OXA, CTX-M, SHV, GES, VIM
Nd1(E)	<i>Bordetella petrii</i>	VIM
Nd1 (C)	<i>Bordetella petrii</i>	TEM
Ab1 (E)	<i>Pseudomonas putida</i>	Ingen påvisning
Ac1 (E)	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Ad1(E)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GES, OXA, CTX-M

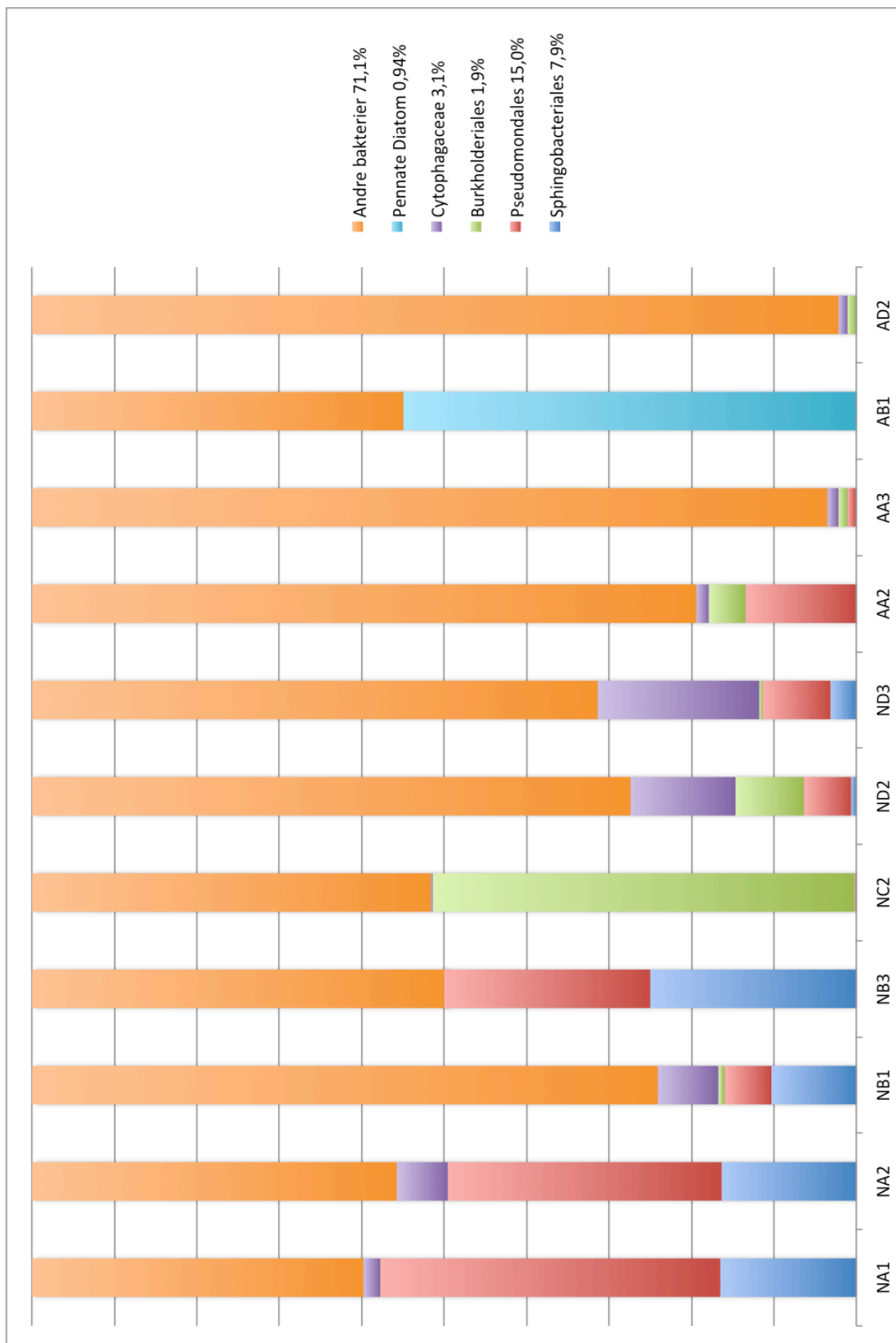
Tabell 5.4 summerer resultatene fra tredje-generasjons sekvensering for påvisning av resistensgener. Av de syv prøvene fikk seks påvist et eller flere resistensgen. VIM- og OXA-genet ble påvist i 42,8 %, SHV-, CTX-M- og GES-genet i 28,6 % og TEM-genet i 14,3 % av prøvene.

Tabell 5.4: Oppsummering av resultater fra tredje-generasjons sekvensering for påvisning av resistensgener.

	VIM	OXA	SHV	CTX-M	TEM	GES
Sum +	3	3	2	2	1	2
Sum -	4	4	5	5	6	5
Totalt	7	7	7	7	7	7
% +	42,8 %	42,8 %	28,6 %	28,6 %	14,3 %	28,6 %

5.5 Påvisning av mikrobiota i rensede prøver ved 16S andre-generasjons sekvensering

Av de 24 rensede prøvene som vektlegges i denne oppgaven var det kun elleve (45,7%) prøver som fikk påvist mikrobiota (Figur 5.17), og 13 (54%) hadde for lite innhold av DNA til å bli sekvensert. Det ble påvist store variasjoner i mikrobiota mellom prøver fra områdene Niagara og Andedammen, og det var likheter i mikrobiota fra samme område. De fleste prøvene fra Niagara har et større innhold av Pseudomonadales, Sphingobacteriales og Cytophagaceae, med unntak av NC2 som har et høyt innhold av Burkholderiales. Prøver fra Andedammen hadde generelt lavere innhold av bakterier enn Niagara-prøvene, og det var større variasjoner innad i prøvene fra Andedammen. AB1 skiller seg ut ved å ha et høyt innhold av Pennate Diatom. Felles for alle prøvene er at de inneholdt store mengder med andre bakterier.



Figur 5.17: Figuren viser variasjon i mikrober mellom jordprøvene fra Niagara og Andedammen. De seks mest representerte bakteriene, inkludert gruppen andre bakterier tilsvarer til sammen 100%.

Tabell 5.5 viser nanodrop-målinger gjort på de rensede prøvene. Forholdstallet mellom 260/280 nm forteller noe om renheten i prøven og alle prøvene fra Niagara hadde et forholdstall lik eller høyere enn 1,8, med unntak av en prøve. Alle prøvene fra Andedammen hadde en renhet under 1,8 ved 260/280 (tabell 5.5).

Tabell 5.5: Tabellen viser renheten i DNA-løsningen (260/280) i prøvene som fikk påvist mikrobiota.

Prøve	Renhet (260/280)
NA1	1,8
NA2	1,98
NB1	1,97
NB3	2,11
NC2	2,55
ND2	1,8
ND3	1,62
AA2	1,49
AA3	1,73
AB1	1,77
AD2	1,76

Alle resultatene fra metodene som er utført på rendyrkede prøver fra selektive skåler er oppsummert i tabell 5.6.

Tabell 5.6: Tabellen viser en oppsummering av resultatene fra alle metodene som er utført på rendyrkede prøver.

Prøve	Vekst på skål	Resistensgen familier fra PCR og gel	Første-generasjons sekvensering	Tredje-generasjons sekvensering	Resistensgen familier fra tredje-generasjons sekvensering
Na1* (E)	Positiv	SHV TEM	<i>Bordetella petrii</i>	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Na1* (C)	Positiv	SHV	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Ochrobactrum anthrop</i>	-
Na1 (E)	Positiv	-	<i>Achromobacter</i> spp.	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Na2 (E)	Positiv	-	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Nb1* (E)	Positiv	-	<i>Bordetella petrii</i>	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Nb1* (C)	Positiv	-	<i>Bordetella petrii</i>	<i>Bordetella petrii/Staphylococcus epidermidis</i>	OXA SHV
Nc1 (E)	Positiv	VIM	Ukjent	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	OXA, CTX-M, SHV, GES, VIM
Nd1 (E)	Positiv	VIM TEM	<i>Bordetella petrii</i>	<i>Bordetella petrii</i>	VIM
Nd1 (C)	Positiv	TEM	<i>Bordetella petrii</i>	<i>Bordetella petrii</i>	TEM

Ab1 (E)	Positiv	TEM	Ukjent	<i>Pseudomonas putida</i>	-
Ac1 (E)	Positiv	-	<i>Pseudomonas</i> spp.	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
Ad1 (E)	Positiv	-	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> <i>flourescens</i>	GES, OXA, CTX-M

6.0 Diskusjon

6.1 Antibiotikaresistens ved bruk av selektive skåler

Skålene som ble benyttet er utviklet med hensyn på hvilke ESBL-produserende bakterier som utgjør et problem i helsesektoren, som *Klebsiella* spp, *E. coli* spp. og *Enterobacter*. Professor Lindstedt (Pers. med. Lindstedt 2017) opplyser om at skålene ikke er testet for bakterier det er vanlig å finne i miljøprøver som for eksempel i fra jord. Dette betyr at fargereaksjonen på skålene er lite pålitelig for våre prøver, og kan derfor ikke benyttes til å avgjøre hvilken eller hvilke bakterier som er dyrket opp. Ved positiv vekst ble det påvist fenotypisk antibiotikaresistens mot bredspektret β -laktam antibiotika.

Alle prøvene fikk påvist antibiotikaresistens ved utsåing på selektive skåler. Det vil si at bakteriene som vokste på skålene i hovedsak hadde resistens mot β -laktamantibiotika som penicilliner, cefalosporiner, men ikke karbapenemer. Tre av prøvene hadde vekst på skåler med karbapenemer, noe som betyr at disse bakteriene kan ha resistens mot alle β -laktamantibiotika, som penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer. Det er vanskelig å si om bakteriene som vokste på de selektive skålene er ESBL-produserende bakterier eller om de benytter seg av andre resistensmekanismer for å danne resistens (Pers. med. Lindstedt 2017). Vekst på skålene bekrefter derimot at bakteriene har mekanismer for antibiotikaresistens mot β -laktamantibiotika.

Det er foreløpig få andre studier om antibiotikaresistens fra miljøprøver som jord, og det kan tyde på at dette er noe det ikke forskes mye på. Tilfeller av antibiotikaresistens i Norge er som regel knyttet til utenlandsreiser, import av mat eller sykehusinnleggelse utenlands (NORM/NORM-VET 2015), men resultatene fra dette forsøket kan derimot tyde på at det både i dag og i fremtiden vil være mulig å bli smittet med antibiotikaresistens på andre måter. Funnene er oppsiktsvekkende da Norge ikke har blitt vurdert som et potensielt reservoar for antibiotikaresistens.

6.2 Antibiotikaresistensgener ved bruk av PCR og gelelektroforese

Påvisning av antibiotikaresistensgener ved bruk av multipleks-PCR og gelelektroforese ble utført for å finne ut om det var tilstedeværelse av ESBL- eller karbapenemaseproduserende bakterier i jordprøvene. Ved PCR og gelelektroforese ble det påvist to ulike resistensgen i to av prøvene, og ett resistensgen i fire av prøvene. Av tolv prøver tilhørte to (16,5 %) SHV-, fire (33,3 %) TEM- og to (16,5 %) VIM-genfamilien. Påvisning av antibiotikaresistensgener ved tredje-generasjons sekvensering ble i hovedsak benyttet for å bekrefte funn fra PCR og gelelektroforese, men også for å eventuelt detektere andre resistensgener. På grunn av kapasitet ble kun syv av tolv prøver som vektlegges i denne oppgaven tredje-generasjons sekvensert. Av disse ble ett resistensgen påvist i tre prøver, og tre prøver fikk påvist to eller flere resistensgener. Av syv prøver tilhørte tre (42,8 %) VIM og/eller OXA-genfamilien, to (28,6 %) SHV, CTX-M og/eller GES-genfamilien og en (14,3 %) TEM-genfamilien.

Påvisning av antibiotikaresistensgener ved tredje-generasjons sekvensering bekrefter i noen tilfeller samme resultater som påvisning av antibiotikaresistensgener ved PCR og gelelektroforese. I en prøve ble det påvist et VIM-gen ved PCR, som ikke ble påvist ved tredje-generasjons sekvensering. Dette kommer sannsynligvis av at VIM sitter på svært bevegelig genetiske elementer, og at sekvenseringen ble utført en god stund etter PCR-analysen. Det er derfor stor sannsynlighet for at VIM-genet har flyttet seg ut av bakterien den var lokalisert i fra starten. VIM er en av de vanligste familiene innenfor gruppe B Karbapenemaser, og de er som regel lokalisert innenfor ulike integron-strukturer hvor de er blitt inkorporert som genkassetter. Dersom integronene er plassert på plasmider eller transposoner kan de overføres fra en bakterie til en annen, noe som er en grunn til bekymring (Queenan og Bush 2007). Det samme gjelder for CTX-M, SHV og TEM, da dette er plasmid medierte resistensgener (Salam & Haque 2010, Chaudhary & Aggarwal 2004) som kan overføres via horisontal genoverføring (Brolund 2014).

I tillegg oppdaget tredje-generasjons sekvensering en god del flere gener enn det som ble oppdaget ved PCR. Primerne som ble benyttet i denne oppgaven er svært spesifikke, og de plukker kun opp et begrenset utvalg av β -laktamase-genfamilier. Sekvenseringen kan derimot detektere alle resistensgener som er tilstede.

I seks av de tolv rendyrkede prøvene ble det påvist resistensgener, noe som betyr at de er ESBL- eller Karbapenemase-produserende bakterier. I de resterende prøvene ble det ikke påvist resistensgener ved PCR og gelelektroforese. I tillegg var det én prøve som ikke fikk påvist resistensgener ved tredje-generasjons sekvensering. Det er ikke grunnlag for å kunne si noe om produksjon av antibiotikaresistente enzymer i disse prøvene og det kan være flere årsaker til at det ikke ble påvist resistensgener. Eksempelvis ble det kun benyttet primere for ESBL- og karbapenemasegener og det finnes derfor flere resistensgener det ikke ble testet for i denne oppgaven, det kan derfor ikke utelukkes helt at disse bakteriene ikke har noen form for antibiotikaresistens-produserende gener. Andre årsaker til at det ikke ble påvist antibiotikaresistensgener kan være at bakteriene benytter seg av andre resistensmekanismer. Bakterier trenger ikke nødvendigvis å produsere enzymer for å hydrolysere antimikrobielle midler, de kan også benytte seg av efflukspumper eller modifisere på målsetet (Guilfoile 2007).

I likhet med resultatene fra de selektive skålene er påvisning av resistensgenfamilie oppsiktvekkende funn i Norge. Dette gjelder spesielt med tanke på at flere av genene tilhører gruppen ESBL_{KARBA}, som gir resistens mot de fleste typer tilgjengelig antimikrobielle midler (Folkehelseinstituttet 2017b).

Sammenligning mellom funn gjort i denne studien og kliniske- og dyreisolater i Norge

Sammenlignet med andre steder i verden har Norge vært svært få tilfeller og utbrudd forårsaket av ESBL-produserende bakterier hos mennesker. Disse tilfellene oppstår kun sporadisk, men det har vært en kraftig økning de siste årene til tross for at nivået fortsatt er lavt (NORM/NORM-VET 2015).

Rapportene fra NORM/NORMVET (2013, 2014, 2015) informerer om at gener fra OXA-familien ble påvist i kliniske isolater fra pasienter både 2013, 2014 og 2015, og gener fra VIM-familien i 2014 og 2015. I 2013 ble det påvist gener fra OXA-familien i kun tre isolater, mens tallet i 2015 hadde økt til 16. For VIM-familien var det en fordobling fra 2014 til 2015, hvor det ble påvist et isolat med VIM i 2014, og to isolater i 2015. I 2014 ble det påvist ESBL_{KARBA}-produserende *Enterobacteriaceae* hos elleve pasienter, og i 2015 hos 30 pasienter. Fra 2014 til 2015 var det dermed en økning på tre ganger i antall pasienter med ESBL_{KARBA}-produserende *Enterobacteriaceae*.

I 2015 ble *E. coli* i blodkulturer fra mennesker undersøkt, og NORM/NORM-VET (2015) rapporterte at 6,5 % av de undersøkte kulturene var ESBL_{A/M}-positive, som var en økning fra 5,8 % i 2014. En stor andel av disse genene fikk påvist genfamilien CTX-M, men

det ble også påvist gener fra SHV-familien. Fra *E. coli* i urin var 3,1 % ESBL-positive, og også her tilhørte en stor andel av de påviste resistensgenene CTX-M. *Klebsiella* spp. i urin ble undersøkt, og 3,3 % av isolatene var ESBL-positive med funn av familiene CTX-M og SHV.

I 2013 ble det resistentestet *E. coli* i hund, eggproduserende høner, kalkunflokker og kalkunkjøtt. Det ble i hundeisolatene påvist ESBL-produserende *E. coli* med blant annet resistensgener fra genfamilie CTX-M (NORM/NORM-VET 2013). I 2014 ble det undersøkt for resistens i norsk kylling, men det var ingen likhet blant påviste resistensgener i denne oppgaven og påviste resistensgener fra norsk kylling (NORM/NORM-VET 2014). I 2015 ble storfe og svin undersøkt for resistens, i hovedsak mot tredje-generasjons cefalosporiner. Det ble i hovedsak funnet AmpC-gener, men det var også et par isolater fra storfekjøtt og tre fra svin, som inneholdt gener fra genfamilie CTX-M. Storfe- og svineisolatene ble også undersøkt for tilstedeværelse av karbapenemaseproduserende *E. coli*, men det ble ikke påvist (NORM/NORM-VET 2015).

Ved sammenligning av resultatene fra denne studien og NORM/NORM-VET-rapporter tilbake til 2013 forekommer det likheter mellom genfamilier påvist i denne studien og genfamilier funnet i kliniske isolater i Norge. Blant annet er familiene VIM, OXA, CTX-M og SHV tidligere blitt påvist hos norske pasienter. Dette er resistensgener som vanligvis er forbundet med kliniske prøver og ikke er normalt å finne i jord. Det at disse genfamiliene nå er påvist i jord kan bety at forekomst av resistensgener i Norge ikke lenger bare er knyttet til utenlandsreiser eller sykehusopphold i utlandet. De resterende resistensfamiliene påvist i denne studien har ikke blitt funnet hos pasienter mellom 2013 og 2015. Det har vært en økning i antall pasienter med påviste resistensgener, som er en bekymrede utvikling.

Forekomsten av antibiotikaresistente bakterier i dyr er relativt lavt i Norge. Det bekreftes ved funnene gjort tilbake til 2013 utført av NORM/NORM-VET. Resistensgenene som går igjen er AmpC, men det var svært få funn av resistente genfamilier mellom 2013-2015 som stemmer overens med genfamilier funnet i denne oppgaven. Det ble i 2013 og 2015 funnet resistensgener fra CTX-M-familien av isolater hos henholdsvis hund, storfe og svin. Disse genene kan ha dukket opp i dyreisolatene på flere måter, for eksempel ved ervervet resistens eller ved smitte fra andre kilder (Helsedirektoratet 2013). Det er ikke usannsynlig at de kan komme fra miljøet, som for eksempel i fra jord. Dersom beitet til storfe og svin inneholder resistensgener, er det en mulighet for at dyrene kan fange opp disse genene, det samme gjelder for andre husdyr. Jordprøvene i dette forsøket er hentet fra steder hvor både dyr og mennesker oppholder seg, der disse genfamiliene kan fanges opp og deretter implementeres i en smittekjede som i verste fall kan resultere i et resistensutbrudd.

Funnene gjort i denne oppgaven gjør at det også kan spekuleres i hvorfor det ikke er flere tilfeller av antibiotikaresistensgener i pasienter og dyr. Dette kan tyde på at genene ikke overføres selv om de er mobile. Jordsmonn består av ulike komponenter, både mikroorganismer og planterester (Matmerk 2015), og flere av disse kan skade eller forstyrre genenes evne til forflytning. Det kan også være fordi jordsmonnet ved NMBU campus i Ås er helt spesielt. I 2008 ble et lignende forsøk utført av Brusetti et al. i Nord-Norge og Svalbard. Det ble undersøkt for forekomst av TEM-gener fra ulike jordprøver, hvor ingenting ble påvist. Dette samsvarer ikke med våre funn, og kan komme av både klimaforskjeller og mindre husdyrproduksjon i Nord-Norge sammenlignet med Øst-Norge. Hadde det vært like mye resistensgener til stede overalt i Norge, ville det sannsynligvis blitt rapportert oftere.

6.3 Sammenheng av metoder for bakterieidentitet

Tredje-generasjons sekvensering bekrefter i noen tilfeller bakterieidentiteten fra første-generasjons sekvenseringen. Dette betyr at bakterieidentiteten for disse bakteriene med høy sannsynlighet er riktig. To av prøvene som ikke fikk påvist noe ved første-generasjons sekvensering, fikk påvist bakterieidentitet med tredje-generasjons sekvensering. Bakteriene som ble funnet både fra første- og tredje-generasjons sekvenseringen er typiske jordbakterier.

Mange av prøvene fikk påvist *Pseudomonas* spp, både *P. putida* og *P. fluorescens*. Etersom at arter av *Pseudomonas* blir funnet naturlig i overflatevann, innsjøer, elver og jord, og overlever i rike- og næringsfattige miljøer, er det ikke forbausende at denne bakterien ble påvist i jordprøvene (Kittinger et al. 2016). *P. putida* som ble påvist i noen av prøvene blir ansett å være en typisk jordbakterie (Molina et al. 2014, Marchiaro et al. 2014), og både *P. putida* og *P. fluorescens* kan forårsake infeksjoner (Kittinger et al. 2016).

Det er verdt å merke seg forskjellen i identifikasjon av prøve Na1* (C) som fra første-generasjons sekvensering ble rapportert å være *P. putida*, men fra tredje-generasjons sekvensering ble rapportert å være *O. anthropi*. 16S første-generasjons sekvensering sekvenserer et lite område, og er avhengig av å treffe innenfor dette området på sekvensen. Det er derfor mulig at bakterieidentiteten som ble identifisert ikke stemmer. Helgenom tredje-generasjons sekvensering sekvenserer store deler av genomet, men denne metoden er likevel ikke alltid mer pålitelig av den grunn. I dette tilfelle ble det ved tredje-generasjons sekvensering oppdaget et OCH-6-gen i prøven. OCH-6 er en β -laktamase i *O. anthropi*

(Nadjar et al. 2001), som gjør det sannsynlig at bakterien er en *O. anthropi*. *Ochrobactrum* spp. er kjent for å være tilstede i miljøet, og har tidligere blitt isolert fra jord (Bharucha et al. 2016, Thoma et al. 2009). Det er dermed ikke overraskende at det ble påvist både *O. intermedium* og *O. anthropi* i jordprøvene. *O. anthropi* er en klinisk viktig art, men det har også blitt rapportert tilfeller av infeksjon av *O. intermedium* (Thoma et al. 2009). Med tanke på antibiotikaresistens har det blitt gjort forsøk som viser at blant annet *O. anthropi* og *O. intermedium* var svært resistent mot alle β -laktamer (Thoma et al. 2009).

Flere av prøvene fikk påvist *B. petrii*, som tidligere har blitt isolert fra miljøkilder. *B. petrii* skiller seg fra de andre *Bordetella*-stammene ved at den overlever i miljøet uten en vert (Carleton et al. 2014). Det ble i tillegg til *B. petrii* oppdaget en forurensning av *Staphylococcus epidermidis* i prøve Nb1* (C). Bakterien *S. epidermidis* er en del av menneskets mikroflora, og finnes vanligvis på huden (Otto 2009), bakterien er derfor ikke en uvanlig forurensning i laboratorier. *S. epidermidis* er kjent for å takle vanskelige forhold i dens naturlige habitat, som for eksempel ekstreme saltkonsentrasjoner (Otto 2009).

Achromobacter spp. finnes blant annet i jord (Busse & Auling 2005), og det var derfor heller ikke uventet å finne denne bakteriearten i en av jordprøvene.

I utgangspunktet trenger ikke tilstedeværelse av antibiotikaresistensgener i en ikke-patogen bakterie utgjøre en trussel. Det er deres evne til å forflytte seg til en patogen bakterie, som for eksempel *E. coli* eller *Klebsiella* spp., eller til å dele på resistensgenene som kan utgjøre en trussel. Det kan resultere i at antibiotika ikke vil fungere på infeksjoner forårsaket av disse patogene bakteriene. I tillegg er de påviste bakteriene opportunistiske, og mennesker med nedsatt immunforsvar vil derfor være ekstra utsatt for at en opportunistisk-patogen bakterie med resistensgen forårsaker infeksjon som ikke kan behandles med antibiotika.

6.4 Påvisning av mikrobiota

Andre-generasjons sekvensering er en kultur-uavhengig analyse som viser det mikrobielle mangfoldet i en prøve. Metoden har ingen måte å selektere på, og det som vil være sjeldent av bakterier i en prøve vil ikke kunne bli påvist. Det er vanlig å finne mye ukulturerede bakterier i jord, men det avhenger av hva som har blitt lagt inn av sekvenser i databasen som brukes. For eksempel ble ikke *B. petrii* oppdaget før i 2001, det vil derfor med stor sannsynlighet ligge flere *B. petrii*-sekvenser som er navngitt som ukultureret bakterium (Pers. med. Lindstedt 2017).

Det var store variasjoner i mikrobiota mellom prøver fra områdene Niagara og Andedammen, men begge områdene inneholder også en god del andre bakterier. Mikrobiota fra samme områder viste tydelige likheter, noe som vil være naturlig. Variasjon mellom Niagara og Andedammen kan tyde på at noen bakterier trives bedre i et område fremfor det andre. Det var som forventet sammenheng mellom funn av order i mikrobiota og bakteriedensitet. For eksempel tilhører *Bordetella* spp. og *Achromobacter* spp. order Burkholderiales, og *Pseudomonas* tilhører order Pseudomonadales.

Nanodrop ble benyttet for å kvantifisere og å analysere renheten i DNA-løsningene etter ekstraksjon, denne kvantifiseringen gjenspeiler resultatet i mikrobiota ved begge områdene. Det er ønskelig at forholdet mellom 260 nm/280 nm har en renhet større enn 1,8 (Sjøberg 2013). Alle prøvene fra Andedammen viste en lavere verdi enn dette. Renheten trenger ikke ha noen betydning, men det kan føre til at andre-generasjons sekvenseringen vil fungere dårligere. Dette kan komme av komponenter i jorda som påvirker absorbansen (Sjøberg 2013).

Prøvene som ble sekvensert ble først rensert med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit for DNA-isolering. I tillegg til sekvenseringen ble det utført PCR og gelelektroforese på de rensede prøvene. Kitet kan brukes på alle typer jordprøver og fjerner alle spor av huminsyre. Stegene i kitet ble fulgt i henhold til protokollen, men stegene krever høy nøyaktighet. Det kan være en mulighet for at prosessen ikke ble utført nøyaktig nok. Samtidig kan det også spekuleres i om kitet fungerer like bra på alle typer jord, og om det er optimalisert for et annet type klima enn det vi har i Norge. Det er kjent at jordsmonn er sammensatt av organisk- og uorganisk materiale som, sand, grus, stein, leire, gass, vann og levende organismer (Matmerk 2015). Det kan være en mulighet for at noe av dette ikke ble fanget opp av rensetrinnet. På en av nettsidene hvor dette kitet kan kjøpes har en bruker av kitet kommentert samme problematikk, til svar blir det nevnt at det kan ha noe å gjøre med hvilken type jord det ekstraheres fra i tillegg til at mye DNA kan gå tapt når huminsyrene fjernes (Zageno 2017). DNA-isoleringen kan være en mulig forklaring på renheten i prøvene, og dårlig kvalitet på gelbildene. Tolkningen av gelbildene ble derfor vanskelig og det ble besluttet og kun vektlegge gelbilder fra rendyrkede prøver.

6.5 PCR-betingelser

Det første PCR-programmet som i utgangspunktet var optimalt tilpasset til mastermiksen lagde skygger på gelbildene, gjorde bildene uklare og vanskelig å tolke. Det ble derfor avgjort å ikke legge vekt på prøver fra BHI-mediet. På grunn av dette ble det derfor gjort noen justeringer i PCR-programmet som viste seg å hjelpe til en viss grad. Det ble også avgjort å justere mengden DNA-templat fra 2 µl til 1 µl, som hjalp til en viss grad, selv om for mye DNA også kan resultere i uklare bilder. Skyggelegging og til dels uklare bånd kan også tyde på at DNA-konsentrasjonen i prøvene har vært for høy eller for lav. Ved for høy DNA-konsentrasjon ville fortynning av prøvene sannsynligvis resultert i bedre bilder, men det ble ikke gjort på grunn av mangel på tid.

6.6 Betingelser ved påvisning av 16S-gen

For påvisning av 16S-gen ble det først benyttet en Iproof 16-mastermiksen, hvor gelbildene ikke viste tegn til 16S-gener. Derfor ble det besluttet å prøve DreamTaq 16S-mastermiksen, men denne fikk heller ikke påvist 16S-gener. En nanodrop ble utført på alle prøver for å dobbeltsjekke at det var nok DNA tilstede i prøvene, men det var derimot for høye DNA-konsentrasjoner som var problemet, og prøvene måtte derfor fortynnes. PCR ble utført på fortynnede prøver med DreamTaq 16S-mastermiksen, som viste tilstedeværelse av 16S-genet i alle prøver. Det var ingen antydninger til problem med den første mastermiksen som ble benyttet og det kan derfor være hensiktsmessig å måle DNA-konsentrasjoner før det utføres PCR.

7.0 Konklusjon

Det kan oppsummeres med: (i) det finnes antibiotikaresistens og resistente genfamilier i jordsmonn i Norge, (ii) det finnes typiske jordbakterier som er ESBL- eller karbapenemase produserende (iii) lignende resistens-genfamilier er funnet i kliniske isolater fra menneske i Norge.

Alle prøvene fikk påvist antibiotikaresistens ved utsåing på selektive skåler. Ved PCR og gelelektroforese ble det påvist resistensgen-familier i halvparten av prøvene.

Tilstedeværelse av resistensgen-familier ble ytterligere bekreftet ved helgenom tredje-generasjons sekvensering. Dette betyr at de er ESBL- eller karbapenemase-produserende. Metodene benyttet i denne studien bekrefter alle tilstedeværelse av resistens i bakterier funnet i jord. Til tross for at det er lite studier om antibiotikaresistens fra miljøprøver som jord, vil påvisning av resistens fra miljøet tilsi at det er en fare for smitte med resistente bakterier i Norge, og at risikoen ikke lenger kun er knyttet til ferie eller innleggelse på utenlandske sykehus.

Det finnes likheter mellom genfamilier påvist i forskningsprosjektet og genfamilier funnet i kliniske isolater i Norge. Når det gjelder resistens hos dyr i Norge er dette nivået svært lavt, det er svært få funn av resistensgener, dette stemmer overens med genfamilier funnet i denne oppgaven.

Bakteriene som ble påvist i forsøket er alle typiske jordbakterier og ikke overraskende å finne i jord. De er opportunistisk patogene, og vil vanligvis ikke føre til infeksjon hos friske mennesker og utgjør derfor ikke en stor trussel for folkehelsen. Hos allerede syke mennesker derimot, kan infeksjon forårsaket av disse bakteriene gi alvorlige infeksjoner, spesielt dersom de er ESBL- eller Karbapenemase-produserende. Funnene er oppsiktsvekkende da Norge ikke har blitt vurdert som et potensielt reservoar for antibiotikaresistens. Dette gjelder spesielt med tanke på at flere av genfamiliene tilhører gruppen $ESBL_{KARBA}$, som er resistens mot de fleste typer tilgjengelige antimikrobielle midler. En annen ting som fører til bekymring ved funn av antibiotikaresistensgener er deres evne til å forflytte seg fra en organisme til en annen.

8.0 Videre arbeid

Det vil ved videre arbeid være interessant å innhente og undersøke flere prøver for mulig funn av resistensgener, både fra jord, dyr og mennesker. Det vil i tillegg være interessant å undersøke om de påviste genene har evne til å forflytte seg mellom bakterier ved horisontal genoverføring. På grunn av tidsmessige utfordringer ble overflatevannet fra jordprøvene ikke undersøkt. Dette vannet er fryst ned, og det kan være spennende å analysere dette også. Etersom at DNA-isoleringen med Genelute™ Isolation Kit trolig ikke fungerte optimalt på våre jordprøver, kan det være hensiktsmessig å undersøke om andre isoleringskit kan fungere bedre. Det ble ikke påvist resistens-genfamilier i alle prøvene, en av årsakene kan være at det kun ble benyttet primere for ESBL- og karbapenemasegener. Det finnes derfor flere resistensgener det ikke ble testet for i denne oppgaven, som eventuelt kan testes i et videre arbeid.

Referanser

Abmgood. (u.å.). *Polymerase Chain Reaction (PCR) - An Introduction*. Rome: Abmgood.

Tilgjengelig fra:

https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php (lest: 18.02.2017).

Amresco, (u.å.) *E190 AGAROSE GEL LOADING DYE, 6X*. Rome: Amresco-inc. Tilgjengelig

fra: <http://www.amresco-inc.com/AGAROSE-GEL-LOADING-DYE-6X-E190.cmsx> (lest 08.03.2017).

Basic Local Alignment Search Tool (u.å). Rome: Blast.ncbi.nlm.nih.

Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest:28.03.2017).

Bathe, S., Achouak, W., Hartmann A., Heulin, H., Schloter., M, Lebuhn, M. (2005). *Genetic and phenotypic microdiversity of Ochrobactrum spp.* Federation of European Microbiological Societies. Blackwell Publishing Ltd, 56: 272–280.

Bax R. & Griffin D. (2012). *Introduction to Antibiotic Resistance I: Coates A.R.M Antibiotic Resistance*. Handbook of Experimental 1 Pharmacology 211, s 3-10.

Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet X., Touraine B., Normand, P. & Cleyet-Marel, J.C. (2000). *Stimulation of the ionic transport system in Brassica napus by a plant growth-promoting rhizobacterium (Achromobacter sp.)*. Canadian Journal of microbiology, 46: 229-236.

Bharucha, T., Sharma, D., Sharma, H., Kandil, H. & Collier, S. (2016). *Ochromobactrum intermedium: an emerging opportunistic pathogen—case of recurrent bacteraemia associated with infective endocarditis in a haemodialysis patient*. New Microbe and New Infect, 2017, (15): 14-15.

Biotium, (u.å. a). *Gelred™ & Gelgreen™ nucleic acid gel stains*. Rome: Biotium.

Tilgjengelig fra:

<https://biotium.com/technology/gelred-gelgreen-nucleic-acid-gel-stains/> (lest: 07.03.2017).

Biotium. (u.å. b). *Gelred™ nucleic acid gel stain*. Rome: Biotium. Tilgjengelig fra:

<https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/> (lest: 07.03.2017).

Biotium. (u.å. c). *Gelgreen™ nucleic acid gel stain*. Rome: Biotium. Tilgjengelig fra:

<https://biotium.com/product/gelgreen-nucleic-acid-gel-stain/> (lest: 07.03.2017).

Bradford, P. A. (2001). *Extended-Spectrum β -Laktamases in the 21st Century:*

Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 933-951.

Brolund, A. (2014). *Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective*. *Infection Ecology & Epidemiology*, 2014 (4).

Brusetti, L., Glad, T., Borin, S., Myhren, P., Rizzi, A., Johnsen, P. J., Carter, P., Daffonchio, D., Nilesen, K. M. (2008). *Low prevalence of blaTEM genes in arctic environments and agricultural soil and rhizosphere*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20: 27-37.

Carleton, A., Casserly, B., Power, L., Linnane, B., O'Flaherty, G., Powell, J., Hartnett, P., Collins, J., Murphy, P., Kenna, D., O'Connell, N.H. & Dunne, C. (2014). *Clustered multidrug-resistant Bordetella pertussis in adult cystic fibrosis patients in Ireland: case report and review of antimicrobial therapies*. *JMM Case Reports*: 1-6.

Chaudhary, U., Aggarwal, R. (2004). *Extended spectrum-laktamases (ESBL) - An emerging threat to clinical therapeutics*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22 (2): 75-80.

Coates, A. R. M. (2012). *Antibiotic Resistance*. New York, London?. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., Wright, G. D. (2006). *Sampling the Antibiotic Resistome*. *Science*, (311): 374-377.

Davies, J. (1994). *Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes*, Science, 264 (4): 375-382.

Duin, v D. & Doi, Y. *The global epidemiology of carbapenamase-producing Enterobacteriaceae*. Virulence, 0 (0): 1-10.

ECDC. (2015). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Rapport, 2015*

EFSA. (2016). *The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. Rapport, 2016*

Fluit, A. C., Schmitz, F. J. (1999). *Class I Integrons, Gene Cassettes, Mobility, and Epidemiology*. Springer-Verlag, 11 (18): 761–770.

FN. (2016). *Antibiotikaresistens er en alvorlig helsetrussel*. Rome: FN. Tilgjengelig fra: <http://www.fn.no/Aktuelt/Nyheter/Antibiotikaresistens-en-alvorlig-helsetrussel> (Lest 12.01.2017).

Folkehelseinstituttet. (2015). *Om antibiotikaresistens*. Rome: FHI. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-antibiotikaresistens/>. (lest:25.02.2017).

Folkehelseinstituttet. (2017a). *Antibiotikaresistens*. Rome: FHI. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/helse-og-sykdom/antibiotikaresistens---folkehelsera/>. (lest: 25.02.2017).

Folkehelseinstituttet. (2017b). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier – veiledere for helsepersonell*. Rome: FHI. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>. (lest: 18.04.2017).

Garrity, G. (ed.) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - the Proteobacteria*. 1. utg., vol. 2. New York: Springer

Grada, A. & Weinbrecht, K. (2003). *Next-Generation Sequencing: Methodology and Application*. Journal of Investigative Dermatology, 133: 1-4.

Guilfoile, P. G. (2007). *Antibiotic-Resistant Bacteria*, Deadly Diseases and Epidemics 1. utgave, Chelsea House, s.10-11, 15-16, 20, 22-23, 39-40, 64-67,85.

Helsedirektoratet. (2013). *Antibiotikaresistens: Fra akademisk curiositet til folkehelseproblem*. Rome: Helsedirektoratet. Tilgjengelig fra: <http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/antibiotikabruk-tannhelse/antibiotikaresistens#Detbiologiskegrunlagetforutviklingavantibiotikaresistens> (lest: 18.04.2017).

Illumina Inc. (2015). *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. Rome: Illumina. Tilgjengelig fra: www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html (lest: 30.03.2017).

Integrated DNA Technologies. (2011). *The Polymerase Chain Reaction*. Rome: idtdna. Tilgjengelig fra: <https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/the-polymerase-chain-reaction.pdf> (lest: 16.01.2017).

Kim, S. E., Park, SH., Park, HB., Park KH., Kim SH., Jung, SI., Shin, JH., Jang, HC., Kang, SJ. (2012). *Nosocomial Pseudomonas putida Bacteremia: High Rates of Carbapenem Resistance and Mortality*. Chonam Medical Journal, 48(2): 91–95.

Kittinger, C., Lipp, M., Beumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A. H., Kirschner, A., Zarfel, G. (2016). *Antibiotic Resistance Patterns of Pseudomonas spp. Isolated from the River Danube*. Frontiers in Microbiology, 2016 (7): 586.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. (2010). *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*. Nat. Rev. Microbiol, 8 (6): 423-435.

Learn Labster. (u.å.). *Gelelektroforese.jpg*. Rome: Learn.labster. Tilgjengelig fra: <http://learn.labster.com/images/thumb/Gelelektroforese.jpg/500px-Gelelektroforese.jpg> (lest: 16.02.2017).

Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Nattestad, M., Marcus, S., Goodwin, S., McCombie, W. R. & Schatz, M. C., (2016). *Third-generation sequencing and the future of genomics*. Rome: Biorxiv. Tilgjengelig fra:

<http://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2016/04/13/048603.full.pdf> (lest: 25.04.2017).

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4. utg. New York (USA): W. H. Freeman

Malachowa, N., DeLeo, F. R. (2010). *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cellular and Molecular Life Sciences, 67 (18): 3057–3071.

Marchiaro, P. M., Brambilla, L., Morán-Barrio, J., Revale, S., Pasteran, F., Vila, A. J., Viale, A. M., Limanskya, A. S. (2014). *The Complete Nucleotide Sequence of the Carbapenem Resistance Conferring Conjugative Plasmid pLD209 from a Pseudomonas putida Clinical Strain Reveals a Chimeric Design Formed by Modules Derived from Both Environmental and Clinical Bacteria*. American Society for Microbiology, 3 (58): 1816–1821.

Matmerk. (2015). *Hva er egentlig jord?*. Rome:Matmerk. Tilgjengelig fra:

<http://www.matmerk.no/no/okologisk/helse-og-livsstil/hva-er-egentlig-jord> (lest: 29.04.2017).

Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernandez, M., Moloina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., Torre, Jesus., Segura, A., Plesiat, P., Jeannot, K., Ramos, J. (2014). *Antibiotic Resistance Determinants in a Pseudomonas putida Strain Isolated from a Hospital*. PLoS ONE, 9 (1).

Nadjar D., Labia R., Cerceau, C., Bizet C., Philippon A. & Arlet G. (2001). *Molecular characterization of chromosomal class C beta-laktamase and its regulatory gene in Ochrobactrum anthropi*. Antimicrob Agents Chemother, 45 (8): 2324-2330.

Nature. (2014). *Plasmid/Plasmids*. Rome: Nature. Tilgjengelig fra:

<http://www.nature.com/scitable/definition/plasmid-plasmids-28> (lest: 03.03.2017).

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). *Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerging Infectious Diseases Journal, 17 (10): 1791-1798.

NORM/NORM-VET. (2013). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of*

Antimicrobial Resistance in Norway, Rapport 2013

NORM/NORM-VET. (2014). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway, Rapport 2015*

NORM/NORM-VET. (2015). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway, Rapport 2015*

Norsk Landbrukssamvirke. (2016). *Hva er egentlig antibiotikaresistens?*. Rome: Landbruk
Tilgjengelig fra: <https://www.landbruk.no/bioekonomi/antibiotikaresistens/>. (lest:16.01.17)

Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen*. Nature Reviews Microbiology, 7: (8): 555-567.

Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M. & Bonomo, R. (2007). *The Continuing Challenge of ESBLs*. Current Opinion in Pharmacology, 7 (5): 459-469.

Phillips, T. (2017). *How to make TAE buffer*. Rome: Thebalance. Tilgjengelig fra:
<https://www.thebalance.com/how-to-make-a-tae-buffer-in-3-steps-375495> (lest: 08.03.2017).

Porcellato, D., Skeie, S. B. (2016). *Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese*. Elsevier, International Dairy Journal, 61 (2016) 182-188.

Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). *Carbapenemases: the Versatile β -Laktamases*. Clinical Microbiology Reviews, 20 (3): 440-458.

Regjeringen. (2013). *Antibiotikaresistens- kunnskapshull/utfordringer og aktuelle tiltak, Rapport 2013*.

Regjeringen. (2015). *Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens 2015-2020*. Rome: Regjeringen. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/nasjonal-strategi-mot-antibiotikaresistens-2015-2020/id2424598/>. (lest:16.01.2017).

Ryan, K. J. & Ray C. G. (ed.). (2014). *Sherris Medical Microbiology*. 6. utg. USA: McGraw Hill Education.

Salam, M. A. & Haque, R. (2010). *Detection of ESBL producing nosocomial gram negative bacteria from a tertiary care hospital in Bangladesh*. Pak J Med Sci, 26 (4): 887-891.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakii, S., Rizvi, S. M. D. & Kamal, M. A. (2015). *Antibiotic resistance and extended spectrum beta-laktamases: Types, epidemiology and treatment*. Saudi Journal of Biological Sciences, 22 (1): 90-101.

Sigma-Aldrich. (2016). *Product information GenElute™ Soil DNA Isolation Kit*. Rome: SigmaAldrich. Tilgjengelig fra:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/dnb100?lang=en®ion=NO> (lest: 30.04.2017).

Simonsen, G. (2008). *Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens*. Rome: Forskningsprosjekter. Tilgjengelig fra:
<https://forskningsprosjekter.ihelse.net/senter/rapport/nk-unn2/2008> (lest: 04.04.2017).

Sjøberg N. O. (2013). *Molekylær genetikk- genteknologi- humant DNA*. 5. utg. Oslo: Vett & Viten AS

Stark, D., Riley, L.A., Harkness, J. & Marriott, D. (2007). *Bordetella petrii from a clinical sample in Australia: isolation and molecular identification*. Journal of Medical Microbiology, 56: 435-437.

Sun J., Deng Z. & Yan A. (2014). *Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations*. Elsevier, 453 (2): 254-267.

Swenson, C. E. & Sadikot, R. T. (2015). *Achromobacter Respiratory Infections*. ATS journals, 12 (2): 252-258.

Thermo Scientific. (u.å. a). *TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) (50X)*. Rome: ThermoScientific.

Tilgjengelig fra:

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B49?gclid=Cj0KEQjw76jGBRDm1K-X_LnrmuEBEiQA8RXYZ0ksT5vUdkbHPN46FNNp8XzjOQMa_0DwHnJv05pn8rsaAqOS8P8HAQ&ef_id=VdoMAQAAAV0jC5Xc:20170316115913:s (lest: 08.03.2017).

Thermo Scientific, (u.å. b). *DNA Gel Loading Dye (6X)*. Rome: ThermoScientific.

Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0611> (lest: 08.03.2017).

Thermo Scientific. (2013). *Quick and easy screening, direct from clinical samples in just 24 hours*. Rome: ThermoScientific. Tilgjengelig fra:

<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-Brilliance-ESBL-Sell-Sheet-EU-EN-PO5302A-low-res.pdf> (lest: 30.03.2017).

Thermo Scientific. (2014). *Quick and easy ESBL and CRE screening*. Rome:

ThermoScientific. Tilgjengelig fra:

<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Brilliance-CRE-ESBL-Biplate-Product-Overview.pdf> (lest: 29.03.2017).

Thermo Scientific. (2016). *Simple, Swift CRE screening*. Rome: ThermoScientific.

Tilgjengelig fra: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-Brilliance-CRE-Sell-Sheet-EU-EN-PO1226A-low-res.pdf> (lest: 30.03.2017).

Thoma, B., Straube, E., Scholz, H. S., Dagouk, S. A., Zöller, L., Pfeffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H. (2009). *Identification and antimicrobial susceptibilities of Ochrobactrum spp.* International Journal of Medical Microbiology, 299 (2009) 209–220.

Trancassini, M., Iebba, V., Citerà N., Tuccio, V., Magni, A., Varesi, P., De Biase, R.V., Totino, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., & Schippa, S. (2014). *Outbreak of Achromobacter xylosoxidans in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains*. Frontiers in microbiology, 5:1-8.

VKM. (2015). *Assessment of antimicrobial resistance in the food chains in Norway. Rapport*, 2015

Walsh, C. (2000). *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature 1, (406): 775-781.

Watson, J. D., Baker. T. A., Bell. S. P., Gann. A., Levine. M., Losick. R. (2014). *Molecular biology of the Gene*. 7.utg. New York (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press

Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. (2003). *The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance*. J Antimicrob Chemother, 51 (1): 9-11.

WHO. (u.å). *Data and statistics*. Rome: WHO. Tilgjengelig fra: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobialresistance/data-and-statistics> (lest 12.01.2017).

WHO. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Rapport, 2015*.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2009). *Prescott's principles of microbiology*, international edition, 1. utg. New York (USA): McGraw-Hill Higher Education

Zageno. (2017). *Genelute™ soil DNA Isolation Kit*. Rome: Zageno. Tilgjengelig fra: <https://zageno.com/p/genelutetm-soil-dna-isolation-kit/vyHeNtcYP3NmdAB57> (lest: 03.05.2017).

Zelazny, A. M., Ding, L., Goldberg, J. B., Mihares, L. A., Conlana, S., Conville, P. S., Stock, F., Ballentine, S. J., Olivier, K. N., Sampajo, P., Murray, P. R., & Holland, S. M. (2014). *Adaptability and Persistence of the Emerging Pathogen Bordetella petrii*. PLoS ONE, 8 (6).

Vedlegg 1 - Kart over områder for prøveuttak

Andedammen (A)



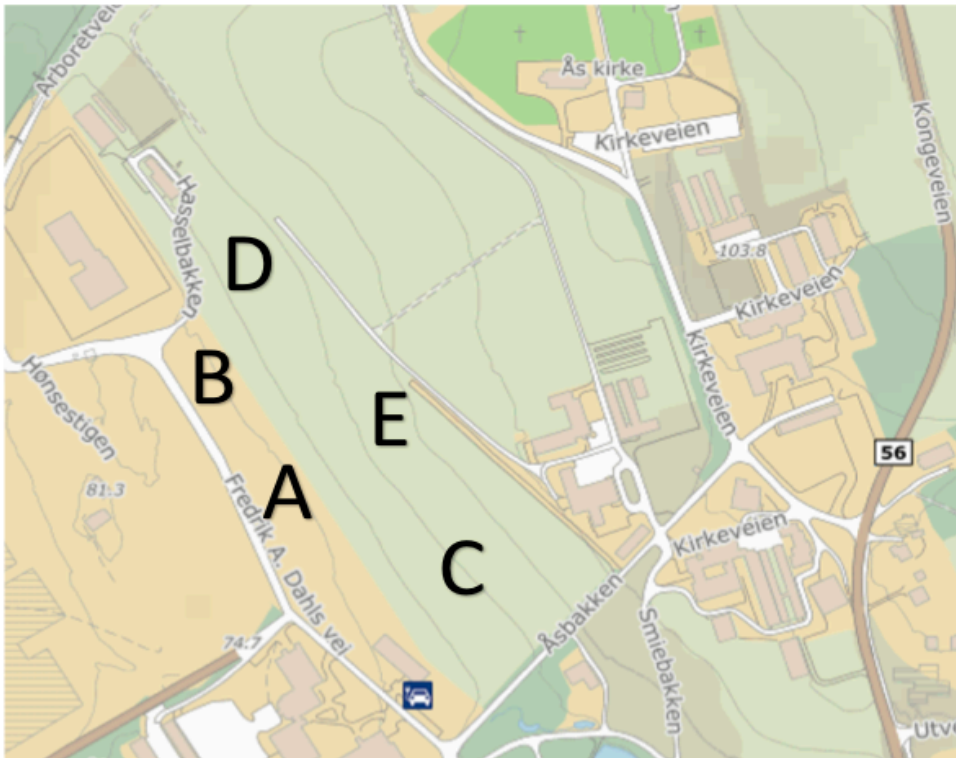
Figur 1: Kart over prøveuttak fra Andedammen

Niagara (N)



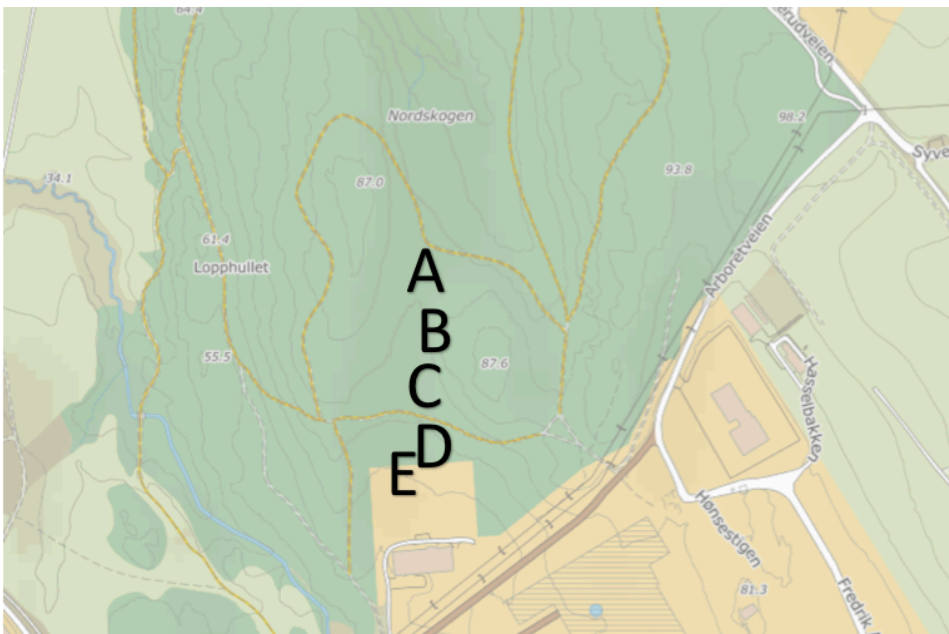
Figur 2: Kart over prøveuttak fra Niagara

Veterinærjordet Nord (VN)



Figur 3: Kart over prøveuttak fra Veterinærjordet Nord

Veterinærjordet (skogholt) (V)



Figur 4: Kart over prøveuttak fra Veterinærjordet (Skogholt)

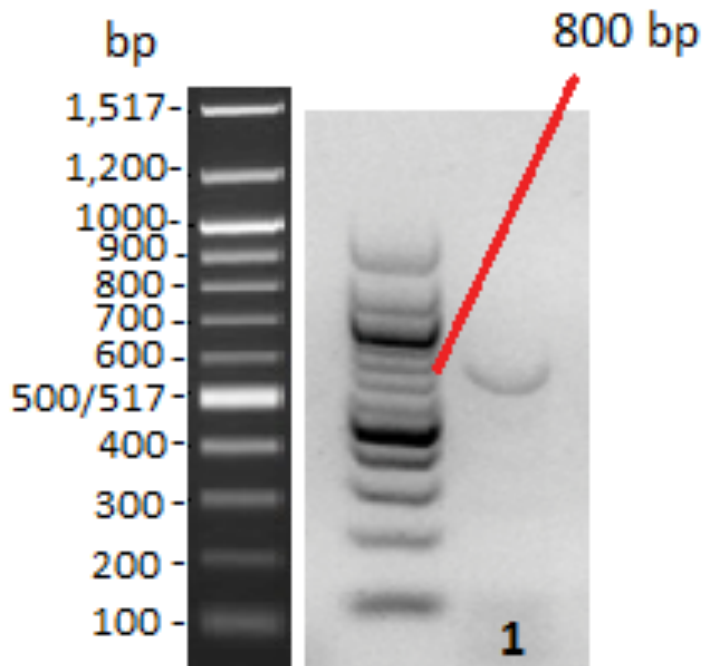
Vedlegg 2 – Oversikt over brukte primermikser

Tabell 1: Oversikt over primere brukt i primermiks 1-4.

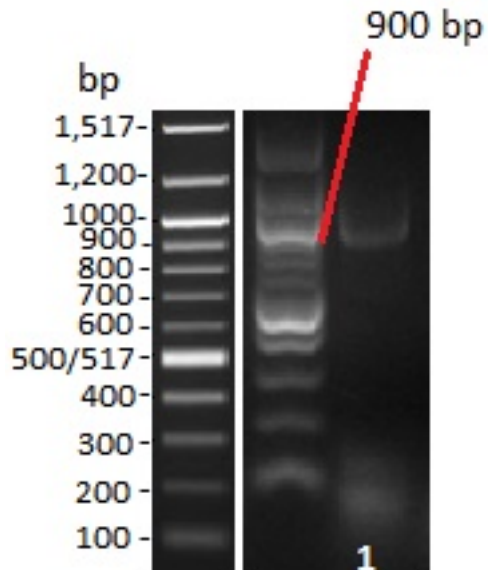
Primer mix	Målgen	Primer	Sekvens (5' → 3')	Produktstørrelse
M1	CTX-M	MultiCTXMGp 2_F	CGTTAACGGCACGATGAC	404 bp
		MultiCTXMGp 2_R	CGATATCGTTGGTGGTR CCAT	
	OXA	MultiTSOO_F	GGCACCAGATTCAACTT TCAAG	564 bp
		MultiTSOO_R	GACCCCAAGTTTCCTGT AAGTG	
	SHV	MultiTSOS_F	AGCCGCTTGAGCAAATT AAAC	713 bp
		MultiTSOS_R	ATCCGCAGATAAATCAC CAC	
M2	CTX-M	MultiCTXMGp 9_F	TCAAGCCTGCCGATCTG GT	561 bp
		MultiCTXMGp 9_R	TGATTCTCGCCGCTGAA G	
	CTX-M	MultiCTXMGp 1_F	TTAGGAARTGTGCCGCT GYA	688 bp
		MultiCTXMGp 1_R	CGATATCGTTGGTGGTR CCAT	
	TEM	MultiTSOT_F	CATTTCCGTGTCGCCCTT ATTC	800 bp
		MultiTSOT_R	CGTTCATCCATAGTTGCC TGAC	
M3	NDM	NDM_F	TGGCCCGCTCAAGGTAT TTT	157 bp
		NDM_R	GTAGTGCTCAGTGTCGG CAT	

	VIM	VIM_F	ATAGAGCACACTCGCAG ACG	564 bp
		VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACC GCGT	
	KPC	KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAAT GCG	460 bp
		KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGT GCC	
M4	Oxa-48	MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	268 bp
		MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCG AAA	
	Enterobacteria ceae	rpoB-F	CAGGTCGTCACGGTAAC AAG	512 bp
		rpoB-R	GTGGTTCAGTTTCAGCAT GTAC	
	Generic	16S_F	AGAGTTTGATCMTGGCT CAG	1505 bp
		16S_R	GYTACCTTGTTACGACTT	

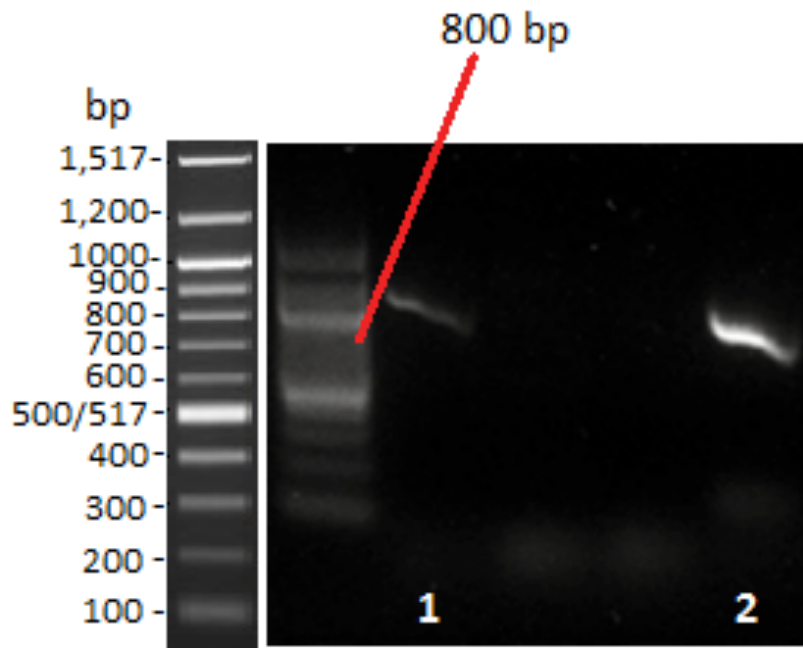
Vedlegg 3 - Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier



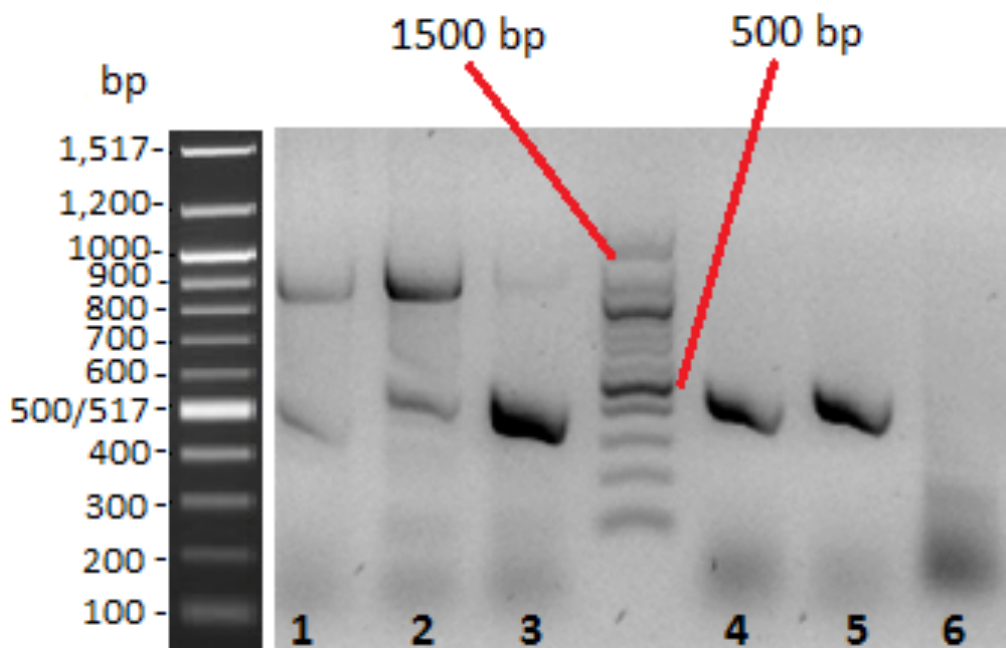
Figur 5: Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermiks 2. 1) Prøve Na1* (E).



Figur 6: Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermiks 2. 1) Prøve Ab1 (E).



Figur 7: Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk av mastermiks 1 og mastermiks 2. 1) Prøve Na1* (C) M1, 2) Prøve Na1* (C) M2.



Figur 8: Påvisning av antibiotikaresistens-genfamilier ved bruk mastermiks 4.

1) Prøve Nc1 (E), 2) Prøve Nd1 (E), 3) Prøve Nd1 (C), 4) Prøve Ab1 (E) 5) Prøve Ac1 (E), 6) Prøve Ad1 (E).

Vedlegg 4 - Påvisning av bakterieidentitet ved første-generasjons sekvensering med BLAST

Tabell 2: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Na1 * E.

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Bordetella</i> spp.	99
<i>Bordetella Petrii</i>	99
<i>Bordetella Petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella</i> spp.	99

Tabell 3: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Na1* C.

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Pseudomonas</i> spp.	99
<i>Pseudomonas putida</i>	99
<i>Pseudomonas putida</i>	99
<i>Pseudomonas putida</i>	99
<i>Pseudomonas putida</i>	97

Tabell 4: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Na1 (E).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Achromobacter insolitus</i>	99
<i>Achromobacter</i> spp.	99
<i>Achromobacter</i> spp.	99
<i>Achromobacter</i> spp.	99
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	99

Tabell 5: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Na 2 (E).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	100
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	100
<i>Ochrobactrum</i> spp.	100
<i>Ochrobactrum</i> spp.	100
<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>	100

Tabell 6: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Nb1* (E).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella</i> spp.	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99

Tabell 7: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Nb1* (C).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Bordetella</i> spp.	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99

Tabell 8: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Nd (E).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Bordetella petrii</i>	100
<i>Bordetella petrii</i>	100
<i>Bordetella petrii</i>	100
Ukultureert bakterie	100
Ukultureert bakterie	100

Tabell 9: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Nd (C).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
<i>Bordetella petrii</i>	99
Ukultureert bakterie	99
Ukultureert bakterie	99

Tabell 10: Utdrag av resultat fra BLAST for prøve Ac (E).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Pseudomonas</i> spp.	99
<i>Pseudomonas</i> spp.	99
<i>Pseudomonas protegens</i>	99
<i>Pseudomonas protegens</i>	99
<i>Pseudomonas protegens</i>	99

Tabell 11: Utdrag fra resultat fra BLAST for prøve Ad (E).

Bakterieidentitet	Identitet %
<i>Pseudomonas</i> spp.	99
<i>Pseudomonas</i> spp.	99
<i>Pseudomonas protegens</i>	99
<i>Pseudomonas protegens</i>	99
<i>Pseudomonas protegens</i>	99



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway