



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Bjørn-Arne Lindstedt

Detektering av betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) i bakterier isolert fra akvatiske miljøer ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder

Detection of extended spectrum beta-lactamases (ESBL and carbapenemases) in bacteria isolated from aquatic environments by using phenotypic and genotypic methods

Hedvig Bentsen Skaflem

Matvaretrygghet, -kvalitet og -hygiene
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven tilsvarer 30 studiepoeng, og ble gjennomført som et avsluttende arbeid av en master i Matvaretrygghet, -kvalitet og -hygiene ved fakultetet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) våren 2018. Å kunne fordype seg i temaet antibiotikaresistens har vært tankevekkende og spennende. Både den praktiske og teoretiske delen av oppgaven har vært utfordrende, men utrolig lærerikt. Arbeidet med masteroppgaven er en god erfaring som jeg ikke ville vært foruten, og som jeg er sikker på at jeg vil ha stor glede av senere i livet.

Fortrinnsvis vil jeg rette en stor takk til professor Bjørn-Arne Lindstedt og førsteamanuensis Hilde Marit Østlie, som påtok seg jobben som henholdsvis hovedveileder og biveileder for meg. Jeg setter stor pris på alle tilbakemeldinger, besvarte spørsmål, samt den konstruktive kritikken jeg har fått på teksten min. Videre ble den praktiske delen utført på patogenlaboratoriet i Meieribygget med en annen masterstudent ved NMBU, Sissel Solberg. Takk for godt samarbeid og selskap, samt utveksling av tanker og idéer. I tillegg må jeg si mange takk til stipendiat Misti Dawn Finton for tålmodig og god oppfølging på laboratoriet og formidling av nyttig kunnskap. Overingeniør Ahmed Abdelghani har også vært til stor hjelp på laboratoriet hvis det bl.a. har vært behov for instruksjoner på hvordan en metode skal gjennomføres eller hva den innebærer. Tusen takk.

Utenom det faglige er jeg takknemlig for all støtten jeg har fått i hverdagen fra kjente og kjære. Takk til medelever for fine stunder og gode råd på lesesalen «Sol og glede», og takk til romkamerater fra SiÅs-boligen i Barken for sosial avkobling. Avslutningsvis må jeg også få rette en enormt stor takk til mor, far, stemor, og venner for moralsk støtte og oppløftende ord. Dere har vært viktige støttespillere for meg gjennom perioden hvor arbeidet med denne masteroppgaven har pågått.

Ås, mai, 2018

Hedvig Bentsen Skaflem

Abstract

Background: Antibiotic resistance is an escalating threat to the global health. Since the introduction of penicillin approximately 70 years ago, the development of resistance has increased along with the use of antibiotics. Proper use of these drugs is therefore crucial. It is particularly important to focus on the beta-lactams, the most commonly used antibiotic group in the world, that Gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family have developed extended spectrum beta-lactamases (ESBL) towards.

Purpose: The main goal of this thesis was to investigate the presence of Gram-negative bacteria with clinically significant genes encoding ESBL_{AM} and ESBL_{CARBA} in water samples from NMBU campus. An investigation of such bacteria and genes can give a further insight into their origin. Differences and similarities between detected genes in the water samples and genes that have been isolated from animals and humans in Norway were studied, as well as their dissemination mechanisms.

Methods: Three water samples were collected from NMBU campus during the spring 2018 and filtered. The filters were transferred to selective medias for detection of ESBL and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (*Brilliance*[™] ESBL and *Brilliance*[™] CRE Agar). *Brilliance*[™] MRSA2 Agar was also used to look for MRSA. Genotypic methods included amplification and separation of DNA with PCR (multiplex and singleplex) and gel electrophoresis, as well as Sanger sequencing (16S rRNA and resistant genes) and whole genome sequencing (MinION). Molecular methods were used to confirm or debunk phenotypical findings, as well as to examine which genes and bacteria that were in the samples.

Results: Cultivated water samples on selective agars grew on 5 and 6 media that respectively selected for ESBL and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. PCR, gel electrophoresis and Sanger sequencing, detected bla_{CMY} from ESBL_{M-C}, as well as bla_{TEM} and bla_{CTX-M-15} from ESBL_A. Genotypic analyses also detected the bacteria *Escherichia coli*, which may occur in water by fecal contamination.

Conclusion: There are ESBL-producing Gram-negative bacteria in the Niagara stream from proven findings in this thesis. The results are unsettling since Norway is considered to have a low prevalence of resistance genes. This study has indicated the importance of further research on ESBL_{AM} and ESBL_{CARBA} in the Norwegian environment to prevent further spread of resistant genes.

Sammendrag

Bakgrunn: Antibiotikaresistens er en eskalerende trussel mot den globale helsen. Siden introduksjonen av penicillin for ca 70 år siden, har resistensutviklingen steget parallelt med bruken av antibiotika. En forsvarlig bruk av legemiddelet er derfor avgjørende. Det er særdeles viktig å rette fokus mot betalaktamer, den hyppigst brukte antibiotikagruppen i verden, som flere Gram-negative (G^-) bakterier fra familien *Enterobacteriaceae* har utviklet ekstenderte spektrum betalaktamaser (ESBL) mot.

Hensikt: Hovedformålet med denne oppgaven var å undersøke forekomsten av G^- bakterier med klinisk signifikante gener som koder for ESBL_{A/M} og ESBL_{KARBA} i vannprøver fra NMBU campus. En granskning av slike bakterier og gener kan gi en ytterligere innsikt i deres opphav. Det ble studert ulikheter og likheter mellom detekterte gener i vannprøvene og gener isolert fra ville dyr, produksjonsdyr og mennesker i Norge, samt deres spredningsmekanismer.

Metode: Tre vannprøver ble hentet inn fra Andedammen og Niagarabekken våsemesteret 2018 og filtrert. Filtrene ble overført til selektive skåler for detektering av ESBL og karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (*Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE Agar). *Brilliance*TM MRSA2 Agar ble også brukt for å finne MRSA. Genotypiske metoder inkluderte amplifisering og separering av DNA med henholdsvis PCR (multipleks og singelpleks) og agarosegelelektroforese, samt Sanger-sekvensering (16S rRNA og resistengener) og helgenomsekvensering (MinION). Molekylære metoder ble benyttet for å bekrefte eller avkrefte fenotypiske funn, samt undersøke hvilke gener og bakterier som var i prøvene.

Resultater: Rendyrkede kolonier på selektive medier viste vekst på fem og seks skåler som henholdsvis selekterte for ESBL og karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae*. Ved bruk av de molekylære metodene PCR, gelelektroforese og Sanger-sekvensering ble *bla*_{CMY} fra ESBL_{M-C}, samt *bla*_{TEM} og *bla*_{CTX-M-15} fra ESBL_A påvist. Genotypiske analyser viste også positive funn av bakteriene *Escherichia coli*, som kan forekomme i vann ved fekal forurensning.

Konklusjon: Det eksisterer ESBL-produserende G^- bakterier i Niagarabekken ut ifra positive funn. Resultatene er foruroligende tatt i betraktning av at Norge anses for å ha en lav prevalens av resistensgener. Denne studien indikerer viktigheten av videre forskning på ESBL_{A/M} og ESBL_{KARBA} i miljøet i Norge, for å unngå en ytterligere spredning av resistente gener.

Forkortelser

1GC	Førstegenerasjons cefalosporiner
2GC	Andregenerasjons cefalosporiner
3GC	Tredjegerasjons cefalosporiner
AR	Antibiotikaresistens
ARB	Antibiotikaresistente bakterier
ARG	Antibiotikaresistente gener
AVMP	Antibakterielle veterinærmedisinske produkter
<i>bla</i>	Gener som koder for betalaktamaser
bp	Basepar
CTX-M	<i>Cefotaksimase München</i> (ESBL _A)
DDD	Definerte daglige doser
ddNTP	Dideoksynukleotid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotid
EAEC	Enteroggregative <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylen Diamin Tetra Acetat
ESBL	Ekstenderte spektrum betalaktamaser / betalaktamaser med utvidet spektrum
ESBL _A	Ambler klasse A ESBL
ESBL _{KARBA}	ESBL med hydrolytisk aktivitet mot karbapenemantibiotika (oppdelt i klasse A, B og D)
ESBL _M	Miscellaneous ESBL (oppdelt i klasse C og D)
EU	Europeiske Union
G ⁺	Gram-positiv
G ⁻	Gram-negativ
HGO	Horisontal genoverføring
IMP	Impenemase (ESBL _{KARBA-B})
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaser (ESBL _{KARBA-A})
KPE	Karbapenemase-produserende <i>Enterobacteriaceae</i>
KRE/CRE	Karbapenemresistent <i>Enterobacteriaceae</i>
MGE	Mobile genelementer
MIK	Minimum inhiberende konsentrasjon (lavest hemmende konsentrasjon)

MR	Multiresistent
MRSA	Meticillinresistent <i>Staphylococcus aureus</i>
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
NCBI	National Center for Biotechnology Information Search database
NDM	New Dehli Metallo-betalaktamase (ESBL _{KARBA} klasse B)
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NORM	Norges overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	NORM – Veterinær
OXA	Oxacillinace (ESBL _{M-D} og ESBL _{KARBA-D})
pAmpC	plasmid Ampicillinace C (ESBL _{M-C})
PBP	Penicillin-bindende proteiner
PCR	Polymerase chain reaction
PCU	Per population correction unit
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
SHV	Sulfhydryl-variabel betalaktamase (ESBL _A)
TAE	Tris-acetat-EDTA (buffer)
TEM	Temoineira betalaktamase (ESBL _A)
VIM	Verona Integronkodet Metallo-betalaktamase (ESBL _{KARBA} klasse B)
WHO	World health organization / verdens helseorganisasjon

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Abstract	II
Sammendrag	III
Forkortelser	IV
1.0 Introduksjon	1
2.0 Bakgrunn	3
2.1 <i>Antibiotika</i>	3
2.1.1. Virkemåter for antibiotika.....	4
2.1.2. Betalaktamer.....	5
2.1.3. Antibiotikaforbruk globalt.....	6
2.1.4. Antibiotikaforbruk i Norge.....	7
2.2. <i>Antibiotikaresistens</i>	8
2.2.1. Naturlig og ervervet resistens.....	9
2.2.2. Mekanismer for utvikling av resistens.....	10
2.2.3. Genoverføring av antibiotikaresistens.....	12
2.2.4. Mobile genelementer.....	13
2.2.5. Resistenszymer.....	14
2.2.6. Antibiotikaresistens globalt.....	18
2.2.7. Antibiotikaresistens i Norge.....	20
2.3. <i>Bakteriestammer funnet i vannprøver</i>	21
2.4. <i>Spredning av antibiotikaresistens</i>	22
2.4.1. Tilstedeværelse og utbredelse av antibiotika og AR i akvatiske miljøer.....	24
2.5. <i>Forebyggende arbeid mot antibiotikaresistens</i>	25
2.6 <i>Metodisk teori</i>	26
2.6.1 Selektive kromogene skåler.....	26
2.6.2 Polymerase chain reaction.....	28
2.6.3 Agarosegelelektroforese.....	29
2.6.4 Spektrofotometer og fluorometer.....	30
2.6.5 Gensekvensering.....	30
3.0 Metoder og materialer	33
3.1 <i>Illustrering av prosessen</i>	33
3.2 <i>Prøveinnsamling</i>	35
3.3 <i>Påvisning av resistensbakterier på selektive skåler</i>	36
3.4 <i>Isolering og ekstrahering av DNA</i>	37

3.5 Indikering av resistensgener med PCR	37
3.6 Separering av DNA med agarosegelelektroforese.....	40
3.7 Kvantifisering og renhetsmåling av DNA	41
3.8 Forberedelse til Sanger-sekvensering (16S og ARG).....	42
3.9 Data-analysering.....	44
3.10 Forberedelse til helgenomsekvensering (MinION).....	44
4.0 Resultater	45
4.1 Fenotypisk påvisning av resistente bakterier.....	45
4.2 Genotypisk påvisning av resistensgener	48
4.2.1 Konsentrasjon og absorbans til isolert DNA	48
4.2.2 Påvisning av resistensgener med PCR og gelelektroforese.....	49
4.2.3 Sanger-sekvensering av bakteriestammer (16S rRNA) og ARG	52
4.2.4 Tredjegerasjons-sekvensering med MinION	54
4.2.5 Oppsummering av resultatene.....	54
5.0 Diskusjon.....	56
5.1 Resistenspåvisning med fenotypisk metode	56
5.2 Resistenspåvisning med genotypisk metode	58
5.2.1 Påviste resistensgener	58
5.2.2 Bakterier isolert fra vannprøver.....	62
5.2.3 Sammenlikning mellom funn i denne studien og studier av ESBL _A og ESBL _M i Norge.....	63
5.2.4 Betingelser for genotypiske metoder.....	70
5.3 Forslag til videre arbeid.....	72
6.0 Konklusjon	73
7.0 Referanser	74
8.0 Vedlegg	i
VEDLEGG A.....	ii
VEDLEGG B.....	iii
VEDLEGG C.....	iv
VEDLEGG D.....	vii
VEDLEGG E.....	xi

1.0 Introduksjon

Resistens mot antibiotika er angivelig verdens største helsetrussel, da antibiotika utgjør noen av grunnpilarene innenfor moderne medisin (Lönn-Stensrud, 2016; Tønjum, 2017). Legemiddelet er viktig å bruke ved tilfeller hvor noen f.eks. har pådratt seg en bakterieinfeksjon på grunn av en ulykke. For å unngå infeksjoner ved en operasjon eller ved tilfeller hvor immunforsvaret er svakt hos kreftpasienter er antibiotika viktig. Som situasjonen er nå, forårsaker antibiotikaresistens (AR) ca. 700 000 dødsfall årlig på verdensbasis (Review on Antimicrobial Resistance, 2014). Innen 2050 vil tallet muligens stige til ti millioner, og dermed ta flere liv enn hva kreft gjør. AR innebærer at bakterier har redusert følsomhet for antibiotika (Tønjum, 2017). Årsaken til dette kan være endringer i bakteriens genom, såkalte mutasjoner, som gir uttrykk for resistens. Slike egenskaper kan videreføres til neste generasjon. Resistente egenskaper kan også overføres fra en bakterie til en annen via horisontal genoverføring (HGO). Trusselen er en nasjonal og internasjonal utfordring for folkehelsen som har vokst seg sterkere i flere tiår. Dette skyldes først og fremst et høyt og feil bruk av antibiotika hos mennesker og dyr (World health organization, 2018).

En infeksjon som har oppstått på grunn av AR bakterier (ARB) er svært utfordrende eller helt umulig å behandle, og kan gi alvorlige konsekvenser, i verste fall død (Folkehelseinstituttet, 2012). Bakterier som produserer betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL) har blitt til en stor global utfordring i dag (Folkehelseinstituttet, 2017a). Et eksempel på en slik bakterie er multiresistente (MR) patogene *Escherichia coli* fra familien *Enterobacteriaceae* (Shaikh et al., 2015). Den kan forårsake infeksjoner på sykehus eller i samfunnet. ESBL kan hydrolysere og inaktivere betalaktamer, som penicilliner, cefalosporiner, og noen karbapenemer (Bush & Bradford, 2016; Statens legemiddelverk, 2012). Betalaktamer er den mest brukte antibiotikagruppen på verdensbasis. Gener som koder for ESBL er ofte plassert sammen med resistensgener som koder for andre antibiotika, og de sitter ofte på mobile genetiske elementer. Dette kan ofte føre til motstandsdyktighet mot andre antibiotika, såkalt koseleksjon, og gi et godt grunnlag for resistensspredning. Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) er en annen spesielt

bekymringsfull resistent bakterie, da den også er motstandsdyktig mot betalaktamer og svært utbredt (Ventola, 2015).

Selv om AR ikke er et utbredt problem i Norge nå, kan det bli det i fremtiden (Folkehelseinstituttet, 2012). Norge er strenge når det kommer til antibiotikabruk, men det hindrer ikke ARB fra å stige i antall. Økt import av utenlandske matvarer, fôr og produksjonsdyr, gjødsling, trekkfugler, samt flere mennesker som reiser kan bringe AR gener (ARG) over landegrenser. Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) er et høyst internasjonalt universitet. Flere som studerer der drar på utveksling, og studenter fra andre nasjoner kommer til universitetet. NMBU er et tidligere landbruksuniversitet, noe som reflekteres i de landlige naturomgivelsene med store jordbruksarealer, og Ås gård ligger et steinkast unna campus. Disse faktorene, samt flere andre, kan skape gunstige forhold for spredning og oppformering av ARG.

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke forekomsten av klinisk relevante ESBL_{A/M} - og ESBL_{KARBA} -produserende G⁻ bakterier i vann fra Andedammen og Niagarabekken på NMBU campus. Flere studier på utbredelsen av ESBL og AR i helsesektoren i Norge har vært gjennomført, men få på utbredelsen i miljøet. Noen av de studiene som eksisterer har blitt sammenliknet med funn i denne studien. For å finne ut av om bakterier fra innhentede prøver uttrykte egenskaper for ESBL-resistens, inkludert karbapenemaser, ble fenotypiske dyrkningsmetoder brukt. Dette er selektive kromogene medier fortrinnsvis ment for ESBL-produserende G⁻ bakterier. Påfølgende genotypiske metoder ble benyttet for å se etter gener som koder for typiske ESBL. De ble gjennomført ved å først ekstrahere DNA fra bakterier hentet ut av rendyrkede bakteriekolonier på dyrkningsmedier. Deretter ble DNA-templatene amplifisert ved multipleks PCR, samt visualisert med agarosegelelektroforese og fotografert under UV-lys. Multipleksene inneholdt primere komplimentære til vanlige ESBL-gener i *Enterobacteriaceae*. Slike gener inkluderer bl.a. *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY} som koder for ESBL_{A/M}, og *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} som koder for ESBL_{KARBA}. Videre ble DNA-templatene Sanger-sekvensert for å bestemme bakterieidentitet (16S rRNA) og bekrefte eller avkrefte funn av resistensgener ved PCR. En helgenomsekvensering (MinION) skulle også gjennomføres til slutt. Min motivasjon for å jobbe med denne oppgaven er en interesse for mikrobiologi og molekylærbiologi. Arbeidet med emnet har vært basert på et behov for å bidra til en kunnskapsformidling om faren som klinisk viktige ESBL-resistente bakterier utgjør for mennesker.

2.0 Bakgrunn

2.1 Antibiotika

Kombinasjonen av de greske ordene *anti* og *bios*, som utgjør ordet antibiotika, betyr henholdsvis *imot* og *liv* (Lönn-Stensrud, 2016). Mikroorganismer kan naturlig produsere organiske stoffer som har toksisk virkning på andre mikroorganismer. Toksinene kan fungere som en slags beskyttelsesmekanisme ved å utkonkurrere utfordrere. Antibiotika er et eksempel på et slikt biologisk stoff, og et viktig legemiddel ved bekjempelse av bakterieinfeksjoner. Antibakterielle stoffer kan ha en baktericid (bakteriedrepende) eller bakteriostatisk (bakteriehemmende) effekt ved hjelp av flere ulike virkningsmekanismer (Kohanski et al., 2010).

Andre verdenskrig medførte store lidelser for tusenvis av soldater som fikk alvorlige infeksjoner og skuddsår (Lönn-Stensrud, 2016). Forskeren Alexander Fleming hadde noen år tidligere oppdaget penicillin ved en tilfældighet, grunnet hemmesoner på en skål han hadde glemt å rydde vekk. Bedrifter fra legemiddelindustrien var skeptiske til bruken av antibiotikumet, siden det var et nytt og ukjent legemiddel. Fleming, samt to andre forskere, fikk likevel engasjert et senter som studerte muggsopp til å samle inn mugne næringsmidler fra folk i samfunnet. Det de kalte for «det medisinske mirakelet» begynte med mugg fra en cantaloupe-melon. Fra den melonen klarte de å utvinne flere tusen enheter penicillin per milliliter, og kurere flere av de hjelpetrengende soldatene. I tillegg ble dette starten på en total endring av helsevesenet, og en del av grunnlaget for moderne medisin. Lungebetennelse, tuberkulose, urinveisinfeksjoner, sepsis og hjernehinnebetennelse ble til infeksjoner det ikke lenger var grunn til å være bekymret for. Penicillin fra dagens apotek stammer fra den cantaloupe-melonen.

Etter at penicillin ble oppdaget, ble det funnet flere ulike varianter av antibiotika. Utviklingen har imidlertid stagnert de siste 30-40 årene (Folkehelseinstituttet, 2016; Livermore et al., 2011; Ventola, 2015). Ingen nye klasser av antibiotika har blitt funnet siden 70-tallet. Dette skyldes at forskning på nye typer antibiotika er tidkrevende, ikke spesielt lønnsomt, og begrenset av et system med mange reguleringer. Legemiddelindustrien har prioritert andre legemidler som gir større økonomisk utbytte, som f.eks. kreftmedisiner. Antibiotikakurer varer som regel over korte perioder, og er

derfor mindre lønnsomt å forske på enn andre medisiner som tas over lengre tid. Den økende resistensutviklingen mot de eksisterende variantene av antibiotika fører også til en uenighet omkring hvilke virkningsmekanismer hos antibiotikumet det bør fokuseres på. Innskrenkningen i alternativene til behandlinger blir bare større og større.

Ved kjent bakterietype, er det mer hensiktsmessig å benytte smalspektret antibiotika (Lönn-Stensrud, 2016). Da virker medisinen på spesifikke bakterier, som f.eks. kun én familietype. Er målet derimot flere bakterier som f.eks. både Gram-positive (G^+) og G^- bakterier, eller en ukjent bakterie, kan bredspektret antibiotika brukes. Forskning tilsier derimot at antibiotika med slike egenskaper har vært en stor bidragsyter til utviklingen av resistens (Tønjum, 2017). Hvorvidt en bakterie er G^- eller G^+ har med celleveggen å gjøre (Kapoor et al., 2017). Mengden peptidoglykan er mindre i celleveggen hos G^- enn G^+ bakterier. I tillegg har de G^- en ytre membran bestående av lipopolysakkarider og proteiner som fungerer som et beskyttende lag. Bakterier skilles ofte etter hvorvidt de er G^- eller G^+ . Denne inndelingen påvirker også valg av antibiotika og legemiddelets virkningsmekanismer.

2.1.1. Virkemåter for antibiotika

Som legemiddel må antibiotika ha en tilstrekkelig toksisk effekt på bakterien, men påføre minst mulig skade på pasienten (Øye, 2017). Et vanlig mål for medisinen er å angripe bakteriecelleveggen, som er essensiell for at bakterier overlever (Lönn-Stensrud, 2016). Celler hos mennesker og dyr er ikke omkranset av en cellevegg, bare en cellemembran, og pasienters celler blir derfor ikke affisert av en antibiotikatype med cellevegg som angrepspunkt. Typisk for baktericide antibiotika er at de angriper viktige funksjoner og strukturer i cellen, som arvestoffet og celleveggen (Kohanski et al., 2010). Mens bakteriostatiske antibiotikum hindrer spredning av bakteriecellene, ved å affisere proteinsyntesen. Betalaktamer, aminoglykosider, og quinoloner er vanlige baktericide antibiotika, mens hyppig brukte bakteriostatiske antibiotika er makrolider, telitromyciner, sulfonamider og tetrasykliner.

Det finnes flere angrepspunkter for antibiotika på og i bakterier, og de kan vanligvis gjennomføres på fem ulike vis: Inhibering av celleveggenes oppbygning, forstyrrelse av funksjonen til cellemembranen, inhibering av proteinsyntesen, inhibering av produksjonen av nukleinsyrer (DNA og RNA) og hemming av folsyreproduksjonen (Tronsmo, 2016). Ved en inhibering av celleveggenes oppbygning

hemmes peptidoglykansyntesen, og derved oppbyggingen av celleveggen, som fører til ødeleggelse av cellemembranen og celledød. Eksempler på antibiotika som hemmer syntese av celleveggen er bacitracin, vancomycin, og betalaktamer. Hvis translasjonen derimot hemmes ved at antibiotika binder seg til ribosomer, produseres det ingen proteiner, f.eks. enzymer, som kan være livsviktige for bakterier. Eksempler på antibiotika som inhiberer proteinsyntesen er kloramfenikol, erytromyciner, og tetrasykliner. Inhibering av nukleinsyresyntesen (replikasjon og transkripsjon) gjennomføres derimot av kinoloner og rifampin. Videre kan cellemembranens funksjon forstyrres ved at peptidantibiotikum endrer membranpermeabiliteten, og metabolismeveier kan blokkeres ved hemming av folsyreproduksjonen.

2.1.2. Betalaktamer

Den mest brukte antibiotika-gruppen i verden ved bakterielle infeksjoner er betalaktamer (Bush & Bradford, 2016). Utallige derivater av penicillin, samt relaterte betalaktamklasser som cefalosporiner og karbapenemer, har blitt utviklet siden Fleming's oppdagelse av penicillin. En betalaktam-ring i deres kjemiske struktur er bakgrunnen for at de heter betalaktamer (Holten & Onusko, 2000). Virkemåten til betalaktamer er at de binder seg til penicillinbindende proteiner (PBP), enzymer som er viktige for syntese av celleveggen hos både G^- og G^+ bakterier (Bush & Bradford, 2016). En slik binding hemmer dannelse av peptidoglykankryssbindinger, og fører til lysis av cellen (Silver, 2011). Den mest bredspektrede av betalaktamene er karbapenemer, og ved alvorlige infeksjonstilfeller med ESBL-produserende *E. coli* fungerer karbapenemer som siste utvei (Bajaj et al., 2016; Norsk legemiddelhåndbok, 2016). Flere typer karbapenemer brukes ved ESBL-infeksjoner, grunnet økt cefalosporinresistens blant bakterier fra familien *Enterobacteriaceae* (Codjoe & Donkor, 2017). Cefalosporiner deles opp i generasjoner, hvorpå tredje og fjerde generasjon har best effekt på G^- bakterier (Norsk legemiddelhåndbok, 2016). På verdens helseorganisasjon (WHO) (2017) sin liste over kritisk viktige antimikrobielle midler av høyeste prioritet står bl.a. cefalosporiner (tredje-, fjerde- og femtegenerasjon), mens karbapenemer og penicilliner er høyt prioritert. Ifølge en rapport om global resistens av WHO (2014) oppstår også ofte mekanismer for resistens mot andre antibiotika ved tilfeller med ESBL-resistens.

2.1.3. Antibiotikaforbruk globalt

2.1.3.1. Utlevering av antibiotika til mennesker

Antibiotika er blant de hyppigst utskrevne legemidlene i verden, men ved halvparten av tilfellene har det ikke vært nødvendig med utlevering av medisinerne eller så har de vært ineffektive (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Det har blitt estimert at det ble solgt mer enn 70 milliarder doser (en pille eller kapsel) antibiotika fra apoteker på verdensbasis i 2010. Da hadde andelen steget med 35 % fra år 2000 (Van Boeckel et al., 2014). Bredspektrede penicilliner og cefalosporiner stod for litt over halvparten av utskrevne antibiotika. Brasil, Russland, India, Kina og Sør-Afrika bidro til nesten 80 % av økningen. Bruken av antibiotika er litt mer restriktiv i Europa. Et Eurobarometer publisert i 2016, viste at siden 2013 har mesteparten av medlemslandene i EU redusert bruken av antibiotika (Europakommisjonen, 2016). Romania, Latvia, Danmark og Nederland opplevde størst nedgang. Land som Spania og Italia hadde derimot en økning. Deler av befolkningen med minst utdannelse og lavest inntekt brukte mest antibiotika.

2.1.3.2. Utlevering av antibiotika til dyr

Det er ikke bare ukritisk bruk av antibiotika blant mennesker, men også hos dyr. Utlevering av antibakterielle veterinærmedisinske produkter (AVMP) inkluderer hovedsakelig produksjonsdyr (f.eks. storfe, griser og fjærkre) og oppdrettsfisker, da de er de største dyregruppene som mottar antibiotika (Keen & Montforts, 2012). Estimerte tall fra Van Boeckel et al. (2015) viser at fra 2010-2030 vil bruken av AVMP være størst i henholdsvis Kina, USA og Brasil på verdensbasis. I USA gis ca. 80 % av all antibiotika til husdyr, hovedsakelig med den hensikt å få dem til å vokse fortere, forhindre infeksjoner og gi økt utbytte (Ventola, 2015). Utlevering av AVMP er stor blant produksjonsdyr, fordi mesteparten av slike dyr behandles og håndteres gruppevis, da de lever tett sammen (Keen & Montforts, 2012). Ved påvisning av ARG i en bestand, og det er uvisst hvilke dyr som er smittet, kan derfor alle dyrene behandles for å spare tid og penger. Videre varierer salget av AVMP i Europa fra nasjon til nasjon. I 2010 startet et prosjekt for å samle inn data om bruk av antimikrobielle midler på dyr i Europa (European Medicines Agency, 2017). I den syvende rapporten ble salg av AVMP fra 30 europeiske land undersøkt. Fokuset var hovedsakelig rettet mot data fra produksjonsdyr. Rapporten avdekket at salget mellom nasjonene og lå mellom 2,9-

434,2 milligram per population correction unit (mg/PCU), med et gjennomsnitt på 135,5 mg/PCU i 2015. Norge lå på bunn, mens Kreta var på topp her. Spania og Italia utleverte også mye antibiotika til dyr, med et salg på henholdsvis 402 og 322 mg/PCU. I 2015 solgte Spania i overkant av 3000 tonn AVMP. Salget var størst for henholdsvis tetracycliner (32,8%), penicilliner (25,0%) og sulfonamider (11,8%). Variasjonen i bruk av AVMP blant landene kan tilskrives ulikheter i dyreproduksjonen og produksjonssystemene.

2.1.4. Antibiotikaforbruk i Norge

2.1.4.1. Utlevering av antibiotika til mennesker

Antibiotikaforbruket i Norge er lavt, noe som kan skyldes et gunstig forbruksmønster (NORM / NORM-VET, 2016). Fra 2006 til 2009 har bruken av antibiotika ligget rundt 20 definerte daglige doser (DDD) / 1000 innbyggere / døgn. Penicilliner stod for den største andelen av foreskrevne antibiotika i Norge i 2016, etterfulgt av tetracycliner. Bruken av cefalosporiner, spesielt 1GC og 2GC, samt karbapenemer har blitt redusert de siste årene, og majoriteten av antibiotika benyttes utenfor helseinstitusjoner. Regjeringen har innført en nasjonal strategi for å senke bruken av antibiotika i Norge med 30 % ved slutten av 2020, sammenlignet med 2012 (European Medicines Agency, 2017; Regjeringen, 2015). Bruken av antibiotika blant den norske befolkningen ble redusert med 13 % fra 2012 til 2016, så målet er i sikte (Folkehelseinstituttet, 2017b).

2.1.4.2. Utlevering av antibiotika til dyr

Som nevnt tidligere utleverer Norge minst antibiotika til matproduserende dyr i Europa. Kun 10 % av utlevert antibiotika i Norge utleveres til dyr ifølge Veterinærinstituttet. I 2016 lå bruken av AVMP for behandling av sykdom og bedring av helsen til matproduserende dyr på 5852 kg i Norge (NORM / NORM-VET, 2016). Forbruket har vært relativt jevnt de siste 16 årene, men fra 1995 til 2000 var det en markant nedgang på 40 %. Nivået har vært stabilt siden den gang. Penicillin var den mest brukte AVMP i 2016. Innen akvakultur er også forbruket av antibiotika lav. Veterinærinstituttet kan fortelle at bare 0,5 % av antibiotika i Norge utleveres til oppdrettsfisk. I fjor var mengden utlevert antibiotika lavere enn på nesten 40 år. Dette kan i stor grad skyldes en vaksinerings av oppdrettsfisk som startet på midten av 90-tallet.

2.2. Antibiotikaresistens

Motstand er en definisjon på resistens (Grahek-Ogden, 2017). Hvis en bakterie er AR betyr det at den innehar spesielle egenskaper som gjør den motstandsdyktig mot antibiotika. Bakterien kan derfor fortsette å leve og formere seg fritt, selv om den blir utsatt for antibiotika (Folkehelseinstituttet, 2016). AR er den største utfordringen innenfor moderne medisin til dags dato. Ved introduksjon av et nytt antibiotikum, har resistens stort sett oppstått etter bare få år (Davies & Davies, 2010). Infeksjoner som har vært enkle å behandle, kan dermed på nytt bli et problem. Kreftbehandling, fødsler, transplantasjoner og kirurgiske inngrep vil bli en større utfordring å gjennomføre i fremtiden dersom AR blir utbredt i stor skala (Folkehelseinstituttet, 2012).

Det har vært en diskusjon om hvorvidt AR oppstod før eller etter at antibiotika ble tatt i bruk som legemiddel (Tronsmo, 2016). For problemet med resistens kom ikke bare etter at Fleming oppdaget penicillin ved en tilfeldighet på laboratoriet på slutten av 1920-tallet (Lönn-Stensrud, 2016). AR er et naturlig fenomen som har eksistert i flere tusen år (Pawlowski et al., 2016). Resistensgener har blitt funnet i f.eks. permafrost og grotter helt uberørt av mennesker. Bakterier har på slike steder med lite lys og næringsstoffer fått god tid til å tilpasse seg og utvikle resistens. Forskjellen frem til i dag er at bakterier har tilpasset seg hyppigere og i mye større grad. En seleksjon av ARB blomstrer opp, og utkonkurrerer de sensitive bakteriene. Årsaken kan være nye mobile resistenselementer, et utvidet mangfold av resistens innad hos enkelte bakteriestammer, og en kombinasjon av resistensgener.

Ukritisk og feil antibiotikabruk hos mennesker og dyr er den viktigste årsaken til utviklingen av ARB (Folkehelseinstituttet, 2012; Folkehelseinstituttet, 2016). Det er ikke nødvendig å gi antibiotika i sammenhenger hvor immunforsvaret hos en organisme fint kan kurere sykdommen på egen hånd. Ved behandling av virusinfeksjoner, som f.eks. forkjølelse, blir det alt for ofte brukt antibiotika som i denne sammenheng hverken har en smertelindrende eller helende effekt, da antibiotika kun virker på bakterier. Som tidligere nevnt, kan bredspektret antibiotika benyttes ved ukjent bakterietype. Ved slike tilfeller kan derimot den normale bakteriefloraen bli slått ut, i tillegg til de patogene bakteriene. Dette kan føre til flere bivirkninger, samt forårsake en kolonisering av andre uvanlige bakterier som igjen kan være vanskelig å behandle (Lönn-Stensrud, 2016).

Mengden utlevert antibiotika bør være restriktiv, men allikevel ikke for lav, slik at kuren ikke blir effektiv nok. Minimum inhiberende konsentrasjon (MIK) er den laveste konsentrasjonen av et stoff som trengs for å hemme bakterievekst (Tronsmo, 2016). MIK kan brukes for å bestemme hvor mye antibiotika som skal utleveres. Svært uheldig er det når gamle og svekkede antibiotikamedisiner blir distribuert. Dette kan inntreffe når et I-land sender legemidler som er utgått eller ikke lenger godkjent, til U-land som kan ha lite antibiotika og mangel på kunnskap om bruken (Davies & Davies, 2010). Mennesker fra U-landene, som bare følger anvisningen på pakningen, kan derved få en ineffektiv behandling og bli bærere av bakterier som selekterer for resistens.

2.2.1. Naturlig og ervervet resistens

Resistens deles som oftest opp i naturlig ("medfødt") og ervervet resistens (Grahek-Ogden, 2017). Ved naturlig resistens finnes ikke de indre strukturelle eller funksjonelle trekkene antibiotikumet virker på hos bakterien (Lönn-Stensrud, 2016). Denne typen resistens kan ikke overføres mellom bakterier, men går heller i arv, og kalles for vertikal genoverføring. Ved ervervet resistens derimot, kan det ha oppstått en mutasjon i arvestoffet til en bakterie eller så har en bakterie mottatt resistensgener fra en annen bakterie eller fra omgivelsene. Overføring av gener med resistenskoder kalles for HGO, som kan igjen kan gå videre til neste generasjon. Konjugasjon, transformasjon og transduksjon er metoder for dette, og kan typisk skje på steder med mange antibakterielle stoffer i miljøet mellom ulike arter og slekter. Ved utviklingen av betalaktamresistens blant enteriske bakterier i miljøet og på sykehus, har HGO hatt en betydelig innvirkning (Davies & Davies, 2010).

Presset bakterier påføres for å tilpasse seg en høy tilstedeværelse av antibiotika, kalles for antibiotisk seleksjonspress (Iredell et al., 2016). Det er sjelden at en mutasjon er fordelaktig for en bakterie, så det er som oftest de sterkeste som tilpasser seg og overlever. Bakterier med MR egenskaper er motstandsdyktig mot to eller flere antibakterielle midler (Tønjum, 2017). Ved genoverføring innsettes ofte et gen i regioner på kromosomer eller plasmider (Iredell et al., 2016). En akkumulering av lignende AR genelementer rundt et resistensgen, som ble plassert på en slik DNA-region i utgangspunktet, fører til MR områder og bakterier med MR egenskaper.

2.2.2. Mekanismer for utvikling av resistens

Bakterier sin metode for å håndtere antibiotisk seleksjonspress kan hovedsakelig deles opp i tre. Det kan være en reduksjon av antibiotika intracellulært, en endring av målmolekylet, eller en inaktivering av antibiotikumet (Arora et al., 2017).

2.2.2.1. Intracellulær reduksjon av antibiotika

For at antibiotika skal ha en effektiv virkning, må legemiddelet kunne nå målmolekylet og stige i tilstrekkelige nivåer i cellen (Arora et al., 2017). Resistens kan oppnås ved å senke opptaket av antibiotika inn i cellen eller øke uttømmingen av antibiotika. Henholdsvis redusert permeabilitet og efflukspumper kan bidra til en slik intracellulær reduksjon. Antibiotika som virker intracellulært, som betalaktamer, vil typisk affiseres som nevnt her (Iredell et al., 2016).

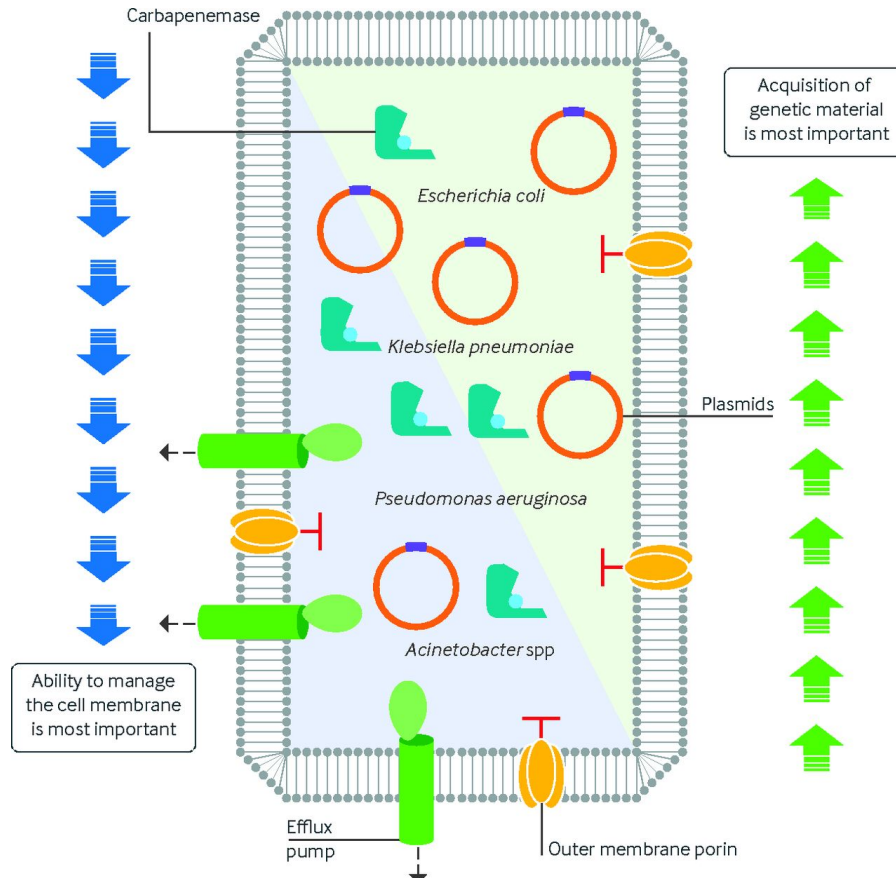
Poriner utgjør det største hinderet for betalaktamer i G⁻ bakterier (Iredell et al., 2016). De er uspesifikke, passive proteinkanaler som eksisterer i den ytre hydrofobe membranen til G⁻ bakterier og frakter ulike stoffer. En forminskert størrelse på poriner eller små selektive poriner kan føre til redusert permeabilitet, og derved senke antibiotikaopptaket (Arora et al., 2017). Videre kan efflukspumper også føre til utilstrekkelig konsentrasjoner av antibiotika i cellen. Antibiotika vil da aktivt pumpes ut av cellen fortere enn stoffet klarer å stige til intracellulære hemmende nivåer. I motsetning til poriner som finnes i den ytre membranen, eksisterer efflukspumper i den cytoplasmiske membranen (Kapoor et al., 2017). De fleste pumpene kan gi opphav til MR, som vil si at de kan pumpe ut et overskudd av kjemikalier uten relatert struktur (Arora et al., 2017). Bakterier fra familien *Enterobacteriaceae* kan kombinere både redusert permeabilitet i membranen og efflukspumper (Iredell et al., 2016). Ved resistens mot betalaktamer er det derimot mer viktig å bruke efflukspumper for mikrober som er vant til forhold i miljøet, som *Acinetobacter* spp. og *Pseudomonas* spp., enn typiske bakterier fra *Enterobacteriaceae*.

2.2.2.2 Endring av målmolekylet

En endring av målsetet til antibiotikumet kan føre til at middelet ikke får bundet seg tilstrekkelig fast (Shaikh et al., 2015). Årsaken til slike endringer kan være en spontan mutasjon i et gen på kromosomet (Kapoor et al., 2017). Små modifikasjoner vil ha en stor effekt, da en interaksjon mellom antibiotikum og målmolekyl er relativt spesifikk. En mutasjon i PBP medfører f.eks. en redusert affiniteten til betalaktamer.

2.2.2.3. Inaktivering av antibiotika

At antibiotika deaktiveres kan skyldes en produksjon av enzymer som spalter legemiddelet hydrolytisk (Arora et al., 2017). Betalaktamaser er hydrolaser som spalter betalaktamer (Davies & Davies, 2010). Enzymene kan katalysere amidbåndhydrolysen av betalaktamringen som fører til en inaktivering av betalaktamer, slik at de ikke kommer frem til målet i cellen (Bajpai et al., 2017). De kan produseres av de utbredte G⁻ patogene bakteriene *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Acinetobacter* spp. (Iredell et al., 2016). Figur 1 illustrerer de ulike resistensmekanismene i de ovennevnte bakteriene.



Figur 1. Viktige mekanismer for resistens hos enkelte G⁻ bakterier (Iredell et al., 2016).

2.2.3. Genoverføring av antibiotikaresistens

Bakterier klarer å replikere sitt DNA raskt og enkelt. Ved HGO vil bakterier kunne overføre DNA seg imellom ved direkte kontakt, ta opp DNA fra omgivelsene, eller overføre DNA ved hjelp av bakteriofager (Tronsmo, 2016). Definisjonen på de tre ovennevnte metodene er henholdsvis konjugasjon, transformasjon og transduksjon.

2.2.3.1. Konjugasjon

Ved HGO er konjugasjon den vanligste metoden for genoverføring, og hovedmekanismen til overføring av ARG mellom bakterier (Keen & Montforts, 2012). Overføringen foregår ved at arvematerialet sendes via et rør, også kalt pilus, fra en celle til en annen som fører til en direkte kontakt mellom donor og mottaker (Tronsmo, 2016). Donor avgir DNA, mens mottakeren tar opp DNA, og den direkte kontakten er påkrevd. Arvestoffet overføres som regel via et konjugativt plasmid som replikeres, og gjør at en kopi av plasmidet kan gå over til mottakercellen. Studier indikerer at hyppigheten av konjugasjon i naturen er høyere enn under forhold på laboratoriet, og at bakterier i tarmen hos mennesker og dyr overfører gener, deriblant ARG, mellom hverandre ofte (Davies & Davies, 2010).

2.2.3.2. Transformasjon

Ved transformasjon opptar en bakterie fritt eller ekstracellulært DNA fra omgivelsene, (Tronsmo, 2016). ARG kan overføres fra allerede motstandsdyktige bakterier til andre som ikke er det fra før via transformasjon (Tønjum, 2017).

2.2.3.3. Transduksjon

Transduksjon er overføring av DNA fra bakterier via bakteriofager, som er virus som angriper bakterier (Tronsmo, 2016). Viruset kan inneholde DNA (omgitt av en proteinkappe) fra en bakterie, og føre dette videre til en annen bakterie. Bakteriofagene kan kontrollere en vertscelle til å lage mange kopier av seg selv, for så å sprekke og slippe viruset ut av cellen. Kopiene av viruset kan ta med seg deler av bakteriens kromosom, med resistensgener, og injisere det i andre bakterier. ARG i bakteriofager har derimot sjeldent blitt isolert fra samfunnet eller sykehus (Davies & Davies, 2010).

2.2.4. Mobile genelementer

Mobile genelementer (MGE) er transposoner, integroner, samt små liknende genetiske elementer, som kan overføre arvemateriale som ARG (Iredell et al., 2016). Elementene kan overføres horisontalt mellom patogene og apatogene bakterier ved hjelp av konjugative plasmider. En forutsetning for dette er at det er en donor og mottaker deler samme habitat, som f.eks. mennesketarmen.

2.2.4.1. Plasmider

Plasmider er små, sirkulære, ekstrakromosomale elementer av DNA (Tronsmo, 2016). De er derfor ikke en del av kromosomet. Størrelsesmessig utgjør de en minimal prosentandel av kromosomet (Brolund, 2014). Plasmider inneholder sjeldent gener som er livsviktige for bakterier, men de kan derimot tilføre verdifulle evner og funksjoner til bakteriene (Tronsmo, 2016). Et eksempel på dette er når plasmidet bærer ARG. Hvis plasmidet i tillegg til å ha resistente egenskaper, også bærer gener for plasmidkonjugasjon, kan de lett overføre disse egenskapene til andre bakterier. Redusert sensitivitet mot flere antibiotika kan oppstå ved overføring av plasmider, da de kan inneholde et mangfold av resistensgener. ESBL-produserende bakterier er vanligvis plasmidkodet (Rawat & Nair, 2010).

2.2.4.2. Transposoner

Hoppende gener, bedre kjent som transposoner, gjør at genetisk materiale kan endre sin posisjon på kromosomet (Tronsmo, 2016). Forflytningen foregår mellom DNA sekvensen på endene til de transposable elementene og en DNA-sekvens i vertscellen ved hjelp av transposaser (Watson et al., 2014). De kan enten kopieres, hvorpå kopien settes inn på en ny lokasjon, eller klippes ut av kromosomet og bli forflyttet til et annet sted. I mange organismer er transposable elementer den vanligste kilden til nye mutasjoner, og en viktig årsak til genetiske sykdommer hos mennesker. Transposoner kan være bærere av resistensgener, konjugative, samt integrert i plasmider, og dermed bidra til en videreføring av resistensegenskaper (Tronsmo, 2016).

2.2.4.3. Integroner

Integroner er små bakterielle genelementer som eksisterer i omtrent en tiendedel av sekvenserte bakteriegenomer, og da spesielt klasse 1 (Deng et al., 2015; Domingues et al., 2012). Klasse 1 integroner er hovedtypen av integroner som er involvert i spredningen av ARG. Angivelig eksisterer de først og fremst i slekter som *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, og *Acinetobacter*. Hos de ovennevnte bakteriene, i tillegg til mange andre G⁻ bakterier, er integroner ansvarlige for mesteparten av tilfeller med overføring av ARG (Davies & Davies, 2010). Integroner inneholder sidespesifikke rekombinasjonssystemer, som kan integrere, uttrykke og utveksle elementer av DNA (Domingues et al., 2012; Tronsmo, 2016). Disse elementene kalles for genkassetter. Hele integronet anses ikke for å være mobilt, da det ikke klarer å forflytte seg selv, men genkassetene har denne funksjonen. De kan flyttes til andre integroner eller et annet sted på bakteriegenomet (Deng et al., 2015). Flesteparten av de kjente genkassetene som eksisterer koder for AR, inkludert betalaktamresistens. Integroner kan overføre resistensgener mellom celler ved å bruke konjugative transposoner eller/og plasmider.

2.2.5. Resistensenzymmer

2.2.5.1. Betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL)

En vedvarende og utbredt bruk av bredspektrede betalaktamer ved alvorlige infeksjoner forårsaket av G⁻ bakterier, har ført til en framvekst av betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL) (Bajpai et al., 2017). Gener fra smalspektrede betalaktamaser (f.eks. TEM-1 og TEM-2) kan produsere ESBL, hvis kombinasjonen av aminosyrer rundt enzymets aktive sete endres som følge av en mutasjon. Plasmider, spesielt konjugative, kan enkelt overføres mellom bakterier og bærer ofte gener som koder for ESBL. Ved betalaktamresistens, mot antibiotikaklasser som penicilliner og cefalosporiner, inaktiveres legemiddelet som en følge av at bakterien produserer betalaktamaser som hydrolyserer betalaktamringen. Kliniske hemmere av enzymene er klavansyre, tazobactam, sulbactam, og avibactam slik at f.eks. penicillin kan beskyttes mot inaktivering (Iredell et al., 2016). Cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, såkalte 3GC, anses for å være de klassiske betalaktamene affisert av ESBL. Årsaken til dette kan være at de affiserer normalfloraen i stor grad, og at de er antibiotika med

et bredt spektrum (Norsk legemiddelhåndbok, 2017). Vanlige ESBL-produserende organismer er *E. coli* og bakterier fra *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. og *Citrobacter* spp. (KESC) gruppen (Iredell et al., 2016). MR organismer som produserer ESBL utgjør en stor bekymring i forskningsmiljøet, da de kan være spesielt vanskelige å spore opp (Bush & Bradford, 2016).

I Norge deles ESBL opp i klasse A ESBL (ESBL_A), miscellaneous ESBL (ESBL_M), og karbapenemaser med hydrolytisk aktivitet mot karbapenemer (ESBL_{KARBA}) (Folkehelseinstituttet, 2017a; Giske et al., 2009). Sistnevnte er resistent mot alle betalaktamer, inkludert karbapenem, mens ESBL_{A/M} er først og fremst resistente mot penicillin og cefalosporin. ESBL_A inkluderer enzymer som inaktiverer eksternderte spektrum cefalosporiner, mens plasmidbåren AmpC (klasse C) og OXA (klasse D) utgjør ESBL_M. ESBL_{KARBA} kan deles opp i underklasse A, B, og D, som er henholdsvis karbapenemasene *K. pneumoniae* karbapenemaser (KPC), metallo-betalaktamaser (MBL) og oxacillin-hydrolyserende metallo-betalaktamaser (OXA) (Bajaj et al., 2016). Andre antibiotikaklasser som fluorokinoloner og aminoglykosider kan også være ineffektive mot ESBL-produserende bakterier (Folkehelseinstituttet, 2017a). Dette skyldes at ESBL har mulighet til å overføres ved hjelp av MGE. Serin er det aktive setet til enzymer fra klasse A, C og D, og enzymene skilles ut ifra deres aminosyresekvens (Bajpai et al., 2017; Shaikh et al., 2015). MBL er sinkavhengige enzymer som hydrolyserer majoriteten av betalaktamer (Khan et al., 2017). Nedenfor står det en klassifisering av de ulike ESBL-klassene (Giske et al., 2009). I denne oppgaven ble primære komplimentære til de uthevede enzymenes gener benyttet ved PCR (vedlegg C, tabell C1 og C2). De er viktige betalaktamaser i *Enterobacteriaceae* (Iredell et al., 2016).

- Hyppig forekommende ESBL_A: **CTX-M**, **TEM**, **SHV**, VEB, og PER.
- ESBL_{M-C}: **CMY**, FOX, MIR, DHA, LAT, BIL, ACT, og ACC
- ESBL_{M-D}: OXA-10gr, OXA-13gr, **OXA-2gr**, OXA-18, og OXA-45
- ESBL_{KARBA-A}: **KPC**, ulike varianter av GES, NMC, SME, IMI-1, -2
- ESBL_{KARBA-B}: **IMP**, **VIM**, SPM-1, GIM-1, SIM-1, AIM-1, **NDM-1**
- ESBL_{KARBA-D}: OXA-23gr, OXA-24gr, **OXA-48**, OXA-58

2.2.5.1.1. Klasse A ESBL

De vanligste ESBL_A-typene hos bakterier fra *Enterobacteriaceae* er *Cefotaksimase München* (CTX-M), *Temoineira betalaktamase* (TEM) og *Sulfhydryl-variabel betalaktamase* (SHV) (Giske et al., 2009; Liebana et al., 2013). Penicillinase SHV og TEM affiserer typisk penicilliner og 1GC, og de finnes vanligvis i *E. coli* og *Klebsiella* spp. (Iredell et al., 2016; Salverda et al., 2010). Etterkommere av TEM-1 har et bredere spektrum og kan affisere høyere generasjoner av cefalosporiner som 2GC, 3GC, og 4GC. Før var SHV og TEM mest utbredt, men for øyeblikket er CTX-M den mest vanlige genvarianten av ESBL (Liebana et al., 2013). Enzymet deles opp i fenotypene CTX-M gr. 1, 2, 8, 9 og 25 (Bevan et al., 2017; Brolund, 2014; Iredell et al., 2016; Shaikh et al., 2015). Genotypen *bla*_{CTX-M-15}, fra CTX-M gr. 1, har økt mest i omfang, og har størst utbredelse på verdensbasis. Omtrent halvparten av genotypene i Norge er *bla*_{CTX-M-15}. CTX-M affiserer blant annet penicillin, monobactamer, 1GC og 3GC. Den hydrolyserer fortrinnsvis 3GC cefotaksim, derav navnet cefotaksimase, og hemmes først og fremst av tazobactam. Enzymet har i stor grad blitt knyttet til *E. coli* og andre slekter fra familien *Enterobacteriaceae*. Slike bakterier anses for å være av stor klinisk betydning. Deres stigende prevalens fører til økt bruk av karbapenemer ved infeksjonstilfeller, som igjen kan føre til mer karbapenemresistens. Ved HGO med konjugative plasmider og transposoner har bakterier overført CTX-M enzymer mellom hverandre. Den har også alltid vært en ESBL, i motsetning til enzymene SHV og TEM som har oppstått som en følge av mutasjoner i aminosyrene til foreldreenzymene.

2.2.5.1.2 Plasmidbåren AmpC (ESBL_{M-C})

Ampicillin er en type aminopenicillin, et bredspektret penicillin, som innehar aktivitet mot utbredte enterobakterier (Norsk legemiddelhandbok, 2017). En økt produksjon av betalaktamaser i Norge har beklageligvis utviklet seg, og i overkant av 1/3 av isolerte *E. coli* er aminopenicillinresistente. AmpC betyr «ampicillin hydrolyserende» (Iredell et al., 2016). AmpC hydrolyserer typisk betalaktamene penicillin, 1GC-3GC. De siste årene har det vært en hyppig rapportering av infeksjoner forårsaket av bakterier som produserer AmpC på verdensbasis i både samfunnet og på sykehus (Liebana et al., 2013). AmpC hydrolyserer ikke bare mange av de samme betalaktamene som ESBL_A, men også cefamyciner (Bajaj et al., 2016). På laboratorier skilles ofte AmpC og ESBL basert på hydrolyse av cefamycin, som assosieres med 2GC (Iredell et al., 2016). AmpC hemmes ikke av vanlige betalaktamase-inhibitorer for ESBL, men heller

cloxacillin. I kromosomet til ulike G⁻ bakterier har AmpC betalaktamaser flere ganger blitt påvist, men det har derimot blitt mer vanlig med tilfeller av plasmidbårne AmpC (pAmpC) enzymer (Liebana et al., 2013). Enzymene har da forflyttet seg over på plasmider. pAmpC kan deles opp i seks familier basert på fylogeni (Bajaj et al., 2016). Enzymet CMY-2, fra familien CIT, anses for å være det vanligste pAmpC enzymet i *E. coli*. Cefamycinasen er hovedsakelig resistent mot cefamycin (Iredell et al., 2016).

2.2.5.1.3 Karbapenemaser (*ESBL_{KARBA}*)

Karbapenemaseproduksjon har blitt en betydelig årsak til bredspekretet betalaktamresistens hos medlemmer av *Enterobacteriaceae*, i tillegg til flere andre G⁻ bakterier (Khan et al., 2017). Karbapenemaser deles opp i underklasser og for øyeblikket er KPC vanligst fra underklasse A, mens OXA-48 er mest vanlig fra underklasse D (Codjoe & Donkor, 2017). Når det kommer til klasse B karbapenemaser (MBL), er blant annet *New Delhi Metallo-betalaktamase 1* (NDM-1), *Verona integron kodet metallo-betalaktamase* (VIM) og *Imipenem-resistent Pseudomonas* (IMP) mest utbredt. En inkorporering i genkassetter og lokalisering på integroner er typisk for *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* og *bla_{IMP}*. I bakterier som *E. coli* og *K. pneumoniae* dominerer *bla_{NDM}* mest. Konjugative plasmider kan enkelt frakte *bla_{NDM}* mellom bakterier ved ervervet resistens (Khan et al., 2017). NDM gir typisk resistens mot penicilliner, 1GC-4GC, samt karbapenemer (Iredell et al., 2016).

2.2.5.2. Meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Et eksempel på en bakterie med ervervet resistens og multiresistens er MRSA (Davies & Davies, 2010). *S. aureus* er en G⁺ kokk som hører til kroppens normalflora, som hud og slimhinner, men kan også være en vanlig humanpatogen bakterie (Stapleton & Taylor, 2002). Bakterien kan blant annet gi lungebetennelse, tuberkulose, mastitt, sepsis, og i verste fall død. MRSA er nå den hyppigst forekommende ARB på verdensbasis (Ventola, 2015). Hvert år dør 11 285 personer i USA av MRSA. I 2016 ble 2 538 MRSA-tilfeller rapportert i Norge, hvorav 35% var kliniske infeksjoner, noe som er en kraftig økning siden 2005 (NORM / NORM-VET, 2016).

Da meticillin ikke lenger produseres, anses MRSA for å være resistent mot nesten alle betalaktamer (Paterson et al., 2014). I stedet for meticillin, brukes betalaktamene oxacillin og/eller cefoxitin ved testing av resistensen til MRSA

(Paterson et al., 2014). Meticillinutsatt *S. aureus* blir omgjort til MRSA når den tar opp et mobilt genetisk element som heter stafylokokk kassett kromosom (SCC*mec*). SCC*mec* bærer genet *mecA* som koder for en endring av PBP, også kalt PBP2a/PBP2', som fører til lavere affinitet for betalaktamer. Siden PBP er essensiell for dannelse av celleveggen, resulterer dette i at MRSA fortsetter sin celleveggbiosyntese selv om nivåer over MIK av betalaktamer er tilstede. PBP2a kompensere for blokkert PBP, som gir bakterien evnen til å vokse selv om antibiotika er tilstede (Ballhausen et al., 2014).

Ved en tilfeldighet ble et nytt *mecA*-gen først funnet i 2007 (García-Álvarez et al., 2011). Et *S. aureus* isolat detektert i en studie fra Storbritannia viste seg å være en fenotypisk MRSA, men analysene testet negativt for *mecA*. Stammen var bare 60-70% identisk med *mecA* sitt DNA og aminosyrene i PBP/2. Den ble kalt for *mecC*. PBP2a_{*mecC*} og PBP2a_{*mecA*} viste ulikheter i affinitet, termostabilitet og optimumstemperatur (Paterson et al., 2014). PBP2a_{*mecC*} har en høyere affinitet for oxacillin enn cefoxitin, som kan lede til en økt resistens mot cefoxitin fremfor oxacillin. PBP2a_{*mecA*} har derimot relativ lik affinitet for begge. Studier tyder på at *mecC* MRSA ikke er veldig vanlig hos mennesker, og at den kun er rapportert i 13 europeiske land. I Norge er genet kun blitt rapportert hos en huskatt i Norge (Medhus et al., 2013).

2.2.6. Antibiotikaresistens globalt

2.2.6.1. Antibiotikaresistens hos mennesker

Årsaken til omfanget av AR varierer fra land til land (Iredell et al., 2016). Forekomsten kan blant annet skyldes hvor restriktive de er med utgivelse av antibiotika til mennesker eller standarden på helsevesenet. I flere land, spesielt utviklingsland, kan f.eks. antibiotika selges reseptfritt og billig (Morgan et al., 2011). Likevel hadde land som Canada og Australia, som er strenge på bruk av antibiotika, en dobling av ESBL-produserende *E. coli* i 2011 (Iredell et al., 2016). Det har ofte vært tilfeller hvor reisende som kommer fra et land med velutviklet helsevesen, har returnert til hjemlandet sitt med kolonisering av ESBL-bakterier. Generelle hygieniske forhold, levestandarden, befolkningstettheten, klimaet eller kvaliteten på renseanlegg kan også spille inn ved utvidelsen av resistens (Brolund, 2014).

Europakommisjonen har anslått at AR fører til 25 000 årlige dødsfall i EU, og at ca. 700 000 dør per år i hele verden (Europakommisjonen, 2018). Minst to millioner mennesker i USA blir syke hvert år på grunn av AR infeksjoner, hvorav 23 000 dør (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). De ARB som det haster mest å få bukt med er *Clostridium difficile*, karbapenemresistent *Enterobacteriaceae* (KRE) og AR *Neisseria gonorrhoeae*. KRE er resistent mot nesten alle eksisterende antibiotika. Det har blitt anslått 7 900 infeksjonstilfeller med karbapenemresistent *Klebsiella* spp. og 1 400 tilfeller med infeksjoner forårsaket av *E. coli* i USA. Andre seriøse utfordringer inkluderer blant annet G⁻ bakterier som MR *P. aeruginosa*, MR *Acinetobacter* spp., ESBL- produserende *Enterobacteriaceae* (spesielt *E. coli* og *K. pneumoniae*), samt den G⁺ bakterien MRSA. Innen 2050 vil angivelig 390 000 mennesker dø i Europa, 317 000 i Nord Amerika, 392 000 i Latin Amerika, og 22 000 i Australia hvert år på grunn av ARB (Review on Antimicrobial Resistance, 2014). De verdensdelene som vil merke utbredelsen av resistens mest vil være Asia og Afrika, med over 4 millioner dødsfall per år i hver av verdensdelene. Årsaken til dette kan være at disse kontinentene består av mange U-land.

2.2.6.2. Antibiotikaresistens i dyr og mat

Det har blitt rapportert at det generelt er lave nivåer av AR hos dyr i Europa, men det er fortsatt en høy forekomst av resistens mot flere ulike antibiotika i enkelte land (European Food Safety Authority, 2018). I 2016 ble det innhentet data fra 20 land i Europa som blant annet viste lave nivåer av redusert følsomhet mot ESBL / karbapenemaseproduserende *E. coli* i avføring fra fjærkre. Hos fjærkre varierer det veldig fra land til land i Europa hvor stort omfanget er. Nivåene spenner fra < 10 % resistens (Norge, Finland, Danmark og Sverige), til 70-90 % resistens (Belgia, Latvia, Spania og Italia). Graden av resistens er lave i Nord-Europa. Videre kan det være vanlig med AR humanpatogener i mat (Iredell et al., 2016). Studier har vist at prøver med ESBL-produserende bakterier fra mennesker, som *E. coli*, har kommet dit på grunn av kontaktsmitte fra dyr eller via matkjeden (Bajaj et al., 2016). Misbruk av antibiotika i mat- og jordbruksindustrien sies å være kilden til problemet.

2.2.6.3. Antibiotikaresistens i miljøet

Tilstedeværelse av AR i miljøet kan skyldes produksjon av antibiotika hos bakterier i jord eller vann (Keen & Montforts, 2012). Andre årsaker kan være en spredning av ARB og antibiotika fra sykehus, husholdninger, gjødsel fra jordbruk, fiskeoppdrett, dyreproduksjon eller via avløpsvann. Resistens kan derfor være naturlig i miljøet eller stamme fra antibiotikaforurensning. Problemet oppstår når forurensningen blir for stor. Det finnes enkelte studier om resistens i miljøet, men ikke nok.

2.2.7. Antibiotikaresistens i Norge

2.2.7.1. Antibiotikaresistens hos mennesker

Tilfeller med infeksjoner forårsaket av enkelte resistente G⁻ stavbakterier i Norge har vært lave, men økende etter at de ble meldepliktig i 2012 (NORM / NORM-VET, 2016). I årsrapporten til NORM/NORM-VET fra 2015 og 2016 ble det detektert lave nivåer av ESBL-gener i humankliniske *E. coli* blodkulturer og urinprøver, men det har likevel vært en økende prevalens siden 2003 (Folkehelseinstituttet, 2014). Fra 2012-2016 har antall meldte tilfeller med G⁻ karbapenemaseproduserende bakterier blitt mer enn firedoblet. Dette er alvorlig. Mange har blitt smittet i utlandet, og da spesielt fra steder med høy risiko for å bli smittet som Sør-øst Asia og Afrika. Antageligvis er ca. én av ti personer bærere av ARB i Norge (Folkehelseinstituttet, 2017c). Disse bakteriene er som regel ikke farligere enn andre sykdomsfremkallende bakterier, men de er vanskeligere å behandle og behandlingen tar lenger tid hvis en infeksjon oppstår.

2.2.7.2. Antibiotikaresistens i dyr og mat

Norge er det landet i Europa som har lavest forekomst av AR i dyr og mat ifølge Veterinærinstituttet (2017). Årsaken til dette kan være Norges lite sentrale beliggenhet, det kalde klimaet som påvirker vekstvilkårene, færre dyr per gårdsbruk, lite import, mindre turisme enn andre land, streng bruk av antibiotika, samt forebygging av sykdom blant dyr som igjen senker utleveringen av antibiotika. På tross av et lavt forbruk av AVMP og en lav forekomst av ARB, kan allikevel internasjonal handel av mat og fôr påvirke nivåene av resistens mot kritisk viktige antibiotika som cefalosporiner (World health organization, 2017). Enkelte isolater fra kylling- og kalkunkjøtt viste gener som koder for cefalosporinaser i årsrapporten til NORM/NORM-VET fra 2016, mens

årsrapporten fra 2015 viste at nivåene av cefalosporinasegener i biff og svinekjøtt var svært lave. Det ble ikke påvist cefalosporinaser i osteprøver (pasteurisert og upasteurisert) og sjømatprøver (blå muslinger, kamskjell, østers, scampi, etc.), utenom to importerte prøver av sjømat.

2.2.7.3. Antibiotikaresistens i miljøet

Foreløpig eksisterer det ikke nok kunnskap om AR i miljøet i Norge (Miljødirektoratet, 2017). Dette kan skyldes at fokuset hovedsakelig har vært rettet mot et annet område, som f.eks. på sykehusene. De studiene som eksisterer er hovedsakelig enkeltrapper fra Veterinærinstituttet, med støtte fra Miljødirektoratet, og årsrapportene til NORM/NORM-VET. Årsrapporten fra 2016 var den første årsrapporten som undersøkte forekomsten av resistensgener hos ville dyr, ifølge Veterinærinstituttet. Ved undersøkelser av ARB og ARG i miljøet i Norge ble rødrev og ville fugler benyttet som indikator. Undersøkelsene viste at fekale prøver isolert fra disse dyrene, inneholdt *E. coli* med 3GC-resistens. Nivåene av ARB i de fekale prøvene var lave, men fortsatt bekymringsverdige.

Havforskningsinstituttet (2017) fikk også støtte fra Miljødirektoratet for å forske på utberedelsen av ARB nylig. Undersøkelsen bestod i å kartlegge forekomsten av ARB i skjell fra flere punkter langs kysten i Norge. Punktene var påvirket av menneskelig aktivitet i ulik grad. Resultatene fra studien viste at 65 % av isolatene var AR mot under 3 antibiotikatyper, mens en tredjedel av bakteriene ble ansett som MR. Noen av bakteriene hadde pattedyr som reservoar, som f.eks. *E. coli*, mens andre var vanlige å finne i akvatiske miljøer.

2.3. Bakteriestammer funnet i vannprøver

På bakgrunn av resultater fra Sanger-sekvensering (16S rRNA) ved innsending av amplifiserte og rensede DNA-templater, ble det fokusert på familien *Enterobacteriaceae* i denne oppgaven. Bakteriene som ble påvist ved sekvenseringen var *E. coli* og *Shigella* spp..

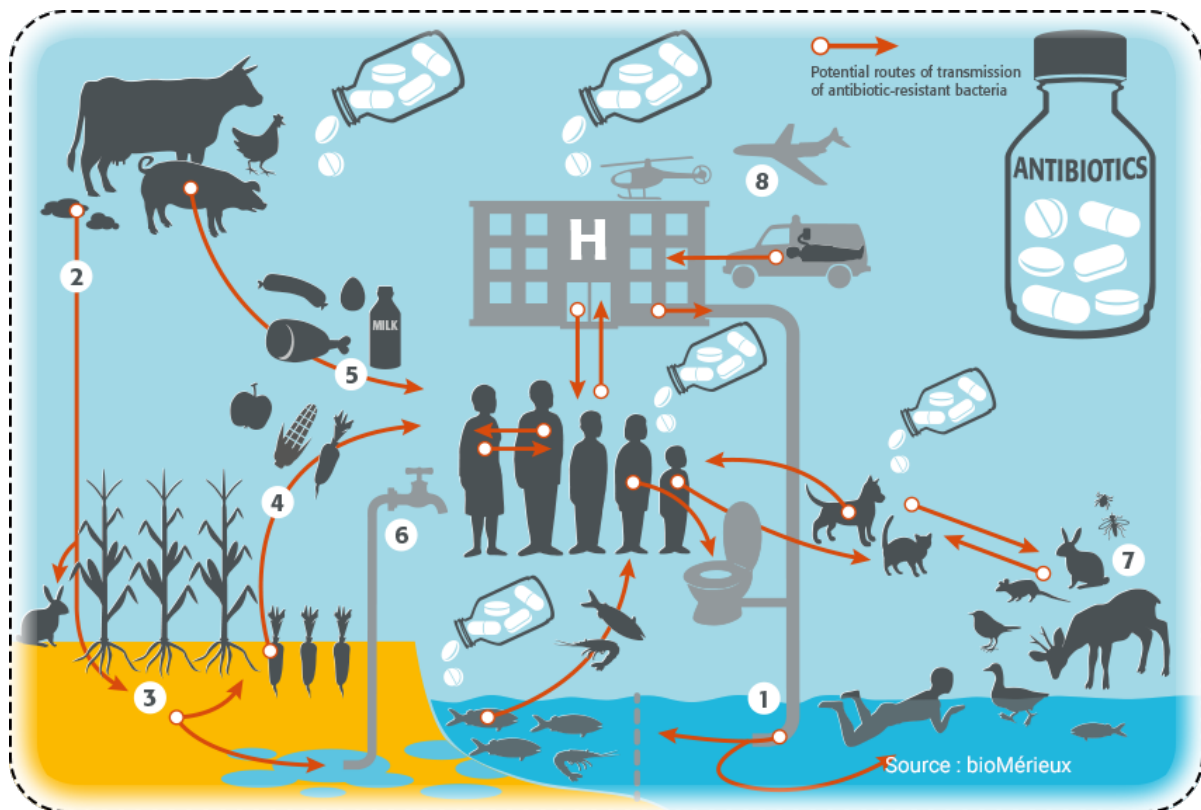
Escherichia coli er en G⁻, ikke sporedannende, zoonotisk, fakultativ anaerob stavbakterie med flageller som vanligvis lever i tarmen til varmblodige dyr og mennesker (Granum, 2015). Bakterien trives best ved 37 °C, men kan også vokse helt

ned til 7 °C og opp til 48 °C. *Escherichia coli* har et stort mangfold, både fenotypiske og genotypiske egenskaper, og genomet er meget fleksibelt. Slike egenskaper kan ha en sammenheng med hvorfor *E. coli* kan variere mellom å være alt fra en helt ufarlig tarmbakterie til en livstruende patogen. Et eksempel på annen art fra samme slekt som ikke anses for å være patogen er *Escherichia fergusonii*. Varianter av *E. coli* som kan angripe tarmsystemet og utvikle sykdom deles inn i seks grupper. Infeksjoner på sykehus og i samfunnet forøvrig har infeksjoner forårsaket av *E. coli* vært blant de patogenene som har blitt oppdaget hyppigst (Guo et al., 2014). Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) er en patogen som er resistent mot flere varianter av antibiotika. Dette er spesielt bekymringsverdig med tanke på overføring av ARG. Det er vanlig at medlemmer av *Enterobacteriaceae* overfører plasmider mellom seg ved ervervet resistens (Iredell et al., 2016).

Shigella spp. er i likhet med *E. coli* en G⁻, ikke sporedannende, fakultativ anaerob stavbakterie, noe som reflekteres i det nære fylogenetiske slektskapet mellom de to bakteriene (Granum, 2015). Bakterien overlever også ved samme temperaturintervall og har samme optimumstemperatur som *E. coli*. *Shigella* spp. har derimot kun menneske som reservoar, i motsetning til *E. coli* som er zoonotisk. Eksempler på to *Shigella*-arter er *Shigella flexneri* og *Shigella sonnei*. Disse bakteriene kan forårsake sykdommen shigellose som er et problem flere steder i verden, men ikke noe særlig i Norge. En ukritisk bruk av ulike varianter av antibiotika mot shigellose har medført en utbredt forekomst av bakterier med redusert følsomhet mot f.eks. 3GC.

2.4. Spredning av antibiotikaresistens

ARB kan utveksles ved kontakt mellom mennesker, mellom mennesker og dyr, og til mennesker og andre organismer via vann, mat og i miljøet (Folkehelseinstituttet, 2016). De kan etablere seg i tarmfloraen til en person eller et pattedyr som da blir en såkalt bærer (Grahek-Ogden, 2017). Typisk enteriske stammer kommer fra familien *Enterobacteriaceae* (Granum, 2015). Genomet til *E. coli* er tilpasningsdyktig og kan endre seg ut i fra forholdene og selektivt press (Bajaj et al., 2016). Dette skjer ved hjelp av HGO med MGE eller mutasjoner. Fekal forurensning av vann og næringsmidler med *E. coli* kan være kritisk ved matforgiftning med f.eks. EAEC (Granum, 2015). Figur 2 illustrerer hvordan antibiotika og AR kan distribueres i naturen og samfunnet.



Figur 2. Spredning av antibiotika og AR i miljøet og mellom organismer (bioMérieux, u.å.).

Som det fremgår av figur 2, er det mange veier antibiotika og ARG kan ta for å videreføres fra et område, en patogen eller apatogen bakterie til en annen. Resistens kan spres via avløp, avfall og kloakk fra sykehus, eller andre liknende institusjoner, ut i innsjøer eller havet (1). Habitatet til fisker, krepsdyr og andre akvatiske dyr kan påvirkes og eventuelt ødelegges, mens bade- eller drikkevannsmulighetene til mennesker kan bli dårligere. I tillegg kan også mennesker få ARB i seg ved å spise fisk. Videre kan bruk av antibiotika til produksjonsdyr gå ut i avføringen (2), og spre resistens via jord til kornavlinger (3) og rotgrønnsaker (4), kjøtt (5) eller ved å forurense grunnvannet (6). Slik kan mennesker igjen få i seg ARB via inntak av mat og drikke. Andre dyr som kjæledyr, ville dyr og insekter kan også spre motstandsdyktige bakterier (7). Ellers er økningen i turismen og import av mat en sterk bidragsyter til resistensøkningen (8).

2.4.1. Tilstedeværelse og utbredelse av antibiotika og AR i akvatiske miljøer

Vann er en enkel spredningsmåte for mikroorganismer og andre stoffer. En sterk bidragsyter til spredning av resistens via vann kan være kommunale avløpsrenseanlegg (Waseem et al., 2017). De håndterer forurenset vann som f.eks. kloakk fra husholdninger og industri. Aktive metabolitter fra antibiotika, som ikke metaboliseres i kroppen, kan skilles ut som ekskrement, eller delvis eliminering i løpet av renseprosessen på anlegget, og til slutt ende opp i miljøet (Keen & Montforts, 2012). Uansett hvor god behandlingen av biproduktet etter rensing av kloakk (kloakkslam) er, så kan produktet høyst sannsynlig inneholde store mengder ARG og ARB (Waseem et al., 2017). Rester fra kloakkslam kan forurense overflatevann (elver, innsjøer, hav, bekker, etc), grunnvann, eller sedimenter (Keen & Montforts, 2012).

Det eksisterer enkelte studier om forekomsten av resistens i vann. Gjennom hele året ble det gjennomført en kvantitativ analysestudie av ARG og transposasener på et urbant avløpsanlegg i Helsinki (Waseem et al., 2017). Alle transposasener og ca. 67 % av alle de ARG de undersøkte var i avløpsvannet. En liknende studie så på den sesongmessige forekomsten av ARG på avløpsanlegg i Dresden over to år. De konkluderte med at nivåene av ARG var høyere om høsten og vinteren. Årsaken til dette er antageligvis økt bruk av antibiotika i løpet av disse månedene. Mengden ARG i miljøet kan altså avhenge av hvilket tidspunkt det er på året. I løpet av en annen studie ble det innhentet vannprøver fra et kloakkrenseanlegg fra fem indiske stater. De fant tilstedeværelse av bredspektrede cefalosporin- og/eller karbapenemresistente i ca. 38% isolater med *E. coli*, hvorav over halvparten av isolatene hadde redusert følsomhet mot andre antimikrobielle midler. Videre kan gjødsel, jord og avløpsvann fra jordbruk og husdyr kan også bidra til spredning av ARB (Waseem et al., 2017). Aktive substanser fra antibiotika kan gå via avføring og urin til gjødsel brukt i jordbruk. Etter regn kan disse substansene i overflatejorden renne videre ut i miljøet (Keen & Montforts, 2012). Jord og vann kan fraktes til andre områder ved å feste seg til dyrepels og insekter, ved menneskelig påvirkning, eller med naturkrefter. Den økende globale oppvarmingen kan medføre økt risiko for lekkasjer og knekk i sårbare rørsystemer ved f.eks. oversvømmelser (Folkehelseinstituttet, 2017c). Finnes det ARB ute i miljøet, uansett om det er i akvatiske miljøer eller i jord, er det høyst sannsynlig at de kan forflytte seg. Kjennskapen til forekomsten av betalaktamer i akvatiske miljøer er ikke god nok, på tross av et høyt konsum og høye utslipp (Keen & Montforts, 2012).

2.5. Forebyggende arbeid mot antibiotikaresistens

Det er svært viktig å motarbeide videre utvikling av AR. Det er allerede et verdensomfattende problem, og kan lede til at mulighetene for helsebehandlinger stagnerer og at dødeligheten stiger (Folkehelseinstituttet, 2016). Resistens kan først og fremst forebygges ved å redusere forbruket av antibiotika hos mennesker og dyr, samt innføre vaksinasjoner og smitteforebyggende tiltak som kan forebygge infeksjonssykdommer. Ved å innføre influensavaksiner kan selve sykdommen, og følgesykdommer grunnet bakterier, forebygges (Folkehelseinstituttet, 2017c). Siden feil bruk av antibiotika ofte forekommer ved sykdomstilfeller forårsaket av virus, kan reduserte tilfeller av slike sykdommer være med på å senke unødvendig bruk av antibiotika. Smitteforebyggende tiltak kan innebære en innføring av gode rutiner for håndvask i barnehager og skoler, og i kommunen for mennesker som jobber med matlaging og servering. Tilstrekkelig og riktig bruk av håndvask og desinfisering med håndsprit kan bidra til å fjerne bakterier og forhindre spredning. Det er også viktig å bruke smalspektret antibiotika, framfor bredspektret, da bredspektret antibiotika medfører økt resistensutvikling som en følge av at flere bakterier påvirkes. Ellers bør det også søkes etter nye klasser av antibiotika.

For å få bukt med resistensproblemet må situasjonen overvåkes og kontrolleres på et nasjonalt og internasjonalt plan. WHO har utviklet en global handlingsplan mot antimikrobiell resistens (World health organization, 2015). Målet med planen er å forhindre infeksjonssykdommer og sikre gode behandlinger over lang nok tid med effektive og trygge legemidler som er kvalitetssikret. For å nå dette målet, er det fem punkter som vektlegges: Styrke bevisstgjøringen og forståelsen av AR, forbedre kunnskapen om AR ved å overvåke og forske, redusere infeksjonstilfeller, optimalisere bruken av antibiotika, og øke de økonomiske midlene for en bærekraftig investering som tar hensyn til alle land sine behov, samt øke investeringen til nye medisiner, diagnostiske verktøy og vaksiner.

I Norge finnes det gode systemer som bidrar til å begrense problemet med spredning av AR. Systemer som overvåker resistensutviklingen møysommelig er Meldingssystemet for smittsomme sykdommer (MSIS), Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), samt NORM-Veterinærmedisin (NORM-VET) (Folkehelseinstituttet, 2017c). Regjeringen har også en nasjonal strategi som tidligere nevnt under kapittelet «antibiotikaforbruk i Norge». Antibiotikasenter for

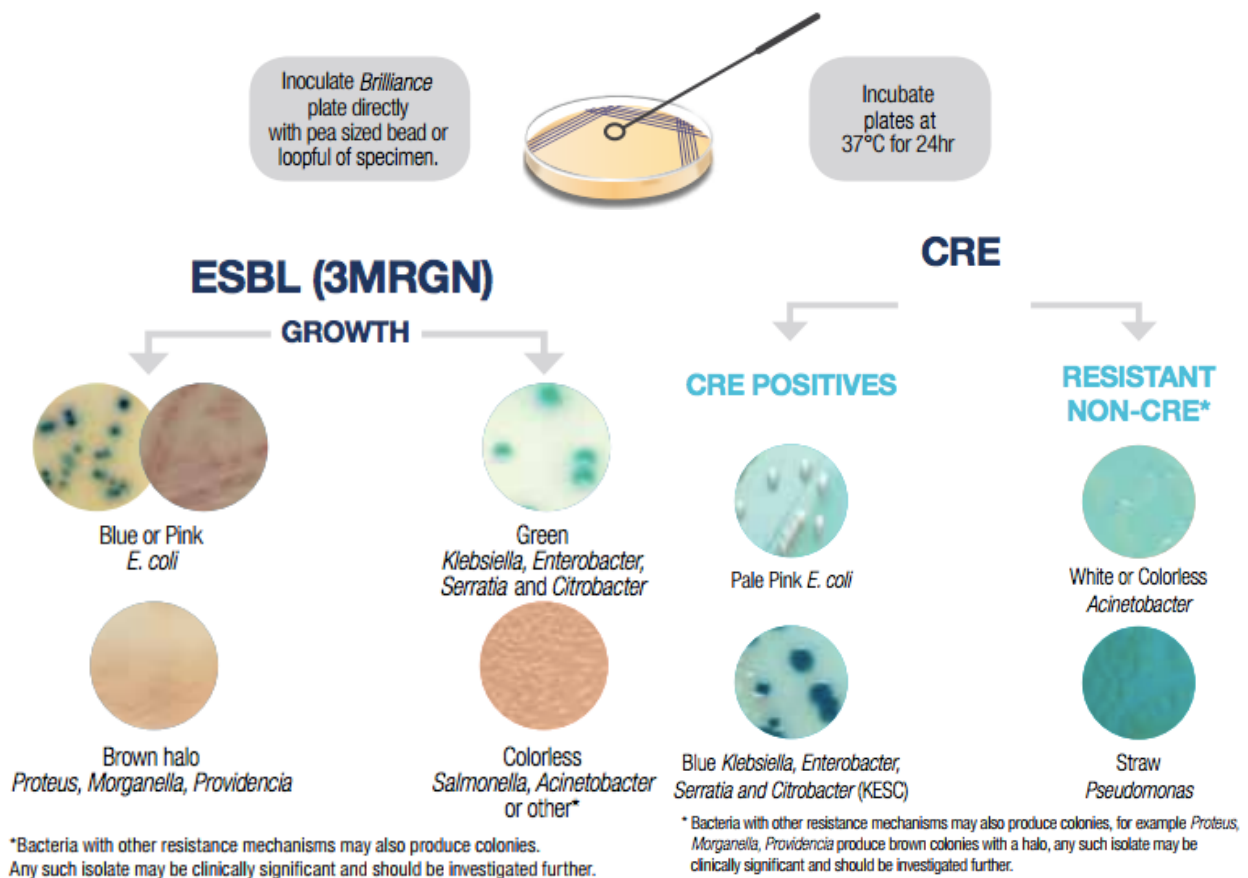
primærmedisin (ASP), og Nasjonal kompetansetjeneste for antibiotikabruk i spesialisthelsetjenesten (KAS) formidler om temaet antibiotika. En nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens (K-res) påviser og karakteriserer AR hos bestemte patogene bakterier. At ansvarlige aktører driver med kartlegging og kunnskapsformidling om resistens i Norge er viktig. Det er ingen selvfølge at folk forstår alvoret med spredning av resistente bakterier (Lönn-Stensrud, 2016). Tilfeller med smitte av patogene ARB har ikke samme sjokkeffekten når det kommer på nyhetene som EBOLA- eller fugleinfluensaviruset. Bakterier som er motstandsdyktige overfor antibiotika er heller en skjult og rolig pandemi. Landegrenser stenges ikke på grunn av ESBL. Media har mye makt over informasjonsformidlingen til befolkningen. Offensivt opplysningsarbeid rundt resistens, og nøye oppfølging av hva som skjer på forskningsfeltet kan virke forebyggende.

2.6 Metodisk teori

2.6.1 Selektive kromogene skåler

Bruk av selektive kromogene medier er en fenotypisk metode som er forholdsvis raske, lettvinnt å bruke, enkle å analysere og relativt rimelige. I denne studien ble *Brilliance*TM ESBL, *Brilliance*TM CRE, *Brilliance*TM STAPH24 og *Brilliance*TM MRSA2 Agar (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) brukt. *Brilliance*TM ESBL Agar er et vekstmedium som er selektiv for ESBL-produserende bakterier fra KESC-gruppen (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a). For å hemme *Enterobacteriaceae* som ikke produserer ESBL, undertrykke vekst av flere AmpC organismer, og andre bakterier som ikke produserer ESBL, inneholder *Brilliance*TM ESBL Agar en bredspektret 3GC og andre antibiotika. Videre kan *Brilliance*TM CRE Agar benyttes ved screening av karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae*, inkludert NDM-1 (Thermo Fisher Scientific Inc, 2011). Agaren inneholder karbapenemer. Her er det viktig å adskille KRE, som ikke er mottakelige for den MIK til karbapenem, og karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* (KPE), som produserer enzymer som hydrolyserer karbapenemer (Iredell et al., 2016). Det finnes også en kombinasjon av de to ovennevnte skålene, såkalte bi-skåler. Bruk av bi-skålen *Brilliance*TM ESBL / *Brilliance*TM CRE Agar er billigere enn de andre skålene som ikke er kombinasjonsskåler (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014). De

mest utbredte ESBL- og karbapenemaseproduserende organismene adskilles ved å inkludere kromogener i agaren, som angriper to enzymer og gir farge til kjemiske forbindelser (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a; Thermo Fisher Scientific Inc, 2011). Prosedyren for fargescreening av *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE Agar vises i figur 3.



Figur 3. Inokuleringsprosedyrer for Ekstenderte spektrum-betalaktamaser og karbapenemresistent *Enterobacteriaceae* (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

*Brilliance*TM MRSA2 Agar og *Brilliance*TM STAPH24 Agar ble også bruk i denne studien (Thermo Fisher Scientific Inc., 2008; Thermo Fisher Scientific Inc., 2010b). *Brilliance*TM MRSA2 skal selektere for MRSA. Er platene positive for MRSA etter rendyrking vil denimblå kolonier åpenbare seg, som en følge av fosfataseaktivitet. Dette enzymet er tilstede i flere stafylokokker, inkludert *S. aureus*. *Brilliance*TM STAPH24 et selektivt og diagnostisk medium for isolering av koagulasepositive stafylokokker. Etter rendyrking skal det oppstå mørkeblå kolonier. Begge mediene ble brukt ved detektering av MRSA.

2.6.2 Polymerase chain reaction

En vanlig metode innenfor molekylærbiologien er «polymerase chain reaction» (PCR) (Universitetet i Oslo, 2011b; Watson et al., 2014). Metoden brukes til å identifisere f.eks. gener eller genområder og er basert på at et lite utvalgt målgen amplifiseres (oppkopieres) ved hjelp av PCR. To primere («forward» og «reverse»), samt fire ulike deoksynukleotid trifosfater (dATP, dCTP, dGTP og dTTP også kalt dNTP) som brukes av DNA polymerase ved nysyntese av DNA, tilsettes i tillegg til DNA-templatet. Denne oppkopieringen av genmateriale gir mer råmateriale for videre analyser.

Prosessen for PCR deles opp i tre sykluser: Denaturering, hybridisering og polymerisering (Tronsmo, 2016; Universitetet i Oslo, 2011b). Ved første trinn denatureres DNA-templatet ved oppvarming til omtrent 95 °C, som fører til at enkelttrådene skiller seg fra hverandre. Med andre ord omdannes dobbelttrådet DNA (dsDNA) til enkelttrådet (ssDNA). Etter denaturering synker temperaturen til 50-70 °C. Her inntreffer det andre trinnet. To primerne vil da kunne hybridiseres til den komplementære DNA-sekvensen som skal amplifiseres på øvre og nedre DNA-tråd. De binder seg til hver sin ende av sekvensen som skal oppformeres. Ved siste steg, polymeriseringen, heves temperaturen til 72 °C, og DNA polymerase amplifiserer DNA-templatet ved påsetting av dNTP til primerne. Etter første polymeriseringssyklus begynner prosessen på nytt. DNA denatureres igjen, primerne bindes til templat, og en ny syklus med syntese av DNA ved hjelp av DNA polymerase og dNTP skjer. I andre runde kan primerne binde seg til nylig syntetisert DNA, samt det originale DNA templatet. Syklusene fortsetter helt til ønsket antall kopier av sekvensen er oppnådd. Til slutt lagres de ved 4°C i PCR-maskinen.

I denne oppgaven ble multipleks og singlepleks benyttet ved PCR-kjøring. Multipleks brukes for å finne to eller flere målsekvenser av DNA eller RNA, mens singlepleks brukes for å finne en målsekvens av DNA eller RNA (Lindstedt, 2018; Zhang et al., 2009). Sistnevnte analyse brukes for å finne en spesiell målregion, mens ved multipleks benyttes flere primere for å kunne detektere mange ARG i løpet av én analyse. Multipleks PCR gjør det mulig å spare både penger og tid. Ulempen er at uriktige negative prøver kan oppstå som en følge av inhiberte DNA-amplifiseringer, siden flere reaksjoner skjer simultant.

2.6.3 Agarosegelelektroforese

Metoden gelelektroforese benyttes til å separere DNA-fragmenter basert på deres størrelse (Watson et al., 2014). Prosessen foregår på en gelmatriks laget av polyakrylamid eller agarose, som deretter settes over i en «brønn» fylt med buffer. Agarose ble benyttet i denne oppgaven. I hver ende av karet ligger det en positiv elektrode (anode) og en negativ elektrode (katode). DNA er negativt ladet og vil derfor trekkes mot anoden. Små fragmenter av DNA vil «vandre» lenger ned i gelen enn store fragmenter. Årsaken til dette er at de store DNA molekylene har vanskeligere for å passere porene i gel matriksen enn de små. Etter endt elektroforese adskilles dermed molekyler av ulik størrelse (antall basepar), basert på distansen de har forflyttet seg mot anoden i gelen. Simultant med elektroforese av DNA-fragmentene, kjøres en DNA-ladder, en blanding med kjente størrelsesmarkører som kan brukes for å finne hvor mange basepar DNA-fragmentene består av. For å synliggjøre båndene i gelen brukes et fargestoff som binder seg til DNA.

I denne oppgaven ble Tris Acetate-EDTA buffer (TAE-buffer), agarosegel, og gel-loading buffer brukt til agarosegelelektroforese av DNA. TAE-buffer har lav ionisk styrke og lav bufferkapasitet (Phillips, 2017). Den består av trisbase, eddiksyre og Etylen Diamin Tetra Acetat (EDTA). 1 x TAE-buffer inneholder 40 mM Tris Acetat, samt 1 mM EDTA og er en fortyning av TAE-bufferen. Fortynnet buffer (1 x TAE) ble brukt i agarosegelen og i gelelektroforesekaret. Agarose er et lineært polysakkarid som er bygd opp av disakkaridet agarobiose (Vaaje-Kolstad, 2016). Polysakkaridet kan oppløses i vann ved oppvarming, og danne en gel ved nedkjøling, og kan brukes for å fraksjonere DNA. I denne oppgaven ble agarosen oppløst i fortyningen av TAE-bufferen. Det ble også tilsatt et fluoriserende stoff, GelRed® eller GelGreen® (Biotium, Fremont, USA), for å synliggjøre båndene av PCR-produkter på gelen ved billedtaking under UV-lys. De fluoriserende stoffene er miljøvennlige, sensitive, trygge og stabile å bruke ved farging av dsDNA, ssDNA eller RNA i agarosegeler (Biotium, u.å.). Videre ble gel-loading bufferen GelPilot® Loading Dye, 5X (Qiagen, Hilden, Tyskland) brukt for å gi prøvene farge, og bidra til å gjøre appliseringen av dem i gel-brønnene enklere (Qiagen, u.å.). Gel-loading bufferen består av tre fargestoffer som indikerer hvor langt DNA hadde vandret i gelen i løpet av gelelektroforese. Migrasjonsdistansen i TAE-buffer i 1 % gel for de ulike fargestoffene var 3000 bp for *Xylene cyanol* (lyseblå), 400 bp for *Bromophenol blue* (mørkeblå) og <100 bp for *Orange G* (oransje).

2.6.4 Spektrofotometer og fluorometer

For å måle renheten av dsDNA i en prøve kan et spektrofotometer benyttes (Thermo Fisher Scientific Inc., u.å.) I denne oppgaven ble NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) brukt. Et slikt apparat måler absorbansen av alle molekyler i prøven på innstilt bølgelengde. Ved 260 nm absorberes både nukleotider, RNA, ssDNA og dsDNA. Disse komponentene vil derfor bidra til prøvens totale absorpsjon. Før bruk av et spektrofotometer må derfor prøven renses. For å måle renhet av DNA brukes ratioen $A_{260/280}$. Rent DNA anses for å være rundt 1.8. Hvis nivåene er lavere kan det være kontaminanter som fenoler og proteiner tilstede. En annen ratio som brukes er $A_{260/230}$. Den brukes for å måle renhet av nukleinsyrer. Disse verdiene er ofte høyere enn verdiene for $A_{260/280}$, med nivåer fra 2.0-2.2. Hvis ratioen er lavere kan det være kontaminanter tilstede.

Ved måling av DNA konsentrasjonen, ble Qubit[®] 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) benyttet i denne oppgaven. Dette fluorometeret kan kvantifisere DNA, RNA og proteiner ved bruk av veldig følsomme og nøyaktige fluorescensbaserte Qubit[™] kvantitetsanalyser (Invitrogen by Life technologies, 2010). Ved å benytte spesielle fargestoffer som er selektive for dsDNA, RNA og proteiner, vil kun molekylkonsentrasjonen av interesse måles, og ikke forurensende kontaminanter.

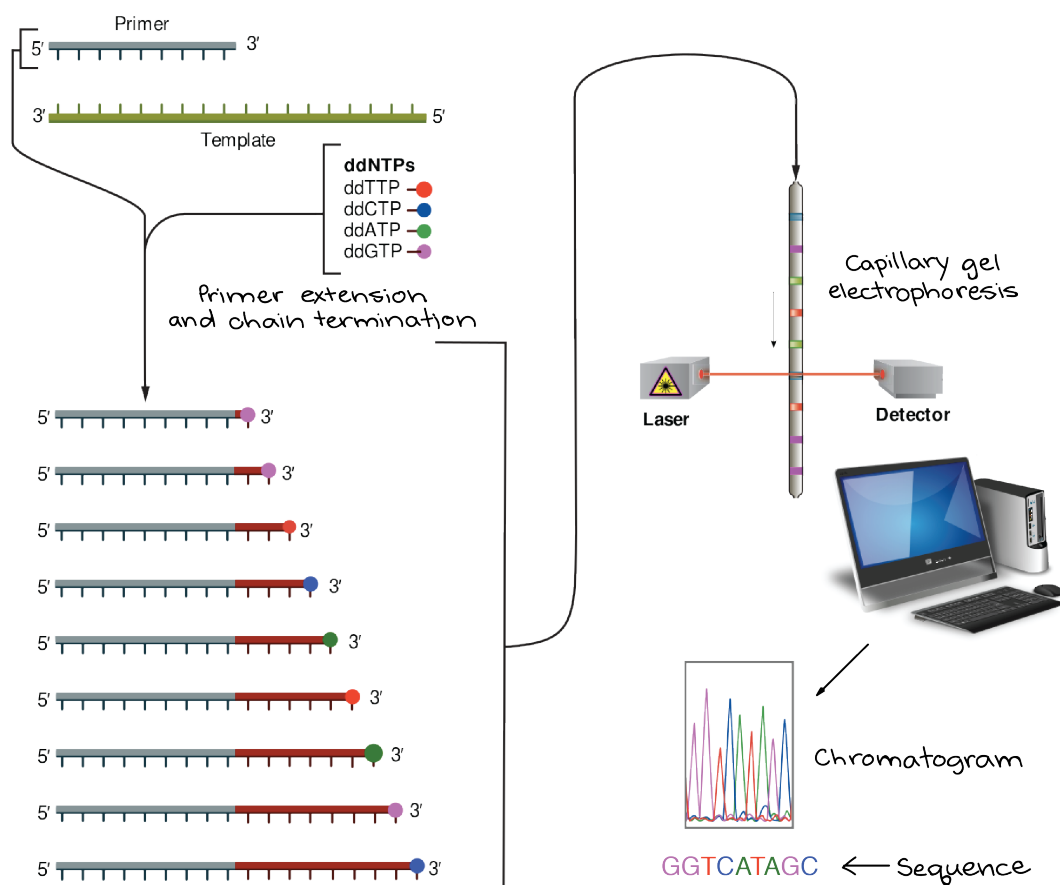
2.6.5 Gensekvensering

2.6.5.1 Sanger-sekvensering (16S rRNA og resistensgener)

Gensekvensering er en metode for å «avlese» arvestoffet til en bakterie (Janda & Abbott, 2007). For å undersøke slektskapet mellom arter og klassifisere bakterier blir 16S ribosomal RNA i stor grad benyttet ved gensekvensering i laboratorier verden rundt. Genet er passe stort (1500 bp) og skal derved bidra med tilstrekkelig, nødvendig informasjon. Det finnes hos alle prokaryoter, og funksjonen til genet har ikke endret seg stort over tid. Vanligvis brukes 16S rRNA gensekvensering ved identifisering av en ukjent bakterie eller isolater med karakteristikk som kan tolkes på flere ulike måter. Likevel er resultater fra slik gensekvensering ikke alltid helt sikker. Forskere har strevd med å skille slekter og/eller arter fra f.eks. familien *Enterobacteriaceae* ved bruk av 16S rRNA Sanger-sekvensering. anbefalte kriterier ved artsidentifisering er at det

foreligger en sekvenslikhet på minst 99 %, og at minst 800 bp, ideelt sett over 1000 bp, sekvenseres ved 16S rRNA gensekvensering.

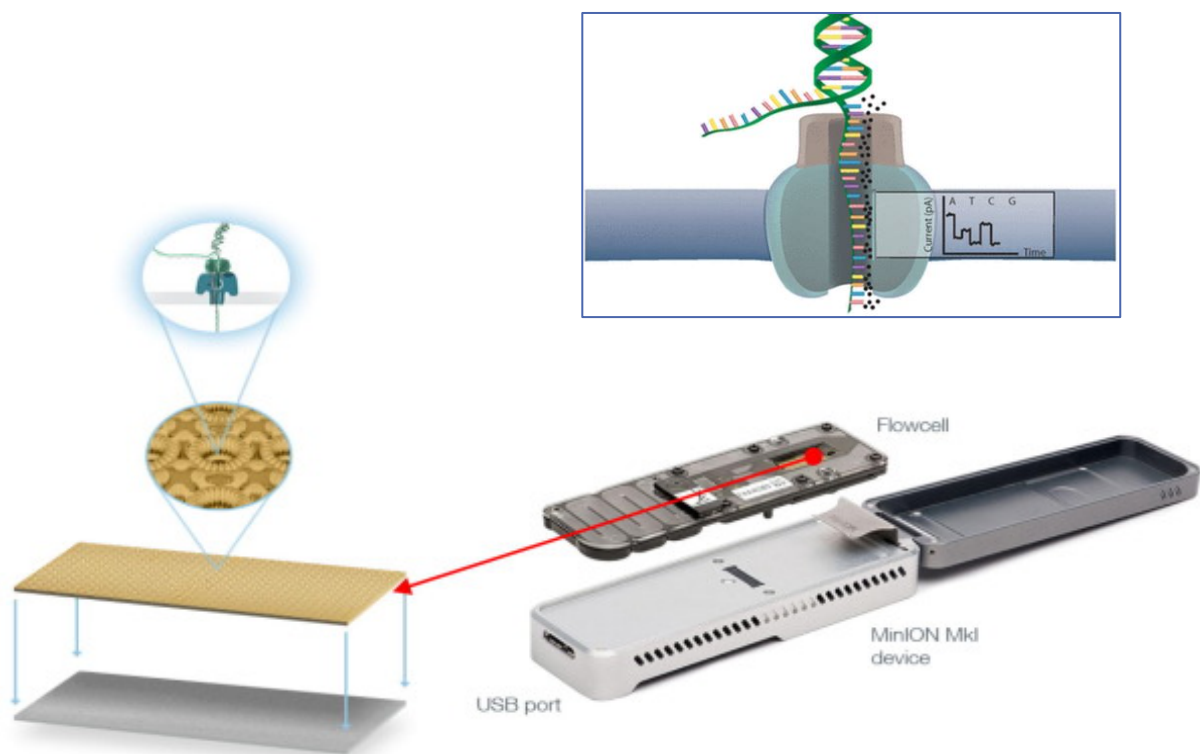
I denne oppgaven ble Sanger-metoden benyttet for å karakterisere hvilke bakteriestammer (16S rRNA) og resistensgener (singelpleks og multipleks PCR) som var i PCR-produktene fra innhentede vannprøver. Resistensproduktene ble amplifisert ved PCR, og bekreftet eller avkreftet med Sanger-sekvensering (Tronsmo, 2016). Samtidig som dNTP'ene tilsettes og en primer, tilsettes også dideoksynukleotider (ddNTP) som kan forhindrer DNA-polymerase i å elongere enkeltråden av DNA. Primeren og DNA-polymerasen kan dermed starte sekvenseringen på nytt fra 3'-enden til primeren. Produktene som kommer ut er fragmenter av DNA med ulik lengde og ddNTP i endene markert med et fluoriserende fargestoff som representerer hver base. Ved kapillærelektroforese separeres DNA fragmentene før basene kan påvises med laser, og danne et kromatogram basert på baserekkefølgen. Figur 4 illustrerer hvordan Sanger-sekvensering foregår, og et eksempel på utseende til en sekvens fra Sanger resultater er vist i vedlegg A, figur A1 (CTX-M-15 som hører til ESBL_A).



Figur 4. Sanger-sekvensering (KhanAcademy, u.å.).

2.6.5.2 Helgenomsekvensering med MinION

Analyse av hele genomet til en bakterie ved hjelp av nanopore-sekvensatoren MinION, er en mobil, rask og relativt billig metode å gjennomføre helgenomsekvensering på (Lu et al., 2016). Metoden kalles også for tredje generasjonssekvensering. Sammenlignet med tidligere sekvenseringsmetoder viser helgenomsekvensering hovedsakelig lengre sekvenser (fra ti til titusener baser per avlesning), kortere sekvenstid (fra dager til timer), og færre eller ikke-eksisterende sekvensfeil introdusert av PCR amplifisering. MinION er liten i både vekt og volum, og kan kobles til en laptop. Identifikasjonen av hele DNA-sekvenser foregår ved at MinION måler endringer i elektriske signaler (en forstyrrelse) når arvematerialet passerer gjennom en nanopore i apparatet. Figur 5 viser hvilke bestanddeler apparatet består av, hvor nanoporene er plassert, og hvordan DNA avleses.

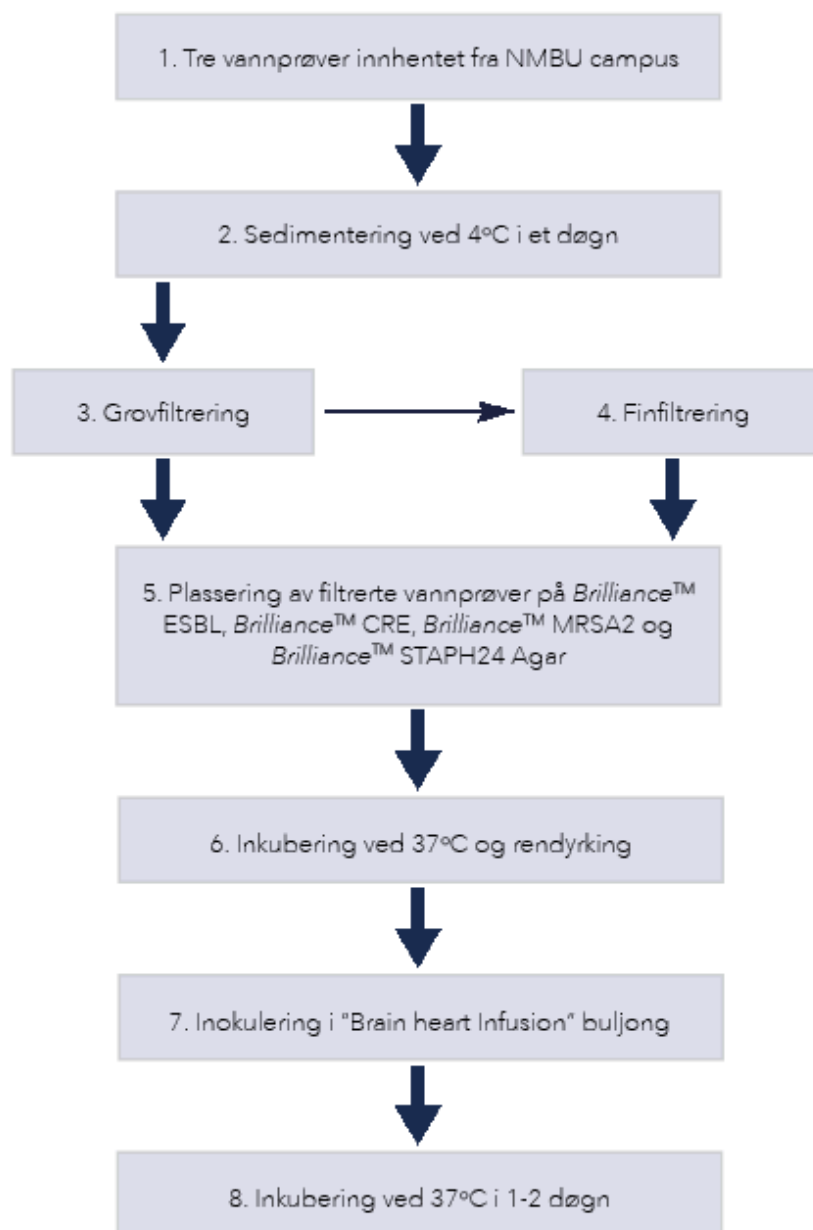


Figur 5. Oppbygningen av MinION-apparatet (Lu et al., 2016), samt en illustrering og forstørrelse av hvordan DNA sekvenseres gjennom en nanopore øverst t.h. (Churko et al., 2013).

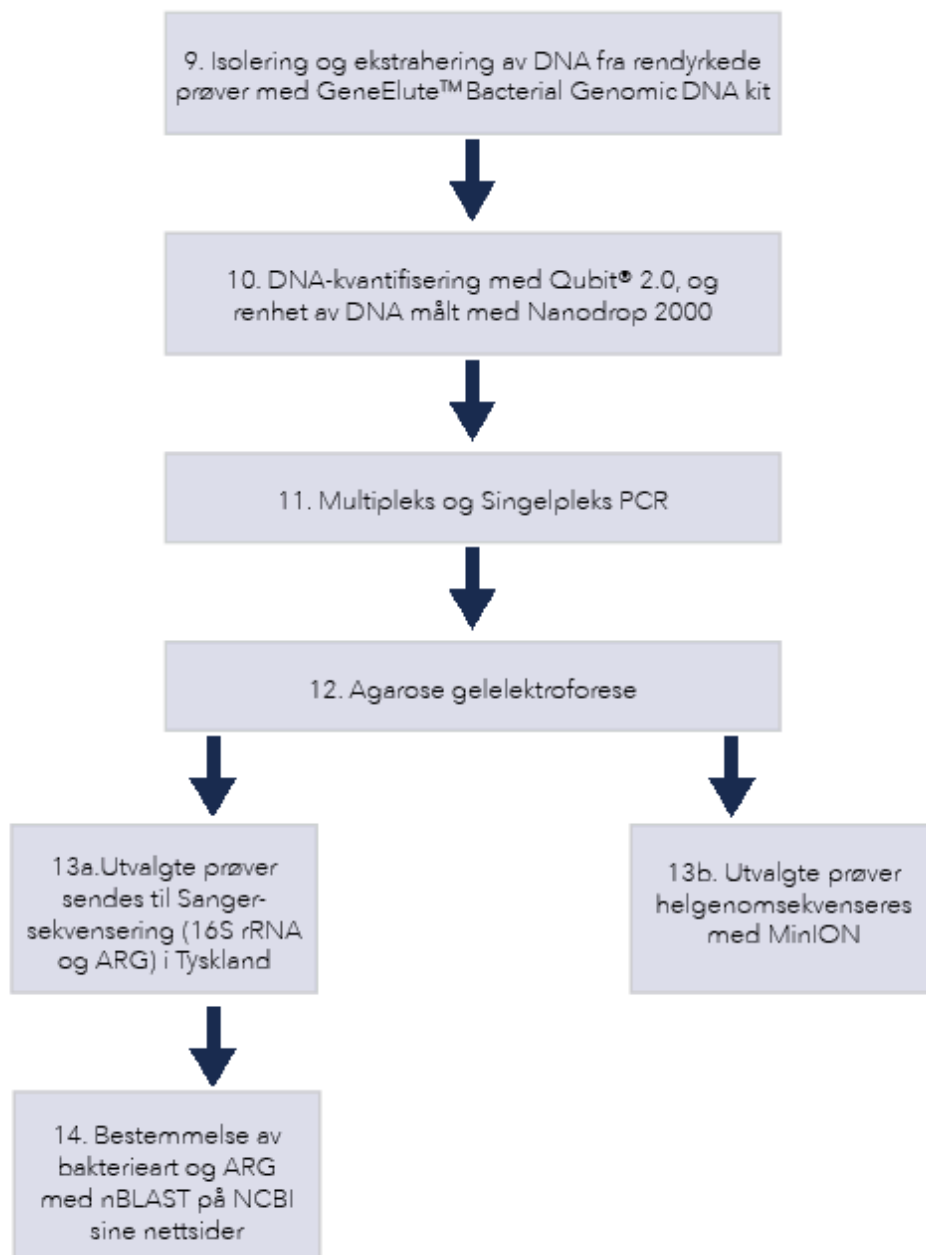
3.0 Metoder og materialer

3.1 Illustrering av prosessen

Det ble tatt en vannprøve fra Andedammen 13.02.2018 (av professor Bjørn-Arne Lindstedt) og to vannprøver fra Niagarabekken 27.02.2018 (av Hedvig Skaflem og Sissel Solberg). Vannprøvene som ble brukt i denne oppgaven ble kalt for H1, H2, og H3. Flytskjema over prosessen for analyser og forsøk vises i figur 6 og 7.



Figur 6. Flytskjema over fenotypisk deteksjon av resistente bakterier i vannprøver (1-8)



Figur 7. Flytskjema over molekylær karakterisering og genotypisk deteksjon av resistente bakterier i vannprøver (pkt. 9-14). Gjennomført etter fenotypisk deteksjon (figur 6).

3.2 Prøveinnsamling

Fra Andedammen vinteren 2018 ble vannprøve H1 innhentet, mens H2 og H3 ble hentet fra Niagarabekken. For å få tilgang til vannet ble isen knust med et skarpt redskap på utvalgte steder. Autoklaverte blåtoppflasker (500 ml) ble fylt med vann, og lagt i kjøleskap over natten slik at vannet kunne sedimentere. Figur 8 viser en oversikt over lokasjonene vannprøvene ble hentet fra på NMBU campus.



Figur 8. Kart over område for prøveuttak. Prøve H1 ble hentet ut fra Andedammen, mens prøve H2 og H3 ble hentet ut fra Niagarabekken.

Det ble også hentet inn jordprøver 01.09.2017 (av stipendiat Misti Dawn Finton) ved Andedammen på NMBU campus. Jordprøvene som ble analysert i denne oppgaven var M9, samt M15-M20. De var blitt rendyrket på selektive skåler, isolert og ekstrahert på forhånd av Misti Dawn Finton. Analysene som ble gjort av jordprøvene i denne oppgaven var multipleks og singelpleks PCR, agarosegelelektroforese og Sanger-sekvensering (16S rRNA og resistensgener).

3.3 Påvisning av resistensbakterier på selektive skåler

For å unngå en opphoping av smuss, planterester o.l. som kan vokse på utvalgte vekstmedier og gi misvisende resultater, ble vannprøven fra Andedammen og Niagarabekken filtrert. Vannet ble filtrert med et grovfilter (Whatman® Quantitative Filter Papers, diameter på 150 mm (100 pcs), GE Healthcare Life Sciences, grade 589/1). Videre ble vannprøvene finfiltrert gjennom cellulosefilteret EZ-Pak®, 47 mm, med porestørrelse 0.22 µm (Merck, Darmstadt, Tyskland) på en Microfil Support Stainless Steel Frit MISP00002 (Merck) som var koblet til vasken med et plastrør. Det filtrerte vannet kunne via trykk fra vannet i vasken gå gjennom tuben og ut i sluket. Hele prosessen foregikk sterilt. Pinsetten, som ble brukt til å overføre cellulosefilteret over til det porøse filteret EZ-Fit™ (Merck) i rustfritt stål på apparatet, ble sterilisert før bruk. Det samme ble filteret i rustfritt stål. Over cellulosefiltrene ble det plassert plastbegre med hull nederst som skulle fylles opp med 100 ml fra hver vannprøve. I løpet av filtreringen ble lukene i apparatet åpnet sakte mens filtreringen pågikk.

Etter grovfiltrering ble 50 ml vann hentet ut av kolben med en pipette, overført på selektive skåler, og platet ut med plastpodenåler. Før skålene ble inkubert ved 37°C, stod de litt og tørket. Skålene som ble brukt var *Brilliance*™ ESBL, *Brilliance*™ CRE, *Brilliance*™ MRSA2 Agar, og *Brilliance*™ STAPH24. De ble inkubert ved 37°C i et døgn. Ved eventuell vekst ble de resistente bakteriekoloniene strøket ut på nye skåler for å rendyrke koloniene. Finfilterene ble også inkubert på de samme dyrkningsmediene (tre av hver) som det grovfiltrerte vannet, ekskludert *Brilliance*™ STAPH24. Bakteriekolonier fra inkuberte finfiltre ble rendyrket på tilsvarende måte, inkludert *Brilliance*™ STAPH24. Etter rendyrking ble de resistente bakteriekoloniene overført til «brain heart infusion»-buljong med en podenål og inkubert ved 37°C i et døgn for å øke konsentrasjonen av bakterier. På denne måten kan DNA-isoleringen bli enklere å gjennomføre og bidra til å gi et større utbytte.

I tillegg til vannprøvene ble også *mecC* MRSA og *Bacillus* spp. undersøkt på *Brilliance*™ MRSA2 Agar (ikke tatt med i oppgaven). Jordprøver innhentet høsten 2017 inneholdt angivelig *mecC* MRSA basert på Sanger-sekvensering (masteroppgaven til Lillebakk). Det var vekst på den selektive skålen, hvor *Bacillus* spp. skal ha levd i symbiose med og beskyttet MRSA ved å lage en biofilm rundt bakterien. Videre analyser i mikroskop (Leitz, Dialux 22) viste derimot at det bare var *Bacillus* spp. med sporer på skålen. Det er uvisst hva som hendte med *mecC* MRSA.

3.4 Isolering og ekstrahering av DNA

Ved vekst på de selektive skålene etter rendyrking, ble kolonier plukket ut for DNA-isolasjon. For å isolere DNA ble det brukt et kit som heter GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Produsentens protokoll «Technical Bulletin» for G⁺ bakterier ble fulgt under rensingen, bortsett fra ved tilsetting av Elution buffer på siste trinn. Da ble SequalPrep™ Normalization Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) brukt istedenfor. Dette skyldes at den ikke inneholder EDTA som kan hemme sekvenseringen. Pelleten ble samlet opp etter sentrifugering av de rendyrkede vannprøvene etter rensing.

3.5 Indikering av resistensgener med PCR

Fra de tre filtrerte vannprøvene, ble det positiv vekst på 15 selektive kromogene skåler etter rendyrking. Fra disse mediene ble DNA isolert og amplifisert ved bruk av multipleks og singelpleks PCR. Fremgangsmåte for tillaging av reaksjonsmiksen ble gjennomført ved å følge produsentens anvisninger hentet fra «QIAGEN Multiplex PCR Kit» (Qiagen). I denne oppgaven ble multipleksene ESBL 1-4, CAR 1 og 2, og MRSA brukt ved multipleks PCR med DNA-templatene. Disse miksene ble brukt for å henholdsvis undersøke om det var ESBL-, karbapenemase- og MRSA-genotyper i prøvene. Singelpleksene ble håndtert enkeltvis, med en F- og en R-primer (Thermo Fisher Scientific Inc.). En oversikt over primerparene og primersekvensene i multipleksene er vist i vedlegg C, tabell C1, C2 og C3. Primersekvensene er også de samme for singelpleksene som ble benyttet. Multipleks- og singelpleksløsningene ble oppbevart i fryseren (- 20 °C), og ble tint på is og vortexet før bruk. Tabell 1 viser en oversikt over reaksjonsoppsettet for PCR.

Tabell 1. Reaksjonsoppsett for multipleks og singelpleks PCR.

Bestanddeler	Volum (μ l) per reaksjon	
	CAR- og ESBL- multipleks	MRSA-multipleks
Reaksjonsmiks:		
- 2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12.5	12.5
- 10 x primer mix (2 μ M av hver primer)	2.5 ¹	4.0
- RNase-fritt vann	9.0	6.5
DNA-templat	1.0	2.0
Totalt	25.0	25.0

¹1.25 μ l for singelpleks primer F og R

De ulike løsningsene i tabell 1 ble pipettert over i hvert sitt PCR-rør, vortexet og sentrifugert. DNA-templatet ble tilsatt til slutt. Totalt skulle det være 25 μ l i blandingen. Før bruk av singelpleksene måtte de fortynnes, da løsningsene inneholdt 100 μ M, og det var ønskelig med 2 μ M i denne oppgaven.

For å amplifisere utvalgte områder på ekstrahert DNA-templat fra vann- og jordprøver ble multipleks PCR benyttet. Basert på hvilke prøver som var positive etter rendyrking, ble primere plukket ut til singelpleks PCR. Hver multipleksprimermiks bestod av tre-fire primerpar, hvorav hvert par hadde to primere som kunne avlese hver sin adskilte enkeltråd med DNA. PCR ble gjennomført i maskinen SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc.). Tabell 2, 3 og 4 viser temperaturprofilene som ble brukt for de ulike multipleks og singelpleks PCR-reaksjonene.

Tabell 2. Temperaturprotokoll 1 brukt under PCR for DNA-templat kjørt med CAR-multipleks og tilhørende singelpleks-primere.

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser
1. Aktivering av DNA polymerase	15:00	95.0	1 x
2. Denaturering	00:30	94.0	30 x
Hybridisering	01:30	60.0	
Polymerisering	01:30	72.0	
3. Endelig polymerisering	10:00	72.0	1 x
Avkjøling	∞	4.0	

Tabell 3. Temperaturprotokoll 2 PCR-program brukt for DNA-templat kjørt med ESBL-multipleks og tilhørende singelpleks-primere.

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser
1. Aktivering av DNA polymerase	15:00	95.0	1 x
2. Denaturering	00:30	94.0	28 x
Hybridisering	01:30	62.0	
Polymerisering	01:30	72.0	
3. Endelig polymerisering	10:00	72.0	1 x
Avkjøling	∞	4.0	

Tabell 4. Temperaturprotokoll 3 PCR-program brukt for DNA-templat kjørt med MRSA-multipleks og tilhørende singelpleks-primere.

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser
1. Aktivering av DNA polymerase	05:00	94.0	1 x
2. Denaturering	00:30	94.0	30 x
Hybridisering	01:00	59.0	
Polymerisering	01:00	72.0	
3. Endelig polymerisering	10:00	72.0	1 x
Avkjøling	∞	4.0	

3.6 Separering av DNA med agarosegelelektroforese

For å skille og kartlegge hvilke amplifiserte DNA-segmenter fra PCR som var tilstede, ble det gjennomført en gelelektroforese med agarosegel. For visualisering av ESBL-gener på gel ble 1 % brukt, mens 2 % ble brukt for MRSA, fordi PCR-produktet for MRSA er mindre. I dette kapittelet har 1 % agarosegel blitt beskrevet. Gelen ble satt sammen av et agarosepulver, en buffer og et fluoriserende fargestoff. Før tillaging av agarosegel ble TAE-buffere tillaget. MilliQ-vann og 50 x konsentrert TAE buffer (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) ble blandet for å lage en 1 x TAE buffer. En målesylinder (2000 ml) ble tilsatt 40 ml 50 x konsentrert TAE buffer, og fortynnet med 1940 ml av-ionisert vann fra MilliQ. Videre ble det veid opp 0,5 g agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza Rockland, USA) som ble løst i 50 ml 1 x TAE buffer. Løsningen ble varmet opp i mikrobølgeovn på max Watt i 30 sekunder og 600 Watt i 30 sekunder. Etter oppvarming ble agaroseløsningen avkjølt ved romtemperatur. Da løsningen var kjølt ned, ble 2,5 µl GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) eller GelGreen™ Nucleic Acid Stain tilsatt og blandet. Videre ble løsningen helt over i en vatret gelstøpeform med en brønnkam. Etter at gelen var ferdig størknet, ble den lagt over i et gelelektroforesekar fylt med 1 x TAE-buffer opp til max-merket.

Hvert PCR-produkt (5 µl) ble mikset med 3 µl Agarose Gel Loading Dye 6 x (Amresco®, Solon, Ohio, USA) og 2 µl dH₂O før applisering. Ved applisering ble 10 µl

av blandingen overført til hver sin brønn i gelen. I tillegg til produktene fra PCR ble det påsatt 10 µl «ladder», eller en såkalt «størrelsesmarkør» på gelen. I denne oppgaven ble Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, USA) benyttet. Til slutt ble elektroforesen kjørt ved rundt 100 V i 1-1,5 t ved å koble elektrodene fra karet til en Bio-Rad PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). For å fotografere ferdigkjørt gel ble gelen lagt under UV-lys i en Molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging system (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA), og bruke programmet Quantity One v.4.6.7 (Molecular Imager®, Bio-rad Laboratories Inc.). Ferdig gelbilde indikerte gentyper tilstede.

3.7 Kvantifisering og renhetsmåling av DNA

Spektrofotometeret NanoDrop 2000 (Thermo Fisher scientific Inc.) og programvaren NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher scientific Inc.) ble brukt for å avlese og håndtere absorbansinformasjon om rensed DNA. For å kalibrere spektrofotometeret ble først 2 µl destillert vann plassert over den optiske linsen. Deretter ble alle de isolerte DNA-prøvene avlest på 260 nm og 280 nm med samme volum på samme optiske linse. Etter avlesing av resultater, og før applisering av ny prøve, måtte rester tørkes bort med tørkepapir.

Kvantifisering av rensed DNA ble utført ved hjelp av fluorometeret Qubit® 2.0 (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.), som detekterer veldig lave konsentrasjoner av DNA, RNA og proteiner. Antall prøver som skulle kvantifiseres representerte bokstaven «n». For å lage en Qubit arbeidsløsning ble 1 * n µl Qubit® dsDNA broad range (BR) Reagent (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) mikset med 199 * n µl Qubit® dsDNA BR Buffer (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.). Deretter ble 2 µl av de rensede prøvene blandet med 198 µl av arbeidsløsningen, mens de to standardløsningene ble laget ved å blande Qubit® dsDNA BR Standard #1 og Qubit® dsDNA BR Standard #2 med 190 µl arbeidsløsning.

3.8 Forberedelse til Sanger-sekvensering (16S og ARG)

DNA-templatene isolert fra vannprøvekoloniene oppdyrket på selektive skåler, ble amplifisert med PCR før de ble sendt til Sanger-sekvensering. Primere som ble brukt for å finne bakteriestammen var 16S rRNA primerne 1F og 5R, mens primere komplimentære til enkelte resistensgener (singelpleks) ble brukt ut ifra hvilke positive gelbånd som oppstod etter kjøring med multipleks PCR. Amplifisering av 16S rRNA og gelelektroforese ble også gjennomført for å se om det var nok DNA i prøvene til Sanger-sekvenseringen. Prøvene som viste bånd på riktig sted på gel ble brukt videre. Et annet kriterium som måtte oppfylles for å kunne sende prøvene til Sanger, var at ved kvantifisering etter PCR-kjøring måtte konsentrasjonen ligge mellom 20 og 80 ng/μl. Da ble 5 μl prøve og 5 μl 16S rRNA primere (2,5 μl av F og R) mikset i et eppendorfrør, før de ble sendt til Sanger-sekvensering (GATC Biotech AG, Köln, Tyskland). Disse prøvene ble sendt for å identifisere bakteriestammer i prøvene. Hvis resistensgenene skulle identifiseres ved Sanger-sekvensering ble bare en singelpleks-primer («forward») tilsatt siden genene er relativt små (<800 bp). Sekvensen til 16S rRNA genet anses derimot for å være relativt stor, derfor brukes både F- og R-primer.

Reaksjonsoppsettet og temperaturprofilen som ble fulgt ved amplifisering av 16S rRNA ble hentet fra «iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase» (Bio-rad Laboratories Inc). Tabell 5 viser hvilket primerpar som ble brukt ved 16S rRNA amplifisering. Komponentenes volum og konsentrasjoner står oppført i tabell 6. Mens temperaturprotokoll for 16S rRNA, gjennomført i en SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher scientific Inc.), vises i tabell 7. Produktene ble sendt til firmaet GATC Biotech AG for Sanger-sekvensering.

Tabell 5. Primere brukt ved 16S rRNA amplifisering og før innsending til Sanger-sekvensering.

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

Tabell 6. Amplifisering av 16S rRNA genet fra vannprøver ved PCR.

Reagent	Start-konsentrasjon	Slutt-konsentrasjon	Volum (μ l) per reaksjon
Iproof HF buffer	5 x	1 x	8.0
dNTP	10 mM	200 μ M	0.8
Primer 1F	5 μ M	0.25 μ M	2.0
Primer 5R	5 μ M	0.25 μ M	2.0
Sterilt H ₂ O	-	-	24.8
Iproof DNA polymerase	2 U/ μ l	0.02 U/ μ l	0.4
DNA-templat	5-100 ng/ μ l	7.5-150 ng	2.0
Totalt			40.0

Tabell 7. Temperaturprotokoll 4 for 16S rRNA amplifisering av DNA-templat før 16S-sekvensering.

Trinn	Tid (min)	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Antall sykluser
1. Aktivering av DNA polymerase	00:30	98.0	1 x
2. Denaturering	00:15	98.0	35 x
Hybridisering	00:30	53.0	
Polymerisering	00:20	72.0	
3. Endelig polymerisering	10:00	72.0	1 x
Avkjøling	∞	4.0	

For å fjerne primere etter PCR-kjøring av 16S rRNA og ARG, ble DNA rensset. Kittet som ble brukt heter GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich), og produsentens anvisninger i protokollen ble fulgt. Før innsending til Tyskland for Sanger-sekvensering ble 16S rRNA 1F og 5R primerne blandet separat i hvert sitt eppendorfrør med amplifisert DNA-templat. Det skulle være 5 μ l PCR-produkt og 5 μ l primer. For

resistensgenene ble det kun brukt F primer (samme som ved PCR-kjøring), grunnet kortere basesekvens. De ble også fortynnet fra 100 til 2 μ M. Samme volum som 16S rRNA ble imidlertid benyttet, bortsett fra hvis konsentrasjonen av amplifisert DNA-templat var <7 ng/ μ l. Da skulle 7 μ l PCR-produkt og 3 μ l primer tilsettes. Til slutt ble ID-lapper klistret på sine respektive eppendorfrør.

3.9 Data-analysering

For å analysere resultater fra Sanger-sekvensering (16S rRNA og ARG) ble programmet Nucleotide Basic Logical Alignment Search Tool (nBLAST) fra nettsidene til National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI) benyttet (NCBI, u.å.). Før blast ble DNA-sekvensene redigert og satt sammen til en sekvens ved hjelp av redigeringsprogrammet BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA). Her ble dårlige sekvensområder fjernet, før de deretter ble satt sammen ved hjelp av «contig assembly program» til en contig-O sekvens som lages i Fastaformat og BLASTER. Programmet ble brukt for å kartlegge sekvenslikheter mellom regioner av baser på innsendte vannprøver og sekvenser i databasen til BLAST. Dette inkluderte både resistensgenene og 16S rRNA.

3.10 Forberedelse til helgenomsekvensering (MinION)


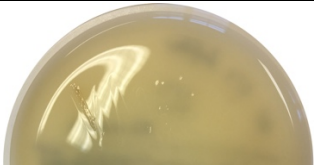


For å detektere gener som koder for ESBL og bakterier som produserer ESBL, skulle DNA helgenomsekvenseres ved bruk av et lite, mobilt instrument kalt MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). De 6 PCR-produktene som også ble sendt til Sanger-sekvensering (16S rRNA og ARG) skulle også bli nanopore-sekvensert med instrumentet. En protokoll for forberedelse av helgenomsekvensering, bestående av Rapid Barcoding Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies) skulle bli gjennomført av stipendiat Misti Dawn Finton og professor Bjørn-Arne Lindstedt som er ansatt ved KBM, NMBU.




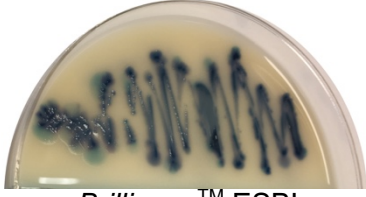


4.0 Resultater



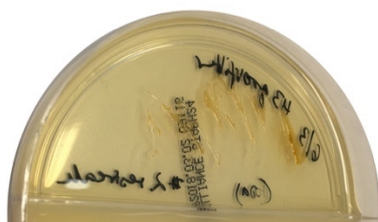
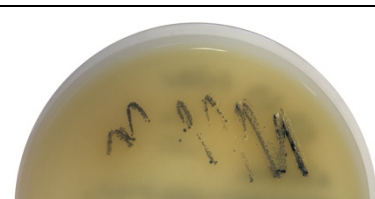
4.1 Fenotypisk påvisning av resistente bakterier

For å undersøke de fenotypiske egenskapene til resistensbakteriene i denne oppgaven, ble det gjennomført en fargescreening av selektive kromogene skåler. Innhentede vannprøver ble først fin- og grovfiltrert, for deretter å bli overført til *Brilliance*TM ESBL, *Brilliance*TM MRSA2, og *Brilliance*TM CRE agarskåler. Blå, beige og rosa kolonier ble så overført til tilsvarende medier, samt *Brilliance*TM STAPH24, etter inkubering og rendyrket. Eksempler på hvordan to av de finfiltrerte skålene så ut med vekst er vist i vedlegg B, figur B1. Tabell 8 viser en oversikt over petriskåler med rendyrkede kolonier fra de filtrerte vannprøvene (H1, H2 og H3).

Tabell 8. Resultater fra rendyrking av vannprøver på selektive skåler.

Vannprøver	Selektive kromogene skåler	Fargereaksjon	Antagelser
H1 ² (prøve 3)	 <i>Brilliance</i> TM CRE	Blå	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> og <i>Citrobacter</i> (KESC) (CRE-positiv)
H1 ³ (prøve 15)	 <i>Brilliance</i> TM MRSA2	Lyserosa	Usikker
H2 ² (prøve 2)	 <i>Brilliance</i> TM ESBL	Mørkeblå	<i>E. coli</i>
H2 ² (prøve 4)	 <i>Brilliance</i> TM CRE	Rosa	<i>E. coli</i> (CRE-positiv)

H2² (prøve 5)	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Beige/blek brun	<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>
H2² (prøve 8)	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Grønn	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia og Citrobacter (KESC)</i>
H2² (prøve 9)	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Rosa	<i>E. coli</i> (CRE positiv)
H2² (prøve 11)	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Mørkeblå	<i>E. coli</i>
H2² (prøve 12)	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Rosa	<i>E. coli</i> (CRE-positiv)
H3² (prøve 1)	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Beige/blek brun	<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>

H3³ (prøve 6)	 <i>Brilliance™ STAPH24</i>	Hvit/beige	Usikker
H3² (prøve 7)	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Mørkeblå	<i>E. coli</i>
H3² (prøve 10)	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Lysegul	<i>Pseudomonas</i>
H3³ (prøve 13)	 <i>Brilliance™ STAPH24</i>	Lysebrun	Usikker
H3² (prøve 14)	 <i>Brilliance™ MRSA2</i>	Denimblå	MRSA

² Fra finfilter, ³ Fra grovfilter

Fargescreening av selektive skåler viste varierte resultater, både mellom og innad i prøvene (tabell 8). Blå, rosa og gule kolonier vokste frem på fem *Brilliance™* CRE Agar. På seks *Brilliance™* ESBL skåler ble det observert lysebrune, mørkeblå, og grønne kolonier. På *Brilliance™* MRSA2 mediene var det denimblå kolonier. Lysebrune og hvite bakterier vokste på *Brilliance™* STAPH24 Agar. Basert på kolonifargene ble det notert antagelser om hvilke bakterier som vokste på skålene.

4.2 Genotypisk påvisning av resistensgener

4.2.1 Konsentrasjon og absorbans til isolert DNA

Kvantifisering og renhetsmåling av isolert DNA fra rendyrkede vannprøver ble gjennomført og vist i tabell 9.

Tabell 9. Konsentrasjon og absorbans til isolert DNA fra rendyrkede vannprøver.

Prøvenr.	Konsentrasjon (ng/ μ l)	A _{260/280}	A _{260/230}
1	83.8	1.88	1.74
2	150.0	1.84	1.87
3	1.7	1.63	0.14
4	57.4	1.80	1.48
5	207.0	1.87	1.94
6	34.4	1.37	0.56
7	141.0	1.85	2.04
8	161.0	1.85	1.80
9	111.0	1.86	1.94
10	134.0	1.90	1.95
11	102.0	1.84	1.79
12	99.4	1.86	1.87
13	2.8	1.45	0.19
14	70.5	1.84	1.55
15	18.2	1.83	1.48

Blant de ekstraherte rendyrkede DNA prøvene varierte konsentrasjonene mellom 1,7 og 207 ng/ μ l (tabell 14). Ved høy konsentrasjon ble prøvevolumet redusert før PCR-kjøring. Tilsvarende justeringer ble også gjennomført med prøver som hadde for lave konsentrasjoner av DNA, men da ble volumet doblet. Konsentrasjonen til PCR-produktene etter rensing ble også målt med fluorometer før de ble sendt til Sanger-sekvensering. Dette var for å forsikre at konsentrasjonene var høye nok. Forholdet A₂₆₀/A₂₈₀ skulle helst ligge på ca. 1,8. Her var resultatene relativt fine, utenom tre som var litt lave. Renheten skulle derfor være god nok for videre analyser. Videre skulle ratioen A₂₆₀/A₂₃₀ være mellom 2 og 2,2. Her lå nesten alle nivåene <2, som kan tyde på saltforurensning. Det ble fokusert på førstnevnte ratio i denne studien.

4.2.2 Påvisning av resistensgener med PCR og gelelektroforese

4.2.2.1 Karbapenemase-genotyper i vannprøver

For å finne ut om det var karbapenemase-genotyper i prøvene 1-12, ekskludert prøve 6, ble multipleks CAR1 og CAR2 brukt. En oversikt over primerne i de ulike multipleksene er vist i vedlegg C, tabell C1. De utvalgte prøvene ble plukket ut, da de viste vekst på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE Agar etter rendyrking. Multipleks- og singelpleks PCR ble utført og resultatene fra amplifisering er vist i tabell 10. Bilder fra agarosegelelektroforese vises i vedlegg D, figur D1 og D2. At PCR-produktene var positive vil si at enzymene mest sannsynlig var tilstede i prøvene.

Tabell 10. Amplifisering og elektroforese for å finne karbapenemaser i vannprøver.

Multipleks	CAR1				CAR2		
	CMY-2	OXA-48	IMP	VIM	NDM	SFC	KPC
Primere							
Antall prøver	11	11	11	11	11	11	11
Positive prøver	5	0	0	0	0	0	0

PCR-produkter fra multipleks CAR1 gav noen positive bånd (tabell 10, figur D1). Multipleks CAR2 viste derimot bare negative resultater. De svake båndene på gelbildet i figur D1 indikerte en mulig tilstedeværelse av genet *bla*_{CMY} (188 bp) eller/og *bla*_{OXA-48} (281 bp) i prøve 2, 7, 9, 11, og 12. Svake bånd på PCR-produktet til singelpleks påviste *bla*_{CMY} i alle tilsvarende rensede prøver (figur D2).

4.2.2.2 ESBL-genotyper i vannprøver

Ved detektering av ESBL-genotyper i prøvene 1-12, ekskludert prøve 6, ble multipleksene M1-M3 brukt. Disse prøvene ble valgt, da de viste vekst på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE Agar etter rendyrking. Innholdet til de ulike multipleksene er vist i vedlegg C, tabell C2. Multipleks og singelpleks PCR utført og resultatene fra amplifisering er vist i tabell 11. Bilder fra agarosegelelektroforese er vist i vedlegg D, figur D3 og D4. At PCR-produktene var positive vil si at enzymene mest sannsynlig var tilstede i prøvene.

Tabell 11. Resultater fra amplifisering og elektroforese for detektering av ESBL i vannprøver.

Multipleks	ESBL 1 (M1)				ESBL 2 (M2)			ESBL 3 (M3)		
	Oxa 48	CTX Gp2	TSOO	TSOS	CTX Gp9	CTX Gp1	TSOT	NDM	VIM	KPC
Antall prøver	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Positive prøver	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0

PCR-produkter fra multipleks ESBL1 og ESBL3 viste ingen positive bånd (tabell 11, figur D3). De rensede og amplifiserte prøvene 2 og 7-12 viste derimot positive resultater på gelbildet for multipleks ESBL2 i figur D3. Seks sterke bånd indikerte at det var en tilstedeværelse av genet *bla*_{CTX-M} (gr. 1) (688 bp) eller/og *bla*_{TEM} (800 bp) i prøve 2, 7, 9, 11, og 12. Vedlagt figur D4 viser tydelige bånd rundt 800 bp for alle PCR-produktene til singelpleksene. Prøve 2, 8, og 11 viste tydelige bånd rundt 688 bp som indikerer en tilstedeværelse av *bla*_{CTX-M} (gr. 1), mens PCR-produktene 2, 7, 8, 9, 11, og 12, viste bånd rundt 800 bp, som indikerer tilstedeværelse av *bla*_{TEM}.

4.2.2.3 MRSA-genotype i vannprøver

For å undersøke om prøve 13-15, inkludert prøve 6, inneholdt gener som kodet for MRSA, ble multiplexen for MRSA brukt. Primerparene og primeresekvensene i multiplexen vises i vedlegg C, tabell C3. Prøve 13-15, samt 6, ble plukket ut siden de vokste på *Brilliance*TM MRSA2 og *Brilliance*TM STAPH24 Agar etter rendyrking. Multiplex PCR ble utført og resultatene fra PCR er vist i tabell 12. Bilder fra agarosegelelektroforese er vist i vedlegg D, figur D5. At PCR-produktene var positive vil si at enzymene mest sannsynlig var tilstede i prøvene.

Tabell 12. Resultater fra PCR og gelelektroforese for detektering av MRSA fra prøver.

Multipleks	MRSA			
	<i>spa</i>	<i>mecA</i>	<i>pvl</i>	<i>mecA</i> _{LGA251} (<i>mecC</i>)
Antall prøver	4	4	4	4
Positive prøver	0	0	0	0

Utfallet av gelelektroforesen viste at alle PCR-produktene fra multiplex MRSA gav negative bånd på gel (tabell 12, figur D5). PCR med multiplex MRSA ble også utført med jordprøve M9, men resultatet var negativt (figur D5).

4.2.2.4 Karbapenemase-genotyper i jordprøver

Ved detektering av karbapenemasegener i prøve M18-M20 ble multipleksene CAR1 og CAR2 brukt. Oversikten over primerparene og primersekvensene i de ulike multipleksene er vist i vedlegg C, tabell C1. Multipleks PCR ble utført og resultater fra PCR-kjøring av de ovennevnte jordprøvene er vist i tabell 13. Bilder fra agarosegelelektroforese er vist i vedlegg D, figur D6.

Tabell 13. Resultater fra PCR og gelelektroforese for detektering av karbapenemase i jordprøver.

Multipleks	CAR1				CAR2		
	CMY2	OXA48	IMP	VIM	NDM	SFC	KPC
Antall prøver	3	3	3	3	3	3	3
Positive prøver	0	0	0	0	0	0	0

PCR-produktene applisert og kjørt på gel viste at det ikke ble påvist noen positive bånd (tabell 12, figur D6).

4.2.2.5 ESBL-genotyper i jordprøver

Ved detektering av ESBL-gener i prøvene M15-M17 ble multipleksene M1-M4 brukt. Oversikten over primerparene og primersekvensene i de ulike multipleksene er vist i vedlegg C, tabell C2. Multipleks og singelpleks PCR ble utført og resultater fra PCR-kjøring av de ovennevnte jordprøvene er vist i tabell 14. Bilder fra agarosegelelektroforese er vist i vedlegg D, figur D7, D8 og D9.

Tabell 14. Resultater fra PCR og gelelektroforese for detektering av ESBL i jordprøver.

Multipleks	ESBL 1 (M1)				ESBL 2 (M2)			ESBL 3 (M3)		
	Oxa48	CTX Gp2	TSOO	TSOS	CTX Gp9	CTX Gp1	TSOT	NDM	VIM	KPC
Antall prøver	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Positive	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

PCR-produktet til ESBL1 viste et sterkt bånd som tilsa at prøve M17 var positiv for *bla*_{CTX-M} (gr. 2) (404 bp), mens PCR-produktet til ESBL3 gav en indikator på at prøve M15 var positiv for *bla*_{NDM} (157 bp) (tabell 13, figur D7). Tilstedeværelsen av genene ble etterprøvd med singelpleks, og viste positive resultater (figur D8 og D9). Det var ingen positive bånd for PCR-produktene til ESBL2.

4.2.3 Sanger-sekvensering av bakteriestammer (16S rRNA) og ARG

4.2.3.1 Påvisning av resistensgener fra rendyrkede vannprøver

Det ble påvist positive bånd med multipleks PCR kun i ESBL2 og CAR1 i prøvene 2 og 7-12, som videre ble bekreftet med singelpleks PCR til å være *bla_{CMY}*, *bla_{CTX-M}* (gr. 1), og *bla_{TEM}* (tabell 10 og 11). Positive PCR-resultater ble bekreftet med Sanger-metoden, hvorpå genotypen for CTX-M (gr. 1) viste seg å være CTX-M-15. Resultatene vises i tabell 15.

4.2.3.2 Påvisning av resistensgener fra rendyrkede jordprøver

Ved analysing av ekstraherte jordprøver kjørt med singelpleks PCR, ble *bla_{CTX-M}* (gr. 2) og *bla_{NDM}* påvist (tabell 14). Videre analyser med Sanger-sekvensering viste derimot at CTX-M (gr. 2) og NDM primerne bant seg til andre gener på omtrent samme sted med nesten samme lengde. Feilbinding av primeren CTX-M (gr.2) står vedlagt i figur D1. De to grønne partiene øverst i vedlegg E1 viser hvilke baser som representerer primeren CTX-M (gr. 2), F og R. Markerte partier på sekvensen til *Pseudomonas rhodesiae* sitt kromosom viser det som skal være PCR-produktet. Sekvensene primerne koblet seg på var nesten komplimentære med primerne, men ikke fullstendig. Rosa partier viser avvik. Artefaktene i figuren var såkalte falske positive, og relativt lik sekvensen og lengden til genet som CTX-M (gr. 2) primeren skulle binde seg til. Figur E2 viser ønsket gensekvens: *E. coli* betalaktamase CTX-M (gr. 2). Sekvenslengden i vedlegg E, figur E1, viser 407 bp PCR-produkt (artefakt), mens lengden i figur E2 viser 404 bp (CTX-M gr. 2). Resultatene vises i tabell 16.

4.2.3.3 Sanger-sekvensering (16S rRNA) av bakteriestammer

DNA-templater isolert fra de rendyrkede vannprøvene 2 og 7-12 ble amplifisert med 16S rRNA primer, rensset og sendt til GATC Biotech AG i Tyskland for Sanger-sekvensering. Sekvensering av jordprøvene M15-M20 med 16S rRNA var gjennomført på forhånd av stipendiat Misti Dawn Finton. Resultatene av bakterieidentitet og resistensgener for vannprøver vises i tabell 15 og for jordprøver i tabell 16.

Tabell 15. Bakterieidentitet og resistensgener etter Sanger-sekvensering av vannprøver

Prøve	Bakterieidentitet (Sanger) i nBLAST	Prosent (%) i nBLAST	Resistensgener (Sanger) i nBLAST	Prosent (%) i nBLAST
1	-	-	-	-
2	<i>E. coli</i>	99	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY}	99 99
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	<i>E. coli</i> eller <i>Shigella</i> spp.	99 99	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY}	99 100
8	For lav konsentrasjon	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	100 99
9	<i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> eller <i>S. flexneri</i>	99 99 99	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY}	99 99
10	-	-	-	-
11	<i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>S. sonnei</i> eller <i>S. flexneri</i>	99 99 99 99	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY}	99 99 98
12	<i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> eller <i>S. flexneri</i>	99 99 99	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY}	99 100
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-

Tabell 15 viser at bakterieidentiteten (16S rRNA) og identiteten til resistensgenene var nesten 100 % for alle sekvenserte PCR-produkter. For 16S rRNA var antall bp over 1000 i nesten alle prøvene, og det var mest sannsynlig nok bp for resistensgenene. Resultatene til bakterieidentitet og resistensgener for jordprøver vises i tabell 16.

Tabell 16. Bakteriestammer og resistensgener i rensset og isolert DNA fra jordprøvene M15-M20.

Prøve	Bakterieidentitet (Sanger)	Resistensgener (PCR og gel)
M15	Ingen resultater	NDM
M16	<i>Pseudomonas</i> spp.	-
M17	<i>Streptomyces</i> spp.	CTX-M gr. 2
M18	Ingen resultater	-
M19	Ingen resultater	-
M20	Ingen resultater	-

4.2.4 Tredjegerasjons-sekvensering med MinION

Selskapet Oxford Nanopore Technologies klarte beklageligvis ikke å levere Rapid Barcoding Sequencing kitet (Oxford Nanopore Technologies) i tide, det vil si før innlevering av denne masteroppgaven. Derfor ble ikke helgenomsekvenseringen gjennomført i denne studien.

4.2.5 Oppsummering av resultatene

En oversikt over alle resultatene fra de ulike benyttede metodene i denne studien, gjennomført med rendyrkede prøver fra selektive medier, står oppført i tabell 17 og 18.

Tabell 17. Fenotypisk påvisning på selektive kromogene skåler og genotypisk påvisning av isolert DNA fra jordprøvene M15-M20.

Prøve	Bakterieidentitet (Sanger)	Påvist resistensgen (PCR og gel)	Påvist resistensgen (Sanger)	Positiv vekst på skåler
M15	Ingen resultater	NDM	Ikke påvist	ESBL
M16	<i>Pseudomonas</i> spp.	Negativ	-	
M17	<i>Streptomyces</i> spp.	CTX-M gr. 2	Ikke påvist	
M18	Ingen resultater	Negativ	-	Karbapenemase
M19	Ingen resultater	Negativ	-	
M20	Ingen resultater	Negativ	-	

Tabell 18. Fenotypisk påvisning på selektive kromogene skåler, og genotypisk påvisning av isolert DNA fra vannprøve 1-15. PCR-produkter fra prøver notert i lysegrå rader viste bånd på gel, og positive resultater ved Sanger-sekvensering.

Prøve	Vann-prøver	Bakterie-identitet (16S rRNA) (Sanger)	Påviste ESBL _{A/M} - gener (PCR og gel)	Påviste ESBL _{A/M} - gener (Sanger)	Positiv vekst på selektive kromogene skåler
1	H3	-	Negativ	-	ESBL
2	H2	<i>E. coli</i>	CMY, TEM	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{TEM}	ESBL
3	H1	-	Negativ	-	Karbapenemase
4	H2	-	Negativ	-	Karbapenemase
5	H2	-	Negativ	-	ESBL
6	-	-	Negativ	-	STAPH
7	H3	<i>E. coli</i> eller <i>Shigella spp.</i>	CMY, TEM	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{TEM}	ESBL
8	H2	-	CTX-M gr. 1, TEM	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	ESBL
9	H2	<i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> eller <i>S. flexneri</i>	CMY, TEM	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{TEM}	Karbapenemase
10	H3	-	Negativ	-	Karbapenemase
11	H2	<i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>S. sonnei</i> eller <i>S. flexneri</i>	CTX-M gr. 1, CMY, TEM	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{TEM}	ESBL
12	H2	<i>E. coli</i> . <i>E. fergusonii</i> eller <i>S. flexneri</i>	CMY, TEM	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{TEM}	Karbapenemase
13	-	-	Negativ	-	STAPH
14	H3	-	Negativ	-	MRSA
15	H1	-	Negativ	-	MRSA

5.0 Diskusjon

5.1 Resistenspåvisning med fenotypisk metode

Selektive kromogene medier brukt i denne studien ble valgt på bakgrunn av helsefarene klinisk signifikante ESBL_{A/M} - og ESBL_{KARBA} - produserende G⁻ bakterier fra *Enterobacteriaceae* utgjør for mennesker (Brolund, 2014). Etter rendyrking ble det totalt isolert 15 prøver fra vannprøvene, hvorav fem prøver viste positiv vekst på *Brilliance*TM CRE Agar, og 6 prøver vokste på *Brilliance*TM ESBL Agar. Resultatene tilsier at vannprøvene inneholdt G⁻ bakterier som produserer ESBL_{A/M} og ESBL_{KARBA}. Fenotypiske funn gir derimot ikke svar på hvilke gener som eksisterer i bakteriene, kun egenskapene de uttrykker (Lindstedt, 2018). Funnene avkrefter ikke hvorvidt bakteriene i prøvene også brukte andre resistensmekanismer enn betalaktamaser mot betalaktamer. Det er vanlig at G⁻ bakterier som *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* og *Acinetobacter* spp. i tillegg til å produsere betalaktamaser, kan bruke efflukspumper og poriner som endrer membranpermeabiliteten for å uttrykke fenotypisk resistens mot betalaktamer (Iredell et al., 2016; Khan et al., 2017). Identiteten til de fleste bakteriene som vokste på alle de fem skålene med karbapenemer var CRE-positive, ikke non-CRE-positive, basert på antagelser. Non-CRE positive bakterier, som *Acinetobacter* og *Pseudomonas*, kan ha benyttet seg av tidligere nevnte resistensmekanismer. Positiv vekst av KRE på et dyrkningsmedium er ikke nødvendigvis synonymt med KPE, da KRE er bakterier som ikke er mottakelige for den laveste konsentrasjonen av karbapenemer som trengs for å hemme bakterien.

Mediene *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE er hovedsakelig ment for analysering av kliniske prøver med *Enterobacteriaceae* (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a; Thermo Fisher Scientific Inc, 2011). Derfor var det usikkert hvordan utfallet ville bli ved inkubering av prøver fra miljøet på de selektive skålene. Bakterier som oftest lever under mer ustabile og utfordrende forhold i akvatiske miljøer og jord, som *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp., har måttet tilpasse seg en tilstedeværelse av toksiske forbindelser og krevende vekstvilkår (Iredell et al., 2016). Medlemmer av *Enterobacteriaceae* lever imidlertid oftest under beskyttede forhold i tarmkanalen til dyr og mennesker. Konsekvensene av dette er at de har en mer permeabel membran og færre efflukspumper enn andre G⁻ bakterier som tåler mer utfordrende miljøer. Miljøbakteriene er derved mindre mottakelige for giftstoffer og mer robuste. Grunnet

tilpassede egenskaper kan de fortsatt vokse på benyttede medier som i utgangspunktet er ment for bakterier fra *Enterobacteriaceae* (Lindstedt, 2018). Dette kan bidra til å gi misvisende resultater.

For å kunne gi korrekt behandling til pasienter, er det meget viktig å være sikker på at diagnosen er riktig. Uriktig identifisering av ARB kan føre til feilbehandling, som videre kan få bakterier til å produsere nye resistensgener grunnet et selektivt press. Tilsvarende konklusjon er også høyst viktig å komme frem til innenfor forskningsverdenen. Resultater fra fargescreening er ikke gode nok bevis for å kunne bestemme hvilke bakterier som gav positiv vekst på selektive medier. Dette bekreftet behovet for bruk av ytterligere metoder, som PCR og Sanger-sekvensering. Disse metodene kan definere hvilke genotypiske trekk bakteriene har med hensyn til produksjon av ESBL_A og ESBL_{KARBA}, samt støtte opp under fenotypiske funn.

Basert på antagelsene om hvilke bakterier som vokste på selektive skåler etter rendyrking, skulle de seks prøvene som ble sendt til Sanger-sekvensering (16S rRNA og resistensgener) inneholde resistente *E. coli*. Resultatene fra de PCR-produktene som ble sendt til Sanger-sekvensering (16S rRNA) bekreftet disse antagelsene. Det å skulle ta en slutning kun basert på fargeanalyseringen av skålene var likevel ikke en god nok indikator. Dette kan ha vært en tilfeldighet, men det tyder på at skålene kan gi en indikasjon. Resultatet kan skyldes at enkelte bakterier har hatt MR egenskaper. Vekst på CRE-skåler kan bety at isolatet hadde en virksam karbapenemase eller at den fenotypiske resistensen skyldes andre faktorer som endringer i celleveggen eller mutasjoner i gener som koder for poriner koblet til et *bla*_{CMY-2} (Lindstedt, 2018). Slike egenskaper kan også forklare veksten av bakterier på skålen som selekterer for MRSA, da denne resistensbakterien ikke ble påvist ved PCR og gelelektroforese.

Graden av positiv vekst på de inkuberte filtrere og rendyrkede bakteriekolonier på selektive skåler i denne studien er foruroligende og påfallende. Innhentede vannprøver ble filtrert for å unngå en opphoping av smuss og urenheter, samt en reduksjon av bakterietettheten, som kunne forstyrre resultatene. Dette er viktig for å gi gode resultater ved rendyrking på selektive skåler og best mulig resultater fra isolering av DNA-templatet. Gjennom hvert finfilter ble kun 100 ml av vannprøvene filtrert. Med tanke på hvor lite volum som ble filtrert, og hvor fint filter som ble brukt, var bakterietettheten høy. Det viktigste funnet ved fenotypisk vekst var derimot det faktum at bakteriene vokste på skåler med bredspektrede betalaktamer. Funnet kan vise at *bla* ikke kun eksisterer i bakteriene, men at de også uttrykker resistens.

5.2 Resistenspåvisning med genotypisk metode

5.2.1 Påviste resistensgener

Primere ble valgt ut basert på hvilke klinisk relevante gener som koder for ESBL_{AM} og ESBL_{KARBA}, og som er viktige i *Enterobacteriaceae*. Ved hjelp av multipleks og singelpleks PCR, agarosegelelektroforese og Sanger-sekvensering (resistensgener) ble gener som koder for ESBL, inkludert karbapenemaser, i vann- og jordprøver undersøkt.

5.2.1.1 *bla*_{CMY}, *bla*_{CTX-M-15} og *bla*_{TEM} i vannprøver

Resultatene fra PCR og gelelektroforese påviste genfamiliene CTX-M gr.1 (ESBL_A) og TEM (ESBL_A), og CMY (ESBL_{M-C}) i vannprøver hentet inn fra Niagarabekken. Sanger-sekvensering av resistensgener kunne bekrefte disse funnene, og at genotypen til CTX-M gr.1 var CTX-M-15. Det er usikkert hvorvidt det var CMY-2 som ble påvist, men enzymet er en veldig vanlig pAmpC (Bajaj et al., 2016; Lindstedt, 2018). Detektert TEM er også mest sannsynlig en høyere variant enn TEM-1 og TEM-2, siden det bare er etterkommerne av disse som er ESBL. Det er vanskelig å si hvilket nummer de er, da de ulike TEM-typene er utfordrende å adskille grunnet like aminosyresekvenser.

Singelpleks PCR-produktene sendt til Sanger-sekvensering viste positive funn av CTX-M-15 i to av seks (30 %) prøver, CMY i fem av seks (83.3 %) og TEM i seks av seks (100 %). Funnene viste at det var høyest prevalens av TEM og lavest av CTX-M i prøvene, noe som ikke stemmer overens med den globale situasjonen i dag. Basert på studier er CTX-M den vanligste typen ESBL blant *Enterobacteriaceae*, hvorav CTX-M-15 og CTX-M-14 dominerer mest på verdensbasis (Bajaj et al., 2016; Bevan et al., 2017). Isolater av CTX-M har blitt funnet i samfunnet og på sykehus, og fra friske mennesker, produksjonsdyr, kjæledyr, mat og kloakk. Den kan derfor finnes overalt, inkludert vann. Dette kan skyldes at *bla*_{CTX-M} er koblet til svært MGE. Viktige betalaktamer på sykehusene er 3GC (som cefotaksim og ceftazidim) som CTX-M hydrolyserer (Iredell et al., 2016). Dette kan bidra til å forklare veksten på *Brilliance*TM ESBL mediet i denne studien. CTX-M-15 har økt aktivitet mot både cefotaksim og ceftazidim (3GC), i motsetning til de fleste CTX-M som hydrolyserer cefotaksim best (Bajaj et al., 2016).

Hvorvidt *E. coli* er resistent eller ikke har vanligvis sammenheng med genotypen (Bajaj et al., 2016; Pitout & DeVinney, 2017). En sterk humanpatogen variant av *E. coli* heter ekstraintestinal patogen *E. coli* (ExPEC). Den gir ikke gastrointestinal sykdom, i motsetning til andre vanlige patogener *E. coli*. I både U-land og I-land har den vært den hyppigste årsaken til urinveisinfeksjoner og sepsis (forårsaket av G⁻ bakterier). En klon av ExPEC som heter sekvenstype (ST) 131 er en genotype som står bak mesteparten av de årlige tilfellene med infeksjoner forårsaket av fluorokinolon- og cefalosporinresistens globalt. Resistens mot fluorokinoloner forekommer ofte sammen med resistens mot cefalosporiner. *Escherichia coli* ST131 er MR (inkludert karbapenemresistens) og det sies at plasmider med *bla*_{CTX-M-15} har vært sentral ved spredningen av bakterien. Positive prøver av CTX-M-15 i denne oppgaven kan derved stamme fra denne sekvensstypen. CTX-M-15 er en kraftig ESBL, og et alvorlig funn i denne oppgaven. Hvis CTX-M-15 da i tillegg finnes i *E. coli* ST131, kan det være større sannsynlighet for resistensspredning.

Ifølge Salverda et al. (2010) er den mest studerte betalaktamasen TEM. Forekomsten av TEM i alle de genotypiske positive isolatene kan tyde på at genet er godt egnet for molekylær screening av ESBL-positive prøver i denne studien (Bajpai et al., 2017). Etter oppdagelsen av TEM-1 har hele 185 TEM-enzymmer blitt oppdaget (Ojdana et al., 2014). TEM med bredspektret resistens kan hydrolysere penicilliner, 2GC, 3GC og 4GC, som kan forklare veksten på *Brilliance*TM ESBL mediene (Salverda et al., 2010). Enzymet eksisterer ofte med plasmidmedierte betalaktamaser som CTX-M, som kan forklare hvorfor de ble funnet i samme prøve i denne oppgaven. Selv om CTX-M har blitt et mer vanlig ESBL_A enzym enn TEM, er det imidlertid fortsatt en høy forekomst av TEM, og høy sannsynlighet for mislykkede pasientbehandlinger ved bruk av betalaktamer.

Genet som koder for CMY ble påvist i alle de amplifiserte og Sanger-sekvenserte DNA-templatene, utenom én. Den hadde derved nest høyest forekomst av de genotypiske positivt testede isolatene. CMY-2 er den vanligste pAmpC blant *E. coli*, som kan bygge opp under bakteriefunnet i denne oppgaven (Bajaj et al., 2016). Gener fra pAmpC er også ofte bærere av andre resistensgener som ikke er ESBL-kodede (Guo et al., 2014). Det har blitt vist at *E. coli* som produserer CMY-2 enkelt kan ta opp andre resistensgener som fører til MR og koseleksjon. Dette kan forklare positiv vekst etter rendyrking på *Brilliance*TM CRE. CMY er også resistent mot vanlige betalaktamase-inhibitorer, i motsetning til CTX-M og TEM (Lindstedt, 2018). AmpC

hemmes vanligvis ikke av vanlige betalaktamase-inhibitorer som klavulansyre og tazobaktam som TEM og CTX-M (Bajaj et al., 2016; Shaikh et al., 2015) Disse faktorene kan gjøre den til en fryktet og alvorlig betalaktamase.

Alle de detekterte enzymene i denne oppgaven ble funnet i bakterier fra familien *Enterobacteriaceae*. Dette samsvarer med forskningen som poengterer at enzymene er vanlige i *E. coli*, som er den hyppigst forekommende patogene bakterien i både sykehus, helsevesenet forøvrig, og infeksjoner i samfunnet (Bajaj et al., 2016; Guo et al., 2014). Årsaken kan være at betalaktamklassene penicillin og cefalosporin brukes utstrakt på *Escherichia* spp., og som CMY (cefamycinase), TEM (penicillinase) og CTX-M-15 (cefotaksimase) kan hydrolysere (Iredell et al., 2016). Det mest foruroligende ved resultatene i denne studien er det faktum at resistensgenene kan utveksles mellom bakterier fra *Enterobacteriaceae* ved HGO på MGE, som integroner og transposoner, på konjugative plasmider (Li & Nikaido, 2009). ESBL-kodede gener sitter også ofte ved siden av resistensgener som koder for andre antibiotika. Følgene av dette kan være koseleksjon og økt spredning av resistens. HGO innad i samme familie, som *Enterobacteriaceae*, er vanligere enn mellom fjernere slektskap, som *Acinetobacter* og *Escherichia* spp. (Iredell et al., 2016). *Escherichia coli*, *Salmonella* og *Shigella* kommer alle fra familien *Enterobacteriaceae*, og plasmider overføres derfor lett mellom dem. Betalaktamaseresistens hos *E. coli* er som oftest forårsaket av et opptak av genelementer via HGO (Bajaj et al., 2016).

Blant de 15 prøvene som viste positiv vekst etter rendyrking på selektive skåler, ble det påvist resistensgener i seks prøver ved PCR og Sanger-sekvensering. Dette er omtrent halvparten, noe som er relativt mye ut fra den forholdsvis lave vannmengden filtrert. Årsaken til hvorfor det ikke ble påvist ARG i den andre halvdel av prøvene kan være mange. Det kan f.eks. skyldes at konsentrasjonen av DNA var for lave. Selv om det var vekst på fenotypiske medier, er det likevel ikke mulig å bekrefte at disse enzymene eksisterte i bakteriene som vokste på skålene. Videre ble det bare benyttet et begrenset antall primere for kartlegging av gener som koder for ESBL_{A/M} og ESBL_{KARBA}. Det kan derfor ikke utelukkes at det eksisterer andre typer resistensgener blant disse ESBL-gruppene i bakteriene. Prøve 9 og 12 viste vekst etter rendyrking på en skål som skal selektere for KRE. Genotypiske metoder påviste derimot ikke gener som koder for ESBL_{KARBA}. I dette tilfellet kan bakterien ha brukt andre mekanismer for resistens som f.eks. poriner. Betalaktamer og karbapenemer innehar mye av den samme strukturen, noe som betyr at ESBL_{A/M} kan hydrolysere

karbapenemer (Iredell et al., 2016). Dette fører imidlertid sjeldent til en ineffektiv behandling og heller ikke til en klinisk signifikant heving av MIK for karbapenemer. I en vert hvor karbapenemaser ikke forekommer ofte, kan mangel på poriner i membranen til en bakterie som produserer ESBL_{AM} gi en større sannsynlighet for klinisk relevant resistens mot karbapenemer. Denne formen for resistens er vanligvis kodet i kromosomet, men kan også gjelde plasmidbåren *bla*_{CMY} (Lindstedt, 2018). Vekst på CRE-skålen med CMY kan forklares med denne mekanismen.

Det er ikke bare et faktum at alvorlige klinisk relevante ARG har blitt detektert på NMBU campus, men i hvert isolat eksisterte det også flere ESBL. Alle prøvene inneholdt to-tre ESBL_{AM}, hvorav en av seks (17 %) inneholdt tre ARG og resten (83 %) inneholdt to ARG. Det var kun én prøve som ikke hadde gener som kodet for både ESBL_A og pAmpC, og ingen positive prøver inneholdt kun ett gen. En høy tilstedeværelse av kombinerte gener kan skyldes at, ved mobilisering av disse genene, er genetiske elementer involvert, ifølge Shahid et al. (2011). Bakterier som produserer flere ESBL har blitt mer og mer vanlig, og studier viser at så mye som 44 % av ESBL-positive bakterier fra *Enterobacteriaceae*, bærer flere ulike gener som koder for resistensenzymene (Ojdana et al., 2014). Eksisterer det flere resistensgener sammen, kan flere egenskaper for resistens komme til uttrykk, noe som er særs alvorlig. Videre kom majoriteten (85 %) av de rensede og sekvenserte positive PCR-produktene, fra vannprøve H2. Utenom én som ble hentet ut av vannprøve H3. De fleste resistensenzymene ble dermed detektert i øverste del av Niagarabekken. Dette kan ha vært en ren tilfeldighet, og hvor eller hvordan vannprøven ble tatt kan ha hatt en innvirkning ved dette tilfellet.

Analysen fra genotypiske metoder viste ikke ESBL_{KARBA} i vannprøvene. Dette er gledelig, siden bakterier med disse enzymene har størst variasjon og bredde ved hydrolysering av betalaktamer (Bajaj et al., 2016). Det ble heller ikke funnet noen ESBL-kodede gener i vannprøven fra Andedammen. Dette behøver imidlertid ikke å ha noen relevans, da Niagarabekken er koblet til Andedammen og gener som koder for ESBL kan enkelt forflyttes mellom bakterier via plasmider og MGE (Ojdana et al., 2014).

5.2.1.2 Primer med feilbinding (CTX-M gr. 2 og NDM) i jordprøver

Amplifiserte produkter fra isolerte jordprøver viste tilstedeværelse av ESBL_A enzymet CTX-M gr. 2 og ESBL_{KARBA-B} enzymet NDM på gel. Resultater fra Sanger-sekvensering viste imidlertid at produktene var falske. Analysen viste at CTX-M gr. 2 primeren ikke koblet seg til målgenet, men heller til to andre gener (figur E1). Det samme skjedde med NDM-primeren. Kombinasjonen av nesten identiske komplementære basepar og nesten like lange sekvenslengder er ytterst sjelden (Lindstedt, 2018). Funnene viser viktigheten av å gjennomføre flere ulike metoder for å kunne underbygge og verifisere resultatene. Flere har brukt denne primeren tidligere, da forskningsartikkelen har blitt sitert hele 188 ganger i PubMed, og denne feilen har sannsynligvis ikke blitt oppdaget før nå. En årsak kan være at det kun har blitt brukt PCR i de andre studiene, uten en påfølgende Sanger-sekvensering for å kunne bekrefte/avkrefte resultatene.

5.2.2 Bakterier isolert fra vannprøver

Bakteriestammene som gav positive svar ved Sanger-sekvensering (16S rRNA) i denne oppgaven var *E. coli* og *Shigella* spp. fra familien *Enterobacteriaceae*. Disse bakteriene har flere likhetstrekk, men også noen forskjeller. Først og fremst så kan de være helseskadelige for mennesker, siden bakterier fra denne familien har en økt forekomst av resistens mot cefalosporiner (Codjoe & Donkor, 2017; Granum, 2015). Ved utvikling av AR i *Enterobacteriaceae* har mekanismer som endring av poriner og effluxpumper vært viktige (Bajpai et al., 2017; Iredell et al., 2016). Betalaktamaser, som fungerer mellom den ytre og indre membranen til G⁻ bakterier, kan også spalte betalaktamer og forhindre dem fra å ødelegge celleveggen. Alvorlige infeksjonstilfeller oppstår imidlertid bare med patogene varianter av *E. coli*, da arten også forekommer naturlig som en apatogen i tarmen til varmblodige dyr og mennesker (zoonotisk) (Granum, 2015). *Shigella* spp. er kun humanpatogen, mens kilden til påvist *E. coli* funnet i Niagarabekken kan ha vært alt fra pinnsvin, hest, fugl, hund, rev, rådyr, samt mennesker som har ferdes på NMBU campus. Det at en patogen *E. coli* kan overføres mellom dyr og mennesker, gjør den mer truende enn *Shigella* spp. da den har større spredningspotensiale og kan affisere flere organismer.

Begge bakteriene er fakultativ anaerobe, som tilsier at de kan overleve uten oksygen i vann (Granum, 2015). *Escherichia coli* kan overleve lengst ved lave

temperaturer, noe som støtter opp under tidspunktet på året vannprøvene ble innhentet. De forekommer derimot ikke normalt i vann, men heller i tarmen til mennesker. Ved tilstedeværelse av *E. coli* i vann er det mest sannsynlig som følge av en fekal forurensing eller kontaminering med urin. I tillegg har *E. coli* flageller, som gjør den bevegelig. Det har ikke *Shigella* spp.. Ved forekomst av resistente *E. coli* med flageller, som kan overleve i kaldt vann fra miljøet, øker det sannsynligheten for spredning av resistens. Hvis de mot formodning skulle kontaminere mat eller drikkevann, kan varmebehandling bidra til å drepe bakteriene, da de ikke tåler temperaturer høyere enn 48 °C.

Det er ikke så vanlig å finne *Shigella* spp. i Norge da den er konkurransesvak og ikke overlever lenge i miljøet (Granum, 2015). Smitte med *Shigella* spp. forekommer ikke ofte i I-land, hvor det er god hygiene og folkehelse, men heller i U-land med blant annet forringet kvalitet på drikkevannet og dårlig helsevesen. Ved Sanger-sekvensering (16S rRNA) kan det være utfordrende å skille mellom *E. coli* og *Shigella* spp., da de er meget like og begge kommer fra *Enterobacteriaceae* (Janda & Abbott, 2007; Lindstedt, 2018). Siden *Shigella* spp. bl.a. ikke er en miljøbakterie, og *E. coli* kan overleve ved lave temperaturer over lang tid, kan det tyde på at bakteriene som ble bekreftet som *Shigella* spp. egentlig er *E. coli*.

5.2.3 Sammenlikning mellom funn i denne studien og studier av ESBL_A og ESBL_M i Norge

Det eksisterer få studier om resistens i miljøet og naturen i Norge, da det har vært mye fokus på å redusere utbrudd og spredning av resistente bakterier i spesielt helsevesenet. På sykehus er det et høyt forbruk av antibiotika, spesielt betalaktamer, som kan selektere for resistente bakterier. En kartlegging av utbredelsen av klinisk relevante *bla*-gener i miljøet og naturen er viktig, fordi det her eksisterer naturkrefter (som vind og vann), akvatiske miljøer (innsjøer, elver, bekker og regn) og dyr, som enkelt kan frakte og spre genene til andre steder. Studier av resistens i Norge, som årsrapportene til NORM / NORM-VET, tilsier at nivåene av ESBL_{A/M}-produserende G⁻ bakterier i Norge er lave, men stigende (Folkehelseinstituttet, 2014). I Norge skyldes tilfeller med AR i stor grad reise, import, og sykehusinnleggelser i utlandet, men denne studien indikerer at det også kan være mulig å bli smittet av klinisk viktige ESBL-gener fra miljøet. Det er usikkert i hvilken grad ESBL-gener og -bakterier fra ville dyr har en

innvirkning på helsen til mennesker, men ville fugler og rever kan være en god indikator på forekomsten av disse i miljøet. Ville fugler kan forflytte seg over lange distanser, spesielt trekkfugler, og kommer enklere til på steder der andre dyr strever. Rovpattedyret reven ligger i toppen av næringskjeden og inntar et bredt spekter av mat. Alt fra fugler, rotter og mus til matrester fra mennesker. Den kan også være i nærheten av kloakk og gjødsel. Isolater fra avføringen til slike dyr har derfor blitt brukt i enkeltstudier gjennomført av Veterinærinstituttet (2017 og 2018) og årsrapporten til NORM / NORM-VET (2016) ved undersøkelse av ARB og ARG i miljøet. Funn av ESBL_{AM} i denne oppgaven og de ovennevnte rapportene sammenliknes nedenfor.

5.2.3.1 Årsrapporter fra NORM / NORM-VET (2015 og 2016)

Mennesketarmen er et typisk reservoar for *E. coli*, slik at bakterien kan enkelt overføres til andre steder ved f.eks. dårlig håndhygiene (Granum, 2015). Fra humankliniske *E. coli* blodkulturer og urinprøver var henholdsvis 5,8 % (av n=1 940) og 3,0 % (av n=1621) av isolatene ESBL-positive i årsrapporten til NORM/NORM-VET fra 2016. Disse resultatene er tilnærmet lik innhentede data fra 2015, hvor 6.5 % (av n=1 952) av blodkulturene og 3,1 % (av n=1 573) av urinprøvene var positive for ESBL. Blant de påviste enzymene i prøvene tilhørte mesteparten CTX-M gr.1 familien, samt noen få prøver med CMY, i blodkulturene fra både 2016 og 2015. I urinprøvene hørte majoriteten av enzymene til CTX-M gr. 1 begge årene, mens enkelte prøver med CMY bare ble funnet i 2015. TEM ble kun detektert i en blodkultur i 2016. Disse resultatene stemmer overens med funnene av CTX-M gr. 1 og CMY i denne masteroppgaven, utenom den lave forekomsten av TEM.

Escherichia coli eksisterer ikke bare i tarmen til mennesker, men også dyr (Granum, 2015). Ville dyr ble for første gang undersøkt i den årlige rapporten til NORM/NORM-VET i 2016, siden den første utgivelsen av årsrapporten i 2000. Avføringsprøver fra nesten 530 rødvogler og 360 ville fugler ble testet for resistens i denne rapporten. Blant disse prøvene ble *E. coli* isolert i majoriteten av prøvene, hvorav nesten 10 % var resistente. Det ble påvist henholdsvis 3,2 % og 8,7 % 3GC-resistens i resistent *E. coli*. Genotypiske metoder viste positive funn av CMY-2 og CTX-M- gr. 1 i isolatene fra både rødvogler og ville fugler. Resultatene til NORM / NORM-VET samsvarer med funnene av CTX-M gr. 1 og CMY i denne masteroppgaven, bortsett fra de lave nivåene av TEM.

Produksjonsdyr kan være en indikator på tilstedeværelse av resistens i både animalske matvarer og husdyrgjødsel. Det ble isolert *E. coli* fra 185 kylling- og 156 kalkunprøver (fekale) i den årlige rapporten til NORM/NORM-VET fra 2016. 3GC-resistens ble funnet i ca. 10 % av prøvene fra både kylling og kalkun. Alle isolatene inneholdt plasmidmediert CMY-2 i isolatene fra kylling, mens 8 av kalkunisolatene viste positive funn av CMY-2. Videre ble kylling- og kalkunkjøtt sett på som indikator på tilstedeværelse av resistens i mat i 2016. Analysene viste at for isolatene med kylling var 9.7 % (av n= 175) 3GC-resistente *E. coli*, mens for kalkunisolatene var det 2.3 % (av n= 128). Også ved dette tilfellet inneholdt alle prøvene med kylling CMY-2. Kun en prøve med kalkunkjøtt inneholdt CMY-2. I årsrapporten fra 2015 ble ikke kylling og kalkun undersøkt, men heller avføring fra produksjonsdyrene svin og kveg. Svinekjøtt og biff ble da brukt som indikator for resistens i mat. Det ble undersøkt om det eksisterte 3GC-resistente *E. coli* i 264 og 258 avføringsprøver fra henholdsvis kveg og svin, samt 245 og 244 prøver av henholdsvis biff og svinekjøtt. Screening av ARB viste at det var svært lave nivåer i kjøttprøver og avføringsprøver fra kveg. Blant 11.2 % av de fekale prøvene fra svin ble den resistente *E. coli* bakterien detektert. I tre av disse fekale prøvene ble plasmidkodet CMY-2 og en genotype av CTX-M oppdaget. Resultatene samsvarer tildels med funnene av CTX-M og CMY i denne masteroppgaven, utenom TEM.

5.2.3.2 Enkeltrapper fra Veterinærinstituttet (2017 og 2018)

Nylige rapporter som har studert forekomsten av resistens blant ville dyr i Norge ble gjennomført av Veterinærinstituttet. Studiene heter *Antimicrobial resistance in the Norwegian environment, red fox as an indicator* (Rapport 11, 2017) og *Antibiotic resistance in terrestrial wild mammal species in Norway - roe deer and wild reindeer as indicators specie's* (Rapport 6, 2018). Førstnevnte rapport viste en lav forekomst av resistente *E. coli* hos rødrev. *Escherichia coli* med 3GC-resistens var sjeldent på steder med en lav populasjonstetthet, og høyere på steder med medium til høy populasjonstetthet. Sistnevnte områder var spesielt tilknyttet gener som koder for CTX-M, som CTX-M-15 og CTX-M-14. CMY-2 ble også funnet i studien. Dette samsvarer med funn i denne masteroppgaven, bortsett fra TEM. Den andre rapporten viste også 3GC-resistent *E. coli* fra reinsdyr i Norge, men det var kun én prøve av 274 prøver. Prøven var innhentet like ved en storby, og inneholdt et CTX-M-1 gen, ikke CTX-M-15. Rapportene viste en lav forekomst av betalaktamaseresistente *E. coli* i ville dyr.

Sammenlignes resultater fra årsrapportene til NORM / NORM-VET (2016 og 2015), og rapportene til Veterinærinstituttet med resultater i denne masteroppgaven, foreligger det visse likheter mellom funn av ESBL-kodede gener. Det ble funnet både ESBL_A (CTX-M gr. 1) og ESBL_M (CMY) i prøver fra produksjonsdyr, mennesker og ville dyr. CTX-M ble funnet i isolerte urinprøver og blodkulturer fra norske pasienter i både 2015 og 2016. I CMY og TEM ble det funnet noe lavere nivåer. Samme genfamilie ble også detektert i fekale prøver fra produksjonsdyr, men de CTX-M som ble funnet var ikke CTX-M-15. CTX-M gr. 1 ble funnet i prøver som indikerte prevalens av ARG i miljøet, som samsvarer med resultatene i denne studien. Prevalensen av CMY var høy i prøver fra kylling, da den ble detektert i alle prøvene fra kylling. Forskningslitteraturen viser at de hyppigst detekterte *bla*-genene rapportert i bredspektrede cefalosporin-resistente *E. coli* er i synkende rekkefølge *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, og *bla*_{CMY-2} (Seiffert et al., 2013). ESBL-genet som har blitt detektert oftest i *Salmonella* spp. er *bla*_{CMY-2}, som kan forklare den lavere forekomsten av genet i *E. coli* isolatene fra mennesker, og den høyere forekomsten i fjærkre. I motsetning til mennesker så er det mer vanlig med *bla*_{CMY-2} i produksjonsdyr og andre genotyper av CTX-M enn CTX-M-15. *Escherichia coli* isolater med resistens mot cefamycinen ceftiofur har vært rapportert flere steder globalt og kan skyldes den veterinærmedisinske bruken av midlene som har ført til et seleksjonspress (Guo et al., 2014). Rapporteringen av CMY-2 støtter også oppunder funnene til NORM/NORM-VET, samt funnene i denne studien. Det kan trolig hende at funnene av CTX-M-15 kan ha kommet fra mennesker og CMY-2 fra produksjonsdyr.

Resistensgenene kan ha oppstått i dyreisolatene på flere ulike måter. Fra enten beite, fôr, eller ved ervervet resistens. Menneskene kan ha fått de i seg som turist via mat, dyr og miljø, eller som pasient i et annet land med dårligere helsevesen. De ville dyrene kan ha fått overført ESBL-genene fra menneskene og produksjonsdyrene via miljøet. På bakgrunn av overføringsegenskapene til TEM, CTX-M og CMY med hensyn til ervervet resistens, er det hensiktsmessig å fundere over hvorfor det ikke er flere registrerte infeksjonstilfeller i Norge. Hvorvidt noen blir syk av bakterier beror på om de er patogene, noe ikke alle *E. coli* er. Flere mennesker og dyr, hvor *bla* har blitt isolert fra, kan ha vært bærere. Slike bærere kan bidra til en ytterligere spredning av genene. På tross av en plassering på MGE er det nødvendigvis ikke slik at de blir overført horisontalt, da det må være en donor og mottaker til stede, samt et konjugativt plasmid. Basert på hvor små mengder vann som ble filtrert og analysert i denne studien, var det

en høy forekomst av *bla* i vannprøvene. I rapportene til Veterinærinstituttet og NORM/NORM-VET ble flere hundre prøver isolert fra ulike mennesker og dyr. Denne studien innhentet imidlertid bare tre prøver fra miljøet, rendyrket og isolerte 15 isolater, og fikk seks positive svar fra Sanger-sekvensering med hensyn til ARG tilstede.

Ås universitetet ligger på et landbruksområde, noe som kan være en årsak til funnene av gener som koder for ESBL_{AM}. Eventuelle rester og komponenter fra gjødsling av jordene og produksjonsdyr kan forflyttes med ville dyr, naturkrefter eller mennesker til vannet der prøvene ble tatt. Det er mange ville fugler som ofte ferdes rundt Andedammen, samt Niagarabekken. ESBL-gener kan også videreføres til Norge via tarmen til trekkfugler fra andre land i Europa eller Afrika, med høyere resistensnivåer enn Norge. Ifølge en gartner ansatt ved parkanlegget ved NMBU, ble Niagarabekken tilført gjødsel for noen år tilbake. Bekken har oppstått naturlig, men ble tilført ny jord fra Ås gård for å utforme den ytterligere. Andedammen har ikke blitt påvirket i samme forstand. Etter inkubering og rendyrking oppstod det mindre vekst på skålene med vann fra Andedammen, enn de to andre prøvene. B. Lindstedt har vist at det ved tidligere analyser har blitt målt betraktelig høyere nivåer av *E. coli* i Niagarabekken enn i Andedammen. En teori kan være at grunnet den høyere forekomsten av *E. coli* i Niagarabekken, er det en større sannsynlighet for at det finnes flere vanlige ESBL-gener som typisk eksisterer i *E. coli* der enn i Andedammen. Jord som ble brukt for å utforme bekken kan ha vært naturgjødsel eller mineralgjødsel, som er hovedgruppene for gjødsel (Bratberg, 2018a). Naturgjødsel består bl.a. av husdyrgjødsel og menneskegjødsel, mens mineralgjødsel utgjør små industrielt fremstilte granuler eller pulver. I Norge er husdyrgjødsel den viktigste formen for naturgjødsel. Husdyrgjødsel inneholder bl.a. ekskrementer og urin fra produksjonsdyr (Bratberg, 2018b). I tillegg har kloakkslam med avføring og urin fra mennesker også blitt brukt som gjødsel (Bratberg, 2018a). Ifølge Keen og Montfords (2012) kan aktive metabolitter fra antibiotika fra ekskrementer fortsatt komme ut i kloakkslammet etter rensing og slippes ut i miljøet. Hvis Niagarabekken ble konstruert med de to sistnevnte gjødseltypene, kan de ha inneholdt ESBL-kodede gener. Dette kan bidra til å forklare at det var en forekomst av *bla* i Niagarabekken. Jord fra Ås gård, som ikke er gjødsel, kan også ha inneholdt *bla* som en følge av at det er flere produksjonsdyr som oppholder seg der og lever der. Imidlertid er det ikke noe som skulle tilsi at det er ulike nivåer av resistensgener i de to vannkildene, da Niagarabekken er en avrenning fra Andedammen.

NMBU har en stor andel studenter, ansatte og besøkende som ferdes i området daglig. At slike områder med høy populasjonstetthet har en høyere forekomst av resistens kan støtte opp under funnene fra Veterinærinstituttets rapporter (2017 og 2018). Rapportene viste at steder med stor menneskelig eksponering har en innvirkning på forekomsten av AR i norsk natur. De viser at selv dyr som ikke får utlevert antibiotika og utsettes for lite seleksjonspress, men oppholder seg i områder nær mange mennesker, også kan bli få ARG tilført og derved bli bærere. Blant alle menneskene som oppholder seg på NMBU campus er det også mange internasjonale studenter og norske studenter som har vært på utveksling. Flere av disse studentene kan ha kommet fra land i Europa med en høyere forekomst av resistens i zoonotiske bakterier, høyere forbruk av antibiotika, inkludert betalaktamer, og dårligere kontroll av forbruket enn Norge. Studentene kan enkelt føre resistensbakterier med seg videre til Norge som bærere, med kjæledyr eller via mat. Flere studenter fra land i Afrika og Asia har også studert ved NMBU. Dette er kontinenter med flest årlige dødsfall forårsaket av ARB i verden (*Review on Antimicrobial Resistance, 2014*). Resistensgenene kan ha havnet i de analyserte akvatiske miljøene i løpet av en vanlig aktivitet under fadderuken, hvor mange tar en svømmetur i Andedammen, eller at de har havnet der ved et uhell eller en tilfeldighet. NMBU campus er også et parkområde hvor flere mennesker går turer og eiere lufter hundene sine. Mulighetene er utallige.

5.2.3.3 Sammenlikning av tidligere masteroppgaver om ESBL på Ås og denne masteroppgaven

Tidligere masterstudenter ved NMBU analyserte jordprøver på NMBU campus innhentet høsten 2017 (Støle, Simonsen og Abbasi, 2017). Prøver i denne masteroppgaven ble derimot tatt om vinteren, for å avdekke eventuelle forskjeller i forekomst av ESBL-produserende bakterier basert på årstid. I tillegg analyserte de ikke vannprøver, som det ble fokusert på i denne masteroppgaven.

Mildt vær og vekstoppblomstring gir optimale forhold for flere mikroorganismer. Grunnet lave temperaturer på vinteren, kan nivåene av næringsstoffer senkes og lede til færre levende organismer i akvatiske miljøer. Isen på overflaten av vannet kan også forhindre at sedimenter virvler opp. Det faktum at prøvene ble tatt om vinteren, kan derfor være positivt for arbeidet med denne oppgaven. Tilstedeværelse av for mange mikroorganismer kan forstyrre resultatene ved inkubering på selektive skåler. Før fenotypiske analyser ble foretatt ble vannprøvene filtrert med både grovfilter og finfilter

for å unngå en oppblomstring av mikrobiell vekst. Videre kan isen ha forhindret at flere utenforstående «stoffer» kommer i vannet. De ARB funnet i denne oppgaven har antageligvis kommet i vannet i løpet av en annen tid på året. Det kan ha vært koliforme bakterier fra et dyr eller fra et menneske, f.eks. en eier og hunden på tur ved Niagarabekken på våren eller høsten, som har vært bærere av ARB. Når det er mildere vær bugner det også av insekter som fluer, bier og sommerfugler som også kan være bærere. Positive funn i denne studien tyder på at de ARB kan overleve under robuste forhold i naturen. Selv om det er mindre mikrobiell vekst om vinteren, kan bakteriene tilpasse seg og ligge i dvale. De kan dyrkes frem på laboratoriet, hvor optimale vekstbetingelser for temperatur og luftfuktighet legges til rette for dem.

En annen ulikhet mellom masteroppgavene i 2017 og denne masteroppgaven, er at det da ble tatt prøver fra jord, mens i denne studien ble det tatt prøver i vann. Forskjeller som foreligger her er at bakterier som lever i vann kan leve uten oksygen, og at forekomsten av bakterier i vannprøver som regel er lavere enn i jord. Vann er også et element som lettere kan forflytte seg, da vann er i flytende form og jord er i fast form. Slik kan bakterier i vannprøver lettere spre seg. Dette er svært alvorlig hvis de da er humanpatogener og resistente. Den psykrotrofe bakterien *Pseudomonas* spp. ble funnet i flere av de rendyrkede, isolerte og Sanger-sekvenserte (16S rRNA) PCR-produktene fra fjorårets innhentede jordprøver. Denne bakterien lever ofte i jord, og kan utkonkurrere *E. coli* ved lave temperaturer (Granum, 2015). *Escherichia coli* eller *Shigella* spp. ble ikke detektert i fjorårets masteroppgaver. Det eksisterer færre poriner og lavere permeabilitet hos bakterier som lever i tøffe miljøer med mange toksiner, som *Pseudomonas* spp., enn hos tarmbakterier fra familien *Enterobacteriaceae* i varmblodige dyr og mennesker. Dette skyldes at de sistnevnte lever under mer gunstige og stabile forhold (Iredell et al., 2016). TEM, CMY og CTX-M ble funnet i både jordprøvene fra tidligere masteroppgaver og i vannprøvene i denne studien, som viser at de kan eksistere i flere typer bakteriestammer.

5.2.4 Betingelser for genotypiske metoder

Ved molekylær karakterisering ble multipleks og singelpleks PCR, agarose gelelektroforese, og Sanger-sekvensering (16S rRNA og ARG) benyttet. For at metodene skal gi gode resultater, må visse betingelser oppfylles. Betingelsene avhenger av ulike faktorer.

Før PCR-kjøring ble de isolerte DNA-templatene fra vannprøver kvantifisert og målt for renhet. For høye eller lave DNA-konsentrasjoner kan gi dårligere resultater. Det er vanskelig å si hva som er for høyt eller lavt, da dette er noe som må utprøves. Ved amplifisering av DNA ble derfor mengden DNA-templat hentet ut fra tre av prøvene (nr. 2, 5, og 8) redusert fra 2 til 1 μ l, da resultatene viste at de inneholdt >150 ng/ μ l. Det var bare en prøve (nr. 3) som viste for lave nivåer <2 ng/ μ l. Mengden DNA-templat ble da doblet ved dette tilfellet. I noen av PCR-kjøringene ble det imidlertid glemt å justere for disse DNA-konsentrasjonene. Likevel ble resultatene fra PCR-kjøringene fine, noe som viser at innvirkningen DNA-konsentrasjonen har på ferdig PCR-produkt ikke bare avhenger av DNA konsentrasjonen til templatet.

Ved gjennomføring av PCR, samt agarose gelelektroforese var det tilfeller hvor bånd eksisterte på områder hvor de ikke skulle være, som f.eks. for store PCR-produkt i forhold til forventede PCR-produkt det søkes etter basert på amplifisert singelpleks (figur D1, CAR2 PCR-produkt 7; figur D5, MRSA PCR-produkt 6 og 14). Hvis antall sykluser er for høye, kan PCR-produkter som ikke bør være tilstede amplifiseres og gi falske produkter (Lindstedt, 2018). Da er det større sannsynlighet for at primeren binder seg til sekvenser den ikke skal. Fra de isolerte og rendyrkede bakteriene fra vannprøver var det derimot nok DNA, og man trengte ikke så mange sykluser. Uspesifikke bånd på gel kan skyldes tilstedeværelse av andre ARG som ikke ble undersøkt i denne oppgaven. For å unngå dette ble antall sykluser redusert fra 40 til 30 for PCR-kjøring med CAR1-2, og fra 35 til 28 sykluser for ESBL1-3. Etter denne reduksjonen ble gelbildene med PCR-produkt mye bedre. Årsaken til at det ble benyttet litt flere sykluser i Thermal cycleren var at det tidligere var blitt undersøkt jordprøver, hvor det var mindre DNA tilstede. Videre er det viktig å passe på at primerne tiner på is og at de ikke tines/fryses gjentatte ganger. 16S rRNA PCR-produkt gav i første omgang negative resultat i denne studien. En årsak kan ha vært at 16S-primerne var for gamle og blitt tatt ut og inn av fryseren for gjentatte ganger noe som har ødelagt dem, og bidratt til å redusere deres bindingsevne. PCR-produktene ble

derfor sendt til GATC på nytt, men da ble bare 6 prøver sendt, på bakgrunn av hvilke prøver det ble påvist ARG. Andre gang ble alle prøvesvarene positive.

Ved gjennomføring av agarosegelelektroforese er det flere punkter som er viktig å tenke på. Kjøres gelen på for høy Volt-styrke (>100) over for lang tid, kan DNA-båndene vandre ut av gelen eller/og gi «glidende» bilder. I denne oppgaven skjedde dette et par ganger, og da måtte elektroforesen gjennomføres på nytt. Det er også viktig at elektroforesen kjøres riktig vei, at strømmen ikke er ujevn, at det ikke er en bøy i brønnen grunnet en dårlig utdraging av kammen, og at det ikke er noen bobler i veien. I denne oppgaven skal ikke ujevn strøm ha vært et problem, da maskinene er forholdsvis nye, og gelen ble sjekket regelmessig under elektroforesen.

Sanger-sekvensering kan gi svar på hvilke bakteriestammer (16S rRNA) og gener som var i prøvene. Ved rensing av DNA, før sekvenseringen, var det viktig å fjerne etanolen tilstrekkelig ved pipettering etter sentrifugeringen, samt å tørke prøven, hvis ikke kan DNA ødelegges. Før prøvene ble sendt måtte konsentrasjonene av DNA etter 16S rRNA-amplifisering være >7 ng/ μ l, helst >20 ng/ μ l (Lindstedt, 2018). Ved tilsetning av primer, måtte mengden prøve være høyere for prøvene med lav DNA-konsentrasjon (<20 ng/ μ l), enn prøvene med tilstrekkelig DNA-konsentrasjon (>20 ng/ μ l). Noen av prøvene var derimot under <7 ng/ μ l. Disse ble likevel sendt til sekvensering, og gav positive resultater. Videre ble Sanger-sekvensering brukt i tillegg til PCR, fordi metoden skal være enda mer pålitelig. Dette skyldes at ved sekvensering kommer selve DNA-sekvensen opp, som kan undersøkes med BLAST for å finne identiteten. Ved PCR dukker kun et bånd opp, som kan være båndet det søkes etter hvis størrelsen (antall bp) er riktig. Det er likevel aldri mulig å være helt sikker på hvorvidt det er et falskt produkt. *Escherichia coli* kan også som nevnt tidligere forveksles med *Shigella* spp. ved Sanger (16S rRNA), siden metoden har vanskelig for å skille de fra hverandre. Men basert på teorien er det mest sannsynlig en tilstedeværelse av *E. coli* i prøvene. Funn av *E. coli* i denne studien er positivt ved helgenomsekvensering med MinION. Årsaken er at MinION er utviklet med hensyn på arten ved utvikling av instrumentet (Lindstedt, 2018). *Escherichia coli* er den bakterien som har blitt analysert mest i verden (Tønjum, 2014). utfordringen er imidlertid at MinION er et nytt og relativt ukjent instrument med en høy feilratio, blant annet har den flere sekvenseringsfeil enn Sanger. Helgenomsekvensering ble dessverre ikke gjennomført grunnet en for sen levering av MinION kitet.

5.3 Forslag til videre arbeid

Funnene i denne oppgaven viser at det trengs en videre forskning og kartlegging av utbredelsen av ESBL-resistens i prøver fra både miljøet, mennesker, og dyr. Forekomsten av påvirkende faktorer som ville dyr (særlig trekkfugler), kjæledyr og mennesker med ESBL produserende bakterier fra *Enterobacteriaceae* i omgivelsene kan være fordelaktig å kartlegge. Det kan da være flere som er bærere. Videre er Niagarabekken en avrenning av Andedammen, og munner ut i Årungen. Det kan derfor være nyttig å ta analyser i dette vannet, og miljøet rundt. Når det kommer til ytterligere fenotypiske analyser, bør isolatene som vokste på *Brilliance*TM ESBL også testes på *Brilliance*TM CRE, for å sjekke egenskaper for karbapenemresistens. Ytterligere genotypiske analyser kan være å undersøke hvordan gener som koder for ESBL_{AM} og ESBL_{KARBA} har mulighet til å forflytte seg ved HGO mellom bakterier. For å teste om det var noen andre resistensgener som kodet for ESBL kan andre multipleks PCR benyttes. Det bør undersøkes hvorvidt *bla*-genene, og andre ARG forøvrig, ligger på kromosomet eller plasmider, som forflytter ARG lettere. En såkalt konjugasjonstest. I tillegg hadde det vært hensiktsmessig å studere hvorvidt bakteriene med redusert følsomhet mot bredspektrede betalaktamer bruker andre resistensmetoder enn enzymer, som f.eks. å søke etter effluks pumper. Det bør også sjekkes hvorvidt *E. coli* bakteriene er patogene eller apatogene, da de patogene er mest farlig for mennesker. Ytterligere Sanger-sekvensering enn det som allerede har blitt gjort bør også gjennomføres, og helgenomssekvenseringen som det ikke ble tid til bør utføres.

6.0 Konklusjon

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke, og eventuelt påvise, forekomsten av G⁻ bakterier som produserer ESBL_{AM} og ESBL_{KARBA} i innhentede vannprøver. For å komme frem til et svar ble dyrkningsmedier brukt for å studere bakterienes uttrykte egenskaper for betalaktam- og karbapenemresistens. Detektering av *bla* gener ble gjennomført ved hjelp av kjente molekylære metoder. I denne studien kan det konkluderes med at det finnes ARB og ARG i vann i Norge basert på de ovennevnte metodene. Det ble påvist ARB med bredspektret resistens i alle vannprøvene ved utplating på betalaktam- og karbapenemholdige selektive kromogene skåler. Etter isolering og PCR-kjøring av rendyrkede bakteriekolonier på dyrkningsmediene var det mulig å identifisere bakteriestammene som vokste på platene ved hjelp av 16S rRNA Sanger-sekvensering. Resultatene viste at det mest sannsynlig var *E. coli*. Bakterien kan forekomme i vann, da den ikke er avhengig av oksygen, men tilstedeværelsen skyldes antageligvis en fekal forurensning eller kontaminering med urin. Påvisning av gener som koder for to ESBL_A og en ESBL_{M-C}, ved singelpleks PCR viste at forekomsten var høyest øverst i Niagarabekken. Singelpleks PCR-produktene var positive for *bla*_{CMY}, *bla*_{TEM}, og *bla*_{CTX-M-15} basert på Sanger-sekvensering (ARG). Det sistnevnte genet er et meget klinisk relevant gen, og har i stor grad vært knyttet til en virulent sekvenstype av *E. coli*. Den påviste bakterien og genene er assosiert med MGE som kan overføres fra en donor til en mottaker hvis det er et konjugativt plasmid i donoren. Det har vært liknende funn i klinisk signifikante isolater fra mennesker og dyr i Norge, men nivåene er fortsatt lave sammenliknet med denne studien. Det viktigste resultatet i denne oppgaven er at det har blitt funnet mobile og klinisk relevante resistensgener i miljøprøver i vann. Utbredelsen av dette er det lite kjennskap til i Norge. Funnene i denne studien bygger opp under behovet for ytterligere studier av ARB og ARG i akvatiske miljøer, og naturen forøvrig.

7.0 Referanser

- Arabestani, M. R., Fazzeli, H. & Nasr Esfahani, B. (2014). Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (4): 461-8. doi: 10.3855/jidc.3856.
- Arora, G., Sajid, A. & Kalia, V. (2017). *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer*. kap. 2 og 4. Sveits: Springer International Publishing.
- Bajaj, P., Singh, N. S. & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, 7: 417. doi: 10.3389/fmicb.2016.00417.
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M. & Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, 7 (1): 12-16. doi: 10.4103/2231-0770.197508.
- Ballhausen, B., Kriegeskorte, A., Schleimer, N., Peters, G. & Becker, K. (2014). The *mecA* homolog *mecC* confers resistance against beta-lactams in *Staphylococcus aureus* irrespective of the genetic strain background. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (7): 3791-8. doi: 10.1128/aac.02731-13.
- Bevan, E. R., Jones, A. M. & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (8): 2145-2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.
- bioMérieux. (u.å.). *Bacteria and the environment*. Tilgjengelig fra: <https://www.antimicrobial-resistance.biomerieux.com/popup/bacteria-and-the-environment/> (lest 01.03.2018).
- Biotium. (u.å.). *GelRed & GelGreen. Environmentally safe and ultra-sensitive nucleic acid gel stain for replacing EtBr*. Tilgjengelig fra: <https://www.garvan.org.au/research/capabilities/molecular-genetics/documents/gelred-flyer.pdf> (lest 09.04.2018).
- Bratberg, E. (2018a). *Gjødsel*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/gj%C3%B8dsel> (lest 25.04.2018).
- Bratberg, E. (2018b). *Husdyrgjødsel*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/husdyrgj%C3%B8dsel> (lest 25.04.2018).
- Brolund, A. (2014). Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infection Ecology & Epidemiology*, 4: 10.3402/iee.v4.24555. doi: 10.3402/iee.v4.24555.
- Bush, K. & Bradford, P. A. (2016). beta-lactams and beta-lactamase inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6 (8). doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*. Atlanta, USA.
- Churko, J. M., Mantalas, G. L., Snyder, M. P. & Wu, J. C. (2013). Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases. *Circulation Research*, 112 (12): 1613-23. doi: 10.1161/circresaha.113.300939.

- Codjoe, F. S. & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *International Journal of Medical Sciences (Basel)*, 6 (1). doi: 10.3390/medsci6010001.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C. & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (3): 490-5. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74 (3): 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y. & Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14: 45. doi: 10.1186/s12941-015-0100-6.
- Domingues, S., da Silva, G. J. & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2 (5): 211-223. doi: 10.4161/mge.22967.
- DTU Food. (2012). *PROTOCOL FOR PCR AMPLIFICATION OF MECA, MECC (MECALGA251), SPA AND PVL*. Tilgjengelig fra: https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf.
- Europakommisjonen. (2016). *Antimicrobial Resistance, Antibiotics in the EU - Use & Perceptions*.
- European Food Safety Authority. (2018). *Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria still high in humans, animals and food, say ECDC and EFSA*. Tilgjengelig fra: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180227> (lest 15.03.2018).
- European Medicines Agency. (2017). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015*. Seventh ESVAC report: European medicines agency.
- Folkehelseinstituttet. (2012). *Om antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-antibiotikaresistens/> (lest 20.02.2018).
- Folkehelseinstituttet. (2014). *Antibiotic resistance in Norway*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/en/op/hin/smitte/antibiotic-resistance-in-norway---p/#how-does-antibiotic-resistance-spread> (lest 18.04.2018).
- Folkehelseinstituttet. (2016). *Om antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://helsenorge.no/legemidler/om-antibiotikaresistens> (lest 19.02.2018).
- Folkehelseinstituttet. (2017a). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/#om-esbl> (lest 15.03.2018).
- Folkehelseinstituttet. (2017b). *Fortsatt nedgang i salg av antibiotika i 2016*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nyheter/2017/fortsatt-nedgang-i-salg-av-antibiotika-i-2016/> (lest 20.03.2018).

- Folkehelseinstituttet. (2017c). *Antibiotikaresistens - en utfordring for folkehelse*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/hn/helse/antibiotikaresistens/> (lest 20.02.2018).
- García-Álvarez, L., Holden, M. T. G., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F. J., Curran, M. D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D. J., Teale, C. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11 (8): 595-603. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8).
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1): 1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.
- Grahek-Ogden, D., Gifstad, T. (2017). *Antibiotikaresistens - hva er det?* Tilgjengelig fra: http://www.matportalen.no/matsmitte_og_hygiene/tema/smittestoffer/antibiotikaresistens_hva_er_det (lest 20.02.2018).
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning, smitte gjennom mat og vann*. kap. 7, 9 og 12. Oslo: Cappelen Damm akademisk.
- Guo, Y.-F., Zhang, W.-H., Ren, S.-Q., Yang, L., Lü, D.-H., Zeng, Z.-L., Liu, Y.-H. & Jiang, H.-X. (2014). IncA/C Plasmid-Mediated Spread of CMY-2 in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* from Food Animals in China. *PLOS ONE*, 9 (5): e96738. doi: 10.1371/journal.pone.0096738.
- Holten, K. B. & Onusko, E. M. (2000). Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American Family Physician Journal*, 62 (3): 611-20.
- Invitrogen by Life technologies. (2010). *Qubit 2.0 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp32866.pdf> (lest 01.03.2018).
- Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *Bmj*, 352: h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9): 2761-2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33 (3): 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- Keen, P. L. & Montforts, M. H. M. M. (2012). *Antimicrobial resistance in the environment*. kap. 7, 9, 18 og 21. New Jersey, USA: Wiley-Blackwell.
- Khan, A. U., Maryam, L. & Zarrilli, R. (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*, 17 (1): 101. doi: 10.1186/s12866-017-1012-8.
- KhanAcademy. (u.å.). *DNA sequencing*. Tilgjengelig fra: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing> (lest 09.04.2018).

- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, 8 (6): 423-435. doi: 10.1038/nrmicro2333.
- Li, X. Z. & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69 (12): 1555-623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000.
- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T. M., Hasman, H., Magiorakos, A. P., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., et al. (2013). Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical Infectious Diseases*, 56 (7): 1030-7. doi: 10.1093/cid/cis1043.
- Lindstedt, B. (2018). *Personlig kommunikasjon med hovedveileder og professor Bjørn-Arne Lindstedt ved NMBU*. Ås (Våren 2018).
- Livermore, D. M., on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug, D., Development, Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J., et al. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (9): 1941-1944. doi: 10.1093/jac/dkr262.
- Lu, H., Giordano, F. & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14 (5): 265-279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>.
- Lønn-Stensrud, J. (2016). *Bakterienes forunderlige verden*. kap. 6 og 7. Oslo: Universitetsforl.
- Medhus, A., Slette-meas, J. S., Marstein, L., Larssen, K. W. & Sunde, M. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (4): 968-9. doi: 10.1093/jac/dks487.
- Miljødirektoratet. (2017). *Undersøker antibiotikaresistens i miljøet*. Tilgjengelig fra: <http://www.miljodirektoratet.no/no/Nyheter/Nyheter/2017/Juni-2017/Undersoker-antibiotikaresistens-i-miljoet/> (lest 15.03.2018).
- Morgan, D. J., Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Perencevich, E. N. & Weisenberg, S. (2011). Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*, 11 (9): 692-701. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70054-8.
- NCBI. (u.å.). *Basic Local Alignment Search Tool, Nucleotide BLAST*. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest 24.04.2018).
- NORM / NORM-VET. (2016). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø / Oslo.
- Norsk legemiddelhandbok. (2016). *Antibakterielle midler*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/27954> (lest 20.03.2018).
- Norsk legemiddelhandbok. (2017). *Bredspektrede penicilliner*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/28225?expand=1> (lest 02.05.2018).

- Ojdana, D., Sacha, P., #x142, Wieczorek, P., Czaban, S., awomir, Michalska, A., Jaworowska, J., Jurczak, A., et al. (2014). The Occurrence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM Genes in Extended-Spectrum beta-lactamase-Positive Strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *International Journal of Antibiotics*, 2014: 7. doi: 10.1155/2014/935842.
- Paterson, G. K., Harrison, E. M. & Holmes, M. A. (2014). The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 22 (1): 42-7. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.003.
- Pawlowski, A. C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H. A., McArthur, A. G. & Wright, G. D. (2016). A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nature Communications*, 7: 13803. doi: 10.1038/ncomms13803
<https://www.nature.com/articles/ncomms13803#supplementary-information>.
- Phillips, T. (2017). *Learn how to make a TAE buffer in a few steps*. Tilgjengelig fra: <https://www.thebalance.com/how-to-make-a-tae-buffer-in-3-steps-375495> (lest 09.04.2018).
- Pitout, J. D. & DeVinney, R. (2017). *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Res*, 6. doi: 10.12688/f1000research.10609.1.
- Qiagen. (u.å.). *GelPilot DNA Loading Dye, 5x. For safe and convenient loading and tracking of DNA samples on electrophoresis gels*. Tilgjengelig fra: file:///Users/hedvigskaflem/Downloads/GelPilot-DNA-Loading-Dye-5x-EN.pdf (lest 09.04.2018).
- Rawat, D. & Nair, D. (2010). Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2 (3): 263-74. doi: 10.4103/0974-777x.68531.
- Regjeringen. (2015). *Nasjonal strategi mot antibiotikaresistens, 2015-2020*. Tilgjengelig fra: https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/sstrategi_antibiotikaresistens_230615.pdf (lest 15.04.2018).
- Review on Antimicrobial Resistance. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. Storbritannia.
- Salverda, M. L. M., De Visser, J. A. G. M. & Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (6): 1015-1036. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x.
- Seiffert, S. N., Hilty, M., Perreten, V. & Endimiani, A. (2013). Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates*, 16 (1-2): 22-45. doi: 10.1016/j.drug.2012.12.001.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (1): 90-101. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (1): 71-109. doi: 10.1128/CMR.00030-10.

- Stapleton, P. D. & Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*, 85 (Pt 1): 57-72.
- Statens legemiddelverk. (2012). *Terapianbefaling: Bruk av Antibakterielle midler til produksjonsdyr*. Oslo: Statens legemiddelverk.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010a). *Brilliance™ ESBL*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/oxoid-Brilliance-ESBL.pdf> (lest 01.03.2018).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2011). *Brilliance™ CRE* Tilgjengelig fra: <http://ams.ro/wp-content/uploads/2012/09/Brilliance-CRE.pdf> (lest 01.03.2018).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2008). *Brilliance™ MRSA2*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/mrsa/27659-Data-MRSA.pdf> (lest 01.03.2018).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010b). *Brilliance™ STAPH24*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/folio-1351-staph-24.pdf> (lest 01.03.2018).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2014). *Quick and easy, ESBL and CRE screening. Brilliance™ ESBL/ Brilliance™ CRE Agar*. Tilgjengelig fra: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Brilliance-CRE-ESBL-Biplate-Product-Overview.pdf> (lest 01.03.2018).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (u.å.). *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios*. Tilgjengelig fra: <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> (lest 01.03.2018).
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. kap. 8 og 13. Oslo: Universitetsforlaget.
- Tønjum, T. (2014). *E. coli*. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/e_coli (lest 10.05.2018).
- Tønjum, T. (2017). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antibiotikaresistens> (lest 19.03.2018).
- Universitetet i Oslo. (2011b). *PCR*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html> (lest 15.02.2018).
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A. & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14 (8): 742-750. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40 (4): 277-283.
- Vaaje-Kolstad, G. (2016). *Agarose*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/agarose> (lest 09.04.2018).
- Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D. & Hashsham, S. A. (2017). Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ Res*, 89 (10): 921-941. doi: 10.2175/106143017x15023776270179.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). *Molecular biology of the gene*. kap. 7 og 12. 7. utg. Glenview, USA: Pearson education Inc.
- World health organization. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. Genève, Sveits.

- World health organization. (2017). *WHO list of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine (WHO CIA list)*. Tilgjengelig fra:
<http://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017.pdf?ua=1> (lest 18.03.2018).
- World health organization. (2018). *Antimicrobial resistance*. Tilgjengelig fra:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> (lest 15.03.2018).
- Zhang, X.-X., Zhang, T. & Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (3): 397-414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z.
- Øye, I., Henriksen, S.D., Bøvre, K. (2017). *Antibiotika: SNL*. Tilgjengelig fra:
<https://sml.snl.no/antibiotika> (lest 19.02.2018).

8.0 Vedlegg

Vedleggsfortegnelse

Vedlegg A – Eksempel på resultat fra Sanger-sekvensering	ii
Vedlegg B – Eksempler på finfiltrerte vannprøver	iii
Vedlegg C – Primere og primersekvenser benyttet ved PCR	iv
Vedlegg D – Gelbilder	vii
Vedlegg E – Uønsket primerbinding	xi

VEDLEGG A

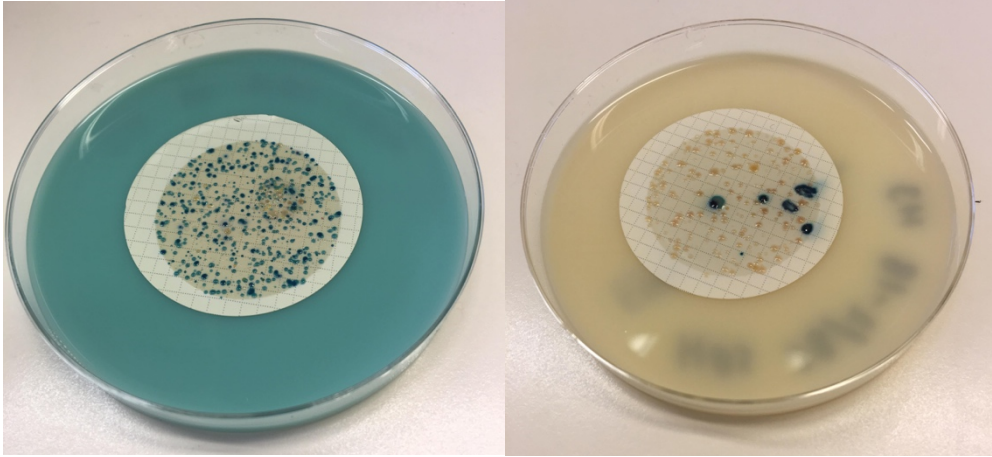
Escherichia coli strain E74ECMO beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M-15) gene, partial cds
 Sequence ID: [KY640534.1](#) Length: 640 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 640 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1179 bits(638)	0.0	639/640(99%)	0/640(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTTGCCGNTTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAG	60		
Sbjct 1	CTTGCCGATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAG	60		
Query 61	ATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAG	120		
Sbjct 61	ATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAG	120		
Query 121	TGATGGCCGCGGCCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACC GAATCTGTTAAATCAGC	180		
Sbjct 121	TGATGGCCGCGGCCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACC GAATCTGTTAAATCAGC	180		
Query 181	GAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCA	240		
Sbjct 181	GAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCA	240		
Query 241	ATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCCGCTACAGTACAGCGATAACGTGG	300		
Sbjct 241	ATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCCGCTACAGTACAGCGATAACGTGG	300		
Query 301	CGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGCTAGCGTCACCGGTTCCGCCGAC	360		
Sbjct 301	CGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGCTAGCGTCACCGGTTCCGCCGAC	360		
Query 361	AGCTGGGAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTC	420		
Sbjct 361	AGCTGGGAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTC	420		
Query 421	CGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTGCGGGAATCTGA	480		
Sbjct 421	CGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTGCGGGAATCTGA	480		
Query 481	CGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCA	540		
Sbjct 481	CGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCA	540		
Query 541	ATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATA	600		
Sbjct 541	ATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATA	600		
Query 601	AAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGA 640			
Sbjct 601	AAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGA 640			

Figur A1. Eksempel på resultat fra Sanger-sekvensering (bakterien *E. coli* med genet blaCTX-M-15) ved bruk av nBLAST. Figuren viser likhet (vertikale streker) mellom nukleinsyrer fra sekvensert materiale og data fra genbanken.

VEDLEGG B



Figur B1. To eksempler på finfiltrerte vannprøver, med blå og beige kolonier, inkubert (37°C i 24 t) på Brilliance™ CRE Agar (t.v.) og Brilliance™ ESBL Agar (t.h.).

VEDLEGG C

Tabell C1. Karbapenemase-primere og -primermikser brukt ved multipleks- PCR amplifisering (Dallenne et al., 2010).

Primer	Primersekvens (5' → 3')	Målgjen	Produktstørrelse (bp)
Mastermiks CAR1 (CAR1)			
CMY2-F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	<i>bla_{CMY}</i>	188
CMY2-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACG		
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla_{OXA-48}</i>	281
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	<i>bla_{IMP}</i>	393
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT		
VIM_F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla_{VIM}</i>	564
VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
Mastermiks CAR2 (CAR2)			
NDM_F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla_{NMD}</i>	157
NDM_R	GTAGTGCTCAGTGTGCGCAT		
SFC1-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	<i>bla_{SFC}</i>	268
SFC1-R	CACTGTACTGCAGAGTGGCA		
KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla_{KPC}</i>	460
KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		

Tabell C2. ESBL-primere og -primermikser brukt ved multipleks- PCR amplifisering

(Arabestani et al., 2014; Dallenne et al., 2010).

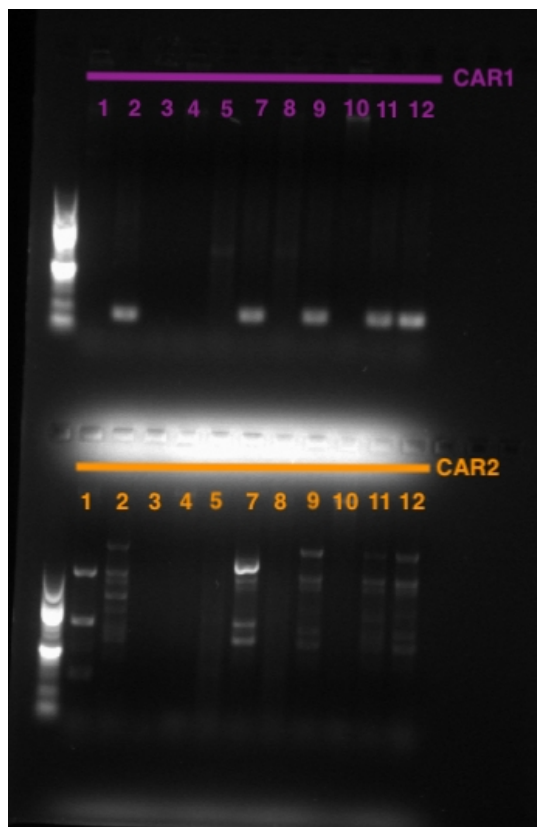
Primer	Primersekvens (5' → 3')	Målgen	Produktstørrelse (bp)
Mastermiks 1 (M1)			
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> _{OXA-48}	281
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
MultiCTXMGp2_F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 2)	404
MultiCTXMGp2_R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT		
MultiTSOO_F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla</i> _{OXA}	564
MultiTSOO_R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
MultiTSOS_F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla</i> _{SHV}	713
MultiTSOS_R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
Mastermiks 2 (M2)			
MultiCTXMGp9_F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 9)	561
MultiCTXMGp9_R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCTXMGp1_F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 1)	688
MultiCTXMGp1_R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiTSOT_F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla</i> _{TEM}	800
MultiTSOT_R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
Mastermiks 3 (M3)			
NDM_F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> _{NMD}	157
NDM_R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
VIM_F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla</i> _{VIM}	564

VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> _{KPC}	460
KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		

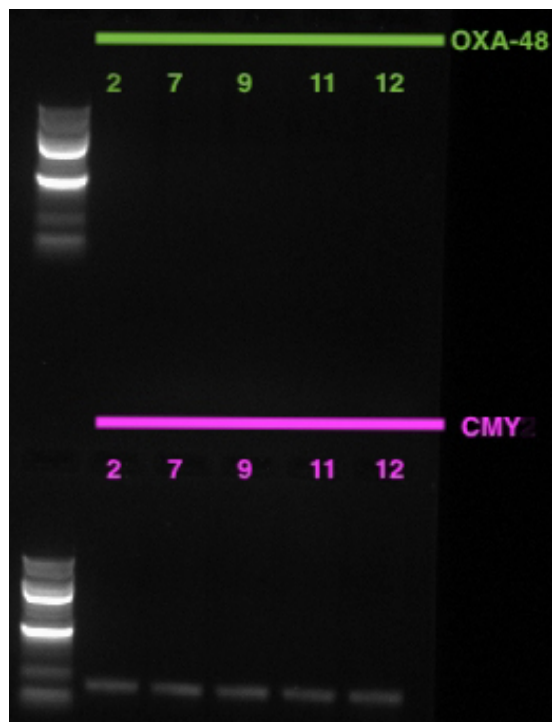
Tabell C3. MRSA-primere og -primermikser brukt ved multipleks-PCR (DTU Food, 2012).

Primer	Primersekvens (5' → 3')	Målgen	Produktstørrelse (bp)
Mastermiks MRSA			
<i>spa</i> -1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC		180-600 bp
<i>spa</i> -1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT		
<i>mecA</i> P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG		162 bp
<i>mecA</i> P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		
<i>pvl</i> -F	GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT		85 bp
<i>pvl</i> -R	GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG		
<i>mecA</i> _{LGA251} MultiFP	GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC		138 bp
<i>mecA</i> _{LGA251} MultiRP	GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC		

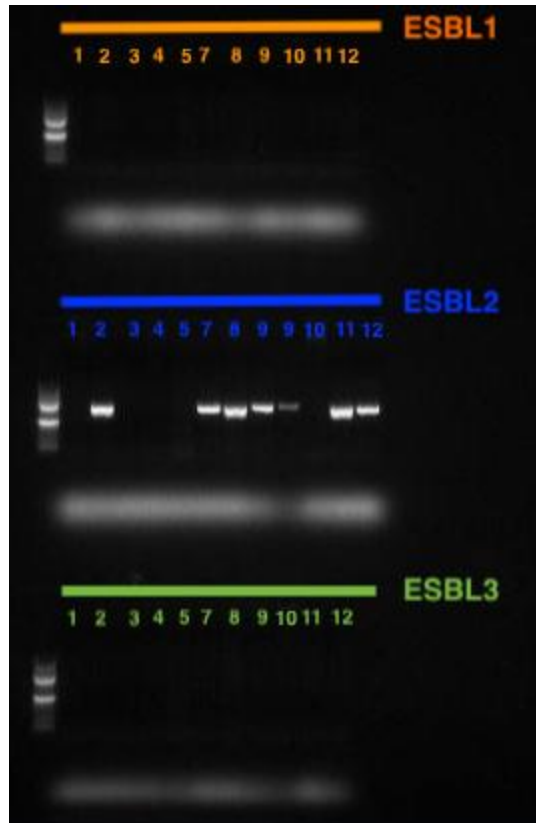
VEDLEGG D



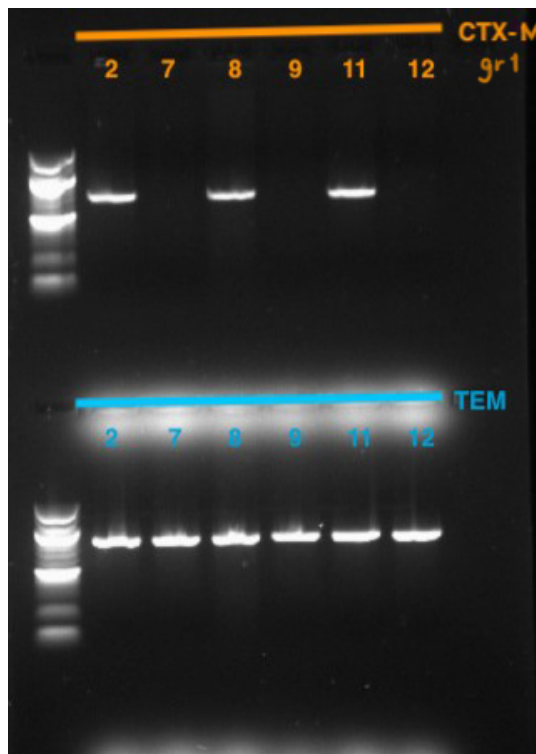
Figur D1. Gelbilde av PCR-produkter (prøve 1-12, minus 6) fra multipleks CAR1 og CAR2, hentet fra vannprøver. Kolonnen helt t.v. er ladderen



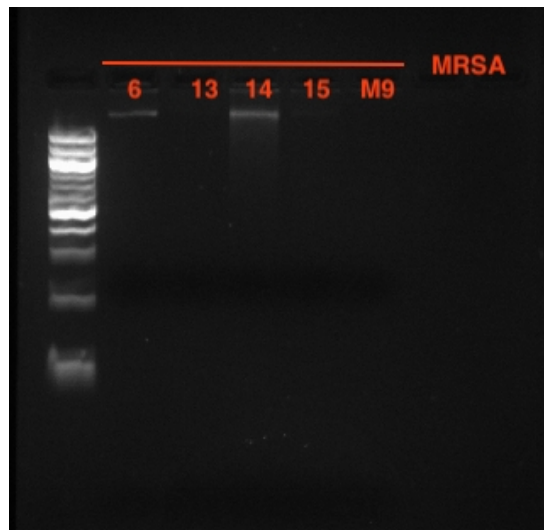
Figur D2. Gelbilde av singlepleks PCR-produkter med primerne komplementære til ESBL_M-genene *bla*_{OXA-48} og *bla*_{CMY2}. DNA-templat ble hentet fra de renyrkede prøvene 2, 7, 9, 11 og 12 fra vannprøver. Kolonnen helt t.v. er ladderen.



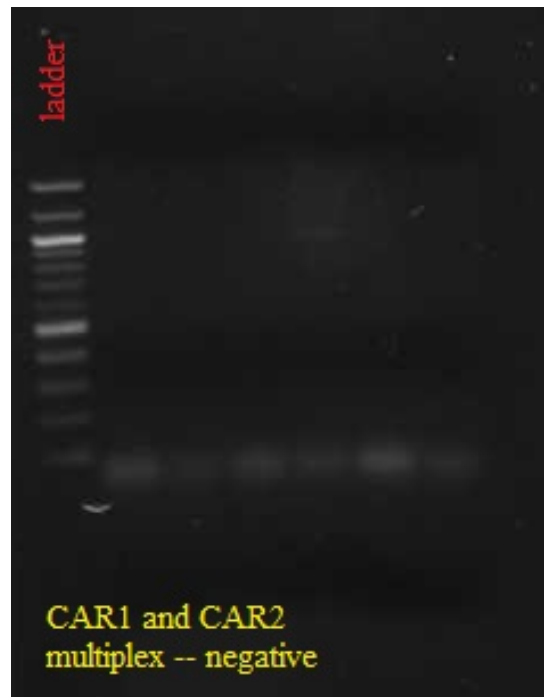
Figur D3. Gelbilde av PCR-produkter (prøve 1-12, minus 6) fra multipleks ESBL (M1-M3), hentet fra vannprøver. Kolonnen helt t.v. er ladderen.



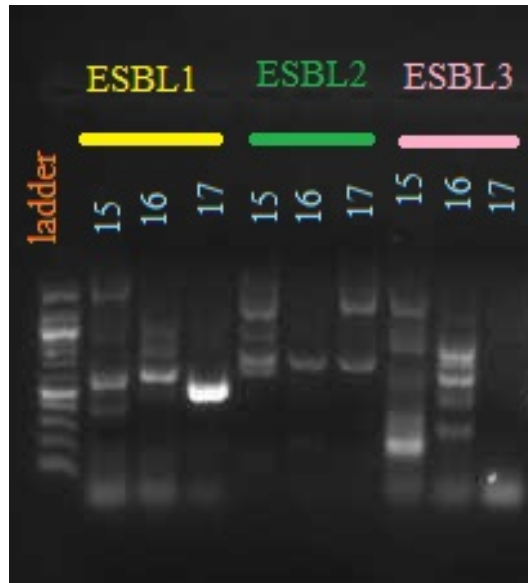
Figur D4. Gelbilde av Singelpleks PCR-produkt med primere komplementære til ESBL_A-genene *bla_{CTX-M}* (gr. 1) og *bla_{TEM}*. DNA-templat hentet fra de rendyrkede prøvene 2, 7, 8, 9, 11 og 12 fra vannprøver, ble amplifisert. Kolonnen helt t.v. er ladderen.



Figur D5. Gelbilde av PCR-produkter til multipleks MRSA. DNA-templater ble isolert fra prøve 14 og 15 fra vannprøver, og 6, 13 og M9 fra jordprøver (2017). Kolonnen helt t.v. er ladderen.



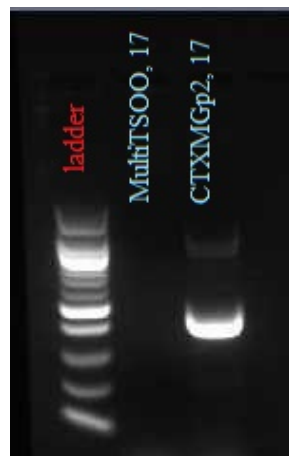
Figur D6. Gelbilde med PCR-produkt fra multipleks CAR1 og CAR2 med jordprøve M18-M20. Ingen av PCR-produktene var positive.



Figur D7. Gelbilde av PCR-produkter (jordprøve M15-M17) fra multipleks ESBL1-4.



Figur D8. Gelbilde av singelpleks PCR-produkter (fra jordprøve M15-M17) med primere komplementære til genene bla_{OXA} , bla_{SHV} , bla_{NDM} og bla_{VIM} .



Figur D9. Gelbilde av singelpleks-PCR-produkter (fra jordprøve M17) med primere komplementære til genene bla_{CTX-M} (gr. 2) t.h. og bla_{OXA} i midten.

VEDLEGG E

Primer sequences:

CTX-Mgp2 F: **cgtaaacggcagatgac** - - **GTCATCGTGCCGTTAACG**

CTX-Mgp2 R: **cgatatcgttggtgtrccat** (R= A or G) - - **ATGGYACCACCAACGATATCG** (Y= C or T)

ARTEFACT

Sequence from: *Pseudomonas rhodesiae* strain BS2777 genome assembly, chromosome: I

tcagcggacgaacagcttctggatcaacttctgtatggacttgccgtagggcgggtagatcagcttcgccgcttcagacgttgctgatcagcacc
cttggccttgctgaacgtcaggaaccttctgtagcctgtagtgccatgcccaggggcccgatgccccgaacggcatatcgtcctggcgacgt
gcagcaggggtgcttcaggcacacgccaccggaatgggttctgtagcagcagcgtgttgccttgttagccgaagtaatacagcgccagc
ggcgaggccgttggtgatgtaggcaaacgcctgatcagggccgcgatacggcagcatcggcagcaccgggccaagatttctcctcatcacgg
tcatgtcgtcgtgacgttaaggagcaggctgtgaggcatcgtcgccttggccttgctgtagcagcgggaatcagggtggcgccttctgtggcgt
ccttgactacgcttgagcctggccagttgctcattgataattgctgtagtccgggtgctggccagcgtgggataaaacccgcaacggcgt
tgctgtaagcctcgaaaacccctgcacaggttcttggcaccagcagtaatccggcgcacgcaggctcggcggcgttcagcgttgcgaag
gcatgcttggcgtcgtccttgagcggatcacctggaaacgatggcggcgcgatttgcgccagttccagggtcaccggcgtgagggttccg
gccgcgcattacatgcttgcgatactggtggcgcgggtgaagagcaagtgatcgaagcgcagccgggaaaacgcgatacccatgctggcctgc
cgagcaccacgcacaccaggcttccgggaaaattctcgcagcaacgtttagcaattgccggtggccggcgtggattcactgagcttgagcatg
accggttaccggcccaacgcgccaacggccgatggcaggtagcagcgggtagtccacggcagatgacccaacgacccccagcggc
tgatagatgatttggctgacccgggttgaaggcaatgcctacggcgcgctcgggaggggttcatccaacgcttgagggtttgctggcgtagtgaatg
ccatgcaggctggcagatcagttcggcgaagagggttctcggcactcgggtggcgaagtctcggctgatcgcagatcaacgctggcgttattg
ctgagcagatcccgcaggccttgagccattgtgacgtcgcagcggcggcggcgggattggcagcgtaggcagcgtgctgtgcgtaacagacc
ctggagttgatccagtgcctgagaatcttcaggtaggcaacgttggcagacat**ATGGCACCAGAGTAAAGAC**CAGCGAGCGTATT
GTGCAAACCAGCCTGGAGCTTTTTAACAGCAGGGCGAGCGCAGTATCAGACCAACCATATCGCCGCCATATG
GAAATTCGCCGGCAACCTGTACTACCACTTCCCAACAAGCAGGCGATCATCGCCGTGCTGTTTCGCGAGTACG
AAGCGCTGGTGGACAGTTTCTGCGTCCGCCCAAGGGCGTGCGATGCAGGTGGAGGATAAGCGTTTCTACCTGC
AAGCCGTATTGGCCGCATGTGGCGCTACCGTTTCTGCACCCGACCTTGAACCTGCTGGAAAGCGACCCGG
AATTGGCCACTGGCTATCGGCGTTTTCCAGCGTTGCTGATCCAGGGCGGCGCTATCTACCAGGGTTTGTGCA
TGCCGGCATTCTCAATATGGACCCGGTGCAAACCGAAGCCCTGACCCTGAATGCCTGGATTATCTCACGTCCTGG
GTGCGTTTTTGTGCACCACCAATGAGAATTCTGCCATCTGAGTGCCGAAGCGATCAAGCGCGGGGTGATCAG
GTGCTGGTGTGGAGGCCGCTTCGTCACGCCCCAGGCGAAAGACGCGGTGGACGCACTGTTCAAAGAATTTTAC
GTGCCATTGAATCAGGCACTGGAAGAAGTGAAGTAG

407bp PCR-product.

Gene 1 (lowercase): **coniferyl-aldehyde dehydrogenase**

Gene 2 (uppercase): DNA-binding transcriptional regulator, **AcrR family**

Figur E1. CTX-M gr. 2 primer med uønsket gensekvens.

CTX-M2

Escherichia coli beta-lactamase CTX-M-2 gene, complete cds.

>AY750915.1 Escherichia coli beta-lactamase CTX-M-2 gene, complete cds

```
ATGATGACTCAGAGCATTCCGCCGCTCAATGTTAACGGTGATGGCGACGCTACCCCTGCTATTTAGCAGCG
CAACGCTGCATGCGCAGGCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTGGAAGCCCTGGAGAAAAGTTCGGGAGGTTCG
GCTTGCGGTTGCGCTGATTAACACCGCCGATAATTTCGAGATTCTCTACCGTGCCGATGAACGTTTTGCG
ATGTGCAGTACCAGTAAGGTGATGGCGGCCGCGCGGTGCTTAAACAGAGCGAGAGCGATAAGCACCTGC
TAAATCAGCGCGTTGAAATCAAGAAGAGCGACCTGGTAACTACAATCCCATTGCGGAGAAAACACGTTAA
CGGCACGATGACGCTGGCTGAGCTTGGCGCAGCGCGCTGCAGTATAGCGACAATACTGCCATGAATAAG
CTGATTGCCCATCTGGGTGGTCCCGATAAAGTGACGGCGTTTGCTCGCTCGTTGGGTGATGAGACCTTCC
GTCTGGACAGAACCGAGCCCACGCTCAATACCGCCATTCCAGGCGACCCGCGTGATACCACCACGCCGCT
CGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACGCTGGGTAAAGCGCTGGCGGAAACTCAGCGGGCACAGTTG
GTGACGTGGCTTAAGGGCAATACTACCGGTAGCGCGAGCATTGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAG
TGGGCGATAAAACCGGCAGCGGAGATTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGAAAACCA
CGCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGGAAAGCCGTCGGGATATTCTG
GCTGCGGCGGCGAAAATCGTAACCCACGGTTTCTGA
```

404bp PCR-product.

CTX-Mgp2 primers.

Published in:

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2010 Mar;65(3):490-5. doi: 10.1093/jac/dkp498. Epub 2010 Jan 12.

Article is cited **188** times in PubMed (26.02.2018).

Author association:

Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Département de Bactériologie, Paris, France.

Figur E2. Primer CTX-M gr. 2 (404 bp) med ønsket gensekvens.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway