



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Screening etter antibiotikaresistente bakterier i jordprøver og

identifisering av *mecC* MRSA

Antibiotic Resistance Screening of Soil Samples
and Identification of *mecC* MRSA

Martha Gjendem Lillebakk

Matvitenskap

Forord

Dette er en masteroppgave tilsvarende 30 studiepoeng i matvitenskap retning matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven er en del av prosjektet “Karakterisering av høynivå antibiotikaresistens mekanismer i matkjeden”. Arbeidet med oppgaven startet i august 2017, og ble avsluttet i desember samme år og foregikk på Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Prosjektet har vært spennende og lærerikt, og noe jeg definitivt har fått mye nyttig ut av. De som har hjulpet meg underveis og som fortjener en takk, er stipendiat Misti Dawn Finton som holdt nøye oppsikt under labarbeidet og lærte meg mye, overingeniør Ahmed Abdelghani for hjelp og tips og ikke minst veileder Bjørn-Arne Lindstedt for oppfølging, veiledning og gode råd underveis. I tillegg vil jeg gi en spesiell takk til Marianne som hele tiden har oppmuntret meg og hatt troen på at jeg skulle komme meg gjennom oppgaveskrivingen.

Ås desember 2017

Martha Gjendem Lillebakk

Sammendrag

Bakterier som blir resistente mot ulike typer antibiotika er et økende problem over hele verden. Dette er noe som ikke bare påvirker det medisinske fagfeltet direkte, men også mennesker og dyr generelt og matproduksjon. Denne oppgaven gikk ut på å lete etter antibiotikaresistente bakterier innen tre av de vanligste gruppene av resistente bakterier i prøver tatt fra naturlig miljø. Dette var MRSA, ESBL og CRE. Deretter ble prøvene dyrket opp og gikk gjennom ulike molekylærbiologiske undersøkelser. Deriblant PCR, første- og tredjegerasjonssekvensering. Resultatet var at det ble funnet antibiotikaresistente bakterier i de aller fleste av prøvene. Blant disse var kanskje det første funnet av *mecC* MRSA i jordsmonn i Norge.

Abstract

Bacterias developing resistance towards various groups of antibiotics is a global problem. Not only does it affect the medical field, but also human life and animals in general, as well as food production. The aim of this thesis was to search for antibiotic resistant bacteria within three of the most common groups of resistance. Those were MRSA, ESBL and CRE. The samples were cultured in growth media and went through first and third generation sequencing. The results were that antibiotic resistant bacteria were found in most of the samples. Among there was the discovery of what probably is the first detected occurrence of *mecC* MRSA in soil in Norway.

Innhold

Forord.....	1
Sammendrag.....	2
Abstract.....	2
1.0 Innledning.....	6
2.0 Antibiotika.....	7
3.0 Antibiotikaresistens.....	10
3.1 Horisontal genoverføring (HGT).....	10
3.2 Mutasjoner.....	13
3.3 Resistensmekanismer.....	14
3.4 Mennesker og miljø.....	15
3.4.1 Husdyr og matkjeden.....	16
3.4.2 Helsevesen og sykehus.....	18
3.4.3 Natur og miljø.....	20
3.4.4 Samfunnet.....	21
3.4.5 Forebyggende tiltak.....	21
3.5 Antibiotikaresistente bakterier.....	22
3.5.1 MRSA.....	22
3.5.2 ESBL-produserende bakterier.....	25
4.0 Metodeteori.....	27
4.1 Dyrking på selektive medier.....	27
4.2 DNA-ekstraksjon.....	28
4.3 Kvantifisering av DNA.....	28
4.4 PCR.....	29
4.5 Gelelektroforese.....	30
4.6 Sekvensering.....	31
4.6.1 Sanger-sekvensering.....	31
4.6.2 Tredjegerasjonssekvensering.....	31
5.1 Prøveuttak.....	33
5.2 DNA-ekstraksjon fra jordprøver.....	34
5.3 DNA-kvantifisering av ekstrakt fra jordprøver.....	34
5.4 Vekst på selektive medier.....	34
5.5 Vekst i buljong.....	34

5.6 DNA-ekstraksjon fra kulturelle media	34
5.7 DNA-kvantifisering av fra kulturelle medier	36
5.8 Multipleks PCR	37
5.8.1 Screening for karbapenemasekodende gener	37
5.8.2 Screening etter ESBL- kodende gener	38
5.8.3 Screening etter MRSA-gener	38
5.9 16S PCR	39
5.10 Gelelektroforese	40
5.11 Sekvensering	40
5.11.1 Sanger-sekvensering.....	40
5.11.2 Helgenomsekvensering.....	41
6.0 Resultater.....	42
6.1 DNA-kvantifisering av ekstrakt fra jordprøver	42
6.2 Vekst på selektive skåler	43
6.2.1 Brilliance™ MRSA Agar	43
6.2.2 Brilliance™ ESBL Agar.....	46
6.2.3 Brilliance™ CRE Agar.....	47
6.3 DNA-kvantifisering av kolonier dyrket i BHI-buljong	48
6.4 Molekylære undersøkelser	48
6.4.1 PCR av jordekstrakter.....	48
6.4.2 Screening med multipleks PCR og gelelektroforese av DNA i BHI-medium	49
6.4.3 16S PCR	50
6.4.4 Sanger-sekvensering.....	51
7.0 Diskusjon.....	61
7.1 Vekst på selektive medier.....	61
7.2 Molekylære undersøkelser	62
7.2.1 PCR og gelbilder	62
7.2.2 Sekvensering	63
7.3 mecC MRSA og Bacillus pumilus	64
8.0 Konklusjon	65
Vedlegg	70
Vedlegg A - Bilder av dyrking på selektive skåler.....	70
Vedlegg B – Oppskrift på agarosegel.....	71
Vedlegg C - Primere.....	72

1.0 Innledning

Antibiotikaresistens er et problem som øker mer og mer. Feil- og overforbruk av antibiotika har ført til en utvikling hvor flere og flere bakterier utvikler resistens. Dermed virker ikke medisinen som har vært i bruk. Det resulterer i at flere sykdommer, ikke bare infeksjoner blir vanskeligere å kurere. I fremtiden vil det hvis utviklingen fortsetter bli vanskeligere å overleve en lungebetennelse, et vanlig kirurgisk inngrep eller kreft. En globalisert verden øker omfanget og spredningen. Reising, flytting og handel er faktorer som kan bidra til å spre problemet. Bakterier regnes som spesielt farlige i denne sammenhengen, er

- vankomycinresistente enterokokker (VRE)
- meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- *Aspergillus*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- ESBL-produserende *Enterobacteriaceae*

(Slama 2008).

Hensikten med denne oppgaven var å lete etter antibiotikaresistente bakterier ved bruk av dyrking og molekylærbiologiske metoder.

2.0 Antibiotika

Sir Alexander Flemings oppdagelse av penicillin i 1928 revolusjonerte medisinen med det som er et av de største gjennombruddene innen faget noen sinne. Etter årevis med videre forskning kunne midlet endelig bli brukt til behandling av bakterielle infeksjoner på 1940-tallet (Davies and Davies 2010; Gaustad 2001; Rossolini, et al. 2014). Frem til da kunne et lite kutt i fingeren, en fødsel eller en lungebetennelse i mye større grad enn i dag være både livsfarlig og videre føre til alvorlig smitte. Risikoen for bakteriell infeksjon var stor, og uten medisiner til å drepe bakteriene, ville bakteriene overleve, mens pasienten ikke ville det. Medisinen ble mye brukt, noe som resulterte i at stadig flere overlevde infeksjonssykdommer. Etter hvert ble det også oppdaget stadig flere typer antibiotika, som gjorde det mye lettere å få bukt med bakterielle infeksjoner. Oppdagelsene kom hyppig de første tiårene, men dabbet av, og siden 1987 har det ikke kommet nye typer på markedet (Davies and Davies 2010). Ettersom overforbruk og feilbruk av medikamentene har forekommet i stor grad, har det ført til en skremmende utvikling av antibiotikaresistens hos bakterier. Selv om antibiotika helst bare bør brukes til behandling av infeksjoner forårsaket av bakterier og enkelte typer sopp, brukes det også forebyggende mot sykdom og som vekstfremmere av produksjonsdyr. Konsekvensen av denne bruken kan bli at bakterier utvikler resistensmekanismer overfor antibiotikumet, og dermed overlever en behandling. På sikt medfører det enorme problemer hva gjelder behandling av bakterielle infeksjoner som i dag er helt vanlige, og som ses på som relativt ufarlige så lenge det finnes antibiotika. Enkelte mener det er som å rykke tilbake til start. Men i realiteten er det mye verre. For ved start var det muligheter til å oppdage og utvikle nye typer antibiotika som bare det. Nå er det ikke sikkert de samme mulighetene lenger er der.

Et antibiotikum er et bakteriedrepende- eller inhiberende middel. Mikroorganismer som sopp og bakterier kan ha det som en del av sin forsvarsmekanisme for å beskytte seg selv mot andre bakterier – enten farlige eller konkurrenter i kampen om ressurser for å overleve (Øye, et al. 2017). Opprinnelig ble kun naturlig produserte organiske forbindelser sett på som antibiotika. Penicillin, som produseres av muggsoppene *Penicillium chrysogenum* og *P. notatum* er et eksempel på det. I dag har imidlertid begrepet antibiotika blitt utvidet til også å omfatte syntetiske og halvsyntetiske forbindelser (Øye, et al. 2017).

Antibiotika kan deles inn i ulike grupperinger basert på kjemisk struktur og virkemåte. Det gjelder bl.a. hvilke systemer de påvirker i en celle og om de er bakteriosidale eller bakteriostatiske. Ulike typer antibiotika inhiberer hovedsakelig følgende systemer i en bakterie (Kohanski, et al. 2010; Øye, et al. 2017):

- DNA-syntese (f.eks. kinoloner)
- RNA-syntese (f.eks. kinoloner)
- Celleveggsyntese (f.eks. β -laktamer)
- Proteinsyntese (f.eks. makrolider, linkosamider, streptograminer, tetrasykliner, aminosyklitol)
- Folsyresyntese (sulfonamider)

Hvorvidt et antibiotikum rammer, kan det deles inn i smal- og bredspektrede antibiotika. Virker medikamentet mot et fåtall bakterier, er det smalspektret. Har de virkning på mange, er de bredspektrede. Smalspektrede virker f.eks. bare mot gramnegative, mens bredspektrede kan virke mot både gramnegative og grampositive (Øye, et al. 2017).

Kinoloner (Q) er en antibiotikaklasse som hemmer replikasjonen av DNA. Forbindelsene har topoisomerase II (gyrase) og IV som mål. Dermed er det DNA-topoisomerase-komplekset som angripes ved dannelsen av replikasjonsgaffelen, som rammes. Kinolonene virker ved at de danner et DNA-topoisomerase-kinolon-kompleks som blir et sterisk hinder for replikasjonsgaffelen. Konsekvensen er bakteriostase og død (Kohanski, et al. 2010). Gyrase rammes oftes hos gramnegative, mens det er topoisomerase IV som rammes mest hos grampositive. Kinolon er et biprodukt fra klorodixinsyresyntesen og derivat av nalidixinsyre, som ble introdusert i behandlingen av urinveisinfeksjoner på 1960-tallet. Siden førstegenerasjonskinoloner er toksiske blir de sjeldent brukt i dag. Andre- (ciprofloxacin), tredje- (levofloxacin) og fjerdegenerasjons (gemifloxacin) kinoloner er mer brukt. Fluorkinoloner (FQ) som ble introdusert som medisin i 1987 var spådd til å være et antibiotikum det skulle være umulig å utvikle resistens mot fordi det krevde flere mutasjoner, i tillegg til at HGT virket lite sannsynlig som spredningsmekanisme. Likevel oppstod det resistens (Davies and Davies 2010; Kohanski, et al. 2010).

Makrolidantibiotika er medikamenter som virker ved å hemme proteinsyntesen. Antibiotikumet virket ved å binde seg på ulike steder på utgangstunnelen for peptidene på 50S- underenheten på ribosomet (kodet av *rpoB*) og RNA-polymerase, og på den måten inhibere den DNA-avhengige transkripsjonen. På dette punktet er polymeriseringen i gang, men den stoppes. Rifomycin og erytromycin er eksempler på slike typer antibiotika. Sistnevnte ble mye brukt til å behandle infeksjoner grunnet grampositive, inkludert methicillinresistente. Dessverre oppstod det resistensmekanismer som ble mer og mer omfattende, og en spesiell rRNA-modifisering har ført til resistens mot alle antibiotika som virker der på ulike steder på disse komponentene. Som med de fleste andre nevnte mekanismene her, spres resistensen (Davies and Davies 2010).

Et betalaktamantibiotikum er et antibiotikum som inneholder en betalaktamring, som er en form for et amid. Betalaktamer har ulike måter å påvirke bakterienes syntese av cellevegg på. Stoffene er biocidale, og konsekvensen er at bakteriene dør ved lysis eller lekkasje. De har blitt mye brukt, og de er fortsatt de mest brukte antibiotikastoffene. Eksempler er penicillin, methicillin, cefalosporin og karbapenem. Betalaktamer er bredspektrede og kan virke mot både grampositive og gramnegative bakterier (Kohanski, et al. 2010). Bakterienes cellevegg består av peptidoglykan (PG), også kalt murein. Dette er en slags matrix bestående av en polymer av peptidbundne β -(1-4)-*N*-acetyl heksosamin (Kohanski, et al. 2010). Kort fortalt interferer betalaktamene med den homeostatiske produksjonen av celleveggen, slik at den ikke gjennomføres. Kryssbindingene mellom peptidoglykanenhetene blokkeres av betalaktamer. Vanligvis katalyserer reaksjonen hvor peptidbindingene i PG dannes av transpeptidasen transglykosylase, som i praksis er et penicillinbindingsprotein (PBP). Siden betalaktam er en analog til D-alanyl-D-alanin-dipeptid som er substratet som danner PG, kan betalaktamet utgi seg for å være den. Dermed penicilloyles PG istedenfor at det glykosyleres. Transglykosylase har imidlertid ikke evnen til å kunne hydrolysere den dannede bindingen med betalaktamet. Amidringen terminerer dermed PG-produksjonen i PBPs aktive sete. Resultatet kan bli lysis og celledød (Kohanski, et al. 2010). Ulike bakterier har ulike PBP. Type PBP og inhibitorene av disse avgjør dermed bakteriecellens skjebne. Inhibitorer av PBP1 kan resultere i lysis, PBP2-inhibitorer fører til endret form, men ikke lysis, og PBP3-inhibitorer fører til filamentering (Kohanski, et al. 2010).

3.0 Antibiotikaresistens

Bakterier er de best tilpassede organismene som finnes. Med tanke på resistens og resistensutvikling hos humanpatogene bakterier er det faretruende. I seg selv er resistensutvikling en naturlig prosess som alltid har vært tilstede. Antibiotika er som nevnt en naturlig del av en mikrobes evne til å angripe andre mikrober, og til å forsvare seg selv. Med det er det også naturlig at bakterier utvikler mekanismer for å forsvare seg mot andre bakterier ved å gjøre seg selv motstandsdyktige mot fiender eller i hardføre miljøer. De utvikler resistens. Det er en naturlig konsekvens av evolusjonen. Altså har antibiotikaresistens og resistensutvikling trolig eksistert så lenge det har eksistert bakterier (Davies and Davies 2010). Resistensen omtales som naturlig eller ervervet avhengig av om det er en iboende del av bakteriens forsvar eller om den skyldes mutasjon (Gaustad 2001). I praksis gjelder seleksjonspress som en viktig faktor for videre utvikling av begge resistenstypene. Ved naturlig resistens betyr det at det er individene som fra før av har egenskapene som trengs for å tåle eller håndtere antibiotikumet. Egenskapene ligger naturlig i genene, og vertikal overføring, fra en generasjon til den neste, er måten den overføres på (Gaustad 2001). For ervervet resistens er det individer som blir resistente ved at de enten får en mutasjon i kromosomet sitt, eller ved horisontal genoverføring. Som en konsekvens av seleksjonspress observeres det raskt resistens mot nye typer antibiotikum etter hvert som de introduseres på markedet. Hvis en bakterie uttrykker resistens mot minst to ulike typer antibiotika, regnes den for å være multiresistent.

3.1 Horisontal genoverføring (HGT)

Ved horisontal genoverføring kan bakterier utveksle DNA på en fleksibel måte. Siden de ikke bare avhenger av vanlig vertikal overføring av genmateriale, bidrar dette til en utvikling og tilpasning som er helt unik. Fremmed genmateriale kan deles, og dermed kan helt nye sekvenser føre til nye egenskaper hos de som tar det opp og integrerer det i sitt kromosom eller i plasmider (Heuer and Smalla 2007). HGT i kombinasjon med en potensiell kort generasjonstid for bakterier gjør at det kan gå forholdsvis fort å spre nye egenskaper i et bakteriesamfunn. Sekvensene som spres er ofte kodende for egenskaper som øker tilpasning til nye nisjer, eller egenskaper som gjør at de takler et tøffere miljø. F.eks. et miljø der det er antibiotika tilstede. Resistenssekvenser sitter ofte på elementer som kan gjennomgå HGT, og slik kan antibiotikaresistens lett overføres mellom individer (Davies and Davies 2010). Genene som overføres sitter på mobile

genelementer (MGE) i form av plasmider, transposoner, IS-elementer og integroner, som ofte inneholder resistensgener (Davies and Davies 2010; Gaustad 2001; Heuer and Smalla 2007; Klug, et al. 2010).

HGT kan foregå på følgende måter (Davies and Davies 2010; Gaustad 2001; Heuer and Smalla 2007):

- Transformasjon (opptak av fritt DNA)
- Transduksjon (overføring via bakteriofager)
- Konjugasjon (overføring ved celle-celle-kontakt)
-

Ved transformasjon kan bakterier som har evnen til det ta opp DNA som ligger i omgivelsene (Gaustad 2001; Heuer and Smalla 2007). Slike celler kalles kompetente, og det forutsettes at de har mekanismene som trengs for at prosessen kan gjennomføres. At en bakterie har evnen er ikke nødvendigvis en garanti for at resten av bakteriene innen samme art har den. Noen bakterier kan skru av og på det å være kompetent etter behov. En av disse er *Bacillus subtilis*, som bruker det å være kompetent som en overlevelsesmekanisme under stress (Heuer and Smalla 2007). Etter opptak kan det nye genmaterialet integreres i kromosomet gjennom homolog rekombinasjon og slik bidra til genetisk innovasjon og variasjon. DNA-et kan også bli brukt til å reparere ødelagt DNA eller som næring for bakterien (Heuer and Smalla 2007). Transformasjon er som oftest en genutveksling som foregår innad artene, men det er også muligheter for at mekanismen skjer mellom ulike arter og slekter. Dog er det ikke påvist at transformasjon kan skje mellom grampositive og gramnegative bakterier (Gaustad 2001). Første bud for å kunne gjennomføre en transformasjon, er at det er fritt DNA tilgjengelig. Dette er rester etter døde organismer, og type organisme bestemmer derfor hvilke egenskaper som kan overføres videre. Cellevegger kan f.eks. være med på å beskytte arvestoffet, og hindre det i å komme i kontakt med omgivelsene etter død, noe som gjør at egenskaper fra gramnegative bakterier er lettere tilgjengelige. Men ved høye temperaturer og fuktighet vil nedbrytning foregå kjappere og gjøre genmaterialet tilgjengelig raskere enn ellers (Heuer and Smalla 2007). Transformasjon er den

eneste av HGT-mekanismene som kan overføre store DNA-deler. Et eksempel hvor transformasjon har vært viktig for utviklingen av antibiotikaresistens, er hvordan gener kodende for penicillinbindende proteiner (PBP) inkorporeres i meningokokker og streptokokker (Gaustad 2001).

Transduksjon er mulig grunnet defekte bakteriofager. I stedet for at de overfører sitt eget arvestoff idet de skal infisere en bakterie, overfører de DNA fra en bakterie. Bakteriofagene har adsorbent feil DNA og fått det pakket inn i hodet sitt under modning, og dermed overføres forrige verts DNA istedenfor virusets DNA/RNA. Patogenitetsøyer (PAI) er sekvenser som ofte overføres på denne måten (Gaustad 2001; Watson, et al. 2014). Egenskaper de bærer med seg er gjerne knyttet til toksinproduksjon, noe *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* og enterohemorragisk *Escherichia coli* har fått. Ellers kan andre virulensfaktorer som proteaser, adhesiner og evnen til jernopptak kodes av slike sekvenser, og de kan også overføres til ikke-patogene bakterier. Siden transduksjon har virus som et mellomledd mellom donor og mottaker, krever den ikke at bakteriene er i fysisk kontakt med hverandre, og genmaterialene kan dermed spres over lengre avstander. Men, virus er høyst vertsspesifikke, noe som gjør at metoden begrenses til overføring mellom nært beslektede bakterier (Gaustad 2001).

Konjugasjon er en utvekslingsmetode som krever direkte kontakt celle-til celle-kontakt for overføring av DNA. For at prosessen skal kunne gjennomføres, kreves det et konjugasjonsapparat bestående av blant annet pili. Elementer som overføres på den måten er plasmider og transposoner. Konjugative transposoner er vanligvis integrert i et kromosom eller et plasmid. De koder selv for sin egen overføring, noe som gjør at konjugasjon til en effektiv måte å overføre antibiotikaresistens på. Transposoner kan også overføre andre resistensgener enn de de bærer på selv (Gaustad 2001). Et typisk resistensplasmid (r-plasmid) består av to hovedkomponenter: resistensoverføringsfaktor (RTF) og én eller flere r-determinanter. Mens RTF inneholder informasjonen som trengs for å overføre plasmidet, inneholder r-determinanten(e) gener som koder for resistens mot f.eks. antibiotika eller kvikksølv. R-determinanten er veldig spesifikk, og koder ikke for resistens mot mer enn én antibiotikaklasse. Disse kan dermed variere mye, men ett plasmid kan kode for flere ulike r-determinanter om gangen. I så fall er den med på å gjøre bakterien multiresistent. RTF derimot, er mindre spesifikk. Ulike plasmider kan bære på samme type RTF, og det muliggjør også forekomsten av ulike r-determinanter på samme

plasmid (Gaustad 2001; Klug, et al. 2010). Integroner er en spesiell type DNA-elementer som kan gjenkjenne og fange opp mobile genkassetter. De inneholder gener som koder for rekombinasjon, slik at de kan ta opp og integrere kassetene, samt promotorer som kan uttrykke gensekvensene de tar opp (Holmes, et al. 2003). Mobiliteten til kassetene gjør at de kan tas opp av flere integroner, og et og samme integron kan inneholde flere ulike kassetter. Genkassetene derimot, har ikke en egen promotor (Gaustad 2001; Holmes, et al. 2003). Dermed er de avhengige av at integronet de tas opp i har promotorene som trengs. Ved opptak vil den nyeste kassetten plasseres nærmest promotoren. Når genene i kassetene skal uttrykkes, er rekkefølgen på plasseringen av kassetene avgjørende. Det er kassetten nærmest integronet som uttrykkes først, altså den nyeste egenskapen. Siden genkassetter ofte inneholder resistensgener, betyr det at de nyeste resistensgenene er de som uttrykkes først, og som spres videre i størst grad (Gaustad 2001; Watson, et al. 2014). Per 2010 var det registrert over 100 ulike genkassetter som viser resistens mot de fleste typene av antibiotika en vet finnes (Davies and Davies 2010).

3.2 Mutasjoner

I tillegg til HGT kan også mutasjoner kan være med på å gjøre bakterier resistente mot antibiotiske forbindelser. Mutasjonene kan være spontane eller adaptive. Spontane mutasjoner skjer mer eller mindre tilfeldig, som følge av f.eks. replikasjonsfeil, manglende DNA-reparasjon eller mutagener. Mutasjonen oppstår kun i celler som deler seg (Gaustad 2001; Watson, et al. 2014). Adaptiv mutasjon derimot, er en konsekvens av selektivt press fra omgivelsene. Her betyr det at det er mutasjoner som oppstår som en tilpasning til et miljø med antibiotika tilstede, og de oppstår i celler som ikke er under deling. Altså er det sånn at bakterier som tåler lave konsentrasjoner med antibiotika kan få mutasjoner som gjør at de overlever. Seleksjonspresset gjør at det er disse bakteriene som vokser videre. Mykobakterier og *E.coli* har adaptive mutasjon som viktige resistensutviklingsmekanismer (Gaustad 2001).

3.3 Resistensmekanismer

Ulike antibiotika angriper bakterie ulikt, og derfor har bakterier ulike mekanismer for resistens. De bakteriene som naturlig er resistente mot et stoff, kan være det fordi de f.eks. mangler akkurat den reseptoren som stoffet kan bindes til for at det skal ha en effekt på mottakeren. Mekanismer bakterier har for å håndtere seleksjonspresset er å utvikle ulike resistensmekanismer (Iredell, et al. 2016; Oma 2012). Strategier kan f.eks. være målmodifisering, medisinekksusjon/medisinekspulsjon og medisinmodifisering. Hvilke strategier som benyttes varierer mellom grampositive og gramnegative bakterier. Generelt er disse resistensmekanismer mot antibiotika vanlige: impermeabilitet, effluxpumper, målmodifiseringer og enzymatisk nedbrytning (Sun, et al. 2014).

Ved impermeabilitet mangler det mekanismer som poriner o.l. som antibiotikumet kan bruke for å trenge inn i cellen.

Efflux som mekanisme bruker transmembrane transportproteiner som pumper antibiotikumet ut av cellen så fort det har kommet inn. Både prokaryote og eukaryote celler kan ha effluxpumper. Genene som koder for pumpene kan både ligge på kromosomet og i plasmider, og de finnes i nesten alle bakterier (Sun, et al. 2014). Det finnes et vidt spekter av effluxpumper, og mange har evne til å pumpe flere ulike forbindelser. Dette gjelder også andre forbindelser som biocider (Webber and Piddock 2003). Tilleggsmekanismer som går ut på å senke antibiotikakonsentrasjonen intracellulært er en av dem. Mutasjoner kan også frembringes, men ettersom studier viser at genomer langt tilbake i tid koder for efflux, og med en stor andel av gener involvert, tyder det på at det ikke er et seleksjonspress grunnet stort antibiotikaforbruk som er skyld i eventuelle store forekomster av effluxpumper (Sun, et al. 2014; Webber and Piddock 2003). Blant prokaryote organismer er effluxpumper inndelt i fem ulike familier (Sun, et al. 2014; Webber and Piddock 2003):

- Major facilitator (MF)
- Multidrug and toxic efflux (MATE)
- Resistance-nodulation-division (RND)
- Small multidrug resistance (SMR)
- ATP-bindingskassett (ABC)

Av de nevnte gruppene finnes RND kun i gramnegative bakterier, mens resten finnes i både gramnegative og grampositive bakterier. En pumpe kan være enten et enkelt- eller et flerkomponentsystem. Enkeltkomponentsystemer har en indre membrantransport, mens flerkomponenter har en ytre membrankanale og et ytre periplasmisk adapterprotein i tillegg (Sun, et al. 2014).

Målmodifisering er en effektiv måte å utvikle resistens på. En fysiologisk endring i en reseptor kan gjøre at et antibiotikum ikke lenger kan binde seg i eller til en bakterie. Et eksempel på det er endringer i penicillinbindingsprotein (PBP) som ses i resistensutviklingen i *S. aureus* grunnet opptak av *SCCmec*. Et annet eksempel er kinolonresistens. Spesielt *E. coli* har en resistensmekanisme der de kan endre reseptorene som vanligvis binder og tar opp kinolon, ved at de får mutasjoner i genene *gyrA*, *gyrB*, *parC* og *parE*, en ikke-overførbar egenskap. De kan også bruke aminoglykosyl-N-acetyltransferase til å modifisere et sekundæramin i fluorokinoloner og slik senke aktiviteten til antibiotikumet. Slike resistensmekanismer er plasmidmedierte og skyldes mutasjoner i *qnrB*, *qnrS*, *qnrA*, *qnrD*, *qnrVC*, *qepA*, *oqxAB* og *aac(6')-Ib-cr* (Davies and Davies 2010; Veterinærinstituttet ; Vetting, et al. 2008)

3.4 Mennesker og miljø

Som nevnt er eksponering til antibiotika med på å gjøre bakterier resistente. Antatte r-gener har naturlig vært tilstede i naturlige miljøer lenge, men kraftig økning i resistensforekomsten de siste tiårene tyder på at antropologisk aktivitet påvirker. Menneskelig bruk av antibiotika på og utenfor sykehus, i landbruket og samfunnet generelt er med på å fremme seleksjonspresset mot resistens. Direkte påvirkning i form av resistensutvikling i bakterier i kroppen til den som behandles er en ting, en annen er konsekvensen av at antibiotika slippes ut i naturen (Anderson and Hughes 2012; Davies and Davies 2010). Konsekvensen er at bakteriene i ulike miljøer i naturen venner seg til å overleve med et konstant nærvær av sub-MIC antibiotika. Følgene av en slik ikke-letal seleksjon er økt en økende mutasjonsrate (Anderson and Hughes 2012; Iredell, et al. 2016). Siden det finnes ulike typer antibiotika, ulike utslippsveger, ulike bakterier og ulike miljøer, er det helt umulig å fastslå konsekvensene av medikamenter som kommer på avveie på denne måten. Dynamikken for r-gener, r-bakterier og selektive agens mellom økosystemene og effekten er kompleks (Iredell, et al. 2016). Det som imidlertid kan fastslås, er at er et økologisk

problem verden over. Typiske virksomheter som sykehus, landbruk, akvakultur og farmasøytiske fabrikker slipper ut antibiotika gjennom kloakk og utslippsvann, som kan ende i elver og vann og overføres til økosystemene i nærheten, f.eks. jordsmonn. Dessuten kan andre forbindelser som biocider og miljøforurensere bidra til resistens via koseleksjon (Anderson and Hughes 2012). At sistnevnte involverer veldig mange virksomheter siden starten på den industrielle revolusjonen, gjør ikke følgene mindre alvorlige.

R-genene i seg selv er ikke så farlige så lenge de ikke befinner seg på bakterier som assosieres med sykdom. Dvs. at apatogene bakterier som finnes naturlig i ulike miljøer og som er bærere av r-gener ikke gjør stor skade for mennesker og dyr. Faren oppstår først når r-genene overføres via f.eks. HGT til patogene bakterier. For da vil bakterier som kan føre til infeksjoner hos mennesker og dyr bli resistente mot behandlingen.

3.4.1 Husdyr og matkjeden

I tillegg til sykdomsbehandling hos mennesker, blir antibiotika også brukt i planter og dyr. På 1940-tallet ble det oppdaget at dyr vokser fortere dersom de får antibiotika. Årsaken er ikke fullstendig kjent, men det foreligger noen hypoteser (Madhab Kumar 2014). Derfor har en del land verden over brukt antibiotika til andre formål enn rent terapeutiske. Mange bønder gir også dyrene antibiotika for å forebygge sykdom. Begge rutinene fører til at den normale mikrobiotæen utsettes for små doser antibiotika som kan føre til at det oppstår resistens, eller at resistente stammer selekteres. Bruk av antibiotika som et vekstfremmende preparat er forbudt i Norge og EU, men er fortsatt utbredt i USA. Av 13 millioner kg antibiotika som ble brukt innen husdyravl i USA i 2010, antas mesteparten å ha vært vekstfremmende (Spellberg, et al. 2013).

Antibiotika gitt vekstfremmende i husdyravl er en viktig faktor som påvirker utvikling av antibiotikaresistens i bakteriefloraen i dyrekroppen. Analyser av dyrs bakterieflora har vist at forekomsten av antibiotikaresistens har økt etter hvert som vekstfremmende antibiotika har blitt rutine. Veksten skyldes som regel et at seleksjonspresset har ført til økt forekomst av resistente stammer som allerede er tilstede i dyret (Madhab Kumar 2014; Spellberg, et al. 2013). Dette kan både være bakterier fra dyrets normalflora og tilførte bakterier som er tilstede. For dyret

selv er det ikke knyttet noen helserisiko til det før genene eventuelt overføres til mikrober som er patogene. For mennesker gjelder i prinsippet det samme, men spredningen i seg selv er uønsket. Dersom resistente gener er tilstede, kan de spres videre til mennesker som jobber med dyrene, de kan spres til mennesker gjennom matkjeden, og de kan spres via avføring og avrenninger til kringliggende områder (Roca, et al. 2015; Spellberg, et al. 2013). Der vil de være tilgjengelig for de bakteriene som måtte ha det som habitat. Dyrebesetninger kan ende opp med å bli reservoarer for antibiotikaresistente gener. Transduksjon blir også bedre tilrettelagt med økt antibiotika i miljøet. Så at dette kan skje, er sannsynlig. Problemet er ofte da at de som er for å bruke antibiotika vekstfremmende ofte ikke er villige til å endre praksis av økonomiske årsaker, eller at de påstår at de seleksjonspresset for r-genene ikke forekommer, eller ikke har noen påvirkning for mennesker. Når det gjelder det økonomiske, så dreier det seg om store kutt i fôrkostnader. Svin som får tilskudd med antibiotika trenger 10 – 15 % mindre fôr for å oppnå ønsket vekst. Kjøttet inneholder i tillegg mer protein og mindre fett enn det ellers ville ha gjort. For kylling er det bedre eggproduksjon som gjelder dersom tetrasyklin eller penicillin gis. Generelt får dyrene også bedre helse. Det er med andre ord lett å skjønne hvorfor en del produsenter av både land- og vanndyr ønsker å benytte seg av dette alternativet. Hypoteser om hvorfor effekten er der, går ut på at mikrober i dyret spiser fôret før dyret drar nytte av det, men at antibiotika dreper disse. Dermed trenger dyrene mindre mat enn før for å vokse. Eller så er det også mulig at dyrene, spesielt i uhygieniske miljøer, konstant bærer på latente infeksjoner. Det kan føre til at det frigjøres cytokiner som videre frigjør katabolske hormoner som svinner muskelmassen. Ved tilførsel av antibiotika trengs ikke cytokinene, og dermed blir heller ikke musklene og det fremtidige kjøttet svekket (Madhab Kumar 2014). Risikoene med å ha en så lav terskel for antibiotikabruk er derimot mye større enn gevinsten ved å bruke det. Selv om de som bruker antibiotika til annet enn terapeutisk bruk hevder at dyrene får dårligere helse hvis de slutter å ta det, er det noe som kun stemmer for en kort tid. I EU ble det først observert at dyrene led av diaré, vekttap og i verste fall døde den første tiden etter at antibiotika ble forbudt som vekstfremmere. Konsekvensen var at dyrene trengte mer antibiotika for å bli friske enn før. Det ble også observert flere tilfeller av at mennesker ble syke av å spise mat fra dyrene. Endringene ble dog utjevnet over tid, og på den måten så det ikke ut til at antibiotika hadde en altfor stor positiv effekt (Madhab Kumar 2014).

Når det gjelder profylaktisk bruk av antibiotika, så er det noe som virker mot sin hensikt. Seleksjonspresset i seg selv, er noe som viser at det på sikt ikke lønner seg å forebygge sykdom

ved å ta antibiotika. Mens normalfloraen av bakterier kan påvirkes negativt, såkalt dysbiosis, kan medisinerbruken fremme veksten til andre tilstedeværende og farlige mikrober. Et eksempel på det er *Clostridium difficile* (Madhab Kumar 2014). Sammen med økt mottakelighet for sykdom er det en dårlig kombo. Dyrekroppen har også en nedgang i produksjon av ulike stoffer som er nyttige for normalfloraen, deriblant en kortkjededede fettsyrer (Madhab Kumar 2014). Vansker knyttet til å kontrollere spredning av r-gener er bl.a. knyttet til det at det er altfor enkelt å få tak i antibiotika uten at det registreres noe sted. I Norge kreves det henvisning av en lege eller veterinær for at en kan få antibiotika. På den måten kan forbruket til en viss grad styres. Dessverre er det ikke slik i alle land, og en vesentlig del av det forebyggende arbeidet mot resistente bakterier, er at veterinærer skal ha mer makt når det gjelder å skrive ut medisiner til dyr. Slik kan det sikres at antibiotika kun gis det formål å behandle infeksjoner (Madhab Kumar 2014; Roca, et al. 2015).

3.4.2 Helsevesen og sykehus

Syke mennesker trenger behandling. Etter hvert som spredning av antibiotikaresistensen blant bakterier er økende, fører det med seg en del utfordringer. Innføringen av antibiotika gjorde at folk kunne bli friske av tidligere dødelige sykdommer. Problemet var at effekten på sikt har blitt svekket på grunn av feil- og overforbruk. Behandling av infeksjoner som ikke skyldes bakterier, bruk av feil type antibiotika og å ikke bruke nok antibiotika er alle med på å selekere r-gener og resistente bakterier. Å behandle virusinfeksjoner med antibiotika fører ikke til en forbedring av sykdomsbildet, siden antibiotika ikke tar knekken på virus. Tvert imot vil antibiotika i slike tilfeller bidra til å selekere frem resistente egenskaper i bakteriene som allerede er i kroppen, samtidig som restene slippes ut av kroppen og til omgivelsene. Når det gjelder type antibiotika, så er det helt avgjørende at den som brukes har en effekt som gjør pasienten frisk. Følgelig er det nødvendig å bruke et antibiotikum som kan drepe eller inhibere bakterien som er skyld i sykdommen. I mange tilfeller trengs det rask behandling samtidig som nøyaktige analyser for å finne ut hvilken mikrobe det dreier seg om tar lang tid. Situasjoner som dette starter ofte med å behandle pasienten med bredspektret antibiotika, da det favner bredere, rammer flere mekanismer og dermed flere bakterier. Ergo er konsekvensen et mye større seleksjonspress i pasienten, enn ved benyttelse av smalspektret antibiotika som kun er myntet på å drepe eller hemme få mekanismer og bakterier. Et økende seleksjonspress er også noe ses som en konsekvens av at det ikke brukes nok antibiotika ved sykdom. Det dreier seg ofte om tilfeller

hvor pasienten avbryter en antibiotikakur fordi sykdomssymptomene er borte. Selv om symptomene er borte, betyr det ikke at alle bakteriene er døde. De få som er igjen vil da kunne overleve, og siden de har blitt utsatt for antibiotika, men ikke dødd enda, kan de ha tilpasset slik at de tåler det. Hvis de bakteriene får anledning til å vokse videre, vil de kunne gjøre pasienten syk igjen, men ny kur med samme antibiotikum vil ha en dårligere, og kanskje ingen virkning. I verste fall kan det innebære at pasienten kan spre antibiotikaresistente patogener til andre mennesker.

For å kunne gjøre noe med problemene som kommer med antibiotikaresistente bakterier, er det en stor fordel å forstå mekanismene og interaksjonene som ligger bak, samt ha en oversikt over hvordan forholdene ligger an. Både på sykehus og i samfunnet ellers gjelder det å ha en oversikt over genpoolen til mikrobene som finnes. Nøkkelen er å skjønne hva som skjer i møtet mellom en antibiotikasensitiv mikrobiota og resistente mikrober, samt å ha retningslinjer for hva som skal gjøres ved for å prøve å kontrollere mikrober og infeksjoner så godt det lar seg gjøre (Iredell, et al. 2016). Disse forholdene er meget komplekse og vanskelig å forstå. Noe som kan være en del av årsaken til at resistensproblemet har fått utvikle seg så langt som det har gjort til nå. Antagelsene er som oftest at resistente bakterier vokser frem i dyr og mennesker som behandles med antibiotika som en respons på et sterk seleksjonspress med antibiotikakonsentrasjoner mye høyere enn MIC (Anderson and Hughes 2012). Dette er noe som har stemt i en del tilfeller, som at *Mycobacterium tuberculosis* har blitt resistent på grunn av inadequate antibiotikabehandlinger, eller hvordan *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* og *Salmonella enterica* har utviklet resistensmekanismer mot fluorokinoloner og β -laktamer. Slike forhold har også resultert i fremveksten av vancomycinresistente MRSA og carbapenemresistent *E. coli*. Infeksjoner skyldes enten antibiotikasensitive eller antibiotikaresistente bakterier. Førstnevnte har ikke resistens, og vil dermed ikke direkte være med på en resistensutvikling. Resistente bakterier vil som en konsekvens av seleksjonspresset ved en antibiotikabehandling føre til seleksjon og videre anrikning av de resistensgenene og mutasjonene de allerede har. Slik sett er det lite sannsynlig at sykehusene er arnesteder for nye resistente kloner (Anderson and Hughes 2012).

Et særdeles viktig moment når det gjelder menneskers påvirkning på spredning og anrikning av resistens mot antibiotika, er antibiotika som slippes ut i naturen. Pasienter som gjennomgår en antibiotikakur, bidrar dessverre til denne statistikken. Ved behandling er det nemlig slik at om

lag 50 % av all antibiotika som gis til mennesker skilles ut igjen via urinen – og det uendret. Altså i en form som fortsatt kan virke aktivt mot bakterier (Anderson and Hughes 2012). Konsekvensen blir dermed at det kan ende opp store konsentrasjoner med aktivt antibiotika i akvatiske miljøer eller i naturen der kloakk slippes ut. Disse områdene vil dermed oppleve et stort seleksjonspress mot de fleste typer antibiotika.

3.4.3 Natur og miljø

Om lag halvparten av all antibiotika som brukes terapeutisk eller som vekstfremmer entrer naturen i uendret form. Hvor mye det er, er vanskelig å anslå, men det totale forbruket kan anslås å ligge på godt over 10^5 tonn per år (Anderson and Hughes 2012). Konsentrasjoner og forekomster av antibiotika i naturen varierer med type natur, beliggenhet og nærliggende virksomheter. Helsevesenet spiller en viktig rolle i og med at det er på sykehus og institusjoner det brukes antibiotika. Utslipp til naturen rett utenfor er dog lite sannsynlig siden det som slippes ut går gjennom kloakken. Utslipp direkte til omgivelsene er heller noe som forekommer ved landbruk og industri. Når det gjelder industri, spiller legemiddelindustrien en stor rolle når det gjelder utslipp av antibiotiske eller andre virkestoffer. I tillegg kan andre typer industri og fabrikker bidra til seleksjonspress ved at andre typer stoffer, som biocider kan angripe samme typer mekanismer som antibiotika, og dermed bidra med koresistens (Anderson and Hughes 2012). Selv om legemiddelindustrien er en bransje som burde vite bedre, bidrar altså fabrikkene deres til store utslipp av medisinske virkestoffer via spillvann. Områder med industri og fabrikker er ofte store, og med flere virksomheter. Konsekvensen er at det lokale området forurenses med det ene og det andre som kan påvirke økosystemer og folks hverdag. Anlegg som renser avløpsvann før det slippes ut, er et «hot spot» for antibiotikaresistens og HGT, og bør derfor tas på alvor, de også (Roca, et al. 2015). I Hyderabad i India er det f.eks. store områder som påvirkes av fabrikkene i området (Carlsson, et al. 2009). Totalt er over 90 ulike medisinprodusenter representert på området. Analyser av vannet som slippes ut har vist at utslippsvannet inneholder mengder av fluorokinoloner som er giftig for flere mikrober. Faktisk var 6 av de 11 mest forekomne medikamentene FQ. Ettersom fluorokinoloner er bredspektret antibiotika, kan et seleksjonspress føre til at bakterier blir resistente i stor grad. Dersom disse egenskapene overføres til humanpatogene bakterier, kan det være meget farlig på sikt (Carlsson, et al. 2009). Anlegg som renser avløpsvann før det slippes ut, er et «hot spot» for antibiotikaresistens og HGT, og bør derfor tas på alvor.

3.4.4 Samfunnet

I samfunnet generelt ses det økte forekomster av resistens mot karbapenemer, kinoloner og tredjegerasjons cefalosporiner. Den siste øker forekomsten av ESBL-mekanismer i Enterobacteriaceae, samt spredning av kloner som *E. coli* ST131 (ECDC 2013; Roca, et al. 2015). Selv om resistens er et stort problem som øker i omfang, gjelder det ikke alle former for resistens og alle typer bakterier. MRSA-forekomsten i mange europeiske land er på veg ned, eller er på veg til å stabilisere seg. European Centre for Disease Prevention and Control (CDC/ECDC) viste i sine rapporter for overvåking av antibiotikaresistens både i 2012 og 2017, som til sammen dekker en periode på seks år, at forekomsten av MRSA varierer lite i Nord-Europa. Sjøover derimot, er forekomstene høyere. Norge hadde en stabil og lav forekomst på rundt 1,2 % av MRSA blant de prøvene som ble analyserte. Ellers har det vært en stor økning av ESBL-produserende bakterier, som Enterobacteriaceae. Utviklingen ses ofte i *E. coli* og *Klebsiella pneumoniae*. Dette gjelder stort sett over hele Europa, og et skremmende moment ved denne resistensen, er at den ofte ses i kombinasjon med resistens mot andre typer antibiotika. Deriblant karbapenemer. (ECDC 2013; ECDC 2017; Roca, et al. 2015). Undersøkelsene for rapportene er knyttet til prøver fra sykehus. Sykdommer knyttet til antibiotikaresistente bakterier har som oftest blitt assosiert i helseinstitusjoner. Et nyere fenomen er dog at de ses mer i samfunnet utenfor. Noe som kan tyde på mer spredning i samfunnet med mulige reservoarer i naturen, i miljøer tilknyttet industri, ved helseinstitusjoner og med spredning via og mellom folk og dyr.

3.4.5 Forebyggende tiltak

Tiltak for å forebygge at antibiotikaresistens bør foregå både lokalt, nasjonalt og internasjonalt. Det hjelper lite å arbeide kun på ett område når en globalisert verden fører til at gener overføres og spres. Første ledd er å øke kunnskapsnivået om hva antibiotikaresistens er, hvordan det spres og hvilke konsekvenser det har. Denne kunnskapen bør gjelde på flere områder, slik at leger og veterinærer er strengere med å skrive ut antibiotika, at industri ikke slipper ut antibiotiske stoffer, og at enkeltmennesker vet hva som er forsvarlig medisinbruk og ikke bruker antibiotika til annet enn behandling av de sykdommene som krever det. Og at de bruker medisinen riktig. Et

annet viktig tiltak er også å oppfordre folk til å levere gamle medisiner til apoteket istedenfor å skylle det i toalettet eller kaste det i søpla.

3.5 Antibiotikaresistente bakterier

3.5.1 MRSA

Staphylococcus aureus, gule stafylokokker, er en grampositiv bakterie som normalt sett er en del av normalfloraen på kroppen hos mennesker og varmblodige dyr. Den finnes vanligvis på hud, hår, slimhinner, og i nese og svelg. *S. aureus* finnes også i miljøet, skitne matproduksjonsanlegg og er ofte assosiert med sykehus. Som regel er den helt ufarlig, men den kan forårsake sykdom. Blant dyr er den en kjent årsak til mastitt. Bakterien kan føre til tilfeller av matbåren smitte, men da er det som regel menneskelige bærere som er den opprinnelige smittekilden (Rørvik and Granum 2015). *S. aureus* er opportunistisk og kan føre til sykdom hvis den entrer innsiden av kroppen. Som regel dreier det seg om infeksjoner i hud, spesielt sår i sår og lesjoner. Sepsis kan også forekomme. Ellers er også infeksjoner i andre vev som lunger eller skjelett noe *S. aureus* kan gi. Faktisk er det et av de bredeste sykdomsspektrene fra en og samme art (ECDC 2017; Moellering 2012; Rørvik and Granum 2015). Selv om disse sykdommene virker alvorlige, har det vært mulig å behandle dem med antibiotika. Det blitt brukt penicillin, f.eks. methicillin. Problemet er at en del av disse bakteriestammene har utviklet resistens mot methicillin og alle betalaktamantibiotika. Methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) er av de bakteriene det er knyttet størst fare til når det gjelder grad av alvorlighet og påvirkning av folkehelse globalt (Davies and Davies 2010; ECDC 2017; Moellering 2012). Smittevernloven § 1-3 definerer den som en «allmennfarlig smittsom sykdom» for mennesker (Helse- og omsorgsdepartementet 2015). MRSA ble påvist for første gang i 1961, bare to år etter at en begynte å bruke methicillin, og den utvikler seg stadig (Davies and Davies 2010; Enright, et al. 2002; Moellering 2012). Tross utallige forsøk på å bekjempe bakterien, har det ikke lyktes. En spesielt god fordel bakterien har, er at den har evne til å ligge latent hos bærere uten å vise symptomer, men med evnen til å kunne spre seg videre. Begrepet MRSA blir fortsatt brukt i dag, selv om methicillin verken produseres eller brukes. Ettersom methicillin er et penicillin, som er et betalaktamantibiotikum, kan derfor «M»-en i MRSA anses som en betegnelse for betalaktamantibiotika (Paterson, et al. 2014).

S. aureus er særdeles tilpasningsdyktig, noe både sykdomsbilde og resistensutvikling er gode eksempler på. Det at bakterien har en god evne til å ta opp fremmede genelementer, såkalte eksogener, og integrere dem i eget genom er noe som har gjort den ganske suveren. Antibiotikaresistensen i MRSA har oppstått ved at methicillinsensitiv *S. aureus* (MSSA) har integrert et MGE kodende for penicillinbindingsprotein 2 (PBP2) fra stafylokokk-kromosomkassett (SCC) via HGT. De ervervede genene koder for PBP som tar over funksjonen for PBP som MSSA ville kodet for ellers. Dermed har fenotypen MRSA oppstått (Rossolini, et al. 2014). Noe som er interessant når det gjelder opprinnelsen til *mecA* er at genet trolig kommer fra *S. sciuri*. Bakterien inneholder *mecA*, men genet blir ikke uttrykt, noe som gjør at den ikke er methicillinresistent (Moellering 2012). Forslag fra multilokus sekvenstyping at det er mulig at en sekvensstype (ST) 8 har ervervet *mecA*, og at ST250 utviklet resistens. Hvorvidt det er én enkelt kloner som står bak methicillinresistensen, eller om SCC*mecA* har blitt overført og integrert i flere kloner er uvisst (Moellering 2012). På verdensbasis er det imidlertid ST247-MRSA-1 som er en av de største stammene. Vanligvis er det genet *mecA*, SCC*mecA* som har blitt ervervet og vært ansvarlig for MRSA. Men de senere årene har det også kommet et nytt genelement, SCC*mecC*. Begge genene koder for PBP2, *mecA* for PBP2a, og *mecC* for PBP2a/c. PBP har lav affinitet for betalaktam. I praksis betyr det at bakteriecellen katalyserer den effektive cellevegg-syntesen selv om det er penicillin, cefalosporin eller karbapenemer i nærheten. Siden det er resistens mot betalaktamantibiotika, er dette en spesiell motstandsstrategi. Vanligvis er det produksjon av betalaktamaser som gjør bakterien resistent. Men i dette tilfellet er det altså en endring i antibiotikumets målmolekyl. I retrospektive undersøkelser har det dog vist seg at den homologe genvarianten *mecC* har eksistert i alle fall i over 40 år, selv om den ikke ble påvist før i 2007 (Paterson, et al. 2014). I funn som ikke bare viste seg være de første funnene av MRSA i en storfebesetning i Storbritannia, viste seg å være en helt ny genotype av MRSA. For fenotypisk sett var det klart at det var MRSA, selv om genotypiske tester ikke greide å påvise *mecA*. Dette illustrerer også problemet med diagnostisering av MRSA i syke pasienter og dyr, ettersom det er vanskelig å påvise genet. I begynnelsen ble det bare kalt *mecA*_{LG251} (Paterson, et al. 2014). I ettertid har genet blitt kalt SCC*mecC*, da det har vist seg å ha noen andre egenskaper enn *mecA*. Det opprinnelige funnet viste resistens mot cefoxitin og oxacillin, og hadde bare en likhet med *mecA* på 69 % genetisk sett. Det resulterte videre i at proteinet det kodet for PBP2 var ulikt det *mecA* koder for. Skillet mellom *mecA* og *mecC* viser seg ved at de har ulike kombinasjoner av rekombinaser. *mecC* har *ccrA*- og *ccrB*- rekombinaser tilhørende *ccrA1*- og *ccrB3*-grupper, til da en helt ny kombinasjon. Mens *mecA* har *mecI*/*mecR* som sine regulato-

riske gener (Paterson, et al. 2014). Genvariantenes evne til å tåle temperaturer er også egenskaper som skiller dem fra hverandre. *mecC* er ikke like stabil som *mecA* ved 37 °C. *mecC* er uavhengig fra *S. aureus*' native PBP for å kunne utøve resistens mot oxacillin. Resistensen kan muligens derfor komme av andre glykوترansferaser. *mecA* derimot, må ha bakteriens opprinnelige PBP for å kunne være resistent, men siden de inkluderer transglykosylase-aktivitet, kan den gå av seg selv uten videre hjelp (Paterson, et al. 2014).

MRSA assosieres ofte med resistens mot flere typer antibiotika samtidig. Blant disse er fluorokinoloner vanligst. Land som har høye forekomster av MRSA har også hatt isolater med resistens mot tre ulike antibiotikagrupper.

Når det gjelder forekomst av MRSA, er det vanskelig å si noen eksakte tall for *mecA* og *mecC*. Førstnevnte er sannsynligvis vanligst (Paterson, et al. 2014). MRSA er oftest assosiert med sykehus (HA-MRSA), men det er også eksempler fra gårdsbruk (LA-MRSA), spesielt i besetninger med storfe eller svin. Siden 1990-tallet har det også blitt observert MRSA i samfunnet ellers (CA-MRSA). Sistnevnte er spesiell med tanke på at det ikke er et typisk miljø for MRSA. Det er også tegn på at det foregår smitte utenfor de kliniske miljøene MRSA tidligere har vært assosiert med (Moellering 2012). Siden pasienter på sykehus ofte er litt opp i årene, har pasienter med HA-MRSA i USA en snittalder på 68 år, mens CA-MRSA ligger på 23 år. Sistnevnte er mest utbredt i grupper av folk som har mye fysisk kontakt med hverandre, slik som idrettslag, barnehagebarn, og innsatte i fengsel (Felson 2017). Ifølge rapportene fra ECDC, har det vært en økning i forekomstene av MRSA inntil nylig, da de i mange europeiske land har begynt å stabilisere seg eller til og med gå ned. Norden og Nederland skiller seg ut med å ha særdeles lave forekomster, og Norge er det eneste landet i verden som har lyktes med en offentlig bekjempelse av MRSA i svin (ECDC 2013; ECDC 2017; Landbrukssamvirke 2017). I Norge er det gode rutiner med fokus på god dyrevelferd, god dyrehelse og ikke minst drastiske tiltak med sanering dersom MRSA skulle bli påvist (Landbrukssamvirke 2017). I Europa var gjennomsnittlig andel MRSA blant de testede prøvene på 13,7 % i perioden 2013-2016, Norge og Nederland hadde lavest forekomst med 1,2 %, mens Romania hadde høyest forekomst med 50,5 % (ECDC 2017). Norges referanselaboratorium for MRSA kunne i 2011 vise til at *mecC* MRSA har blitt funnet i mennesker fra kliniske miljøer, samt i en katt. Forekomsten var veldig liten, med en andel på < 0,4 % av alle MRSA-stammer (Larssen, et al. 2011).

Heldigvis er det ikke slik at MRSA er mer patogen enn MSSA, men når sykdom skulle inn-
treffe, er behandlingen vesentlig mer krevende. En pasient krever full isolasjon for å unngå
spredning av smitte, og det er viktig å bruke medisiner som kan virke. I tilfeller med MRSA
har vancomycin og teicoplanin blitt brukt som behandling, og også kombinasjonsbehandlinger
hvor ulike typer antibiotika med ulike virkemåter benyttes. Det kan f.eks. være vancomycin
eller daptomycin + betalaktamantibiotika (Bal, et al. 2017).

3.5.2 ESBL-produserende bakterier

«Extended spectrum β - lactamases» (ESBL), på norsk betalaktamaser med utvidet spektrum, er
mekanismer som i praksis gjør at en bakterie er resistent mot de vanligste typene antibiotika
som finnes i dag. Som navnet tilsier gjelder det betalaktamer, samt fluorokinoloner og amino-
glykosider. Derfor er risikoen for alvorlig sykdom og død høy ved smitte av ESBL-produser-
ende bakterier (Folkehelseinstituttet 2017). Internasjonalt er det ingen enighet om noen katego-
risering og innledning i undergrupper, men i Norge brukes en inndeling etter forslag fra Giske,
et. al:

- ESBL_A
- ESBL_M
- ESBL_{KARBA}

ESBL_{A/M} er enzymproduksjon som gjør bakteriene resistente mot penicillin og de fleste cefa-
losporin, men ikke mot karbapenemer. ESBL_{KARBA} er enzymproduksjon som gjør bakteriene
resistente mot alle betalaktamantibiotika, inkl. penicillin, cefalosporin og karbapenemer
(Giske, et al. 2009). Produksjon av betalaktamaser er kodet på genetisk mobile elementer. Kli-
nisk sett i Norge er det *Enterobacteriaceae*, særlig *E. coli* og *K. pneumoniae* pluss noen ikke-
fermenterende bakterier som kan kolonisere luftvegene. *Acinetobacter* og *Pseudomonas* er ek-
sempler på slike (Folkehelseinstituttet 2017; Shaik, et al. 2014). Betalaktamaser er enzymer
som hydrolyserer betalaktamringen i betalaktamantibiotika slik at det mister virkningen. I ut-
bredelse er betalaktamasegenene blant de mest globale når det gjelder resistensgener (Davies
and Davies 2010). «Extended spectrum β - lactamases» (ESBL), på norsk betalaktamaser med
utvidet spektrum, er mekanismer som angriper bredspektret antibiotika, og er av de aller største

problemene innen infeksjonsbehandling og resistens. I praksis spres r-genene for betalaktamaser i såpass stor grad at det nærmest skjer endemisk. Det er knyttet stor mutasjonsrate til betalaktamaser, da mer enn 100 substitusjoner med aminosyrer er mulig. Disse har også lett for å spre seg videre via f.eks. HGT. Enzymene i seg selv er veldig gamle, og det er spor etter dem på øde steder som ikke har vært i kontakt med typiske miljøer hvor antibiotika som medisin er utbredt. I klinisk sammenheng ble de oppdaget i *Kluyvera*-stammer fra miljøet på 1990-tallet. Betalaktamasen de inneholdt var CTX-M, identifisert første gang i 1989, som var den første som kunne hydrolysere bredspektrede cefalosporiner på et klinisk signifikant nivå (Davies and Davies 2010). Selve arketyper av betalaktamaser er TEM, og er plasmidmediert (Davies and Davies 2010; Oma 2012).

4.0 Metodeteori

4.1 Dyrking på selektive medier

Selektive skåler blir brukt for tidlig å kunne få en antydning om hvilke bakterier som måtte befinne seg i prøver. Ulike medier selekterer for ulike bakterier, og fargene på koloniene indikerer hvilke bakterier som kan være tilstede. I denne oppgaven ble det brukt to ulike typer skåler, med tre ulike vekst-/seleksjonsmedier. Skålene som ble brukt, var Brilliance™ MRSA Agar og Brilliance™ ESBL Agar/ Brilliance™ CRE Agar. Førstnevnte var en petriskål med ett medium, mens sistnevnte var en petriskål delt i to like halvdelar med hvert sitt medium (Thermo Fisher Scientific ; Thermo Fisher Scientific). Brilliance™ MRSA Agar er et opakt medium som inneholder ulike stoffer med antimikrobiell virkning mot MSSA og flere andre bakterier som kan være konkurrenter til MRSA. Stoffer som sørger for undertrykkelse av andre stafylokokkers fosfataseaktivitet er også tilstede, noe som øker spesifisiteten og gjør det lettere å dyrke frem eventuelle MRSA. Dersom det vokser MRSA på skålen, vil de vise seg som blå kolonier (Thermo Fisher Scientific). Den delen av Brilliance™ ESBL Agar/ Brilliance™ CRE Agar som selekterer for ESBL-produserende inneholder cefpodoxime, et tredje generasjons cefalosporin som er effektivt mot både grampositive og gramnegative bakterier (Thermo Fisher Scientific ; Wikipedia 2017d). Det fungerer som en markør for ESBL-resistens, og hemmer de fleste ikke-ESBL-produserende *Enterobacteriaceae*. Ved å ha denne markøren vil mengden falske positive reduseres. Skålen brukes hovedsakelig i letingen etter ESBL-produserende *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter* (KESC). Grønne kolonier indikerer KESC, da de uttrykker galaktosidase. Blå kolonier indikerer *E. coli* da de uttrykker både galaktosidase og glukoronidase. Rosa kolonier indikerer β -galaktosidasenegative *E. coli*. Brun gul koloni med brun halo rundt indikerer *Morganella* og *Providencia*, ettersom de ikke kan utnytte kromogen, og de deaminerer tryptofan (Thermo Fisher Scientific). Brilliance™ CRE Agar inneholder karbapenem, slik at vekst på skålen kan indikere karbapenemaseaktivitet og dermed resistens mot karbapenem. Mediet brukes til leting etter karbapenemresistente *Enterobacteriaceae* (CRE), inkl. New Delhi Metallo β -laktamase 1 (NDM-1)-mekanismen. Rosa kolonier indikerer *E. coli*. Blå kolonier indikerer bakterier i KESC-gruppen. Hvite kolonier indikerer ikke-CRE bakterier, som f.eks. *Acinetobacter* (Thermo Fisher Scientific).

4.2 DNA-ekstraksjon

DNeasy® PowerSoil® Kit fra Qiagen er et sett som brukes til å ekstrahere mikrobielt genomisk DNA fra alle typer jord- og miljøprøver. Dette inkluderer bakterier, sopp og alger. Ved å bruke inhibitorfjerningsteknologi fjernes humussyre, og rent DNA-et isoleres og kan brukes til videre analyser (Qiagen).

GenElute™ Bacterial Genome DNA Kit er et sett som brukes til å ekstrahere rent DNA fra bakteriekulturer. Her ble det brukt til å ekstrahere DNA fra bakterier i BHI-buljong. Settet har egne protokoller for grampositive og gramnegative bakterier, da førstnevnte trenger lysozym for å kunne lysere celleveggen. Bakteriene lyses i en kaotropisk saltholdig løsning for å sikre at makromolekylene i cellen denatureres. Settet kombinerer silicamembraner i et minispinnformat. Tilsetning av EtOH gjør at DNA lettere bindes til kolonnen før lysatet sentrifugeres ut. Prosedyren omfatter egentlig en siste vask med EDTA som etterlater DNA i en tris-EDTA-løsning (eluat), slik at det kan brukes videre til ulike analyser som kvantifisering, PCR og NanoDrop. Denne vasken ble ikke brukt, ettersom EDTA kan ødelegge for multipleks PCR med de primerne som skulle brukes (Sigma-Aldrich).

4.3 Kvantifisering av DNA

Kvantifisering av DNA ble gjort ved å bruke en kombo av Qubit™ dsDNA BR Assay Kit og Qubit® 2.0 Fluorometer. Systemet er veldig nøyaktig og kan selektere ut DNA i løsninger selv om det er mye annet i den samtidig. Teknologien bak er bruk av prøvereagens og fortynningsbuffer som blandes med prøven som skal undersøkes. I blandingen er det Molecular Probes®-farge, som bindes til DNA-et i prøven, og som emitterer fluorescerende lys. Prøvene ble blandet i 500 µL Qubit® tynnveggede prøverør av polypropylen, og avlest ved hjelp av Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

4.4 PCR

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en molekylærbiologisk metode som brukes til å kopiere DNA-sekvenser flerfoldige ganger in vitro. Prosessen utnytter polymerase til å kunne kopiere ønsket/ ønskede sekvenser, slik at de kan undersøkes videre. Ved bruk av ulike typer PCR kan én eller flere sekvenser oppformes samtidig. Prosessen består av tre steg: Denaturering, hybridisering og elongering (Integrated DNA Technologies 2011; Watson, et al. 2014). For å kunne gjennomføre en PCR trengs følgende: Vann, PCR-buffer, $MgCl_2$, deoksynukleotidtrifosfater (dNTP-er), primerpar (forlengs og baklengs), templat- DNA og polymerase (Integrated DNA Technologies 2011). Vannet brukes kun som en væske kjedereaksjonen kan foregå i, uten at det blir en ekstra miljømessig påvirkning. Buffer brukes for å holde rett pH og monovalent saltmiljø i blandingsrøret. $MgCl_2$ brukes som en kilde til Mg^{2+} , da det er en kofaktor for enzymer som brukes (Type II). Konsentrasjonen ligger på 1,5 mM. dNTP-er er byggesteinene i DNA, basene adenin (A), tyrosin (T), guanin (G) og cytosin (C). Polymerasen bruker disse til å lage nytt DNA. Primere (oligonukleotider) er bindeleddet mellom templat-DNA og polymerasen, og er derfor spesifikke for hver enkelt DNA-sekvens og velges deretter. Altså velges primere ut fra hvilken sekvens en vil undersøke - spa-primere velges for spa-sekvenser, og 16S for 16S-sekvenser, da de skal ha evnen til å binde til sekvensene. DNA-polymerase er enzymet som hekter dNTP-er på den etter hvert voksende kjeden av baser som kopierer det enkeltrådede templat-DNA-et. Taq-polymerase brukes, fordi den er meget varmestabil. (Integrated DNA Technologies 2011). Selve prosessen går som følger (Integrated DNA Technologies 2011; Watson, et al. 2014):

- Denaturering: Høy temperatur (94-96 °C) brukes til å splitte ds-templat-DNA til to ssDNA.
- Annealing: Primerne binder til riktig sekvens på hver av trådene. For å holde trådene fra hverandre velges en temperatur et par grader celsius lavere enn primernes smelte-temperatur. Antall primerpar velges ut fra om det er en eller flere sekvenser som skal oppformes.
- Elongering: Taq-polymerasen bindes til primeren og begynner polymeriseringen av sekvensen som går i 5'-3'-retning. Temperaturen her ligger på 72 °C som er den optimale temperaturen for Taq-polymerasen.

Etter endt syklus har antallet templat-DNA blitt doblet. PCR foregår i en syklus på mellom 30 og 45 runder, hvor hver av de tre stegene gjentas hver gang. Hver runde har dobbelt så mange DNA-templater som den forrige, altså er det en eksponentiell vekst (Watson, et al. 2014). Produktet etter en PCR-reaksjon kan brukes til å identifisere arvestoff, og brukes blant annet til forskning, diagnostisering og rettsmedisinsk. Her ble det brukt multipleks og 16S PCR.

4.5 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en teknikk som brukes for å separere DNA og RNA etter størrelse, slik at en kan danne seg et bilde av en DNA-profil. Et kar som har elektroder med hhv. negativ og positiv ladning på hver sin ende fylles med en gel. PCR-produktet appliseres i brønner på den negative enden. Når spenningen skrues på, vil DNA-/RNA-fragmentene dras mot den positivt ladde enden, siden de selv har negativ ladning (Watson, et al. 2014). Små fragmenter vil bevege seg fort, og dermed langt, mens store bruker lengre tid og beveger seg derfor kortere i det tidsrommet strømmen er på. Testen er mulig fordi gelen er hard og inneholder porer. Hardheten bremser bevegelsen, samtidig som porene gjør bevegelsene mulig. I et bløtere materiale ville alt bare flyte utover og være mye mindre konsekvens. Ved å applisere en ladder i en eller flere av brønnene har man en referanse for hvor store de ulike sekvensene er, da det inneholder markører for ulike sekvenslengder (Watson, et al. 2014). Ulempen ved å bruke agarose, er at store sekvenser (30-50 kb) er for store til å penetrere porene i gelen, og dermed beveger seg så å si likt, og blir umulig å skille fra hverandre.

For at det skal være mulig å se det som skjer på gelen, forberedes både gelen og prøvene nøye. Gelen kan ha ulik konsentrasjon av agarose (ev. polyakrylamid, hvis det brukes istedenfor), høyere konsentrasjon betyr hardere/ mer inert gel. 0,8 % gel er egnet for store produkter (5-10 kb), mens 2 % gel egnes best for små produkter (0,2-1 kb) (Watson, et al. 2014; Wikipedia 2017b). Standarden er 1 %, og hvis ikke annet er gitt ble det brukt for undersøkelsene av produkter fra isolater på ESBL- og CRE-skåler, mens 2 % ble brukt på produkter fra isolater på MRSA-skål. PCR-produktet blandes med vann og farge for at det skal bli synlig på gelen. Fargestoffet som binder til DNA/ RNA er fluorescerende og gjør det mulig å se resultatet i UV-lys

(Wikipedia 2017b). Her ble det brukt Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye fra Thermo Fisher Scientific. Fargeblandingen inneholder også glyserol som gjør at PCR-produkt og ladder kan synke i brønnen, da det blir tyngre enn resten av væsken i karet. Væsken som blandes med agarosen for å lage gel, er TAE-buffer. Det er en blanding av trisbase, eddiksyre og EDTA. 1 X TAE-buffer er fortynnet til 40 mM Tris, 20 mM eddiksyre, 1 mM EDTA med pH = 8,5 (Thermo Fisher Scientific). I tillegg blandes det fargestoff i gelen, GelRed™ Nucleic Acid Stain. Fargestoffene fungerer også som markører for hvor langt prøvene har migrert i gelen, ettersom de beveger seg samtidig som dem (Thermo Fisher Scientific).

4.6 Sekvensering

4.6.1 Sanger-sekvensering

Sanger-sekvensering, også kalt dideokseysekvensering, er en metode som benyttes for å finne rekkefølgen av baser i en gensekvens, og dermed kan brukes til identifisering av gener. I prinsippet er det en PCR hvor DNA-sekvensen som skal identifiseres brukes som et templat primer binder til og polymerase kopierer opp. dNTP-er blir brukt til å forlenge sekvensen. Mens ddNTP blir brukt til å stoppe forlengingen. Sistnevnte ser ut som en vanlig dNTP, men mangler 3'-OH som gjør det mulig for en dNTP å hektes på den voksende tråden (Kristensen 2014). Reaksjonsblandingen består av ca. hundre ganger så mye dNTP som ddNTP. Polymeriseringen får gå helt til det tilfeldigvis settes på en ddNTP. Gjennom fire ulike reaksjoner tilsettes dermed kun en av de fire ddNTP-ene om gangen. Resultatet er fragmenter med DNA med samme utgangspunkt, men med ulik lengde. Avsluttende ddNTP er den avsluttende basen i sekvensen. Til slutt har en fått flere ulike sekvenser med ulike lengder (Kristensen 2014; Wikipedia 2017e). Ved å gjennomføre en elektroforese vil DNA-fragmentene bevege seg ut fra størrelse, og basesekvensen kan avgjøres ut fra en stigende rekkefølge. Dette er mulig å se ettersom ddNTP-ene er fluorescerende merket, med lys som emitteres ved ulike bølgelengder for hver av basene. Den endelige basesekvensen som kommer opp kan søkes opp i databaser for å finne ut hva slags gen det er, eller hvilken art den tilhører.

4.6.2 Tredjegerasjonssekvensering

Tredjegerasjonssekvensering er måter å sekvensere DNA selv fra små mengder materiale. Informasjon fra slike sekvenseringer har bidratt til å samle opp store mengder mikrobielle genomer de novo (Lee, et al. 2016). Apparatet som brukes til å måle og samle informasjonen er lite, håndholdt og kobles til en datamaskin via USB. I tillegg er metoden kjapp. Ca. 70 baser kan registreres i sekundet. Dvs. at det tar 7 minutter å registrere 30 kb (Juul, et al. 2015). Dette gjør det så enkelt at det f.eks. kan brukes ute i felt. Konseptet går ut på å la DNA gjennomgå en elektroforese og passere protein-nanoporor. Et elektrisk potensiale får ioner, og dermed strøm til å flyte gjennom nanoporene. Innimellom vil DNA passere, og skape et brudd i strømmen

som går gjennom i porene. Denne forstyrrelsen registreres av datamaskinen, og er avhengig av sekvensstørrelsen, ettersom små sekvenser beveger seg raskere enn store. Dermed kan målingene gi informasjon om hvilke sekvenser som analyseres (Juul, et al. 2015; Lee, et al. 2016). Hastigheten kan reguleres ved å bruke et tilleggsprotein (motor). Mengden ATP i sekvensbufferen er det som styrer farten (Juul, et al. 2015).

5.0 Materialer og metoder

5.1 Prøveuttak

Denne masteroppgaven baserer seg på prøver og analyser fra jordsmonn. Jordprøvene ble hentet langs bekken Niagara på universitetsparken ved Universitetet for miljø- og biovitenskap (NMBU) på Ås 14. august 2017. Selve bekken ble anlagt på 1930-tallet, og renner ut av Svanedammen. Bekken og området rundt ble restaurert i 2015, noe som medførte at det ble tilført mer jord, leire og planter. Området er ellers et populært rekreasjonsområde med mye folk og dyr i alle aldre. I Svanedammen er det mye stökkender og andre fugler, i tillegg er det observert en del piggsvin på Ås generelt. Innholdet i rørene varierte noe, med organiske materialer som jord, gress, blader og planterester, og uorganiske materialer som småstein, sand og vann.

Det ble tatt seks prøver fra tre ulike punkter langs Niagara, to prøver fra hvert punkt. Selve uttaket ble gjort ved å stikke 50 mL plastrør i jordsmonnet for å samle materiale. Deretter ble korken skrudd på rørene, og de ble tatt med på laben for veiing og uttak til inndeling i paralleller. Fra hver av de seks store rørene ble det tatt ut små mengder jord som ble overført til tre små eppendorfrør (1,5 mL). Totalt ble det altså 18 små rør. Etersom mengdene var så små, var det mye prøve igjen i rørene, som kan brukes til videre undersøkelser senere. Alle 24 rørene ble deretter oppbevart i kjøleskap ved 4 °C for lagring til neste dag. Så lenge ikke annet er nevnt, ble jordprøvene oppbevart i kjøleskapet så lenge de ikke var i bruk for analyser.

Prøvene ble delt inn som følger:

Tabell 5.1 Nomenklatur og paralleller av jordprøver

Sted (reagensrør, 50 mL)	Paralleller (eppendorfrør, 1,5 mL)
1-1	1-1'
	1-1''
	1-1'''
1-2	1-2'
	1-2''
	1-2'''
2-1	2-1'
	2-1''
	2-1'''
2-2	2-2'
	2-2''
	2-2'''
3-1	3-1'
	3-1''
	3-1'''
3-2	3-2'
	3-2''
	3-2'''

5.2 DNA-ekstraksjon fra jordprøver

DNA ble ekstrahert fra jordprøvene ved bruk av DNeasy[®] PowerSoil[®] Kit fra Qiagen. Protokollen som fulgte settet med kjemikalier ble fulgt.

5.3 DNA-kvantifisering av ekstrakt fra jordprøver

DNA-et som ble ekstrahert fra jordprøvene ble kvantifisert ved bruk av Qubit[™] dsDNA BR Assay Kit og Qubit[®] 2.0 Fluorometer i henhold til protokollene som følger med kjemikaliene og fluorometeret.

5.4 Vekst på selektive medier

Ca. en spatelstørrelse prøve ble tatt fra hver av stedene 1, 2 og 3. Valget falt på prøvene 1-2, 2-2 og 3-2. Prøvene ble blandet i hver sine rør med Ringers løsning. Deretter ble 50 µL fra hver av prøvene sådd ut på hver sine skåler med Brilliance[™] MRSA Agar, og ble sådd ut på hver av halvdelene på Brilliance[™] ESBL Agar/ Brilliance[™] CRE Agar. Skålene ble inkubert ved 37 °C i to døgn. Etter to døgn ble det valgt kolonier som så aktuelle ut for videre isolering og vekst. De ble strøket på nytt på nye samme type skåler, og inkubert ved 37 °C i ett døgn. Kolonier som enda ikke var rene ble strøket på ny skål enda en gang for ny inkubasjon ved 37 °C over natten. Totalt var det 15 kolonier som ble strøket på nytt. 9 fra MRSA-skål og 6 fra ESBL-/CRE-skål. Av disse var det 12 gode isolater. To av dem hadde ingen vekst, mens en var umulig å isolere i enkeltkolonier. Disse tre skålene var dermed ubrukelig for videre undersøkelser, og ble dermed ikke tatt videre.

5.5 Vekst i buljong

Isolatene fra skålene med selektiv agar ble overført til et flytende vekstmedium for videre vekst. Det ble brukt «Brain Heart Infusion»-buljong fra VWR Chemicals Internationals. 37 g buljongpulver/ L dH₂O ble blandet og autoklavert uken før. Protokollen til produsenten ble fulgt. Én koloni fra hver skål ble overført i hvert sitt rør med 4 mL buljong og inkubert ved 37 °C over natten.

5.6 DNA-ekstraksjon fra kulturelle media

DNA-et i BHI-buljongene ble ekstrahert ved bruk av GenElute[™] Bacterial Genome DNA Kit fra Sigma-Aldrich. Prosessen fulgte protokollen som fulgte settet, bortsett fra at vaskingen med

EDTA ikke ble foretatt. De første fire stegene var forskjellige for grampositive og gramnegative bakterier, etter det var prosessen den samme for alle prøvene. Vekst på Brilliance™ MRSA Agar fulgte protokollen for grampositive bakterier, mens vekst på Brilliance™ ESBL Agar/ Brilliance™ CRE Agar fulgte protokollen for gramnegative bakterier.

A. Forberedelse av gramnegative bakterier:

1a. Høste celler

1,5 mL av bakteriekulturen ble overført til et eppendorfrør sentrifugert ved 16000 xg i 2 minutter. Resultatet var at cellene befant seg i en pellet, og væsken fra vekstmediet kunne kastes.

2b. Resuspendere cellene

180 µL «Lysis Solution T» ble brukt til å resuspendere pelleten, og gjøre alt flytende igjen.

3a. Forberede for lysering av cellene

20 µL av en «Proteinase K»- løsnings ble tilsatt prøven for at proteiner kan brytes ned. Blandingen ble vortexet og satt på varmeblokk ved 55 °C i 30 minutter.

4a. Lysere cellene

200 µL «Lysis solution C» ble tilsatt, og prøven ble vortexet i 15 sekunder, før ny runde på varmeblokk 55 °C i 10 minutter. Løsningen skulle sørge for at cellene lyserte, slik at DNA kunne bli tilgjengelig.

B. Forberedelse av grampositive bakterier:

1b. Forberede lysozymløsning ved å bruke lysozym fra eggehvite

Grunnet en annen cellevegg enn gramnegative bakterier, måtte de grampositive gjennomgå en runde med lysozym. Løsningen ble lagd i forkant ved å blande lysozym og med «Lysis solution».

2b. Høste celler

1,5 mL av bakteriekulturen ble overført til et eppendorfrør sentrifugert ved 16000 xg i 2 minutter. Resultatet var at cellene befant seg i en pellet, og væsken fra vekstmediet kunne kastes.

3b. Resuspendere cellene

Pelleten ble resuspendert i 200 µL av lysozymløsningen fra 1b og satt på varmeblokk 37 °C i 30 minutter for at bindingene som holder peptidoglykanet i celleveggen sammen kunne brytes.

4b. Lysere cellene

200 µL «Lysis solution C» ble tilsatt, og prøven ble vortexet i 15 sekunder, før ny runde på varmeblokk, denne gangen 55 °C i 10 minutter. Løsningen skulle sørge for at cellene lyserte, slik at DNA kunne bli tilgjengelig.

DNA-isolering fra gramnegative og grampositive bakterier. Felles prosedyre etter trinn 1-4.:

5. Forberede kolonnene til binding av lysatet

500 μL «Column Preparation Solution» ble tilsatt bindingskolonnen i et 2 mL oppsamlingsrør og sentrifugert ved 12000 xg i 1 minutt. Væsken ble kastet, og kolonnen beholdt. Trinnet ble brukt som en forberedelse for at DNA lettere skal festes lettere til kolonnen etterpå.

6. Forbered lysatet til binding til kolonne

200 μL (95-100 %) etanol ble tilsatt de lyserte cellene og vortexet i 10 sekunder.

7. Overføring av lysat

Lysat + etanol-blandingen ble overført til bindingskolonnen ved bruk av en stor pipette. Kolonnen var i et 2 mL oppsamlingsrør. Sentrifugering ved 6500 xg i 1 minutt. Oppsamlingsrøret med eluat ble kastet, og kolonnen ble satt i et nytt.

8. Første vask

500 μL «Wash solution 1» ble tilsatt i kolonnen for å få bort mest mulig av det som ikke er rent DNA. Røret ble sentrifugert ved 6500 xg i 1 minutt. Oppsamlingsrøret med eluatet ble tømt.

9. andre vask

For å tørke kolonnen og bli kvitt etanol som kan ødelegge DNA, og dermed resultater videre, ble det kjørt en ny runde med 500 μL «Wash Solution». Røret ble sentrifugert ved 16000 xg i 3 minutter.

10. Eluering av DNA

Til slutt ble DNA-et eluert og befant seg i væskeform i oppsamlingsrøret. Dette etter at 200 μL buffer ble tilsatt direkte på midten av kolonnen, og deretter sentrifugert ved 6500 xg i 1 minutt.

5.7 DNA-kvantifisering av fra kulturelle medier

Isolatene fra veksten i BHI-buljongen ble kvantifisert ved bruk av QubitTM dsDNA BR Assay Kit og Qubit[®] 2.0 Fluorometer, samt Nanodrop.

5.8 Multipleks PCR

DNA-et som ble isolert fra BHI-buljongen ble videre analysert genotypisk med multipleks PCR for å lete etter antibiotikaresistente gener. Multipleks PCR ble kjørt med SimpliAmp™ Thermal Cycler fra Applied Biosystems. Isolatene fra ulike selektive medier hadde litt ulike opplegg med primere tilpasset det som tilsynelatende kunne være på skålene. Når det gjelder undersøkelse av gener kodende for karbapenemase, så ble det kjørt en multipleks PCR allerede for jordisolatene. Altså av DNA som ble isolert direkte fra jordprøvene. I tillegg ble det kjørt multipleks PCR av isolatene som opprinnelig vokste på CRE-skålene. Alle ingrediensene til multipleksmiksen var frosne, og ble tint på is, og ble vortexet og sentrifugert i 8-10 sekunder før de ble brukt.

5.8.1 Screening for karbapenemasekodende gener

Første PCR for leting etter karbapenemasekodende gener ble foretatt på DNA ekstrahert fra jord. Altså på prøvene 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1 og 3-2, samt en positiv kontroll. For blanding av mastermiksen ble oppskrift og utstyr fra Qiagen® Multiplex Kit brukt. Oppskriften på mastermiksen for ett rør ses i tabell 5.2. Primerblandingen ses i tabell 5.3. Samme opplegget ble også kjørt for isolatene 10 og 14, da de vokste på CRE-skålene. Hver av isolatene ble undersøkt to ganger, med primerløsning car 1 og car 2 i hver. Altså to rør med isolat 10, hvorav et hadde car 1, og et car 2. Isolat 14 var i to rør, hvorav et hadde car 1, og et car 2.

Tabell 5.2 Reaksjonsblanding for multipleks PCR- screening etter karbapenemasekodende gener

Komponent	Volum (µL) per rør/ reaksjon
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	10
10x primer mix (2 µM av hver primer)	2
RNAse-fritt vann	7
Templat- DNA	1
Totalt	20

Tabell 5.3 Primere brukt i multipleks PCR- screening etter karbapenemasekodende gener.

	CAR 1:	CAR 2:
Primere	Cmy2-f-/cmy2-r	NDM_F
	MultiOxa48-F	NDM_R
	IMP-F	SFC1_F
	IMP-R	SFC1_R
	VIM_F	KPC_F
	VIM_R	KPC_R

Tabell 5.4 Oppsett for multipleks PCR for screening etter karbapenemase- og ESBL-gener.

	Tid	Temperatur
Forberedende varmeaktivering	15 min	95 °C
Denaturering	30 sek	94 °C
Hybridisering	90 sek	60 °C
Forlenging	90 sek	72 °C
Antall sykluser: 40		
Siste forlenging:	10 min	72 °C
«Oppbevaring»	∞	4 °C

5.8.2 Screening etter ESBL- kodende gener

Multipleks PCR for leting etter ESBL-kodende gener ble tatt på det isolerte DNA-et fra koloniene som vokste på ESBL-skål og senere BHI. Tilsynelatende positive resultater førte til nye runder med PCR for bekreftelse. For blanding av mastermiks ble oppskrift og utstyr fra Qiagen® Multiplex Kit brukt. Oppskriften på mastermiks for ett rør ses i tabell 5.5. Volumet var en halvering av oppskriften i protokollen. Samme reaksjonsblanding, med unntak av innholdet i primermiksen var det samme for ESBL- og MRSA-undersøkelsene.

Tabell 5.5 Reaksjonsblanding for multipleks PCR med screening etter ESBL- og MRSA-gener.

Komponent	Volum (µL) per rør/ reaksjon
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5
10x primer mix (2 µM av hver primer)	2,5
RNase-fritt vann	7 (6)
Templat- DNA	1 (2)
Totalt	25

5.8.3 Screening etter MRSA-gener

Det ble kjørt multipleks PCR av isolatene fra MRSA-skålene som hadde vokst i BHI. Flere runder ble kjørt for å bekrefte positive resultater. Positiv kontroll ble alltid brukt. Ettersom de var positive for *spa*, *MecA* og *MecC* ble det kjørt nye runder med PCR for å bekrefte resultatet. Mastermiksen var den samme som for ESBL. For blanding av mastermiks ble oppskrift og utstyr fra Qiagen® Multiplex Kit brukt. Oppskriften på mastermiks for ett rør ses i tabell 5.5. Volumet var en halvering av protokollen. Tallene i parentes for vann og DNA ble brukt ved bekreftelse av resistensgener *mecA* og *mecC*. Oppsett for tid og temperatur står i tabell 5.6.

Tabell 5.6 Oppsett for multipleks PCR for screening etter MRSA-gener.

	Tid	Temperatur
Forberedende var-meaktivering	15 min	95 °C
Denaturering	30 sek	94 °C
Hybridisering	90 sek	62 °C
Forlenging	90 sek	72 °C
Antall sykluser: 35		
Siste forlenging:	10 min	72 °C
«Oppbevaring»	∞	4 °C

5.9 16S PCR

16S PCR ble gjennomført med C1000™ Thermal Cycler fra Bio-Rad. Innholdet i selve reaksjonen ses i tabell 5.7 og oppsett med temperatur og tid for reaksjonen er i tabell 5.8.

Tabell 5.7 Reaksjonsblanding 16S PCR

Komponent	Volum (µL) per rør/ reaksjon
iProof HF buffer	8
dNTP-er	0,8
1 Forward	2
5 Reverse	2
iProof DNA polymerase	0,4
Templat DNA	2
PCR-grade H2O	24,8
Totalvolum (µl)	40

Tabell 5.8 Oppsett for 16S PCR

	Tid	Temperatur
Forberedende var-meaktivering	30 sek	98 °C
Denaturering	10 sek	98 °C
Hybridisering	30 sek	55 °C
Forlenging	10 min	72 °C
Antall sykluser: 35		
Siste forlenging:	10 min	72 °C
«Oppbevaring»	∞	4 °C

5.10 Gelelektroforese

Agarosekonsentrasjonene som ble brukt i gelene under elektroforesene var på 1 % for screening etter karbapenemasegener, ESBL-gener og for 16S PCR. For leting etter MRSA-gener ble det brukt 2 % gel. Gelene ble lagd ved å løse opp agarose i 1 x TAE-løsning i en erlenmeyerkolbe i mikrobølgeovn. Effekten ble satt til maks og tiden til to minutter. Ved koking ble kolben tatt ut og rørt forsiktig rundt, før den ble satt inn igjen, og effekten ble skrudd ned skrudd ned til 600 W den resterende tiden. Etter omtrent 2 minutter totalt i mikrobølgeovnen var innholdet i kolben en klar løsning uten uoppløst sukker. Løsningen ble kjølt ned i romtemperatur til den ble litt varmere enn lunken, ble det tilsatt GelRed™ Nucleic Acid Stain, rørt rundt, og helt over i en form med kammer. Eventuelle luftbobler ble fjernet eller skjøvet til siden med en pipettespiss. Kammene er i gelen for å lage brønner som PCR-produktene kan appliseres i. Etter hvert som gelen stivnet, ble kammen(e) fjernet, og gelen flyttet over i et elektroforesekar tilkoblet elektroder. Karet var fylt med 1x TAE, og ble etterfylt til gelen var dekket dersom den ikke var det. Deretter ble 5 µL PCR-produkt blandet med 4 µL vann og 2 µL loading dye applisert i brønnene. Totalt ble det overført 10 µL av denne blandingen i brønnene, det samme for den positive kontrollen. For ladder var det for det meste 7 µL som ble brukt, men for bekreftelsene på slutten ble det også brukt 10 µL av den for å få en sterkere markør av lengdene på båndene. Deretter ble karet koblet til strøm og skrudd på. Spenningen var på 80 V for 1%- gelene, og de ble kjørt i 30-45 minutter. For 2 %-gelene var det 130 V i 60-90 minutter. Etter endt elektroforese ble gelene løftet opp og tatt med for å ta bilde under UV-lys for å kunne se hvor langt båndene hadde beveget seg, og dermed størrelsen på dem. Dersom det ikke var bånd på linjen etter en brønn, tydet det på at genet som det ble brukt primere for ikke var tilstede i DNA-et.

5.11 Sekvensering

5.11.1 Sanger-sekvensering

Alle prøver som tilsynelatende testet positivt på PCR ble klargjort og sendt videre til GATC Biotech i Tyskland. Prøvene det var aktuelt for var alle prøvene fra 16S-sekvenseringen, samt at prøve 9 ble testet med hensyn på *spa*-gen og *mecC*. Første ledd i klargjøringen var rensing med GenElute™ PCR Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich. Prosessen foregår trinnvis ved å binde DNA til en silicamembran i en kolonne i et oppsamlingsrør, vaske det og til slutt la det konsentrerte DNA-et samles opp. Som for ekstrahering, gjelder det å klargjøre bindingskolonnen med «Column Preparation Solution» for å øke evnen til å binde DNA til membranen. Deretter brukes «Binding Solution» sammen med prøven, for at den skal bindes til membranen. Her brukes det fem ganger så mye «Binding Solution» som PCR-produkt. Videre er det en vask med «Wash Solution» blandet med etanol. Mellom hvert trinn er det en sentrifugering, hvor eluatet kastes. Sentrifugen varer i 0,5 til 2 minutter og er på 12000 til 16000 xg avhengig av trinnet. Til slutt overføres kolonnen til et større eppendorfrør, blir tilsatt «Elution Solution» og sentrifugeres en siste gang. Da er det rent DNA i oppsamlingsrøret. Deretter kvantifiseres mengden DNA med Qubit™ dsDNA BR Assay Kit og Qubit® 2.0 Fluorometer (Sigma-Aldrich). Prøvene som hadde for lite DNA måtte gjennom en ny runde PCR, rensing og kvantifisering for å sjekke om det gikk an å få mer. Dette gjaldt prøvene 1, 3 og 11. Etter ny PCR hadde de nok DNA.

Før prøvene kunne sendes av gårde for sekvensering måtte de klargjøres med primere. Mengde konsentrert DNA avgjorde hvor mye primer som skulle tilsettes. Ettersom Sanger-sekvensering ikke kan brukes på for store produkter med for mange basepar, behandles hver prøve i to rør, et med forward-primer, og et med reverse-primer.

Tabell 5.9 Reaksjonsblanding til Sanger-sekvensering

Mengde DNA (ng/ μ L)	Mengde primer
< 10	2 μ L primer til 8 μ L prøve
10 – 20	3 μ L primer til 8 μ L prøve
\geq 20	5 μ L primer til 5 μ L prøve

Etter sekvenseringen kom resultatet tilbake som en datafil med basesekvenser. Sekvensene ble kopiert inn i søkemotoren Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) for databaser med gensekvenser.

5.11.2 Helgenomsekvensering

Tredjegerasjons-helgenomssekvenseringen ble foretatt ved bruk av Oxford Nanopore MinION på utvalgte prøver. Metoden ble brukt til å identifisere hvilke gensekvenser og bakteriearter som var i prøven. Stipendiat Misti Dawn Finton, professor Bjørn-Arne Lindstedt og postdoktor Davide Porcellato utførte analyser og databehandling. Prøve 9, 10, 11, 13, 14 og 15 ble analysert. Prøvene ble analysert for antibiotikaresistensgener med følgende verktøy:

- 1) The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) – rgi- søk.
- 2) nBLAST i Bio-Edit med ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) databasen (Nt Ver 3).
- 3) nBLAST med egen database (Lindstedt) kjørt hos The Center for Genomic Epidemiology (CGE) server.
- 4) ResFinder web service fra The Center for Genomic Epidemiology (CGE).
- 5) ResFinderFG web service fra The Center for Genomic Epidemiology (CGE).
- 6) KmerResistance web service fra The Center for Genomic Epidemiology (CGE).

6.0 Resultater

6.1 DNA-kvantifisering av ekstrakt fra jordprøver

Tabell 6.1 Mengde ekstrahert DNA fra jordprøver.

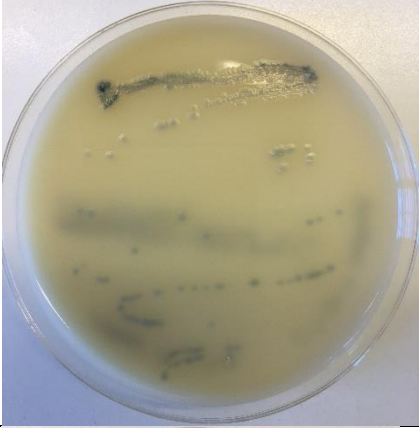
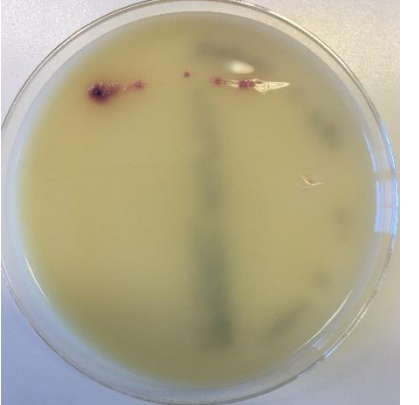

Prøve	DNA (ng/ μ L)
1-1'	4,66
1-1''	5,84
1-1'''	4,86
1-2'	3,0
1-2''	16,0
1-2'''	37,8
2-1'	2,12
2-1''	For lavt
2-1'''	For lavt
2-2'	6,94
2-2''	11,2
2-2'''	8,04
3-1'	5,86
3-1''	11,8
3-1'''	34,0
3-2'	8,20
3-2''	14,5
3-2'''	20,8



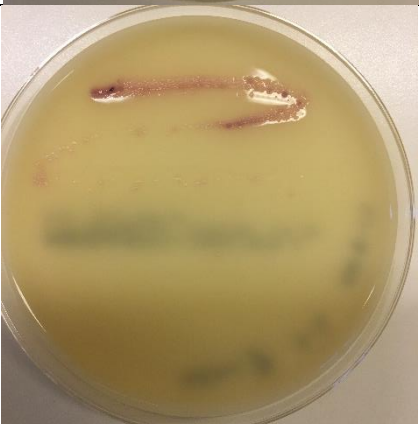

Ifølge tabell 6.1 var det noen forskjeller selv mellom parallellene fra samme sted. Likevel var det i gjennomsnitt forholdsvis like mengder DNA i prøvene fra alle stedene, med unntak av 2-1, som i snitt var en del lavere enn resten.

6.2 Vekst på selektive skåler

6.2.1 Brilliance™ MRSA Agar

Tabell 6.2 Vekst på Brilliance™ MRSA Agar

Prøve	Bilde	Kommentar
Koloni 1 (Opprinnelig fra 1-2)		Svakt blågrønne kolonier. Kan tyde på MRSA.
Koloni 2 (Opprinnelig fra 1-2)		Rosa/lilla tyder på at det er noe annet enn MRSA på skålen.
Koloni 3 (Opprinnelig fra 1-2)		Rosa/lilla tyder på at det er noe annet enn MRSA på skålen.




<p>Koloni 5 (Opprinnelig fra 2-2)</p>		<p>Blå/grønn/lilla. Interessant skål, men pga. vansker med å få materialer av skålen, ble det tatt et valg om ikke å gå videre med dyrking av bakterier herfra.</p>
<p>Koloni 6 (Opprinnelig fra 2-2)</p>		<p>Rødt/ rosa tyder på at det ikke er MRSA på skålen.</p>
<p>Koloni 7 (Opprinnelig fra 3-2)</p>		<p>Rosa tyder på at det ikke er MRSA på skålen.</p>
<p>Koloni 8 (Opprinnelig fra 3-2)</p>		<p>Rosa tyder på at det ikke er MRSA på skålen.</p>

<p>Koloni 9 (Opprinnelig fra 3-2)</p>		<p>Rosa tyder på at det ikke er MRSA på skålen.</p>
---	--	---

Som tabell 6.2 viser, var det vekst på alle skålene ved rendyrking av isolatene på MRSA-skål. MRSA skulle vist seg som blå kolonier, noe som ikke var der i særlig grad. Det er mulig at det var noe på skålen fra koloni 5, men etter mange forsøk, var det umulig å få noe materiale av skålen. Ellers er veksten generelt rødlig og rosa, noe som tyder på at det er en annen type bakterie som kan vokse på skålen, og som på en eller annen måte tåler miljøet med antibiotika i.

6.2.2 Brilliance™ ESBL Agar



Tabell 6.3 Vekst på Brilliance™ ESBL Agar

Prøve	Bilde	Kommentar
Koloni 11 (Opprinnelig fra 3-2)		Gul-orange farge tyder på at veksten sannsynligvis ikke er av ESBL-produserende <i>Enterobacteriaceae</i> .
Koloni 13		Gul-orange farge tyder på at veksten sannsynligvis ikke er av ESBL-produserende <i>Enterobacteriaceae</i> .
Koloni 15 (Opprinnelig fra 1-2)		Gul-orange farge tyder på at veksten sannsynligvis ikke er av ESBL-produserende <i>Enterobacteriaceae</i> .

Tabell 6.3 viser at det var vekst på alle skålene med medium som skulle selektere for ESBL-produserende bakterier. Likevel var det ingenting som tydet på at veksten skyldtes slike bakterier. Det var heller ikke lett å se adskilte kolonier.

6.2.3 Brilliance™ CRE Agar

Tabell 6.4 Vekst på Brilliance™ CRE Agar

Prøve	Bilde	Kommentar
Koloni 10 (Opprinnelig fra 3-2)		Gulaktig farge kan tyde på at veksten ikke kommer av karbapenemresistente <i>Enterobacteriaceae</i> .
Koloni 14 (Opprinnelig fra 1-2)		Blå-grønn farge kan tyde på vekst av <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobacter</i> (KESC).

Tabell 6.4 viser at CRE-vekst er lite sannsynlig, men at bakterier i KESC-gruppen muligens er tilstede.

6.3 DNA-kvantifisering av kolonier dyrket i BHI-buljong

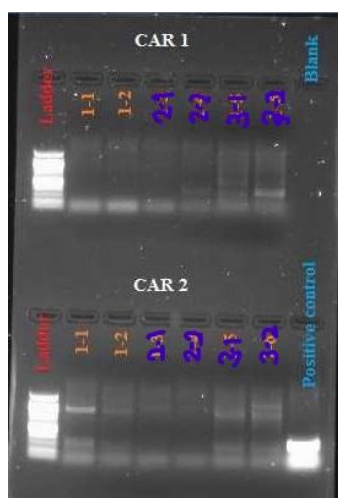
Tabell 6.5 Mengde DNA ekstrahert fra BHI-kulturer

	Prøve	DNA (ng/μL)	Nanodrop	260/280	260/230
MRSA-skåler	1	89,0	60,6	2,10	2,43
	2	22,6	105,0	2,09	2,54
	3	16,9	22,5	1,98	2,50
	6	20,8	50,8	1,83	1,51
	7	66,8	51,4	1,86	1,73
	8	7,26	114,6	1,56	0,85
	9	78,0	49,9	1,71	1,29
ESBL-/CRE-skåler	10	17,8	51,0	2,05	2,42
	11	268	73,4	2,06	2,39
	13	258	802,7	2,11	2,35
	14	16,8	44,3	2,02	2,15
	15	64,4	71,1	1,96	2,43

Det ble ekstrahert DNA etter bakterievekst i BHI-buljong i ca. et døgn. GenElute™ Bacterial Genome DNA Kit fra Sigma-Aldrich ble brukt til ekstraksjon, og Qubit™ dsDNA BR Assay Kit og Qubit® 2.0 Fluorometer, samt Nanodrop ble brukt til kvantifisering. Som tabell 6.5 viser, så viser det seg at renheten i prøvene var ganske høy, da alle bortsett fra prøve 8 og 9 hadde verdier over 1,8 på 260/280-ratioen. Prøvene 6, 7, 8 og 9 hadde også lavere absorbans ved 260/230, noe som ikke er helt ideelt.

6.4 Molekylære undersøkelser

6.4.1 PCR av jordekstrakter



Figur 6.1 PCR av jordekstrakt med karbapenemasegener som positiv kontroll

Jordprøvene som ble ekstrahert med DNeasy® PowerSoil® Kit fra Qiagen gikk gjennom PCR for undersøkelse for eventuell forekomst av karbapenemasegener. Bildet av gelen viste bånd i flere av prøvene, og det så ut som at det kan ha vært positive resultater for flere av dem.

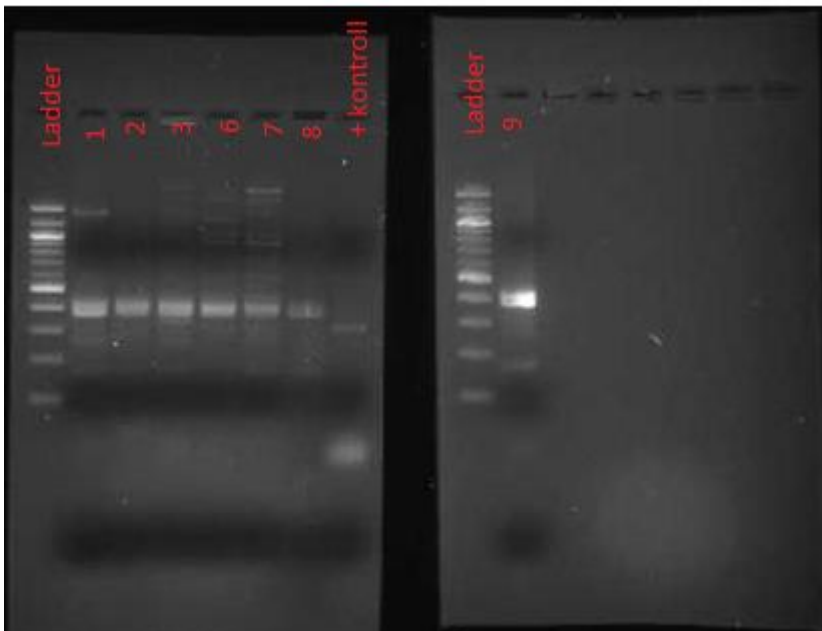
6.4.2 Screening med multipleks PCR og gelelektroforese av DNA i BHI-medium

Gelbildet etter multipleks PCR av ekstraktene fra CRE-skåler viste ingenting, noe som for øvrig stemte overens med bildene av de selektive skålene. Bildet har derfor blitt utelatt. Når det gjelder ekstrakt fra koloniene som vokste på ESBL-skålene, ble det kjørt to runder, uten at det ga store utslag. Tabell 6.6 og 6.7 viser hvilke primere som ble brukt den siste runden. *MecC* ble tatt med som en slags referanse den siste runden, og følgende primere ble brukt:

Tabell 6.6 og 6.7 Primere brukt ved ESBL-screening

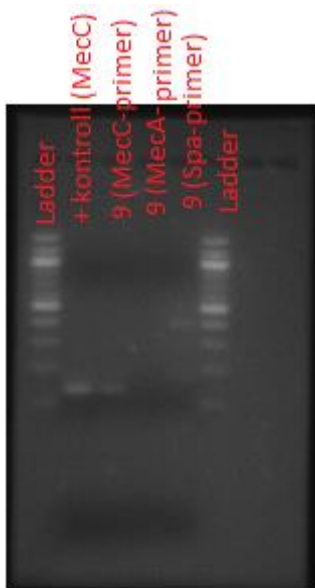
A	MultiCTXMGp1	11	A	MultiCTXMGp9	15
B	MultiTSOT		B	MultiCTXMGp1	
C	MultiCTXMGp2	13	C	MultiTSOT	
D	MultiTSOO		D	NDM	
E	MultiTSOS		E	VIM	
F	MultiCTXMGp2	15	F	KPC	
			G	MecC	+
			H		

Når det gjelder undersøkelsene av prøvene som opprinnelig vokste på de selektive skålene for MRSA, var det flere utslag for *spa*-genet. Dette resultatet gjaldt for alle prøvene. I første runde med PCR så det også ut som at prøve 9 kunne være positiv for *mecA* og *mecC*, som er MRSA-gener. Koloni 9 så ikke i utgangspunktet ut som at den skulle være MRSA-positiv, da det var 1 og 5 som kunne tyde på det.



Figur 6.1 Gelbilde av PCR-produkt fra MRSA-skål og BHI-buljong

Gelbildet viser at alle prøvene var positive for *spa*-genet. 9 var i tillegg positiv for *MecA* og *MecC*. Det ble kjørt flere runder med PCR og gel for å bekrefte dette.

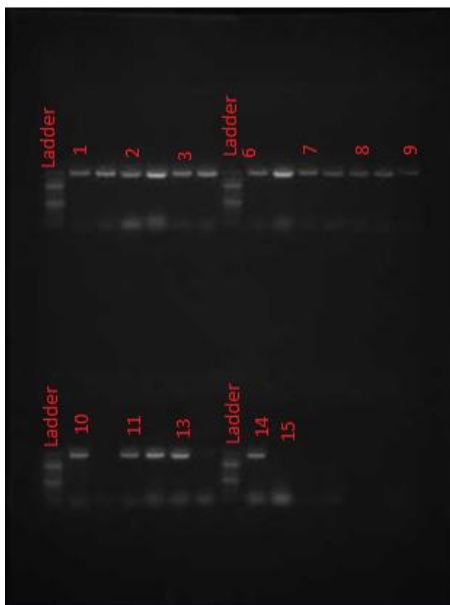


Bilde 6.3 viser en endelig bekreftelse av at prøve 9 inneholdt MRSA. Prøven var positiv for *MecC* og *spa*, og negativ for *MecA*. Denne prøven ble derfor undersøkt videre med sekvensering.

Figur 6.2 Påvisning av resistensgenet *MecC* i MRSA

6.4.3 16S PCR

For gelelektroforesen ble prøvene 1, 7, 9, 11 og 13 fortynnet 1/10 (1 μ L PCR-produkt i 9 μ L H₂O) grunnet utydelige bånd tidligere. Noen av prøvene, 1, 3, 11, 13 og 15, var fortsatt utydelige, og ble kjørt på nytt ufortynnet. Alle prøvene ble undersøkt videre for Sanger-sekvensering.



Figur 6.3 16S PCR



Figur 6.4 16S PCR

Noen av prøvene, 1, 3, 11, 13 og 15, var fortsatt utydelige, og ble kjørt på nytt ufortynnet. Alle prøvene ble undersøkt videre for Sanger-sekvensering.

6.4.4 Sanger-sekvensering

Sanger-sekvensering av positive resultater fra 16S og multipleks PCR ga resultater for de fleste av sekvensene. Prøvene 11, 13 og 15 ga ingen resultater. For 9 var det ulike resultater på 16S og for prøvene tilsatt primere for hhv. *Spa* og *mecC*. Resultatene var som følger:

Utdrag fra resultatet i BLAST:

mecC

46F147 (Martha O) - MRSA

Staphylococcus aureus strain MVCNSTC8 penicillin binding protein (**mecC**) gene, partial cds

Sequence ID: [KX018811.1](#) Length: 299 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 182 to 252 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
132 bits(71)	3e-28()	71/71(100%)	0/71(0%)	Plus/Plus	

Features:

```
Query 4      TTGCAAATACTTATGACAATAAACCTTTAGACACATTATTGGAGAAAAAGG-
CTGAAAACG  63
          |||
Sbjct 182    TTGCAAATACTTATGACAATAAACCTTTAGACACATTATTGGAGAAAAAGG-
CTGAAAACG  241

Query 64      GAAAAGATCTT 74
          |||
Sbjct 242      GAAAAGATCTT 252
```

46FI48 (Martha O) - MRSA

Staphylococcus aureus strain MVC MSTC8 penicillin binding protein (**mecC**) gene, partial cds

Sequence ID: [KX018811.1](#) Length: 299 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 119 to 194 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score Expect Identities Gaps Strand Frame

141 bits(76) 5e-31() 76/76(100%) 0/76(0%) Plus/Minus

Features:

```

Query 4 TAAGTATTTGCAATGGATACCTTAAAACCATCAGTGTTTTGCAATTGTTTATCATA-
GAGG 63
      |||
Sbjct 194 TAAGTATTTGCAATGGATACCTTAAAACCATCAGTGTTTTGCAATTGTTTATCATA-
GAGG 135

Query 64 CGTTCTAAGCCTTTTT 79
      |||
Sbjct 134 CGTTCTAAGCCTTTTT 119

```

Spa

46FI45 (Martha O) - MRSA

Staphylococcus aureus strain M4 staphylococcal protein A (**spa**) gene, partial cds

Sequence ID: [KY315723.1](#) Length: 383 Number of Matches: 4

Related Information

Range 1: 84 to 143 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score Expect Identities Gaps Strand Frame

104 bits(56) 5e-20() **58/60(97%)** 0/60(0%) Plus/Plus

Features:

```

Query 1 CGATGCTC NNGCACCAAAAAGAGGAAGACAACAACAAACCTGGTAAAGAAGACGG-
CAACAA 60
      |||
Sbjct 84 CGATGCTCAAGCACCAAAAAGAGGAAGACAACAACAAACCTGGTAAAGAAGACGG-
CAACAA 143

```

46FI46 (Martha O) - MRSA

Staphylococcus aureus isolate Egy50A Spa gene, partial cds

Sequence ID: [KC428635.1](#) Length: 327 Number of Matches: 3

Related Information

Range 1: 182 to 276 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
150 bits(81)	1e-33()	88/95(93%)	0/95(0%)	Plus/Minus	

Features:

Query	1	GGTTNACGACATGTACTCCGTTGCCGCTCTTCTTTACCAGGTTTTTTGTTGTCTTCTTTNN	60
Sbjct	276	GGTTAACGACATGTACTCCGTTGCCGCTCTTCTTTACCAGGTTTTTTGTTGTCTTCTTTGC	217
Query	61	NNGGCTTGTTGNCATCTTCTTTACNAGGTTTTTTG	95
Sbjct	216	CAGGCTTGTTGCCATCTTCTTTACCAGGTTTTTTG	182

Koloni 1

Bakterie

Bacillus cereus
Bacillus cereus
Bacillus cereus

Identitet (%)

98
98
98

Koloni 2

Bakterie

Bacillus thuringiensis
Bacillus thuringiensis
Bacillus toyonensis

Identitet (%)

99
99
99

Koloni 3

Bakterie

Bacillus pumilus
Bacillus pumilus
Bacillus pumilus

Identitet (%)

99
99
99

Koloni 6

Bakterie

Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis

Identitet (%)

96
96
96

Koloni 7

Bakterie

Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis

Identitet (%)

99
99
99

Koloni 8

Bakterie	Identitet (%)
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99
<i>Bacillus licheniformis</i>	99
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99

Koloni 9 (16S)

Bakterie	Identitet (%)
<i>Bacillus pumilus</i>	99
<i>Bacillus pumilus</i>	99
<i>Bacillus pumilus</i>	99

Koloni 10

Bakterie	Identitet (%)
<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>	99
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	97
<i>Ochrobactrum oryzae</i>	97

Koloni 14

Bakterie	Identitet (%)
<i>Novosphingobium capsulatum</i>	99
<i>Novosphingobium capsulatum</i>	99
<i>Novosphingobium rhizosphaerae</i>	99

Koloni 9 spa

Bakterie	Identitet (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	97

Koloni 9 mecC

Bakterie	Identitet (%)
<i>Staphylococcus aureus mecC</i>	100
<i>Staphylococcus aureus Egy50A Spa-gen</i>	100

6.4.5 Tredjegenasjonssekvensering

Helgenomsekvenseringen med minION resulterte i følgende:

Tabell 6.8 Helgenomsekvensering av prøve 9

Koloni 9: <i>Bacillus pumilus</i>		
Gen	Kategori	Kommentar
<i>cat8</i>	Quorum sensing	Kloramfenikol acetyltransferase (plasmidbåren).
<i>(Phe)Cat-86</i>	Quorum sensing	Kloramfenikol acetyltransferase (bæres på kromosom)
<i>van_ligase</i>		

Tabell 6.9 Helgenomsekvensering av prøve 10

Koloni 10: <i>Ochrobactrum anthropi</i>		
Gen	Kategori	Kommentar
<i>abeS</i>	Effluxpumpe	SMR- familien av transportproteiner. Resistens mot ulike klasser antimikrobielle agens, vaskemidler og fargestoffer.
<i>carA</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter involvert i makrolidresistens.
<i>lsaB</i>	Effluxpumpe	ABC efflxpumpe som gir resistens mot clindamycin.
<i>macB</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter involvert i makrolidresistens
<i>macB</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter involvert i makrolidresistens.
<i>MexI</i>	Effluxpumpe	Transportprotein i den indre membranen i effluxkompleks MexGHI-OpmD.
<i>MexI</i>	Effluxpumpe	Transportprotein i den indre membranen i effluxkompleks MexGHI-OpmD.

<i>msbA</i>	Effluxpumpe	MDR- transporter- homolog fra <i>E. coli</i> .
<i>novA</i>	Effluxpumpe	Type III ABC- transporter, identifisert på novobiocin biosyntetisk genklase. Involvert i transport av novobiocin.
<i>oqxB</i>	Effluxpumpe	Komponent i RND-type multidrug effluxpumpe som gir resistens mot olaquinox.
« <i>Streptomyces cinnamoneus</i> »- <i>EF-Tu</i> - mutasjoner	Determinant for resistens mot elfamycin	Resistens mot elfamycin.
<i>Tet(G)</i>	Effluxpumpe	Tetrasyklin- effluxprotein i Gram-negative bakterier.
<i>tetA(46)</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter som gir tetrasyklinresistens.
<i>tetA(48)</i>	Effluxpumpe	Tetrasyklin-effluxpumpe.
<i>tetT</i>	Beskyttelse av målprotein.	Ribosomalt beskyttelsesprotein. Determinant for resistens mot tetrasyklin.
<i>vgaE</i>	Effluxpumpe	Effluxprotein som gir resistens mot streptogramin A.

Tabell 6.10 Helgenomsekvensering av prøve 11

Koloni 11: <i>Pseudomonas alkylphenolia</i>		
Gen	Kategori	Kommentar
<i>mprA</i>	Effluxpumpe	Negativ regulator for EmrAB-TolC- MDR- effluxpumpen.
<i>emrA</i>	Effluxpumpe	Multidrug- effluxsystem som gir resistens mot nalidixinsyre og thiolactomycin.
<i>emrB</i>	Effluxpumpe	Multidrug-effluxsystem som gir resistens mot nalidixinsyre og thiolactomycin.
<i>mdtL</i>		MDR-protein

Tabell 6.11 Helgenomsekvensering av prøve 13

Koloni 13: <i>Pseudomonas</i> sp.		
Gen	Kategori	Kommentar
<i>oqxB</i>	Effluxpumpe	RND-type multidrug effluxpumpe som gir resistens mot olaquinox (vekstpromotorgitt svin og kylling).

Tabell 6.12 Helgenomsekvensering av prøve 14

Koloni 14: <i>Achromobacter xylosoxidans</i>		
<i>Streptomyces bingchenggensis</i>		
Gen	Kategori	Kommentar
<i>kdpE</i>	Effluxpumpe	Transkripsjonsaktivator, del to-komponentsystemet KdpD/KdpE. Determinant for aminoglykosidresistens
<i>MexA</i>	Effluxpumpe	Membranfusjonsprotein i MexAB-OprM multidrug effluxkompleks.
<i>Mfd</i>	Beskytter målprotein	Resistens mot FQ.
<i>msbA</i>	Effluxpumpe	Multidrug-transportprotein.
“ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ”- <i>katG</i> -mutasjoner		Resistens mot isoniazid
<i>rpoB2</i>	Flytter målproteiner	Rifampin-resistant beta-underenhet i RNA polymerase (<i>rpoB2</i>).

Koloni 15: <i>Achromobacter xylosoxidans</i>		
<i>Streptomyces bingchenggensis</i> N		
Gen	Kategori	Kommentar
<i>AcrF</i>	Effluxpumpe	Membrantransporter
<i>adeL</i>	Effluxpumpe	AdeFGH overekspresjon og MDR.
<i>bacA</i>	Effluxpumpe	Resirkulerer undecaprenyl- pyrofosfat under celleveggbiosyntese. Resistens mot bacitracin.
<i>bcr-1</i>	Molekylær bypass	Transmembranprotein som frastøter bicyclomycin.
<i>bcrA</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter. Bacitracin-resistens.
<i>Brucella suis mprF</i>	Målmodofisering	Resistens mot peptider som ødelegger cellemembranen, inkl. defensiner.
<i>cmlv</i>	Enzyminaktivering	Kloramfenikolfosfotransferase
<i>cmrA</i>	Enzyminaktivering	Kloramfenikolresistens (ligger på transposon).
<i>efrB</i>	Effluxpumpe	MDR
<i>emrB</i>	Effluxpumpe	MDR
<i>ErmA</i>	Målmodofisering	Resistens mot erythromycin, azithromycin og clindamycin.
<i>kdpE</i>	Effluxpumpe	Transkripsjonsaktivator, del tokomponentsystemet KdpD/KdpE. Determinant for aminoglykosidresistens.
<i>macB</i>	Effluxpumpe	ABC-transporter. Makrolidresistens.
<i>mdtA</i>	Effluxpumpe	Fusjonsprotein i multidrug effluxkomplekset mdtABC.
<i>mdtF</i>	Effluxpumpe	Multidrug membrantransporter i MdtEF-TolC- efflux-kompleks.
<i>MexA</i>	Effluxpumpe	Membranfusjonsprotein i MexAB-OprM multidrug-efflux- kompleks.
<i>MexB</i>	Effluxpumpe	Multidrug eksporter i efflux komplekset MexAB-OprM.
<i>MexD</i>	Effluxpumpe	Multidrug membran-transporter i MexCD-OprJ-kompleks.
<i>MexF</i>	Effluxpumpe	Multidrug-transporter i MexEF-OprN- kompleks.
<i>MexJ</i>	Effluxpumpe	Membranfusjonsprotein i MexJK multidrug- efflux-protein.
<i>MexK</i>	Effluxpumpe	RND- transporter i MexJK multidrug- effluxprotein

<i>MexL</i>	Effluxpumpe	Repressor av mexJK transkripsjon. Autoregulerer egen ekspressjon.
<i>MexN</i>	Effluxpumpe	Membrantransporter
<i>MexV</i>	Effluxpumpe	Membranfusjonsprotein i MexVW-OprM- multidrug effluxkompleks.
<i>MexW</i>	Effluxpumpe	RND-type membranprotein. FQ- og tetrasyklinresistens
<i>MexX</i>	Effluxpumpe	Membranfusjonsprotein i MexXY-OprM- multidrug-efflux.
<i>mfd</i>	Endring av målprotein	FQ-resistens
<i>msbA</i>	Effluxpumpe	MDR
<i>MuxC</i>	Effluxpumpe	Del av RND-systemet MuxABC-OpmB
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> intrinsic <i>murA</i>		Fosfomycinresistens
<i>oleB</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter involvert i oleandomycin- sekresjon
<i>OpmH</i>	Effluxpumpe	Triklosanresistens
<i>OprN</i>	Effluxpumpe	Komponent i ytre membran-kanal i MexEF-OprN multidrug effluxkompleks.
<i>otrC</i>	Effluxpumpe	Tetrasyklinresistens
<i>rpoB2</i>	Flytter målproteiner	Rifampinresistens beta-underenhet i RNA polymerase (<i>rpoB2</i>)
<i>Salmonella</i> serovar <i>gyrB</i>	Genvariant eller mutant	FQ-resistens
<i>Sav1866</i>	Effluxpumpe	Resistens mot verapamil, tetraphenylphosphorchloride, and Hoechst 33342.
<i>smeR</i>	Effluxpumpe	
<i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF-Tu- mutant	Elfamycinresistens	Elfamycinresistens
<i>Streptomyces rishiriensis</i> <i>parY</i> -mutant	Aminocoumarinresistens	Aminocoumarinresistens
<i>tetA(48)</i>	Effluxpumpe	Tetrasyklinresistens
<i>tetA(46)</i>	Effluxpumpe	ABC- transporter. Tetrasyklinresistens
<i>TriA</i>	Effluxpumpe	Membranprotein sammenhengende med TriB. Triklosanresistens.
<i>TriB</i>	Effluxpumpe	Membranprotein sammenhengende med TriA. Triklosanresistens.
<i>TriC</i>	Effluxpumpe	RND- transporter. Del av TriABC-OpmH, et triklosan-spesifikt effluxprotein.
<i>vanHD</i>	Glykopeptidresistens	Ligger på vanHD (assosiert med vancomycinresistens)

<i>vanHO</i>	Glykopeptidresistens	Ligger på vanHO (assosiert med vancomycinresistens)
<i>vanRO</i>	Glykopeptidresistens	Ligger på vanRO (assosiert med vancomycinresistens)
<i>vanSF</i>	Glykopeptidresistens	Ligger på vanF (assosiert med vancomycinresistens)
<i>vanSL</i>	Glykopeptidresistens	Ligger på vanL (assosiert med vancomycinresistens)
<i>vgaA</i>	Effluxpumpe	Resistens mot streptogramin A
<i>YojI</i>	Effluxpumpe	Resistens antibiotisk microcin J25 (peptid)

7.0 Diskusjon

7.1 Vekst på selektive medier

Dyrking på skålene resulterte i at det vokste en del kolonier som ikke var de typiske som mediene var lagd for å selektere for. Fargene stemte ikke overens med det som var forventet, noe som indikerte at det var andre bakterier enn typiske ESBL-produserende enterobakterier, CRE, og MRSA som vokste der. Ut fra fargeindeksen fra produsenten var det derfor vanskelig å antyde hvilke bakterier det kunne være, bortsett fra på noen få skåler. Dog viste resultatene fra PCR og sekvensering at de ikke stemte helt. Koloni 1 var f. eks. *B. cereus* og ikke MRSA, KESC var ikke tilstede i koloni 14. Koloni 5 lot seg ikke fjerne fra skål, og ble derfor ikke undersøkt videre, men resultater fra videre undersøkelser fra den hadde vært veldig interessante å ha sett. Ettersom skålene inneholdt antibiotika, var det sannsynlig at bakteriene som vokste på en eller annen måte var resistente mot antibiotikatyperne i mediene. Siden skålene er utviklet fra forskning med og for klinisk bruk med tanke på hvilke bakterier som gir sykdom hos mennesker, kan det også være at jordprøver ikke er den mest ideelle kilden for bakterier til skålene. Selv om jord inneholder mange ESBL-produserer, CRE og MRSA er ofte mer assosiert med folk og dyr, derfor kan det være lettere å bruke kilder som blod, urin og avføring enn jord på disse mediene, fordi det er der kliniske prøver vanligvis kommer fra. Men uansett, det en kan si om skålene, var at det var vekst av bakterier der, og med tanke på problematikken med antibiotikaresistens, og spredning er det skremmende. Alle skålene selekterer for ulike typer betalaktamantibiotika, som er den vanligste typen antibiotika i bruk. Konsekvensen ved en eventuell spredning av resistensegenskaper er derfor skummel. For fenotypisk sett er bakteriene på skålene, og også i jordsmonnet de kom fra, resistente mot betalaktamantibiotika som penicillin, cefalosporiner og karbapenemer. Selv om bakteriene i jordsmonnet og prøvene skulle vise seg ikke er patogene for mennesker eller dyr, kan patogener erverve disse egenskapene. Noe som er faretruende for de som skulle bli smittet med slike bakterier. Ettersom området prøvene ble tatt fra er et populært turområde i nærheten av der folk bor, jobber og studerer, skal en ikke se bort fra at hunder, katter eller små barn kan finne på å utforske området på kloss hold og dermed ta med seg eventuelle resistente bakterier hjem og til samfunnet ellers.

7.2 Molekylære undersøkelser

7.2.1 PCR og gelbilder

For de aller fleste av PCR-ene ble det ikke funnet stort. Med tanke på at primerne som ble brukt var tilpasset en leting etter/ deteksjon av karbapenemresistente og ESBL-produserende *Enterobacteriaceae*, var det kanskje ikke så rart. Fargen på koloniene samsvarte ikke med det som skulle indikere vekst av de bakteriene. Men, vekst på skålene betyr at det er bakterier som på en eller annen måte kan overleve med de typene antibiotika tilstede. Det skulle tyde på at det enten er andre bakterier som har lignende gener, samme resistensmekanismer som ESBL-produserer og CRE, eller at bakteriene rett og slett ikke lar seg påvirke av at det er antibiotika der. F.eks. kan det være at det er bakterier som naturlig er resistente mot antibiotikumet ved at det ikke har reseptorer som skal til for å ta det opp. I et sânt tilfelle er det ikke rart at bakteriene vokser på skålen samtidig som at PCR ikke gir noe utslag. Hvis bakteriene som vokste på skålen kunne det fordi de hadde de samme resistensmekanismene som ESBL eller CRE, kunne det skyldes at det var de samme genene som kodet for det i begge bakterietypene. Dermed ville de ha vist seg på gelbildet. Da det ikke var noe særlig til bånd på bildene, så det derfor ut som at bakteriene tilstede var andre bakterier enn CRE og ESBL. Dog, det var noen bånd på PCR-en tatt direkte fra jordekstrakter. Sted 1-1 hadde bånd for begge primerblandinger, mens 1-2, 2-1 og 3-2 hadde bånd for primerblanding car 1. 1-2 og 3-2 var for øvrig stedene hvor hhv. 14 og 10 kom fra, som var de som vokste på CRE-skål. Men, de fikk heller ingen utslag på multipleks PCR, så kun basert på vekst på skål og PCR er det umulig å fastslå hvilke bakterier som er på skålene og hvordan de overlever med antibiotika i nærheten.

For skålene med selektivt medium for MRSA derimot, var det et veldig interessant funn. Selv om det kun var et par skåler med blå kolonier som kunne indikere MRSA, 1 og 5, så alle koloniene som ble tatt med videre, altså ikke inkl. koloni 5, ut til å være positive for *spa*. Ettersom *spa* er et gen som karakteriserer *S. aureus* var det en lovende start for «ønsket» om å påvise antibiotikaresistente bakterier og gener. At prøve 9 i tillegg så ut som den kunne være positiv for både resistensgenet *mecA* og *mecC* etter den første runden med PCR var en bonus. Etter flere runder med positive kontroller for både *mecA* og *mecC* var det tydelig at prøven med utgangspunkt i koloni 9 ifølge multipleks PCR var positiv for *mecC* og negativ for *mecA*. MRSA er en bakterie som skal tas på alvor, og det er en grunn til at det er strenge regelverk knyttet til varsling ved funn i mennesker og dyr som har blitt syke av den. MRSA er tross alt meldingspliktig gruppe A, som innebærer både bærertilstand og smitte, til meldingssystem for smitsomme sykdommer (MSIS) (Folkehelseinstituttet 2015). Funnet er også spesielt ettersom *mecA* er den vanligste varianten av MRSA. *MecC* har i alle fall tilsynelatende vært forholdsvis sjelden til nå. Mye av problematikken med *mecC* har nettopp vært det at den er såpass sjelden at den ikke har blitt registrert der den har blitt funnet. Stedet *mecMRSA* ble funnet på er også unikt, i alle fall i Norge. Per 2014 hadde referanselaboratoriet for MRSA i Norge kun registrert 11 tilfeller av *mecC*. Av disse var 11 i mennesker og 1 i katt. Ingen var i «vill tilstand» i naturen eller det naturlige miljøet (Larssen, et al. 2011). I kliniske sammenhenger hvor *mecC* er involvert observeres det ofte fenotypisk antibiotikaresistens (mot cefoxitin). Da har det vært problematisk at genotypiske undersøkelser som ofte har hatt *mecA* som referanse ikke fanger opp at det er MRSA det dreier seg om (Folkehelseinstituttet 2015). For når det gjelder kliniske situasjoner kan en slik deteksjon være forskjellen mellom liv og død for en syk pasient.

7.2.2 Sekvensering

Sekvenseringene av isolatene kom med en del spennende informasjon. For eksempel var verken 16S-sekvenseringen eller helgenomsekvenseringen av koloni 9 positive for *S. aureus*, selv om PCR klart viste både *spa*- og *mecC*-gener. Ifølge begge sekvenseringene bestod isolatet av *B. pumilus*. Sekvenseringen med primere for *spa* og *mecC* hevdet imidlertid at det var MRSA som var i isolatet. Etter videre undersøkelser og forsøk gjort av Misti Dawn Finton i etterkant, ser det ut til at prøve 9 er en slags blanding av *B. pumilus* og *S. aureus*, og at de er umulige å skille. Det kan altså se ut til at de på en eller annen måte er avhengige av hverandre og derfor lever i symbiose.

Når det gjelder de andre funnene som kom med sekvenseringene, var det noen som var overraskende, og andre ikke fullt så overraskende. Alle funnene i 16S som opprinnelig var dyrket på MRSA-selektiv agar indikerte en eller annen form for *Bacillus*-bakterie. Ut fra vekst og farge på koloniene var det ikke overraskende at det var bakterier innen samme slekt som vokste på alle skålene. Ettersom *Bacillus* er bakterier som ofte finnes i jord og gress, da de er jordsaprophytter, var det heller ikke spesielt merkelig at de skulle detekteres jordsmonn. *B. cereus* er blant annet kjent for å forurense jur til dyr på beite og på den måten gå over i melk og forårsake sykdom hos mennesker (Granum 2015). *B. thuringensis* er en bakterie kjent for produksjon av et krystallprotein, Bt-toksin, som tar livet av insekter. Faktisk brukes bakterien til produksjon av flere typer biopesticider (Wikipedia 2017c)S. Når det gjelder *B. licheniformis*, så er det en jordbakterie, som har blitt assosiert med patogenese i mennesker. Ofte dreier det seg om smitte via mat, og alvorlige tilfeller av sepsis kan forekomme. Med tanke på at den ser ut til å tåle de vanligste typene antibiotika er derfor skummelt. Spesielt hvis det er de vanligvis behandles med. Resistente *B. licheniformis* har blitt registrert i forbindelse med sepsis. Bl.a. gjaldt det karbapenemer (Haydushka, et al. 2012). Ellers så er bakterien også ofte assosiert med fugler som typisk holder seg nært bakken. F.eks. ender. Altså er det ikke overraskende at bakterien ble funnet der den ble funnet (Granum 2015; MicrobeWiki 2011).

Bakteriene som ble identifisert med helgenomsekvensering viste seg å være meget resistente. De aller fleste av bakteriene hadde mange ulike resistensgener, og utøvde resistens mot flere typer antibiotika. Med tanke på eventuell spredning er dette uheldig. Hvorfor bakteriene er så-

pass resistente er vanskelig å si noe om. Jordsmonn er ikke et typisk område med seleksjonspress fra antibiotika med mindre det er i sammenheng med dyrehold eller utslipp av avløpsvann, f.eks. Og i samfunnet ellers er det sykehus og andre helseinstitusjoner som er de typiske seleksjonspressede arenaene. Hvis det eventuelt skulle være et seleksjonspress i jorden, kan kanskje komme fra bakterienes egne antibiotikaproduksjon. Både *B. thuringensis* og *S. bingchenggensis* er kjente for å produsere antibiotiske stoffer (Wang, et al. 2010; Wikipedia 2017c). Når det gjelder genene og mekanismene som ble funnet, er det ofte slik at mange av dem henger sammen. At de er gener som koder for ulike proteiner i det samme pumpekomplekset. Og effluxpumper var det mange av i de bakteriene. Som nevnt innledningsvis er det en såpass gammel og utbredt mekanisme at det ikke nødvendigvis er et seleksjonspress fra økt antibiotikabruk som står bak. Trolig er det for mange en iboende mekanisme. Men, prøvene som ble tatt fra et parkområde. Resistens mot antibiotika kan ha kommet av kryssresistens, der middelet bakteriene i utgangspunktet ble utsatt for var sprøytemidler eller lignende. Flere av de identifiserte bakteriene er bakterier som kan føre til sykdom hos mennesker. Heldigvis holder de seg ofte til jordsmonn og våte områder, slik at sykdom ikke forekommer så ofte. For med de resistensegenskapene bakteriene har, blir det vanskelig å behandle sykdom. *O. anthropi*, *A. xylosoxidans* og *S. bingchenggensis* er alle kjente for å være både humanpatogener og resistente mot antibiotika (Thoma, et al. 2009; Wang, et al. 2010; Wikipedia 2017a).

7.3 *mecC* MRSA og *Bacillus pumilus*

Som nevnt er det ikke spesielt rart at *B. pumilus* finnes i prøver fra jord. Flere av *Bacillus*-artene har sine habitater der (Granum 2015; Yuan and Gao 2015). At *mecC* MRSA ble identifisert derfra er mye mer oppsiktsvekkende. Og faktumet at de to bakteriene ikke ser ut til å ville skilles fra hverandre er også meget spesielt. Hva gjelder MRSA, så er det spesielt at det blir funnet i jordsmonn på denne måten. Vanligvis er dette en bakterie som assosieres med sykehus eller besetninger med storfe eller svin. Hvis det i prosessen med å restaurere Niagara har blitt tilført ny jord fra Ås gård, så kan det ha vært en faktor som har spilt inn. Selv om det ikke er kjente tilfeller av MRSA der. Ellers så er det et variert dyreliv på Ås. Det observeres ofte piggsvin i området, et dyr som i Sverige har blitt assosiert med *mecC* MRSA (Bengtsson, et al. 2017). Ellers så er det også observert *mecC* i katt i Norge (Medhus, et al. 2013). Hvorfor og hvordan *mecC* MRSA kan ha havnet i jordsmonnet ved en bekk på Ås blir bare spekulasjoner i og med at det vil være umulig å vite fasiten. Det er heller viktig å fokusere på at det finnes antibiotikaresistente bakterier fritt i et område der det ferdes mye folk og dyr. Med tanke på spredning er det skummelt. Hunder og katter spesielt kan finne på å gå utenfor opplagte stier, bade i bekken eller lignende og ta med seg antibiotikaresistente bakterier. Dersom de blir bærere

er det lett å spre bakterien videre. I tillegg er det viktig å ha i mente at *SCC_{mecC}* er et MGE som kan overføres til andre bakterier, og slik kan genet bli spredd videre.

8.0 Konklusjon

Bakteriers grad av antibiotikaresistens er et økende problem. Det dukker stadig opp flere bakterier med resistensegenskaper. Ut fra denne oppgaven kan en konkludere med at det finnes flere ulike antibiotikaresistente bakterier i jordsmonn i Norge. Deriblant har det blitt identifisert *mecC* MRSA i det som trolig er det første funnet i et naturlig miljø i Norge. Veksten på bakterieskåler som skulle være selektiv for visse typer resistente bakterier viste seg å være av andre bakterier, noe som kan tyde på at resistens sprer seg til flere bakterier enn det en trodde var resistente fra før. Hva som gjør at disse bakteriene er resistente, om det er iboende egenskaper eller ervervede er ikke så lett å si for alle tilfellene. Men et seleksjonspress kan være tilstede i form bakterier eller kryssresistens fra omgivelsene. Det viktigste er uansett å ta hensyn til at resistensen finnes, bruke antibiotika med måte, opprettholde normal hygiene, og ikke gjøre alt en kan for å spre bakterier.

Referanser

Anderson, DI, and D Hughes

2012 Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates* 15(3):162-172.

Bal, A. M., et al.

2017 Future trends in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: An in-depth review of newer antibiotics active against an enduring pathogen. *J Glob Antimicrob Resist* 10:295-303.

Bengtsson, Björn, et al.

2017 High occurrence of *mecC*-MRSA in wild hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *Veterinary Microbiology* 207(Supplement C):103-107.

Carlsson, Gunnar, Stefan Örn, and D. G. Joakim Larsson

2009 Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2656-2662.

Davies, J, and D Davies

2010 Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3):417-433.

ECDC

2013 Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). .

—

2017 Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Enright, Mark C., et al.

2002 The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(11):7687-7692.

Felson, S

2017 Understanding MRSA Infection -- the Basics: WebMD.

Folkehelseinstituttet, (FHI)

2015 Stafylokokkinfeksjoner (inkl. MRSA-infeksjoner) - veileder for helsepersonell. *In* Smittevernveilederen: Folkehelseinstituttet.

—

2017 ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell. *In* Smittevernveilederen, Vol. 2017. Oslo: Folkehelseinstituttet.

Gaustad, P

2001 Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier. *Tidsskrift for Den norske legeförening* 26(121):3090-3094.

Giske, CG, et al.

2009 Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Granum, PE

2015 *Bacillus cereus* og andre *Bacillus*-arter. *In* Matforgiftning - smitte gjennom mat og vann. 4. utgave edition. P. Granum, ed. Pp. 152-162. Oslo: Cappelen Damm.

Haydushka, Irina A., et al.

2012 Recurrent Sepsis Due To *Bacillus Licheniformis*. *Journal of Global Infectious Diseases* 4(1):82-83.

Helse- og omsorgsdepartementet

2015 Lov om vern mot smittsomme sykdommer [smittevernloven]. H.-o. omsorgsdepartementet, ed: Helse- og omsorgsdepartementet.

Heuer, H, and K Smalla

2007 Horizontal Gene Transfer Between Bacteria. (6).

Holmes, A. J., et al.

2003 The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ Microbiol* 5(5):383-94.

Integrated DNA Technologies

2011 The Polymerase Chain Reaction: Integrated DNA Technologies

Iredell, J, J Brown, and K Tagg

2016 Antibiotic Resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and Clinical Implications. *the BMJ*.

Juul, Sissel, et al.

2015 What's in my pot? Real-time species identification on the MinION. *bioRxiv:030742*.

Klug, WS, et al.

2010 Essentials of Genetics. San Francisco: Pearson.

Kohanski, MA, DJ Dwyer, and JJ Collins

2010 How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nature Reviews Microbiology:423-535*.

Kristensen, T

2014 DNA-sekvensering. *In* Store norske leksikon. G. Vaaje-Kolstad, ed.

Landbrukssamvirke, Norsk

2017 Hva er egentlig MRSA?, Vol. 2017: Norsk Landbrukssamvirke.

Larssen, KW, et al.

2011 Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* in Norway. Trondheim: St. Olavs hospital

Lee, Hyan, et al.

2016 Third-generation sequencing and the future of genomics. *BioRxiv:048603*.

Madhab Kumar, Chattopadhyay

2014 Use of antibiotics as feed additives: A burning question. *Frontiers in Microbiology* 5(JULY).

Medhus, A., et al.

2013 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *J Antimicrob Chemother* 68(4):968-9.

MicrobeWiki

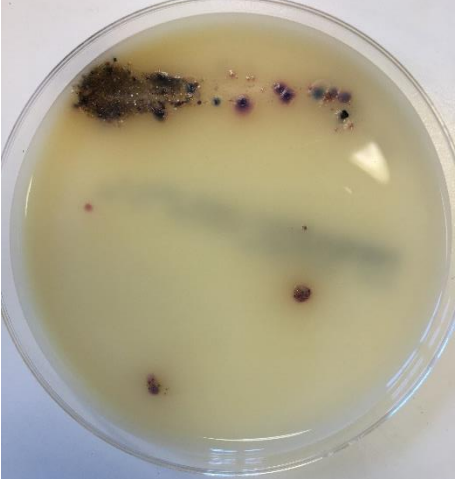
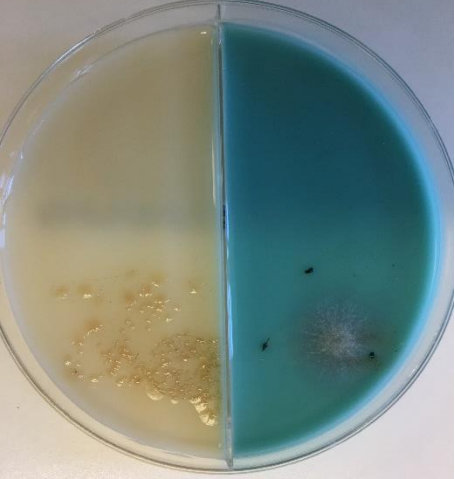
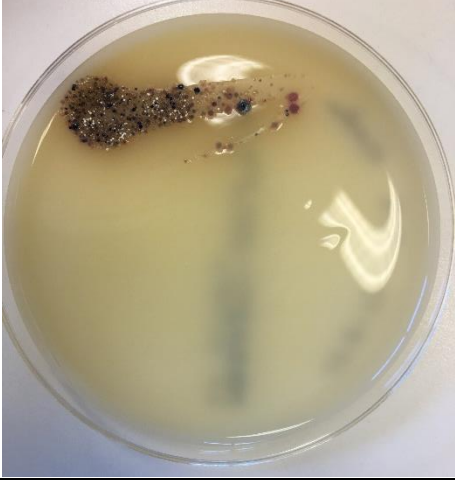
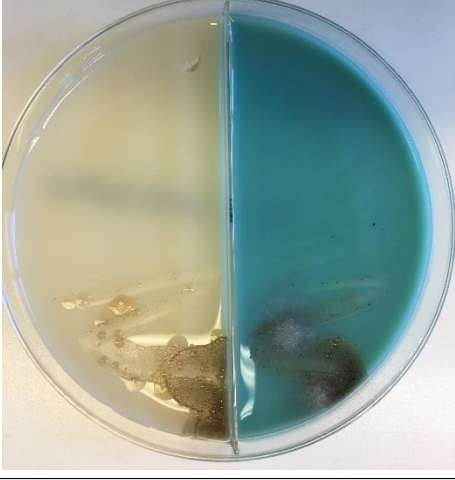
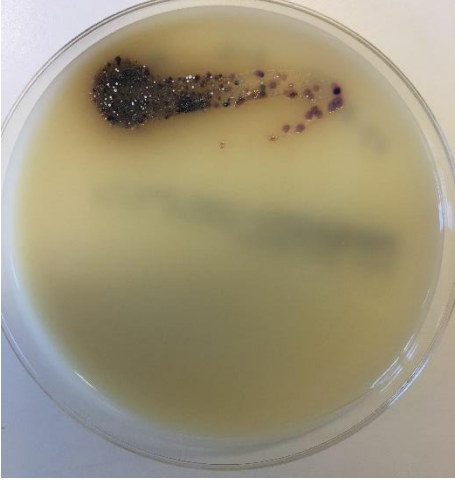

- 2011 *Bacillus licheniformis*.
Moellering, Jr Robert C.
- 2012 MRSA: the first half century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(1):4-11.
Oma, DH
- 2012 Kva er antibiotikaresistens? H.B. Seksjon for pasientsikkerheit, ed. Bergen: Seksjon for pasientsikkerheit, Helse Bergen.
Paterson, Gavin K., Ewan M. Harrison, and Mark A. Holmes
- 2014 The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 22(1):42-47.
Qiagen
- DNeasy PowerSoil Kit: Qiagen.
Roca, Ignasi, et al.
- 2015 The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*:22-29.
Rossolini, GM, et al.
- 2014 Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*.
Rørvik, LM, and PE Granum
- 2015 *Staphylococcus aureus*. *In* Matforgiftning smitte gjennom mat og vann. 4. utgave edition. P. Granum, ed. Oslo: Cappelen Damm.
Shaik, S, et al.
- 2014 Antibiotic Resistance and Extended Spectrum beta-lactamases: Types, Epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22(1):90-101.
Sigma-Aldrich
- GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit Protocol (NA2100, NA2110, NA2120) Sigma-Aldrich.
—
- GenElute™ PCR Clean-Up Kit.
Slama, Thomas G.
- 2008 Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care* 12(Suppl 4):S4-S4.
Spellberg, Brad, John G. Bartlett, and David N. Gilbert
- 2013 The Future of Antibiotics and Resistance. *The New England Journal of Medicine* 368(4):299-302.
Sun, Jingjing, Ziqing Deng, and Aixin Yan
- 2014 Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453(2):254-267.
Thermo Fisher Scientific
- Brilliance MRSA Thermo Fischer Scientific,.
—
- Brilliance™ ESBL Agar/ Brilliance™ CRE Agar: Thermo Fischer Scientific,.
—
- DNA Gel Loading Dye (6X): Thermo Fisher Scientific.

-
- Product Information: 50X TAE Electrophoresis Buffer, #B49.
-
- The Qubit® 2.0 Fluorometer: Thermo Fischer Scientific, .
- Thoma, B., et al.
- 2009 Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. *Int J Med Microbiol* 299(3):209-20.
- Veterinærinstituttet
- Kinolonresistens (QREC): Veterinærinstituttet.
- Vetting, MW, et al.
- 2008 Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry*.
- Wang, Xiang-Jing, et al.
- 2010 Genome Sequence of the Milbemycin-Producing Bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *Journal of Bacteriology* 192(17):4526-4527.
- Watson, JD, et al.
- 2014 *Molecular Biology of the Gene*: Pearson Education Inc.
- Webber, M. A., and L. J. V. Piddock
- 2003 The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(1):9-11.
- Wikipedia
- 2017a *Achromobacter xylosoxidans*.
-
- 2017b Agarose gel electrophoresis: Wikipedia.
-
- 2017c *Bacillus thuringiensis*.
-
- 2017d Cefpodoxime, Vol. 2017: Wikipedia.
-
- 2017e Sanger sequencing, Vol. 2017.
- Yuan, Yihui, and Meiyang Gao
- 2015 Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports* 5:10259.
- Øye, I, SD Henriksen, and K Bøvre
- 2017 *Antibiotika*. H. Nordeng, ed, Vol. 2017: Store medisinske leksikon.

Vedlegg

Vedlegg A - Bilder av dyrking på selektive skåler

Tabell A1 Første stryking av jordprøver på selektive medier

	1-2	
	2-2	
	3-2	

Vedlegg B – Oppskrift på agarosegel

Oppskrift på 1 % gel i lite kar:

0,5 g agarose + 50 mL 1x TAE + 2,5 μ L GelRed™

Oppskrift på 1 % gel i stort kar:

2 g agarose + 200 mL 1x TAE + 10 μ L GelRed™

Oppskrift på 2 % gel i lite kar:

1 g agarose + 50 mL 1x TAE + 2,5 μ L GelRed™

Oppskrift på 2 % gel i stort kar:

4 g agarose + 200 mL 1x TAE + 10 μ L GelRed™

Vedlegg C - Primere

Tabell C1 Primere brukt ved ESBL PCR

Mul- tiCTXMGp1_ F	ttaggaartgtgccgctgya		688bp		CTX M	The CTX-M-1 group includes six plasmid-mediated enzymes (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, and FEC-1) and the unpublished enzymes CTX-M-22, CTX-M-23, and CTX-M-28
Mul- tiCTXMGp1_ R	cgatatcgttggtggtrccat					
Mul- tiCTXMGp2_ F	cgттаacggcacgatgac		404bp		CTX M	The CTX-M-2 group includes eight plasmid-mediated CTX-M enzymes (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, and Toho-1)
Mul- tiCTXMGp2_ R	cgatatcgttggtggtrccat					
Mul- tiCTXMGp9_ F	tcaagcctgccgatctggt		561bp		CTX M	The CTX-M-9 group includes nine plasmid-mediated enzymes (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27, and Toho-2)
Mul- tiCTXMGp9_ R	tgattctcgccgctgaag					
MultiTSOT_ F	catttccgtgtcgcccttattc		800bp		TEM	
MultiTSOT_ R	cgttcatccatagttgcctgac					

MultiTSOS_F	agccgctt- gagcaaattaaac		713bp		SHV	
MultiTSOS_R	atcccgcagataaatcac- cac					
MultiTSOO_F	ggcaccagattcaac- tttcaag		564bp		OXA	
MultiTSOO_R	gacccaagtttctg- taagtg					
NDMv2_F	GGCCAGCAAAT- GGAAACTGG	TM 60	333bp		ND M	New Delhi Metallo-beta-lactamase-1
NDMv2_R	GTTGACAACGCATT- GGCAT					
NDM_F	TGGCCCGCTCAAGG- TATTTT	TM 60	157bp	NC_0223 75.1	ND M	New Delhi Metallo-beta-lactamase-1
NDM_R	GTAGTGCT- CAGTGTCGGCAT					
VIM_F	ATAGAGCACAC- TCGCAGACG	TM 58	564bp	NC_0204 52.1	VIM	Verona integron–encoded metallo-β-lactamase 1 (car- bapenemase)

VIM_R	TTATT- GGTCTATTTGAC- CGCGT					
KPC_F	TCCGTTACGG- CAAAAATGCG	TM 60	460bp	NC_0251 83.1	KPC	class A carbapenemases which hydrolyze penicillins, cephalosporins and carbapenems
KPC_R	GCATAGT- CATTGCCGTGCC					
mcr-1-F	ATGATGCAGCATAC- TTCTGTG		1 626 bp		MC R1	Colistin-resistance: Polymyxins (eg colistin) are the last line of defense against lethal infections caused by multidrug resistant Gram-negative pathogens
mcr-1-R	TCAGCGGATGAAT- GCGGTG					

Tabell C2 Primere brukt ved MRSA- PCR-bekreftelse

Primer	Sekvens
<i>spa</i> -1113F	5' – TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC – 3'
<i>spa</i> -1514R	5' – CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT – 3'
<i>mecA</i> P4	5' – TCCAGATTACAACCTTCACCAGG – 3'
<i>mecA</i> P7	5' – CCACTTCATATCTTGTAACG – 3'
<i>mecA</i> _{LGA} MultiFP	5' – GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC – 3'
<i>mecA</i> _{LGA} MultiRP	5' – GAAGATCTTTCCGTTTTTCAGC – 3'



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway