



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2019 30 stp**

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

# **Identifisering av $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) blant bakterieisolater fra vannkilder ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder**

Identification of broad-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL and carbapenemases) among bacteria isolated from water sources using phenotypical and genotypical methods.

Cecilie Fagerland

Matvitenskap

## ABSTRAKT

Den globale økningen av antibiotikaresistens (AB) regnes for å være en av de største helsetruslene verden står ovenfor. Verdens helseorganisasjon (WHO) har trukket frem Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae familien med  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL) og karbapenemaser (CRE) som en av de mest relevante brikkene i dette trusselbilde. Kunnskap står sentralt i kampen mot antibiotikaresistente bakterier (ARB). En holistisk tilnærming, som inkluderer miljøet, er nødvendig for å hemme utviklingen av AR.

Formålet med masteroppgaven var å søke etter tilstedeværelsen av bakterier med ESBL, inkludert karbapenemaser, i ulike vannkilder for å fremme kunnskapen om AR i miljøet.

Vannprøvene ble filtrerte og grodd på «OXOID Briliance™ ESBL» og «OXOID Briliance™ CRE» skåler. DNA fra bakterieisolatene ble ekstrahert og amplifisert i en «polymerase chain reaction» (PCR). Det ble benyttet tre multipleks primermikser for å lete etter ESBL gener og to for å detektere karbapenemaser. PCR-produktene ble kjørt på 1 % agarose gelelektroforese for å påvise DNA-bånd. Alle bakterieisolatene ble Sanger-sekvensert. De prøvene med positive DNA-bånd ble helgenomsekvensert med en MinION. Tilslutt ble det utført 13 disk diffusjonstester for å søke etter AR hos de helgenomsekvenserte bakteriestammene.

Det vokste frem åtte bakterieisolater på de selektive skålene. Sanger-sekvenseringen antydnet at det vokste frem bakterier fra andre familier (Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae og Alcaligenaceae) enn hva skålene selekterte for (Enterobacteriaceae). Prøve 2 og 3 hadde hvert sitt positive DNA-bånd som kodet for *bla*<sub>CTX-M</sub> (gr. 9), og disse to ble prøvene ble helgenomsekvensert. Etter helgenomsekvenseringen kunne det bekrefte at prøve 2 og 3 var *Escherichia coli* og tilhørte serotype O10:H32, men prøvene var ikke fra samme stamme. Begge *E. coli* stammene «multidrug» resistente (MDR) og patogen. Prøve 2 var en enteroaggregative *E. coli* (EAEC), mens prøve 3 kunne kategoriseres som en ekstraintestinale *E. coli* (ExPEC). Det viktigste antibiotikaresistente genet var et plasmidmediterte *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Ut fra funnene i oppgaven kunne det konkluderes med at det fantes MDR, patogen *E. coli* stammer med ESBL i Andedammen som ligger på campusen til Norges miljø- og biovitenskaplige universitet, og plasmidmeditert *bla*<sub>CTX-M</sub> hadde mest sannsynlig den størst innvirkningen på den observerte AR.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance (AR) is listed as one of the biggest health threats the world is facing. The World Health Organization (WHO) have pointed out Gram-negative bacteria from the Enterobacteriaceae family with extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and carbapenemases (CRE) as one of the biggest concern when it comes to spreading AR. Knowledge is essential in the war against the AR, and a holistic approach that includes the environment is necessary to reduce the spreading of AR.

The purpose of this thesis was to search for bacteria with ESBL, included carbapenemases, in different water sources to increase knowledge about what role the nature can play in spreading of AR.

The water samples were filtered and grown on OXOID Briliance™ ESBL and OXOID Briliance™ CRE petri dishes. DNA from the bacterial isolates was extracted and amplified in a polymerase chain reaction (PCR). It was used three multiplex primermixes to search for ESBL-gens and two to look for carbapenemases. 1 % agarose gelelectrophoresis was used to detect positive DNA-bonds. All the isolates were Sanger-sequenced. The samples with positive DNA-bonds was nanopore sequenced with a MinION. Finally, a disk diffusion test with 13 antibiotic test strips was conducted to search for AR.

Eight isolates grew on the selective petri dishes. The Sanger-sequencing results indicated that bacteria from other families (Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae and Alcaligenaceae) then the Enterobacteriaceae could grow on the selective petri dishes. Sample 2 and 3 each had a positive DNA-bond which encoded for *bla*<sub>CTX-M (gr. 9)</sub>. These two samples where whole genom sequenced, and after that, it could be stated that sample 2 and 3 were both *Escherichia coli* and belonged to the serotype O10:H32, but they were not from the same strain. Both off the *E. coli* stains were multidrug resistant (MDR) and pathogenic. Sample 2 was categorised as an enteroaggregative *E. coli* (EAEC) while sample 3 was an extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). The most important AR gen was a plasmid-meditate *bla*<sub>CTX-M</sub>.

It could be concluded MDR, pathogen *E. coli* stains with ESBL could be found in the «Andedammen» situated the campus of the Norwegian university of life science, and a plasmid-meditate *bla*<sub>CTX-M</sub> was most likely the reason for a lot of the observed AR

## FORORD

Denne oppgaven ble utført som et avsluttende prosjekt ved mastergradstudiet i matvitenskap ved Norges miljø – og biovitenskapelig universitet (NMBU). Den er en del av et større prosjekt som heter «Karakterisering av høynivå antibiotikaresistens mekanismer i matkjeden» og ble påbegynt i 2016 med NMBU i spissen. Oppgaven har vært givende og utfordrende, da det er masse informasjon om antibiotikaresistens der ute og mange nye begreper å tilegne seg.

Jeg har fått hjelp av en rekke mennesker i denne masterprosessen, og den første jeg vil takke er min veileder Dr. Bjørn-Arne Lindstedt. Han har svart på alle mine spørsmål, uansett hvor dumme de har vært. Han har alltid stilt opp med godt humør og kloke ord. Videre vil jeg også rette en kjempestor takk til førsteamanuensis Hilde Marit Østerli for all konstruktiv kritikk og gode tilbakemelding på mitt skriftlige arbeid, du har vært unik. Jeg vil også rette en enorm takk til Dr. Roger Meisal for utmerket hjelp ved behandling av rådataen etter helgenomsekvenseringen fra MinION. Dessuten fortjener stipendiat Misti Dawn Finton umåtelig mye ros. Hun har vært til uvurderlig hjelp gjennom hele masterprosessen. Hennes støtte har vært helt avgjørende på lab og ved skriving av masteroppgaven, da hun har gitt råd og tips etter beste evne.

Tilslutt vil jeg rette en stor takk til Oda Karin Ytreøy som jeg utført forsøket sammen med. Hennes gode humør og pågangsmot har vært særdeles motiverende, selv om hun til tider var i ammetåken. På tampen vil jeg også rette en stor takk til Silje Holm og min mor for korrekturlesing, samt min far for teknisk assistanse.

Oslo, 14 mai, 2019

---

Cecilie Fagerland

## FORKORTELSER

ACT	AmpC (ampicillinase C) navngitt etter hvilken $\beta$ -laktamase den bryter ned - AmpC
APEC	Avian patogenisk <i>Escherichia coli</i>
ARMA	«Antimicrobial Resistance Mapping Application»
AmpC	Ampicillinase C
AR	Antibiotikaresistens
ARB	Antibiotikaresistente bakterier
ARG	Antibiotikaresistente gen
ARM	Antibiotikaresistente mekanismer
BCCD	«BC Centre for Disease Control»
<i>bla</i>	$\beta$ -laktamasegen
bp	Basepar
C	Cytosin
CMY	AmpC navngitt etter hvilket antibiotikum det utviser resistens mot- cefoxitin (cefamycin)
CRE	Karbapenemresistente bakterier fra Enterobacteriaceae familien
CTX-M	Cefotaksimase
DEC	Diarégenisk <i>E. coli</i>
ECDC	«European Centre of Disease Prevention and Control»
ECOFF	Ecological Cut-OFF
EMA	«The European Medicines Agency»
<i>erm</i>	Erytromycin ribosom metylase
ESBL	$\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum
EUCATS	«European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing»
ExPEC	Ekstraintestinale <i>Escherichia coli</i>
ddNTP	Dideoksynukleotid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotid
G	Guanin
<i>gyrA</i>	GyraseA
HGT	Horisontal genoverføring
IMP	Impenemase

KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -karbapenemaser
MBC	«Minimal bacteriosid concentration» (bakteriosid effekt)
mdf(A)	Membranprotein
MDR	«Multidrug» resistente
MFS	«The major facilitator superfamily»
MGE	Mobile gen elementer
MIC	«Minimum bacterial concentration» (bakteriostatisk effekt)
MIR	AmpC navngitt etter hvor det ble funnet – Miriam sykehuset i Providence, Rhode Island
mph(A)	Makrolid 2'-fosfattransferase
MRSA	Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NCBI	«National Center for Biotechnology Information Search database»
NCCLS	«National Committee for Clinical Laboratory Standards»
NDM	New Delhi metallo- $\beta$ -laktamase
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NMEC	Neonatal meningitt <i>Escherichia coli</i>
NORM	Norges overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	NORM - Veterinærinstituttet
OXA	Oxacillinace
PBP	Penicillinbindende proteiner
pAmpC	Plasmid Ampicillinace C
kAmpC	Kromosome Ampicillinace C
parC	DNA topoisomerase IV
PCR	«Polymerase chain reaction»
qnrS1	Fluorokinolonresistens klass 1
RDP Classifier	«Ribosomal Database Project Classifier»
RNA	Ribonukleinsyre
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
SHV	Sulfhydryl-variabel $\beta$ -laktamase
ST	Sekvenstype
stx-bakteriofag	Shigatoksin bakteriofag
<i>sul</i> I	Sulfamidresistens gen
TEM	Temoineira betalaktamase
<i>tet</i> (A)	Tetrasyklinresistens protein klasse A

UPEC	Uropatogeniske <i>Escherichia coli</i>
VIM	Verona Integron kodet Metallo- $\beta$ -laktamase
WIMP	«What`s in My Pot?»
WHO	«Worlds Health Organization»

# INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>1</b>	<b>INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEKNISK TEORI</b> .....	<b>2</b>
2.1	ANTIBIOTIKA.....	2
2.1.1	<i>β</i> -laktam.....	5
2.2	ANTIBIOTIKARESISTENS .....	5
2.2.1	«Multidrug» resistens.....	8
2.2.2	Overføring av genetiske elementer.....	9
2.2.2.1	Transformasjon.....	9
2.2.2.2	Transduksjon .....	10
2.2.2.3	Konjugasjon .....	10
2.2.3	Antibiotikaresistente mekanismer .....	10
2.2.3.1	Enzymatisk inaktivering av antibiotika.....	11
2.2.3.1.1	CTX-M .....	12
2.2.3.1.2	TEM og SHV .....	13
2.2.3.1.3	Karbapenemase .....	14
2.2.3.2	Redusert opptak av antibiotika.....	15
2.2.3.3	Efflukspumper .....	16
2.2.3.4	Modifisering av målsete .....	17
2.2.4	Mobile genetiske elementer.....	17
2.2.4.1	Plasmid .....	17
2.2.4.2	Transposoner .....	18
2.2.4.3	Integron .....	18
2.3	ESCHERICHIA COLI .....	19
2.4	SPREDNING AV ANTIBIOTIKA OG ANTIBIOTIKARESISTENS TIL MILJØET .....	19
2.4.1	Spredningsvektorer i naturlige miljøer .....	24
2.4.2	Vannmiljøer.....	24
2.5	TILTAK MOT ANTIBIOTIKARESISTENS .....	25
<b>3</b>	<b>METODISK TEORI</b> .....	<b>27</b>
3.1	ESBL OG CRE SCREENING – EN FENOTYPISK METODE FOR PÅVISNING AV ANTIBIOTIKARESISTENS .....	27
3.2	KVALITETSKONTROLL OG KVANTIFISERING MED NANODROP™ SPEKTROFOTOMETER OG QUBIT 2.0® FLUOROMETER .....	28

3.3	PCR .....	28
3.4	SEKVENSERING .....	29
3.4.1	16S rRNA.....	30
3.4.2	Resultatbehandling av 16S rRNA.....	31
3.5	AGAROSE GELELEKTROFORESE .....	31
3.6	NANOPORESEKVENSERING MED MINION .....	32
3.7	ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING.....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL OG METODER.....</b>	<b>34</b>
4.1	MATERIAL.....	34
4.2	METODER.....	37
4.2.1	Behandling av vannprøvene .....	37
4.2.2	Isolering av DNA og nedfrysning av bakterier .....	38
4.2.3	Ekstrahering av DNA .....	39
4.2.4	Kvalitetssikring og kvantifiserings av DNA ved hjelp av Qubit® 2.0 Fluorometer og NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer.....	39
4.2.5	Multi- og singelpleks PCR.....	40
4.2.5.1	Agarose gelelektroforese.....	42
4.2.6	Sangersekvensering av 16S rRNA .....	44
4.2.6.1	16S rRNA PCR .....	44
4.2.6.2	Rensing av 16S rRNA PCR-produkter.....	45
4.2.6.3	Resultatbehandling av 16S rRNA PCR-produktene .....	45
4.2.7	Helgenomsekvensering med MinION.....	46
4.2.8	Antimikrobiell sensitivitetstesting .....	47
<b>5</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>48</b>
5.1	FENOTYPISKE RESULTATER SAMMENLIGNET MED SANGER-SEKVENSERINGEN AV 16S RRNA GENET OG HELGENOMSEKVENSERINGEN .....	48
5.2	KVALITET OG KVANTIFISERING AV DNAET TIL BAKTERIEISOLATENE, 16S RRNA PCR-PRODUKTENE OG SINGELPLEKS PCR-PRODUKTENE.....	52
5.3	AGAROSE GELELEKTROFORESE AV MULTI- OG SINGELPLEKS ESBL OG CAR.....	53
5.4	ANTIBIOTIKARESISTENTE GENER FRA ARMA .....	54
5.5	HELGENOMSEKVENSERINGSRESULTATER ETTER BEHANDLING MED CANU .....	55
5.5.1	Stammekarakterisering.....	57
5.6	DISK DIFFUSJONSTESTING .....	58

<b>6</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>60</b>
6.1	FENOTYPISK DETEKSJON AV ANTIBIOTIKARESISTENS .....	60
6.2	SEKVENSERING AV 16S rRNA .....	62
6.2.1	<i>Sammenligning av 16S rRNA-resultatene med fargescreeningen</i> .....	64
6.3	PÅVISNING AV ANTIBIOTIKARESISTENTE GEN MED AGAROSE GELELEKTROFORESE OG SANGER-SEKVENSERING.....	67
6.4	PÅVISNING AV BAKTERIESTAMMER OG ANTIBIOTIKARESISTENTE GEN ETTER HELGENOMSEKVENSERINGEN .....	69
6.4.1	<i>Kategorisering av bakteriestammene i prøve 2 og 3</i> .....	69
6.4.2	<i>Viktige antibiotikaresistente gener i prøve 2 og 3</i> .....	71
6.4.2.1	CTX-M ( $\beta$ -laktamresistens) .....	72
6.4.2.2	<i>tet(A)</i> (tetrasyklinresistens) .....	74
6.4.2.3	<i>mdf(A)</i> (MDR protein).....	75
6.4.2.4	TEM ( $\beta$ -laktamresistens).....	76
6.4.2.5	<i>mph(A)</i> (makrolidresistens) .....	77
6.4.2.6	<i>qnrS1</i> og <i>parC</i> (fluorokinolonresistens) .....	78
6.5	ANTIBIOTIKA SENSITIVITETSTESTING - DISK DIFFUSJON .....	80
6.5.1	<i>Refleksjoner knyttet til opphavet til antibiotikaresistensen</i> .....	84
<b>7</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>VIDERE ARBEID</b> .....	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>KILDEHENVISNING</b> .....	<b>88</b>

VEDLEGG 1: RDP Classifier resultater fra 16S rRNA

VEDLEGG 2: BLAST resultater fra 16S rRNA

VEDLEGG 3: Kvalitets- og kvantifiseringsresultater av DNA

VEDLEGG 4: Kvantifiseringsresultater av 16S rRNA

VEDLEGG 5: Bilder av agarose gelelektroforesen

VEDLEGG 6: ARMA-resultater fra helgenomsekvensering

VEDLEGG 7: Oppsummering av bearbeidede CANU-resultater

VEDLEGG 8: Antimikrobiell sensitivitetstesting

# 1 INNLEDNING

Antibiotika har vært et internasjonalt gode som store deler av verdens befolkning har nytt godt av i flere tiår, men den voksende antibiotikaresistensen (AR) de siste tiårene har satt den globale helsen, mattryggheten og utviklingen av det moderne samfunnet i fare WHO (2018). I 2012 fastslo verdens helseorganisasjon (WHO) at AR var en av de største helsetruslene verden står overfor (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Om trusselen ikke tas på alvor vil verden kastes tilbake til de såkalte «dark ages» hvor selv den minste infeksjon eller operasjon kan være dødelig (Davies & Davies, 2010). AR er ikke et nytt fenomen, og «antibiotikaensfar» Alexander Fleming, advarte om faren av overdreven bruk i sin nobeltale i 1945 (Zaman et al., 2017). Det finnes en rekke eksempler på at AR var et fenomen lenge før den antibiotisketidsalder (Sykes, 2010). Eksempelvis kan det stadfestet, basert på dens strukturelle oppbygning, at serine- og metallo- $\beta$ -laktamaser har vært tilstede i over to milliarder år, mens  $\beta$ -laktamaser har vært å finne på plasmider i millioner av år (Aminov, 2010). Grunnen til at oldtidens antibiotikaresistente bakterier (ARB) ikke skapte et større problem var at virulensen deres ikke var sterk nok til å dominere miljøet på samme måte som etter antibiotika ble tatt i bruk klinisk (Fernández & Hancock, 2013).

AR er en naturlig eller ervervet egenskap (Davies & Davies, 2010) som grunnet uforsvarlig og overdreven bruk i kombinasjon med mangel på nye antibiotika (Yazdankhah et al., 2013), har ført til en faretruende høy AR (Bruun et al., 2018). I denne sammenheng rettes i dag et spesielt fokus mot seks patogene mikroorganismer: vancomycinresistente enterokokker (VRE), meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Aspergillus-arter, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* og Enterobacteriaceae med  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL) (Chandra & Kumar, 2017). Flere forskningsgrupper er spesielt urolige for de Gram-negative bakteriene fra Enterobacteriaceae (hovedsakelig *Klebsiella pneumoniae*) familien, *P. aeruginosa* og *A. baumannii*. Grunnen er at disse bakteriene har en tendens å utvikle resistens mot flere typer antibiotika («multidrug» resistens, MDR) (ECDC/EMA, 2009; Helse- og omsorgsdepartementet, 2015; Holmes et al., 2015; Iredell et al., 2016). Bakterier med gen som koder for ESBL trekkes frem som en av de viktigste årsakene til utviklen av MDR (Davies & Davies, 2010), og slike gener kan erverves via horisontal genoverføring (HGT) (MacGowan & Macnaughton, 2017). Det finnes en rekke gener som koder for ESBL, og noen stammer fra mutasjoner av velkjente plasmidmediterte  $\beta$ -laktamaser (eksempelvis TEM eller SHV), mens andre kommer fra kromosomet til miljøbakterier (CTX-M fra *Kluyvera* spp.) (Wellington et al., 2013). Bakterier med ESBL har evnen til å spre seg

hurtig og dette har ført til at legene må ta i bruk sterkere og mer toksiske antibiotika (karbapenem) for å behandle ulike infeksjoner (Nordmann et al., 2012). Dessverre tilpasser bakteriene seg hurtig og en gryende karbapenemresistens er å detektere. Dette er svært lite heldig fordi mange av karbapenemasene regnes for «siste utveismedisiner», og total resistens mot disse vil få katastrofale konsekvenser for verden slik vi kjenner den i dag (Codjoe & Donkor, 2017).

Utviklingen av ESBL har vært dramatisk siden starten av 2000-tallet, og ansees for å være en av de mest signifikante hendelsene inne den antibiotiske æraen (Wellington et al., 2013). Det er ikke mulig å stoppe denne uheldige utviklingen AR, men den kan hemmes (WHO, 2018). For å få til dette er det viktig med en holistisk tilnærming til problemet, og et av de viktigste elementene er å øke kunnskapsnivået og bevissthet rundt AR (WHO, 2018). Det har tidligere vært et høyt fokus på antibiotikabruk i sykehus, industrien og landbruk, men de siste årene er det registrert en økende interesse for miljøets plass i utviklingen av AR (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Høyt seleksjonspress i miljøet vil kunne fremme tilstedeværelsen av antibiotikaresistente bakterier (ARB) og antibiotikaresistente gener (ARG) (Edgar & Bibi, 1997; Huerta et al., 2013), og gjøre naturen til en «hot spot» for deling av gener mellom patogene og apatogene bakterier (Forsberg et al., 2012; He et al., 2016). Vann er en spesielt utsatt miljønisje fordi antibiotika, ARB og ARG kan kontinuerlig komme i kontakt med ulike vannkilder (Waseem et al., 2017).

Formålet med denne masteroppgaven var å søke etter tilstedeværelsen av bakterier med ESBL, inkludert karbapenemaser, i ulike vannkilder for å fremme kunnskapen om AR i miljøet.

## **2 TEKNISK TEORI**

### **2.1 Antibiotika**

Fleming (1929) oppdaget penicillinet i sitt laboratorium 3. september 1928, og alt i 1941 ble den første pasienten, en politimann med en livstruende blodforgiftning, behandlet med penicillin (Yazdankhah et al., 2013). Andre verdenskrig var en pådriver til en rask utvikling av penicillin, og siden den gang har antibiotika blitt sett på som en av de største hendelsene i nyere medisinhistorien (Zaman et al., 2017). Antibiotikum som sulfonamider og  $\beta$ -laktam har

ført til en anselig reduksjon av sykdomstilfeller og en fantastisk utvikling innenfor medisinske behandlinger (Chandra & Kumar, 2017). I dagens samfunn er antibiotika et av de mest sentrale medikamentene i forebyggingsarbeid og behandling av bakterielle infeksjoner hos dyr og mennesker (O'Neill, 2016). Antibiotika regnes som et forholdsvis nytt medikament, men det er gjort flere funn som indikerer at medikamentet har vært benyttet lenge før det ble «oppdaget» (Aminov, 2010). Bassett et al. (1980) fant rester av tetrasyklin i menneskeskjeletter fra Sudan som kan dateres tilbake til 350-550 før Kristus, og funnene kan kun forklares ved at antibiotika var en del av den humane dietten. Falkinham et al. (2009) fant aktinobakterier (antibiotikaproduserende bakterier) og aktinomysin C2 og C3 (antibiotikakomponenter) i «rød» jord fra Jordan som i sin tid ble brukt til å kurere hudinfeksjoner. Det er dessuten funnet qinghaosu (antimalariamiddel) i Artemisiaplanten, som har vært benyttet i kinesisk naturmedisin i tusenvis av år (Aminov, 2010).

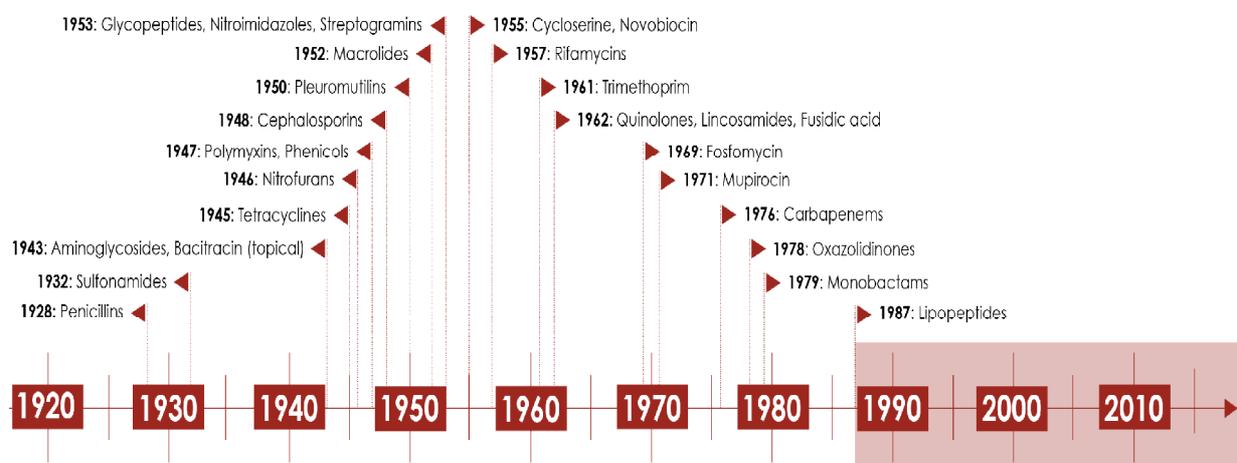
Det var Paul Ehrlich sine tanker rundt «den magiske kulen» som var innledningen til den antibiotiske æraen. Idéen bak den magiske kulen var at virkestoffet skulle angripe de patogene bakteriene og la de friske være (Yazdankhah et al., 2013). Antibiotika betyr «imot liv» (Chandra & Kumar, 2017), og benevnelsen ble for første gang benyttet av Selman Waksman i 1942 (Yazdankhah et al., 2013). Betegnelsen kan brukes om en hvilken som helst klasse av organisk molekyl som virker hemmende (bakteriostatisk) på en bakteriecelle eller dreper (baktericid) den (Davies & Davies, 2010). Mengden antibiotika som skal til for å gi en bakteriostatisk eller bakteriocid effekt varierer mellom de ulike bakteriene. Minimumsdosen som skal til for å skape en bakteriostatisk effekt kalles «minimum inhibitory concentration» (MIC), mens den laveste dosen antibiotika som skal til for å gi en bakteriocid effekt kalles «minimal bacteriocid concentration» (MBC) (Iredell et al., 2016).

Antibiotika er sekundære metabolitter (Chandra & Kumar, 2017) som dannes naturlig av mikroorganismer som muggsoppen *Aspergillus niger* i den stasjonære fasen (Madigan et al., 2015). Produksjon av antibiotika er en overlevelsesmekanisme bakteriene anvender for å tilpasse seg ulike miljøer og utkonkurrere andre mikroorganismer (Sykes, 2010). Grunnet sin svært heterogene sammensetning er jord et stort reservoar for antibiotikaproduserende mikrober (Falkinham et al., 2009), og det er funnet både  $\beta$ -laktam-, aminoglykosid-, streptomycin- og tetrasyklinproduserende mikroorganismer i jord (Chandra & Kumar, 2017). I starten ble det hovedsakelig benyttet naturlige antibiotikum som ble benyttet, men i nyere tid har farmasiindustrien greid å fremstille nye antibiotika som er delvis eller helt syntetiske (ikke

vanlig). Sulfonamider og fluorokinoloner er to av de få antibiotikaene som kan fremstilles 100 % syntetisk (Holmes et al., 2015).

Det er vanlig å dele antibiotika inn i ulike klasser basert på virkningsmekanismer, strukturell oppbygning, toksisitet og virkningsspektrum (Davies & Davies, 2010). Det finnes utallige måter å kategorisere antibiotika (Davies & Davies, 2010; Iredell et al., 2016; Kapoor et al., 2017; Shaikh et al., 2015), men Kapoor et al. (2017) deler antibiotika inn i fire hovedklasser. (I) de som inhiberer celleveggsyntesen (for eksempel  $\beta$ -laktam antibiotika som penicillin og cefalosporin) (II) de som kan inhiberer proteinsyntesen (for eksempel tetrasykliner, makrolider og aminoglykosider) (III) antibiotikagruppen som kan virke inn på nukleinsyresyntesen (for eksempel kinoloner) (IV) gruppen antibiotika vil kunne inhibere syntesen av folsyre (for eksempel sulfonamider og trimetoprim).

Gullalderen for utvikling av antibiotika strakte seg fra 1950 til 1970 (se figur 2.1) (Davies & Davies, 2010). Fra midten av 60-tallet stagnerte utviklingen, og siden 1987 har det ikke vært utviklet antibiotika med nye virkningsmekanismer (Yazdankhah et al., 2013). Denne nedgangen skyldes hovedsakelig at det er dyrt og lite økonomisk gunstig for farmasiindustrien å utvikle nye antibiotikum (Davies & Davies, 2010). Bakteriene utvikler hurtig resistens, og en antibiotikakur er forholdsvis kort i forhold til andre kurer. Dette gjør at inntektene fra salg av antibiotikakurer gir forholdsvis lav profitt i forhold til inntektene farmasiindustrien kan hente fra lengre behandlingkurer (Yazdankhah et al., 2013). Farmasiindustrien har derfor valgt å fokusere på andre medisiner som gir større avkastning (MacGowan & Macnaughton, 2017; Ventola, 2015).



Figur 2.1. Skjematisk fremstilling som viser utvikling av antibiotika fra penicillin i 1928 til lipopeptider i 1987 (ReAct, 2015).

Et av de største utfordringene ved redusert utvikling av nye antibiotika er at de som finnes på dagens marked er i ferd med å miste sin funksjon. Det er stor internasjonal enighet om at den beskjedne utviklingen av antibiotika har vært med på å fremme den uheldige resistensutviklingen (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015; O'Neill, 2016; WHO, 2018). Dette fordi mesteparten av antibiotikumet som er å finne på dagens marked stammer fra samme økologiske nisjer og taksonomiske gruppe, nemlig *Actinomyces* spp. som finnes i jord. I tillegg stammer virkningsmekanismene til all antibiotika fra de samme cellulære prosessene som deres naturlige og syntetiske forgjengere (Aminov, 2010). Bakteriene har derfor ikke noe problem med å gjenkjenne de antibiotiskemidlene og mekanismene deres, og vil derfor hurtig utvikle resistens mot flere av medikamentene (Iredell et al., 2016). På bakgrunn av dette er det behov for å finne nye antibiotika med nye virkningsområder (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015; O'Neill, 2016; WHO, 2018). Forskere som Aminov (2010) mener at vann og/eller peptider i dyr og planter kan være potensielle kilder til nye antibiotikum. Forskeren fremmer nytenkning, og mener at nye antibiotika kanskje ligger utenfor de tradisjonelle antibiotiskeklassene.

### 2.1.1 $\beta$ -laktam

$\beta$ -laktam er en av de vanligste formene for antibiotika, og benyttes i behandling av infeksjonssykdommer som skyldes Gram-negative og Gram-positive bakterier (Shaikh et al., 2015). Penicillin, karbapenem og cefalosporin er noen av de vanligste  $\beta$ -laktamene (Codjoe & Donkor, 2017). Den viktigste forsvarsmekanismen til  $\beta$ -laktam er  $\beta$ -laktamringen som gir beskyttelse mot de fleste  $\beta$ -laktamaser (enzym som bryter ned  $\beta$ -laktam) som metallo- $\beta$ -laktamase (MBL) og ESBL (Davies & Davies, 2010).  $\beta$ -laktam er hovedsakelig rettet mot penicillinbindende proteiner (PBP) som styrker celleveggen ved å fremme kryssbindinger mellom D-alanyl-alanin og glysinrester. Det er hypotisert at  $\beta$ -laktamringen etterligner D-alanyl-D-alanin-delen i peptidkjeden, og om PBP er bundet til  $\beta$ -laktamringen vil de ikke kunne være en del av syntetiseringen av ny peptidoglykan til celleveggen. Dette vil svekke cellen slik at den etterhvert vil lyserer (Kapoor et al., 2017).

## 2.2 Antibiotikaresistens

AR er en naturlig mekanisme som kan manifestere seg i alle typer mikrober, både bakterier virus, sopp og parasitter (O'Neill, 2016), men i denne oppgaven er det i hovedsak snakk om

resistens i bakterier. Resistens betyr motstand (Vitenskapskomiteen for mat og miljø, 2017), og de fleste mikroorganismer som danner antibiotika har også gener som koder for resistens (Allen et al., 2010). Det oppstår resistens når et antibiotikum mister evnen til å inhibere bakterieveksten eller drepe bakteriecellen (Shaikh et al., 2015). Det skilles hovedsakelig mellom to typer resistens, naturlig og ervervet (Davies & Davies, 2010). Naturlig resistens, også kalt iboende resistens, er en naturlig del av bakteriens overlevelsesmekanisme (Iredell et al., 2016). Iboende resistens skjer gjennom vertikal genoverføring (Gaustad, 2001) og kan kun arves, ikke overføres til andre bakterier (MacGowan & Macnaughton, 2017). Et av de mest kjente eksemplene er tilstedeværelsen av  $\beta$ -laktamaser i bakterieisolater fra avsidesliggende områder som kan dateres flere millioner år tilbake (Hasnain et al., 2017). Et annet eksempel er den naturlige kolistinresistensen blant Gram-positive bakterier (MacGowan & Macnaughton, 2017).

Ervervet resistens kan utvikles gjennom mutasjoner eller ved overføring av resistensgen fra omgivelsene og/eller andre bakterier (Davies & Davies, 2010). Spontane mutasjoner oppstår tilfeldig ved en replikasjonsfeil eller lignende (Thougaard et al., 2009), mens bakterier kan utvikle adaptive mutasjoner ved høy eksponering av antibiotika (Gniadkowski, 2008). Det er eksempelvis påvist at *Escherichia coli* populasjoner, som overlever en lav konsentrasjon ciprofloxacin (<MIC), vil inneholde ciprofloxacinfølsomme celler med en viss veksthemning og resistente mutanter (Gaustad, 2001). Overføring av resistensgen derimot, skjer via horisontal genoverføring (HGT) mellom bakterier fra samme art eller mellom ulike arter (Zaman et al., 2017). HGT kan også oppstå mellom like eller ulike slekter, og mellom Gram-negative og Gram-positive bakterier (Gaustad, 2001). HGT kan medføre spredning av resistensgener mellom forskjellige bakteriepopulasjoner i ulike verter og mellom populasjoner i forskjellige økosystemer (Steinbakk et al., 2014). Det er stor enighet blant forskere at ervervet AR øker ved hyppig eksponering av antibiotika (Cantón & Morosini, 2011). Andre faktorer som kan påvirke utviklingen av ervervet AR er feil bruk av antibiotika, dårlig kunnskap om AR, mye bredspektret antibiotika, reising, importert mat og dårlig forbygning av infeksjoner (WHO, 2018). Dessuten trekkes biofilm frem som et «hot spot» for deling og opptak av resistens mellom ulike bakterier (Canteón, 2009).

I tillegg til hyppig eksponering av antibiotika er det gjort funn som viser at enkelte antibiotika gir større sannsynlighet for å utvikle resistens enn andre. Dette gjelder spesielt for fluorokinoloner (bredspektret antibiotika) som påvirker nukleinsyremetabolismen. Siden

fluorokinoloner vil virke forstyrrende på bakterienes proteinoppbygning, vil bakteriene svare med økt mutasjonsrate og økt deling av plasmider med resistensgener mellom bakteriene. Dette vil kunne høyne resistensnivået. Andre bredspektrede antibiotika som tetrasykliner, cefalosporiner (2. og 3. generasjon) og karbapenem vil også kunne føre til økt AR (Helsedirektoratet, 2013). Problemet med bredspektret antibiotika er at de ikke er laget for å treffe det sykdomsfremkallende agens. Bredspektret antibiotikum er mer generelle medikamenter som kan virke inn på en rekke Gram-negative og Gram-positive bakterier i kroppen, som bakteriene lokalisert i gastrointestinal-(GI)-tractus (den delen av fordøyelseskanalen hvor næringsstoffer og vann resorberes) (Smith et al., 2015). Bruken av bredspektret antibiotika vil øke seleksjonspresset, noe som igjen vil kunne resultere i økt AR og fremme utviklingen av «multidrug» resistens (MDR). Et høyere resistensnivå hos bakteriene vil gjøre behandlingsprosessen mer komplisert (Zaman et al., 2017). Det er derfor ønskelig å bruke mer smalspektret antibiotika som er mer spesifikt i sin virkningsmetode, og retter seg mot de utvalgte sykdomsfremkallende bakteriene (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015).

Diskusjonen rundt AR er svært dagsaktuell fordi utviklingen har vært urovekkende høy (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015), og det er spesielt sykdommer som blodforgiftning, lungebetennelse, tuberkulose og gonoré som er berørt av ARB (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Utvikling av AR ansees som svært lite heldig fordi det vil bli vanskeligere å behandle selv den minste infeksjon (Davies & Davies, 2010). Et høyere resistensnivå vil føre til at legene må skrive ut mer og sterkere antibiotika, samt at pasienten må gå gjennom en lengre behandlingsperiode. Et stadig stigende forbruke av fosfomycin, temocillin, kolistin og pristinamycin som regnes for «gamle» antibiotika, og som i sin tid ble fjernet fra markedet på grunn av sin toksisitet, er et tydelig tegn på at AR alt har etablert seg i samfunnet (MacGowan & Macnaughton, 2017). En av de største utfordringene med dette er at AR ofte fører til høyere morbiditet og mortalitet (Astrup et al., 2014). Det er spesielt de kompliserte medisinske tilfellene som organtransplantasjoner og cellegiftbehandling som vil påvirkes av antibiotikaresistente bakterier (ARB) (Ventola, 2015). Grunnen er at disse pasientene har et svært nedsatt immunforsvar, og vil være lettere mottakelig for de uønskede bakteriene (Zaman et al., 2017).

Et av de største problemene med ARB er at de vil kunne fortsette å formere seg og leve videre i verten under og etter selve behandlingen. På denne måten kan ARB bli dominerende i

vertens naturlige tarmflora fordi de ARB er mer motstandsdyktige enn de andre bakteriene, men ikke alle ARB vil gjøre verten syk (Zaman et al., 2017). Noen ARB vil ikke påvirke verten ytterligere. De vil bare leve i tarmen til verten uten å gi symptomer, og slike verter kalles «friske smittebærere». Problemet med friske smittebærere er at de kan smitte andre mennesker, samt spre antibiotikaresistente gen (ARG) og ARB til miljøet (Allen et al., 2010). Studier viser at antallet friske smittebærere har økt i takt med AR infeksjoner, noe som igjen vil kunne fremme resistensutviklingen i samfunnet (Astrup et al., 2014). Andre ARB vil leve i harmoni med de andre bakteriene i normalfloraen og være helt ufarlige frem til verten blir syk. Slike bakterier kalles opportunistiske og vil gjøre behandlingsprosessen langt mer komplisert (Helsedirektoratet, 2013).

### 2.2.1 «Multidrug» resistens

I Europa dør det rundt 25000 mennesker i året av MDR bakterieinfeksjoner (ECDC/EMEA, 2009), og det er estimert at i 2050 vil 10 millioner dø årlig (O'Neil, 2016). MDR kan defineres som en bakterie med resistens mot tre eller flere antibiotika, men det finnes også bakterier som er ekstremt resistente (XDR) og de som er fullstendig resistente (PAN) mot alle typer antibiotiske agenter (Magiorakosa et al., 2012). *Mycobacterium tuberculosis*, som forårsaker tuberkulose, er et av de beste eksemplene på en slik bakterie (MacGowan & Macnaughton, 2017). *M. tuberculosis* XDR-TB er resistente mot fire eller flere antibiotika, mens TDR-TB er totalt resistente mot all type antibiotika (Davies & Davies, 2010). Faren med at MDR øker, er at sjansen for å kunne kurere pasienten reduseres og behandlingstiden vil gå opp. For eksempel vil behandlingstiden av tuberkulose gå fra seks måneder til 20 måneder om infeksjonen skyldes MDR bakterier (MacGowan & Macnaughton, 2017).

Forklaring til hvorfor MDR oppstår ligger i bakteriens evne til å spre sine gener gjennom HGT (Iredell et al., 2016). «European Centre of Disease Prevention and Control (ECDC)» beskriver at MDR oppstår ved at integroner og transposoner overfører genetiske kassettsystemer som inneholder gener som koder for resistens (Magiorakosa et al., 2012). I disse kassettsystemene akkumuleres og spres resistensen som en samlede «resistenspakke» mellom ulike bakterier via plasmider. Ved å samle ulike resistensgener på samme genetiske element vil det tilrettelegges for overføringen av MDR. Siden flere ARG kan linkes til hverandre vil kun en antibiotikakur være nok for å utvikle resistens mot flere antibiotika (Helsedirektoratet, 2013). Det har dessuten vist seg at mobile genetiske elementer (MGE) som inneholder AR ofte inneholder gener som koder for resistens mot andre toksiske komponenter

(koresistens), noe som kan fører til koseleksjon (Singer et al., 2016). Koseleksjon oppstår på grunn av koresistens eller kryssresistens. Kryssresistens er når en enkelt antibiotikamekanisme er ansvarlig for resistens mot to eller flere forbindelser, mens koresistens oppstår når flere resistensmekanismer sitter på samme MGE og fører til resistens mot flere toksiske stoffer samtidig (Baker-Austin et al., 2006). Et av problemet med koseleksjon er at bruken av soppdrepende midler, desinfeksjonsmiddel, nitrogengjødsel og/eller tungmetaller kan fremme MDR (Holmes et al., 2015).

### 2.2.2 *Overføring av genetiske elementer*

Bakterienes omfattende evne til å spre sitt eget deoksyribonukleinsyre (DNA) er en av årsakene til at de dominerer de fleste økosystemer (Sykes, 2010). Spredning av gener skjer hovedsakelig gjennom de tre formene for HGT som transformasjon, transduksjon og konjugasjon (Munita & Arias, 2016). I alle HGT introduseres DNA-sekvenser fra en donorcelle til en mottakercelle, hvor DNA-sekvensen deler noe eller ingen homologi med DNAet til mottakercellen. Det ervervede DNAet kan forbli utenfor kromosomet (ekstrakromosomalt) på plasmider eller det kan integreres på kromosomet (Sykes, 2010).

#### 2.2.2.1 Transformasjon

Transformasjon er kanskje den simpleste formen for HGT, men det er kun utvalgte bakterier (kompetente) som kan gjennomføre denne prosessen naturlig (Munita & Arias, 2016). Bakterier som *E. coli* kan kun gjennomgå transformasjon under bestemte betingelser i et laboratorium (Thougaard et al., 2009), mens transformasjon er en vanlig egenskap hos pneumokokker og *Nisseria* spp. (Helsedirektoratet, 2013). En transformasjon starter med at en bakteriecelle tar opp et stykke fritt DNA fra miljøet og inkorporerer det i sitt eget arvematerialet gjennom homolog rekombinering (Madigan et al., 2015). Det frie DNAet kan stamme fra bakteriekromosom eller plasmider, og plukkes opp fra lyserte og levende celler (Sykes, 2010). Grunnet den homologe rekombinering skjer transformasjon hovedsakelig mellom nært beslektede arter, men prosessen kan også oppstå mellom ulike arter og slekter. Det er ikke observert transformasjon mellom Gram-negative og Gram-positive bakterier (Gaustad, 2001).

#### 2.2.2.2 Transduksjon

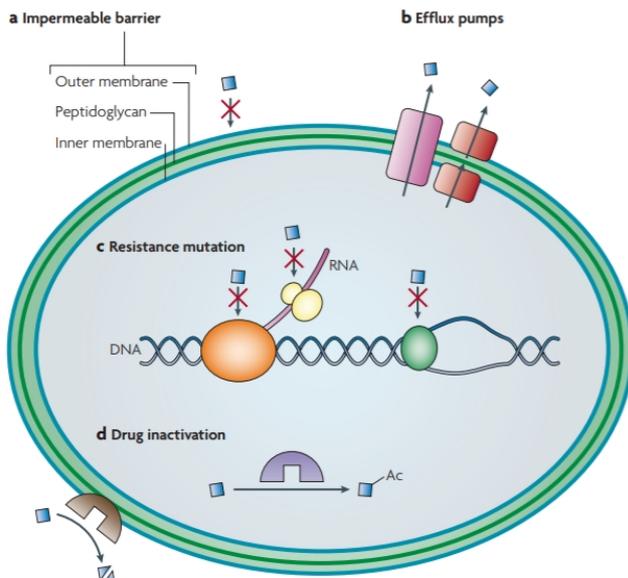
I motsetning til transformasjon, vil en transduksjon forekomme ved at en bakteriofag (bakterievirus) overfører genmaterialet til en mottakercelle (MacGowan & Macnaughton, 2017). Helsedirektoratet (2013) opplyser om at transduksjon mest sannsynlig er årsaken til at meticillinresistente gen overføres mellom stafylokokker. Under transduksjon vil bakteriofagene bruke bakteriecellen til å replikere sitt eget DNA, og når bakteriecellen har dannet nok replikater lyserer cellen. Viruset vil da få spredt sitt DNA til omgivelsene (Thougaard et al., 2009). Enkelte ganger gjør viruset en feil og innkapsler et DNA-fragment fra donorcellen istedenfor sitt eget. Dette kalles en transduserende partikkel. Denne partikkelen kan feste seg til en ny mottakercelle, og inkorporeres i dens DNA ved homolog rekombinering (Madigan et al., 2015). Bakteriofagen er vertsavhengig, og derfor er denne mekanismen mest gjeldene hos nært slektede bakteriearter (Gaustad, 2001).

#### 2.2.2.3 Konjugasjon

Den tredje metoden for HGT kalles konjugasjon. Overføring av DNA skjer gjennom direkte celle-til-celle kontakt ved hjelp av en spesiell utvekst kalt sex-pilus, og regnes som den viktigste av de tre HGT i forhold til spredning av resistens (Munita & Arias, 2016). Det som skjer under konjugasjon er at donorcellens sex-pilus vil finne reseptorer i overflaten til mottakercellen og trekke mottakercellen til seg. Arvematerialet kan så overføres gjennom sex-pilusen (Thougaard et al., 2009). Det er hovedsakelig plasmider (konjugative-plasmider) som overføres under konjugasjon, men også transposoner og biter av bakteriekromosomet kan overføres (Munita & Arias, 2016). Konjugasjon kan føre til spredning av resistens mellom et vidt spekter av bakterieslekter og -arter (Wellington et al., 2013).

### 2.2.3 *Antibiotikaresistente mekanismer*

De fire vanligste mekanismene knyttet til AR er enzymatisk degradering, redusert opptak av antibiotika, efflukspumper og forandring av målsetet (se figur 2.2) (Shaikh et al., 2015). Mange bakterier benytter seg av to eller flere av disse mekanismene samtidig for å hindre antibiotikumet å nå sitt mål (Munita & Arias, 2016). Hvilke mekanismer bakteriene anvender varierer mellom de ulike slektene og artene (MacGowan & Macnaughton, 2017). Eksempelvis vil fluorokinolonresistente bakterier modifisere målsetet, pumpe ut antibiotikumet med efflukspumper og redusere permeabiliteten i cellemembraner ved å hindre porinene å plukke opp antibiotika på en og samme tid (Munita & Arias, 2016).



Figur 2.2. Skjematisk fremstilling av de fire viktigste ARM i en bakteriecelle. For det først kan poriner (B) som er lokalisert i den ytre cellemembranen i Gram-negative bakterieceller selekter hvilke stoffer som slippes inn i cellen, mens efflukspumper (B) sitter i cytoplasmamembranen og kan pumper ut toksiske stoffer. Vider kan mutasjoner (C) føre til modifisering av målsetet slik at antibiotikumet ikke når frem til sitt dedikerte mål. Tilslutt finnes enzymer  $\beta$ -laktamaser som kan hydrolysere  $\beta$ -laktam (D) (Allen et al., 2010).

### 2.2.3.1 Enzymatisk inaktivering av antibiotika

I følge Munita and Arias (2016) er enzymatisk nedbrytning det viktigste våpenet bakteriene har i kampen mot antibiotika. De tre mest sentrale enzymene er  $\beta$ -laktamase, aminoglykosidmodifiserte enzymer og kloramfenikol acetyltransferase (Shaikh et al., 2015).  $\beta$ -laktamaser er den mest omtalte enzymgruppen, og ble beskrevet alt før de ble klinisk observert (Aminov, 2010). Enzymene har evnen til å hydrolysere nesten alle varianter av  $\beta$ -laktamer med en ester og en amidbinding (Codjoe & Donkor, 2017). Det er identifisert rundt tussen  $\beta$ -laktamaser i dag (Munita & Arias, 2016), og det er vanlig å klassifisere  $\beta$ -laktamasene inn i klasser basert på struktur (Ambler) eller funksjon (Bush–Jacoby–Medeiros) (Shaikh et al., 2015).

Gen som koder for dannelsen av  $\beta$ -laktamase kan ligge i bakteriekromosomet eller på MGE (plasmider eller integron) (Munita & Arias, 2016).  $\beta$ -laktamasegen overføres via transposoner, men de er også funnet i integroner (Giedraitienė et al., 2011).  $\beta$ -laktamasegen kalles *bla* etterfulgt av navnet for det enkelte enzymet (for eksempel *bla*<sub>TEM-1</sub>) (Munita & Arias, 2016). Enkelte av  $\beta$ -laktamasene virker bredspektret, mens andre er mer smalspektret. ESBL er en bredspektret enzymgruppe med en voksende resistens mot mange av de viktigste  $\beta$ -laktamantibiotika som penicillin, cefalosporin, monobaktam og karbapenem (Ventola, 2015). Enkelte ESBL har utviklet en total resistens mot penicillin og cefalosporin, og derfor

er det nødvendig til å benytte karbapenem (Shaikh et al., 2015). Dette er svært lite heldig siden denne gruppen antibiotikum er såkalte «siste utveis medikamenter». Om bakteriene utvikler en total resistens mot denne typen antibiotika vil det kunne få katastrofale konsekvenser for den globale helsen (Codjoe & Donkor, 2017). Det er spesielt hos tarmbakterier fra Enterobacteriaceae (*E. coli* og *K. pneumoniae*) familien og ikke-fermentative bakterier som *Acinetobacter* spp. og *Pseudomonas* spp. med ESBL som skaper store problemer (MacGowan & Macnaughton, 2017). ESBL ble originalt knyttet til nosokomiale patogener, men er blitt mer vanlige å finne utenfor helseinstitusjoner (Smith et al., 2015). Dette skyldes hyppigere bruk av karbapenem, koseleksjon for antibiotika, friske smittebærere og andre spredningsvektorer (Hrabák et al., 2014). ESBL er ofte MDR (Naas et al., 2011), og kan derfor knyttes til høy morbiditet og mortalitet (Folkehelseinstituttet, 2012a). Fra et norsk ståsted er prevelansen av ESBL forholdsvis lav, men det registreres stadig flere tilfeller av ESBL-infeksjoner som trolig ikke skyldes reising (Astrup et al., 2014).

Det finnes ingen internasjonal standardisering av ESBL. I denne masteroppgaven er det valgt å benytte Folkehelseinstituttet (2012a) tredeling (ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub>, og ESBL<sub>KARBA</sub>) slik Giske et al. (2008) beskrev i sin artikkel. De to første klassene kan bryte ned penicillin og cefalosporin, men ikke karbapenem. Sistnevnte derimot, har mulighet til å bryte ned penicillin, cefalosporin og karbapenem (Folkehelseinstituttet, 2012a). I den første klassen, ESBL<sub>A</sub>, finnes de originale enzymene som kan inaktivere penicillin og cefalosporiner, men de inhiberes av klavulansyre. De viktigste genene i denne klassen er CTX-M, TEM og SHV (Naas et al.). Den neste klassen, ESBL<sub>M</sub>, kan deles inn i to undergrupper ESBL<sub>M-C</sub> (plasmidmediterte AmpC; klasse C) og ESBL<sub>M-D</sub> (OXA; klasse D) (Giske et al., 2008). Disse enzymene kjennetegnes ved at de kan overføres ved hjelp av plasmider, såkalt plasmidmedierte (Bajaj et al., 2016). Til den siste gruppen tilhører karbapenemasene, og denne klassen kan deles inn i tre undergrupper Ambler A, B og D (Giske et al., 2008). Felles nevneren for enzymene i denne klassen er at de hydrolyserer karbapenem, og at de delvis inhiberes av klavulansyre (Codjoe & Donkor, 2017).

#### 2.2.3.1.1 CTX-M

Det vanligste ESBL enzymet er cefotaksimase (CTX-M) som kan bryte ned cefotaksim, og tilhører ESBL<sub>A</sub> (Iredell et al., 2016). Genet ble for første oppdaget i München (derfor M i navnet) i en *E. coli*, men seinere er enzymet også detektert i *Salmonella* spp. og andre bakterier fra Enterobacteriaceae familien (Shaikh et al., 2015). Det finnes få likehetstrekk

mellom CTX-M ESBL og TEM- og SHV ESBL som er de originale ESBL enzymene i Ambler A gruppen. Dette henger sammen med at CTX-M ble ervervet fra gener i *Kluyvera* spp. (opportunistiske bakterier i miljøet) gjennom HGT, mens SHV stammer fra *K. pneumoniae* og TEM fra *E. coli* (Munita & Arias, 2016). Basert på aminosyre sekvensene i det spesifikke enzymet kan CTX-M deles inn i fem grupper 1, 2, 8, 9 og 25, hvor 1 og 9 er de mest vanlige (Giedraitienė et al., 2011). Det spesielle med denne enzymfamilien er at den kan hydrolysere cefotaksim (Davies & Davies, 2010), og i motsetning til andre  $\beta$ -laktamaser inhiberes de lettere av tazobactam enn sulbactam og klavulansyre (Bajaj et al., 2016). På global basis er det antatt at 70 % av ikke-nosokomiale infeksjoner skyldes *E. coli* stammer med *bla*<sub>CTX-M</sub>, mens 79% av ESBL funnet i *E. coli* isolater fra dyr og dyremat tilhørte CTX-M varianter (Njage & Buys, 2015).

Slike funn viser hvor ekstremt flinke epidemiske gen er til å spre seg, og grunnet hurtig spredningsratio er genene nærmest umulige å kontrollere (Davies & Davies, 2010). Iredell et al. (2016) viste til at to av de viktigste grunnene til den raske spredningen av *bla*<sub>CTX-M</sub> skyldes at genet fantes på en rekke plasmider og lå kromosomalt hos patogene *E. coli* stammer. Den voksende spredningen av CTX-M har ført til økt bruk av karbapenem antibiotika som imipenem og meropenem (Wellington et al., 2013). To av de mest utbredte versjonen er CTX-M-14 og CTX-M-15 (Davies & Davies, 2010). CTX-M-14 er som regel funnet i pasienter fra Kina, mens CTX-M-15 er oftest knyttet til sykdomsutbrudd i India (Wellington et al., 2013). Dette indikerer at demografi kan spille en rolle i utvikling av de ulike CTX-M genene (Bajaj et al., 2016). Dessuten har *E. coli* CTX-M-14 og CTX-M-15 forskjellig mottakelighet fluorokinoloner og amoksisillin med klavulansyre (Shaikh et al., 2015). Smitte skjer hovedsakelig ved overføring av IncFII plasmidet og assosieres ofte med det mobile genetisk element IS26 (Shaikh et al., 2015).

#### 2.2.3.1.2 TEM og SHV

TEM og SHV er de mest studerte  $\beta$ -laktamasene innenfor ESBL<sub>A</sub>, og de er hovedsakelig funnet i Gram-negative bakterier som *K. pneumoniae* fra Enterobacteriaceae familien (Gniadkowski, 2008). Verdens første TEM gen ble isolert fra et plasmid i en *E. coli* i 1965, og TEM-1 spredde seg hurtig til andre bakterier gjennom MGE (hovedsakelig transposoner) (Medeiros, 1997). SHV derimot, kommer mest sannsynlig fra kromosomet til en *K. pneumoniae* stamme (Gniadkowski, 2008). TEM var den første gruppen enzymer som utviklet ESBL (Davies & Davies, 2010), og 17 år seinere ble det for første gang isolert et plasmid i en

*K. oxytoca* med ceftazidimresistens (3. generasjons cefalosporiner) (Shaikh et al., 2015). Det er gjennom substitusjon av utvalgte aminosyrer (for eksempel Gly238 eller Arg164) fra smalspektret TEM-1, TEM-2, SHV-1 (Naas et al.) og SHV-11  $\beta$ -laktamase TEM og SHV type ESBL har utviklet seg (Gniadkowski, 2008). TEM-1 og TEM-2 kan hydrolysere penicillin, samt 1. og 2. generasjon cefalosporiner, men de kan ikke angripe oxyimino-cefalosporiner (Shaikh et al., 2015). TEM type ESBL derimot, bryter ned oxyimino- $\beta$ -laktam (oxyimino-cefalosporiner og aztreonam). Utvikling av ESBL i TEM og SHV skyldes hyppig bruk av oxyimino- $\beta$ -laktam i medisinskbehandling siden midten av 80-tallet. Dessuten har det vist seg at enzymene er svært tilpasningsdyktige. Blant TEM og SHV familiene er detektert tre hovedaktiviteter: bredtspektret  $\beta$ -laktamaser, ESBL og inhibitorresistente  $\beta$ -laktamaser (Gniadkowski, 2008).

#### 2.2.3.1.3 Karbapenemase

Karbapenemaser kan deles inn i klasse Ambler A (KPC), B (VIM, IMP og NDM-1), og D (OXA-48)  $\beta$ -laktamaser (Giske et al., 2008). I tillegg er det funnet noen bakterier i Enterobacteriaceae familien med gener på kromosomet som koder for cefalosporinase (Ambler klasse C/AmpC) som kan bryte ned karbapenem, men forskningen på dette området er mangelfull (Nordmann et al., 2012). På lik linje med de andre  $\beta$ -laktamasene kan karbapenemase hydrolysere en rekke  $\beta$ -laktamantibiotika, men det som gjør disse enzymene spesielle er at det kan hydrolysere karbapenem. Karbapenemase kan deles inn i to subgrupper serinkarbapenemaser og metallo- $\beta$ -laktamaser. Til førstnevnte tilhører de non-metallo-enzymene KPC (inhiberes av borsyre) og OXA-48, mens til metallo- $\beta$ -laktamase tilhører NDM-1, VIM og IMP som inhiberes av EDTA (Etylendiamintetraacetat) (MacGowan & Macnaughton, 2017). Enzymene finnes vanligvis i patogene, Gram-negative, bakterier som *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* og *A. baumannii*. Resistensen mot karbapenem kan være iboende eller tilegnet via ervervet resistens. Mange  $\beta$ -laktamaser i bakterier fra Enterobacteriaceae familien er som oftest plasmidmedierte (Codjoe & Donkor, 2017).

Et stort problem med karbapenemase er at enzymene ofte er funnet sammen med andre ARM, som aminoglykoside-modifiserende enzymer, noe som gjør det enda vanskeligere å behandle pasienter med disse infeksjonene (MacGowan & Macnaughton, 2017). Dessuten har karbapenemasene en tendens til å utvikle MDR i et hurtig tempo (Ventola, 2015). I Hellas for eksempel, ble det i 2001 registrert < 5 % tilfeller av *K. pneumoniae* med ELSB<sub>KARBA</sub> hos sykehuspasienter, men i 2006 var tallet steget til >70 %. Denne drastiske økningen skyldes

hovedsakelig spredningen av ESBL<sub>KARBA</sub>  $\beta$ -laktamase VIM. Et annet eksempel er spredningen av New Delhi metallo- $\beta$ -laktamase (NDM-1) i *E. coli* (Shaikh et al., 2015). NDM-1 ble registrert for første gang hos en pasient i Sverige i 2008 som hadde vært innlagt på et sykehus i India (Nordmann et al., 2011), og siden 2010 har NDM-1 i *E. coli* og *K. pneumoniae* blitt registrert på de fleste kontinenter verden over (Munita & Arias, 2016). Det som gjør NDM-1 genet ekstra farlig er at det ofte er funnet sammen med andre ARG, og må derfor behandles med tigesyklin, kolistin eller fosfomycin (Nordmann et al., 2012).

CRE er bakterier fra familien Enterobacteriaceae som har flere antibiotika mekanismer som kan bryte ned karbapenem, mens CPE er bakterier fra Enterobacteriaceae familien som produserer karbapenemase (Folkehelseinstituttet, 2012a). CPO er bakterier fra Enterobacteriaceae, men inkluderer også andre familier, og disse produserer enzymer som kan bryte ned karbapenem antibiotika (BCCDS, 2014). Spredning av ESBL<sub>KARBA</sub> ansees for å være svært bekymringsverdig siden karbapenem er et «sisteutveis-antibiotika», og økt resistens vil kunne få katastrofale konsekvenser for verdenssamfunnet. MISIS overvåker derfor slike infeksjonstilfeller i Norge, og gjennom sitt arbeid håper de å kunne redusere den uheldige utviklingen en ser i dag (Astrup et al., 2014). I 2015 ble det påvist 45 tilfeller med ESBL<sub>KARBA</sub>, mot 10 tilfeller i 2012, hvor de fleste pasientene hadde fått behandling i utlandet (NORM/NORM-VET, 2017). Situasjonen i utlandet er betydelig verre. Det finnes visse land, hvor en kan detektere epidemiske tilstander. Eksempelvis hos bakterier med KPC-genet i USA, Hellas og Israel, VIM-genet i Hellas, OXA-48 genet i Nord Afrika og Tyrkia, samt NDM-1 i Indian og muligens på Balkan (Nordmann et al., 2012). Selv i land som Canada og Australia, hvor det generelt er en lav forekomst av ESBL, er det registrert en hyppigere frekvens ESBL<sub>KARBA</sub> grunnet mye reising (MacGowan & Macnaughton, 2017).

### 2.2.3.2 Redusert opptak av antibiotika

Poriner er vannfylte kanaler bygget opp av proteiner som tar opp hydrofile stoffer fra omgivelsene, og transporterer de inn i celle (Munita & Arias, 2016). Disse hydrofile kanalene er lokalisert i den ytre cellemembranen hos Gram-negative bakterier og mykobakterier. Disse komponentene har en selekterende effekt, og er med på å selektere ut hvilke stoffer som slippes videre inn i cellen (Fernández & Hancock, 2013). Gjennom å forandre uttrykket som koder for porinkanalene i cellemembranen, kan Gram-negative bakterier hindre antibiotikumet i å trenge inn og nå sitt dedikerte mål (Codjoe & Donkor, 2017). Bakteriene kan også kvitte seg med poriner eller svekke de genene som koder for poriner for å redusere

permeabiliteten til cellemembranen slik at opptaket av antibiotika reduseres (Munita & Arias, 2016). Slike mutasjoner vil spesielt påvirke  $\beta$ -laktamer, tetrasykliner, fluorokinoloner og kloramfenikol (Fernández & Hancock, 2013). Blant *E. coli* stammer er OmpC og PhoE de vanligste AR porinene, mens hos *P. aeruginosa* er OprD (D2) den mest utbredte (Munita & Arias, 2016).

### 2.2.3.3 Efflukspumper

For å hindre en intracellulær akkumulering av giftstoffer har bakteriene utviklet energibaserte pumpesystemer. Disse systemene kalles efflukspumper, og kan pumpe ut stoffer som ellers kunne ført til forandring og/eller nedbrytning av cellen (Fernández & Hancock, 2013).

Efflukspumper kan skyve ut de fleste typer antibiotika (Martínez, 2008), bortsett fra polymyxin. Pumpesystemene består av membranproteiner lokalisert i cytoplasmamembranen, og de finnes i alle mikroorganismer (Blanco et al., 2016). En bakterie kan ha flere efflukspumper som jobber sammen mot antibiotika inntrengerne (Giedraitienė et al., 2011). Noen efflukspumpene retter seg inn mot et spesifikt substrat, mens de aller fleste har et bredspektret substratsystem som kan pumpe ut antibiotika fra flere forskjellige klasser (Munita & Arias, 2016). Dette gjør at efflukspumpene er en av de viktigste faktorene i utviklingen av MDR (Giedraitienė et al., 2011). Gener som koder for pumpesystemene ligger enten på MGE eller kromosalt hos bakteriecellen (Munita & Arias, 2016).

I tillegg til å pumpe ut antibiotika kan også noen av efflukspumpene, som AcrAB i *E. coli*, pumpe ut stoffer som tungmetaller, organiske forurensninger og biocider (Fernández & Hancock, 2013). Slike efflukspumper kalles «multidrug» resistens efflukspumper (Iredell et al., 2016), og vil fremme overlevelsessevnen til bakteriene gjennom å øke deres tilpasningsevne til ulike miljøer (Blanco et al., 2016). I det prokaryotiske riket finnes det fem hovedtyper efflukspumper: “adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) superfamily”, “the resistance-nodulation-division (RND) family”, “the small multidrug resistance (SMR) family”, “the major facilitator superfamily (MFS)”, og “the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family” (Blanco et al., 2016). Hovedforskjellen mellom gruppene er hvilken energikilde som driver systemene (Fernández & Hancock, 2013).

#### 2.2.3.4 Modifisering av målsete

Et antibiotikum er avhengig av et spesifikt målsete for å nå frem til riktig virkningsområdet i bakteriecellen (Giedraitienė et al., 2011). Eksempelvis vil tetrasyklin hemme proteinsyntesen ved å hindre at det skjer en binding mellom aminoacyl-tRNA og den ribosomale akseptor (A) (Kapoor et al., 2017). Selv små modifiseringer i målsetet til bakteriecellen vil gjøre det vanskelig for antibiotikumet å nå frem til sitt dedikerte mål (Giedraitienė et al., 2011). De tre vanligste årsakene til slike modifikasjoner er mutasjon av målsetet, enzymatisk forandring av bindingsstedet (for eksempel en ekstra metylgruppe) og utbytting av det originale målsetet. Disse modifikasjonene vil føre til at målsetet utvikler en redusert affinitet for antibiotika (Munita & Arias, 2016). Omstruktureringer i peptidoglykanet i celleveggen, forandringer i proteinsyntesen og forstyrrelser i DNA-syntesen er noen av de vanligste modifikasjonene (Giedraitienė et al., 2011). Eksempelvis vil forandringer i 30S subunit eller 50S subunit i ribosomet føre til resistens mot antibiotika som påvirker proteinsyntesen (eksempelvis makrolider og tetrasykliner), mens forandringer i PBP vil ofte føre til resistens mot  $\beta$ -laktam hos Gram-positive bakterier. Ellers kan mutert DNA gyrase (gyrA og gyrB) topoisomerase IV (parC og parE) føre til resistens mot fluorokinoloner fordi fluorokinolonene ikke kan binde seg til DNA gyrase A, mens RNA-polymerase mutasjoner kan føre til rifampicinresistens (Kapoor et al., 2017).

#### 2.2.4 Mobile genetiske elementer

MGE kan ifølge MacGowan and Macnaughton (2017) deles inn i to hovedgrupper. Den første gruppen omfavner de elementene som kan overføres fra en celle til en annen (plasmid), mens den andre gruppen rommer de elementene som kan hoppe fra et genetisk område til et annet (transposoner og integroner). I prinsippet kan gener hentes fra en hvilken som helst kilde, men i praksis skjer overføringen av MGE hovedsakelig mellom bakterier fra samme økologiske nisje (Wellington et al., 2013). MGE inneholder ofte gener som koder for resistens, men siden disse komponentene lett kan mistes inneholder de ikke egenskaper som er essensielle for cellens livssyklus (Wellington et al., 2013).

##### 2.2.4.1 Plasmid

Plasmider er selvreplikerende, sirkulære molekyler av dobbeltrådet DNA som eksisterer uavhengig av kromosomet i cellens cytoplasma. Noen plasmider (episomer) kan også settes inni kromosomet til bakterien. Replikasjon skjer hovedsakelig som for bakteriekromosomet,

men kan også skje etter «rolling circel» prinsippet (Madigan et al., 2015). Plasmid inneholder ofte resistensgener (r-plasmid), og en rekke plasmider har mer enn et resistensgen (Thougaard et al., 2009). I tillegg til å kode for AR kan også plasmidene inneholde resistens mot giftige tungmetaller (kvikksølv, kadmium og sølv) og biocider (Giedraitienė et al., 2011). Enkelte plasmider kan kun overføres til en bestemt mottakercelle, mens andre plasmider kan overføres til en rekke celletyper, deriblant miljøbakterier (Wellington et al., 2013).

#### 2.2.4.2 Transposoner

Transposoner er små, mobile DNA-fragmenter som kan forflytte seg til ulike posisjoner på genomet (Sykes, 2010) eller plasmidet (Giedraitienė et al., 2011). En transposon må inneholde transposase for å kunne bevege seg rundt, samt inverterte repeterte områder (identiske sekvenser) på begge sider av DNA-fragmentet. Mer komplekse transposoner kan inneholde gener som koder for resistens mot antibiotika og/eller andre toksiske stoffer (Harvey & Ferrier, 2011). Noen transposoner forflytter seg etter «klipp ut og lim inn»-prinsippet, men andre etter «kopier og lim inn» (Madigan et al., 2015). Grunnet sin evne til å hoppe fra kromosomalt DNA til plasmidets DNA og tilbake igjen, har transposoner ofte en sentral rolle i utviklingen av MDR. Dessuten fører transposoner lett til mutasjoner, noe som også kan fremme utvikling av resistens (Sykes, 2010). Transposoner overføres via konjugasjon, transformasjon eller transduksjon. De transposonene som overføres via konjugasjon har flere likhetstrekk med plasmider (Giedraitienė et al., 2011), men de vil aldri være helt uavhengige av genomet (Madigan et al., 2015).

#### 2.2.4.3 Integron

Integron er et «genfangersystem» som finnes på kromosomer, plasmider og transposoner, hvor stykker av DNA kalt genkassetter kan inkorporeres, uttrykkes og formidles (Sykes, 2010). De kan ikke forflytte seg på egenhånd, men er avhengige av transposoner eller plasmider (Zhang et al., 2009). Integron benytter spesifikke rekombinasjonssystemer ved inkorporering av gen (Munita & Arias, 2016), og består av tre hovedkomponenter. Den første komponenten er enzymet integrase (gen *int*) som fungerer som et spesifikt rekombineringsystem for å sette inn eller fjerne genkassetter. Den andre komponenten er et spesifikt rekombineringsområde (*attI* site) og den siste komponenten er en promoter som kan starte transkripsjon av genet (Giedraitienė et al., 2011). Integron ansees for å være en av de viktigste drivfaktorene bak bakteriens hurtige utvikling, og er helt sentrale for deres

overlevelsessevner i ulike miljøer (Munita & Arias, 2016). Det kan settes inn flere genkassetter i et integron, og det er funnet integroner med opptil ni (hovedsakelig fire til fem) ARG i vannmiljøer som avløpsvann og urbant avløpsvann, men også i vann som ikke er eksponert for ARB eller ARG (Zhang et al., 2009).

### 2.3 *Escherichia coli*

*E. coli* er en Gram-negativ, ikke-sporedannende, fakultativ anaerob, zoonotisk stavbakterie som stammer fra familien Enterobacteriaceae (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a). Den beveger seg via flageller og trives best ved 37 °C, men kan leve fra 10 °C til 45 °C (Thougaard et al., 2009). Bakteriearten består av en rekke stammer med store geno- og fenotypiske forskjeller (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a). De fleste *E. coli* stammene er apatogene, og lever i tarmen til mennesker og varmblodige dyr, og dette er grunnen til at *E. coli* kan brukes som indikator for fekal forurensing i næringsmiddelindustrien (Thougaard et al., 2009). Fekal forurensing kan indikere at patogene mikroorganismer er tilstede i matvaren eller i produksjonen, og konsumenten kan bli dårlig av å spise eller drikke det gitte produktet (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a).

Det finnes også *E. coli* stammer som er patogene, og det er viktig å skille mellom *E. coli* som en indikatorbakterie og *E. coli* som en sykdomsfremkallende bakterie (Thougaard et al., 2009). De patogene *E. coli* bakteriene kan klassifiseres inn i seks grupper, og globalt er *E. coli* den viktigste årsaken til bakterielle enteritter (sykdommer som angriper tarmen, og gir symptomer som diaré og oppkast). Det finnes også patogene *E. coli* stammer som virker utenfor tarmsystemet og kan føre til meningitt, sepsis, sårinfeksjoner og urinveisinfeksjoner. Slike *E. coli* stammer kalles ekstraintestinale *E. coli* (ExPEC) (Njage & Buys, 2015). De fleste patogene *E. coli* smitter gjennom mat og vann, og en av de mest omtalte artene er enterohemorragisk *E. coli* (EHEC). EHEC eksisterer primært i drøvtyggere og kan være årsak til alvorlig sykdom hos mennesker (Thougaard et al., 2009).

### 2.4 Spredning av antibiotika og antibiotikaresistens til miljøet

Det ble i lange tider antatt at resistensgener ble spredt fra menneskeskapte miljøer til det naturlige miljøet, og det naturlige miljøet ble i seg selv ikke sett på som en spredningsvektor for AR (Steinbakk et al., 2014). Nyere forskning indikerer at naturlige miljøer kan inneholde AR som kan plukkes opp av patogene bakterier og spres til kliniske miljøer (Cytryn, 2013;

Forsberg et al., 2012; Yin et al., 2013) eller til matprodukter som videre kan øke resistensen hos den som spiser maten (Njage & Buys, 2015). I løpet av de siste 10-20 årene er det observert en kraftig økning av ARB og ARG i de ulike økologiske nisjene (Wellington et al., 2013). Grunnen er komplisert og sammensatt, men en de mest sentrale årsakene er overdreven bruk av antibiotika (Blaak et al., 2015). Helt siden oppdagelsen av penicillin, er det sluppet ut millioner av tonn antibiotika i miljøet (Zaman et al., 2017). De største utslippene kommer fra dyre/menneske avføring og avfall fra fabrikker/sykehus/landbruk (Holmes et al., 2015).

Så mye som 30 til 90 % av all antibiotika som konsumeres av dyr og mennesker forlater kroppen som ikke-metaboliserte komponenter via urin eller avføring (Singer et al., 2016). De ikke-metaboliserte komponentene vil først nå kloakken før de kan overføres videre til ulike miljøer som elver, innsjøer, drikkevann og jord (Arun et al., 2017). Hvor mye antibiotika som slippes ut fra avføringen varierer med opprinnelse, behandling av avføring, egenskapene til antibiotikaen og miljøbetingelser (Singer et al., 2016). I forhold til utslipp fra industrien rapporterte O'Neil (2016) at produksjonsvann fra fabrikker var en av de mest bekymringsfulle kildene til antibiotika, ARG og ARB i miljøet, mens Baquero et al. (2008) trakk frem avfall fra sykehus og landbruk. Produksjonsvann har en høy tetthet av ARG og levende organismer, samt antibiotika (Zhang et al., 2009). Selv om både produksjonsvann og kloakkvann fra industrien behandles før det slippes ut i naturen (Arun et al., 2017) er det flere forsøk som viser at det finnes antibiotika, ARB og ARG i ulike vannkilder nær slike områder (Waseem et al., 2017). Eksempelvis har prøver fra kloakkanlegg i India vist at 37,9 % av *E. coli* isolatene inneholdt ESBL og/eller karbapenemase (Waseem et al., 2017), mens elvevann i nærheten av antibiotikaproducenter hadde et urovekkende høyt innhold av ciprofloxacin (Zhang et al., 2009). Rodriguez-Mozaz et al. (2015) fant et høyere antall ARG i avløpsvann fra sykehus enn andre vannkilder, mens Walson et al. (2001) fant en høyere frekvens av AR i den bolivianske urbefolkningen som bodde nær helseinstitusjon enn de som bodde lengre unna. Dessuten har det vist seg at det er lettere å fjerne tetrasykliner og fluorokinoloner enn makrolider fra avfallsvann (Wellington et al., 2013). Hvor standhaftige ARB er i rensset kloakkvann avhenger av type kloakkvann (industri eller kommunalt), saltinnhold, temperatur, type behandling kloakkvannet har gjennomgått og tidsperiode kloakken er i rensenanlegget (hydraulisk retensjonstid) (Singer et al., 2016).

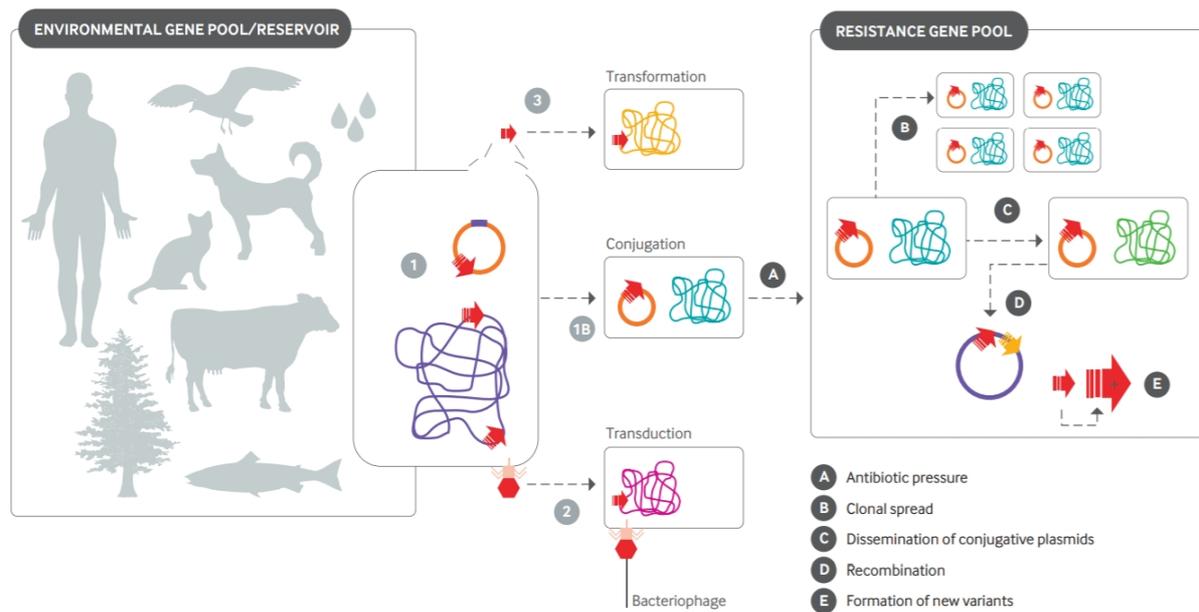
I forhold til landbrukssektoren er det en internasjonal enighet om at bruken av antibiotika er for høy, og at dette er en av hovedgrunnen til at antibiotika flyter ut i miljøet (ECDC/EMA,

2009; O'Neill, 2016; WHO, 2018). Yin et al. (2013) fant nye menneske-assosierte ESBL og AmpC gener i miljøisolater fra Lake Taihu i Kina, og forskerne trakk frem nærliggende landbruksområder som en av hovedfaktorene til disse funnene. Baquero et al. (2008) viser til høye nivåer av antibiotika og ARB i produksjonsvann og vannområder i nærheten av gårder som drev med svinedrift. Disse funnene skyldes at landbrukssektoren bruker/har brukt mye antibiotika som vekstfremmere så vel som for å forhindre og/eller behandle infeksjoner. Alt i 1960 ble det påvist en relasjon mellom overføring av AR mellom dyr og mennesker ved bruk av antibiotika som vekstfremmere, men ikke før i 2006 ble det opprettet et forbud mot dette. Dessverre gjaldt forbudet kun i Europa, men land som USA pøser enda antibiotika ut i landbruket (Holmes et al., 2015).

Norske bønder bruker forholdsvis lite antibiotika og det er lite resistens i norsk landbruk, men AR kan overføres over landegrensene (NORM/NORM-VET, 2017). I 2016 ble det stadfestet at internasjonal handel av mat og fôr kan introdusere resistente bakterier til uberørte områder. Et eksempel på dette er introduksjonen av cefalosporinresistente *E. coli* til norsk kylling via import av avlsdyr (Espenhain et al., 2017). Fra et folkehelseperspektiv sees dette på som svært lite gunstig, spesielt om zoonoser (bakterier som smitter fra dyr til menneske) som *Salmonella* spp. og *Campylobacter* spp. utvikler AR og deler sine gener med miljøbakterier. Det er allerede registrert at MRSA kan smitte fra gris til menneske (livestock assosierte MRSA (LA-MRSA)) (Holmes et al., 2015), men NORM/NORM-VET (2017) kunne ikke påvise noen svinebesetninger med LA-MRSA CC398, som er den vanligste MRSA typen. Det ble imidlertid påvist andre MRSA; MRSA CC7, CC130 og CC425, så muligheten er tilstede for at flere bakterier kan bevege seg i denne retningen.

Problemet med at antibiotika flyter ut i naturen er at det kan føre til økt seleksjonspress hos normalfloraen i vann og jordsmonn (Davies & Davies, 2010) slik at miljøet kan bli et stort reservoar for AR (se figur 2.3) (He et al., 2016; Huerta et al., 2013; Wellington et al., 2013). Faren med dette er at miljøbakteriene vil kunne dele sine resistente gener med andre bakterier, både patogene og apatogene (Forsberg et al., 2012; O'Neill, 2016). Det fryktes at økt eksponering for antibiotika vil kunne fremme tilpasningsevnen til resistensbærende miljøbakterier, som ellers har en forholdsvis lav tilpasningsevne, og dermed vil AR miljøbakterier kunne bli mer fremtredende i naturen (Kümmerer, 2009). Rodriguez-Mozaz et al. (2015) fant en positiv korrelasjon mellom mengde antibiotika og antall ARG, og forskerne konkluderte med at elvevann som ble tilført antibiotika kunne være en potensiell kilde for

spredning av ARG. Abriouel et al. (2007) fant i sitt forsøk en rekke enterokokker både i jord, vann og grønnsaker. Noe som ansees som lite heldig grunnet enterokokkenes sin evne til å dele DNA gjennom konjugasjon av plasmider, transposoner og integroner. Den dominerende arten var *Enterococcus faecalis*, både hos vannstammene og de kliniske. Forskjellen var at de kliniske stammene hadde en høyere forekomst av resistens og MDR. Dette tyder på at miljøstammen kan være mindre reaktive enn de kliniske bakteriestammene. Spørsmålet forskerne stiller seg i disse dager er hva en kontinuerlig tilførsel av antibiotika kan føre til i fremtiden?



Figur 2.3. Skjematisk fremstilling av hvordan økt seleksjonspresset kan transformere miljøet til et «hot spot» for deling av gener via (3) transformasjon, (1B) og transduksjon (2). En ARB (1) vil kunne spre sin resistens ved å danne kloner av seg selv (B) eller overføre AR via konjugative, r-plasmider til andre bakterier fra samme familie, slekt art eller stamme. Eventuelt kan den ARB benytte andre MGE som transposoner eller integroner (E) for å overføre AR som kan inkorporeres i ARG- Nye varianter kan også oppstå ved mutasjon (E) (Iredell et al., 2016).

Et annet problem med kontinuerlig tilføring av antibiotika til miljøet er at antibiotikakonsentrasjoner ned til 1/1000 av MIC vil kunne fremme HGT og ARG i miljøet (Steinbakk et al., 2014). Dessuten vil en konsentrasjon ved det ikke-inhiberende nivået fremme konjugasjon av plasmider og transposoner (Zhang et al., 2009), og AR kan dermed bli en del av miljøet (Iredell et al., 2016). Det er likevel viktig å huske at det finnes naturlig resistens i alle miljøer. 90 % av alle bakterier som stammer fra sjøen er resistente mot en eller flere antibiotika, mens 20 % er resistente mot flere enn fem antibiotika (Huerta et al., 2013). Antibiotikaproduserende miljømikroorganismer, i motsetning til kliniske mikroorganismer, viser en betydelig grad av egen resistens som ser ut til å være uavhengig av det selektive trykket. Det antas at denne egenskapen er svært gammel og er utviklet lenge før den kliniske bruken av antibiotika startet (Singer et al., 2016).

En annen faktor som antas å påvirke utviklingen av AR i miljøbakterier er utslipp av organiske og uorganiske toksiner (Baquero et al., 2008). Dette er fordi mange resistensmekanismer som fungerer mot antibiotika også vil fungere mot biocider og tungmetaller (Singer et al., 2016). Tungmetaller som jod, arsenikk og kvikksølv ble i sin tid benyttet både i industrien og som terapeutiske midler. Det antas derfor at bakteriene kjenner igjen disse stoffene, og utslipp fra tidligere tider kan derfor ha hatt en innvirkning på utviklingen og tilstedeværelsen av dagens AR (Davies & Davies, 2010). Rasmussen and Sørensen (1998) viste i sitt forsøk at nærværet av kvikksølv i vann førte til et økt antall av konjugerte-plasmider med gener som kodet for resistens mot tetrasyklin og kvikksølv i miljøbakteriene. Andre metaller som aluminium og jern vil kunne forandre overflatespenninger (pH og/eller ionestyrke) i vann og jordinteraksjoner slik at antibiotikautslipp fra jord til vann øker (Huerta et al., 2013). Dessuten kan ARG i seg selv sees på som forurensing fordi komponenten er lett å erverve, men vanskelig å bli kvitt (Zhang et al., 2009).

Det er viktig å påpeke at det i dag er liten forståelse knyttet til miljøbakterienes plass i resistensutviklingen (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Grunnen er at det er vanskelig å dyrke miljøbakteriene i et laboratorium på en slik måte som genererer valide resultater (Allen et al., 2010; Huerta et al., 2013; Waseem et al., 2017), ei finnes det standardiserte metoder eller retningslinjer for hvordan man må utføre slike studier (Berendonk et al., 2015). Dessuten er undersøkelsen av miljøbakteriene sjeldent kvantitative, og det finnes lite informasjon om hvor i genomet resistensen er lokalisert (Steinbakk et al., 2014). Dette har resultert i forholdsvis lite informasjon om hvordan det selektive trykket av klinisk antibiotika kan påvirke miljøbakteriene, hvilke bakteriearter som faktisk er med på å spre resistens i miljøet (Huerta et al., 2013), og i hvilken grad de ulike mekanismene (som  $\beta$ -laktamase) kan overføres ved HGT (Forsberg et al., 2012). Det er også knyttet usikkerhet til om miljøbakteriene og deres gener vil kunne være sykdomsfremkallende hos mennesker (Steinbakk et al., 2014). Det er en stor internasjonal enighet om å øke kompetansen innenfor dette området (ECDC/EMEA, 2009; Helse- og omsorgsdepartementet, 2015; O'Neill, 2016; WHO, 2018).

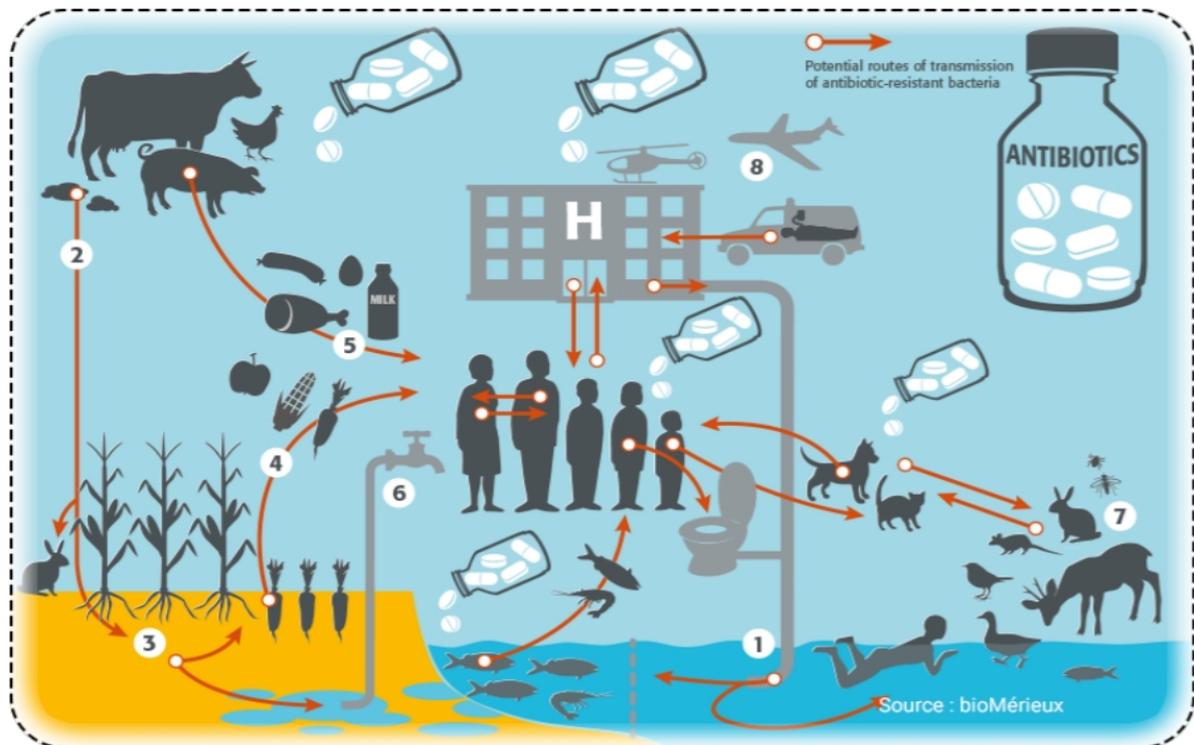
### 2.4.1 Spredningsvektorer i naturlige miljøer

Antibiotika og AR kan spres på en rekke ulike måter. Fysiske krefter som vind og vann kan frakte med seg ARB eller ARG over lengre avstander. Eksempelvis kan resistens fra jorden spres via støvpartikler som virvles opp av vinden (Allen et al., 2010). Fugler og villdyr som måker, rødvov og trekkfugler ansees for å være gode indikatorer på tilstedeværelsen av antibiotika og resistens i miljøet (Holmes et al., 2015). Trekkfugler er kanskje spesielt interessante fordi de forflytter seg over lange avstander, hvor de kan frakte med seg resistens over landegrenser og mellom ulike miljøer (Allen et al., 2010). Det finnes flere forsøk som viser til at villdyr, og da spesielt små gnagere, som bor i nærheten av tett befolkede områder har mer ARG i sin avføring enn de som bor i mer avsidesliggende områder (Gilliver et al., 1999). Kontakt med kloakkvann fra fabrikker, sykehus og andre urbane områder trekkes frem som en av de mest sannsynlige årsakene til disse funnene (Allen et al., 2010; NORM/NORM-VET, 2017; Wellington et al., 2013). Det antas også at kjæledyr kan være bærere av MDR som kan smitte mennesker (Iredell et al., 2016). NORM/NORM-VET (2017) rapporterte at det brukes mindre antibiotika i kjæledyrseksjonen enn før, men det selges mer amoksisillin med klavulansyre (tilsettes om det oppdages ARB).

### 2.4.2 Vannmiljøer

En av de mer utsatte miljøene er vann (se figur 2.4). Dette fordi elver, sjøer, hav, drikkevann og grunnvann kontinuerlig tilføres antibiotika, ARB og ARG fra omgivelsene (Waseem et al., 2017). En rekke humane-, animale- og miljøbakterier blandes i vannet, og kan dermed overføre sine gener til hverandre. Dessuten slippes det ut store mengder antibiotika, desinfeksjonsmidler og tungmetaller ut i vannkilder (Baquero et al., 2008). Det er hovedsakelig ved utslipp fra fabrikker, jordbruk, sykehus og oppdrettsnæringen at antibiotika, ARG og/eller ARB forurenses ulike typer overflatevann. Dessuten kan forurenset vann trekke ned i bakken og kontaminere grunnvannet (Zhang et al., 2009). Det er funnet hundrevis av antibiotika, ARG og ARB i diverse vannkilder, til og med i drikkevann (Waseem et al., 2017). ARG og ARB i drikkevann sees på som lite heldig. Dette fordi store deler av verden sliter med forurenset vann, og ytterligere kontaminasjon vil redusere den allerede svekkede mattryggheten (Xi et al., 2009). Hvilke ARG og ARB som finnes i de ulike vannområdene er varierende. Eksempelvis er det observert *Aeromonas* spp. med *tetE* og sulfonamidresistente gener (*sulI*, II, III og A) i sjøområder nært oppdrettsanlegg. Videre er det funnet vancomycinresistente enterokokker (VRE) i elver nærheten av meierier i Italia, kloakk i

England og ubehandlet kloakk, urban kloakk og overflatevann i Sverige, samt produksjonsvann, overflatevann og biofilmer i drikkevann i Tyskland (Zhang et al., 2009).



Figur 2.4. Grafisk fremstilling av hvordan AR kan spres ved overdreven bruk av antibiotika blant mennesker og dyr. Figuren illustrer en rekke veier antibiotika, ARB og ARG kan kontaminere vannkilder. Eksempelvis vil ikke vannrenningsanlegg (1) fjerne all AR og noe vil frigjøres i miljøet. En annen svært vanlig rute er gjødsling av avlinger (2) hvor ARB kan komme over på plantene (3). Inntak av ARB kan skje ved konsum av planter (4) eller dyr/fisk (5). Siden bakteriene lett kan komme til ulike vannkilder kan også drikkevannet bli en smitekilde (6). Ellers vil et generelt dyreliv og insekter rundt vannkildene kunne spre både antibiotika, ARG og ARG (7). Dessuten er turisme, migrasjon og matimport (8) rapportert til å fremme spredningen av AR over landegrensene. I helse Norge kan smitte skje mellom pasienter eller helsepersonell eller forurenset overflate vann eller medisinske utstyr. Friske smittebærere vil også kunne spille en viktig rolle i spredningen av AR (bioMérieux., u.å.).

## 2.5 Tiltak mot antibiotikaresistens

Den norske statistikken viser til forholdsvis lave tall knyttet til AR (NORM/NORM-VET, 2017), noe som hovedsakelig skyldes gode rutiner innen helsevesenet (Astrup et al., 2014) og lite bruk av antibiotika innen landbrukssektoren (Holmes et al., 2015). Problemet er at denne situasjonen lett kan snu grunnet utstrakt reising, import av mat og fôr, samt overdreven antibiotika bruk i andre land (Astrup et al., 2014). AR ikke kan stoppes, den kan kun reduseres og vi kan innrette oss slik at påvirkningen på menneske- og dyrehelse blir minst mulig (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Norske helsemyndigheter har derfor satt som mål å redusere den totale antibiotikabruken med 30 % innen 2020. For å nå dette målet har Helse- og omsorgsdepartementet (2015) utviklet en handlingsplan som beskriver hvilke tiltak

Norge skal ta i bruk for å prøve å redusere den pågående utviklingen av AR. Målene i handlingsplanen samsvarer med den globale handlingsplanen («Global Action Plan») mot AR og en resolusjon fra de forente nasjoners organisasjon for ernæring og landbruk (FAO), da internasjonalt samarbeid på tvers av landegrenser ansees å være et av de viktigste våpnene i kampen mot AR (WHO, 2018). I Norge blir AR nøye overvåket av Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MISIS), Norske overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), Norske overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober-veterinærmedisin (NORM-VET), Reseptregistrert og Norsk overvåkingssystem for antibiotikabruk og helsetjenesteassosierte infeksjoner (NOIS) (Folkehelseinstituttet, 2018). Slike overvåkningssystemer skal følge antibiotika forbruket og utviklingen av AR slik at det kan settes i gang tiltak om det detekteres uheldig trender (Folkehelseinstituttet, 2012b).

For å få kunne hemme utviklingen av AR står kunnskap helt sentralt (O'Neill, 2016). Den norske stat ønsker å løfte kunnskapen om antibiotika og AR blant både helsepersonell og den generelle befolkningen (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Det er viktig at folk skjønner seriositeten av å ikke fullføre en antibiotikakur eller følge de rådene legen gir (Davies & Davies, 2010). Det er også ønskelig å utvikle hurtige metoder som kan gjøre diagnoser lettere og mer konkret (Zaman et al., 2017). Forskere håper dette kan føre til redusert bruk av bredspektrede antibiotika (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015), samt hindre bruk av antibiotika hos pasienter som har en virusinfeksjon. Antibiotika virker ikke på virus, men likevel skrives det ut for å bekjempe virusinfeksjoner, og da spesielt luftveisinfeksjoner og øreinfeksjoner (Espenhain et al., 2017). Videre står utvikling av ny antibiotika helt sentralt om bakteriene ikke skal ta helt over og da er det behov for internasjonalt samarbeid og statlig finansiering (WHO, 2018). Det er dessuten ønskelig å rette et fokus mot miljøet og undersøke hvordan det kan påvirke utviklingen (Steinbakk et al., 2014). Utslipp av tungmetaller, desinfeksjon, biocider, gjødsel og kloakk trekkes også frem som viktige forskningsområder (Kümmerer, 2009). Som et siste punkt er det ønskelig å forhindre utvikling av infeksjoner med et internasjonalt vaksineringsprogram. Det er også et ønske om å rette fokuset mot god hygiene, og spesielt god håndhygiene for å hindre utvikling av infeksjoner som trenger å behandles med antibiotika (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015).

### 3 METODISK TEORI

#### 3.1 ESBL og CRE screening – en fenotypisk metode for påvisning av antibiotikaresistens

For å detektere ESBL bakterier fra Enterobacteriaceae familien kan selektive, kromogene skåler med «Oxoid Brilliance™ ESBL» benyttes (Huang et al., 2010), mens «Oxoid Brilliance™ CRE» kan brukes for å detektere karbapenemresistente Enterobacteriaceae, inkludert NDM-1 (Cohen et al., 2013). Det er hovedsakelig *E. coli* og *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. og *Citrobacter* spp. (KESC-gruppen) som vokser på disse mediene. Brilliance™ ESBL inneholder cefpodxime og andre markører som inhiberer de fleste non-ESBL Enterobacteriaceae, samt undertrykke vekst av AmpC og andre non-ESBL organismer (Thermo Fisher Scientific Inc., 2010). Brilliance™ CRE inneholder imipenem, meropenem, ertapenem og doripenem (Thermo Fisher Scientific Inc., u.å.). Begge «Oxoid Brilliance™» skålene kan inokuleres med prøvematerialet direkte fra rektal screening «swabs», avføringsprøver, isolerte kolonier eller fra en flytende suspensjon. Petriskålene bør romtempereres før de inkuberes i 18-24 timer ved 37 °C, mens skåler med negative resultater bør inkuberes i ytterligere 24 timer (Thermo Fischer Scientific Inc., 2014).

Selektive, kromogene medier tilsettes antibiotika for seleksjon, og kromogene substanser for speciesidentifisering (Löhr & Samuelsen, 2015). På ESBL-skålene vil *E. coli* uttrykker galaktosidase og glukuronidase, og vil danne blå kolonier ( $\beta$ -galaktosidase negative *E. coli* gir rosa kolonier), mens bakterier fra KESC-gruppen ville danne grønne kolonier (Thermo Fisher Scientific Inc., 2010). De karbapenemresistente *E. coli* stammen på CRE-skålene derimot, danner lyserosa kolonier, mens bakterier fra KESC-gruppen danner blå kolonier (Thermo Fisher Scientific Inc., u.å.). Vekst av *Proteus* spp., *Morganella* spp. og *Providencia* spp. vil gi lysebrune kolonier med en brun ring rundt grunnet deaminering av tryptofan på begge mediene, mens vekst av *Salmonella* spp. og *Acinetobacter* spp. vil generere rosa eller hvite til kremfargede kolonier. Det er også mulig at andre bakterie vokser på de selektive, kromogene skålene (Oxoid Ltd, 2010)

## 3.2 Kvalitetskontroll og kvantifisering med NanoDrop™

### Spektrofotometer og Qubit 2.0® Fluorometer

I teorien kan både et NanoDrop™ Spektrofotometer og et Qubit® 2.0 Fluorometer beskrive hvor mye DNA som er tilstede i en bakterieprøve (Thermo Fischer Scientific Inc., 2009; Thermo Fischer Scientific Inc., 2011), men Qubit® 2.0 Fluorometeret gir mer eksakte verdier. Et NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer benyttes her hovedsakelig for å undersøke renheten til DNAet før det sekvenseres med en MinION. Et Qubit® fluorometer bruker fluoriserende fargestoffer for å bestemme konsentrasjonen av nukleinsyrer eller proteiner i en ukjent prøve, og derfor vil ikke avlesningen av DNA-konsentrasjonen påvirkes av forurensing i prøven. Det anvendes ultrafiolett (UV)-spektroskopi for å måle mengden lys som absorberes i den ukjente prøven. Jo mer lys som absorberes ved 260 nm (maksimums absorpsjonsverdi for DNA), desto mer DNA er det i prøven (Manchester, 1996). Det er ønskelig at verdiene i bakterieprøvene skal ligge på 20-80 ng/ml for å oppnå gode sekvenseringsresultater (Thermo Fischer Scientific Inc., 2011).

I likhet med Qubit® 2.0 Fluorometeret baserer et NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer seg på nukleotidets evne til å absorbere UV-lys (Thermo Fischer Scientific Inc., 2009). Som sagt er DNAets maksimums absorpsjonsverdi 260 nm (Sarochoa & Reject, 2012), mens ved 280 nm vil proteiner, fenoler og andre kontaminanter også kunne absorberes. For å avgjøre renheten i prøven benyttes en absorbasjonsrate på 260 nm og 280 nm ( $A_{260/280}$ ), og verdien burde ligge på ~1,8 (lavere verdier indikerer kontaminasjon av proteiner, fenoler eller andre kontaminanter).  $A_{260/230}$  nm benyttes som en dobbelt sikkerhet og viser renheten til nukleinsyrene. Verdien burde ligge på 1,8-2,2 (lavere verdier indikerer kontaminasjon fra karbohydrater eller fenoler) (Thermo Fischer Scientific Inc., 2009).

## 3.3 PCR

«Polymerase-Chain-Reaction» (PCR) er en slags “in vitro replikasjon” som under kontrollerte forhold kan amplifisere milliarder av et utvalgte DNA-fragment. I en PCR-reaksjon inngår templat (delen av genomet som skal oppkonsentreres), primere (korte enkeltrådede DNA-strenger med 15-30 bp), dNTP byggestein (dATP, dGTP, dTTP og dCTP), DNA-polymerase (*Taq* DNA polymerase som er varmestabil og tåler å bli varmet til 95 °C gjentatte ganger) og en buffer (salter og da spesielt Mg-ioner fordi disse virker som en kofaktor for DNA-polymerasen) (Thougaard et al., 2009). Prosessen styres hovedsakelig av temperaturskifte og

foregår i termo syklere. En vanlig PCR-prosess består vanligvis av tre trinn denaturering, hybridisering (primer annealing) og elongering (McPherson & Møller, 2000).

I det første trinnet må alle ingrediensene tilsettes og blandes før blandingen varmes opp til 95 °C. Den høye varmebehandlingen vil føre til denaturering av DNA-templatet. Hydrogenbindinger mellom bp i DNAets dobbelte heliks brytes opp, og det dannes to enkelttrådede DNA-strenger (ssDNA) i (Thougaard et al., 2009). I neste trinn senkes temperaturen til 55-60 °C alt etter hvilke primere en bruker. Primerne binder seg til de komplementære sekvenser i 3'enden til de enkelttrådede DNA-strengene (McPherson & Møller, 2000). Deretter heves temperaturen til 72 °C, som er den optimale temperaturen til DNA-polymerasen (Thougaard et al., 2009). DNA-polymerasen vil starte å danne dobbeltrådet DNA fra primerens 3'enden med de tilstedeværende nukleotidene som byggesteiner. *Tag* DNA polymerasen benytter primeren som startpunkt, og derfor ansees primerne som avgjørende for hvilken del av genomet som oppkonsentreres. Valg av primere gjøres derfor på bakgrunn av hvilken del av genomet som skal oppkonsentreres (McPherson & Møller, 2000). Oppbygningen av dobbeltrådet DNA skjer helt frem til polymerasen når enden av templatet. I denne første syklusen er mengden DNA fordoblet, og denne prosessen gjentas helt frem til ønsket antall sekvenser er amplifisert (Thougaard et al., 2009). Det alltid viktig å rense PCR-produktene om de skal sekvenseres. Dette fordi det vil være et overskudd av primere som ellers vil kunne forstyrre sekvenseringen (McPherson & Møller, 2000).

Det finnes flere PCR varianter som kan benyttes for å detektere ARG i miljøprøver, deriblant multipleks PCR, kvantitativ PCR og realtime PCR (Zhang et al., 2009). I denne oppgaven ble det brukt multi- og singelpleks PCR. I en multipleks PCR benyttes det flere primerpar i PCR-blanding for å kunne amplifiserer flere DNA-fragmenter fra ulike ARG på samme tid (McPherson & Møller, 2000). En singelpleks PCR vil kun ha et målgen, og kan eksempelvis benyttes for å bekrefte hvilket målgen en multipleks testet positivt for (Hsieh & Amin, 2016).

### 3.4 Sekvensering

Sekvensering benyttes for å bestemme rekkefølgen til de ulike bp (nukleotidene) i et DNA-molekyl (Thougaard et al., 2009). Den mest brukte metoden for sekvensering er Sanger-sekvensering, også kalt dideoksey-sekvensering (Harvey & Ferrier, 2011). De siste årene har «neste generasjons DNA-sekvensering» (NSG) blitt mer vanlig å bruke fordi disse metodene

er mindre ressurskrevende (Valencia, 2013). Første steget i en Sanger-sekvensering er en tilnærmet PCR prosess hvor DNAet amplifiseres (Harvey & Ferrier, 2011), men det er en forskjell fra den vanlige PCR amplifiseringen. Det tilsettes nemlig fire fluoriserende dideoksynukleotider (ddATP, ddGTP, ddTTP og ddCTP) med ulike fargestoffer i hver sin reaksjonsblanding. Disse analogene mangler en hydroksylgruppe (OH), og kan derfor ikke danne bindinger til nye nukleotider (Thougaard et al., 2009). Polymerasen merker ikke forskjell mellom dNTP og dideoksynukleotidene (ddNTP), og vil benytte begge komponentene i elongeringsprosessen. Når en ddNTP settes inn vil polymerasen stoppe opp, og elongeringsprosessen termineres (Harvey & Ferrier, 2011). PCR-produktet vil inneholde lange og korte DNA-fragmenter, alt ettersom hvor ddNTP settes inn (Valencia, 2013). Dessuten inneholder sekvenserings-PCR et overskudd av primere og ddNTP som kan skape forstyrrelser under sekvenseringen om de ikke fjernes (McPherson & Møller, 2000). Ved hjelp av en kapillær gelelektroforese med polyakrylamid gel og en laserdetektor er det mulig å skille DNA-molekylene fra hverandre. En laserdetektor vil registrere signalene fra de fire ulike fluoriserende ddNTP, og detektoren vil kunne omsette disse signalene til bp slik at DNAets basesekvens kan fremstilles grafisk (Thougaard et al., 2009).

### 3.4.1 16S rRNA

Den vanligste metoden å benytte ved fylogenetiske studier (Wang et al., 2007) og undersøkelser av mikrobiologiske populasjoner er sekvensering av 16S ribosomal ribonukleinsyre (rRNA) (Harvey & Ferrier, 2011). I 90 % av tilfellene kan forskerne bekrefte bakterieslekten ved sekvensering av 16S rRNA genet, mens i 65-83 % av tilfellene kan sekvensen til 16S rRNA genet også bestemme bakteriearten. En liten andel (1-14 %) av isolatene vil ikke kunne identifiseres ut ifra 16S rRNAet (Janda & Abbott, 2007). 16S rRNA finnes i alle prokaryote celler. Genet er en viktig del av den normale cellefunksjonen, og rRNA er selve målsetet hvor proteinsyntesen starter (Harvey & Ferrier, 2011). Grunnet sin svært sentrale oppgave i cellens normalfunksjon er 16S rRNA lite forandret under bakteriens utviklingsevolutjon, og dette er en av grunnen til at genet benyttes i fylogenetiske studier. En annen grunn er at genet består av cirka 1500 bp, og dermed inneholder det nok informasjon til å identifisere og klassifisere bakterier ned til artsnivå (Kolbert & Persing, 1999). Utfordringen med rRNA er at det kan være vanskelig å identifisere nye taksonomiske grupper, at det ikke er tilstrekkelig sekvenser i nukleotiddatabasen eller at arter deler lignende og/eller identiske 16S rRNA (Janda & Abbott, 2007). Det er også viktig å ha en bra søkesekvens, det vil si bra

separering av basene og tilstrekkelig lengde (rundt 800-1000 bp), om «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST) skal benyttes (Altschul et al., 1997). Det er behov for et standardisert sett med retningslinjer for å hjelpe forskerne med å tolke sekvenseringsdataene slik at resultatene fra 16S rRNA-sekvensering samsvarer på tvers av forskningsmiljøene (Janda & Abbott, 2007).

### 3.4.2 Resultatbehandling av 16S rRNA

Et av de mest brukte verktøyene for å behandle resultatene fra en sekvensering er programvaren BLAST (Altschul et al., 1997). BLAST er utviklet av «National Center for Biotechnology Information» (NCBI), og sammenligner ukjente nukleotider i en DNA-sekvens med kjente DNA-sekvenser fra dataprogrammets GenBanken database. På denne måten kan ukjente bakterieprøver sammenlignes med kjente bakterier og eventuelt identifiseres. Siden mange bakterieslekter og -arter har forholdsvis like og/eller identiske sekvenser (Janda & Abbott, 2007) kan resultatene bli svært omfattende, og resultatene kan derfor fremstå som lite valide. Det finnes mange typer BLAST, men de kan deles inn i to hovedkategorier proteinbaserte og nukleotidbaserte metodene (Nucleus, 2012). Det er også mulig å benytte andre programvarer som «The Ribosomal Database Project (RDP) Classifier» for å bekrefte bakterieslekter fra 16S rRNA PCR-produkter (Wang et al., 2007).

## 3.5 Agarose gelelektroforese

Den vanligste og hurtigste metoden for å analysere PCR-produkter er agarose gelelektroforese (McPherson & Møller, 2000). Agarose er et linjert polysakkarid som er utvunnet fra røde alger, og kan løses opp ved oppvarming før det danner gel ved nedkjøling. Kort oppsummert baserer gelelektroforese seg på at DNA-molekylene, som har en negativ ladning, beveger seg gjennom en gel mot en anode som er positivt ladd. Gelen er fast, men inneholder en rekke porer, hvor styrken på gelen bestemmer størrelsen på porene. Mer agarose vil gi en strammere gel og mindre porer slik at mindre DNA kan detekteres. Porene vil være fylt med elektroforesebuffer med en passende pH og ionekonsentrasjon (Thougaard et al., 2009). Etersom DNA-fragmentene beveger seg gjennom gelen vil de sorteres etter størrelse. De minste vil bevege seg hurtigst og nå lengst (McPherson & Møller, 2000). Før ble det benyttet etidiumbromid (EtBr) for å synliggjøre DNA-båndene, men grunnet sin toksisitet ble den byttet ut med «GelRed™» eller «GelGreen™» som er mer skånsomme og miljøvennlige valg

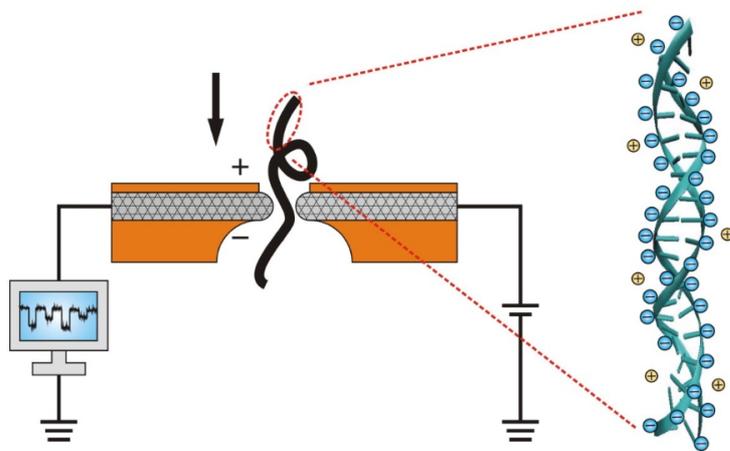
(Biotium, 2015). For å bestemme størrelsen på DNA-fragmentene benyttes en størrelsesmarkør («ladder») som inneholder kjente DNA-fragment (Biolabs, 2019). Størrelsen benevnes som regel i bp (Thougaard et al., 2009). Hvor mye agarose som benyttes i gelen avhenger av størrelsen på de oppkonsentrerte DNA-fragmentene som skal separeres, men det er vanlig å bruke 0,8-3,0 % agarose. 1 % agarosegel kan separere DNA-fragmenter mellom 500-4000 bp, mens 2 % blir ofte brukt ved detektering av mindre DNA-fragmenter (McPherson & Møller, 2000). I tillegg tilsettes en «loading dye» for å gjøre det lettere å treffe og fylle brønnen i agarosegelen. Dessuten vil «loading dyen» gjøre det lettere å følge migrasjonen under elektroforesen. I denne oppgaven ble det brukt en «Agarose Loading Dye, 6X». Den lyseblå fargen indikerer migrasjon ned til 4000 bp, indigo 600 bp og magenta 150 bp ved 1 % agarose gel (Amresco Inc, 1994).

### 3.6 Nanoporesekvensering med MinION

I 2014 introduserte Oxford Nanopore Technologies (ONT) MinION med nanoporesekvensering til markedet (Miten et al., 2015). MinION er en liten maskin som kan kjøre realtime sekvensering og på samme tid lese av hele genom. Maskinen er på størrelse med en Iphone og kan kobles til en hvilken som helst PC gjennom en USB-inngang, noe som gjør at den kan tas med overalt (Tarraga et al., 2016). På bakgrunn av dette antas det at en MinION sekvensering har et stort potensial innen mikrobiologiske undersøkelser. Den er alt brukt i overvåking av Ebola, samt detektering av Zikaviruset og vancomycinresistens i enterokokker (Tyler et al., 2018). I forhold til tidligere sekvenseringsmetoder er det ikke behov for amplifisering (PCR) eller annen kjemiske merking (primer), noe som vil spare betydelig med tid (Hengyun et al., 2016).

Idéen bak nanopore sekvensering stammer fra seint på 80-tallet. Den gangen ble det skissert et forslag om en maskin som kunne sekvensere enkeltrådede DNA-strenger ved å benytte elektroforese for å transportere den ukjente prøve gjennom en nanoporemembran (Deamer et al., 2016). Dagens nanosekvensering består av en syntetisk membran med 2058 protein nanoporer som ligger nedfelt i en elektrofysiologisk løsning i et todelt kammer, og hele 512 DNA-molekyler kan leses av på samme tid (Tyler et al., 2018). Under nanosekvenseringen settes det på elektronisk spenning over membranen for å kunne lese av basekomposisjonen. Når DNAet eller RNAet strømmer gjennom nanoporene fra *cis* til *trans* siden av membranen (se figur 3.1), vil dette skape en forandring i den elektroniske strømningstettheten (Deamer et

al., 2016). Denne forandringen registreres av en sensor som sender informasjonen til en chip før et dataprogram (MinKNOW) sekvenserer hele DNA-fragmentet i prøven (Hengyun et al., 2016). Hvor hurtig DNA- eller RNA-tråden beveger seg gjennom nanoporene bestemmes av et enzym (polymerase eller helicase) som er bundet til DNAet eller RNAet (Deamer et al., 2016; Miten et al., 2015). Dataprogram som «What`s in my Pot?» (WIMP) og «Antimicrobial Resistance Mapping Application» (ARMA) er vanlige å bruke til bearbeiding av resultatene fra MinION (Oxford Nanopore Technologies, 2017). Først vil WIMP programmet klassifisere den ukjente prøven slik at den ender i den riktige taksonomiske gruppen før ARMA benyttes for å detektere ARG (Schmidt et al., 2016).



Figur 3.1. Skjematisk fremstilling av nanoporesekvensering, (Science China Press, 2013).

### 3.7 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Disk diffusjon regnes for å være en av de eldste og mest brukte metodene for å teste bakterienes sensitivitet mot antibiotika (AST) (Chaitanya et al., 2014). Grunnen til dette er at disk diffusjonsmetoden gir reproduserbare og valide resultater, samt den krever få ressurser. I denne masteroppgaven benyttes disk diffusjonsmetoden som er utviklet av «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST) basert på «International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing» (Matuschek et al., 2013).

I korte trekk går disk diffusjonsmetoden ut på at en test strip med en gitt mengde antibiotika overføres til en Muller-Hinton (M-H) agar petriskål inokulert med en gitt bakterieprøve. Antibiotikumet vil diffundere over til agaren, og gradvis forandre antibiotika gradienten rundt disken (Remel, 2012). Om bakterien er resistent mot det gitte antibiotikumet eller mengden på den gitte disken vil bakterievekst ikke påvirkes ytterligere (Matuschek et al., 2013), men om bakterien er mottakelig for antibiotika vil veksten hemmes. Det vil oppstå inhiberingssoner

rundt disken, og den nederste delen av inhiberingssonen indikerer hvor mye antibiotika som skal til for å skape en bakteriostatisk effekt. Denne verdien må så sjekkes opp mot de kliniske konsentrasjonsverdiene for brytningspunktet for MIC (EUCAST, 2009). Er dosen på disken høyere enn resistensverdiene kan det konkluderes med at bakteriestammen er resistent mot det gitte antibiotikumet. Det er standard å la bakterieprøvene vokse på en M-H agar (NCCLS, 1996), og for «kresne» bakterier må det tilsettes et supplement som inneholder  $\beta$ -NAD og heste- eller saueblod (Matuschek et al., 2013). Videre er det vanlig å benytte en McFarland 0,5 Standard for å teste turbiditeten til de fortyndede bakterieprøvene (i saltvann) før de strykes ut på H-M agaren og inkuberes. Vanligvis inkuberes M-H petriskålene i 16-20 timer ved  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  om leverandøren ikke oppgir annet (Chaitanya et al., 2014).

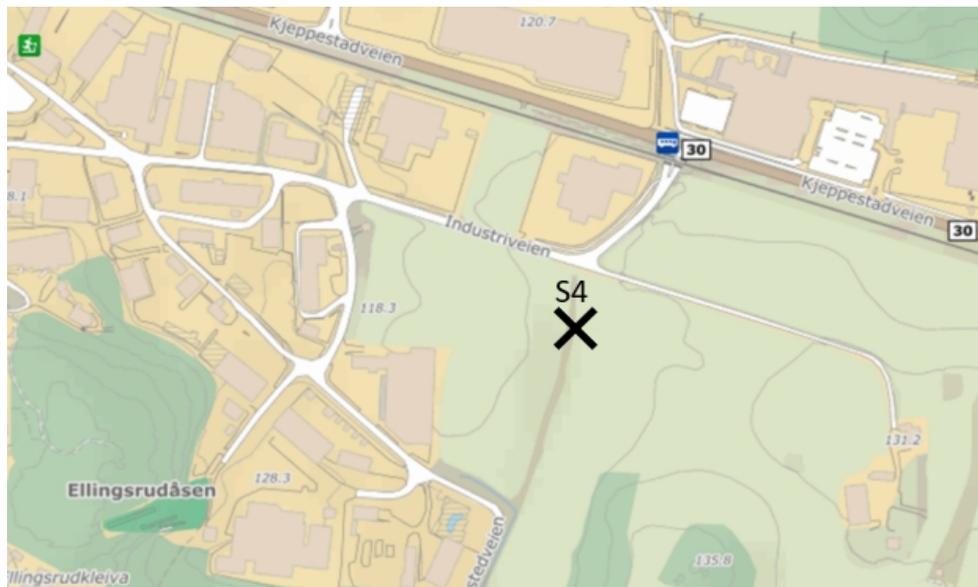
## **4 MATERIAL OG METODER**

### **4.1 Material**

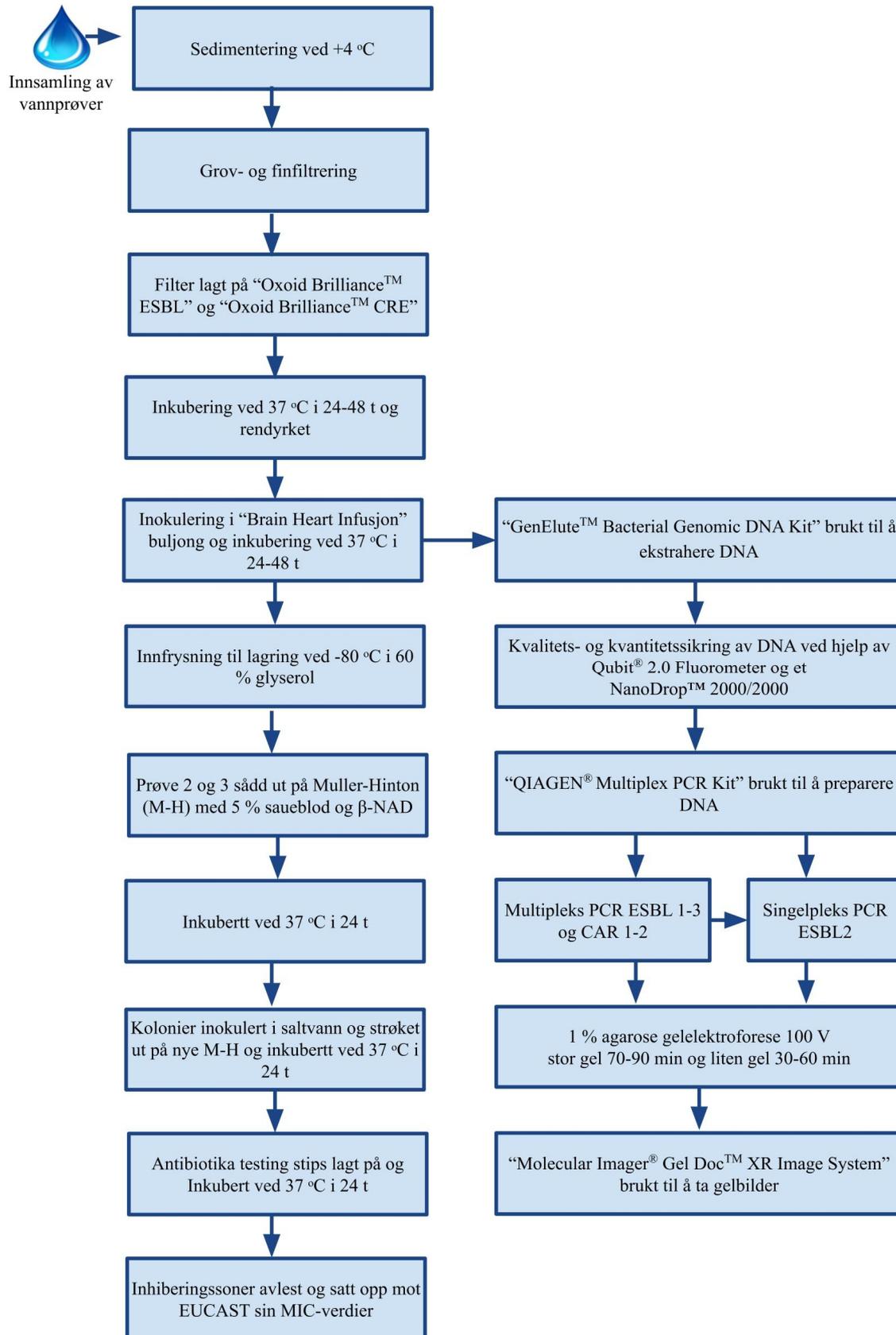
Ås er et gammelt landbruksområde, hvor det fremdeles drives landbruk, både dyrehold og dyrking av jord. På campus finnes en liten dam kalt Andedammen. Utfra Andedammen renner det en liten bekk kalt Niagara som strømmer gjennom et renseanlegg før den ender i en innsjø kalt Årungen. Ellingsrud industriområdet i Ski er et tettbebodd strøk med ulike idrettsplasser, butikker og fabrikker som Lilleborg AS, samt noe jordbruk. Det ble samlet inn en vannprøve fra Andedammen og to vannprøver fra Niagara (se figur 4.1), mens den siste ble hentet fra en liten elv som ligger på Ellingsrud industriområde, øst i Ski kommune (se figur 4.2). Alle vannprøvene ble hentet i løpet av februar 2019. Det ble hentet inn cirka 200 ml vannprøve i 500 ml og 1000 ml sterile Scott Duran glassflasker. Disse flaskene ble satt på et mørkt kjølerom ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i henholdsvis to og en dag for å sedimentere. Figur 4.3 og 4.4 beskriver videre behandling av vannprøvene i dette forsøket.



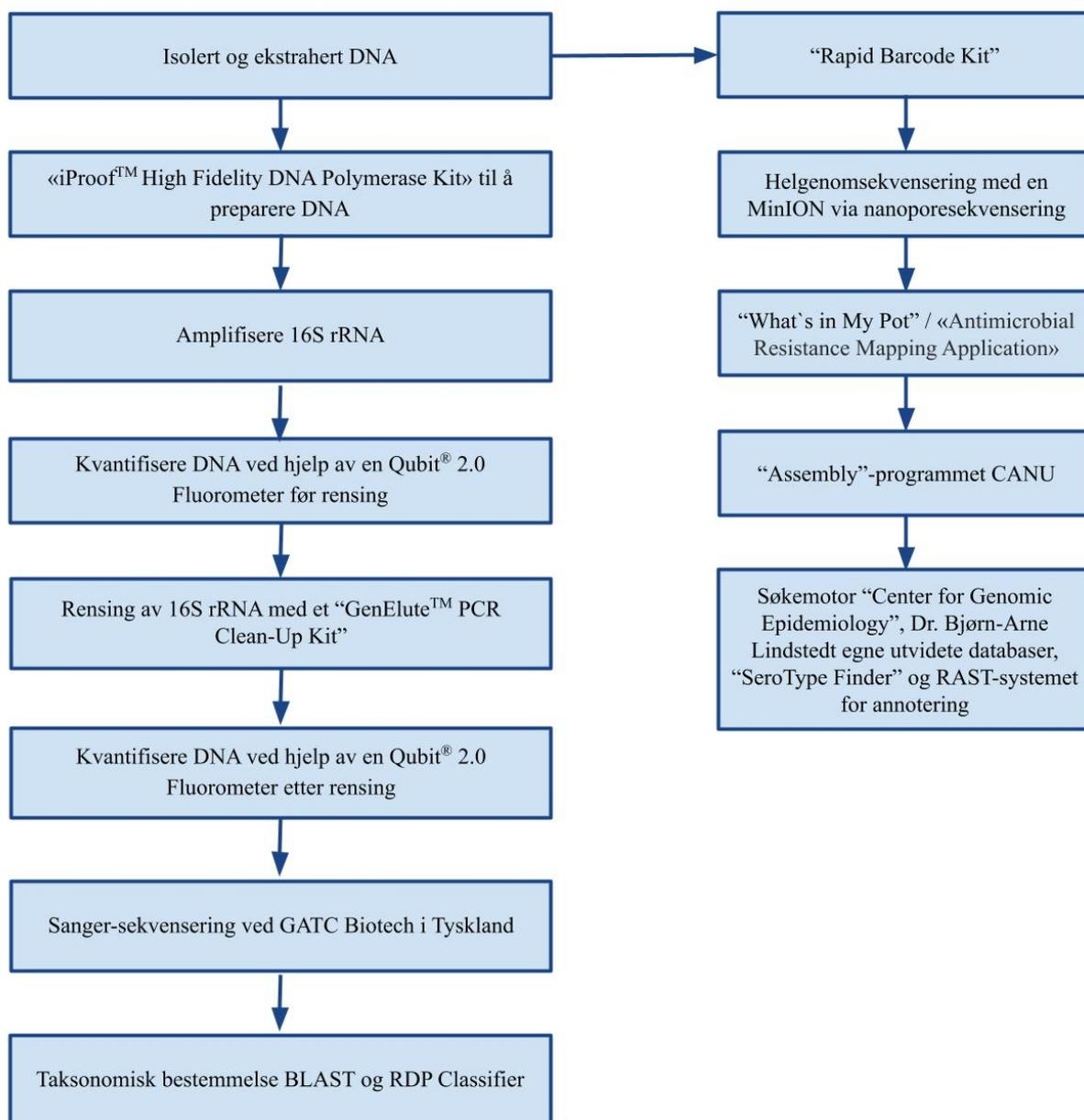
Figur 4.3. Kart som viser hvor vannprøvene fra Andedammen (S1), Niagara 1 (S2) og Niagara 2 (S3) ble hentet februar 2019.



Figur 4.4. Kart som viser hvor vannprøvene fra Ellingsrud Ski kommune (S4) ble hentet februar 2019.



Figur 4.3. Flytskjema som viser prosessstegene fra innsamling av vannprøver til billedtakning av multi- og singelpleks PCR-produktene (ESBL 1-3, CAR 1-2 og ESBL2) etter agarose gelelektroforese, samt gangen i antimikrobiell sensitivitetstesting.



Figur 4.4. Skjematisk fremstilling av Sanger-sekvenseringen og helgenomsekvenseringen.

## 4.2 Metoder

### 4.2.1 Behandling av vannprøvene

Siden prøvematerialet var svært grumsete etter sedimenteringen, ble det brukt et grovfilter før vannprøvene ble finfiltrert (vakuumfiltrert). Til grovfiltreringen ble det brukt et sterilt «Whatmann® Quantity filter paper 589/1 Black ribbon 15 cm i diameter» (GE Healthcare, VWR™ Life Science, Pittsburg USA). Dette filteret ble brukt fordi det vil slippe gjennom bakteriene, men holder igjen jord og andre uønskede partikler. Filteret ble satt i en trakt, og 200 ml fra hver av de fire vannprøvene ble filtrert ned i en 200 ml Scott Duran glassflasker.

Etter grovfiltreringen ble vannprøvene finfiltrert i et «Millipore™ Microfil»-filtreringssystem MISP00002» (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) som var koblet til en vannkran. 100 ml fra hver av de tre vannprøvene ble fylt i små plastbeger og filtrert gjennom et sterilt EZ-Pak® membranfilter (Merck KGaA) med en porestørrelse på 0,22 µm. Det var trykk fra vannet i vannkranen som fjernet vannprøvene, og skylte den ut i vasken. Etter vakuumsfiltreringen ble EZ-Pak® membranfilteret overført til ferdigstøpte agarskåler. Det ble benyttet to typer AR medium, «Oxoid Brilliance™ ESBL» (Thermo Fisher Scientific Inc., Hampshire, Storbritannia) og «Oxoid Brilliance™ CRE» (Thermo Fisher Scientific Inc.). Skålene ble så inkubert på det patogene laboratoriet ved 37 °C i 48 timer.

#### *4.2.2 Isolering av DNA og nedfrysning av bakterier*

Etter endt inkuberingsstid ble det plukket kolonier med en steril podeøse (GE Healthcare, VWR™ Life Science) i henhold til Thermo Fischer Scientific Inc. (2014). Hovedsakelig var det mørkeblå, lyserosa, grønne og brune kolonier fra «Oxoid Brilliance™ ESBL» skålene og brune kolonier fra «Oxoid Brilliance™ CRE» skålene som ble plukket. Koloniene ble strøket ut på nye AR skåler også inkubert i 24-48 timer ved 37 °C. De skålene som hadde vekst etter førsteutstyking gjennomgikk en andre og eventuelt tredjegangs utstryking for å sikre at det var rene bakterieisolater som vokste frem. Det ble så plukket kolonier fra de petriskålene en antok det vokste ARB. Disse koloniene ble så inokulert i 10 ml reagensrør (med kork) fylt med romtemperert «Brain Heart Infusion» (BHI) buljong (OXOID Ltd., Loughborough, Storbritannia).

BHI er et næringsrikt medium hvor «kresne» bakterier kan vokse, og anbefales som vekstmedium i forsøk hvor det søkes etter antibiotikafølsomme bakterier (Interchim®, u.å.). Buljongen ble preparert i henhold til produsentens anvisning av stipendiat Misti Dawn Finton ved gruppe meieriteknologi og matkvalitet, KMB, NMBU. På lik linje med de kromogene petriskålene, ble bakterieisolatene inokulert i BHI inkubert i 48 timer ved 37 °C, før DNA ble ekstrahert (se 4.2.3). Alle bakterieisolatene vokste som ønsket i BMI buljongen, og skålene ble merket med hvert sitt prøvenummer (n=8). Det ble gjort en vurdering av hvilke bakterier de selektive skålene kunne inneholde før det ble tatt bilder av koloniveksten på 2. og/eller 3. utstryksskål (fenotypiske trekk ved bakterieprøven) med en vanlig mobiltelefon. Videre ble 500 µl BHI fra hvert av reagensrørene pipettert ned i 2 ml kryorør (Nunc™ CryoTubes™, Thermo Fisher Scientific Inc.) sammen med 500 µl glyserol (60 %). Dertil ble rørene plassert i

en fryser (-80 °C) for langtidslagring, mens resten av prøvematerialet ble kastet og autoklavert.

#### *4.2.3 Ekstrahering av DNA*

For å ekstrahere DNAet fra bakterieisolatene ble det benyttet et «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). Siden vi ikke visste hvilke bakterieisolater som vokste på de ulike petriskålene ble protokollen for Gram-positive bakterier anvendt. Dette fordi protokollen for Gram-positive inneholdt enzymet lysozym (Sigma-Aldrich®) som kan bryte ned det tjukke peptidoglykanlaget i celleveggen til eventuelle Gram-positive bakterier i de ukjente bakterieprøvene. Protokollen fra produsenten ble hovedsakelig fulgt, men det ble gjort en justering. Kittets buffer ble byttet ut med en «SequalPrep™ Normalization Elution Buffer» (Thermo Fisher Scientific Inc.). Grunnen til dette var at kittets buffer inneholdt EDTA som kan ødelegge DNA-sekvenseringen (Kolbert & Persing, 1999). Deretter ble DNAet oppbevart i fryseren (-20 °C) før det ble kvalitetssikret, kvantifisert og amplifisert.

#### *4.2.4 Kvalitetssikring og kvantifisering av DNA ved hjelp av Qubit® 2.0*

##### *Fluorometer og NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer*

Etter at DNAet var ekstrahert ble det benyttet et Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies Corporation, Wilmington, USA) og et NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, USA) for å kvalitetssikre og kvantifisere DNA-innholdet i bakterieprøvene. Et «Qubit® dsDNA BR Assay Kit» (Invitrogen™ Life Technologies Corporation, Eugene, USA) ble brukt for å klargjøre DNAet til kvantifisering, og protokollen ble fulgt. Det ble overført 2 µl DNA (tint på is og vortexet før bruk) og 198 µl reagens til et 0,5 ml BRAND® mikrosentrifugerør (Sigma-Aldrich®) før DNAet ble kvantifisert. De to standardene i kittet ble brukt til å lage en standardkurve de ukjente bakterieprøvene kunne måles opp mot, og det var ønskelig at prøvene skulle ha en verdi på 20-80 ng/µl. Etter at DNAet var kvantifisert ble det kvalitetssjekket ved hjelp av et NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer. Det ble benyttet 2 µl vann for å kalibrere apparatet, og mellom hver prøvetakning ble linsen vasket. 2 µl DNA ble pipettert ut fra hver av de fremdyrkede bakterieisolatene. Dataprogrammet «NanoDrop 2000/2000C software

versjon 1.0» (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) ble benyttet for å lese av resultatene.

#### 4.2.5 Multi- og singelpleks PCR

I denne masteroppgaven ble det benyttet tre multipleks primermikser (ESBL 1-3), også kalt mastermikser, for å undersøke tilstedeværelsen av ESBL i bakterieisolatene. Det ble også brukt to multipleks primermikser (CAR 1-2) for å identifisere eventuelle karbapenemaser. Hver multipleks primermiks inneholdt fire eller tre primerpar for å nå ulike målgen, hvor KONTROLL var en kontrollsjekk (se tabell 4.1 og 4.2). På grunn av to positive resultater (prøve 2 og 3) etter agarose gelelektroforesen, ble tre singelpleks PCR kjørt med primerpar og målgenen til ESBL 2 (se tabell 4.1). Singelpleks PCR-produktene ble deretter rensset og sendt til sekvensering i Tyskland (se 4.2.6.1-4.2.5.3).

Tabell 4.1. Primerpar, primesekvens, målgen og antall basepar de tre ESBL multipleks primermiksene og KONTROLL primermiksen inneholdt.

Primerpar	Primersekvenser (5'-3')	Målgen	Basepar (bp)	Referanser
<b>ESBL 1</b>				
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	281	Dallenne et al. (2010)
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAA			
MultiCTXMGp2-F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> <sub>CTX-M (gr. 2)</sub>	404	Dallenne et al. (2010)
MultiCTXMGp2-R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT			
MultiTSOO-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	564	Dallenne et al. (2010)
MultiTSOO-R	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG			
MultiTSOS-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	713	Dallenne et al. (2010)
MultiTSOS-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC			
<b>ESBL 2</b>				
MultiCTXMGp9-F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla</i> <sub>CTX-M (gr. 9)</sub>	561	Dallenne et al. (2010)
MultiCTXMGp9-R	TGATTCTCGCCGCTGAAG			
MultiCTXMGp1-F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla</i> <sub>CTX-M (gr. 1)</sub>	688	Dallenne et al. (2010)
MultiCTXMGp1-R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT			
MultiSOT-F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	800	Dallenne et al. (2010)
MultiSOT-R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
<b>ESBL 3</b>				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	157	Lindstedt (u.å.-a)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCCGCAT			
VIM-F	ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	564	Lindstedt (u.å.-b)
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT			
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	460	Lindstedt (u.å.-c)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			
<b>KONTROLL</b>				
rpoB-F	CAGGTCGTCACACGGTAACAAG	<i>RpoB</i>	512	Arabestani et al. (2014)
rpoB-R	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC			
16S-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	<i>16S rRNA</i>	1505	Generic
16S-R	GGTTACCTTGTTACGACTT			

Tabell 4.2. Primerpar, primersekvens, målgen og antall basepar de to CAR multipleks primermiksen inneholdt.

Primerpar	Primersekvenser (5'-3')	Målgen	Basepar (bp)	Referanse
<b>CAR 1</b>				
CMY2-F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	188	Lindstedt (u.å.-d)
CMY2-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACG			
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	281	Dallenne et al. (2010)
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAA			
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	393	Lindstedt (u.å.-e)
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT			
MultiTSOO-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	564	Dallenne et al. (2010)
MultiTSOO-R	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG			
<b>CAR 2</b>				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	157	Lindstedt (u.å.-a)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT			
SFC1-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	<i>bla</i> <sub>SFC-1</sub>	268	Lindstedt (u.å.-f)
SFC1-R	CACTGTACTGCAGAGTGGCA			
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	460	Lindstedt (u.å.-c)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			

Det var ingen standard som anga hvilke primerpar og målgen multipleks primermiksen skulle inneholde. Denne avgjørelsen ble tatt av veileder professor Bjørn-Arne Lindstedt, og primerne som ble valgt kodet for de viktigste ESBL<sub>A/M</sub> og ESBL<sub>KARBA</sub> i kliniske sammenhenger (Dallenne et al., 2010; Davies & Davies, 2010; Giske et al., 2008; Iredell et al., 2016; Löhr & Samuelsen, 2015; Nordmann et al., 2011; Shaikh et al., 2015). De fleste primerparene som ble benyttet var designet i forbindelse med tidligere forsøk (Dallenne et al., 2010), mens de resterende ble designet av veileder ved hjelp av programvaren «Primer-BLAST» («National Center for Biotechnology Information», Bethesda, USA), slik tabell 4.1 og 4.2 viser. NCBI har utviklet programvaren «Primer-BLAST» som bruker «Primer3web versjon 4.1.0.» for å designe målspesifikke PCR primere. Deretter benyttes BLAST og globale alignment algoritmer for å finne den optimale nukleotid kombinasjonen slik at en forhindrer at primerparet koder for ikke-spesifikke amplifikasjoner (Ye et al., 2012). Multipleks primermiksen ble laget av stipendiat Misti Dawn Finton i henhold til protokollen, mens singelpleks primerne ble levert av Thermo Fischer Scientific Inc..

Det ble anvendt et «QIAGEN® Multiplex PCR Kit» (QIAGEN®, Hilden, Tyskland) for å preparere det ekstraherte DNAet til multi- og singelpleks PCR. Protokollen ble hovedsakelig fulgt, men mengden reaksjonsløsning ble halvert fordi dette var mer økonomisk. Det vil si at 24 µl reagenser og 1 µl DNA (se tabell 4.3) ble pipettert i «MicroAmp® 8-Tub Stripes» (GE Healthcare VWR™ Life Science) før prøvene ble overført til et «Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler» (Thermo Fisher Scientific Inc.) for å amplifisere DNA. Det ble

anvendt to ulike programmer (Master ESBL-2 og Master ESBL) i denne masteroppgaven; et program for å amplifisere DNAet til ESBL-prøvene (se tabell 4.4) og et for å amplifisere DNAet til CAR-prøvene (se tabell 4.5). Begge Master ESBL-programmene var programmert i henhold til resultater fra gamle masteroppgaver (Skamflem, 2018; Solberg, 2018).

Tabell 4.3. Nødvendige reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet til PCR amplifisering.

Reagenser	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum (µl) til 1 reaksjon
2x «Quiagen Multiplex PCR Mastermix»	2x	1x	12,5
Primermiks	2 µm av hver primer	0,2 µm	2,5*
PCR grade H <sub>2</sub> O			9
Templat (DNA-fragment)		1 µg DNA/reaksjon	1
<b>Totalkonsentrasjon i hvert rør</b>			<b>25</b>

\*1,5 µl av «forward» og «revers» primer ved tillaging av singelpleks primermiks.

Tabell 4.4. Master ESBL-2 programmet benyttet ved PCR for ESBL 1-3 pluss KONTROLL med hensyn til tid, temperatur og antall sykluser.

Steg i PCR-prosessen	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Sykluser
Aktivering	95	15:00	1
1. Denaturering	94	00:30	
2. Annealing	60	01:30	28
3. Elongering	72	01:30	
Endelig elongering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

Tabell 4.5. Master benyttet ved PCR for CAR 1-2 med hensyn til tid, temperatur og antall sykluser.

Steg i PCR-prosessen	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Sykluser
	95	15:00	1
1. Denaturering	94	00:30	
2. Annealing	62	01:30	30
3. Elongering	72	01:30	
Endelig elongering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

#### 4.2.5.1 Agarose gelelektroforese

Det ble laget både små og store geler, alt etter som hvor mange PCR-produkter som skulle undersøkes. Det ble brukt 1 % agarosegel for å kunne separere og identifisere båndene i gelen

(McPherson & Møller, 2000). Ved tillaging av en liten gel ble 50 ml Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) og 0,5 g SeaKem® LE Agarose (Lonza Rockland Inc., Rockland, USA) blandet i en 500 ml Erlenmeyerkolbe (stor gel ble ingrediensene x5). Erlenmeyerkolben ble satt inn i en mikrobølgeovn i 1,5 minutter på maksimum styrke og deretter 1/2 minutt på 600 watt (geleblandinger til de store gelene ble satt på 1,5 minutter på full styrke og i 1,5 minutter på 600 watt). Etter oppvarming ble Erlenmeyerkolben satt på benken for å kjøles ned. Gelen ble så tilsatt 2,5 µl (12,5 µl stor gel) «GelRed™ Nuclure Acid» (Biotium, Fremont, USA) før den ble helt ned i et utstøpningskar (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.).

Da gelen var fast og opak, ble brønnkammen tatt ut. De små gelene ble overført til et «Mini-Sub® Cell Model GT System» (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.), mens de store ble overført til et «Sub-Cell® Cell Model GT System» (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.) fylt med TAE-buffer. Videre ble 4 µl H<sub>2</sub>O, 3µl «Agrose Gel Loading Dye 6x» (GE Healthcare, VWR™ Life Science, AMERSCO®, Solon, OH, USA) og 3 µl DNA-produkt overført fra «MicroAmp® 8-Tubene» til en PS mikroplate 96 brønnplate (Greiner Bio-One, Thermo Fisher Science Inc.). De tre komponentene ble blandet godt med en pipette, og 10 µl fra hver av brønnene i 96 brønnplate ble så pipetert over til en brønn i agarosegelen. Før elektroforesen ble igangsatt, ble 7 µl «Quick-Load 100 bp DNA ladder» (New England Biolabs Inc., Ipswich, England) med et størrelsesområde på 100-1517 bp tilsatt (Biolabs, 2019). I de store gelene ble det satt inn en «ladder» i den første og midterste brønnen, mens i de små gelene ble det kun brukt en «ladder» i den første brønnen. Det ble brukt en «Bio-Rad PowerPAC 300 SUPPLY» (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.) som elektrisk kilde til elektroforesen. Både multi- og singelpleks PCR-produktene ble kjørt på 80 volt. De store gelene ble kjørt i 70-90 minutter, mens de små ble kjørt i 30-60 minutter.

Etter endt agarose gelelektroforese ble det tatt bilder av gelene under UV-lys i en «Molecular Imager® Gel Doc™ XR Image System» (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.). Dataprogrammet «The Discovery Series™ Quantity One® 1-D Analysis Software versjon 4.6.7» (Bio-Rad Laboratories Inc.) ble brukt for å analysere bildene. Til singelplekse PCR ble det brukt en «UVP Dual-Intensity Transilluminator» (Thermo Fisher Science Inc.) for å bekrefte DNA-båndene i gelen, og bildet ble tatt med en vanlig mobiltelefon.

## 4.2.6 Sangersekvensering av 16S rRNA

### 4.2.6.1 16S rRNA PCR

Det ble anvendt et «iProof<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase Kit» (Bio-Rad Laboratories Inc., Vilnius, Litauen) med et primerpar som kodet for 16S rRNA (se tabell 4.6) for å preparere DNAet til 16S rRNA PCR. I tabell 4.7 listes det opp hvilke reagenser som ble benyttet, og protokollen fra leverandøren ble fulgt. En «Applied Biosystems<sup>TM</sup> SimpliAmp<sup>TM</sup> Thermal cycler» ble brukt til å kjøre 16S rRNA PCR, og maskinen ble stilt inn på Master 16S rRNA-programmet (se tabell 4.8).

Tabell 4.6. Primerpar, primesekvens, målgen og antall basepar som ble brukt for å detektere 16S rRNA genen.

Primer	Primersekvens (5'-3')	Målgen	Basepar (bp)
F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1505
R	GGTACCTTGTTACGACTT		

Tabell 4.7. Nødvendige reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet til 16S rRNA PCR amplifisering.

Reagenser	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum (µl) til 1 reaksjon
Iproof HF buffer	5x	1x	8
dNTPs	10 mM	200 µM	0,8
«Forward» 1 primer	5 µM	0,25 µM	2
«Revers» 1 primer	5 µM	0,25 µM	2
PCR grade H <sub>2</sub> O		40 µl	24,8
Iproof DNA polymerase	2 U/µl	0,02 U/µl	0,4
Templat (DNA-fragment)	5-100 ng/µl	7,5-150 ng	2
<b>Total konsentrasjon i hvert rør</b>			<b>40</b>

Tabell 4.8. Master 16S rRNA programmet benyttet ved PCR for 16S rRNA med hensyn til tid, temperatur og antall sykluser.

Steg i PCR-prosessen	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Sykluser
Aktivering	98	00:30	1
1. Denaturering	98	00:10	
2. Annealing	55	00:30	35
3. Elongering	72	00:450	
Endelig elongering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

#### 4.2.6.2 Rensing av 16S rRNA PCR-produkter

Etter amplifisering av DNAet til 16S rRNA PCR-produktene, ble primerne fjernet ved hjelp av et «GenElute™ PCR Clean-Up Kit» (Sigma-Aldrich®). Protokollen ble hovedsakelig fulgt, men i det siste trinn ble det tilsatt 25 µl «Elution Solution» (Sigma-Aldrich®) istedenfor 50 µl. Dette ble gjort for å oppnå en høyere DNA-konsentrasjon, noe som kunne fremme sjansen for å oppnå gode Sanger-sekvenseringsresultater. Dertil ble DNA-innholdet kvantifisert ved hjelp av et Qubit® 2.0 Fluorometer (se punkt 4.6). Etter kvantifiseringen ble de rensede 16S rRNA PCR-produktene sendt til GATC Biotech i Tyskland for Sanger-sekvensering.

Før prøvene ble sendt til Tyskland, ble 20 eppendorfrør alà 1,5 ml (16 rør til 16S rRNA PCR-produktene og fire rør til ESBL-2 singelpleks PCR-produktene) merket med en strekkode og et nummer. Dagen prøvene skulle sendes ble det pipettert ut 5 µl rensed DNA-produkt og 5 µl «forward» eller «revers» primer i 1,5 ml eppendorfrør. Dette fordi sekvensene som koder for 16S rRNA er forholdsvis lange (cirka 1500 bp), og for å få med all nødvendig informasjon var det nødvendig å sende et rør med «forward» primer og et rør med «revers» primer. Sekvensen for *bla<sub>CTX-M</sub>(gr. 9)* var betydelig kortere (561 bp) og det var egentlig ikke nødvendig å sende både «forward» og «revers», men samme prosedyre ble fulgt. Grunnet dårlige resultater ble det kjørt en nye singelpleks PCR for prøve 2 og 3 med *bla<sub>CTX-M</sub>(gr. 9)* som målgen. Prøvene ble kvantifisert, rensed og sendt til Tyskland for en ny sekvensering uten videre hell.

#### 4.2.6.3 Resultatbehandling av 16S rRNA PCR-produktene

Det første man må gjøre ved bearbeiding av 16S rRNA Sanger-sekvenseringsresultater er å trimme og sette sammen sekvensen til et potensielt 16S rRNA gen. Det er vanlig å benytte et redigeringsprogram som Bioedit® (Ibis Biosciences, Carlsberg, USA) til denne jobben. I Bioedit® undersøkes og redigeres de ulike sekvenstrådene. Uklare deler redigeres bort og de resterende sekvensene settes sammen til et alignment. Det er dette alignment som seinere benyttes i programvaren BLAST for å kunne identifisere den ukjente bakterieslekten. I denne masteroppgaven ble ikke sekvensene redigert og sydd sammen. Sekvensene fra «forward» og «revers» ble bare lagt rett inn i søkefeltet til BLAST. Grunnen var at Sanger-sekvenseringen hovedsakelig ble brukt til å screene skålene for hva de kunne inneholde. Dessuten ville de viktigste funnene bli helgenomsekvensert med en MinION uansett, og disse resultatene vil være mer valide enn Sanger-sekvenseringsresultatene uansett.

For å kunne systematiseres og analyseres de ubehandlede sekvensene fra Tyskland ble dataprogrammet BLAST anvendt. Valgfunksjonene Nucleotide BLAST (BLASTN) og «16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archea)» ble benyttet for å oppnå ønskede resultater. «Forward» og «revers» sekvensene til hver av de åtte prøvene ble som tidligere nevnt lagt inn i søkefeltet uten å sys sammen først. Hvis kun «forward» og «revers» ble lagt inn var enkelte av sekvensene svært kort og ga ingen svar, mens andre ga for mange svar (korte sekvenser kan gi mange treff med høy likehetsfaktor, men treffene vil være lite valide fordi de er lite spesifikk for den enkelte bakterieprøve). BLAST sammenligner en nukleotidsekvens fra RNAet eller DNAet med nukleotidsekvenser i databasen for å finne eventuelle likheter (Nucleus, 2012). Det var kun bakterieslekter med 99,00-100,00 % identitetsscore som ble vurdert, og «quary»-lengden for de utrimmede sekvensene varierte mellom 871-1775 bp. Videre ble resultatene fra Sanger-sekvenseringen («forward» og «revers» sekvensene i samme felt) lagt inn i programvaren RDP versjon 11 Classifier (Center for microbial ecology, Michigan, USA) for å bekrefte resultatene fra BLAST. Resultatene fra Sanger-sekvenseringen av prøve 2 og 3 ble behandlet med BLASTX fordi denne databasen kan benyttes til å finne spesifikke gen som ARG (Yang et al., 2014). BLASTX er en proteinbasert variant av BLAST som oversetter nukleotidsekvens til en proteinsekvens før søket. Under søket vil databasen lete etter lignende proteinsekvenser i GenBanken og BLASTP-algoritmen benyttes (Nucleus, 2012).

#### *4.2.7 Helgenomsekvensering med MinION*

Det var ønskelig å kartlegge hvilke bakteriestamme(r) som hadde gen(er) som kodet for ESBL i prøve 2 og 3, og derfor ble disse prøvene helgenomsekvensert med en MinION (Oxford NANOPORE™ Technologies, Oxford, Storbritannia) ved hjelp av nanoporesekvensering. Det ble brukt et «Rapid Barcode Kit» (Oxford NANOPORE™ Technologies) for å klargjøre bakterie DNAet til helgenomsekvenseringen, mens WIMP/ARMA (Oxford NANOPORE Technologies) ble henholdsvis benyttet til å stadfeste den ukjente bakterieprøvens taksonomiske gruppe og ARG i «real-time». Forsøket ble utført i henhold til leverandørens spesifikasjoner. Alt arbeidet med MinION ble utført av stipendiat Misti Dawn Finton, mens Dr. Roger Meisal behandlet rådataene fra MinION, da WIMP/ARMA-resultatene ble sett på som ikke utfyllende nok. I bearbeidingsprosessen brukte Dr. Roger Meisal «assembly»-programmet CANU (Koren et al., 2017) som ble kjørt på NMBU sin «ORION cluster» (Cigene, u.å.) fordi en vanlig datamaskin ikke hadde nok kapasitet. CANU prøver å sette

sammen alle sekvensene i rådataen til et ferdig resultat, og målet er å få ut et komplett helgenom, selv om dette er svært vanskelig. CANU lager «contig» med den rådataen som passer best sammen (overlapper hverandre), og CANU antyder at alle genene i en «contig» hører sammen (Koren et al., 2017). Den «samlede» dataen fra CANU-søket ble videre bearbeidet av Dr. Bjørn-Arne Lindstedt for å finne resistensgen, serotype og virulensgener. Det ble i denne sammenheng brukt en online søkemotor («Center for Genomic Epidemiology» som er lokalisert i DTU i Danmark), hans egne utvidete databaser, «SeroType Finder» (Joensen et al., 2015) og RAST-systemet for annotering (Aziz et al., 2008).

#### 4.2.8 Antimikrobiell sensitivitetstesting

For å kunne dokumentere hvilke av de 13 vanligste antibiotikaene (se tabell 4.9), som gis i kliniske sammenhenger, prøve 2 og 3 var resistente mot ble det utført en AST. Det ble brukt test strips, og forsøket ble gjort i henhold til Matuschek et al. (2013). De nedfrosede bakterieisolatene fra prøve 2 og 3 ble sådd ut på M-H agar før petriskålene ble inkubert i 24 timer ved 37 °C. Det ble benyttet ferdigstøpte agarskåler med M-H agar (Thermo Fisher Scientific Inc.) med  $\beta$ -NAD og 5 % saueblod for å få «kresne» bakterier som *Streptococcus* spp. til å vokse (Remel, 2012). Etter endt inkuberingstid ble det plukket kolonier som ble inokulert i sterilt saltvann. Turbiditeten til saltvannet ble sjekket opp mot en McFarland Standard 5.0 (Pro-Lab Diagnostics Inc., Bromborough, Storbritannia) før prøvene ble strøket ut med en steril bomullspinne på nye M-H agarskåler. En antimikrobiell strip ble lagt på toppen av M-H agaren med en steil pinsett, og skålene ble inkubert i 24 timer ved 37 °C. Det ble benyttet antimikrobielle strips fra to ulike leverandører, «M.I.C. Evaluators™» (Thermo Fisher Scientific Inc.) og «MIC Test Strip for Antibiotika Susceptibility Testing» (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia). Mengden antibiotika de 13 test stripene inneholdt varierte, og inhiberingssoneverdien ble sammenlignet med de kliniske, resistente (R>) MIC-brytningspunktverdiene for Enterobacterales\* listet hos EUCAST (2009). Testen ble gjennomført to ganger for å få validere resultatene.

Tabell 4.9. Antibiotika prøve 2 og 3 ble testet opp mot for å påvise klinisk resistens basert på MIC-verdier fra (EUCAST, 2009).

<b>Antibiotikaklasser</b>	<b>Antibiotika</b>
Aminopenicillin	Ampicillin (3. generasjon) Amoksicillin med klavulansyre
Cefalosporin	Cefotaksim (3. generasjon) Cefepim (4. generasjon)
Fluorokinoloner	Ciprofloxacine
Aminoglykosid	Amikacin Gentamicin Streptomycin
Karbapenem	Imipenem Meropenem
Makrolid	Erytromycin
Polymyxin	Kolistin
Sulfonamider og trimetoprim	Trimetoprim

## 5 RESULTATER

### 5.1 Fenotypiske resultater sammenlignet med Sanger-sekvenseringen av 16S rRNA genet og helgenomsekvenseringen

Tabell 5.1 viser hvor bakteriene ble hentet, hvilke fenotypiske trekk bakteriene hadde (kolonifarge) og hvilke bakterier som vokste på «OXOID Brilliance™ EBSL» og «OXOID Brilliance™ CRE» skålene ifølge (Thermo Fischer Scientific Inc., 2014). Tabellen oppgir også hvilke bakterier, som ifølge 16S rRNA Sanger-sekvenseringsresultatene fra RDP Classifier og BLAST (se vedlegg 1 og 2), vokste frem på de selektive, kromogene skålene, samt hvilke stammer som ble helgenomsekvensert og hvilke slekter disse prøvene tilhørte ifølge WIMP- og CANU-resultatene.

Tabell 5.1. Samletabell som viser resultatene fra fargescreeningen på «OXOID Brilliance™ EBSL» (gul) og «OXOID Brilliance™ CRE» skålene (turkis), og hvilke bakterier som kunne vokse frem ifølge Thermo Fischer Scientific Inc. (2014). Videre angir tabellen hvilke bakterier som ble identifisert av BLAST og RDP Classifier etter Sanger-sekvenseringen av 16S rRNA genet, samt hvilke to stammer som ble helgenomsekvensert.

Prøve	Uttakssted	Bilde av petriskåler med AR vekst	Farge på koloni	Fargescreening av ESBL and CRE*	16S rRNA resultat fra BLAST	16S rRNA resultat fra RDP Classifier
1**	Andedammen (S1)		Lysebrune, kornfargede	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. eller <i>Providencia</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp., eller <i>Stenotrophomonas</i> spp. <sup>1</sup>	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
2***	Andedammen (S1)		Mørkeblå, nesten svart	<i>E. coli</i> ****	<i>Escherichia</i> spp. eller <i>Shigella</i> spp. <sup>2</sup>	Enterobacteriaceae

<sup>1</sup> «Query»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 1137 bp (se vedlegg 2).

<sup>2</sup> «Query»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 1538 bp (se vedlegg 2).

3***	Andedammen		Mørkeblå, nesten svart	<i>E. coli</i> ****	<i>Escherichia</i> spp., <i>Shigella</i> spp. eller <i>Citrobacter</i> spp. <sup>3</sup>	<i>Escherichia</i> spp. eller <i>Shigella</i> spp.
4***	Andeammen (S1)		Helt lysebrune kolonier som gikk mot gylden gul/oransje og litt kornfarget	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. eller <i>Providencia</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp. <sup>4</sup>	Pseudomonadaceae
5***	Niagara 1 (S2)		Lysebeige som heller mot litt svakt gule og/eller rosa	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. eller <i>Providencia</i> spp.	<i>Sierratia</i> spp. <sup>5</sup>	<i>Serratia</i> spp.

<sup>3</sup> «Query»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 1266 bp (se vedlegg 2).

<sup>4</sup> «Query»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 871 bp (se vedlegg 2).

<sup>5</sup> «Query»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 929 bp (se vedlegg 2).

6 <sup>***</sup>	Niagara 2 (S3)		Klar, intens sjøgrønn som går mot litt turkis	KESC-gruppen	<i>Pseudomonas</i> spp. <sup>6</sup>	<i>Pseudomonas</i> spp.
7 <sup>***</sup>	Ellingsrud industriområde, Ski kommune (S4)		Svakt beige med et snev av lyserosa	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. eller <i>Providencia</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp. <sup>7</sup>	Alcaligenaceae
8 <sup>**</sup>	Ellingsrud industriområde, Ski kommune (S4)		Lysebrune, kornfargede	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. eller <i>Providencia</i> spp.	Xanthomonadaceae <sup>8</sup>	Xanthomonadaceae

<sup>\*</sup>Thermo Fischer Scientific Inc. (2014). <sup>\*\*</sup>«OXOID Brilliance™ CRE» skål. <sup>\*\*\*</sup>«OXOID Brilliance™ CRE» skål. <sup>\*\*\*</sup>Ble helgenomsekvensert og WIMP og CANU-resultatene kunne bekrefte at prøven var en *E. coli* stamme.

<sup>6</sup> «Quary»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 1080 bp (se vedlegg 2).

<sup>7</sup> «Quary»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 1669 bp (se vedlegg 2).

<sup>8</sup> «Quary»-lengde på utrimmet sekvens («forward» og «revers» i samme søk) 1775 bp (se vedlegg 2).

Ut fra tabell 5.1 kunne det observeres at det var åtte bakterieisoalter som vokste frem på de selektive, kromogene skålene, to på «Oxoid Brilliance™ CRE» skålene og seks på «Oxoid Brilliance™ ESBL» skålene. Videre kunne det observeres at koloniene som vokste på «Oxoid Brilliance™ CRE» skålene (skål 1 og 8) lignet på hverandre, både i farge og vekstmønster. Begge skålene hadde lysebrune, kornfargede kolonier og ifølge protokollen kunne det være *Proteus* spp., *Morganella* spp. eller *Providencia* spp.. BLAST-resultatet antydte at det kunne være *Stenotrophomonas* spp. eller *Pseudomonas* spp., mens RDP Classifier kategoriserte bakteriestammen på skål 1 som en *Stenotrophomonas* spp. og bakteriestammen på skål 8 som en bakterie fra Xanthomonadaceae familien. Koloniene som vokste på skål 2 og 3 var mørkeblå/svarte og ifølge protokollen skulle det være *E. coli* som vokste på disse skålene. BLAST-resultatene indikerte at det kunne være en *Escherichia* spp. eller *Shigella* spp., mens prøve 3 kunne også være en *Citrobacter* spp.. RDP Classifier identifiserte prøve 2 ned til en bakterie i Enterobacteriaceae familien, mens prøve 3 ble klassifisert ned til en *Escherichia* spp. eller *Shigella* spp., mens helgenomsekvenseringen (både WIMP- og de bearbejdede CANU-resultatene) kunne identifisere det var *E. coli* stammer som vokste i både prøve 2 og 3.

Kolonienveksten på skål 4, 5 og 7 så forholdsvis like ut. Forskjellen var at koloniene på skål 4 hadde en mer oransjeaktig farge, mens koloniene på skål 5 og 7 var litt mer lyserosa og beige. Ut fra fargen på koloniene kunne det antas det var som *Proteus* spp., *Morganella* spp. eller *Providencia* spp. vokste på skålene, siden disse skal ha brune kolonier ifølg protokollen. Ifølge BLAST-resultatene var skål 4 *Pseudomonas* spp., skål 5 *Serratia* spp. og skål 7 *Achromobacter* spp.. RDP Classifier kunne identifisere bakteriestammen på skål 4 ned til Pseudomonadaceae familien og bakterien på skål 7 ned til Alcaligenaceae familien, mens bakterieslekten på skål 5 ble identifisert som *Serratia* spp.. Skål 6 var den eneste skålen som hadde sjøgrønne kolonier, og skulle derfor være en *Serratia* spp. ifølg protokollen. Resultatene fra Sanger-sekvenseringen (BLAST og RDP Classifier) klassifiserte likevel bakterien som en *Pseudomonas* spp..

## 5.2 Kvalitet og kvantifisering av DNAet til bakterieisolatene, 16S rRNA PCR-produktene og singelpleks PCR-produktene

Det ble observert en forholdsvis stor variasjon mellom DNA-konsentrasjonene i de åtte bakterieisolatene (se vedlegg 3). Dessuten viste resultatene fra Qubit® 2.0 Fluorometeret (4,84-21,20 ng/ml) generelt lavere DNA-konsentrasjonsverdier enn resultatene fra

NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometeret (7,90-46,50 ng/ml). Alle bakterieisolatene ble sett på som forholdsvis rene i forhold til A<sub>260/280</sub> nm verdiene, da forholdstallet lå på 1,81-2,0 (ønsket verdi var 1,80-2,20). Verdiene fra A<sub>260/230</sub> nm lå på 0,8-1,35 (ønsket verdi ~1,80), og ut ifra disse verdiene kunne det antas at prøvene var noe kontaminert av karbohydrater, fenoler eller andre komponenter (Eurofins, u.å.; Thermo Fischer Scientific Inc., 2009).

Det ble målt DNA-konsentrasjon i alle prøvene som skulle sendes til Tyskland for en Sanger-sekvensering. DNA-konsentrasjonen i de åtte 16S rRNA PCR-produktene var forholdsvis høy, både før (53,40-87,50 ng/ml) og etter (49,10-87,50 ng/ml) rensing av DNA (se vedlegg 4). Dessverre hadde prøve 2 (10,00 ng/ml) og 3 (12,10 ng/ml) fra ESBL 2 singelpleks PCR betydelige (de to prøven med positive DNA-bånd, se 5.3) lavere verdier enn hva som var ønsket (se vedlegg 4).

### 5.3 Agarose gelelektroforese av multi- og singelpleks ESBL og CAR

Tabell 5.2 viser tolkningen av bilderresultatene (se vedlegg 5 figur 1-3) etter agarose gelelektroforesen var kjørt på ESBL 1-3 PCR-produktene, inkludert KONTROLL. DNA-båndene ble vurdert i forhold til båndene i «ladder» som ble anvendt (dette gjaldt for all vurdering av gelbilder i denne masteroppgaven).

Tabell 5.2. Oversiktstabell som viser eventuelle positive DNA-bånd hos ESBL 1-3 multipleks PCR-produktene pluss KONTROLL etter agarose gelelektroforesen.

Prøve	ESBL 1				ESBL 2			ESBL 3			Kontroll	
	OXA-48	CTX-M (gr. 2)	OXA	SHV	CTX-M (gr. 9)	CTX-M (gr. 1)	TEM	NDM	VIM	KPC	RpoB	16S rRNA
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

-Ingen positive DNA-bånd (ESBL 1-3) eller kontrollbånd (KONTROLL).

+Antydte positive DNA-bånd (ESBL 1-3) og kontrollbånd (KONTROLL).

Tabell 5.2 antydte at prøve 2 og 3 hadde positive DNA-bånd i ESBL 2 (*bla*<sub>CTX-M</sub> (gruppe 9), *bla*<sub>CTX-M</sub> (gruppe 1) og *bla*<sub>TEM</sub>). Det var vanskelig å angi størrelsen på DNA-båndene (se vedlegg 5 figur 2), men ut ifra hvor de lå i forhold til «ladderne», kunne det tenkes at de kodet for *bla*<sub>CTX-M</sub> (gruppe 9) eller *bla*<sub>CTX-M</sub> (gruppe 1). Det ble likevel kjørt tre singelpleks PCR med alle primerparene i ESBL 2 for å være sikker på at det ikke ble gjort noen feilvurderinger. Resultatet fra tolkningen av bilderresultatene fra de tre singelpleksene (se vedlegg 5 figur 4)

fremstilles i tabell 5.3. Det kan i tillegg trekkes frem at PCR-prosessen ble sett på som vellykket fordi KONTROLL primermiksen viste kontrollbånd, selv om noe av DNA-båndene var litt svake.

Tabell 5.3. Målgen som testet positivt (inneholdt DNA-bånd) etter tre singelpleks PCR med *bla*<sub>CTX-M (gr. 9)</sub>, *bla*<sub>CTX-M (gr. 1)</sub> og *bla*<sub>TEM</sub> som målgen.

Prøve	ESBL 2		
	CTX-M (gr. 9)	CTX-M (gr. 1)	TEM
2	+	-	-
3	+	-	-

-Ingen positive DNA-bånd.

+Positivt DNA-bånd.

Resultatet fra de tre singelpleks PCR agarose gelelektroforesene ble tolket slik at både prøve 2 og 3 inneholdt positive DNA-bånd for *bla*<sub>CTX-M (gr. 9)</sub> slik tabell 5.3 viser, og prøvene ble derfor helgenomsekvensert i en MinION for å bekrefte disse funnene.

Tabell 5.4 viser tolkningen av bilderesultatene (se vedlegg 5 figur 5) fra agarose gelelektroforesen som ble kjørt på multipleks PCR karbapenemase-produktene (CAR 1-2).

Tabell 5.4 Oversiktstabell som viser eventuelle positive DNA-bånd av PCR-produkter fra de to multiplekse PCR karbapenemase-primermiksene (CAR1-2) etter agarose gelelektroforesen.

Prøve	CAR 1			CAR 2			
	CMY	OXA-48	IMP	OXA	NDM	SFC-1	KPC
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-

-Ingen positive DNA-bånd.

+Positive DNA-bånd.

Det ble ikke funnet noen positive DNA-bånd i gelen etter agarose gelelektroforesen var kjørt på karbapenemase-produktene (CAR 1-2), slik tabell 5.4 viser.

## 5.4 Antibiotikaresistente gener fra ARMA

Resultatene fra ARMA var svært omfattende (se vedlegg 6), og inneholdt en rekke virulensgen og ARG som «multidrug» efflukspumper, poriner,  $\beta$ -laktamaser, ESBL og antibiotika efflukspumper. Det ble også funnet gener som stammet fra andre stammer innenfor Enterobacteriaceae familien som ompK36 ( $\beta$ -laktamase) fra *Klebsiella* spp. og oprM/N («multidrug» efflukspumper) fra *Pseudomonas* spp.. De viktigste funnene blant WIMP-resultatene i forhold til AR var *bla*<sub>CTX-M</sub> (ESBL), *bla*<sub>TEM</sub> ( $\beta$ -laktamase) og *bla*<sub>CMY</sub> ( $\beta$ -

laktamase), og det faktum at begge prøvene hadde *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Begge stammene inneholdt dessuten *mph(A)* og/eller *mrx*. Det kunne også observeres at begge stammene inneholdt *bla*<sub>ACT</sub> ( $\beta$ -laktamase) og *bla*<sub>MIR</sub> ( $\beta$ -laktamase). Dessuten ble det observert at prøve 2 hadde potensielt flere ARG (*bla*<sub>CTX</sub>= 13, *bla*<sub>TEM</sub>=5 og *bla*<sub>CMY</sub>=2) enn prøve 3 (*bla*<sub>CTX</sub>=5, *bla*<sub>TEM</sub>=1 og *bla*<sub>CMY</sub>=0).

## 5.5 Helgenomsekvenseringsresultater etter behandling med CANU

Tabell 5.5 fremstiller de viktigste resultatene fra helgenomsekvenseringen etter at rådataene var behandlet med «assembly»-programmet CANU (se vedlegg 7) også videre bearbeidet i en online søkemotor («Center for Genomic Epidemiology»), Dr. Bjørn-Arne Lindstedt sine egne utvidete databaser og et RAST-systemet for annotering.

Tabell 5.5. Samletabell som viser de viktigste resistensgenene i prøve 2 og 3 etter rådata fra helgenomsekvenseringen var kjørt gjennom «assembly»-programmet CANU og videre bearbeidet.

Resistensgener	Identitet (%)	Query/HSP	Contig	Posisjon i contig	Kommentar	Accession no.
<b>Prøve 2</b>						
<b>β-laktam</b> <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> *	98,63	876/877	tig00000023	33305..34171	β-laktamresistens	AY044436
ESBL <sub>A</sub> (EC 3.5.2.6) => et TEM gen*	-	-	-	-	-	-
<b>MLS - Makrolider, Linkosamider og Streptogramin B</b>						
<i>mdf(A)</i>	98,22	1233/1233	tig00000001	2604950..2606175	MDR protein	Y08743
<i>mph(A)</i>	99,89	906/903	tig00000021	9891..10793	Makrolid 2'-fosfotransferase (makrolidresistens)	D16251
<b>Tetrasyklin</b> <i>tet(A)</i>	99,50	1200/1200	tig00000001	3270238..3271433	Tetrasyklinresistens	AJ517790
<b>ExPEC</b>						
<i>aatA</i>	92,25	1239/1239	tig00000019	121940..123166	attPABCD «cluster»	AY351860
<i>aatD</i>	90,34	1211/1212	tig00000019	119401..120598	attPABCD «cluster»	CP003291
<i>aatP</i>	92,84	1132/1131	tig00000019	123163..124289	attPABCD «cluster»	CP003291
<i>sfaH</i>	97,45	903/903	tig00000001	1617793..1618695	Knyttet til urinveisinfeksjoner	KT444704
<b>Prøve 3</b>						
<b>β-laktam</b> <i>bla<sub>CTX-M-182</sub></i> *	99,20	876/870	tig00000015	50357..51223	β-laktamresistens	KX056901
<b>Fluorokinoloner</b> <i>qnrS1</i>	99,09	657/657	tig00000015	55825..56475	Overførbart kinolonresistent gen	AB187515
<b>MLS - Makrolider, Linkosamider og Streptogramin B</b> <i>mdf(A)</i>	98,30	1233/1233	tig00000001	2137287..2138515	MDR protein	Y08743
<b>Tetrasyklin</b> <i>tet(A)</i>	99,67	1200/1200	tig00000001	2801427..2802624	Tetrasyklinresistens	AJ517790
<b>parC</b>						
<b>Mutasjon**</b>	<b>Nucleotide forandring</b>	<b>Aminosyre forandring</b>	<b>Resistens</b>	<b>PMID</b>		
parC p.E84K	GAA→AAG	E→K	Nalidixinsyre og ciprofloxacin	8524852		

\*Funnet etter et dypere søk med lavere spesifisitet i ulike BLAST søkemotorer (inkludert Dr. Bjørn-Arne Lindstedt egne BLAST database) så ligger ikke i vedlegg 7. \*\*Usikkert grunnet CANU-resultatene er svake på punktmutasjon, så dette må bekreftes etter sammenfatning av Illumina MiSeq sekvenseringsresultater.

Ut ifra tabell 5.5 kunne det leses av at både prøve 2 og 3 hadde *bla*<sub>CTX-M</sub> som kunne bryte ned  $\beta$ -laktam, samt *tet*(A) som kunne gi tetrasyklinresistens og et *mdf*(A) som er et MDR protein. Prøve 2 hadde i tillegg *mph*(A) som kodet for makrolidresistens, og et ukjent TEM gen som potensielt kunne påvirke resistensbildet. Et annet særegent trekk ved prøve 2 var at den hadde *attA*, *attD* og *attP* som er tre gener som inngår som en del av en *attPABCD* «cluster», samt et *sfaH* gen som er knyttet til urinveisinfeksjoner. Prøve 3 hadde *qrnS1* (overførbart kinolonresistent gen) og en potensiell *parC* p.E84K (mutasjon i topoisomerase IV) som kunne føre til resistens mot nalidixinsyre og ciprofloxacin (makrolidresistens). I prøve 2 var alt mer usikkert, og for å kunne bekrefte funnene fra CANU må rådataen sekvenseres på nytt i en Illumina MiSeq også må resultatene sammenfattes med resultatene fra CANU. *tig00000001* i prøve 3 var 5161562 bp langt (denne informasjonen ligger i arbeid som er under bearbeiding). Det ble også funnet andre ARG og virulensgener enn hva som ligger i vedlegg 7. Eksempelvis ble det funnet flere «transfer» (*tra*) på flere av «contigene».

### 5.5.1 Stammekarakterisering

Programmet «Serotype Finder» kunne bekrefte at både prøve 2 og 3 var *E. coli* serotype O10:H32, men de tilhørte ikke samme stamme. Begge stammene ble identifisert som patogener. Prøve 2 ble klassifisert som en enteroaggregative *E. coli* (EAEC), men hadde også et *sfaH* gen (se vedlegg 7) som er assosiert med urinveisinfeksjoner. Det var mer uklart hvilken gruppe prøve 3 tilhørte, og det var ikke mulig å kategoriseres den som noe annet enn en ExPEC stamme. For å kunne skille mellom en diarégenisk *E. coli* (DEC) og en uropatogeniske *E. coli* (UPEC) må den gitte bakteriestammen inneholde to eller flere av følgene gen *vat*, *yfcV*, *chuA* pluss *fyuA*. For å skille mellom UPEC og avian patogenisk *E. coli* (APEC) må alle de fire genene nevnt ovenfor være tilstede (Spurbeck et al., 2012). I tabell 5.6 fremstilles hvilke av de fire genene bakterieisolat 2 og 3 inneholdt.

Tabell 5.6. Samletabell som viser hvilke av de fire genene (*vat*, *yfcV*, *chuA* og *fyuA*) prøve 2 og 3 hadde.

Gen for å kunne identifisere UPEC	Prøve 2	Prøve 3
<i>vat</i>		
<i>yfcV</i>		
<i>chuA</i>		
<i>fyuA</i>		

Rosa indikerte at et gen ikke var tilstede.

Grønt indikerte at genet var tilstede.

Ut fra tabell 5.6 kan man lese av at det ikke var mulig å anslå om bakterieisolatene stammet fra DEC eller UPEC, ei var det mulig å skille mellom UPEC og APEC.

## 5.6 Disk diffusjonstesting

Tabell 5.7 viser gjennomsnittsverdiene av inhiberingssonene til prøve 2 og 3 etter to gjentak med disk diffusjonstesting (se vedlegg 8). Tabellen viser også hvilke antibiotika prøve 2 og 3 var resistente mot.

Tabell 5.7. Gjennomsnittlig inhiberingssoner til prøve 2 og 3 etter disk diffusjonstesting av 13 antibiotika med to gjentak.

Antibiotikaklasser	Antibiotikum	EUCAST klinisk brytningspunkt for MIC (mg/l)	Prøve 2 <i>E. coli</i> (mg/l)	Prøve 3 <i>E. coli</i> (mg/l)
<b>Aminopenicillin<sup>1</sup></b> -β-laktam -Angriper celleveggsyntesen				
	<b>Ampicillin</b> 3. generasjon	8	>256	>256
	<b>Amoksisicillin med klavulansyre</b> Aminopenicillins tilsettes klavulansyre om bakterien viser tegn på resistens*	8 uten klavulansyre 32 med klavulansyre	5	3,5
<b>Cefalosporiner<sup>2</sup></b> -β-laktam -Angriper PBP				
	<b>Cefotaksim</b> 3. generasjon	2	32	32
	<b>Cefepim</b> 4. generasjon	4 (Ecological Cut-Off, ECOFF=0,125)	4,5	1,5
<b>Fluorokinoloner<sup>2</sup></b> Inhiberer DNA-syntesen				
	<b>Ciprofloxacin</b>	0,5 (ECOFF=0,064)	0,25	0,25
<b>Aminoglykosid<sup>2</sup></b> Bryter ned 30S subunit				
	<b>Gentamicin</b> Første valgs antibiotika	4	0,375	0,375
	<b>Amikacin</b> Andre valg om bakterien er resistent mot gentamicin	16	1	1
	<b>Streptomycin</b> Sistevalg - Fremveksten av resistente organismer har begrenset bruken av streptomycin til noen spesifikke forhold	64	3	3
<b>Karbapenem<sup>3</sup></b> -β-laktam -Angriper cellevegg syntese				
	<b>Imipenem</b>	8	0,185	0,25
	<b>Meropenem</b>	8 (ECOFF =0,125)	0,3	0,3
<b>Makrolid<sup>2</sup></b> -Bryter ned 50S subunit				
	<b>Erytromycin<sup>4</sup></b>	≥8	>256	>256
<b>Polymyxin<sup>4</sup></b> -Angriper cellemembranen				
	<b>Kolistin</b>	≥2	1,5	1,5
<b>Sulfonamider og trimetoprim<sup>2</sup></b> -Inhiberer folsyresyntesen				
	<b>Trimetoprim</b>	4	0,22	0,6

<sup>1</sup>National Institutes of Health (2016a) <sup>2</sup>Kapoor et al. (2017) <sup>3</sup>Codjoe and Donkor (2017) <sup>4</sup>Velkov et al. (2013)

\*National Institutes of Health (2016b) **Rød skrift**=klinisk resistent ifølge (EUCAST, 2009). **Blå skrift**=verdien var høyere enn ECOFF-verdien (EUCAST, u.å.).

Ut fra tabell 5.7 kan det observeres at bakteriestammene ifra skål 2 og 3 hadde forholdsvis like inhiberingssoner, og begge bakteriestammene var MDR ifølge verdiene satt av EUCAST (2009). Prøve 2 var resistent mot fire antibiotika (ampicillin, cefotaksim cefepim og erytromycin), mens prøve 3 var resistent mot tre antibiotika (ampicillin, cefotaksim og erytromycin). Videre kunne det observeres at >256 mg/l erytromycin (makrolid) og ampicillin (aminopenicillins) måtte til for å oppnå en bakteriestatisk effekt for bakteriestammene i prøve 2 og 3. I forhold til ECOFF-verdiene hadde både prøve 2 og 3 en høyere inhiberingssoneverdier for meropenem og ciprofloxacine, mens prøve 3 hadde MIC-brytningsverdier over ECOFF-verdien for cefepim.

## 6 DISKUSJON

### 6.1 Fenotypisk deteksjon av antibiotikaresistens

Vanligvis benyttes «Oxoid Brilliance™ ESBLE» og «Oxoid Brilliance™ CRE» i helsesektoren for hurtig deteksjon av Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae for å redusere spredningen av EBSL og optimalisere behandlingsprosessen (Thermo Fisher Scientific Inc., 2010; Thermo Fisher Scientific Inc., u.å.). I denne oppgaven ble de selektive, kromogene mediene hovedsakelig benyttet for å detektere EBSL blant miljøbakterier fra ulike vannområder i Follo kommune. Det vokste frem to rene bakterieisolater på «Oxoid Brilliance™ CRE» skålene (skål 1 og 8) og seks på «Oxoid Brilliance™ ESBLE» skålene (skål 2-7). Veksten på «Oxoid Brilliance™ ESBLE» indikerte i at det fantes Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae familien med resistens mot 3. generasjon cefalosporiner i de gitte vannområdene, mens vekst på «Oxoid Brilliance™ CRE» indikerte hovedsakelig resistens mot karbapenemantibiotika. Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae familien anses for å være en av de største truslene mot den globale helsen grunnet dens evne til å bryte ned  $\beta$ -laktamer (Davies & Davies, 2010). Bakterier med EBSL<sub>A</sub> har nådd et epidemisk nivå i flere land (Bajaj et al., 2016), og er ofte knyttet til høy mortalitet og morbiditet. Spredningen av EBSL<sub>KARBA</sub> holdige bakterier anses som særdeles bekymringsfullt fordi de er ofte knyttet til MDR og reduserte behandlings alternativer (Codjoe & Donkor, 2017). På bakgrunn av dette fremstod funnene som forholdsvis tankevekkende og lumske, spesielt veksten på CRE-skålene. På samme tid er det viktig å nevne at AR i Norge er forholdsvis lav, og det ble dessuten ikke funnet *E. coli* isolater fra EBSL<sub>KARBA</sub> i 2017 (NORM/NORM-VET, 2017).

Problemet med dyrkningsmetodikken er at den ikke sier noe spesifikt om hvilken bakterie den

ukjente prøven inneholder eller hvilke gener som faktisk fører til utslag på agarskålene (Gazin et al., 2012). Så selv om skålene skulle selektere for ESBL-produserende bakterier fra Enterobacteriaceae, har tidligere forsøk vist at bakterier fra andre familier og med andre gener enn ESBL, kan føre til utslag på de gitte skålene (Gazin et al., 2012; Huang et al., 2010). Bakteriene er i hurtig utvikling og tilegner seg stadig nye ARM (Kümmerer, 2009). Mangfoldet av ESBL-enzymmer i kombinasjon med de utallige resistensmekanismene har ført til større vansker med å oppnå valide resultater ved fenotypisk testing fordi det fort kan vokse frem feil type bakterier (Huang et al., 2010).

Videre kan kromosomalt AmpC (kAmpC) eller plasmidmeditert AmpC (pAmpC) gi falske resultater fordi de kan bryte ned  $\beta$ -laktamer uten tilstedeværelse av ESBL (Gazin et al., 2012). Det er også vanskelig skille mellom bakterier med ESBL<sub>A/M-C</sub> og ESBL<sub>KARBA</sub> fordi bakterier med ESBL<sub>KARBA</sub> kan vokse på begge (Löhr & Samuelsen, 2015), mens fra ESBL<sub>M</sub> er det hovedsakelig ESBL<sub>M-C</sub> som kan identifiseres med fenotypisk testing (Giske et al., 2008). I tillegg varierer aktiviteten mot  $\beta$ -laktam blant de ulike ESBL<sub>KARBA</sub>-klassene. ESBL<sub>KARBA-A</sub> og ESBL<sub>KARBA-B</sub> har generelt høyere aktivitet mot karbapenem (Löhr & Samuelsen, 2015) enn ESBL<sub>KARBA-C</sub> (*bla*<sub>OXA-48</sub>) som har en generell lavere aktivitet mot karbapenem. Cohen et al. (2013) konkludert med at det var lavere deteksjonsrate for gen som OXA-48 (som det ble lett etter i denne masteroppgaven) ESBL<sub>KARBA-C</sub>, enn KPC (ESBL<sub>KARBA-A</sub>), VIM og NDM-1 (ESBL<sub>KARBA-B</sub>) på medier som selekter for karbapenem. Dessuten har det vist seg at ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M-C</sub> i kombinasjon med porinmutasjoner og efflukspumper kan føre til vekst på CRE-medium (Löhr & Samuelsen, 2015). Det er også viktig å være klar over at resistens kan linkes til slekt. Eksempelvis vil en *K. pneumoniae* med *bla*<sub>KPC</sub> være mer resistens enn en *E. coli* med samme gen (Iredell et al., 2016). Veksten på skål 1 og 8 kunne med andre ord skyldes andre faktorer enn CRE fra ESBL<sub>KARBA</sub> klassen. Utfra fargescreeningen var det umulig å si om disse faktoren hadde en innvirkning på vekst av bakteriestammene, men ved bruk av dyrkningsmetodikk er det viktig å reflektere rundt slike potensielle feil og mangler.

På samme tid ble det sett på som svært interessant at miljøbakteriene kunne vokse på de kliniske mediene med prokoller for kliniske stammer. Den bakterielle veksten på de selektive, kromogene skålene indikerte at de AR-miljøbakteriene hadde enkelte eller flere likhetstrekk med kliniske stammer (Cytryn, 2013; Forsberg et al., 2012; Yin et al., 2013), og kunne derfor vokse på de selektive skålene. Miljøbakterier vokser sjelden under samme betingelser satt for kliniske stammene fordi de stiller andre krav til faktorer som pH, temperatur og lys grunnet

mer kompliserte livsvilkår og hardere konkurransevilkår (Kümmerer, 2009). Dessuten variere livsvilkårene mellom miljøbakterier som er vokst opp i ulike geografiske områder (Akinbowale et al., 2007). På samme tid har miljøbakteriene utviklet seg til å bli konkurransedyktige. *A. baumannii* har en cellemembran som er sju ganger mindre permeabel for cefalosporiner og karbapenem, mens *P. aeruginosa* 100 ganger mindre permeabel enn *E. coli*. Hovedsakelig skyldes denne reduserte permeabiliteten et redusert antall poriner i den ytre cellemembranen, men for å kunne overleve i ugunstige miljøer er de Gram-negative bakteriene også avhengige av efflukspumper (Iredell et al., 2016). Kombinasjonen av disse kan også slå ut som ESBL på kliniske skåler (Löhr & Samuelsen, 2015). Videre fremsto graden av vekst på skålene etter filtrering og rendyrking som forholdsvis høy med tanke på porestørrelsen på filteret og det faktum at kun 100 ml vannprøve ble finfiltrert. Flere av skålene med filter var overgrodde og viste tydelig tegn på kontaminasjon fra sedimenter, men de overgrodde prøvene insinuerte at det var forholdsvis høy bakterietetthet i prøvene. Det var ikke mulig å si noe om hvor valide og reproducerbare resultatene var siden det ikke fantes en standard eller noen retningslinjer å forholde seg til (Berendonk et al., 2015). Videre genotypisk testing var derfor nødvendig for å kunne bekrefte eller avkrefte funnene etter fargescreeningen.

## 6.2 Sekvensering av 16S rRNA

For å kunne bekrefte hvilke bakterier som vokste fram på de selektive, kromogene skålene ble resultatene fra fargescreeningen sammenlignet med Sanger-sekvenseringsresultatene av 16S rRNA genet. 16S rRNA sekvensering av 16S rRNA genet brukes ved fylogenetiske studier fordi genet er godt konserverert og tilstrekkelig langt til at det inneholder nok informasjon til å klassifisere ukjente bakterieprøver ned til slekts- og/eller artsnivå (Kolbert & Persing, 1999). Et av de største problemene med 16S rRNA er at mange arter deler svært like og/eller identiske sekvenser, så det kan være vanskelig å skille arter fra hverandre, spesielt om det ikke er nok DNA i prøvene. Det kan også være et problem at databasen ikke inneholder gitt sekvens som trengs for å identifisere den ukjente bakterien (Janda & Abbott, 2007) ellers kan korte søkesekvenser («quary» lengde) som legges inn i BLAST ikke er lange nok (Altschul et al., 1997). I denne masteroppgaven kunne ikke Sanger-sekvenseringen skille mellom *E. coli* eller *Shigella* spp. i prøve 2 og 3 selv om DNA-innholdet var >20 ng/ml slik protokollen fra Thermo Fischer Scientific Inc. (2011) anga, og lengden på de utrimmede Sanger-sekvensene var 871-1775 bp (så lange sekvenser var mulig fordi «forward» og «revers» sekvensene ikke

var trimmet og sydd sammen). Grunnen til at en ikke kunne skille mellom *E. coli* eller *Shigella* spp. kom mest sannsynlig av at det ikke fantes en sekvens for bakteriestammen i GenBanken, og siden disse slektene er såpass like klarte ikke BLAST eller RDP Classifier å skille de fra hverandre.

*Escherichia* spp. og *Shigella* spp. har mange fylogenetisk likheter, og flere forskningsgrupper mener *Shigella* spp. burde være en subgruppe eller patogruppe av *E. coli*. På lik linje med *E. coli* er *Shigella* spp. en fakultativ, Gram-negativ, ikke sporedannende stavbakterie, men den danner ikke gass ved forgjæring av sukker eller forgjærer laktose i konvensjonelle medier (Thougaard et al., 2009). En annen viktig faktor som skiller *Shigella* spp. fra kolibakterier er at arten kun vokser i mennesketarmen og ikke i dyretarmen. *Shigella* spp. er derfor ikke en zoonose, og kan heller ikke anvendes som en indikator på fekalforurensing. Dessuten er bakterien lite konkurransedyktig, og tåler dårlig selektive komponenter i dyrkingsmedier (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015b). Det var derfor liten sannsynlighet for at *Shigella* spp. kunne vokse på en skål med «Oxoid Brilliance™ ESBL» som var tilsatt antibiotika som en selektiv komponent (Huang et al., 2010). Dessuten finnes *Shigella* spp. hovedsakelig i land med lav drikkevannskvalitet, dårlig sanitære forhold og høy befolkningstetthet (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015b). I Norge sliter vi ikke med noen av disse problemene, noe som reduserer sannsynligheten for at det kunne være en *Shigella* spp.. Det ble derfor antatt at skål 2 og 3 inneholdt *E. coli* stammer, men videre genotypisk testing måtte til for å avgjøre det.

For å tolke sekvensene etter Sanger-sekvenseringen ble BLAST og RDP Classifier benyttet. Det var hovedsakelig resultatene fra BLAST en var ute etter siden dette programmet er det mest brukte (Altschul et al., 1997). Det ble kun vurdert prøver som hadde 99,0-100,0 % likhetsscore, og «Quary»-lengden til de utrimmede sekvensene var 871-1775 bp. Viktig at denne søkesekvensen ligger >800 bp for å få valide resultater. Det hjelper ikke ha 100,00 % likhetsscore om sekvensen kun er 100 bp lang, da sier denne sekvensen lite om den ukjente bakterieprøven. RDP Classifier ble hovedsakelig brukt for å dobbelt sjekke resultatene. Det ble detektert få forskjeller mellom programvarene, men RDP Classifier kunne ikke klassifisere bakteriene lengre enn til slektsnivå (Wang et al., 2007). Dette var ikke en begrensing, da en kun var ut etter bakterieslekten. Likevel kunne RDP Classifier kun klassifisering prøve 2, 4, 7 og 8 ned til familienivå. Grunnen til dette kan komme av at de to programvarene brukte ulike systemer ved klassifisere av de taksonomiske gruppene (RDP Classifier=Bergey`s outline og BLAST=NCBI), samt at de to programvarene inneholdt ulikt

antall sekvenser (henholdsvis 5014 mot 23095). Eksempelvis ble de 23096 sekvensene i NCBI GenBank fordelt på 1187 slekter, mens de 5014 sekvensene i Bergey`s omfatter 998 bakterieslekter (Wang et al., 2007). Det faktum at sekvensene ikke ble trimmet og sydd sammen ble ikke sett på som et problem fordi lengden på de utrimmede sekvensene var såpass lange at en antok resultatene ville blitt forholdsvis like. Dessuten ble Sanger-sekvenseringen hovedsakelig benyttet som en screeningmetode for å detektere hvilke bakterieslekter som potensielt kunne vokse på skålene, og det var helgenomsekvenseringen som var de virkelige spennende og valide resultatene.

En annen faktor som kan ha påvirket Sanger-sekvenseringen var potensiell kontaminasjon av prøvene. Vannprøvene ble sett på som forholdsvis skitne før og etter filtrering. Dette gjaldt spesielt vannprøvene fra Niagara 2, som hadde flere skåler med filter som var overgrodd. Ifølge  $A_{280/260}$  verdiene fra Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometeret var prøvene rene, men  $A_{260/230}$  verdiene indikerte at det var noe forurensing fra karbohydrater, fenoler eller andre komponenter. De lave verdiene i  $A_{260/230}$  ble det ikke tatt større hensyn til fordi tidligere masteroppgaver har hatt lignende verdier uten at det har påvirket resultatene ytterligere (Abbasi & Simonsen, 2017; Skamflem, 2018; Støle, 2017). Verdiene var hovedsakelig satt til kliniske stammer og siden miljøbakterier kan oppføre seg annerledes kan det være at nye verdier burde vært satt ved forskning på miljøet.

### *6.2.1 Sammenligning av 16S rRNA-resultatene med fargescreeningen*

Ved å sammenligne resultatene fra Sanger-sekvenseringen med protokollen fra Thermo Fischer Scientific Inc. (2014) var det kun Sanger-sekvenseringsresultatene fra skål 2 og 3 som til dels stemte overens med protokollen. Eksempelvis kunne mistolking av fargescreeningen, vekst av andre bakterier enn Enterobacteriaceae og/eller andre ARG enn  $\beta$ -laktamaser (Gazin et al., 2012) føre til avvik fra protokollen. Dessuten er det viktig å påpeke at protokollen og de kromogene skålene var laget for å differensiere patogene bakterier fra Enterobacteriaceae familien med ESBL i kliniske sammenhenger (Thermo Fischer Scientific Inc., 2014), og ikke for å differensiere miljøbakterier med ESBL. Hovedgrunnen til at Sanger-sekvenseringen ga mer valide resultater enn fargescreeningen var at GenBanken til BLAST bestod av betydelig flere sekvenser enn hva de kromogene skålene var kodet for, og resultatene fra BLAST ville derfor omfavne flere taksonomiske grupper. Videre kunne det tenkes at det fantes flere og andre bakteriearter i vannmiljøer enn i de kliniske miljøene. Det kunne også tenkes at enkelte

miljøstammer kunne vokse der kliniske stammer ikke vokser grunnet andre krav til vekstvilkår og sterkere konkurranseforhold (Steinbakk et al., 2014).

I forhold til feiltolkning av fargenyanse var skål 6 og skål 4 to gode eksempler. Ifølge Thermo Fischer Scientific Inc. (2014) skulle skål 6 inneholde en bakterie fra KESC-gruppen grunnet sine grønne kolonier, mens skål 4 skulle inneholde *Proteus* spp., *Morganella* spp. eller *Providencia* spp. fordi fargen på koloniene var beige med et hint av oransje. Begge skålene viste seg å være *Pseudomonas* spp. ifølge 16S rRNA Sanger-sekvenseringsresultatene. Huang et al. (2010) rapporterte at vekst av *Pseudomonas* spp. var den mest observerte, ikke-Enterobacteriaceae bakterien på «Oxoid Brilliance™ ESBL». *Pseudomonas* spp. omfatter en stor heterogen gruppe med Gram-negative, obligat aerobe, mesofile bakterier som også kan leve i psykrotrofe omgivelser (Andreani & Fasolato, 2017). *Pseudomonas* spp. kan forventes på «Oxoid Brilliance™ ESBL» skåler grunnet sin evne til å danne uregelmessige, ekstracellulære fargepigmenter (ofte strågule) og sin oksidase positive karakter.

Enkelte arter som *P. aeruginosa* kan produsere pyocyanin (som er et blågrønt vannløselig fenazin pigment) når de vokser (El-Fouly et al., 2015), noe som kan forklare de sjøgrønne koloniene som vokste på skål 6. De lysebrune koloniene på skål 4 kunne like gjerne blitt beskrevet som strågul, og dermed ville veksten stemt overens med tidligere (Huang et al., 2010). Slike feiltolkninger viser hvorfor fenotypisk testing ikke er nøyaktige nok for å avgjøre hvilke bakterier som vokser på en skål, samt at de indikerer hvor lett det er å feiltolke for et utrent øye. Gazin et al. (2012) anbefalte i sin artikkel at erfarne biologer burde benyttes til detekteringsarbeid for å fremme hurtige og valide resultater, spesielt i medisinske sammenhenger. Likevel kan funnene sees på som spennende fordi ikke-fermentive bakterier som *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. med ESBL er kjent for å fremme morbiditet og mortalitet på lik linje med Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae familien (MacGowan & Macnaughton, 2017). Eksempelvis er *P. aeruginosa* en av de tre bakteriene ECDC/EMEA (2009) har rettet et spesifikt fokus mot fordi arten er kjent for å forårsake infeksjoner med karbapenemresistens (Codjoe & Donkor, 2017). Dessuten er *P. aeruginosa* hyppig detektert i vannmiljøer (Andreani & Fasolato, 2017) og hadde prøvene med *Pseudomonas* spp. testet positivt etter multipleks PCR og agarose gelelektroforesen ville funnene vært mer foruroligende. Spesielt om videre genotypisk testing viste at det var en *P. aeruginosa* eller en *Pseudomonas putida*. *P. putida* er en allestedsnærværende bakterie som hovedsakelig lever i vann- og jordområder, men de siste årene er det også registrert flere

kliniske tilfeller. Bakterien kan føre til alvorlige infeksjoner og det er registrert AR i *P. putida*, hvor  $\beta$ -laktamaser og RND efflukspumper var de viktigste mekanismene (Molina et al., 2014).

Videre hadde skål 5 og 7 lysebeige kolonier og kunne være en *Proteus* spp., *Morganella* spp. eller *Providencia* spp. ut fra protokollen til Thermo Fischer Scientific Inc. (2014), men skålene inneholdt henholdsvis *Serratia* spp. og *Achromobacter* spp.. *Serratia* spp. var forventet siden den tilhører KESC-gruppen, og skal ifølge teorien ha grønne kolonier (Gazin et al., 2012; Huang et al., 2010). Man har derfor ingen god forklaring til hvorfor koloniene var lysebeige. Det kunne tenkes at den lysebeige fargen kom av at det var miljøbakterier og ikke kliniske stammer som ble undersøkt (Kümmerer, 2009). På den andre siden viste Huang et al. (2010) i sitt forsøk at 1 av 70 ESBL isolater ga fargeløse kolonier, og den fargeløse kolonien var *Serratia marcescens* som er en av de mest utbredte artene blant humanpatogene bakterier (Stock et al., 2003). Så, Huang et al. (2010) sitt funn kunne være en potensiell forklaring til de lysebeige koloniene på skål 5. Det finnes derimot ikke noe litteratur om vekst av *Achromobacter* spp. på selektive medier. En forklaring til manglende teori om *Achromobacter* spp. kan skyldes få forsøk knyttet til denne slekten fordi det er usikkert hvor viktig *Achromobacter* spp. er i kliniske sammenhenger (Swenson & Sadikot, 2014). *Achromobacter* spp. er en allestedsnærværende, Gram-negativ, ikke-fermentativ bakterie som lever i jord og vannmiljøer. *Achromobacter* spp. kan produsere  $\beta$ -laktamaser, mens *Achromobacter xylosoxidans* (patogen art) kan i tillegg produsere aminoglykosidmodifiserte enzymer. Andre stammer har vist å inneholde ulike efflukspumper og/eller karbapenemaser som bryter ned imipenem og meropenem (Swenson & Sadikot, 2014). Vekst av *Achromobacter* spp. var derfor ikke overraskende, men viste at det potensielt fantes bakterie fra ulike familier med antatt AR som kunne komme av gener som kodet for ESBL i vannkilder i Follo kommune.

Veksten på de to «Brilliance™ CRE» skålene kunne tenkes å være falske positive. Ifølge Thermo Fischer Scientific Inc. (2014) kunne de lysebrune, kornfargede kolonier som vokste på skåle 1 og 8 være *Proteus* spp., *Morganella* spp. eller *Providencia* spp., mens erfaring fra tidligere masteroppgaver og litteratur mente veksten kunne skyldes henholdsvis *Pseudomonas* spp. (Gazin et al., 2012; Skamflem, 2018; Støle, 2017) eller *E. coli* (Cohen et al., 2013). Sanger-sekvenseringsresultatene indikerte at skålene inneholdt *Stenotrophomonas* spp. eller *Pseudomonas* spp., og ifølge protokollen var vekst av *Stenotrophomonas maltophilia* en negativ positiv fordi den ikke er en CRE. *S. maltophilia* er en Gram-negativ, ikke-

fermenterende bakterie som kan vokse på «Brilliance™ CRE» skåler (Gazin et al., 2012) fordi den har MDR efflukspumper og antibiotikamodifiserende enzymer i tillegg til  $\beta$ -laktamaser (Brooke, 2012).

Uansett om det var en *S. maltophilia* eller en *Pseudomonas* spp. antyd det veksten at de undersøkte vannområdene kunne inneholde ikke-CRE bakterier med resistens mot karbapenemantibiotika (Gazin et al., 2012). Hadde skål 1 eller 8 hatt positive DNA-bånd etter multipleks PCR og agarose gelelektroforesen hadde funnet vært svært interessant siden det viste de hadde trekk som lignet kliniske stammer, spesielt hvis videre genotypisk testing viste at bakterieisolatene kom fra en *S. maltophilia*. *S. maltophilia* regnes ikke for å være en av de seks mikroorganismene forskere verden over har rettet et spesielt fokus mot (Chandra & Kumar, 2017), men bakterien er en globalt, voksende MDR opportunistisk bakterie. Bakterien lever i vann og AR i *S. maltophilia* er ervervet grunnet overdreven bruk av antibiotika i sykehussektoren (Brooke, 2012). Selv om det i dette forsøket ikke var så viktig å skille mellom CRE og ikke-CRE, fordi en hovedsakelig ville påvise variasjon av bakterier med ESBL, er det helt essensielt i kliniske sammenhenger for å kunne gi optimal behandling. Falske positive vil være uheldig for pasienten så vel som miljøet som kan tilføres mer antibiotika og ESBL grunnet feil behandling av pasienten. Hurtig og korrekt identifisering av bakterier er derfor viktig både for pasienten og miljøet.

### 6.3 Påvisning av antibiotikaresistente gen med agarose gelelektroforese og Sanger-sekvensering

Det ble anvendt tre multipleks primermikser (ESBL 1-3) for å søke etter gener som kodet for ESBL i de åtte bakterieisolatene, mens det ble brukt to multipleks primermikser (CAR 1-2) for å identifisere eventuelle karbapenemaser. Etter tre ESBL singelpleks PCR med *bla*<sub>CTX-M</sub> (gr. 9), *bla*<sub>CTX-M</sub> (gr. 1) og *bla*<sub>TEM</sub> som målgene viste gelbildene at prøve 2 og 3 hadde hvert sitt DNA-bånd som kodet for *bla*<sub>CTX-M</sub> (gr. 9). Tatt i betraktning at ikke alle bakteriestammene som vokste på de selektive, kromogene skålene kom fra Enterobacteriaceae familien eller hadde gen som kodet for ESBL, kunne det likevel fremstå som litt rart at ikke flere DNA-bånd ble detektert. Eksempelvis ble en underlig versjon av TEM detektert etter et dypdykk i resultatene fra helgenomsekvenseringen av prøve 2, men dette genet kom ikke frem på gelelektroforesen. DNA-templatene, primerne, polymerasen og/eller PCR-programmet er de vanligste årsakene til at DNA-bånd ikke vises på en gelelektroforese (McPherson & Møller, 2000). Siden det ble

brukt «QIAGEN® Multiplex PCR Kit®» med ferdig miksede reagenser og to godt tilpassede PCR-programmer i dette forsøket, var det lite trolig at faktorer som lite TAG polymerase eller for mange sykluser under amplifisering hadde en innvirkning på bånddannelsen. Det faktum at det ikke ble funnet flere DNA-bånd skyldes mest sannsynlig mangelfulle primere.

Multipleks PCR er en tids- og kostnadsbesparende metode fordi den kan lete etter flere målgene på en gang, men metoden har også sine begrensninger (Zhang et al., 2009). Den største begrensningen er at det ikke kan søkes etter mer enn et visst antall gener i en multipleks PCR primermiks (Löhr & Samuelsen, 2015). Siden det finnes tusenvis av ESBL (Wellington et al., 2013) kan det godt tenkes at primerne i denne oppgaven ikke dekker de ESBL-genene som fantes i de filtrerte miljøbakterier.

Det kunne også tenkes at DNA-innholdet påvirket resultatene til en viss grad. For lite DNA kan føre til at polymerasen ikke har nok DNA å amplifisere, mens for mye DNA kan føre til at primeren sliter med å finne riktig sted å amplifisere. I dette forsøket ble DNA-konsentrasjon målt etter DNAet var ekstrahert fra bakterieisolatene med et «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» for Gram-positive bakterier, men ikke etter at DNAet var preparert med et «QIAGEN® Multiplex PCR Kit» og amplifisert i en multipleks PCR. DNA-verdiene kunne fremstå som forholdsvis lave, men siden KONTROLL viste at det var bakterielt DNA tilstede og Sanger-sekvenseringen fungerte, ble multipleks PCR-prosessen ansett som vellykket. I denne sammenheng kan det nevnes at noen av båndene i KONTROLL var litt svake og dette kan insinuerer at primerne var litt gamle, men det hadde mest sannsynlig liten innvirkning på forsøket (McPherson & Møller, 2000).

Dessverre kunne ikke de positive DNA-båndene bekreftes av Sanger-sekvenseringen. Grunnen var mest sannsynlig lite DNA i de to prøvene som ble sendt til Tyskland (10 ng/ml og 12 ng/ml), samt korte «contig» som skulle legges inn i BLAST. Sekvenseringen ble utført to ganger (med samme primer) for å dobbelt sjekke at noe ikke gikk galt første gangen, men resultatene kom tilbake negative begge gangene. Både prøve 2 og 3 ble likevel helgenomsekvensert og testet for AR ved bruk av 13 test stripes (disk diffusjonstester) fordi det ble antatt at bakterieisolatene som vokste frem var to *E. coli* stammer.

## 6.4 Påvisning av bakteriestammer og antibiotikaresistente gen etter helgenomsekvenseringen

Etter helgenomsekvenseringen ble rådataen kjørt gjennom WIMP/ARMA før CANU-programmet sorterte rådata i «contig» som ble antatt å tilhøre samme komponenter. Deretter ble denne dataen videre bearbeidet for å finne serotypene og virulensgenene til de to bakteriestammene. Det ble registrert noen forskjeller mellom de uttrykte genene fra WIMP/ARMA-resultatene og de bearbeidede CANU-resultatene, men essensen var det samme. Eksempelvis indikerte WIMP/ARMA-resultatene at det var gen som kodet for CMY, MIC og ACT i de to *E. coli* stammene, men etter endt bearbeiding av CANU-resultatene ble det kun funnet et kAmpC gen. Forskjell mellom WIMP/ARMA-resultatene og de bearbeidede CANU-resultatene kunne skyldes det faktum at *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>MIC</sub> og *bla*<sub>ACT</sub> er alle pAmpC som har svært genetiske likheter med kAmpC (Halvorsen, 2012). Grunnet dette nære slektskapet kan kAmpC fremstå som pAmpC (Jacoby, 2009) om analyseverktøyet ikke er nøyaktig nok. En annen forskjell var at WIMP/ARMA-resultatene viste at begge stammene hadde en rekke *bla*<sub>CTX-M</sub> deriblant *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, mens etter et utvidet søk blant de bearbeidede CANU-resultatene, var det kun prøve 2 som potensielt hadde et *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (prøve 3 hadde potensielt et *bla*<sub>CTX-M-182</sub>). Det er viktig å understreke at CTX-M varianter ikke vil kunne bekreftes før all rådataen fra MinION er sekvensert på nytt med Illumina MiSeq og sammenfattet med CANU-resultatene.

### 6.4.1 Kategorisering av bakteriestammene i prøve 2 og 3

Både WIMP-resultatene og de bearbeidede CANU-resultatene kunne bekrefte at prøve 2 og 3 var *E. coli*, slik de selektive, kromogene skålene og Sanger-sekvenseringen hadde antydnet. «SeroType Finderen» anga at begge prøvene tilhørte serotype O10:H32, men at de stammet fra ulike stammer. Det var liten kjennskap til den gitte serotypen, men O10 er beskrevet i sammenheng med avføringsprøver fra storfe (Diarra et al., 2009; Pigatto et al., 2008; Timm et al., 2007), geiter (Cid et al., 1996) og fjørfe (Samanta et al., 2015). Videre ble det registrert en rekke virulensgener som er knyttet til patogene arter, og derfor ble begge *E. coli* stammene sett på som patogene. Sammensetning av virulensgenene var forholdsvis underlig, noe som gjorde det vanskelig å klassifisere *E. coli* stammene. Eksempelvis ble prøve 2 kategorisert som en EAEC som ifølge teorien skal gi diaré (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a), men på samme tid hadde stammen et SfaH gen som er knyttet til urinveisinfeksjon og meningitt hos spebarn. SfaH er et av fire proteiner (SfaA, SfaG, SfaS og SfaH). Proteinet inngår i bindingen

mellom *S fimbriae* (trådformet protein som er kortere en flagelle og ligner på pili) og eukaryotceller med sialsyre, noe som kan føre til urinveisinfeksjoner eller meningitt hos nyfødte. Den spesifikke oppgaven til SfaH genet er å binde *S fimbriae* til erytrocytter (røde blodceller) (Morschhäuser et al., 1993). Dessuten inneholdt prøve 2 genet *fyuA*, som er en kjent indikator på urinveisinfeksjon, men det er behov for tre andre genene (vat, *yfcV*, *chuA*) for å skille intestinale fra ekstraintestinale *E. coli* stammer (Spurbeck et al., 2012). Stammen hadde med andre ord noen gener som kodet for en diaréform og andre gener som kodet for en urinveisinfeksjonsbakterie. Prøve 3 var enda vanskeligere å klassifisere, og den kunne kun grupperes ned til en ExPEC stamme.

EAEC ble definert som en egen patogen, enterisk *E. coli* gruppe på grunn av deres spesielle aggregerende adhesjonsmønster (AA) til mukosale epitelceller (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a). Nishi et al. (2003) konkluderte med at patogene EAEC var avhengige av et attPABCD «cluster» (spesielt ABC-transportsystem) for å skyve ut dispersin (glykosidhydrolase) fra bakteriecellen. Dispersin vil løse bakteriecellen fra overflaten den er festet til slik at den kan feste seg til nye overflater og forlenge biofilm eller starte en ny koloni (Blackledge et al., 2013), med andre ord vil dispersin være viktig for EAEC sin AA (Nishi et al., 2003). I prøve 2 kunne *aatA* (ytre membranprotein TolC), *aatD* (egenskap uklar) og *attP* (indre membranpermease) identifiseres, men ikke *attB* (egenskap uklar) og *attC* (ATP-bindende cassette protein) eller *aggR*. Nishi et al. (2003) mente at alle fem att-genene var nødvendig for at «clusteret» skulle skyve ut dispersin over både den indre og ytre cellemembranen, mens *aggR* (en regulator av virulensgenet i EAEC) var nødvendig for transskripsjon av attPABCD. De manglende genene i prøve 2 er nok et eksempel på hvor underlig virulenssammensetningen i prøve 2 var.

Det skumle med EAEC er at det var en bakteriestamme fra denne gruppen som var årsaken til det store utbruddet i Tyskland som drepte flere titalls personer. Hendelsen i Tyskland var svært spesielt, da en EAEC stamme hadde tilegnet seg evnen til å produsere shigatoksiner ved å integrere en *stx*-bakteriofag i sitt genom (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a). Selv om prøve 2 ikke var samme stamme som den i Tyskland, er det dokumentert at *E. coli* isolert fra storfeavføring med serotype O10:H42 (Pigatto et al., 2008) og O10:H14 (Timm et al., 2007) kan tilegne seg shigatoksiner. Slike funn er svært lite heldig for Andedammen, spesielt siden *E. coli* stammen i prøve 2 ble regnet som MDR og patogene (se 6.5). Heldigvis er den infektive dosen for EAEC noe høyere ( $>10^8$ ) enn for andre patogene *E. coli* grupper som

EHEC ( $<10^3$ ) (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015a), så potensielt må et menneske få i seg store doser for å bli syk. Dessuten vil bakterier fra denne gruppen hovedsakelig ramme små barn og de med nedsatt immunforsvar, men likevel er slike funn en oppvekker siden bakteriene stadig deler resistens og utvikler ny resistens.

Prøve 3 var vanskeligere å kategorisere, og det var ikke mulig å klassifisere bakterien som noe annet enn en ExPEC stamme. ExPEC er en vid gruppe og kan deles opp i UPEC som gir urinveisinfeksjon, APEC som stammer fra fjærfe og neonatal meningitt *E. coli* (NMEC) som fører til meningitt hos nyfødte (Köhler & Dobrindt, 2011). Klassifiseringen er basert på opprinnelsen til isolatet fordi det ikke finnes noen spesifikke virulensfaktorer som skiller dem (Spurbeck et al., 2012). Det var ikke mulig å skille prøve 3 fra en UPEC (urinveisinfeksjon) eller en DEC (diaré), ei kunne en skille mellom en UPEC og APEC fordi stammen manglet nødvendige gen. For å kunne skille mellom UPEC og DEC må en bakterie inneholde to eller flere av de følgende genene *yfcV*, *vat* eller *chuA* pluss *fyuA* (genet som gir sterkest indikasjon på urinveisinfeksjonsbakterie). For å skille UPEC og APEC må alle de fire nevnte genene være til stede (Spurbeck et al., 2012), mens i prøve 3 ble kun *fyuA* funnet (samme gjaldt for prøve 2).

#### 6.4.2 Viktige antibiotikaresistente gener i prøve 2 og 3

Antibiotika som sulfonamider, makrolider, trimetoprim, cefalosporiner og fluorokinoloner er funnet som aktive komponenter i kloakkanlegg og avløpsvann. Antibiotikanivået har vist seg å variere med årstiden, og det er generelt mer aktive komponenter på vinteråret grunnet et høyere humant forbruk (Baquero et al., 2008), og dette kan fremme utviklingen av AR. Som en følge av antibiotika bruk og tilstedeværelse av antibiotika i produksjonsvann fant (Rodriguez-Mozaz et al., 2015) *tet* (tetrasyklinresistens), *bla<sub>TEM</sub>* (ESBL) *qnrS* (nedsatt følsomhet for fluorokinolon/lavnivå resistens), *erm* (makrolidresistens) og *sul I* (sulfonamidresistens) i avfallsvann fra sykehus. I Norge har en således vært særdeles opptatt av å begrense bruken av tetrasykliner, cefalosporiner (2. og 3. generasjon), karbapenemer og fluorokinoloner i både sykehus, industrien og jordbruk for å redusere seleksjonspresset (Helsedirektoratet, 2013). Likeledes kan også andre faktorer som metaller, biocider og spredningsvektorer fremme AR (Allen et al., 2010). Vannet i denne masteroppgaven ble ikke undersøkt for antibiotika, metaller eller biocider, kun ARB (se 6.2.1 og 6.3.1) og ARG. De viktigste genene som ble funnet i forhold til utviklingen av AR var *bla<sub>CTX-M</sub>* (ESBL), *tet(A)*

(tetrasyklinresistens), *mdf(A)* (MDR protein), *qnrS1* (nedsatt følsomhet for fluorokinolon), *parC p.E84K* (nalidixinsyre- og ciprofloxacinresistens) og en potensiell *bla<sub>TEM</sub>* (ESBL), noe som stemte forholdsvis godt med teorien. Etter disk diffusjonstest ble det registrert resistens for ampicillin (aminopenicillin), cefotaksim (cefalosporiner), cefepim (cefalosporiner) og erytromycin (makrolid) (se 6.5). Begge stammene ble ansett for å være MDR, og noen av genene som ble funnet kunne påvirke den observerte resistensen.

#### 6.4.2.1 CTX-M ( $\beta$ -laktamresistens)

*bla<sub>CTX-M</sub>* ansees for å være et globalt fenomen som har ført til epidemiske tilstander i land som Hellas, India og Kina grunnet genets unike evne til å spre seg via MGE som plasmider og transposoner (Wellington et al., 2013). Originalt var *bla<sub>CTX-M</sub>* knyttet til nosokomiale infeksjoner (Shaikh et al., 2015), og sykehuset i Stavanger hadde det første skandinaviske utbruddet med *bla<sub>CTX-M-X</sub>* hos *K. pneumoniae* (Steinbakk et al., 2014). Trenden i dag er at stadige flere CTX-M varianter isoleres fra *E. coli* stammer i friske mennesker, husdyr, matproduksjon, kloakk og kjæledyr (Wellington et al., 2013). Amos et al. (2014) fant en rekke CTX-M varianter i ulike elver rundt om i Storbritannia, mens Tanner et al. (2019) identifiserte *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* *bla<sub>SHV</sub>* og/eller *bla<sub>OXA-48</sub>* i 6 % av de koliforme bakteriene isolert fra ulike springvannskilder i USA. Forskningsgruppen til Tanner et al. (2019) var en av de første til å påvise så store geografiske spredninger av ESBL- og karbapenemaseproduserende isolater med klinisk karakter i drikkevann i et industriland. Det finnes med andre ord en rekke eksempler på at *bla<sub>CTX-M</sub>* er et vanlig gen i ulike vannkilder, kanskje enda vanligere enn tidligere antatt. Det var derfor ikke overraskende å finne to *E. coli* stammer med CTX-M genet som kodet for ESBL<sub>A</sub> (potensielt *bla<sub>CTX-M-15</sub>* i prøve 2 og *bla<sub>CTX-M-182</sub>* i prøve 3) i Andedammen. Derimot ble funn av *bla<sub>CTX-M</sub>* sett på som lite heldig og forholdsvis alarmerende fordi begge bakteriestammene var MDR og patogener.

For at spredning av *bla<sub>CTX-M</sub>* skal være mulig må genet ligge på et MGE (Bonnet, 2004), og i både prøve 2 og 3 ble det antatt at CTX-M genet lå på et plasmid. For prøve 3 ble denne vurderingen gjort utfra størrelsen på *tig00000001* som var 5161562 bp. Denne «contigen» var såpass stor at det ble antatt det var genomet, og da ville de andre «contigene» kode for komponenter som plasmider. Siden *bla<sub>CTX-M</sub>* ofte sitter på plasmider kunne det antas at *tig00000015* var et plasmid. Dessuten ble det funnet flere *tra* gener på samme «contig», og siden *tra* gener er nødvendige for at plasmidene skal kunne overføres fra en bakterie til en annen via HGT (Grohmann et al., 2003), forsterket dette antakelsen om at *tig00000015* var et

plasmid. Prøve 2 var mer uklar og det må mer informasjon til for å kunne dra noen klare konklusjoner, men det kunne tenkes at tig00000023 var et plasmid grunnet de andre gener som fantes på «contiget». Problemet med å finne *E. coli* plasmidmeditert *bla*<sub>CTX-M</sub> (om de er konjugative) er at de kan overføre sin  $\beta$ -laktamresistensen videre til andre bakterier fra Enterobacteriaceae familien via HGT (Bonnet, 2004). Siden forsøket ikke var kvantitativt med flere gjentak kunne det vært en reell sannsynlighet for at funnet var tilfeldige, men siden fjorårets masterstudenter gjorde lignende funn (Skamflem, 2018; Solberg, 2018), antas det at det finnes en kilde som slipper ut CTX-M gen som koder for ESBL<sub>A</sub> i nærheten av Andedammen.

I kloakkvann og avløpsvann er *bla*<sub>CTX-M</sub> ofte funnet sammen med *tet*, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *qnrS*, *qnrA*, *sul* I (sulfonamidresistens) og *int1* (integron klass 1) (Waseem et al., 2017). Slike funn bekrefter litteraturen som sier at *bla*<sub>CTX-M</sub> ofte er funnet på samme genetiske plattform som gener som koder for resistens mot aminoglykosider og fluorokinoloner (koresistens), noe som tilrettelegger for koseleksjon og spredning av *bla*<sub>CTX-M</sub> (Bonnet, 2004; Canteón, 2009). Problemet med koseleksjon er at bruken av et antibiotikum vil kunne selektere for resistens mot et annet antibiotikum, og det vil dermed bli vanskeligere å behandle en bakteriell infeksjon (Steinbakk et al., 2014), samt MDR kan fremmes. I tillegg vil andre komponenter som biocider og tungmetaller ha samme selekterende effekt. Det vil si at bakteriecellen ikke nødvendigvis må eksponeres for antibiotika for å utvikle og spre AR (Helsedirektoratet, 2013). I dette forsøket ble det funnet et CTX-M gen sammen med et potensielt TEM gen i prøve 2, mens CTX-M genet i prøve 3 ble funnet sammen med et *qnrS1*. Begge funnene stemmer overens med teorien, og hadde eksempelvis *E. coli* stammen i prøve 3 blitt isolert fra et menneske ville bruk av  $\beta$ -laktam i behandlingsprosessen kunne vært med på å fremme fluorokinolonresistens.

Blant *E. coli* er *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (*bla*<sub>CTX (gr. 9)</sub>) og *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (*bla*<sub>CTX (gr. 1)</sub>) de mest utbredte enzymene fra CTX-M familien, både hos mennesker, dyr og i miljøet (Bajaj et al., 2016). I Norge ansees *bla*<sub>CTX-M-15</sub> som det vanligste ESBL<sub>A</sub> genet isolert fra dyr og mennesker (NORM/NORM-VET, 2017), og genet ble funnet av tidligere masterstudenter (Skamflem, 2018). Det ville derfor ikke vært overraskende om CTX-M genet i prøve 2 var *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Faren med dette er at de fleste *E. coli* stammene som bærer CTX-M-15 type ESBL tilhører den internasjonale sekvens typen ST(131). Dette ansees som svært alarmerende fordi ST(131) er den mest utbredte MDR *E. coli* bakterien som kan gi urinveis- og blodinfeksjoner, og

smitten vil lett kunne overføres mellom mennesker og/eller miljøet (Bajaj et al., 2016). Et annet problem med *E. coli* ST(131) med *bla*<sub>CTX-M-15</sub> er at de ofte har ervervet andre resistensgener som *bla*<sub>NDM-1</sub> (Nordmann et al., 2011). Denne kombinasjonen av gener vil gjøre urinveisinfeksjoner ekstra vanskelige å behandle, og antibiotika som tigesyklin, kolistin eller fosfomycin må benyttes (Nordmann et al., 2008), noe sees på som lite ønskelig fordi dette er sterke og toksiske medikamenter.

Den stadig økende forekomsten av CTX-M har ført til et høyere forbruk av karbapenemantibiotika som imipenem og meropenem, noe som er lite heldig for verdens globale helse fordi dette er såkalte «siste sjanse» medikamenter (Wellington et al., 2013). En total resistens mot karbapenem vil være katastrofalt for helseverden slik vi kjenner den i dag (Codjoe & Donkor, 2017). Heldigvis ble det ikke påvist *E. coli* med karbapenemase gen i dette forsøket, ei ble det observert karbapenemresistens etter disk diffusjonstestene. Det som var forholdsvis tankevekkende og urovekkende var at både prøve 2 og 3 hadde inhiberingssoner som lå over ECOFF-verdiene for meropenem (se 6.5).

#### 6.4.2.2 *tet*(A) (tetrasyklinresistens)

Den første tetrasyklinresistente bakterien var en *Shigella dysenteriae* og ble isolert i 1953 (Chopra & Roberts, 2001), mens i 1978 ble det første efflukspumpe systemet som kodet for tetrasyklin (*tet*) isolert fra et plasmidmeditert gen i den indre membranen til en *E. coli* (Fernández & Hancock, 2013). Ifølge (NORM/NORM-VET, 2017) hadde flere av *E. coli* isolatene fra hester, svin og storfe nedsatt følsomhet mot tetrasykliner, mens tetrasyklinresistensen ble hovedsakelig funnet i *Pseudomonas* spp. og *Campylobacter* spp. (hovedsakelig utlandssmitte) isolater blant de humane prøvene. Blant de mange *tet* genene som er påvist i dag stammer over halvparten fra vannbakterier som *Aeromonas* spp. og *Vibrio* spp. (Zhang et al., 2009), og *tet*(A) regnes som en av de vanligste efflukspumpene (Akinbowale et al., 2007) funnet i Gram-negative bakterier (Chopra & Roberts, 2001). En efflukspumpe som *tet*(A) drives av energien over protongradienten i cellemembranen (MFS-familien), og *tet*(A) skyver ut tetrasyklin-kation slik at den intracellulære konsentrasjonen av antibiotika holdes forholdsvis lav (Poole, 2000). Det ble funnet *tet*(A) i både prøve 2 og 3, men det var kun prøve 2 som hadde et potensielt plasmidmeditert *tet*(A) som kunne utøve tetrasyklinresistens. Mest sannsynlig satt *tet*(A) genet på kromosomet i prøve 3 fordi det ble funnet på tig00000001, som ble antatt å være bakteriens kromosom, og ville derfor ha liten innvirkning på resistensbildet. Mange *tet* sitter kromosomalt eller på ikke-konjugative

plasmider så funnet var ikke overraskende, selv om *tet(A)* regnes for å være plasmidmeditert (Wellington et al., 2013).

Det er funnet *tet(A)* i en rekke vannområder som kloakkanlegg, avløpsvann, (Waseem et al., 2017), fiskeoppdrett (Akinbowale et al., 2007), overflatevann og ulike badeområder (Zhang et al., 2009), men også i hønseavføring og sagflis (Waseem et al., 2017). Akinbowale et al. (2007) demonstrerte i sitt forsøk at *tet(A)*, *tet(D)*, og *tet(M)* kunne overføres på et oxytetrasyklinresistent plasmid (via HGT) fra miljøbakterier som *Aeromonas* spp. og *Vibrio* spp. til *E. coli* stammer isolert fra kylling, svin og mennesker. Funnene i denne undersøkelsen indikerer hvilken uheldig innvirkning *tet* gener kan ha på utviklingen av AR i miljøet, og underbygger teorien om at miljøbakterier kan overføre sin resistens til bakterier som kan påvirke det kliniske bildet. Plasmidmeditert *tet(A)* kan være med på å gjøre Andedammen til et «hot spot» for deling av gener mellom vannbakterier og andre bakterier som MDR, patogene *E. coli* stammer. På denne måten vil *tet(A)* gen vil kunne fremme AR i ulike vannmiljøer og genet vil kunne fremstå som et potensielt faremoment i krigen mot AR. Det ble ikke testet for tetrasyklinresistens i dette forsøket, hovedsakelig på grunn av interesse verses ressursbruk, og det var derfor umulig å si noe om *tet(A)* påvirket en potensiell tetrasyklinresistens eller ikke.

#### 6.4.2.3 *mdf(A)* (MDR protein)

Det ble funnet to *mdf(A)* proteiner, et i hver av de to bakterieprøvene. *mdf(A)* (også kalt *cmr*) er et av de best karakteriserte effluksproteinene fra MFS-familien, og genet er funnet i flere patogene bakteriearter (Jie et al., 2015). MFS-familien drives av kraften til protonets elektrokjemiske gradient over cellemembranen (Blanco et al., 2016). *mdf(A)* proteinet består av 410 aminosyrer og regnes for svært unikt fordi det kan gjenkjenne en rekke antibiotikum med ulik oppbygning og ladning (Jie et al., 2015). Overekspresjon av plasmidmediterte *mdf(A)* kan føre til høynivå resistens mot kationisk (positivt ladd) og/eller zwitterionisk (nøytrale) lipofilekomponenter som etidiumbromid og tetrasykliner, samt en rekke urelaterte, kliniske antibiotika som kloramfenikol, erytromycin og noen aminoglykosider (Edgar & Bibi, 1997). Yang et al. (2003) viste at tilstedeværelsen av *mdf(A)* kunne være nok til å gi fluorokinolonresistens, selv uten et mutert *gyrA* gen som oftest er nødvendig for å oppnå høynivå resistens. Edgar and Bibi (1997) konkluderte at *mdf(A)* ga størst utslag på erytromycinresistens blant de antibiotikaene han testet for, mens den generelle oppfatningen

er at *mdf(A)* vil ha størst effekt i en *mph(A)*-*mrx*-*mph(R)* «cluster» (Poole et al., 2006).

Ut fra teorien ville en potensiell tilstedeværelse av et plasmidmediterte *mdf(A)* protein kunne påvirke den observert MDR hos de to *E. coli* stammene (se 6.5). I prøve 3 lå *mdf(A)* på *tig00000001* som trolig var bakteriens kromosom (grunnet størrelse på «contig»), mens i prøve 2 var det trolig at *mdf(A)* proteinet satt på et plasmid fordi det ble funnet på samme «contig» som *tet(A)*, som er kjent for å være plasmidmeditert (Wellington et al., 2013). Det kunne derfor tenkes at *mdf(A)* proteinet i prøve 2 kunne ha påvirket den kliniske resistensen mot erytromycin (Edgar & Bibi, 1997) eller den tilegnede resistensen stammen uttrykte mot ciprofloxacin (ikke klinisk resistens, se 6.4.2.6) (Yang et al., 2003), men dette er kun spekulasjoner. For at *mdf(A)* effluksproteinet skal kunne skyver ut antibiotika må det fungerer optimalt og det må fungere mot den gitte komponenten. Poole et al. (2006) antydte at *mdf(A)* i *E. coli* fungerer best mot andre komponenter enn antibiotika, mens Edgar and Bibi (1997) diskuterte om *mdf(A)* kanskje trengte «hjelpeteiner», på lik linje med ABC-familien, for å skyve ut antibiotikumet over cellemembranen. For å bekrefte funksjonaliteten til *mdf(A)* må rådataen sekvenseres på nytt med en Illumina MiSeq og disse resultatene må sammenfattes med CANU-resultatene.

#### 6.4.2.4 TEM ( $\beta$ -laktamresistens)

Frem til nå er det diskutert gener som ble identifisert hos begge bakteriestammene, men de neste underkapitlene skal ta for seg hva som skilte de to bakterieisolatene. I bakterieisolatet 2 ble det funnet en underlig form for TEM og et *mph(A)* gen, mens i prøve 3 ble det funnet et *qnrS1* og et mutert *parC* p.E84K (mutasjon av DNA topoisomerase IV) gen. Basert på litteratur (Giedraitienė et al., 2011; Naas et al., 2011; Shaikh et al., 2015) var det ikke overraskende at det ble funnet et *bla<sub>TEM</sub>* gen i en *E. coli* stamme som potensielt kunne påvirke den observerte  $\beta$ -laktamresistensen. TEM var den første gruppen enzymer som utviklet ESBL (Davies & Davies, 2010), og i dag er de fleste TEM enzymene knyttet til ESBL (Lachmayr et al., 2008). Enzymet har hatt en svært sentral plass i kliniske sammenhenger og vært et viktig ledd i epidemiologiske studier av bakterielle infeksjoner verden over (Wellington et al., 2013). Det er dessuten detektert *bla<sub>TEM</sub>* gen i en rekke vannmiljøer som drikkevann (Xi et al., 2009), avfallsvann fra sykehus (Rodriguez-Mozaz et al., 2015) og drikkevann (Wellington et al., 2013). Problemet med å finne et potensielt *bla<sub>TEM</sub>* gen i en MDR, patogen EAEC stamme er at det kan bli vanskeligere å kurrere diaréen eller den potensielle urinveisinfeksjonen

grunnet en potensiell  $\beta$ -laktamaseresistens.

Et annet problem med TEM gener er at de er forholdsvis overlevingsdyktige slik Lachmayr et al. (2008) konkluderte med i sitt forsøk etter de fant forholdsvis store mengder *bla*<sub>TEM</sub> i rensset avfallsvann. Slike funn kan støttet av Rodriguez-Mozaz et al. (2015) som viste til en undersøkelse hvor det totale antall *E. coli* ble signifikant redusert etter desinfeksjon i 4 timer, men likevel ble det funnet resistensgen (*bla*<sub>TEM</sub>, *qnrS*, and *tetW*) i avfallsvannet. TEM gen i Andedammen vil kunne være med på å fremme seleksjonspresset fordi genet fremstår som svært overlevelsedyktig, og kan derfor være med på å videre utvikle AR i Andedammen og nærliggende områder. Dessuten er *bla*<sub>TEM</sub> ofte lokalisert på samme genetisk plattform som *bla*<sub>CTX-M</sub> og kan føre til koseleksjon (Lachmayr et al., 2008), som også kan fremme spredningen av AR. Siden det ble funnet plasmidmeditert *bla*<sub>CTX-M</sub> var det ikke overraskende å finne *bla*<sub>TEM</sub>, men det var ikke mulig å si om disse gene satt på samme plasmid slik teorien beskriver, ei kunne resultatene si noe om funksjonaliteten til TEM genet. (Skamflem, 2018) fant flere TEM gen i sin masteroppgave enn CTX-M gen, noe som indikerte at enzymene fantes i miljøet og det er en reell mulighet for at det vil kunne hydrolysere  $\beta$ -laktamaser, men mer informasjon om *bla*<sub>TEM</sub> må til før valide konklusjoner kan trekkes.

#### 6.4.2.5 *mph*(A) (makrolidresistens)

I tillegg til et udefinert *bla*<sub>TEM</sub> gen ble det identifisert et *mph*(A) gen i prøve 2. *mph*(A) er et plasmidmeditert gen som kan overføres via HGT, og koder for resistens mot makrolider som azitromycin (Nguyen et al., 2009) og erytromycin (Poole et al., 2006). Genet er ofte funnet i MDR *E. coli* (Nguyen et al., 2009), og uttrykker resistens ved at en makrolid 2'-fosfotransferase fosforylerer og inaktiverer det gitte makrolidet (Poole et al., 2006).

(Pawlowski et al., 2018) viser til at *mph*(A) er svært vanlig blant patogene, Gram-negative bakterier som *A. baumannii*, *K. pneumoniae* og *E. coli*. Funn av *mph*(A) i en *E. coli* stamme ansees derfor ikke som uvanlig, men som lite heldig fordi det vil kunne fremme spredningen av azitromycinresistens til andre bakterier fra Enterobacteriaceae familien gjennom HGT.

Makrolider som azitromycin er blant de mest suksessfulle antibiotikaene i verden og benyttes blant annet for å behandle shigellose (Nguyen et al., 2009). I Paris ble det påvist makrolidresistens grunnet *mph*(A) som uttrykte makrolid 2'-fosfotransferase etter et shigellose utbrudd (Boumghar-Bourtchai et al., 2008). Shigellose er utbedt gastrointestinal sykdom i både industri og utviklingsland og resistens mot dette antibiotikumet er derfor lite

ønskelig (Nguyen et al., 2009).

Sutcliffe et al. (1996) fant en mph(A) med opprinnelse ifra en *E. coli*, i en *Staphylococcus epidermidis* (hvite stafylokokker), noe som tydet på at mph(A) kan spres fra Gram-negative til Gram-positive stammer. Ved etterprøving av forsøket kunne Noguchi et al. (1998) kun påvise mph(B) i *S. epidermidis*. Mest sannsynlig fordi G+C sammensetningen i mph(B) var likere *S. epidermidis* enn den funnet i mph(A). Det som derimot var svært alarmerende, var at mph(B) førte til et høyere resistensnivå mot en rekke makrolider som spiramycin hos stafylokokkene, enn hva de hadde gjort hos *E. coli* stammene. Så, selv om studiene ikke samsvarer helt, indikerer de at ulike mph proteiner kan overføres fra Gram-negative til Gram-positive bakterier; ja til og med slå ut sterkere i Gram-positive stammer. Begge funnene var svært urovekkende, selv om studiene ikke ble utført i Norge, fordi de viser at gener ikke bare kan overføres via nært beslektede arter, men også på kryss av Gram-negative og Gram-positive bakterier. Det ble ikke testet for azitromycinresistens i denne masteroppgave, men det ble observert erytromycinresistens (se 6.5). Igjen er det viktig å påpeke at de bearbejdede CANU-resultatene ga lite informasjon om funksjonaliteten til mph(A). Funksjonalitetene må bekreftes ved en ny sekvensering (Illumina MiSeq) før resultatene fra CANU og Illumina MiSeq sammenfattes og resultater av svært høy kvalitet oppnås.

#### 6.4.2.6 qnrS1 og parC (fluorokinolonresistens)

Fluorokinoloner er en undergruppe av kinoloner som er klassifisert som kritisk viktig av WHO grunnet sin effektive virkning, og forbruket er forbeholdt humant bruk (Veterinærinstituttet, u.å.) for å stagnere den voksende resistensen mot dette medikamentet (Liu et al., 2012). Det er observert en generell økning av qnr gener i kliniske isolater så vel som fra miljøet (Monárrez et al., 2018). Ifølge NORM/NORM-VET (2017) økte forekomsten av resistens og nedsatt følsomhet for ciprofloxacin i *E. coli* fra humane blodprøver med cirka 1 % fra 2016 til 2017, på tross av redusert bruk i både sykehus og primærhelsetjenesten. Det ble også registrert en høyere prevalens av fluorokinolonresistens blant *E. coli* enn hos *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp.. Blant dyr er kinolonresistent forholdsvis lav i Norge, men i andre land kan resistensen være så høy som 80 %. Fluorokinolonresistente bakterier skilles ut med avføring og smitter oralt ved inntak av forurenset vann, fôr eller mat (Veterinærinstituttet, u.å.). Fluorokinolonresistens er kromosomaltmeditert og kan ikke overføres mellom ulike bakterieslekter, mens nedsatt følsomhet mot antibiotikumet kan

utvikles via overføring av plasmidmediterte gen (PMQR) som epA, oqxAB, aac(6')-1b-cr og qnr på tvers av kliniske stammer og miljøbakterier (Monárrez et al., 2018). I prøve 3 ble det funnet både et plasmidmediterte qnrS1 og en potensiell mutasjon i parC p.E84K.

Tradisjonelt ble kinolonresistens sett på noe som oppsto ved modifikasjon av målenzym eller ved at en efflukspumpe pumpet ut kinolone fra bakteriecellen (Canteón, 2009), men forandring i celleveggen permeabilitet kunne også være en årsak (Liu et al., 2012). En mutasjon i målenzymet (DNA gyrase og topoisomerase IV) vil føre til at kinolonene ikke når frem til riktig sted i bakteriecellen og dermed vil resistens kunne oppstå. Det er vanlig å dele målenzym mutasjoner inn i to undergrupper: gyrA/gyrB og parC/parE (Veterinærinstituttet, u.å.). Mirzaia et al. (2018) fastslo at mutasjon i gyrA og parC var de viktigste faktorene i utvikling av fluorokinolonresistens i *E. coli*, mens kun mutasjon i parC vil sjelden være nok til å utvikle høynivå resistens, da andre ARM også måtte være tilsted (Liu et al., 2012). parC er kjent for å fremme resistens mot nalidixinsyre og ciprofloxacin, men det ble ikke påviste ciprofloxacinresistens i noen av prøvene (nalidixinsyre ble det ikke testet etter). Derimot, indikerte test stripene at begge *E. coli* stammene hadde tilegnet seg noe resistens mot ciprofloxacin siden de hadde MIC-brytningsverdier over ECOFF-verdiene satt av EUCAST (2009) (se 6.5).

Det første qnr genet med ESBL ble isolert fra en *K. pneumoniae* i 1998, og genet er kjent for å beskytte DNA gyrase og DNA topoisomerase IV mot inhibering av kinoloner (Monárrez et al., 2018). Det finnes sju plasmidmediterte familier (qnrA, qnrBn, qnrC, qnrD, qnrE, qnrS og qnrVC) som skilles fra hverandre ved ulike aminosyre sammensetninger (Monárrez et al., 2018), og i prøve 3 ble det trolig funnet et plasmidmeditert qnrS1 gen. Det ble antatt at qnrS1 satt på et plasmid fordi det ble funnet på samme «contig» som *bla*<sub>CTX-M</sub>. Et problem med genet er at det ofte er funnet sammen med andre gener som *bla*<sub>CTX-M</sub>, pAmpC, aminoglykosid-modifiserende enzymer og/eller plasmidmediterte efflukspumper og vil kunne føre til kodelsesjon (Canteón, 2009). Et annet faremoment med PMQR er at de legger til rette for mutasjon i kromosomalt DNA ved eksponering for ciprofloxacin, og dette kan føre til et høynivå fluorokinolonresistens (Cantón & Morosini, 2011). Noe som kan bekrefte av Rodriguez-Mozaz et al. (2015) som viste en positiv korrelasjon mellom ciprofloxacin og qnrS gener hos bakterier, samt ofloxacin og qnrS gen i kloakkvann qnrS1 genet kan føre til redusert følsomhet for fluorokinoloner, men uten kromosomal resistens vil ikke fluorokinolonresistensen slå ut som klinisk resistens (Moran et al., 2017).

Dette ansees som spesielt lite heldig siden fluorokinoloner er særdeles hardføre, og kan overleve som aktive komponenter i ulike vannområder månedsvis og helt opp til et år (Wellington et al., 2013). *qnrS* er ofte funnet i kloakkanlegg, husholdningsavløp, avløpsvann fra urbane områder (Waseem et al., 2017). Videre er det registrert at *qnrS1* genet har mange likheter (96 % til 97 %) med kromosomale *qnr* gener fra en rekke vibriostammer (vannbakterie) som *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mytili*, og *Vibrio ostreicida* (Monárrez et al., 2018). Slike likheter mellom gener fra ulike familier kan være med på å bekrefte at det kan skje gendeling mellom miljøbakterier og Enterobacteriaceae familien, og at det ikke bare er bakterier fra samme slekt og art som bor i samme nisje som deler gener. Det var derfor ikke overraskende å finne et *qnrS1* gen i en *E. coli*, hvor dette genet er kjent for å være dominerende. *qnrS1* er i seg selv ville ikke vært nok til å gi klinisk resistens, kun nedsatt følsomhet mot ciprofloxacin (Liu et al., 2012), men sammen med *parC* burde den kunne fått et utslag. Ifølge de kliniske MIC-brytningsverdiene til EUCAST (2009) var ingen av stammene kliniske resistente mot fluorokinoloner, men resultatene antydte at begge stammene hadde tilegnet seg noe ciprofloxacinresistens (se 6.5).

## 6.5 Antibiotika sensitivitetstesting - disk diffusjon

Det ble brukt 13 test strips med ulike antibiotikum for å undersøke hvilke antibiotika prøve 2 og 3 kunne være resistente mot. Ifølge MIC-brytningspunktverdiene satt av EUCAST (2009) var prøve 2 resistent mot ampicillin (aminopenicillin), cefotaksim (cefalosporin), cefepim (cefalosporin) og erytromycin (makrolid). Prøve 3 var resistent mot ampicillin (aminopenicillin), cefotaksim (cefalosporin) og erytromycin (makrolid). Siden begge *E. coli* stammene var resistente mot  $\geq 3$  antibiotikum ble de ansett som MDR (Magiorakosa et al., 2012). Forklaring til hvorfor MDR oppstår ligger i bakteriens evne til å spres sine gener gjennom HGT (Iredell et al., 2016). ECDC beskriver at MDR oppstår ved at integroner og transposoner overfører genetiske kassettsystemer som inneholder gener som koder for resistens (Magiorakosa et al., 2012). MDR kan fremmes av faktorer som seleksjonspress, metaller, biocider (Singer et al., 2016) og deling av gener via HGT (Munita & Arias, 2016). Faren med MDR er at selv den minste operasjon vil bli vanskelig å behandle med antibiotika, og sterkere medikamenter og lengre behandlingstid kreves (Aminov, 2010). Dessuten er MDR forbundet med høy morbiditet og mortalitet (Helsedirektoratet, 2013). Den observerte MDR i prøve 2 og 3 kunne skyldes flere av de ARG diskutert i under punkt 6.4.2.

$\beta$ -laktam har i mange år blitt brukt til behandling av *E. coli* infeksjoner (Köhler & Dobrindt, 2011), men utviklingen av ESBL gener som CTX-M og TEM har ført til en økt resistens mot 3. generasjons cefalosporiner som ceftazidim, cefotaksim og ceftriaxon (Giedraitienė et al., 2011). En av grunnen til den økte resistensen er overdreven bruk. NORM/NORM-VET (2017) rapporterte at 17 % av all antibiotika som ble skrevet ut på norske sykehus var cefalosporiner (kun slått av penicilliner), men heldigvis ble det registrert en forholdsvis høy følsomhet for de mest brukt cefalosporinene som cefotaksim (93,0 %) og cefepim (92, 1 %). Det ble registrert 6,6 % *E. coli* stammer med ESBL blant isolatene fra de humane blodprøvene, og flere av stammene hadde ingen følsomhet for cefotaksim (n=138) og/eller cefepim (n=125). Tallene var forholdsvis like for husholdningsdyr (storfe, svin og hest), og det ble ikke funnet ESBL i maten som ble undersøkt. CTX-M som kodet for ESBL<sub>A</sub> ble sett på som et av de mest sentrale genene i forhold til spredningen av AR. Problemet med *bla*<sub>CTX-M</sub> er at det er en heterogen gruppe og ulike varianter kan føre til ulik AR (Bonnet, 2004). Eksempelvis er det registrert at *bla*<sub>CTX-M-15</sub> har en økende resistens mot både cefotaksim og ceftazidim, i motsetning til andre CTX-M som ofte hydrolyserer cefotaksim bedre enn ceftazidim (Shaikh et al., 2015). Det kan derfor antas at tilstedeværelsen av *bla*<sub>CTX-M</sub> var grunnen til cefotaksimresistensen i prøve 2 og 3.

I tillegg til å være resistent cefotaksim, var prøve 2 også klinisk resistent mot cefepim. Ut ifra gitte resultater kunne det tenkes at cefepimresistensen stammet fra det potensielle TEM genet, tilstedeværelsen av *mdf(A)* og/eller en potensiell koseleksjon. På den andre siden er *bla*<sub>CTX-M</sub> kjent for å uttrykke signifikant, hydrolytisk aktivitet mot cefepim (Bonnet, 2004), og derfor ble det antatt at *bla*<sub>CTX-M</sub> var opphavet til cefepimresistensen i prøve 2. Det er også verdt å nevne at selv om prøve 3 ikke var klinisk resistent mot cefepim, var inhiberingssonen over ECOFF-verdien for cefepim. ECOFF-verdien skiller villtype (standardtype/ikke-mutert) mikroorganismer fra ikke-villtyper som har ervervet resistens eller mutasjoner som har ført til resistens mot et gitt antibiotikum (Edelstein, 2017). Det vil si at prøve 3 hadde noe tilegnet resistens mot cefepim, men ikke nok til å gi klinisk resistens. Faren med slike bakterier er at de kan utvikle klinisk resistens ved økt selektivt press over lengre tid, noe som vil gjøre behandlingsprosessen vanskeligere og mer komplisert om bakteriene fører til infeksjon.

Problemet med at *E. coli* utvikler resistens mot 3. og 4. generasjons cefalosporiner er at legen må ta i bruk mer toksiske antibiotika som karbapenem, og behandlingsbildet vil bli mer

komplisert (MacGowan & Macnaughton, 2017). I Norge ble det ikke funnet noe karbapenemresistens i *E. coli* isolatene som ble undersøkt i 2017 og NORM/NORM-VET (2017) kunne rapportere om forholdsvis høy følsomhet mot karbapenemantibiotika som meropenem (99,6 %) blant *E. coli* stammer isolater fra humant blod. Hverken prøve 2 eller 3 vokste frem på «Oxoid Brilliance™ CRE» skåler, og det ble heller ikke funnet CRE gen etter agarose gelelektroforesen. Inhiberingssonene var heller ikke høyere enn hva EUCAST (2009) satte som MIC-brytningsverdier for klinisk karbapenemresistens, derimot var inhiberingssonen for begge bakterieisolatene over ECOFF-verdien for meropenem. Dette ansees for å være tankevekkende og alarmerende, fordi verdier over ECOFF-verdien antydde at bakteriene hadde tilegnet seg noe resistens mot meropenem. Meropenem er et karbapenem som er et «siste utveis» medikament, og derfor var denne tilegnede resistensen hakket verre enn den tilegnede cefepim- og ciprofloxacinresistensen. Problemet er at bakteriene ved en sykehusinnleggelse vil kunne oppføre seg som klinisk resistente bakterier og det kan potensielt bli mer komplisert å behandle pasienten. Hvor komplisert en behandlingsprosess blir kommer an på hvordan bakterien reagerer på medikamentets farmakodynamikk (legemidlets virkningsmekanismer), hvor infeksjonen sitter, doseringen som benyttes og andre faktorer (Edelstein, 2017). Alt i alt vil bakterier med MIC-brytningsverdier over ECOFF-verdiene kunne fremme økt morbiditet og mortalitet.

Ampicillin er et bredspektret antibiotikum som ofte er brukt for å behandle Gram-negative bakterier, og NORM/NORM-VET (2017) viste at ampicillinresistens i *E. coli* isolater fra dyr og mennesker ikke var uvanlig. Det faktum at begge stammene i dette forsøket var resistente mot ampicillin var derfor ikke så overraskende, men den høye kliniske resistensen var bekymringsverdig. Særlig med tanke på at ampicillin er et bredspektret 3. generasjons aminopenicillin som kan benyttes for å behandle en rekke bakterieslekter, og resistens mot dette medikamentet kan føre til et høyere forbruk av sterkere og mer toksiske antibiotika. Alt i 1960 ble det registrert at TEM-1 kunne hydrolysere ampicillin (Munita & Arias, 2016), men det finnes også bevis på at *blaSHV-1* kan bryte ned ampicillin (Shaikh et al., 2015). Likevel er kanskje AmpC (både plasmidmeditert og kromosomalt) det mest kjent genet som koder for enzym som bryter ned ampicillin, og økt eksponering av cefalosporiner kan indusere forekomsten av kAmpC. Induksjon av kAmpC er en kompleks og variabel prosess, men det mest kritiske punktet i klinisk sammenheng er at «derepressed» kAmpC mutanter (mutasjoner som senker genuttrykket; viktig i enkelte Enterobacteriaceae som produserer AmpC enzymer) kan føre til et stabilt høyt nivå av AmpC, som kan fremme ampicillinresistens (Iredell et al.,

2016). Det ble både funnet kAmpC og en underlig versjon av TEM som kunne ha påvirket den observerte ampicillinresistensen til prøve 2 (Hemeg, 2018), men siden kAmpC ikke var mutert, hadde nok dette genet minimal innvirkning på ampicillinresistensen (Iredell et al., 2016). Siden funksjonaliteten til TEM genet ikke kunne bekreftes var det trolig *bla*<sub>CTX-M</sub> som førte til den observerte resistensen. Noe som kunne bekreftes av Bonnet (2004) som beskrev i sin artikkel at både villtyper og laborierstammer av *E. coli* med CTX-M er kjent for å inneha høynivå resistens mot aminopenicilliner som ampicillin. Det ble også testet for amoksisicillin med klavulansyre, men bakteriestammene ble inhibert av klavulansyren. Noe som var bra siden ESBL<sub>A</sub> er kjent for å inhiberes av klavulansyre, mens ESBL<sub>KARBA</sub> inhiberes i mindre grad (Giske et al., 2008).

Erytromycin var det siste antibiotikumet bakteriestamme 2 og 3 var klinisk resistente mot, og resistensnivået ble sett på som forholdsvis høyt. Erytromycin er som andre makrolider hovedsakelig brukt til behandling av Gram-positive kokker eller *Mycoplasma pneumoniae* (O'Hara et al., 1989), da dette antibiotikumet har en mindre effektiv virkning på Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae familien siden de ofte har en iboende resistens mot makrolider (Poole et al., 2006). Gram-negative bakterier fra Enterobacteriaceae familien med erytromycinresistens har som oftest utviklet det etter langvarig oral bruk (O'Hara et al., 1989). Det ble ikke detektert erytromycinresistens i *E. coli* fra humane- eller animalske prøver, men 4,3 % resistens ble detektert blant *Streptococcus agalactiae* fra de kliniske prøvene (NORM/NORM-VET, 2017). På bakgrunn av tallene fra NORM/NORM-VET (2017) kunne det kanskje virke litt påfallende at de to *E. coli* stammene hadde utviklet en så høy erytromycinresistens, men på den andre siden følger bakteriene den globale trenden. En forklaring til den observerte erytromycinresistensen kunne være tilstedeværelsen av *mdf(A)* i begge bakterieisolatene. *mdf(A)* har evnen til å bytte ut erytromycin med et proton slik at det toksiske nivået inni cellen forholder seg forholdsvis lav og cellens vekst påvirkes lite (Edgar & Bibi, 1997). Problemet her var at det var kun prøve 2 som hadde *mdf(A)* på et potensielt plasmid, og ville kunne påvirket erytromycinresistens. Prøve 2 inneholdt i tillegg *mph(A)* som er en 2'-fosfotransferase som fosforylerer og inaktiverer erytromycin (Poole et al., 2006). Det finnes en viss sammenheng mellom tilstedeværelsen av *mph(A)* og makrolidresistens (Bibi et al., 2001; Poole et al., 2006; Yang et al., 2003), men for å oppnå høynivå resistens må *mpx* og *mphR* også være til stede (Poole et al., 2006).

Som et siste punkt kan det trekkes frem at det ble sett på som litt underlig at ciprofloxacin

ikke slo ut som klinisk resistent. Det ble funnet både parC p.E84K (mutert topoisomerase IV), qnrS1 (lavnivå resistens mot ciprofloxacin) og mdf(A) (fluorokinolonresistens) som potensielt kunne gitt ciprofloxacinresistens (Bibi et al., 2001; Cantón & Morosini, 2011). qnrS1 ville ikke i seg selv kunne gi resistens, men sammen med et kromosomalt mutert gen ville det kunne gitt ciprofloxacinresistens (Monárrez et al., 2018). I forhold til mutasjon av parC gen viste Liu et al. (2012) til at det var en korrelasjon mellom antall muterte gyrA og parC gener og det totale antallet av mutasjoner og ciprofloxacinresistens, mens Mirzaiia et al. (2018) viste til at gyrA og parC var helt sentrale for utvikling av ciprofloxacinresistens, men parC alene kunne ikke føre til resistens. Liu et al. (2012) hadde 10 isolater hvor parC var hovedgrunnen til resistens, men forskerne mente at den høye fluorokinolonresistensen kom av andre ARM (eksempelvis efflukspumper) som forsøket ikke tok høyde for. Med andre ord burde bakteriesisolatene også inneholde gyrA for å utvikle en resistens mot ciprofloxacin (Moran et al., 2017). En annen påfallende faktor var at det faktisk var mdf(A) tilstede i begge bakteriestammene, noe som potensielt kunne ført til resistens mot ciprofloxacin fordi mdf(A) er en efflukspumpe som er kjent for å pumpe ut fluorokinolonene (Bibi et al., 2001). På den andre siden ble det antatt at mdf(A) lå kromosomalt hos prøve 3 og kunne derfor ha lite innvirkning. Disk diffusjonstesten indikerte at begge stammene hadde en mutasjon eller ervervet ARG siden MIC-brytningspunktet var over ECOFF-verdien, og en eller flere av genene nevnt ovenfor kan ha vært opphavet til den tilegnede resistensen.

### *6.5.1 Refleksjoner knyttet til opphavet til antibiotikaresistensen*

Ås er et gammelt jordbrukssamfunn, hvor man i dag hovedsakelig dyrker korn, men det finnes også en del dyredrift (svin, kyr og høns), samt noe grønnsaksproduksjon. Universitetet på Ås eier kommunens største gård (Thorsnæs & Askheim, 2018), og vannprøvene ble ikke tatt så langt unna nærmeste jorden. Landbrukssektoren regnes for å være en av de største brukerne av antibiotika globalt (Singer et al., 2016). Miljøet tilføres antibiotika fra landbrukssektoren både direkte og indirekte. Gjødsling av jorder og/eller avrenning fra vanlig dyredrift trekkes frem som en av de største kildene til antibiotikakontaminasjon (Allen et al., 2010). Avføring kan inneholde ikke-metaboliserte antibiotikakomponenter som følger kloakken og dermed spres videre til naturen via avfallsvann (Iredell et al., 2016). Forsberg et al. (2014) viste at gjødsel som inneholdt nitrogen (noe dyreavføring gjør) kunne øke forekomsten av ARG i jorden, mens Marti et al. (2013) viste til større innhold av ARB i grønnsaker som var gjødslet med dyreavføring. Det er også gjort flere forsøk som viser til at antallet *Pseudomonas* spp. med

AR øker ved bruk av (Al-Jassim & Hong, 2017; Andreani & Fasolato, 2017). Sidene jordene i nærheten gjødsles med dyreavføring kan dette ha påvirket utviklingen av AR i Andedammen.

Andedammen, hvor *E. coli* stammene ble isolert fra, hadde ikke vært i direkte kontakt med jordbruk, men fysiske krefter som vær og vind kan ha tatt med seg AR fra nærliggende områder (Allen et al., 2010). Dessuten er det et rikt dyreliv på Ås som kan ha påvirket den observerte AR. Andedammen er full av stökkender og andre ville fugler når den ikke er frosset. CTX-M genet er det mest registrert ESBL genet blant ville fugler (Wellington et al., 2013), mens Cole et al. (2005) kunne konkludere med at kanadagjess som hadde vært i kontakt med flytende avfall fra svineindustrien hadde signifikant mer AR *E. coli* og kunne dermed virke som spredningsvektorer. Blaak et al. (2015) viste til at fluer og andre insekter som lever i dyreavføring/døde dyr kan fly fra en gård og over til næringsmiddelindustrien eller miljøet og på denne måten fungere som en spredningsvektor. Dessuten finnes det en rekke smågnagere som mus og rotter på Ås campus. Gilliver et al. (1999) kunne vise til stor AR i ville musestammer som ikke tidligere var eksponert for antibiotika. Videre kan også mennesker dele og spre AR. Universitet på Ås har et rikt studentsamfunn med studenter fra over 70 land, hvor av de fleste kommer fra Europa (NMBU, 2018) som har en betydelige høyere AR rate enn i Norge (NORM/NORM-VET, 2017). Det finnes også en rekke studenter fra Afrika og Asia hvor enkelte gener som CTX-M har ført til pandemiske tilfeller (Bajaj et al., 2016). Disse utvekslingsstudentene kan ha tatt med seg ARB eller ARG som har etablert seg på Ås. Videre kan det å trekkes frem at norske studenter og ansatte på universitetet reiser betraktelig mer enn før, noe som også vil kunne påvirke AR i nærmiljøet.

## 7 KONKLUSJON

Ut fra de feno- og genotypiske metoder som ble anvendt i dette forsøket kunne det konkluderes med at det fantes MDR, patogen *E. coli* stammer med ESBL i Andedammen, som ligger på campusen til NMBU. Et plasmidmeditert *bla*<sub>CTX-M</sub> var mest sannsynlig opphavet til mye av den observerte AR, og siden funnet ikke ble sett på som tilfeldig, kan det tenkes at det finnes en kilde i nærheten av Andedammen som slipper ut *bla*<sub>CTX-M</sub> til miljøet. Siden *bla*<sub>CTX-M</sub> mest sannsynligvis lå på et plasmid vil resistensen kunne overføres til andre bakterier i Andedammen og omegn via HGT, noe som kan fremme AR blant andre bakterier. Funnene i denne masteroppgaven antyder at miljøet kan være et viktig ledd i AR utviklingen, men videre forskning på området er nødvendig for å kunne dra klare slutninger.

## 8 VIDERE ARBEID

For å kunne bekrefte eller avkrefte funnene i denne masteroppgaven må rådata fra MinION sekvenseringen sekvenseres på nytt i en Illumina MiSeq. Dertil må dataen fra CANU og Illumina MiSeq fusjoneres og settes sammen («hybrid assembly»). Resultatet fra denne hybridiseringen vil være av svært høy kvalitet, og kan eksempelvis avgjøre hvilke CTX-M varianter de to stammene inneholdt. Denne hybrididen vil også kunne bekrefte funksjonaliteten til de ulike ARG diskutert i denne masteroppgaven. Etter resultatene fra CANU og Illumina MiSeq er sammenfattet vil resultatene sendes til en GenBank i USA.

I videre arbeid med forsøket hadde det vært spennende å prøve å finne kilden til CTX-M genet. Potensielt kan denne kilden være dyr, fugler, fisk og/eller andre spredningsvektorer, og det kunne derfor vært opplysende å søke etter kilden i faunaen i nærheten av campus. Det kunne også vært spennende å måle mengden tungmetaller og biocider i vannområdene, og kanskje i jordområdene rundt vannkildene. Videre undersøkelse av andre vannkilder i kommunen, som avfallsvannet fra fabrikken Lilleborg, hadde vært svært spennende for å se om funn kunne sammenfalle med de gjort i utlandet.

## 9 KILDEHENVISNING

- Abbasi, G. E. & Simonsen, M. L. H. (2017). *Identifikasjon av bredspektret  $\beta$ -laktam resistens (ESBL og Karbapenemaser) i bakterielle isolater fra miljøet ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser*. Masterthesis. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Available at: <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/2451631/Masteroppgave%202017.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed: 07.01.2019).
- Abriouel, H., Omar, N. B., Molinos, A. C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamero, M. M. & Galvez, A. (2007). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food and Microbiology*, 31 (1-2): 38-49. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067.
- Akinbowale, O. L., Peng, H. & Barton, M. D. (2007). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (5): 2016-2025. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03445.x.
- Al-Jassim, N. & Hong, P.-Y. (2017). Potential dissemination of ARB and ARGs into soil through the use of treated wastewater for agricultural irrigation: is it a true cause for concern? In Hashmi, M. Z., Strezov, V. & Varma, A. (eds) *Soil biology, vol. 51 Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils: Monitoring, toxicity, risk assessment and management*, pp. 105-140. Cham: Springer International Publishing.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (4): 251-259. doi: 10.1038/nrmicro2312.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17): 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiolgy*, 1 (134): 1-7. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- Amos, G. C. A., Hawkey, P. M., Gaze, W. H. & Wellington, E. M. (2014). Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (7): 1785-1791. doi: 10.1093/jac/dku079.

- Amresco Inc. (1994). *Electrophoresis loading dyes for acrylamide and agarose electrophoresis (E190, E269, E274) [Protokoll]*. Available at: <http://www.interchim.fr/ft/6/662600.pdf> (accessed: 08.04.2019).
- Andreani, N. A. & Fasolato, L. (2017). *Pseudomonas* and related genera. In Bevilacqua, A., Corbo, M. R. & Sinigaglia, M. (eds) *The microbiological quality of food foodborne spoilers*, pp. 25-60. UK: Woodhead Publishing.
- 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): 461-468. doi: 10.3855/jidc.3856.
- Arun, S., Mukhopadhyay, M. & Chakraborty, P. (2017). A review on antibiotics consumption, physico-chemical properties and their sources in asian soil. In Hashmi, M. Z., Strezov, V. & Varma, A. (eds) *Soil biology*, vol. 51 *Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils: monitoring, toxicity, risk assessment and management*, pp. 39-54. Cham: Springer International Publishing.
- Astrup, E., Elstrøm, P., Eriksen, H.-M., Kacelnik, O. & Litlekare, I. (2014). Antibiotikaresistens. In *Folkehelse rapporten - Helsetilstanden i Norge*. Oslo: Folkehelseinstituttet. Available at: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/> (accessed: 02.01.2019).
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., et al. (2008). The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9 (75). doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- Bajaj, P., Singh, N. S. & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli*  $\beta$ -Lactamases: what really matters. *Frontiers in Microbiology*, 7 (417). doi: 10.3389/fmicb.2016.00417.
- Baker-Austin, C., Wrighta, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14 (4): 176-182. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006.
- Baquero, F., Martínez, J.-L. & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (3): 260-265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Bassett, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L. & Villanueva, A. R. (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*, 209 (4464): 1532–1534. doi: 10.1126/science.7001623.
- BCCDS. (2014). *Carbapenemase-producing organisms (CPO) fact sheet* Available at: <http://www.bccdc.ca/resource->

- [gallery/Documents/Educational%20Materials/Epid/Other/CPOBacteriainBC\\_factsheet\\_feb7\\_2014.pdf](#) (accessed: 16.01.2019).
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13 (5): 310-317. doi: 10.1038/nrmicro3439.
- Bibi, E., Adler, J., Lewinson, O. & Edgar, R. (2001). MdfA, an interesting model protein for studying multidrug transport. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3 (2): 171-177. Available at: <https://www.caister.com/jmmb/v/v3/v3n2/06.pdf> (accessed: 26.04.2019).
- Biolabs, N. E. (2019). *Quick-Load® 100 bp DNA Ladder [Protokoll]*. Available at: <https://www.neb.com/products/n0467-quick-load-100-bp-dna-ladder#Product%20Information> (accessed: 12.03.18).
- bioMérieux. (u.å.). *Bacteria and the environment*. Available at: <https://www.antimicrobial-resistance.biomerieux.com/popup/bacteria-and-the-environment/> (accessed: 12.05.2019).
- Biotium. (2015). *GelRed™ & GelGreen™ [Protokoll]*. Available at: [https://www.fisherbiotec.com.au/wp-content/uploads/2017/09/biotium\\_gelred-gelgreen-stains-fb\\_flyer.pdf](https://www.fisherbiotec.com.au/wp-content/uploads/2017/09/biotium_gelred-gelgreen-stains-fb_flyer.pdf) (accessed: 11.03.2019).
- Blaak, H., vanHoek, A. H. A. M., Hamidjaja, R. A., vander Plaats, R. Ø. J., Kerkhof-deHeer, L., Husman, A. M. R. & Schets, F. M. (2015). Distribution, numbers, and diversity of ESBL producing *Escherichia coli* in the poultry farm environment. *Plos One* 10 (8): e0135402. doi: 10.1371/journal.pone.0135402
- Blackledge, M. S., Worthington, R. J. & Melander, C. (2013). Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13 (5): 699-706. doi: 10.1016/j.coph.2013.07.004.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. & Martinez, J. L. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, 4 (1). doi: 10.3390/microorganisms4010014.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (1): 1-14. doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004.

- Boumghar-Bourtchai, L., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., Filliol, I., Dhalluin, A., Ifrane, S. A., Weill, F.-X. & Leclercq, R. (2008). Macrolide-resistant *Shigella sonnei*. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (8): 1297-1299. doi: 10.3201/eid1408.080147.
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2 (41): 2-41. doi: 10.1128/CMR.00019-11.
- Bruun, T., Denison, E., Gjersing, L., Husøy, T., Knudsen, A. N. & Strand, B. H. (2018). *Folkehelse rapporten - helsetilstanden i Norge 2018*. Rapport 2018. Oslo: Folkehelseinstituttet. Available at: <http://www.forebygging.no/Global/helsetilstanden-i-norge-2018.pdf> (accessed: 07.01.2019).
- Canteón, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (1): 20-25. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x.
- Cantón, R. & Morosini, M.-I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 35 (5): 977-991. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x.
- Chaitanya, P. J., Chandrashekar, R., Bhavani, N.-L. & Kudle, K. R. (2014). A comparative study of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents - cephalosporin, cloxacillin and sulbactam on gram-ve and gram+ve bacterial organisms *Salmonella typhi* and *Staphylococci*. *Journal of Scientific & Innovation Research*, 3 (1): 43-48. Available at: [http://www.jsirjournal.com/Vol3\\_Issue1\\_08.pdf](http://www.jsirjournal.com/Vol3_Issue1_08.pdf) (accessed: 10.03.2019).
- Chandra, N. & Kumar, S. (2017). Antibiotics producing soil microorganisms. In Hashmi, M. Z., Strezov, V. & Varma, A. (eds) *Soil biology*, vol. 51 *Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils: monitoring, toxicity, risk assessment and management*, pp. 1-18. Cham: Springer International Publishing.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2): 232-260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
- Cid, D., Blanco, M., Blanco, J. E., Ruíz Santa Quiteira, J., de La Fuente, R. & Blanco, J. (1996). Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic goat kids in Spain. *Veterinary Microbiology*, 53 (3): 349-354. doi: 10.1016/S0378-1135(96)01222-9.

- Cigene. (u.å.). *Cigene computational unit*. Available at: <https://cigene.no/lab-resources/cigene-computational-unit/> (accessed: 03.05.2019).
- Codjoe, F. S. & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, 6 (1): 1-28. doi: 10.3390/medsci6010001.
- Cohen, S. J., Voets, G., Rottier, W., Voskuil, S., Scharringa, J., Van Dijk, K., Fluit, A. C. & Leverstein-Van, M. H. (2013). Evaluation of the Oxoid Brilliance™ CRE agar for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32 (11): 1445-1449. doi: 10.1007/s10096-013-1896-7.
- Cole, D., Drum, D. J. V., Stallknecht, D. E., White, D. G., Lee, M. D., Ayers, S., Sobsey, M. & Maurer, J. J. (2005). Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (16): 935-938. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367595/pdf/04-0717.pdf> (accessed: 05.01.2019).
- Cytryn, E. (2013). The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 63 (2013): 18-23. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.03.017.
- 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): 490–495. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *American Society for Microbiolog*, 74 (3): 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Deamer, D., Akeson, M. & Branton, D. (2016). Three decades of nanopore sequencing (historical perspective). *Nature Biotechnology*, 34 (5): 518-524. doi: 10.1038/nbt.3423.
- Diarra, M. S., Giguère, K., Malouin, F., Lefebvre, B., Bach, S., Delaquis, P., Aslam, M., Ziebell, K. A. & Roy, G. (2009). Genotype, serotype, and antibiotic resistance of sorbitol-negative *Escherichia coli* isolates from feedlot cattle. *Journal of food protection*, 72 (1): 28-36. doi: 10.4315/0362-028X-72.1.28.
- ECDC/EMEA. (2009). *The bacterial challenge: time to react a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents*. Technical report. Stockholm: ECDC. Available at: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) (accessed: 05.01.2019).

- Edelstein, P. (2017). *Epidemiologic Cutoff Values [Protokoll]*. Available at: [http://www.ups.upenn.edu/bugdrug/antibiotic\\_manual/ECV.htm](http://www.ups.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/ECV.htm) (accessed: 03.05.2019).
- Edgar, R. & Bibi, E. (1997). MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *The Journal of Bacteriology*, 179 (7): 2274-2280. doi: 10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997.
- El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. M. M., El-Bialya, H. A. & Omaraa, A. M. A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8 (1): 36-48. doi: 10.1016/j.jrras.2014.10.007.
- Espenhain, L., Alberg, T., Holen, Ø. & Eriksen, H.-M. (2017). *Årsrapport 2016 - Helsetjenesteassosierte infeksjoner og antibiotikabruk i Norge* Folkehelseinstituttet årsrapport resistente mikrober 2016. Oslo: Folkehelseinstituttet. Available at: [https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/nois-msis-verdens-handhygienedag/arsrapport-2016-om-helsetjenesteassosierte-infeksjoner-antibiotikabruk-nois-antibiotikaresistens-msis-og-verdens-handhygienedag\\_15.11.2017\\_med-omslag.pdf](https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/nois-msis-verdens-handhygienedag/arsrapport-2016-om-helsetjenesteassosierte-infeksjoner-antibiotikabruk-nois-antibiotikaresistens-msis-og-verdens-handhygienedag_15.11.2017_med-omslag.pdf) (accessed: 16.01.2019).
- EUCAST. (2009). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0, valid from 2019-01-01*. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v9.0_Breakpoint_Tables.pdf) (accessed: 05.04.2019).
- EUCAST. (u.å.). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. Available at: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=162> (accessed: 09.04.2019).
- Eurofins. (u.å.). *Lightrun tube*. Available at: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/lightrun-tube/> (accessed: 15.03.2019).
- Falkinham, J. O., III, Wall, T. E., Tanner, J. R., Tawaha, K., Alali, F. Q., Li, C. & Oberlies, N. H. (2009). Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (9): 2735-2741. doi: 10.1128/AEM.00104-09.
- Fernández, L. & Hancock, R. E. (2013). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 6 (1): 661-681. doi: 10.1128/CMR.00043-12.

- Fleming, A. (1929). On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10 (3): 226-236. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/pdf/brjexppathol00255-0037.pdf> (accessed: 06.01.2019).
- Folkhelseinstituttet. (2012a). *ESBL-holdige gramnegative stabbakterier - smitteverntiltak i helseinstitusjoner* Available at: [https://www.fhi.no/sv/forebygging-i-helsetjenesten/smittevern\\_i\\_institusjoner/tiltak/esbl-holdige-gramnegative-stavbakte/](https://www.fhi.no/sv/forebygging-i-helsetjenesten/smittevern_i_institusjoner/tiltak/esbl-holdige-gramnegative-stavbakte/) (accessed: 16.01.2019).
- Folkhelseinstituttet. (2012b). *Om antibiotikaresistens*. Available at: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-antibiotikaresistens/> (accessed: 02.01.2019).
- Folkhelseinstituttet. (2018). *Om antibiotikaresistens*. Available at: <https://helsenorge.no/legemidler/om-antibiotikaresistens> (accessed: 02.01.2019).
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A. & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337 (6098): 1107-1111. doi: 10.1126/science.1220761.
- Forsberg, K. J., Patel, S., Gibson, M. K., Lauber, C. L., Knight, R., Fierer, N. & Dantas, G. (2014). Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature*, 509 (7502): 612-614. doi: 10.1038/nature13377.
- Gaustad, P. (2001). Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier. *Tidsskrift for den Norske Legeforening*, 26 (121): 3090-3094. Available at: <https://tidsskriftet.no/2001/10/tema-infeksjoner/mekanismer-utvikling-av-antibiotikaresistente-bakterier> (accessed: 03.03.2019).
- Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H. & Malhotra-Kumar, S. (2012). Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (4): 1140–1146. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318521/> (accessed: 20.04.2019).
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. & Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47 (3): 137-147. doi: 10.3390/medicina47030019.
- Gilliver, M. A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S. M. & Hart, C. A. (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*, 401 (6750): 233-234. doi: 10.1038/45724.

- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. R. (2008). Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal Antimicrob Chemother*, 63 (1): 1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.
- Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1): 11-32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x.
- Grohmann, E., Muth, G. & Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (2): 277-301. doi: 10.1128/MMBR.67.2.277-301.2003.
- Halvorsen, B. G. (2012). Multiresistente Gram-negative bakterier – et økende globalt helseproblem. *Bioingenøren*, 47 (2): 16-21. Available at: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/c2ab8c45b3e54ca6a4f9634f57720e8c/bioingenioren-2-2012.pdf> (accessed: 20.02.2019).
- Harvey, R. A. & Ferrier, D. (2011). *Lippincotts illustrated reviews: biochemistry*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Hasnain, A., Nasim, W., Mubarak, H., Mirza, N., Khan, S., Su, X., Ahmed, S. & Hashmi, M. Z. (2017). Antibiotics resistance genes. In Varma, A., Hashmi, M. Z. & Strezov, V. (eds) *Soil biology, vol. 51 Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils: monitoring, toxicity, risk assessment and management*, pp. 19-37. Cham: Springer International Publishing
- He, L.-Y., Ying, G.-G., Liu, Y.-S., Su, H.-C., Chen, J., Liu, S.-S. & Zhao, J.-L. (2016). Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. *Environment International*, 92-93: 210–219. doi: 10.1016/j.envint.2016.03.023.
- Helse- og omsorgsdepartementet. (2015). *Nasjonal strategi mot antibiotikaresistens 2015–2020*. Oslo: Helse- og omsorgsdepartementet. Available at: [https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi\\_antibiotikaresistens\\_230615.pdf](https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi_antibiotikaresistens_230615.pdf) (accessed: 20.02.2019).
- Helsedirektoratet. (2013). *Nasjonal faglig retningslinje for bruk av antibiotika i sykehus*. Oslo: Helsedirektoratet. Available at: <https://helsedirektoratet.no/retningslinjer/antibiotika-i-sykehus/seksjon?Tittel=antibiotikaresistens-11047> (accessed: 03.02.2019).

- Hemeg, H. A. (2018). Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates recovered from food samples and outpatient Clinics, KSA. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25 (5): 928-931. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.01.016.
- Hengyun, L., Giordano, F. & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14 (5): 265-279. doi: 10.1016/j.gpb.2016.05.004.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J. & Piddock, L. J. (2015). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387 (10094): 176-187. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- Hrabák, J., Chudáčková, E. & Papagiannitsis, C. C. (2014). Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (9): 839-853. doi: 10.1111/1469-0691.12678.
- Hsieh, L. & Amin, A. (2016). Antimicrobial stewardship: hospital strategies to curb antibiotic resistance. In Kon, K. & Rai, M. (eds) *Antibiotic resistance mechanisms and new antimicrobial approaches*, pp. 1-18. London: Elsevier Inc. Available at: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-46718-4.pdf> (accessed: 20.02.2019).
- Huang, T.-D., Bogaerts, P., Berhin, C., Guisset, A. & Glupczynski, Y. (2010). Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6): 2091-2096. doi: 10.1128/JCM.02342-09.
- Huerta, B., Marti, B., Gros, M., López, P., Pompêo, M., Armengol, J., Barceló, D., Balcázar, J. L., Rodríguez-Mozaz, S. & Marcé, R. (2013). Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of The Total Environment*, 456-457: 161-170. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.071.
- Interchim®. (u.å.). *Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) [Protokoll]*. Available at: <http://www.interchim.fr/ft/J/JI061A.pdf> (accessed: 28.03.2019).
- Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *The BMJ*, 352 (h6420): 1-19. doi: 10.1136/bmj.h6420
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*®, 22 (1): 161-182. doi: 10.1128/CMR.00036-08.

- 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.
- Jie, H., Yan, Z., Ming, L., Yue, L., Junping, F., Xianping, W., Yongfang, Z. & Xuejun, C. Z. (2015). Substrate-bound structure of the *Escherichia coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell Research*, 25 (9): 1060-1073. doi: 10.1038/cr.2015.94.
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M. & Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology*, 53 (8): 2410-2426. doi: 10.1128/JCM.00008-15.
- 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.
- Kolbert, C. P. & Persing, D. H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens *Current Opinion in Microbiology*, 2 (3): 299-305. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80052-6.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H. & Phillippy, A. M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive -mer weighting and repeat separation. *Genome research*, 27 (5): 722-736. doi: 10.1101/gr.215087.116.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, 75 (4): 435–441. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006.
- Köhler, C.-D. & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301 (8): 642-647. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006.
- L'Abée-Lund, T. & Wasteson, Y. (2015a). *Escherichia coli*. In Granum, P. E. (ed.) *Matforgiftning - Smitte gjennom mat og vann*, pp. 78-95. Oslo: Cappelen Damm Akademisk.
- L'Abée-Lund, T. & Wasteson, Y. (2015b). *Shigella* spp. In Granum, P. E. (ed.) *Matforgiftning - Smitte gjennom mat og vann*, pp. 112-119. Oslo: Cappelen Damm Akademisk.
- Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., Cavanaugh, C. M. & Ford, T. E. (2008). Quantifying nonspecific TEM-lactamase (*bla*<sub>TEM</sub>) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (1): 203-211. doi: 10.1128/AEM.01254-08.

- Lindstedt, B.-A. (u.å.-a). *NC\_022375.1 [Sekvens]*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Unpublished manuscript.
- Lindstedt, B.-A. (u.å.-b). *NC\_020452.1 [Sekvens]*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Unpublished manuscript.
- Lindstedt, B.-A. (u.å.-c). *NC\_025183.1 [Sekvens]*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Unpublished manuscript.
- Lindstedt, B.-A. (u.å.-d). *NC\_017645.1 [Sekvens]*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Unpublished manuscript.
- Lindstedt, B.-A. (u.å.-e). *AJ223604 [Sekvens]*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Unpublished manuscript.
- Lindstedt, B.-A. (u.å.-f). *AY354402.1 [Sekvens]*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Unpublished manuscript.
- Liu, B.-T., Liao, X.-P., Yang, S.-S., Wang, X.-M., Li, L.-L., Sun, J., Yang, Y.-R., Fang, L.-X., Li, L., Zhao, D.-H., et al. (2012). Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 1595-1599. doi: 10.1099/jmm.0.043307-0.
- Löhr, I. & Samuelsen, Ø. (2015). *Litteraturgjennomgang og vurdering av mulige strategier ved bruk av selektive kromogene medier for screening for bærerskap av multiresistente (ESBL-holdige) Gram-negative stavbakterier*. Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens. Tromsø: Universitetssykehuset Nord-Norge. Available at: [https://unn.no/Documents/Kompetansetjenester,%20sentre%20og%20fagr%C3%A5d/AFA%20%20arbeidsgruppen%20for%20antibiotikasp%C3%B8rsm%C3%A5l/Metoder/20151126%20Screening%20ESBL%20AFA%20KRES%20\(2\).pdf](https://unn.no/Documents/Kompetansetjenester,%20sentre%20og%20fagr%C3%A5d/AFA%20%20arbeidsgruppen%20for%20antibiotikasp%C3%B8rsm%C3%A5l/Metoder/20151126%20Screening%20ESBL%20AFA%20KRES%20(2).pdf) (accessed: 20.04.2019).
- MacGowan, A. & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45 (10): 622-628. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.07.006.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015). *Brock biology of microorganisms*. Harlow: Pearson Education
- Magiorakosa, A.-P., Srinivasanb, A., Carey, R. B., Carmelic, Y., Falagasde, M. E., Giskef, C. G., Harbarthg, S., Hindlerh, J. F., Kahlmeteri, G., Olsson-Liljequistj, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired

- resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (3): 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Manchester, K. L. (1996). Use of UV-methods for the measurement of protein and nucleic acid concentrations. *BioTechniques*, 20 (6): 968–970. doi: 10.2144/96206bm05.
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y. & Toppa, E. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (18): 5701-5709. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754188/pdf/zam5701.pdf> (accessed: 03.03.2019).
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321 (5887): 365-367. doi: 10.1126/science.1159483.
- Matuschek, E., Brown, D. F. J. & G., K. (2013). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (4): O255–O266. doi: 10.1111/1469-0691.12373.
- McPherson, M. J. & Møller, S. G. (2000). *PCR*. 2nd ed. The basics. UK: Bios Scientific Publishers Ltd.
- Medeiros, A. A. (1997). Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24: S19-S45. doi: 10.1093/clinids/24.Supplement\_1.S19.
- Mirzaia, M., Jamshidi, S., Zamanzadeh, M., Marashifard, M., Asghar S.A., Hosseini, M., Haeili, M., Jahanbin, F., Mansouri, F., Darban-Sarokhalile, D., et al. (2018). Determination of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinarytract infection in Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13: 197-200.
- Miten, J., Ian, T. F., Karen, H. M., Hugh, E. O., Benedict, P. & Mark, A. (2015). Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. *Nature Methods*, 12 (4): 351-356. doi: 10.1038/nmeth.3290.
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., de la Torre, J., Segura, A., Plesiat, P., et al. (2014). Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. *Plos One*, 9 (1): e81604. doi: 10.1371/journal.pone.0081604.

- Monárrez, R., Wang, Y., Fu, Y., Liao, C.-H., Okumura, R., Braun, M. R., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. (2018). Genes and proteins involved in qnrS1 induction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62 (9): e00806-18. doi: 10.1128/AAC.00806-18.
- Moran, R. A., Anantham, S., Holt, K. E. & Hall, R. M. (2017). Prediction of antibiotic resistance from antibiotic resistance genes detected in antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* using PCR or WGS. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72 (3): 700-704. doi: 10.1093/jac/dkw511.
- Morschhäuser, J., Vetter, V., Korh, T., Uhlin, B. E. & Hacker, J. (1993). Regulation and binding properties of S fimbriae cloned from *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection and meningitis In Hacker, J. (ed.) *Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, vol. 278 *Zentralblatt für Bakteriologie*, pp. 165-176. Stuttgart/New York Gustav Fischer Verlag. Available at: [https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/7061/file/Hacker\\_7061.pdf](https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/7061/file/Hacker_7061.pdf) (accessed: 28.04.2019).
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.
- Naas, T., Cuzon, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y. & Nordmann, P. (2011). Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (4): 1608-1613. doi: 10.1128/JCM.02607-10.
- National Institutes of Health. (2016a). *Aminopenicillins third generation penicillins*. Available at: <https://livertox.nih.gov/Aminopenicillins.htm> (accessed: 01.05.2019).
- National Institutes of Health. (2016b). *Overview amoxicillin-clavulanate*. Available at: <https://livertox.nih.gov/AmoxicillinClavulanate.htm> (accessed: 01.05.2019).
- NCBI. (2006/2007). New database and view options for Nucleotide BLAST services. *NCBI*, 15 (2). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html> (accessed: 05.04.2019).
- NCCLS. (1996). *Protocols for evaluating dehydrated Mueller–Hinton agar; approved standard*. Available at: <http://demo.nextlab.ir/getattachment/186efc9c-53d6-4336-b166-2a7cb5fa65a1/CLSI-M06-A.aspx> (accessed: 05.04.2019).

- Nguyen, M. C. P., Woerther, P.-L., Bouvet, M., Andremont, A., Leclercq, R. & Canu, A. (2009). *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (10): 1648-1650. doi: 10.3201/eid1510.090696.
- Nishi, J., Sheikh, J., Mizuguchi, K., Luisi, B., Burland, V., Boutin, A., Rose, D. J., Blattner, F. R. & Nataro, J. P. (2003). The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *The Journal of biological chemistry*, 278 (46): 45680-45689. doi: 10.1074/jbc.M306413200.
- Njage, P. M. K. & Buys, E. M. (2015). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology*, 8 (3): 462-473. doi: 10.1111/1751-7915.12234.
- NMBU. (2018). *Velkommen til våre internasjonale studenter!* Available at: <https://www.nmbu.no/aktuelt/node/35273> (accessed: 20.04.2019).
- Noguchi, N., Tamura, Y., Katayama, J. & Narui, K. (1998). Expression of the mphB gene for macrolide 2'-phosphotransferase II from *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 159 (2): 337-342. doi: 10.1016/S0378-1097(98)00003-2.
- Nordmann, P., Lartigue, M.-F. & Poirel, L. (2008).  $\beta$ -Lactam induction of ISEcp1B-mediated mobilization of the naturally occurring bla<sub>CTX-M</sub>  $\beta$ -lactamase gene of *Kluyvera ascorbata*. *FEMS Microbiology Letters*, 288 (2): 247-249. doi: doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01359.x.
- Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (10): 1791-1798. doi: 10.3201/eid1710.110655.
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N. & Miriagoue, V. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (5): 432-438. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x.
- NORM/NORM-VET. (2017). *Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway 2017*. Tromsø/Oslo: NORM/NORM-VET. Available at: [https://unn.no/Documents/Kompetansetjenester,%20sentre%20og%20fagr%C3%A5d/NORM%20%20Norsk%20overv%C3%A5kingssystem%20for%20antibiotikaresistens%20hos%20Omikrober/Rapporter/NORM\\_NORM-VET\\_2017.pdf](https://unn.no/Documents/Kompetansetjenester,%20sentre%20og%20fagr%C3%A5d/NORM%20%20Norsk%20overv%C3%A5kingssystem%20for%20antibiotikaresistens%20hos%20Omikrober/Rapporter/NORM_NORM-VET_2017.pdf) (accessed: 07.01.2019).

- Nucleus. (2012). *Databasesøgning med BLAST [Protokoll]*. Available at: <http://www.bioteknologibogen.dk/bioteknologi-6/links/Tema12-Link4.pdf> (accessed: 11.04.2019).
- O'Hara, K., Kanda, T., Ohmiya, K., Ebisu, T. & Kono, M. (1989). Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (8): 1354-1357. doi: 10.1128/AAC.33.8.1354.
- O'Neil, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. Rapport May 2016. UK: The Review on Antimicrobial Resistance. Available at: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf) (accessed: 06.01.2019).
- Oxford Nanopore Technologies. (2017). *Oxford Nanopore launches analysis workflow for antimicrobial resistance*. Available at: <https://nanoporetech.com/about-us/news/oxford-nanopore-launches-analysis-workflow-antimicrobial-resistance> (accessed: 08.04.2019).
- Oxoid Ltd. (2010). *Brilliance™ ESBL [Protokoll]*. Available at: <http://www.oxoid.com/pdf/oxoid-Brilliance-ESBL.pdf> (accessed: 29.01.2019).
- Pawlowski, A., Stogios, P., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A. & Wright, G. (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature Communications*, 9 (1): 112-112. doi: 10.1038/s41467-017-02680-0.
- Pigatto, C. P., Schocken-Iturrino, R. P., Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Comarella, L., Irino, K., Kato, M. A. M. F., Farah, S. M. S. S., Warth, J. F. & Fadel-Picheth, C. M. T. (2008). Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paran State, Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 54 (7): 588-593. doi: 10.1139/W08-046.
- Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (9): 2233-2241. doi: 10.1128/AAC.44.9.2233-2241.2000.
- Poole, T. L., Callaway, T. R., Bischoff, K. M., Warnes, C. E. & Nisbet, D. J. (2006). Macrolide inactivation gene cluster mphA-mrx-mphR adjacent to a class 1 integron in *Aeromonas hydrophila* isolated from a diarrhoeic pig in Oklahoma. *Journal Antimicrobial Chemothererapy*, 57 (1): 31-38. doi: 10.1093/jac/dki421.

- Rasmussen, L. D. & Sørensen, S. J. (1998). The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. *An International Journal*, 36 (5): 291-297. doi: 10.1007/s002849900312.
- ReAct. (2015). *Understand – How did we end up here? Few antibiotics under development*. Available at: <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/09/ab-discovery-timeline.png> (accessed: 08.05.019).
- Remel. (2012). *Muller-Hilton agar w/ and w/o 5 % sheeps blood [Protokoll]*. Available at: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FIFU1620-PI.pdf&title=TXVlbGxlcjBIaW50b24gQWdhcg> (accessed: 20.03.2019).
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Barceló, D. & Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69 (1): 234-242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- Samanta, I., Joardar, S. N., Das, P. K. & Sar, T. K. (2015). Comparative possession of Shiga toxin, intimin, enterohaemolysin and major extended spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolated from backyard and farmed poultry. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16 (1): 90-93. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789247/> (accessed: 28.04.2019).
- Sarocho, G. & Reject, P. M. P. (2012). A comparative study on UV spectrophotometric quantification of DNA extracted from human saliva. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 2 (4): 123-125. doi: 10.1016/j.ejfs.2012.08.003.
- Schmidt, K., Mwaigwisya, S., Crossman, L. C., Doumith, M., Munroe, D., Pires, C., Khan, A. M., Woodford, N., Saunders, N. J., Wain, J., et al. (2016). Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (1): 104-114. doi: 10.1093/jac/dkw397.
- Science China Press. (2013). *The gene sequencing that everyone can afford in future*. Available at: <https://phys.org/news/2013-12-gene-sequencing-future.html> (accessed: 08.05.2019).
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Mohd, S., Rizvi, D. & 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.

- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V. & Hart, A. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1728): 1-22. doi: 10.3389/fmicb.2016.01728.
- Skamflem, H. B. (2018). *Detektering av betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) i bakterier isolert fra akvatiske miljøer ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder*. Masterthesis. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Available at: <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/2570744/Masteroppgave%20Hedvig%20Bentsen%20Skamflem%20va%CC%8Aren%202018.pdf?sequence=2&isAllowed=y> (accessed: 10.04.2019).
- Smith, R. A., M'ikanatha, N. M. & Read, A. F. (2015). Antibiotic resistance: A primer and call to action. *Health Communication*, 30 (3): 309-314. doi: 10.1080/10410236.2014.943634.
- Solberg, S. (2018). *Screening for bredspektrede  $\beta$ laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser i akvatiske nærmiljø*. Masterthesis. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Available at: [https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2573382/Solberg\\_Sissel\\_2018\\_master.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2573382/Solberg_Sissel_2018_master.pdf?sequence=4&isAllowed=y) (accessed: 11.03.2019).
- Spurbeck, R. R., Jr., D., P.C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R. & Mobley, H. L. T. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyuA, chuA, and yfcV efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity*, 80 (12): 4115-4122. doi: 10.1128/IAI.00752-12.
- Steinbakk, M., Sunde, M. M., Urdahl, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B.-T., Bonhorst, J. Ø., Nielsen, K. M., Lindbæk, M. & Bjørnholt, J. V. (2014). *Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak*. Rapport fra tverrsektoriell ekspertgruppe. Folkehelseinstituttet: Oslo. Available at: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2014/2014-antibiotikaresistens.pdf> (accessed: 03.02.2019).
- Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Gruger, T. & Wiedemann, B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51 (4): 865-885. doi: 10.1093/jac/dkg156.

- Støle, M. (2017). *Screening av miljøprøver for bredspektrede  $\beta$ -laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser*. Masterthesis: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Available at: <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/2454536/St%C3%B8le%202017.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed: 09.01.2019).
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40 (11): 2562-2566. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163576/pdf/402562.pdf> (accessed: 28.04.2019).
- Swenson, C. E. & Sadikot, R. T. (2014). *Achromobacter* respiratory infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 12 (2): 252-258. doi: 10.1513/AnnalsATS.201406-288FR.
- Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (9): 1842-1852. doi: 10.1093/jac/dkq217.
- Tanner, W. D., Vanderslice, J. A., Goel, R. K., Leecaster, M. K., Fisher, M. A., Olstadt, J., Gurley, C. M., Morris, A. G., Seely, K. A., Chapman, L., et al. (2019). Multi-state study of Enterobacteriaceae harboring extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase genes in U.S. drinking water. *Nature*, 9 (3938): 1-8. doi: 10.1038/s41598-019-40420-0.
- Tarraga, J., Gallego, A., Arnau, V., Medina, I. & Dopazo, J. (2016). HPG pore: an efficient and scalable framework for nanopore sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 17 (84): 1-7. doi: 10.1186/s12859-016-0966-0.
- Thermo Fischer Scientific Inc. (2009). *NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer V1.0 user manual [Protokoll]*. Available at: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf> (accessed: 08.03.2019).
- Thermo Fischer Scientific Inc. (2011). *The next generation in nucleic acid and protein quantitation*. Available at: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobables-journal-of-cell-biology-applications/bioprobables-issues-2011/bioprobables-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html> (accessed: 08.03.2019).

- Thermo Fischer Scientific Inc. (2014). *Quick and easy ESBL and CRE screening*. Available at: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Brilliance-CRE-ESBL-Biplate-Product-Overview.pdf> (accessed: 29.01.2018).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010). *Prepared media - ready prepared plates Brilliance ESBL agar [Protokoll]*. Available at: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=PO5302&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO5302&c=UK&lang=EN) (accessed: 29.01.2019).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (u.å.). *Prepared media - ready prepared plates Brilliance CRE agar [Protokoll]*. Available at: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=PO1226&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1226&c=UK&lang=EN) (accessed: 29.01.2019).
- Thorsnæs, G. & Askheim, S. (2018). Ås. In *Store Norske Leksikon*. Available at: <https://snl.no/Ås> (accessed: 10.04.2019).
- Thougaard, H., Varlund, V. & Madsen, R. M. (2009). *Mikrobiologi*. 3 ed. København: Nyt Teknisk Forlag.
- Timm, C. D., Irino, K., Gomes, T. A. T., Vieira, M. M., Guth, B. E. C., Vaz, T. M. I., Moreira, C. N. & Aleixo, J. A. G. (2007). Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (4): 419-425. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02085.x.
- Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Mulvey, M. R. & Corbett, C. R. (2018). Evaluation of Oxford Nanopore's MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications. *Scientific Reports*, 8 (1): 1-12. doi: 10.1038/s41598-018-29334-5.
- Valencia, C. A. (2013). *Next generation sequencing technologies in medical genetics*. New York: Springer.
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E. & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiology*, 8 (6): 711-731. doi: 10.2217/fmb.13.39.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats *Pharmacy and Therapeutics*, 40 (4): 277-283. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>.

- Veterinærinstituttet. (u.å.). *Kinolonresistens (QREC)*. Available at: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kinolonresistens-qrec> (accessed: 28.04.2019).
- Vitenskapskomiteen for mat og miljø. (2017). *Antibiotikaresistens – hva er det?* Available at: [http://www.matportalen.no/matsmitte\\_og\\_hygiene/tema/smittestoffer/antibiotikaresistens\\_hva\\_er\\_det](http://www.matportalen.no/matsmitte_og_hygiene/tema/smittestoffer/antibiotikaresistens_hva_er_det) (accessed: 02.01.2019).
- Walson, J. L., Marshall, B., Pokhrel, B. M., Kafle, K. K. & Levy, S. B. (2001). Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in Nepal reflects proximity to Kathmandu. *The Journal of Infectious Diseases*, 184 (9): 1163-1169. doi: 10.1086/323647.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & J.R., C. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environment Microbiology*, 73 (16): 5261-5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07.
- Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D. & Hashsham., S. A. (2017). Antimicrobial resistance in the environment. *Water Environment Research*, 89 (10): 921-941. doi: 10.2175/106143017X15023776270179.
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., Otten, W., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet*, 13 (2): 155-165. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1.
- WHO. (2018). *Antibiotic resistance*. Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (accessed: 02.01.2019).
- Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C. F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B. & Nriagu, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied Environmental Microbiology*, 75 (17): 5714–5718. doi: 10.1128/AEM.00382-09.
- Yang, S., Clayton, S. R. & Zechiedrich, E. L. (2003). Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51 (3): 545-556. doi: 10.1093/jac/dkg126.
- Yang, Y., Jiang, X.-T. & Zhang, T. (2014). Evaluation of a hybrid approach using UBLAST and BLASTX for metagenomic sequences annotation of specific functional genes. *Ploese One*, 9 (10): e110947. doi: 10.1371/journal.pone.0110947.
- Yazdankhah, S., Lassen, J., Midtvedt, T. & Solberg, C. O. (2013). Historien om antibiotika. *Tidsskrift for den Norske Legeforening*, 133 (23-24): 2502-2507. doi: 10.4045/tidsskr.13.0145.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13 (134): 1-11. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Yin, Q., Yue, D., Peng, Y., Liu, Y. & XiaoL. (2013). Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in Lake Taihu. *Microbes Environment*, 28 (4): 479–486. doi: 10.1264/jsme2.ME13098.
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, T. K. & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9 (6). doi: 10.7759/cureus.1403.
- 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.

Tabell 1. Bakteriefamilier og -slekter RDP Classifier identifisert de åtte 16S rRNA PCR-produktene i.

<b>Prøve</b>	<b>Familie</b>	<b>Slekt</b>
1		<i>Stenotrophomonas</i> spp.
2	Enterobacteriaceae	Uklassifisert
3		<i>Escherichia</i> spp./ <i>Shigella</i> spp.
4	Pseudomonadaceae	Uklassifisert
5		<i>Serratia</i> spp.
6		<i>Pseudomonas</i> spp.
7	Alcaligenaceae	Uklassifisert
8	Xanthomonadaceae	Uklassifisert

Tabell 1. Bakterieslekter, -arter og -stammer BLAST klassifiserte 16S rRNA-produktene etter.

Bakterieslekt, -art og -stamme	Identitetsscore (%) <sup>*</sup>	«Quary»-lengde (bp)
<b>Prøve 1</b>		<b>1137</b>
[ <i>Pseudomonas</i> ] <i>hibiscicola</i> stamme ATCC 19867	99,44	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme IAM 12423	99,23	
[ <i>Pseudomonas</i> ] <i>geniculata</i> stamme ATCC 19374	99,14	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme strain NBRC 14161	99,14	
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme LGM 25348	99,14	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme LGM 25348	99,14	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme ATCC 13637	99,14	
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme ICB 89	99,04	
<b>Prøve 2</b>		<b>1538</b>
<i>Escherichia fergusonii</i> stamme ATCC 35469	99,71	
<i>Escherichia fergusonii</i> stamme NBRC 102419	99,71	
<i>Escherichia fergusonii</i> stamme ATCC 35469	99,71	
<i>Shigella flexneri</i> stamme ATCC 29903	99,71	
<i>Shigella sonnei</i> stamme CECT 4887	99,61	
<i>Escherichia coli</i> stamme NBRC 102203	99,51	
<i>Shigella boydii</i> stamme P288	99,51	
<i>Escherichia coli</i> stamme U 5/41	99,42	
<i>Escherichia albertii</i> stamme Albert 19982	99,32	
<b>Prøve 3</b>		<b>1266</b>
<i>Escherichia fergusonii</i> stamme ATCC 35469	99,68	
<i>Escherichia fergusonii</i> stamme NBRC 102419	99,68	
<i>Escherichia fergusonii</i> stamme ATCC 35469	99,68	
<i>Shigella flexneri</i> stamme ATCC 29903	99,68	
<i>Shigella boydii</i> stamme P288	99,57	
<i>Shigella sonnei</i> stamme CECT 4887	99,67	
<i>Escherichia coli</i> stamme NBRC 102203	99,46	
<i>Escherichia coli</i> stamme U 5/41	99,35	
<i>Escherichia albertii</i> stamme Albert 19982	99,24	
<i>Citrobacter koseri</i> stamme LMG 5519	99,03	
<b>Prøve 4</b>		<b>871</b>
<i>Pseudomonas resinorans</i> stamme ATCC 14235	99,12	
<b>Prøve 5</b>		<b>929</b>
<i>Serratia glossinae</i> stamme C1	99,21	
<i>Serratia fonticola</i> stamme NBRC 102597	99,09	
<i>Serratia fonticola</i> stamme LMG 7882	99,09	
<b>Prøve 6</b>		<b>1080</b>
<i>Pseudomonas orientalis</i> stamme CFML 96-170	99,42	
<i>Pseudomonas meridianan</i> stamme CMS 38	99,13	

<i>Pseudomonas antartica</i> stamme CMS 35	99,13
<i>Pseudomonas veronii</i> stamme CIP 104663	99,13
<i>Pseudomonas marginalis</i> stamme ICMP 3553	99,04
<i>Pseudomonas tivialis</i> stamme P 513/19	99,04
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> stamme 14-3	99,04
<b>Prøve 7</b>	<b>1669</b>
<i>Achromobacter aegrifaciens</i> stamme LMG 26853	99,39
<i>Achromobacter insuavis</i> stamme LMG 26853	99,09
<i>Achromobacter marplatensis</i> stamme B12	00,09
<b>Prøve 8</b>	<b>1775</b>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme IAM 12423	99,79
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme NBRC 14161	99,69
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme LMG 958	99,69
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme ICB 89	99,69
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme ATCC 19374	99,69
[ <i>Pseudomonas</i> ] <i>geniculata</i> stamme ATCC 19374	99,59
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme LMG 25348	99,59
[ <i>Pseudomonas</i> ] <i>hibiscicola</i> stamme ATCC 19867	99,49
<b>CTX-M gr.9</b>	
<b>Prøve 2</b>	-
Ingen signifikante funn	
<b>Prøve 3</b>	-
Ingen signifikante funn	

\*Hvor stor likhet det er mellom den ukjente prøven o gen prøve fra BLAST sin GenBank (NCBI, 2006/2007)

Tabell 1. DNA-konsentrasjon og renhetsverdier fra NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer og Qubit® 2.0 Fluorometeret i DNA isolert fra bakterieisolatene.

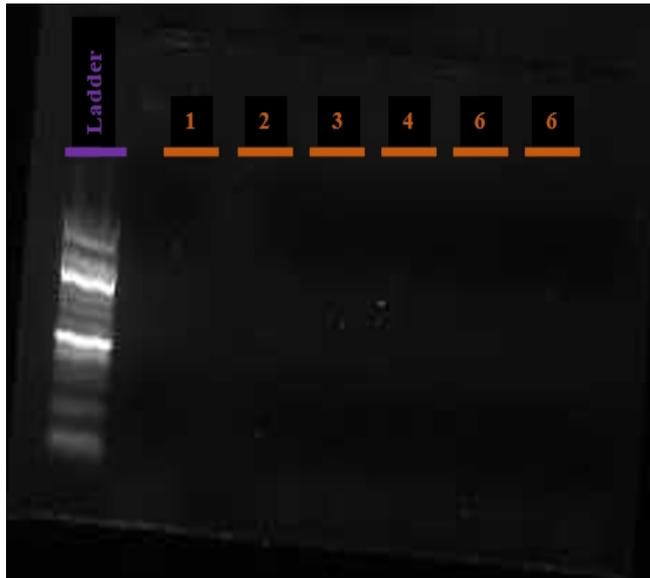
Prøve	NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer			Qubit® 2.0 Fluorometer
	DNA (ng/ml)	Renhet 260/280*	Renhet 260/230**	DNA (ng/ml)
1	46,5	1,82	1,17	21,10
2	39,90	1,89	1,04	19,70
3	25,50	1,98	1,17	9,62
4	23,60	1,81	1,05	15,50
5	13,50	1,90	0,80	4,84
6	23,80	2,00	1,24	11,10
7	34,20	1,91	1,35	21,20
8	7,90	2,00	1,02	12,70

\*Absorpsjonsverdien til målinger ved 260/280 nm burde ligge på ~1,80. En verdi betydelig lavere enn dette kan indikere tilstedeværelsen av proteiner, fenoler og/eller annen kontaminasjon som kan absorberes ved 280 nm (Thermo Fischer Scientific Inc., 2009).

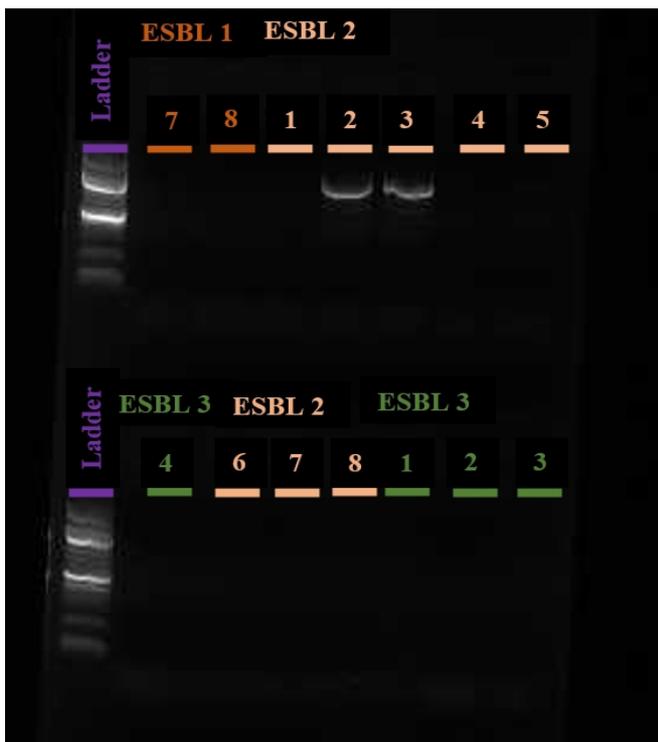
\*\*Absorpsjonsverdien til målinger ved 260/230 nm burde ha en verdi på 1,8-2,2. En verdi betydelig lavere kan dette indikere kontaminering fra karbohydrater eller fenoler (Thermo Fischer Scientific Inc., 2009).

Tabell 1. Verdiene fra Qubit® 2.0 Fluorometeret for de åtte 16S rRNA-produktene før og etter rensing av DNAet, samt prøve 2 og 3 fra ESBL 2 singelpleks PCR-produktene etter rensing.

<b>Prøve</b>	<b>DNA-innhold (før)</b>	<b>DNA-innhold (etter)</b>	<b>DNA-innhold (etter)</b>
	<b>(ng/ml)</b>	<b>(ng/ml)</b>	<b>(ng/ml)</b>
1	63,70	61,70	
2	65,50	49,10	10,00
3	80,60	80,70	12,10
4	65,90	60,90	
5	84,60	79,60	
6	71,00	69,20	
7	53,40	76,40	
8	87,50	87,50	



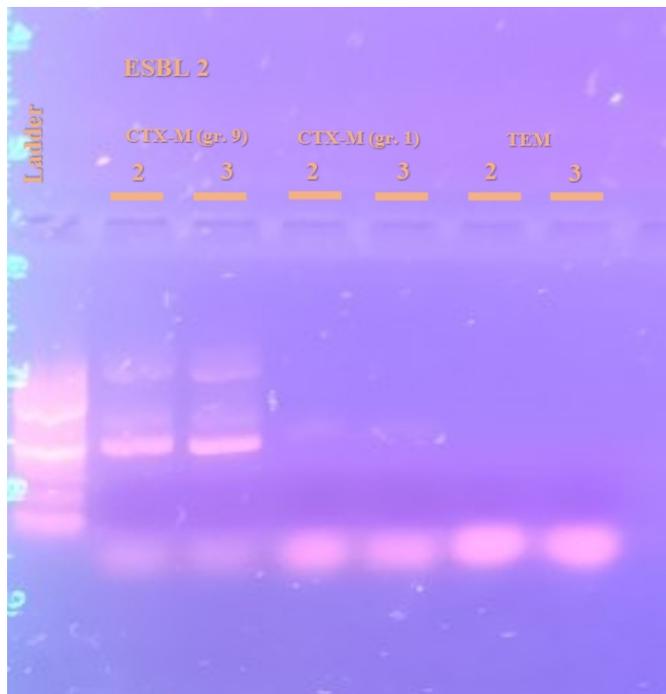
Figur 1. Gelbilde av multipleks PCR ESBL 1 (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* (gr. 2), *bla<sub>OXA</sub>* og *bla<sub>SHV</sub>*) prøve 1-6. Ingen positive DNA-bånd.



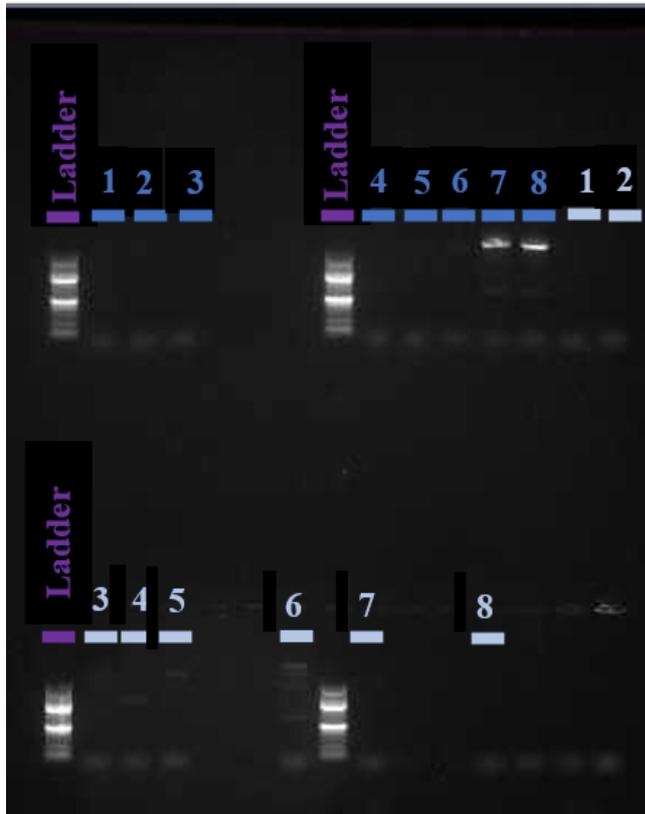
Figur 2. Gelbildet av multipleks PCR ESBL 1 (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* (gr. 2), *bla<sub>OXA</sub>* og *bla<sub>SHV</sub>*) prøve 7-8, ESBL 2 (*bla<sub>CTX-M</sub>* (gr. 9), *bla<sub>CTX-M</sub>* (gr. 1), *bla<sub>OXA</sub>* og *bla<sub>TEM</sub>*) prøve 1-8, ESBL 3 (*bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* og *bla<sub>KPC</sub>*) prøve 1-4. Prøve 2 og 3 hadde hvert sitt positive DNA-bånd i ESBL 2.



Figur 3. Gelbildet av multipleks PCR ESBL 3 ( $bla_{NDM}$ ,  $bla_{VIM}$  og  $bla_{KPC}$ ) prøve 5-8 og KONTROLL ( $RpoB$  og  $16S rRNA$ ).



Figur 4. Gelbildet av singelpleks PCR ESBL 2 ( $bla_{CTX-M (gr. 9)}$ ,  $bla_{CTX-M (gr. 1)}$  og  $bla_{TEM}$ ) prøve 2 og 3. Prøve 2 og 3 hadde hvert sitt positive DNA-bånd i singelpleks 1 med  $bla_{CTX-M (gr. 9)}$  som målgen.



Figur 5. Gelbildet av multipleks PCR for CAR 1 ( $bla_{CMY-2}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{IMP}$  og  $bla_{VIM}$ ) og CAR 2 ( $bla_{NDM}$ ,  $bla_{SFC-1}$  og  $bla_{KPC}$ ) for prøve 1-8.

Tabell 1. Samletabell som viser hvilke antibiotikaresistente gen ARMA fant i prøve 2 og 3.

Gen	Resistensmekanismer	Prøve 2	Prøve 3
16S rRNA mutasjon (ingen gener var oppgitt)	Bekrefter resistens mot edeine		
16S rRNA mutasjon i rrsC genet	Bekrefter resistens mot kasugamicin		
16S rRNA mutasjon i rrsD genet	Bekrefter resistens mot spectinomycin	Viste ikke resistens mot streptomycin	Viste ikke resistens mot streptomycin
16S rRNA mutasjon i rrnB genet	Bekrefter resistens mot tetrasykliner		
16S rRNA mutasjon i rrnB genet	Bekrefter resistens mot streptomycin og spectinomycin	Viste ikke resistens mot streptomycin	Viste ikke resistens mot streptomycin
16S rRNA mutasjon i rrsB genet	Bekrefter resistens mot streptomycin, G418, kanamycin A, tobramycin, gentamicin C, neomycin, tetrasykliner, spectinomycin og paromomycin	Viste ikke resistens mot streptomycin eller gentamicin	Viste ikke resistens mot streptomycin
16S rRNA mutasjon i rrsH genet	Bekrefter resistens mot spectinomycin	Viste ikke resistens mot streptomycin	
acrA	«multidrug» efflukspumpe gen		
acrB	«multidrug» efflukspumpe gen		
acrD	«multidrug» efflukspumpe gen		
acrE	«multidrug» efflukspumpe gen		
acrF	«multidrug» efflukspumpe gen		
acrR	«multidrug» efflukspumpe gen		
acrS	«multidrug» efflukspumpe gen		
adiY	Regulerer et syreressistent gen kalt adiA		
ACT-5	$\beta$ -laktamase		
ACT-14	$\beta$ -laktamase		
ACT-18	$\beta$ -laktamase		
ACT-21	$\beta$ -laktamase		
ACT-23	$\beta$ -laktamase		
ACT-24	$\beta$ -laktamase		
ACT-36	$\beta$ -laktamase		
alaS	Aminocoumanresistant		
arnA	Polymyxinresistens	Mulig polymyxinresistens – disk viser ofte lavere resistens	
bacA	Bacitracinresistans		
baeR	Umiddelbar nedstrøms for mdtABCD og gir multidrugresistens		

baeS	Umiddelbar nedstrøms for mdtABCD og gir multidrugresistens		
cpxA	Kopper induuerte promoter og fosfomycinresistens		
cpxR	Kopper induuerte promoter og fosfomycinresistens		
CRP	Cyclic Amp regulator protein		
CMY-55	β-laktamase		
CMY-83	β-laktamase		
CTX-M-3	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim	CTX-M bekrefter resistens mot cefotaksim. Gjelder for alle CTX-M i grønt.	
CTX-M-15	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-33	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-55	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-71	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-82	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-101	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-109	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-114	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-117	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-132	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-142	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-144	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-156	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
CTX-M-157	ESBL, høyere resistens mot cefotaksim		
cysB	Aminocoumanresistens		
EF-Tu mutant	Bekrefter resistens mot pulvomycin		
EF-Tu mutant	Bekrefter resistens mot enacyloxin IIa		
EF-Tu mutant	Bekrefter resistens mot kirromycin		
emrA	«multidrug» efflukspumpe		
emrB	«multidrug» efflukspumpe		
emrD	«multidrug» efflukspumpe		
emrK	«multidrug» efflukspumpe		
emrR	«multidrug» efflukspumpe		
emrY	«multidrug» efflukspumpe		
evgA	Aktiverer ved lav pH og alkali metaller, samt genet regulerer mange gener, inkludert de som er glutamateavhenige syreressistente systemer og en rekke efflukspumper		
evgS	Aktiverer ved lav pH og alkali metaller, samt genet regulerer mange gener, inkludert de som er glutamateavhenige syreressistente systemer og en rekke efflukspumper		
folP	Bekrefter resistens mot spectinomycin		

fyuA	Viktig i dannelse av biofilm i jernfattige miljøer		
gadE	Syreresistens		
gadX	Syreresistens		
gadW	Syreresistens		
GlpT	Bekrefter resistens mot fosfomycin		
gyrA	Bekrefter resistens mot fluorokinoloner	Viste ikke resistens mot ciprofloxacin	Viste ikke resistens mot ciprofloxacin
gyrB	Fra <i>Salmonella serovars</i> bekrefter resistens mot aminocoumarin og fluorokinoloner		
kdpE	Høy affinitet mot kalium opptakssystem		
leuO	Syre under dannelse av biofilm		
marA	«multidrug» resistans protein		
marR	«multidrug» resistans		
mdfA	«multidrug» resistans		
mdtA	«multidrug» resistans		
mdtB	«multidrug» resistans		
mdtC	«multidrug» resistans		
mdtD	«multidrug» resistans		
mdtE	«multidrug» resistans		
mdtF	«multidrug» resistans		
mdtG	«multidrug» resistans		
mdtH	«multidrug» resistans		
mdtK	«multidrug» resistans		
mdtL	«multidrug» resistans		
mdtM	«multidrug» resistans		
mdtN	«multidrug» resistans		
mdtO	«multidrug» resistans		
mdtP	«multidrug» resistans		
mexK	«multidrug» efflukspumpe		
mgrB	Vanlig mekanisme for kolistinresistens	Stammen testet ikke positivt for kolistin	Stammen testet ikke positivt for kolistin
MIR-3	$\beta$ -laktamase		
MIR-5	$\beta$ -laktamase		
MIR-6	$\beta$ -laktamase		
MIR-11	$\beta$ -laktamase		
MIR-15	$\beta$ -laktamase		
MIR-16	$\beta$ -laktamase		
mphA	Makrolidresistens	Stammen viste makrolidresistens	
Mrx	Makrolidresistens	Stammen viste makrolidresistens	Stammen viste makrolidresistens
msbA	Antibiotika efflukspumpe		

mgrB	Vanlig mekanisme for kolistinresistens	Stammen ikke resistent mot kolistin	
murA mutant	Bekrefter resistens mot fosfomycin		
omp36 mutant	Vanligvis fra <i>Enterobacter aerogenes</i>		
ompK36	Gener fra <i>Klebsiella</i> spp. bekrefter resistens mot $\beta$ -laktamase		
parC	Bekrefter resistens mot fluorokinoloner	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin
parE	Bekrefter resistens mot fluorokinoloner	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin
PhoP	Bekrefter resistens mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin
PmrB	Bekrefter resistens mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin	
PmrC	Bekrefter resistens mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin
PmrE	Bekrefter resistens mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin
PmrF	Bekrefter resistens mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin	Stammen var ikke resistent mot kolistin
QnrS1	Quinolonerresistens	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin
QnrS4	Quinolonerresistens	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	
QnrS7	Quinolonerresistens	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	
QnrS8	Quinolonerresistens	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	
QnrS9	Quinolonerresistens	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin	Stammen var ikke resistent mot ciprofloxacin
robA	Økt resistens mot mange antibiotika og organiske midler.		
rpoB mutant	Bekrefter resistens mot rifampicin		

smeD	«Multidrug» efflukspumpe		
TEM-4	$\beta$ -laktamase		
TEM-30	$\beta$ -laktamase		
TEM-59	$\beta$ -laktamase		
TEM-63	$\beta$ -laktamase		
TEM-105	$\beta$ -laktamase		
tolC	«Multidrug» efflukspumpe		
UhpT	Bekrefter resistens mot fosfomycin		
YojI	Microcin efflukstransportør		

Rosa indikerte at bakteriestammen ikke hadde genet ifølge ARMA.

Grønn indikerte at bakteriestammen hadde genet ifølge ARMA.

Tabell 1. Oversikt over alle ARG som var tilstede i *E. coli* stammene som vokst på skål 2 (*Cec\_1*) og 3 (*Cec\_2*)

GENE	ACCESSION	% Sim	Coverage	Contig	Position	Strain	COMMENT
aatA (Anti aggregation protein transporter)	AY351860	92.25	1239 / 1239	tig00000019	121940..123166	<b>Cec_1</b>	Part of aaT cluster: The aat cluster encodes a specialized ABC transporter, which plays a role in the pathogenesis of EAEC by transporting dispersin out of the bacterial cell.
aatD	CP003291	90.34	1211 / 1212	tig00000019	119401..120598	<b>Cec_1</b>	Part of aaT cluster: The aat cluster encodes a specialized ABC transporter, which plays a role in the pathogenesis of EAEC by transporting dispersin out of the bacterial cell.
aatP	CP003291	92.84	1132 / 1131	tig00000019	123163..124289	<b>Cec_1</b>	Part of aaT cluster: The aat cluster encodes a specialized ABC transporter, which plays a role in the pathogenesis of EAEC by transporting dispersin out of the bacterial cell.
AcrA	NC_000913	99.58	1194 / 1194	tig00000001	2218905..222009 6	<b>Cec_1</b>	AcrA is the periplasmic lipoprotein component of the AcrAB-TolC and AcrAD-TolC multidrug efflux pumps in <i>Escherichia coli</i>
AcrA	NC_000913	99.50	1194 / 1194	tig00000001	1751132..175232 3	<b>Cec_2</b>	
AcrA	NC_000913	98.66	1194 / 1194	tig00000001	994865..996057 1042591..104378	<b>Oda_1</b>	
AcrA	NC_000913	98.58	1194 / 1194	tig00000004	2	<b>Oda_2</b>	
aec77 (yeeW-like protein)	NZ_CP023820	98.36	489 / 489	tig00000001	168986..169471	<b>Cec_1</b>	Similarity to YeeW YeeW-Uncharacterized protein is encoded by the CP4-44 prophage in K-12
aec77 (yeeW-like protein)	NZ_CP023820	98.57	489 / 489	tig00000001	4838316..483880 2	<b>Cec_2</b>	
aec77 (yeeW-like protein)	NZ_CP023820	95.89	341 / 489	tig00000001	3932966..393330 5	<b>Oda_1</b>	
aec77 (yeeW-like protein)	NZ_CP023820	95.89	341 / 489	tig00000001	2102606..210294 5	<b>Oda_2</b>	
air (Enteroaggregative Immunoglobulin Repeat protein)	CP003034	93.96	5179 / 5192	tig00000001	4679085..468425 0	<b>Oda_1</b>	inverse autotransporter beta-barrel domain-containing protein
air (Enteroaggregative Immunoglobulin Repeat protein)	CP003034	93.90	5179 / 5192	tig00000001	2847014..285217 6	<b>Oda_2</b>	
AmpC	BA000007	97.80	1134 / 1134	tig00000001	1469730..147085 8	<b>Cec_1</b>	Beta-lactamase (chromosomal)
AmpC	BA000007	97.44	1134 / 1134	tig00000001	1002061..100318 4	<b>Cec_2</b>	
antigen43	NZ_NKOF010 00084	97.69	3120 / 3120	tig00000001	294517..297619	<b>Oda_1</b>	Antigen 43 (Ag43) is an abundant outer membrane protein in <i>Escherichia coli</i> belonging to the autotransporter adhesin family.
antigen43	NZ_NKOF010 00084	97.34	3120 / 3120	tig00000004	343237..346330	<b>Oda_2</b>	

Antigen43-A	AE014075	96.87	3130 / 3129	tig00000001	153815..156930 4823149..482626	<b>Cec_1</b>	Ag43a (but not Ag43b) promoted long-term persistence in the urinary bladder
Antigen43-A	AE014075	96.93	3129 / 3129	tig00000001	5	<b>Cec_2</b>	
asIA (arylsulfatase)	CU928163	92.92	1652 / 1656	tig00000001	1075342..107698 6	<b>Cec_1</b>	Escherichia coli K1 asIA Contributes to Invasion of Brain Microvascular Endothelial Cells In Vitro and In Vivo
asIA (arylsulfatase)	CU928163	92.92	1652 / 1656	tig00000001	607739..609385 4835768..483741	<b>Cec_2</b>	
asIA (arylsulfatase)	CU928163	99.34	1656 / 1656	tig00000001	5 3003391..300503	<b>Oda_1</b>	
asIA (arylsulfatase)	CU928163	99.09	1656 / 1656	tig00000001	5	<b>Oda_2</b>	
atoC	NC_011751	97.69	1386 / 1386	tig00000005	234182..235558 3951685..395306	<b>Cec_1</b>	acetoacetate metabolism two-component system response regulator AtoC [ Escherichia coli UMN026 ]
atoC	NC_011751	97.76	1386 / 1386	tig00000001	2 3081615..308299	<b>Cec_2</b>	
atoC	NC_011751	99.13	1386 / 1386	tig00000001	2 1253946..125531	<b>Oda_1</b>	
atoC	NC_011751	98.48	1386 / 1386	tig00000001	3	<b>Oda_2</b>	
atoE	NC_011751	98.72	1323 / 1323	tig00000005	237056..238375 3954561..395588	<b>Cec_1</b>	short chain fatty acid transporter [ Escherichia coli UMN026 ], positive in EPEC1 and negative in EPEC2
atoE	NC_011751	98.79	1323 / 1323	tig00000001	1 3084489..308580	<b>Cec_2</b>	
atoE	NC_011751	99.62	1323 / 1323	tig00000001	7 1256803..125811	<b>Oda_1</b>	
atoE	NC_011751	98.87	1324 / 1323	tig00000001	4	<b>Oda_2</b>	
atoS	NC_011751	97.81	1827 / 1827	tig00000005	232365..234185 3949868..395168	<b>Cec_1</b>	two-component system sensor histidine kinase AtoS [ Escherichia coli UMN026 ]
atoS	NC_011751	97.76	1827 / 1827	tig00000001	8 3079800..308161	<b>Cec_2</b>	
atoS	NC_011751	99.12	1827 / 1827	tig00000001	8 1252131..125394	<b>Oda_1</b>	
atoS	NC_011751	99.18	1827 / 1827	tig00000001	9	<b>Oda_2</b>	
Auto-Transporter gene	NZ_KE701455	96.02	2664 / 2664	tig00000001	3167554..317018 1 2698634..270125	<b>Cec_1</b>	/product="autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein"
Auto-Transporter gene	NZ_KE701455	96.12	2653 / 2664	tig00000001	2 1847135..184977	<b>Cec_2</b>	From strain: Escherichia coli UMEA 3033-1
Auto-Transporter gene	NZ_KE701455	98.72	2664 / 2664	tig00000001	9	<b>Oda_1</b>	
Auto-Transporter gene	NZ_KE701455	98.79	2653 / 2664	tig00000001	24242..26877	<b>Oda_2</b>	

BapA-domain Containing Protein	NZ_AYOG01 000034	94.74	20781 / 20778	tig00000001	1025060..104576 3	<b>Oda_1</b>	BapA prefix-like domain-containing protein, position similarity with Beta1-2glucan plasmid gene from FHI_NMBU_03 Plasmid Biofilm-associated protein (bapA), a large surface protein has been shown to play a leading role in the development of biofilm in Salmonella.
BapA-domain Containing Protein	NZ_AYOG01 000034	94.77	20781 / 20778	tig00000004	1072646..109334 7	<b>Oda_2</b>	
Bcr	CP027060	99.83	1184 / 1191	tig00000005	192275..193457 3909803..391098	<b>Cec_1</b>	Involved in sulfonamide (sulfathiazole) and bicyclomycin resistance
Bcr	CP027060	99.92	1184 / 1191	tig00000001	6 3040433..304162	<b>Cec_2</b>	
Bcr	CP027060	96.81	1191 / 1191	tig00000001	0 1212861..121403	<b>Oda_1</b>	
Bcr	CP027060	96.94	1178 / 1191	tig00000001	6	<b>Oda_2</b>	
BlaAMPH	AP012030	97.58	1158 / 1158	tig00000001	2128816..212996 1	<b>Cec_1</b>	AmpH binds strongly to penicillin G, cefoxitin, and cephalosporin C; is temperature sensitive; and disappears from cells after overnight incubation in stationary phase.
BlaAMPH	AP012030	97.93	1158 / 1158	tig00000001	1661058..166220 6	<b>Cec_2</b>	
BlaAMPH	AP012030	95.42	1158 / 1158	tig00000001	902500..903644	<b>Oda_1</b>	
BlaAMPH	AP012030	95.51	1158 / 1158	tig00000004	950468..951614	<b>Oda_2</b>	
blaEC family C-type betalactamase (AmpC)	NZ_ADIK010 00065	97.97	1134 / 1134	tig00000001	127443..128571	<b>Oda_1</b>	BlaEC family class C beta-lactamase from Escherichia coli M056
blaEC family C-type betalactamase (AmpC)	NZ_ADIK010 00065	97.18	1134 / 1134	tig00000004	176848..177967	<b>Oda_2</b>	
casI	BA000007	96.75	924 / 924	tig00000001	3644641..364556 4	<b>Oda_1</b>	CRISPR-associated endonuclease
casI	BA000007	96.32	925 / 924	tig00000001	1815115..181603 4	<b>Oda_2</b>	
casA	BA000007	94.95	1563 / 1563	tig00000001	3648534..365009 0	<b>Oda_1</b>	CRISPR system Cascade subunit
casA	BA000007	94.75	1563 / 1563	tig00000001	1818998..182055 3	<b>Oda_2</b>	
casE CRISPR- associated Protein	BA000007	97.47	789 / 789	tig00000001	3645561..364634 3	<b>Oda_1</b>	CRISPR-associated protein Cas6/Cse3/CasE, locus_tag="ECs_3610"
casE CRISPR- associated Protein	BA000007	96.83	789 / 789	tig00000001	1816031..181681 1	<b>Oda_2</b>	
chuA	CP025573	98.18	1983 / 1983	tig00000001	4470578..447255 4	<b>Oda_1</b>	Outer membrane hemin receptor any two of yfcV, vat, or chuA along with fyuA could be used to differentiate UPEC from DEC, human commensal, or animal commensal isolates. However, to differentiate UPEC from APEC, vat, fyuA, and yfcV together are necessary.
chuA	CP025573	97.98	1983 / 1983	tig00000001	2638740..264071 2	<b>Oda_2</b>	
cirA	CP030337	98.83	1026 / 1026	tig00000005	157555..158575	<b>Cec_1</b>	Ferric iron-catechol outer membrane transporter

cirA	CP030337	98.83	1026 / 1026	tig00000001	3875094..387611 5	<b>Cec_2</b>	
cirA	CP018206	98.13	1980 / 1980	tig00000001	3006793..300876 0	<b>Oda_1</b>	
cirA	CP018206	98.08	1981 / 1980	tig00000001	1179309..118127 6	<b>Oda_2</b>	
class-1 integron Integrase	CP031216	98.50	667 / 944	tig00000017	67199..67861	<b>Oda_1</b>	Integron integrase class I
class-1 integron Integrase	CP031216	98.65	667 / 944	tig00000014	35374..36038	<b>Oda_2</b>	
copA	CP027060	99.20	2505 / 2505	tig00000001	2243232..224572 3	<b>Cec_1</b>	Copper-exporting P-type ATPase
copA	CP027060	99.32	2505 / 2505	tig00000001	1775467..177796 0	<b>Cec_2</b>	
copA	CP027060	95.85	2505 / 2505	tig00000001	1018291..102078 5	<b>Oda_1</b>	
copA	CP027060	95.73	2505 / 2505	tig00000004	1066007..106850 1	<b>Oda_2</b>	
csgA	BA000007	92.76	442 / 459	tig00000001	3016247..301668 5	<b>Cec_1</b>	Major curlin subunit
csgA	BA000007	92.76	442 / 459	tig00000001	2548648..254908 6	<b>Cec_2</b>	
csgA	NC_007946	99.12	456 / 456	tig00000001	1651465..165192 0	<b>Oda_1</b>	Major curlin subunit
csgA	NC_007946	99.12	456 / 456	tig00000004	1697624..169807 9	<b>Oda_2</b>	
csgB	CP027060	98.90	456 / 456	tig00000001	3015757..301620 7	<b>Oda_1</b>	Minor curlin subunit
csgB	CP027060	98.89	452 / 456	tig00000001	1650974..165142 4	<b>Oda_2</b>	
csgB	CP000800	98.55	483 / 483	tig00000001	2548129..254860 7	<b>Cec_1</b>	Minor curlin subunit
csgB	CP000800	97.51	482 / 483	tig00000004	1697110..169758 4	<b>Cec_2</b>	
csgE	NC_011750	98.97	390 / 390	tig00000001	3013977..301436 5	<b>Cec_1</b>	Curli production assembly/transport component
csgE	NC_011750	98.72	390 / 390	tig00000001	2546375..254676 2	<b>Cec_2</b>	
csgE	NC_011750	98.97	390 / 390	tig00000001	1649196..164958 1	<b>Oda_1</b>	
csgE	NC_011750	99.23	390 / 390	tig00000004	1695360..169574 6	<b>Oda_2</b>	

csgF	NC_011750	97.60	417 / 417	tig00000001	3013538..301395	<b>Cec_1</b>	Curli production assembly/transport component
csgF	NC_011750	97.60	417 / 417	tig00000001	2545936..254635	<b>Cec_2</b>	
csgF	NC_011750	98.32	417 / 417	tig00000001	1648757..164917	<b>Oda_1</b>	
csgF	NC_011750	98.08	417 / 417	tig00000004	1694922..169533	<b>Oda_2</b>	
csgG	LT903847	98.56	834 / 834	tig00000001	3012678..301351	<b>Cec_1</b>	Curli production assembly/transport component
csgG	LT903847	98.32	834 / 834	tig00000001	2545079..254590	<b>Cec_2</b>	
csgG	LT903847	98.80	834 / 834	tig00000001	1647897..164873	<b>Oda_1</b>	
csgG	LT903847	98.80	834 / 834	tig00000004	1694063..169489	<b>Oda_2</b>	
cusA	NZ_NMMD01 000001	97.04	3144 / 3144	tig00000001	2322100..232523	<b>Cec_1</b>	/product="Cu(+)/Ag(+) efflux RND transporter permease subunit CusA", copper/silver resistance /chicken liver isolate
cusA	NZ_NMMD01 000001	97.14	3144 / 3144	tig00000001	1854344..185747	<b>Cec_2</b>	
cusA	NZ_NMMD01 000001	97.68	3144 / 3144	tig00000001	1167470..117059	<b>Oda_1</b>	
cusA	NZ_NMMD01 000001	97.52	3144 / 3144	tig00000004	1214693..121782	<b>Oda_2</b>	
CvaA colicin-V secretion protein	GG773553	96.93	1236 / 1242	tig00000001	512970..514195	<b>Cec_1</b>	
CvaA colicin-V secretion protein	GG773553	96.93	1236 / 1242	tig00000001	45525..46751	<b>Cec_2</b>	Colicin V secretion protein Colicin V (ColV) is a peptide antibiotic that kills sensitive cells by disrupting their membrane potential
CvaA colicin-V secretion protein	GG773553	97.67	1242 / 1242	tig00000001	4249294..425052	<b>Oda_1</b>	
CvaA colicin-V secretion protein	GG773553	97.34	1242 / 1242	tig00000001	2417957..241918	<b>Oda_2</b>	
deoK	FJ999998	99.24	921 / 921	tig00000001	1587218..158813	<b>Cec_1</b>	
deoK	FJ999998	99.35	921 / 921	tig00000001	1119534..112045	<b>Cec_2</b>	deoxyribokinase, the deoK operon is more common among pathogenic than commensal Escherichia coli strains
DUF3987-domain Protein	NZ_BGQI010 00015	98.61	1509 / 1509	tig00000001	149822..151320	<b>Cec_1</b>	/product="DUF3987 domain-containing protein" A family of uncharacterized proteins found by clustering human gut metagenomic sequences.
DUF3987-domain Protein	NZ_BGQI010 00015	98.34	1509 / 1509	tig00000001	4819164..482065	<b>Cec_2</b>	
DUF3987-domain Protein	NZ_BGQI010 00015	93.47	1363 / 1509	tig00000001	290697..292045	<b>Oda_1</b>	

DUF3987-domain Protein	NZ_BGQI01000015	93.19	1381 / 1509	tig00000004	339400..340766	<b>Oda_2</b>	
eaeH	CU928161	93.93	4233 / 4251	tig00000001	2046296..205051	<b>Cec_1</b>	EaeH shares 95% identity with FdeC, Putative attaching and effacing protein homolog
eaeH	CU928161	93.81	4233 / 4251	tig00000001	1578681..158289	<b>Cec_2</b>	
EAST1-toxin (astA)	AF143819	100.00	117 / 117	tig00000019	44644..44760	<b>Cec_1</b>	enterotoxin; EAST1
EAST1-toxin (astA)	AF143819	100.00	117 / 117	tig00000013	68593..68709	<b>Cec_2</b>	From strain enterotoxigenic 27D
ecotin	CP025268	99.52	419 / 419	tig00000005	216376..216792	<b>Cec_1</b>	General inhibitor of pancreatic serine proteases: inhibits chymotrypsin, trypsin, elastases, factor X, kallikrein as well as a variety of other proteases
ecotin	CP025268	99.76	419 / 419	tig00000001	3933907..393432	<b>Cec_2</b>	
ecotin	CP025268	97.14	419 / 419	tig00000001	4	<b>Oda_1</b>	
ecotin	CP025268	96.90	419 / 419	tig00000001	3064379..306479	<b>Oda_2</b>	
ecotin	CP025268	97.14	419 / 419	tig00000001	6	<b>Oda_1</b>	
ecotin	CP025268	96.90	419 / 419	tig00000001	1236723..123713	<b>Oda_2</b>	
ecpA common pilus	BA000007	97.91	573 / 588	tig00000001	807594..808163	<b>Oda_1</b>	Common pilus major fimbriin subunit EcpA
ecpA common pilus	BA000007	97.95	584 / 588	tig00000004	855661..856239	<b>Oda_2</b>	From strain: Escherichia coli O157:H7 (EHEC) Sakai
ecpB	NZ_QOON01000045	99.40	669 / 669	tig00000001	2041333..204200	<b>Cec_1</b>	/product="fimbrial chaperone EcpB" /isolation_source="surface water" /country="USA: St. Louis Clyde watershed of Lake Superior"
ecpB	NZ_QOON01000045	99.40	669 / 669	tig00000001	1573718..157438	<b>Cec_2</b>	
ecpB	NZ_QOON01000045	97.76	669 / 669	tig00000001	5	<b>Oda_1</b>	
ecpB	NZ_QOON01000045	97.76	669 / 669	tig00000004	806864..807527	<b>Oda_2</b>	
EcpD	CP019777	98.84	1644 / 1644	tig00000001	854940..855605	<b>Oda_1</b>	Common pilus fimbria adhesin EcpD
EcpD	CP019777	98.48	1644 / 1644	tig00000004	802707..804345	<b>Oda_2</b>	From strain Escherichia coli NU14 (UPEC)
ecpD	NZ_UASG01000005	98.78	1644 / 1644	tig00000001	2037174..203880	<b>Cec_1</b>	Common pilus fimbria adhesin EcpD
ecpD	NZ_UASG01000005	98.97	1644 / 1644	tig00000001	1569554..157119	<b>Cec_2</b>	From strain Escherichia coli NCTC10279
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	98.01	602 / 606	tig00000005	931399..931996	<b>Cec_1</b>	An ETT2 gene from Escherichia coli O157:H7 str. Sakai
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	98.01	602 / 606	tig00000001	4648826..464942	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	96.51	602 / 606	tig00000001	4	<b>Oda_1</b>	
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	96.51	602 / 606	tig00000001	3781444..378204	<b>Oda_2</b>	
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	96.51	602 / 606	tig00000001	1	<b>Oda_1</b>	
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	96.51	602 / 606	tig00000001	1951463..195206	<b>Oda_2</b>	
ECs3737 (ETT2)	NC_002695	96.51	602 / 606	tig00000001	0	<b>Oda_2</b>	

ehaB	BA000007	95.34	3753 / 3753	tig00000005	252641..256365	<b>Cec_1</b>	The Escherichia coli O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle
ehaB	BA000007	95.42	3753 / 3753	tig00000001	3970162..397389	<b>Cec_2</b>	
eilA (hilA homologue)	CP023364	97.88	1698 / 1698	tig00000001	4672278..467396	<b>Oda_1</b>	invasion protein regulator HilA
eilA (hilA homologue)	CP023364	97.88	1698 / 1698	tig00000001	2840212..284189	<b>Oda_2</b>	
eivC (ETT2)	KU684470	97.80	1321 / 1320	tig00000001	3772885..377419	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eivC (ETT2)	KU684470	98.03	1320 / 1320	tig00000001	1942924..194423	<b>Oda_2</b>	
eivF (ETT2)	NC_002695	98.38	742 / 750	tig00000001	3779072..377981	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eivF (ETT2)	NC_002695	97.84	742 / 750	tig00000001	1949098..194983	<b>Oda_2</b>	
eivG (ETT2)	NC_002695	95.95	1704 / 1704	tig00000001	3777381..377906	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eivG (ETT2)	NC_002695	95.72	1704 / 1704	tig00000001	1947411..194909	<b>Oda_2</b>	
eivH (ETT2)	DQ077151	98.64	294 / 294	tig00000005	936904..937197	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eivH (ETT2)	DQ077151	98.30	294 / 294	tig00000001	4654396..465468	<b>Cec_2</b>	
eivH (ETT2)	DQ077151	96.62	296 / 294	tig00000001	3767510..376780	<b>Oda_1</b>	
eivH (ETT2)	DQ077151	97.28	294 / 294	tig00000001	1937538..193783	<b>Oda_2</b>	
eivI (ETT2)	KU684470	95.55	427 / 426	tig00000001	3772484..377290	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eivI (ETT2)	KU684470	96.49	427 / 426	tig00000001	1942519..194294	<b>Oda_2</b>	
eivJ (ETT2)	KU684470	93.39	348 / 348	tig00000001	3771599..377194	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eivJ (ETT2)	KU684470	94.83	348 / 348	tig00000001	1941633..194198	<b>Oda_2</b>	
elaD	NC_011750	93.98	1197 / 1209	tig00000005	315095..316279	<b>Cec_1</b>	ElaD is a moderately active deubiquitinating protease
elaD	NC_011750	94.15	1197 / 1209	tig00000001	4032628..403381	<b>Cec_2</b>	
elaD	NC_011750	96.53	1209 / 1209	tig00000001	3145157..314635	<b>Oda_1</b>	

elaD	NC_011750	96.36	1209 / 1209	tig00000001	1317351..131854 2	<b>Oda_2</b>	
elfG	CP011134	99.07	1071 / 1071	tig00000001	2787582..278864 6	<b>Cec_1</b>	putative fimbrial-like protein
elfG	CP011134	98.97	1071 / 1071	tig00000001	2319897..232096 1	<b>Cec_2</b>	
entA	CP027060	99.33	747 / 747	tig00000001	2351799..235254 0	<b>Cec_1</b>	Involved in the biosynthesis of the siderophore enterobactin (enterochelin)
entA	CP027060	99.60	741 / 747	tig00000001	1884034..188477 3	<b>Cec_2</b>	
entA	CP027060	95.58	747 / 747	tig00000001	1196849..119759 4	<b>Oda_1</b>	
entA	CP027060	95.45	747 / 747	tig00000004	1244059..124480 3	<b>Oda_2</b>	
entE	CP027060	99.44	1611 / 1611	tig00000001	2349328..235093 1	<b>Cec_1</b>	Involved in the biosynthesis of the siderophore enterobactin (enterochelin)
entE	CP027060	99.50	1611 / 1611	tig00000001	1881559..188316 4	<b>Cec_2</b>	
entE	CP027060	95.10	1611 / 1611	tig00000001	1194375..119598 0	<b>Oda_1</b>	
entE	CP027060	95.03	1611 / 1611	tig00000004	1241587..124319 0	<b>Oda_2</b>	
entH	CP027060	99.76	414 / 414	tig00000001	2352543..235295 6	<b>Cec_1</b>	Involved in the biosynthesis of the siderophore enterobactin (enterochelin)
entH	CP027060	99.76	414 / 414	tig00000001	1884781..188519 4	<b>Cec_2</b>	
entH	CP027060	95.65	414 / 414	tig00000001	1197597..119801 0	<b>Oda_1</b>	
entH	CP027060	95.57	406 / 414	tig00000004	1244813..124521 8	<b>Oda_2</b>	
epaO (ETT2)	KU684470	97.36	948 / 948	tig00000005	933148..934082 4650595..465153	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
epaO (ETT2)	KU684470	98.21	948 / 948	tig00000001	6 3770662..377159	<b>Cec_2</b>	
epaO (ETT2)	KU684470	92.09	948 / 948	tig00000001	9 1940696..194163	<b>Oda_1</b>	
epaO (ETT2)	KU684470	92.30	948 / 948	tig00000001	3	<b>Oda_2</b>	
epaP ECs3725 (ETT2)	NC_002695	95.80	667 / 666	tig00000005	934072..934724 4651526..465218	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
epaP ECs3725 (ETT2)	NC_002695	97.75	666 / 666	tig00000001	8 3770011..377067	<b>Cec_2</b>	
epaP ECs3725 (ETT2)	NC_002695	97.45	666 / 666	tig00000001	2	<b>Oda_1</b>	

epaP ECs3725 (ETT2)	NC_002695	97.75	666 / 666	tig00000001	1940043..194070 6	<b>Oda_2</b>	
epaQ (ETT2)	NC_002695	94.21	242 / 261	tig00000005	934746..934980 4652197..465245	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
epaQ (ETT2)	NC_002695	94.64	261 / 261	tig00000001	2 3769746..377000	<b>Cec_2</b>	
epaQ (ETT2)	NC_002695	94.64	261 / 261	tig00000001	1 1939776..194003	<b>Oda_1</b>	
epaQ (ETT2)	NC_002695	95.40	261 / 261	tig00000001	3	<b>Oda_2</b>	
epaR (ETT2)	KU684470	95.54	762 / 768	tig00000005	934992..935742 4652460..465321	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
epaR (ETT2)	KU684470	96.59	762 / 768	tig00000001	7 3768985..376973	<b>Cec_2</b>	
epaR (ETT2)	KU684470	95.62	754 / 768	tig00000001	3 1939014..193977	<b>Oda_1</b>	
epaR (ETT2)	KU684470	95.67	763 / 768	tig00000001	0	<b>Oda_2</b>	
epaS1 (ETT2)	KU684470	92.74	468 / 468	tig00000005	935751..936189 3768552..376897	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
epaS1 (ETT2)	KU684470	94.41	429 / 468	tig00000001	6 1938550..193900	<b>Oda_1</b>	
epaS1 (ETT2)	KU684470	93.16	468 / 468	tig00000001	5	<b>Oda_2</b>	
epaS2 (ETT2)	KU684470	98.88	358 / 363	tig00000005	936484..936838 4653974..465433	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
epaS2 (ETT2)	KU684470	99.44	358 / 363	tig00000001	0 3767864..376822	<b>Cec_2</b>	
epaS2 (ETT2)	KU684470	94.77	363 / 363	tig00000001	4 1937891..193825	<b>Oda_1</b>	
epaS2 (ETT2)	KU684470	94.77	363 / 363	tig00000001	2	<b>Oda_2</b>	
eprH (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	94.56	1140 / 1191	tig00000005	937948..939079	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eprH (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	94.52	1187 / 1191	tig00000001	4655439..465661 6	<b>Cec_2</b>	
eprH (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	97.98	1191 / 1191	tig00000001	3765587..376676 1	<b>Oda_1</b>	
eprH (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	99.16	1191 / 1191	tig00000001	1935605..193678 7	<b>Oda_2</b>	

EprI (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_002695	99.17	240 / 240	tig00000005	939126..939364	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
EprI (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_002695	99.17	240 / 240	tig00000001	4656630..4656868	<b>Cec_2</b>	
EprI (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_002695	98.33	240 / 240	tig00000001	3765334..3765573	<b>Oda_1</b>	
EprI (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_002695	98.33	240 / 240	tig00000001	1935352..1935591	<b>Oda_2</b>	
EprJ (putative type-III secretion component) (ETT2)	KU684470	97.30	333 / 333	tig00000001	4656888..4657219	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
EprJ (putative type-III secretion component) (ETT2)	KU684470	97.90	333 / 333	tig00000001	3764987..3765315	<b>Oda_1</b>	
EprJ (putative type-III secretion component) (ETT2)	KU684470	98.80	333 / 333	tig00000001	1935001..1935332	<b>Oda_2</b>	
eprK (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	95.42	698 / 735	tig00000001	4657216..4657912	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
eprK (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	100.00	727 / 735	tig00000001	3764264..3764990	<b>Oda_1</b>	
eprK (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	99.72	727 / 735	tig00000001	1934280..1935004	<b>Oda_2</b>	
espC	CXML01000068	98.47	523 / 570	tig00000019	35110..35628	<b>Cec_1</b>	/product="serine protease EatA" /locus_tag="ERS153606_02707" /gene="espC"
espC	CXML01000068	98.66	523 / 570	tig00000013	77718..78236	<b>Cec_2</b>	(Shigella sonnei)
espL2/shET2 effector toxin	NC_002655	96.68	1899 / 1899	tig00000001	3890754..3892638	<b>Cec_1</b>	ShET2/EspL2 family type III secretion system effector toxin [Escherichia coli] /locus_tag="Z_RS12905"
espL2/shET2 effector toxin	NC_002655	96.95	1899 / 1899	tig00000001	3421944..3423829	<b>Cec_2</b>	
espL2/shET2 effector toxin	NC_002655	95.84	1899 / 1899	tig00000001	2464719..2466603	<b>Oda_1</b>	
espL2/shET2 effector toxin	NC_002655	95.84	1899 / 1899	tig00000001	638921..640803	<b>Oda_2</b>	
							From: Escherichia coli O157:H7 str. EDL933 genome

espL2/ShET2-family effector toxin	NZ_AYOG01 000052	97.30	2187 / 2187	tig00000001	5075641..507781 5	<b>Oda_1</b>	/product="ShET2/EspL2 family type III secretion system effector toxin"
espL2/ShET2-family effector toxin	NZ_AYOG01 000052	97.03	2187 / 2187	tig00000004	22699..24867	<b>Oda_2</b>	From: Escherichia coli LAU-EC5
espR1	BA000007	93.46	1055 / 1260	tig00000001	3528489..352953 8	<b>Cec_1</b>	Non-LEE-encoded type III secreted effector
espR1	BA000007	93.46	1055 / 1260	tig00000001	3059533..306058 2	<b>Cec_2</b>	
espR1	BA000007	93.61	1251 / 1260	tig00000001	2169918..217116 3	<b>Oda_1</b>	
espR1	BA000007	93.53	1251 / 1260	tig00000001	345818..347060 4	<b>Oda_2</b>	
espR2 (T3SS effector-like protein)	BA000007	94.46	505 / 504	tig00000001	2171974..217247 4	<b>Oda_1</b>	O-I (O-island) 62 effector gene, predicted non-LEE-encoded type III secreted effector
espR2 (T3SS effector-like protein)	BA000007	94.46	505 / 504	tig00000001	347874..348373 4	<b>Oda_2</b>	
espX1	CP003034	93.32	1422 / 1422	tig00000001	1726086..172749 4	<b>Cec_1</b>	putative type III secreted effector
espX1	CP003034	93.18	1422 / 1422	tig00000001	1258350..125975 6	<b>Cec_2</b>	
espX1	CP003034	96.42	1423 / 1422	tig00000001	472675..474088 4	<b>Oda_1</b>	
espX1	CP003034	96.27	1422 / 1422	tig00000004	521252..522659 4	<b>Oda_2</b>	
espX4	NC_017646	96.40	1528 / 1539	tig00000001	1342214..134373 4	<b>Cec_1</b>	E. coli Type III secretion effector protein
espX4	NC_017646	96.27	1528 / 1539	tig00000001	874566..876084 5	<b>Cec_2</b>	
espX4	NC_017646	98.38	1232 / 1539	tig00000001	5110165..511139 0	<b>Oda_1</b>	
espX4	NC_017646	98.24	1532 / 1539	tig00000001	7571..9091 4	<b>Oda_1</b>	
espX4	NC_017646	98.56	1532 / 1539	tig00000004	57073..58598 4	<b>Oda_2</b>	
espX5	NC_013008	96.04	1289 / 1293	tig00000001	1373081..137436 5	<b>Cec_1</b>	
espX5	NC_013008	95.89	1289 / 1293	tig00000001	905410..906692 4	<b>Cec_2</b>	Effector protein translocated by the type III secretion system. Twelve virulence genes were significantly less common in ST131 isolates (p value < 0.05), including four genes (entD, espX1, espX5 and espL1) present in over 79% of non-ST131 isolates but absent in ST131 isolates
espX5	NC_013008	95.42	1289 / 1293	tig00000001	38584..39867 4	<b>Oda_1</b>	
espX5	NC_013008	95.42	1289 / 1293	tig00000004	88105..89387 4	<b>Oda_2</b>	
espY1	NC_002695	92.23	631 / 753	tig00000001	1765608..176623 0	<b>Cec_1</b>	
espY1	NC_002695	92.05	616 / 753	tig00000001	1297858..129846 6	<b>Cec_2</b>	T3SS effector-like protein EspY

espY1	NC_002695	91.64	586 / 753	tig00000001	512129..512708	<b>Oda_1</b>	
espY1	NC_002695	91.64	586 / 753	tig00000004	560670..561250	<b>Oda_2</b>	
espY3	NC_002695	95.42	1572 / 1572	tig00000001	946135..947701	<b>Oda_1</b>	T3SS effector-like protein EspY
espY3	NC_002695	95.36	1572 / 1572	tig00000004	994054..995619	<b>Oda_2</b>	
espY4	NC_002695	95.37	2398 / 2409	tig00000001	4746513..474888 6	<b>Oda_1</b>	/product="T3SS effector-like protein EspY"
espY4	NC_002695	95.25	2398 / 2409	tig00000001	2914466..291683 6	<b>Oda_2</b>	
etrA (ETT2)	KU684467	96.61	501 / 501	tig00000005	937199..937698	<b>Cec_1</b>	Escherichia coli type III secretion system 2 regulator EtrA promotes virulence of avian pathogenic Escherichia coli
etrA (ETT2)	KU684467	96.61	501 / 501	tig00000001	4654690..465518 9	<b>Cec_2</b>	
etrA (ETT2)	KU684467	99.00	501 / 501	tig00000001	3767011..376750 8	<b>Oda_1</b>	
etrA (ETT2)	KU684467	99.60	501 / 501	tig00000001	1937036..193753 6	<b>Oda_2</b>	
evfA (T6SS gene)	JN837480	92.29	480 / 480	tig00000001	689879..690356	<b>Oda_1</b>	Hcp-like protein, part of T6SS gene cluster
evfA (T6SS gene)	JN837480	91.67	480 / 480	tig00000004	738079..738555	<b>Oda_2</b>	Hcp (hemolysin-coregulated protein) is considered a vital component of the functional T6SS (Type VI Secretion System)
evfC (macrophageToxin)	JN837480	97.45	3016 / 3018	tig00000001	691739..694738	<b>Oda_1</b>	putative macrophage toxin, IcmF-like protein, part of T6SS gene cluster IcmF functions to assemble and stabilize the complex responsible for the secretion of virulence factors
evfC (macrophageToxin)	JN837480	97.45	3016 / 3018	tig00000004	739934..742931	<b>Oda_2</b>	
evfQ	JN837480	94.68	1842 / 1842	tig00000001	705108..706941	<b>Oda_1</b>	hypothetical protein, part of T6SS gene cluster
evfQ	JN837480	94.68	1842 / 1842	tig00000004	753281..755111	<b>Oda_2</b>	
evfW	JN837480	92.77	1591 / 1983	tig00000001	2150955..215253 0	<b>Oda_1</b>	part of T6SS gene cluster
evfW	JN837480	94.89	1468 / 1983	tig00000001	710800..712253	<b>Oda_1</b>	
evfW	JN837480	93.34	1591 / 1983	tig00000001	326836..328416	<b>Oda_2</b>	
evfW	JN837480	94.89	1468 / 1983	tig00000004	758971..760423	<b>Oda_2</b>	
fdeC	NZ_QOON01 000045	94.40	4250 / 4254	tig00000001	818137..822366	<b>Oda_1</b>	/product="intimin-like adhesin FdeC" /isolation_source="surface water" /country="USA: St. Louis Clyde watershed of Lake Superior"
fdeC	NZ_QOON01 000045	94.28	4250 / 4254	tig00000004	866189..870415	<b>Oda_2</b>	
fecA	NC_011751	99.48	2325 / 2325	tig00000001	275543..277861	<b>Oda_1</b>	outer membrane ferri-siderophore receptor, an E. coli 83972 isolate during deliberate bladder colonization lost genes for the aerobactin siderophore system, which is immunogenic, while expression of the ferric citrate receptor FecA was upregulated

fecA	NC_011751	99.44	2325 / 2325	tig00000004	324261..326578	<b>Oda_2</b>	
feoB	CP019777	97.15	2318 / 2322	tig00000001	4331057..433337 0	<b>Oda_1</b>	FeoB is a ferrous iron uptake system which is active under anaerobic growth conditions
feoB	CP019777	97.15	2318 / 2322	tig00000001	2499337..250164 9	<b>Oda_2</b>	
feoB	HG941718	97.02	2318 / 2322	tig00000001	616297..618612	<b>Cec_1</b>	
feoB	HG941718	97.02	2318 / 2322	tig00000001	148853..151168	<b>Cec_2</b>	
feoB	HG941718	97.02	2318 / 2322	tig00000001	148853..151168	<b>Cec_2</b>	
fepA	CP000468	95.99	1944 / 1947	tig00000001	2333870..233580 5	<b>Cec_1</b>	Ferrienterobactin receptor
fepA	CP000468	95.78	1944 / 1947	tig00000001	1866111..186804 3	<b>Cec_2</b>	
fepA	CP000468	95.52	1944 / 1947	tig00000001	1179105..118103 9	<b>Oda_1</b>	
fepA	CP000468	95.32	1944 / 1947	tig00000004	1226324..122825 5	<b>Oda_2</b>	
fepB	AE014075	97.07	957 / 957	tig00000001	2346818..234777 3	<b>Cec_1</b>	Ferrienterobactin-binding periplasmic protein
fepB	AE014075	97.07	957 / 957	tig00000001	1879054..188000 9	<b>Cec_2</b>	
fepB	AE014075	97.28	957 / 957	tig00000001	1192051..119300 4	<b>Oda_1</b>	
fepB	AE014075	97.39	957 / 957	tig00000004	1239271..124022 3	<b>Oda_2</b>	
fepC	AE014075	96.91	809 / 816	tig00000001	2342673..234347 7	<b>Cec_1</b>	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein
fepC	AE014075	96.91	809 / 816	tig00000001	1874908..187571 2	<b>Cec_2</b>	
fepC	AE014075	96.66	809 / 816	tig00000001	1187910..118871 4	<b>Oda_1</b>	
fepC	AE014075	96.29	809 / 816	tig00000004	1235123..123592 6	<b>Oda_2</b>	
fepD	AE014075	95.97	1017 / 1017	tig00000001	2344457..234547 3	<b>Cec_1</b>	Ferric enterobactin transport system permease protein
fepD	AE014075	95.97	1017 / 1017	tig00000001	1876691..187770 7	<b>Cec_2</b>	
fepD	AE014075	95.87	1017 / 1017	tig00000001	1189693..119070 8	<b>Oda_1</b>	
fepD	AE014075	95.87	1017 / 1017	tig00000004	1236907..123792 3	<b>Oda_2</b>	
fepE	AE014075	93.92	1134 / 1134	tig00000001	2341543..234266 9	<b>Cec_1</b>	Ferric enterobactin transport protein

fepE	AE014075	93.74	1134 / 1134	tig00000001	1873779..187490 4	<b>Cec_2</b>	
fepE	AE014075	93.21	1134 / 1134	tig00000001	1186780..118790 6	<b>Oda_1</b>	
fepE	AE014075	93.12	1134 / 1134	tig00000004	1233994..123511 9	<b>Oda_2</b>	
fepG	CP025573	97.07	989 / 993	tig00000001	2343477..234446 0	<b>Cec_1</b>	Ferric enterobactin transport system permease protein
fepG	CP025573	97.07	989 / 993	tig00000001	1875712..187669 4	<b>Cec_2</b>	
fepG	CP025573	97.57	989 / 993	tig00000001	1188714..118969 6	<b>Oda_1</b>	
fepG	CP025573	97.57	989 / 993	tig00000004	1235926..123691 0	<b>Oda_2</b>	
Fes	CP027060	99.64	1125 / 1125	tig00000001	2336125..233724 5	<b>Cec_1</b>	Enterobactin/ferric enterobactin esterase
Fes	CP027060	99.56	1125 / 1125	tig00000001	1868364..186948 4	<b>Cec_2</b>	
fes	CP027060	96.89	1125 / 1125	tig00000001	1181359..118248 0	<b>Oda_1</b>	
fes	CP027060	96.80	1125 / 1125	tig00000004	1228575..122969 5	<b>Oda_2</b>	
fiu Siderophore Receptor	CP027060	99.47	2283 / 2283	tig00000001	2560769..256304 2	<b>Cec_1</b>	Catecholate siderophore receptor
fiu Siderophore Receptor	CP027060	99.43	2283 / 2283	tig00000001	2093081..209535 4	<b>Cec_2</b>	
fiu Siderophore Receptor	CP023820	98.29	2283 / 2283	tig00000001	1398661..140093 4	<b>Oda_1</b>	
fiu Siderophore Receptor	CP023820	98.12	2283 / 2283	tig00000004	1445345..144761 4	<b>Oda_2</b>	
flgD	CP027060	99.28	696 / 696	tig00000001	3044549..304524 1	<b>Cec_1</b>	Basal-body rod modification protein
flgD	CP027060	99.28	696 / 696	tig00000001	2576949..257764 1	<b>Cec_2</b>	
flgD	CP027060	97.84	696 / 696	tig00000001	1678693..167938 3	<b>Oda_1</b>	
flgD	CP027060	97.70	696 / 696	tig00000004	1724678..172536 8	<b>Oda_2</b>	
flgM	CP028192	98.30	294 / 294	tig00000001	3042537..304282 8	<b>Cec_1</b>	Negative regulator of flagellin synthesis
flgM	CP028192	98.30	294 / 294	tig00000001	2574939..257523 0	<b>Cec_2</b>	

flgM	CP028192	99.32	294 / 294	tig00000001	1676681..167697 2	<b>Oda_1</b>	
flgM	CP028192	98.30	294 / 294	tig00000004	1722677..172296 6	<b>Oda_2</b>	
fmlA F9-fimbriae	BA000007	96.28	564 / 564	tig00000001	2220235..222079 2	<b>Oda_1</b>	Major subunit of F9 fimbriae, F9 fimbriae are part of the $\gamma$ 1 fimbrial subclade and are closely related to type 1 and F1C/S fimbriae in genetic organization and structural composition.
fmlA F9-fimbriae	BA000007	96.99	564 / 564	tig00000001	395992..396554	<b>Oda_2</b>	F9 fimbriae mediate strong biofilm formation
fsr Fosmidomycin Resistance	CP027060	99.67	1221 / 1221	tig00000001	2237867..223908 5	<b>Cec_1</b>	Fosmidomycin resistance protein
fsr Fosmidomycin Resistance	CP027060	99.51	1221 / 1221	tig00000001	1770101..177131 7	<b>Cec_2</b>	Fosmidomycin is an antibiotic that was originally isolated from culture broths of bacteria of the genus <i>Streptomyces</i> .
fsr Fosmidomycin Resistance	CP027060	97.79	1221 / 1221	tig00000001	1013547..101476 3	<b>Oda_1</b>	
fsr Fosmidomycin Resistance	CP027060	97.71	1221 / 1221	tig00000004	1061263..106248 1	<b>Oda_2</b>	
fyuA	CP016828	98.52	2022 / 2022	tig00000001	2888614..289062 7	<b>Cec_1</b>	Ferric yersiniabactin uptake receptor
fyuA	CP016828	98.57	2022 / 2022	tig00000001	2420931..242294 7	<b>Cec_2</b>	any two of yfcV, vat, or chuA along with fyuA could be used to differentiate UPEC from DEC, human commensal, or animal commensal isolates. However, to differentiate UPEC from APEC, vat, fyuA, and yfcV together are necessary.
fyuA	CP016828	98.76	2022 / 2022	tig00000001	2734177..273619 0	<b>Oda_1</b>	fyuA is part of the High-pathogenicity island (HPI).
fyuA	CP016828	98.47	2022 / 2022	tig00000001	907273..909279	<b>Oda_2</b>	
gspD (Shigella)	NC_007606	96.27	1851 / 1836	tig00000001	177994..179835 4847330..484917	<b>Cec_1</b>	type II secretion protein [Shigella dysenteriae Sd197]
gspD (Shigella)	NC_007606	96.16	1851 / 1836	tig00000001	1	<b>Cec_2</b>	
hlyD-family gene	NZ_CP023820	97.11	1176 / 1176	tig00000001	1047920..104908 9	<b>Oda_1</b>	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit" /locus_tag="CRT46_RS02485"
hlyD-family gene	NZ_CP023820	96.53	951 / 1176	tig00000004	1095501..109643 7	<b>Oda_2</b>	
hlyE	BA000007	96.95	918 / 918	tig00000001	3177262..317816 3	<b>Cec_1</b>	Haemolysin E (HlyE) is a novel pore-forming toxin first identified in <i>Escherichia coli</i> K-12. Substitution of Gly188 by Arg in <i>E. coli</i> K-12 HlyE abolishes activity,
hlyE	BA000007	96.41	918 / 918	tig00000001	2708455..270935 4	<b>Cec_2</b>	
hlyE	BA000007	98.15	918 / 918	tig00000001	1856968..185787 7	<b>Oda_1</b>	
hlyE	BA000007	98.58	918 / 918	tig00000001	34040..34952	<b>Oda_2</b>	

hlyIII	ANSQ010000 06	99.71	690 / 690	tig00000005	882830..883519	<b>Cec_1</b>	/product="hemolysin III" /locus_tag="WCM_00291"
hlyIII	ANSQ010000 06	99.57	690 / 690	tig00000001	4600267..460095	<b>Cec_2</b>	
hutX	NZ_CP023820	97.78	495 / 495	tig00000001	4475498..447599	<b>Oda_1</b>	/product="heme utilization cytosolic carrier protein HutX"
hutX	NZ_CP023820	97.78	495 / 495	tig00000001	2643655..264414	<b>Oda_2</b>	
ibrA	CP003034	92.09	1075 / 1185	tig00000001	2965971..296704	<b>Cec_1</b>	immunoglobulin-binding regulator A
ibrA	CP003034	92.27	1074 / 1185	tig00000001	2498401..249947	<b>Cec_2</b>	
ibrA	CP003034	97.49	1196 / 1185	tig00000001	2758010..275919	<b>Oda_1</b>	
ibrA	CP003034	97.58	1196 / 1185	tig00000001	931017..932201	<b>Oda_2</b>	
iha-Adhesin Receptor (Siderophore-R4)	CP018957	99.10	2010 / 2010	tig00000001	115002..116999	<b>Cec_1</b>	exogenous ferric siderophore receptor R4
iha-Adhesin Receptor (Siderophore-R4)	CP018957	98.94	1883 / 2010	tig00000001	2936273..293814	<b>Cec_1</b>	
iha-Adhesin Receptor (Siderophore-R4)	CP018957	98.91	2010 / 2010	tig00000001	2468660..247065	<b>Cec_2</b>	
iha-Adhesin Receptor (Siderophore-R4)	CP018957	98.91	2010 / 2010	tig00000001	4784339..478633	<b>Cec_2</b>	
iha-Adhesin Receptor (Siderophore-R4)	CP018957	98.91	2010 / 2010	tig00000001	3	<b>Cec_2</b>	
invA (ETT2)	CU928163	99.08	2061 / 2061	tig00000001	3774202..377625	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
invA (ETT2)	CU928163	98.98	2061 / 2061	tig00000001	1944239..194628	<b>Oda_2</b>	
invasion related gene	NZ_CP018206	96.73	1437 / 1437	tig00000001	1867544..186896	<b>Oda_1</b>	Putative invasion related protein, leucine rich repeat family protein, Escherichia coli strain MRSN346647, BSZ13_RS09705
invE (ETT2)	NC_011751	98.87	1146 / 1146	tig00000001	3776243..377737	<b>Oda_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
invE (ETT2)	NC_011751	98.87	1146 / 1146	tig00000001	1946274..194740	<b>Oda_2</b>	
ipaD-family gene	NZ_CP023820	95.93	1350 / 1350	tig00000001	4670733..467207	<b>Oda_1</b>	/product="IpaD/SipD/SspD family type III secretion system needle tip protein"
ipaD-family gene	NZ_CP023820	95.93	1350 / 1350	tig00000001	2838666..284001	<b>Oda_2</b>	
Iron binding protein	NC_013175	99.23	1941 / 1941	tig00000017	51829..53762	<b>Oda_1</b>	/product="high affinity Fe+2 binding protein permease component" /locus_tag="pEC14_8"
Iron binding protein	NC_013175	98.66	1942 / 1941	tig00000014	49410..51339	<b>Oda_2</b>	

irp1	CU928163	99.12	9492 / 9492	tig00000001	2894212..290366 5	<b>Cec_1</b>	Gene is part of the Yersinia high-pathogenicity island (HPI) encoding synthesis and uptake of the siderophore yersiniabactin (Ybt). HPI is widely distributed in human pathogenic members of the family of Enterobacteriaceae, above all in extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC).
irp1	CU928163	99.05	9492 / 9492	tig00000001	2426535..243598 2	<b>Cec_2</b>	
irp1	CU928163	99.07	9492 / 9492	tig00000001	2721134..273058 6	<b>Oda_1</b>	
irp1	CU928163	99.05	9492 / 9492	tig00000001	894242..903684	<b>Oda_2</b>	
irp2	CP006834	98.87	6108 / 6108	tig00000001	2903753..290984 0	<b>Cec_1</b>	Gene is part of the Yersinia high-pathogenicity island (HPI) encoding synthesis and uptake of the siderophore yersiniabactin (Ybt). HPI is widely distributed in human pathogenic members of the family of Enterobacteriaceae, above all in extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC).
irp2	CP006834	98.94	6108 / 6108	tig00000001	2436069..244214 9	<b>Cec_2</b>	
irp2	CP006834	98.67	6108 / 6108	tig00000001	2714969..272104 6	<b>Oda_1</b>	
irp2	CP006834	98.79	6108 / 6108	tig00000001	888073..894154	<b>Oda_2</b>	
iss	CP030791	95.45	308 / 309	tig00000001	1809699..181000 5	<b>Oda_1</b>	Increased serum survival protein
iss	CP030791	94.81	308 / 309	tig00000004	1855319..185562 2	<b>Oda_2</b>	
iucA	CU928163	98.55	1789 / 1788	tig00000001	126693..128468	<b>Cec_1</b>	Aerobactin genes Aerobactin is a bacterial iron chelating agent (siderophore) found in E. coli. It is a virulence factor enabling E. coli to sequester iron in iron-poor environments
iucA	CU928163	98.88	1788 / 1788	tig00000001	4796053..479783 1	<b>Cec_2</b>	
iucB	AE014075	98.95	668 / 668	tig00000001	125753..126416 4795110..479577	<b>Cec_1</b>	
iucB	AE014075	99.40	668 / 668	tig00000001	6	<b>Cec_2</b>	
iucC	AE014075	98.56	1742 / 1742	tig00000001	124021..125752 4793380..479510	<b>Cec_1</b>	
iucC	AE014075	98.62	1742 / 1742	tig00000001	9	<b>Cec_2</b>	
iucD	CP001232	95.98	1269 / 1278	tig00000001	122759..124021 4792117..479338	<b>Cec_1</b>	
iucD	CP001232	95.98	1269 / 1278	tig00000001	0	<b>Cec_2</b>	
ivy	CP025268	99.16	474 / 474	tig00000001	1955107..195557 8	<b>Cec_1</b>	
ivy	CP025268	98.95	474 / 474	tig00000001	1487341..148781 1	<b>Cec_2</b>	
ivy	CP025268	98.10	474 / 474	tig00000001	723227..723698	<b>Oda_1</b>	
ivy	CP025268	98.31	474 / 474	tig00000004	771382..771854	<b>Oda_2</b>	

kpsC	AWDO010000 31	95.68	1946 / 2028	tig00000001	3940394..394232 9	<b>Oda_1</b>	/product="capsule polysaccharide export protein KpsC"
kpsC	AWDO010000 31	95.32	1946 / 2028	tig00000001	2110025..211195 3	<b>Oda_2</b>	
kpsD	NC_007946	98.63	1677 / 1677	tig00000001	3937977..393964 9	<b>Oda_1</b>	Capsule transport protein KpsD
kpsD	NC_007946	98.63	1677 / 1677	tig00000001	2107605..210927 7	<b>Oda_2</b>	
kpsS	CU928163	94.42	1022 / 1233	tig00000001	3942445..394346 2	<b>Oda_1</b>	Capsule polysaccharide export protein KpsS
kpsS	CU928163	94.32	1022 / 1233	tig00000001	2112069..211308 4	<b>Oda_2</b>	
lktB (Sakai lktB homologue)	NC_002695	94.15	2121 / 2121	tig00000001	1045807..104792 3	<b>Oda_1</b>	leukotoxin B gene homologue from E. coli O157:H7 EHEC (Sakai)
lktB (Sakai lktB homologue)	NC_002695	94.11	2121 / 2121	tig00000004	1093390..109550 4	<b>Oda_2</b>	leukotoxin translocation ATP-binding protein
lpfA	FN554766	99.48	573 / 573	tig00000001	4763679..476424 8	<b>Oda_1</b>	long polar fimbriae (lpf) are important colonization factors in STEC isolates
lpfA	FN554766	99.30	573 / 573	tig00000001	2931591..293216 0	<b>Oda_2</b>	lpfA long polar fimbria major protein
mannosyl glycerate hydrolase gene	NC_011415	96.58	2634 / 2634	tig00000001	2490104..249273 0	<b>Cec_1</b>	mannosylglycerate hydrolase, /locus_tag="ECSE_RS04115", positive in EHEC2 absent from EHEC1
mannosyl glycerate hydrolase gene	NC_011415	96.62	2634 / 2634	tig00000001	2022384..202500 9	<b>Cec_2</b>	
matB	LS483297	98.63	583 / 588	tig00000001	2042057..204263 2	<b>Cec_1</b>	Mat fimbriae gene. Mat fimbriae promote biofilm formation
matB	LS483297	98.97	583 / 588	tig00000001	1574442..157501 9	<b>Cec_2</b>	
matD	HM102365	96.71	2526 / 2526	tig00000001	2038799..204130 7	<b>Cec_1</b>	Mat fimbriae biogenesis; putative usher protein
matD	HM102365	96.75	2526 / 2526	tig00000001	1571182..157369 2	<b>Cec_2</b>	
matD	HM102365	97.51	2526 / 2526	tig00000001	804335..806838 804335..806838	<b>Oda_1</b>	
matD	HM102365	97.59	2526 / 2526	tig00000004	852405..854914 2949517..294981	<b>Oda_2</b>	
mchB (microcin H47)	AE014075	95.08	305 / 294	tig00000001	2482033..248233 7	<b>Cec_1</b>	Microcin H47 precursor
mchB (microcin H47)	AE014075	95.08	305 / 294	tig00000001	2482033..248233 3	<b>Cec_2</b>	Microcin H47 is a chromosome-encoded microcin antibiotic of Escherichia coli.
mdfA	Y08743	98.22	1233 / 1233	tig00000001	2604950..260617 5	<b>Cec_1</b>	MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition
mdfA	Y08743	98.30	1233 / 1233	tig00000001	2137287..213851 5	<b>Cec_2</b>	

mdfA	Y08743	96.75	1229 / 1233	tig00000001	1448694..144991 6	<b>Oda_1</b>	
mdfA	Y08743	96.01	1229 / 1233	tig00000004	1495269..149648 1	<b>Oda_2</b>	
mdtH	CP019777	97.93	1209 / 1209	tig00000001	3036846..303805 1	<b>Cec_1</b>	Multidrug resistance protein MdtH
mdtH	CP019777	97.93	1209 / 1209	tig00000001	2569250..257045 5	<b>Cec_2</b>	
mdtH	CP019777	98.26	1209 / 1209	tig00000001	1670992..167219 5	<b>Oda_1</b>	
mdtH	CP019777	95.94	1182 / 1209	tig00000004	1717046..171820 3	<b>Oda_2</b>	
merA (mercury resistance)	GQ259888	99.44	1614 / 1614	tig00000017	75380..76987	<b>Oda_1</b>	Mercury(II) reductase (EC 1.16.1.1), commonly known as MerA, is an oxidoreductase enzyme and flavoprotein that catalyzes the reduction of Hg <sup>2+</sup> to Hg <sup>0</sup> .
merA (mercury resistance)	GQ259888	99.50	1614 / 1614	tig00000014	26218..27825	<b>Oda_2</b>	
merA (mercury resistance)	GQ259888	99.32	1614 / 1614	tig00000016	6060..7668	<b>Oda_2</b>	
mphA	DQ445270	99.89	903 / 906	tig00000021	9891..10793	<b>Cec_1</b>	Macrolide 2'-phosphotransferase
mphA	DQ445270	99.78	906 / 906	tig00000017	70967..71871	<b>Oda_1</b>	Macrolide Resistance Gene
mphA	DQ445270	99.34	906 / 906	tig00000016	1642..2541	<b>Oda_2</b>	
mphA	DQ445270	99.78	906 / 906	tig00000014	31349..32252	<b>Oda_2</b>	
nikA	CU928163	97.20	1571 / 1575	tig00000001	688465..690027	<b>Cec_1</b>	NikA is the periplasmic binding protein of a high affinity Ni <sup>2+</sup> uptake system in Escherichia coli.
nikA	CU928163	97.26	1571 / 1575	tig00000001	221027..222589 4426649..442821	<b>Cec_2</b>	
nikA	CU928163	99.17	1575 / 1575	tig00000001	6 2594848..259641	<b>Oda_1</b>	
nikA	CU928163	98.98	1575 / 1575	tig00000001	1	<b>Oda_2</b>	
ompA	CP027060	98.94	1041 / 1041	tig00000001	2804696..280573 1	<b>Cec_1</b>	Outer membrane protein A (OmpA) is a major protein in the Escherichia coli outer membrane.
ompA	CP027060	98.85	1041 / 1041	tig00000001	2337014..233804 9	<b>Cec_2</b>	
ompA	CP027060	97.69	1041 / 1041	tig00000001	1582507..158354 2	<b>Oda_1</b>	
ompA	CP027060	97.21	1041 / 1041	tig00000004	1628772..162980 4	<b>Oda_2</b>	
ompW	CP027060	99.09	548 / 639	tig00000001	3260222..326076 6	<b>Cec_1</b>	Outer membrane protein OmpW of Escherichia coli is required for resistance to phagocytosis.

ompW	CP027060	99.27	548 / 639	tig00000001	2791386..279193 1	<b>Cec_2</b>	
ompW	CP027060	97.99	548 / 639	tig00000001	1946632..194717 6	<b>Oda_1</b>	
ompW	CP027060	97.08	548 / 639	tig00000001	123291..123830	<b>Oda_2</b>	
papC	CP003034	98.93	2532 / 2532	tig00000001	3921827..392434 2	<b>Oda_1</b>	Genes of the the pyelonephritis-associated pilus (pap) operon. Uropathogenic Escherichia coli are major causative agents of cystitis and pyelonephritis. Most E. coli pyelonephritis isolates express pili encoded by the pyelonephritis-associated pili (pap) gene cluster.
papC	CP003034	98.74	2532 / 2532	tig00000001	2091498..209400 5	<b>Oda_2</b>	
papD	NC_011751	98.78	735 / 735	tig00000001	3921030..392175 8	<b>Oda_1</b>	
papD	NC_011751 JSXL0100008	98.37	735 / 735	tig00000001	2090704..209142 9	<b>Oda_2</b>	
papF	JSXL0100008 7	99.01	504 / 504	tig00000001	3918750..391924 9	<b>Oda_1</b>	
papF	JSXL0100008 7	99.01	504 / 504	tig00000001	2088439..208893 8	<b>Oda_2</b>	
papG	UFZN0100000 3	99.20	502 / 630	tig00000001	3916933..391743 1	<b>Oda_1</b>	
papG	UFZN0100000 3	99.60	502 / 630	tig00000001	2086624..208712 3	<b>Oda_2</b>	
papX	CP025251	96.01	552 / 552	tig00000001	3914922..391546 4	<b>Oda_1</b>	
papX	CP025251	96.20	552 / 552	tig00000001	2084618..208516 1	<b>Oda_2</b>	
pemK-toxin	NC_022885	99.40	333 / 333	tig00000021	17066..17396	<b>Cec_1</b>	implicated in plasmid maintenance probably in the regulation of virulence via alteration of the translation of a large pool of genes
pemK-toxin	NC_022885	99.70	333 / 333	tig00000017	79988..80319	<b>Oda_1</b>	
pemK-toxin	NC_022885	100.00	333 / 333	tig00000016	10661..10993	<b>Oda_2</b>	
pemK-toxin	NC_022885	100.00	333 / 333	tig00000014	22880..23212	<b>Oda_2</b>	
pkgA ECs3736 (ETT2)	NC_002695	95.80	1047 / 1059	tig00000005	932000..933015 4649428..465046	<b>Cec_1</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
pkgA ECs3736 (ETT2)	NC_002695	97.52	1047 / 1059	tig00000001	2 3780402..378144	<b>Cec_2</b>	
pkgA ECs3736 (ETT2)	NC_002695	97.04	1047 / 1059	tig00000001	0 1950424..195145	<b>Oda_1</b>	
pkgA ECs3736 (ETT2)	NC_002695	96.85	1047 / 1059	tig00000001	9	<b>Oda_2</b>	
ppk	CP025268	99.76	2067 / 2067	tig00000005	570461..572523	<b>Cec_1</b>	polyphosphate kinase (PPK)

ppk	CP025268	99.71	2067 / 2067	tig00000001	4287926..428999 0	<b>Cec_2</b>	Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and act as virulence factors in Shigella and Salmonella spp.
ppk	CP025268	98.36	2067 / 2067	tig00000001	3363207..336526 9	<b>Oda_1</b>	
ppk	CP025268	98.21	2067 / 2067	tig00000001	1534363..153641 9	<b>Oda_2</b>	
<b>qnrS1</b>	<b>CP026578</b>	<b>99.09</b>	<b>657 / 657</b>	<b>tig00000015</b>	<b>55825..56475</b>	<b>Cec_2</b>	Transmissible Quinolone-Resistance Gene. The Qnr proteins protect DNA gyrase from quinolone inhibition. In the absence of chromosomally mediated quinolone resistance mechanisms, the acquisition of only the qnrS1 gene will not display clinical resistance.
rpiR	NC_011750	97.42	891 / 891	tig00000001	1404332..140521 7	<b>Cec_1</b>	DNA-binding transcriptional repressor RpiR, involved in rpiB and als operon repression. Positive in EPEC absent in EHEC
rpiR	NC_011750	97.53	891 / 891	tig00000001	936668..937554	<b>Cec_2</b>	
sapA	NC_011751	98.65	1629 / 1644	tig00000001	3361774..336339 4	<b>Cec_1</b>	antimicrobial peptide ABC transporter substrate-binding protein [ Escherichia coli UMN026 ]
sapA	NC_011751	98.34	1628 / 1644	tig00000001	2892957..289457 5	<b>Cec_2</b>	
sapA	NC_011751	99.26	1629 / 1644	tig00000001	2037204..203882 1	<b>Oda_1</b>	
sapA	NC_011751	98.83	1630 / 1644	tig00000001	213509..215123	<b>Oda_2</b>	
<b>sfaH</b>	<b>KT444704</b>	<b>97.45</b>	<b>903 / 903</b>	<b>tig00000001</b>	<b>1617793..161869</b> 5	<b>Cec_1</b>	This protein is necessary for full expression of S-specific binding. S-fimbrial adhesins enable pathogenic E.coli causing urinary-tract infections or newborn meningitis to attach to glycoproteins terminating with alpha-sialic acid-2-3-beta-Gal.
sfmC (fimbrial chaperone)	NSBV0100001	99.13	693 / 693	tig00000001	1090394..109108 4	<b>Oda_1</b>	fimbrial chaperone SfmC, Part of the sfmACDHF fimbrial operon. Could contribute to adhesion to various surfaces in specific environmental niches. Increases adhesion to eukaryotic T24 bladder epithelial cells in the absence of fim genes.
sfmC (fimbrial chaperone)	NSBV0100001	98.85	693 / 693	tig00000004	1137728..113841 5	<b>Oda_2</b>	
sfmC (fimbrial chaperone)	CP032667	99.42	693 / 693	tig00000001	2294285..229497 4	<b>Cec_1</b>	
sfmC (fimbrial chaperone)	CP032667	99.57	693 / 693	tig00000001	1826540..182723 0	<b>Cec_2</b>	
shiA	NC_011751	97.42	1317 / 1317	tig00000001	4141974..414328 5	<b>Cec_1</b>	
shiA	NC_011751	97.42	1317 / 1317	tig00000001	3673274..367458 3	<b>Cec_2</b>	shikimate transporter [ Escherichia coli UMN026 ] According to recent studies using the mouse model of ascending UTI, shiA is involved in the virulence of UPEC
shiA	NC_011751	97.71	1311 / 1317	tig00000001	2741159..274245 9	<b>Oda_1</b>	
shiA	NC_011751	97.94	1311 / 1317	tig00000001	914236..915537	<b>Oda_2</b>	

sigA (Shigella flexneri 2a)	NC_004337	99.35	3858 / 3858	tig00000001	102198..106040	<b>Cec_1</b>	The enterotoxin SigA of <i>S. flexneri</i> 2a is an autonomously secreted serine protease capable of degrading casein. SigA is cytopathic for HEp-2 cells and plays a role in the intestinal fluid accumulation associated with <i>S. flexneri</i> infections.
sigA (Shigella flexneri 2a)	NC_004337	99.46	3858 / 3858	tig00000001	4771524..477536	<b>Cec_2</b>	
sinH	CP023644	99.54	2174 / 2178	tig00000001	3386840..338900	<b>Oda_1</b>	Virulence-associated bacterial outer membrane protein sharing a structural and evolutionary history with intimin and invasins
sinH	CP023644	99.22	2174 / 2178	tig00000001	1557916..156007	<b>Oda_2</b>	
sitA	FQ482074	96.57	903 / 915	tig00000001	1836168..183706	<b>Oda_1</b>	The iron transport system SitABCD This locus is induced in the animal specifically after invasion of the intestinal epithelium.
sitA	FQ482074	96.46	903 / 915	tig00000001	2	<b>Oda_2</b>	
sitB	NC_017659	97.21	825 / 825	tig00000001	13283..14176	<b>Oda_1</b>	
sitB	NC_017659	97.09	825 / 825	tig00000001	1835349..183616	<b>Oda_2</b>	
sitC	CP000836	98.25	858 / 858	tig00000001	5	<b>Oda_1</b>	
sitC	CP000836	97.55	858 / 858	tig00000001	12465..13280	<b>Oda_2</b>	
sitD	UGFR0100000	96.50	858 / 858	tig00000001	1834501..183535	<b>Oda_1</b>	
sitD	1	96.04	858 / 858	tig00000001	2	<b>Oda_2</b>	
sitD	UGFR0100000	96.50	858 / 858	tig00000001	11623..12468	<b>Oda_1</b>	
sitD	1	96.04	858 / 858	tig00000001	1833651..183450	<b>Oda_2</b>	
stcD (fimbrial adhesin)	NC_018658	97.58	1035 / 1035	tig00000005	99232..100262	<b>Cec_1</b>	Fimbrial adhesin from <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
stcD (fimbrial adhesin)	NC_018658	97.49	1035 / 1035	tig00000001	3816764..381779	<b>Cec_2</b>	
stcD (fimbrial adhesin)	NC_018658	96.51	1031 / 1035	tig00000001	4	<b>Oda_1</b>	
stcD (fimbrial adhesin)	NC_018658	96.61	1031 / 1035	tig00000001	2944107..294513	<b>Oda_2</b>	
sugE	CP018976	97.76	313 / 318	tig00000001	1468801..146911	<b>Cec_1</b>	Disinfection resistance. High-level expression of sugE leads to resistance to a subset of toxic quaternary ammonium compounds.
sugE	CP018976	97.12	313 / 318	tig00000001	3	<b>Cec_2</b>	
sugE	CP018976	99.36	313 / 318	tig00000001	1001135..100144	<b>Oda_1</b>	
sugE	CP018976	99.03	310 / 318	tig00000004	126516..126828	<b>Oda_2</b>	
sugE1	CP000604	99.53	428 / 441	tig00000051	175927..176234	<b>Cec_1</b>	
sugE1	CP000604	99.30	428 / 441	tig00000050	2006..2432	<b>Cec_1</b>	
sugE1	CP000604	99.30	428 / 441	tig00000050	2518..2944	<b>Cec_1</b>	

sugE1	CP000604	99.53	428 / 441	tig00000051	5617..6043	<b>Cec_1</b>	
sugE1	CP000604	99.53	428 / 441	tig00000008	1644..2070	<b>Cec_2</b>	
sugE1	CP000604	99.53	428 / 441	tig00000008	5256..5682	<b>Cec_2</b>	
TISS-protein	NZ_JSLB01000085	98.07	1296 / 1296	tig00000001	1023660..1024951	<b>Oda_1</b>	TolC family type I secretion outer membrane protein
tehA	CP027060	99.30	993 / 993	tig00000001	3482984..3483973	<b>Cec_1</b>	Tellurite resistance protein, Responsible for potassium tellurite resistance when present in high copy number.
tehA	CP027060	99.30	993 / 993	tig00000001	3014059..3015048	<b>Cec_2</b>	
tehA	CP027060	97.48	993 / 993	tig00000001	2123590..2124577	<b>Oda_1</b>	
tehA	CP027060	97.38	993 / 993	tig00000001	299530..300515	<b>Oda_2</b>	
tehB	CP027060	99.66	590 / 594	tig00000001	3483970..3484558	<b>Cec_1</b>	Tellurite resistance protein, Responsible for potassium tellurite resistance when present in high copy number.
tehB	CP027060	99.49	590 / 594	tig00000001	3015045..3015632	<b>Cec_2</b>	
tehB	CP027060	97.12	590 / 594	tig00000001	2124574..2125162	<b>Oda_1</b>	
tehB	CP027060	96.43	589 / 594	tig00000001	300512..301094	<b>Oda_2</b>	
terB	BA000007	98.90	456 / 456	tig00000001	2990386..2990839	<b>Cec_1</b>	Tellurite resistance protein
terB	BA000007	98.90	456 / 456	tig00000001	2522798..2523250	<b>Cec_2</b>	
terY3	DQ517526	97.98	1041 / 1041	tig00000001	2978131..2979166	<b>Cec_1</b>	Tellurite resistance protein
terY3	DQ517526	97.98	1041 / 1041	tig00000001	2510553..2511590	<b>Cec_2</b>	
tetA	CP031106	99.52	1247 / 1275	tig00000001	3270163..3271405	<b>Cec_1</b>	Tetracycline resistance protein, class E
tetA	CP031106	99.68	1247 / 1275	tig00000001	2801352..2802596	<b>Cec_2</b>	
tonB	CP027060	99.58	720 / 720	tig00000001	3257300..3258017	<b>Cec_1</b>	Interacts with outer membrane receptor proteins that carry out high-affinity binding and energy dependent uptake into the periplasmic space of specific substrates.
tonB	CP027060	99.72	720 / 720	tig00000001	2788467..2789185	<b>Cec_2</b>	
tonB	CP027060	98.33	720 / 720	tig00000001	1943713..1944430	<b>Oda_1</b>	
tonB	CP027060	98.06	720 / 720	tig00000001	120379..121094	<b>Oda_2</b>	
traT	AY214164	97.69	735 / 831	tig00000021	33646..34377	<b>Cec_1</b>	Complement resistance protein

traT	AY214164	97.82	735 / 831	tig00000017	29977..30709	<b>Cec_2</b>	
traT	AY214164	98.34	722 / 831	tig00000018	5943..6664	<b>Oda_1</b>	
traT	AY214164	96.91	808 / 831	tig00000017	95075..95879	<b>Oda_1</b>	
traT	AY214164	98.10	735 / 831	tig00000014	5905..6639	<b>Oda_2</b>	
Type-III effector protein gene	NZ_CP023820	97.81	1189 / 1188	tig00000001	4749186..475036 5	<b>Oda_1</b>	/product="type III effector protein", from a UPEC strain.
Type-III effector protein gene	NZ_CP023820	97.47	1188 / 1188	tig00000001	2917134..291830 6	<b>Oda_2</b>	
Type-III effector protein gene	NZ_JSLB01000038	98.97	2520 / 2520	tig00000001	4750832..475333 2	<b>Oda_1</b>	/product="type III effector protein", from a UPEC strain.
Type-III effector protein gene	NZ_JSLB01000038	99.09	2520 / 2520	tig00000001	2918775..292127 5	<b>Oda_2</b>	
upaG-like Adhesin	NZ_CP024862	96.20	5265 / 5262	tig00000001	4597457..460267 5	<b>Oda_1</b>	/product="adhesin" (upaG-like) UpaG: Mediates aggregation, biofilm formation and adhesion to a range of extracellular matrix (ECM) proteins, such as fibronectin, fibrinogen, laminin and collagen types I, II, III, and V. Mediates adhesion to human T24 bladder epithelial cells.
upaG-like Adhesin	NZ_CP024862	96.30	5265 / 5262	tig00000001	2765466..277068 9	<b>Oda_2</b>	
vgrG	NZ_LQSN01000194	98.42	1902 / 1902	tig00000001	2314103..231599 5	<b>Cec_1</b>	Type VI secretion system tip protein VgrG
vgrG	NZ_LQSN01000194	96.44	1517 / 1902	tig00000001	3510181..351168 7	<b>Cec_1</b>	
vgrG	NZ_LQSN01000194	98.26	1902 / 1902	tig00000001	1846352..184824 5	<b>Cec_2</b>	
vgrG	NZ_LQSN01000194	96.11	1517 / 1902	tig00000001	3041254..304276 1	<b>Cec_2</b>	
ybbP putative ABC-transporter Permease	NC_011751	96.80	2407 / 2415	tig00000001	2254722..225711 7	<b>Cec_1</b>	putative ABC transporter permease
ybbP putative ABC-transporter Permease	NC_011751	96.80	2407 / 2415	tig00000001	1786957..178935 3	<b>Cec_2</b>	
ybbP putative ABC-transporter Permease	NC_011751	99.54	2415 / 2415	tig00000001	1058839..106124 7	<b>Oda_1</b>	
ybbP putative ABC-transporter Permease	NC_011751	99.54	2415 / 2415	tig00000004	1106190..110859 7	<b>Oda_2</b>	
ybtA	CP028714	99.27	956 / 960	tig00000001	2910032..291098 6	<b>Cec_1</b>	Yersiniabactin operon. Yersiniabactin (YBT) is a bacterial siderophore with a very high stability constant for iron. It is a virulence factor widespread among human- and animal-pathogenic enterobacteria.
ybtA	CP028714	99.27	956 / 960	tig00000001	2442341..244329 4	<b>Cec_2</b>	Part of the high-pathogenicity island (HPI).
ybtA	CP028714	98.96	960 / 960	tig00000001	2713825..271478 2	<b>Oda_1</b>	

ybtA	CP028714	98.65	960 / 960	tig00000001	886931..887885 2912931..291472	<b>Oda_2</b>	
ybtQ	CP003034	98.95	1803 / 1803	tig00000001	5 2445240..244703	<b>Cec_1</b>	
ybtQ	CP003034	98.89	1803 / 1803	tig00000001	2 2710084..271187	<b>Cec_2</b>	
ybtQ	CP003034	98.78	1803 / 1803	tig00000001	7	<b>Oda_1</b>	
ybtQ	CP003034	98.89	1803 / 1803	tig00000001	883193..884988 2914718..291599	<b>Oda_2</b>	
ybtX	CP003034	99.06	1281 / 1281	tig00000001	2 2447025..244829	<b>Cec_1</b>	
ybtX	CP003034	99.22	1281 / 1281	tig00000001	9 2708817..271009	<b>Cec_2</b>	
ybtX	CP003034	98.75	1281 / 1281	tig00000001	1	<b>Oda_1</b>	
ybtX	CP003034	99.06	1281 / 1281	tig00000001	881924..883200	<b>Oda_2</b>	
ycbS	NC_011750	92.96	2586 / 2601	tig00000001	2785011..278757 6 2317326..231989	<b>Cec_1</b>	Systematic protein interactome analysis of glycosaminoglycans revealed <b>YcbS</b> as a novel bacterial virulence factor
ycbS	NC_011750	92.85	2586 / 2601	tig00000001	1	<b>Cec_2</b>	
ycgV autotransporter	NZ_CP024862	97.30	2887 / 2886	tig00000001	1888401..189125 7	<b>Oda_1</b>	putative autotransporter adhesin, <b>ycgV</b> has homology with flu - encoding the autotransporter (AT) self-recognizing adhesin Ag43
ycgV autotransporter	NZ_CP024862	96.88	2888 / 2886	tig00000001	65281..68123 3200759..320361	<b>Oda_2</b>	
ycgV autotransporter	NC_011751	98.92	2869 / 2868	tig00000001	3 2731947..273479	<b>Cec_1</b>	
ycgV autotransporter	NC_011751	98.88	2868 / 2868	tig00000001	7	<b>Cec_2</b>	
ydeR	CU928163	97.42	504 / 504	tig00000001	3572433..357293 1 3103603..310409	<b>Cec_1</b>	Uncharacterized fimbrial-like protein
ydeR	CU928163	97.78	495 / 504	tig00000001	6 2215457..221595	<b>Cec_2</b>	
ydeR	CU928163	98.61	504 / 504	tig00000001	8	<b>Oda_1</b>	
ydeR	CU928163	98.38	495 / 504	tig00000001	391211..391702	<b>Oda_2</b>	
yecI (ferritin-like protein-2)	AE014075	97.42	504 / 504	tig00000001	4072766..407326 7 3604046..360454	<b>Cec_1</b>	Iron-storage protein. Ferritin
yecI (ferritin-like protein-2)	AE014075	97.62	504 / 504	tig00000001	8	<b>Cec_2</b>	
yecI (ferritin-like protein-2)	AE014075	98.61	504 / 504	tig00000001	2647168..264766 9	<b>Oda_1</b>	
yecI (ferritin-like protein-2)	AE014075	98.41	504 / 504	tig00000001	820418..820919	<b>Oda_2</b>	

yeeJ	NC_000913	96.57	7021 / 7077	tig00000001	4133356..414035 6	<b>Cec_1</b>	YeeJ is an inverse autotransporter from Escherichia coli that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation
yeeJ	NC_000913	96.59	7013 / 7077	tig00000001	3664660..367164 9	<b>Cec_2</b>	
yeeR	CP006632	98.71	2254 / 2523	tig00000001	162690..164937 4832025..483426	<b>Cec_1</b>	/product="Inner membrane protein yeeR" /locus_tag="PPECC33_03247"
yeeR	CP006632	98.49	2254 / 2523	tig00000001	8	<b>Cec_2</b>	
yeeW (ECs1407)	NC_002695	91.82	489 / 489	tig00000001	3007649..300813 5	<b>Cec_1</b>	ECs1407 hypothetical protein [ Escherichia coli O157:H7 str. Sakai ] yeeW
yeeW (ECs1407)	NC_002695	92.02	489 / 489	tig00000001	2540056..254054 3	<b>Cec_2</b>	
yejO	NC_011750	96.85	2511 / 2511	tig00000005	200064..202558 3917586..392008	<b>Cec_1</b>	YejO shows sequence similarity to the $\alpha$ 3 subunit of Ag43, which is the outer membrane protein responsible for phase-variable auto-aggregation in E. coli
yejO	NC_011750	96.85	2511 / 2511	tig00000001	2	<b>Cec_2</b>	
yejO	NC_011750	97.49	2511 / 2511	tig00000001	3048227..305072 7	<b>Oda_1</b>	
yejO	NC_011750	97.33	2511 / 2511	tig00000001	1220630..122312 4	<b>Oda_2</b>	
yfcI	NC_011750	97.66	598 / 903	tig00000005	357400..357995 4074935..407553	<b>Cec_1</b>	putative transposase
yfcI	NC_011750	97.66	598 / 903	tig00000001	0	<b>Cec_2</b>	
yfcI	NC_011750	95.44	878 / 903	tig00000001	3180856..318171 9	<b>Oda_1</b>	
yfcI	NC_011750	95.44	878 / 903	tig00000001	1352929..135379 2	<b>Oda_2</b>	
yfcV	GG774912	99.47	567 / 567	tig00000001	3213988..321455 3	<b>Oda_1</b>	The presence of the putative fimbrial subunit gene yfcV was highly predictive of UPEC any two of yfcV, vat, or chuA along with fyuA could be used to differentiate UPEC from DEC, human commensal, or animal commensal isolates. However, to differentiate UPEC from APEC, vat, fyuA, and yfcV together are necessary.
yfcV	GG774912	99.65	567 / 567	tig00000001	1386015..138658 1	<b>Oda_2</b>	
yfhA	AQEJ0100003 3	91.61	477 / 477	tig00000021	50208..50682	<b>Cec_1</b>	2-component transcriptional regulator YfhA is part of the AI-3/epinephrine/norepinephrine signaling cascade and activate transcription of espFu to drive actin polymerization during AE lesion formation.
yfhA	AQEJ0100003 3	91.42	478 / 477	tig00000017	13782..14257	<b>Cec_2</b>	
yfhA	AQEJ0100003 3	91.40	477 / 477	tig00000018	22504..22977	<b>Oda_1</b>	
ygeF ECs3707 (ETT2)	NC_002695	95.53	492 / 492	tig00000001	4664623..466510 8	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2

ygeF ECs3707 (ETT2)	NC_002695	93.39	484 / 492	tig00000001	3758357..375883	4	Oda_1	
ygeF ECs3707 (ETT2)	NC_002695	94.01	484 / 492	tig00000001	1928305..192878	4	Oda_2	
ygeG (ECs3708) (ETT2)	NC_002695	96.92	487 / 492	tig00000001	4663910..466439	4	Cec_2	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
ygeG (ECs3708) (ETT2)	NC_002695	96.52	488 / 492	tig00000001	3759069..375955	4	Oda_1	
ygeG (ECs3708) (ETT2)	NC_002695	96.11	488 / 492	tig00000001	1929020..192950	4	Oda_2	
ygeH (ETT2)	NC_002695	97.53	1377 / 1377	tig00000001	4662204..466357	6	Cec_2	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
ygeH (ETT2)	NC_002695	93.68	1377 / 1377	tig00000001	3759889..376125	5	Oda_1	
ygeH (ETT2)	NC_002695	94.12	1377 / 1377	tig00000001	1929838..193120	5	Oda_2	
ygeJ (PBL) (ETT2)	NC_000913	98.41	503 / 503	tig00000001	4661241..466173	6	Cec_2	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
ygeJ (PBL) (ETT2)	NC_000913	90.02	501 / 503	tig00000001	1931673..193216	8	Oda_2	
ygeK (ECs3712) (ETT2)	NC_002695	97.00	633 / 633	tig00000001	4660592..466122	1	Cec_2	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
ygeK (ECs3712) (ETT2)	NC_002695	96.61	443 / 633	tig00000001	3762231..376267	1	Oda_1	
ygeK (ECs3712) (ETT2)	NC_002695	96.68	633 / 633	tig00000001	1932186..193281	5	Oda_2	
ygfI	CU928163	98.31	889 / 897	tig00000005	859852..860737		Cec_1	putative DNA-binding transcriptional regulator
ygfI	CU928163	98.09	889 / 897	tig00000001	4577307..457819	0	Cec_2	
ygfI	CU928163	99.44	889 / 897	tig00000001	3848161..384904	5	Oda_1	
ygfI	CU928163	98.88	889 / 897	tig00000001	2017994..201887	6	Oda_2	
yghJ	KX245009	99.28	4569 / 4569	tig00000001	182508..187063		Cec_1	YghJ, the secreted metalloprotease of pathogenic E. coli induces hemorrhagic fluid accumulation in mouse ileal loop, putative surface lipoprotein with peptidase domain
yghJ	KX245009	99.21	4569 / 4569	tig00000001	4851853..485640	4	Cec_2	
yjaA	CP021288	97.92	384 / 384	tig00000001	1304771..130515	3	Cec_1	YjaA is involved in the cellular response to hydrogen peroxide and acid stress
yjaA	CP021288	97.92	384 / 384	tig00000001	837121..837502		Cec_2	

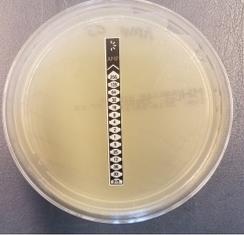
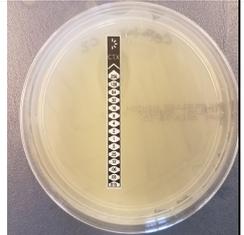
ypjA	CP001368	97.47	4587 / 4587	tig00000005	709838..714408 4427283..443185	<b>Cec_1</b>	adhesin-like autotransporter
ypjA	CP001368	97.49	4587 / 4587	tig00000001	3 3543404..354796	<b>Cec_2</b>	
ypjA	NC_011751	99.58	4575 / 4575	tig00000001	5 1714005..171856	<b>Oda_1</b>	
ypjA	NC_011751	99.61	4575 / 4575	tig00000001	9	<b>Oda_2</b>	
yqeH (ETT2)	NC_000913	98.89	633 / 633	tig00000001	4667481..466811 0 3755156..375576	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
yqeH (ETT2)	NC_000913	94.63	633 / 633	tig00000001	2 1925074..192570	<b>Oda_1</b>	
yqeH (ETT2)	NC_000913	97.95	633 / 633	tig00000001	2	<b>Oda_2</b>	
yqeI (ETT2)	NC_011750	91.06	235 / 261	tig00000001	4661834..466206 7 4666341..466714	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
yqeI (ETT2)	NC_011750	96.17	810 / 810	tig00000001	7 3756094..375689	<b>Cec_2</b>	
yqeI (ETT2)	NC_011750	98.64	810 / 810	tig00000001	8 3761380..376163	<b>Oda_1</b>	
yqeI (ETT2)	NC_011750	98.47	261 / 261	tig00000001	8 1926036..192684	<b>Oda_1</b>	
yqeI (ETT2)	NC_011750	98.89	810 / 810	tig00000001	3 1931331..193158	<b>Oda_2</b>	
yqeI (ETT2)	NC_011750	98.47	261 / 261	tig00000001	9	<b>Oda_2</b>	
yqeJ (ETT2)	NC_011750	95.65	483 / 483	tig00000001	4665871..466634 8 3756902..375736	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
yqeJ (ETT2)	NC_011750	98.08	469 / 483	tig00000001	5 1926836..192731	<b>Oda_1</b>	
yqeJ (ETT2)	NC_011750	98.14	483 / 483	tig00000001	2	<b>Oda_2</b>	
yqeK ECs3706 (ETT2)	NC_002695	98.36	426 / 426	tig00000001	4665301..466572 3 3757515..375793	<b>Cec_2</b>	ETT2: Escherichia coli type III secretion system 2
yqeK ECs3706 (ETT2)	NC_002695	96.71	426 / 426	tig00000001	3 1927460..192788	<b>Oda_1</b>	
yqeK ECs3706 (ETT2)	NC_002695	97.42	426 / 426	tig00000001	1	<b>Oda_2</b>	
yqfA (hemolysin-III family gene)	CP027060	96.52	660 / 660	tig00000001	3825429..382608 8	<b>Oda_1</b>	hemolysin III family protein, locus_tag="C5Y66_03365"
yqfA (hemolysin-III family gene)	CP027060	96.52	660 / 660	tig00000001	1995305..199596 3	<b>Oda_2</b>	

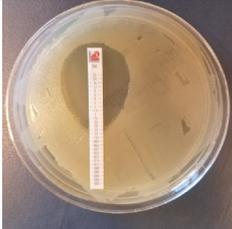
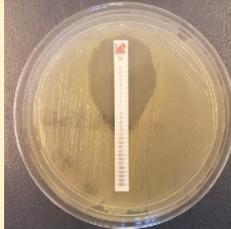
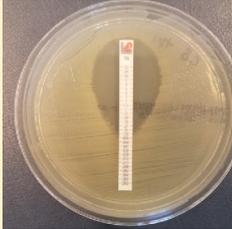
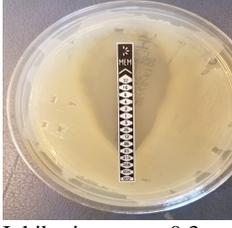
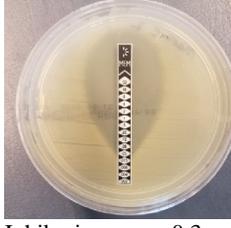
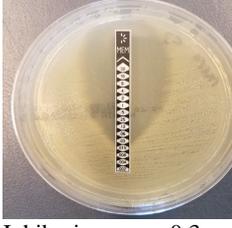
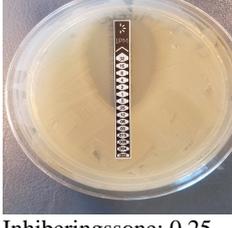
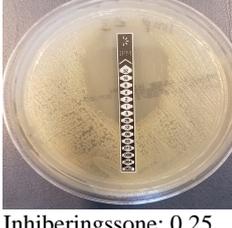
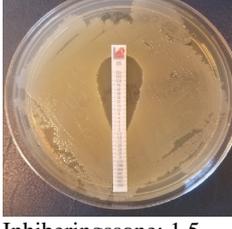
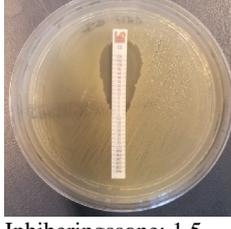
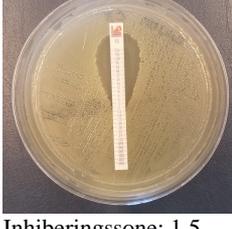
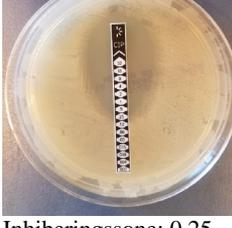
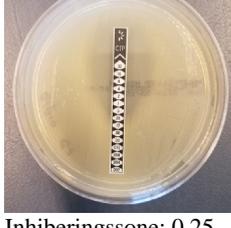
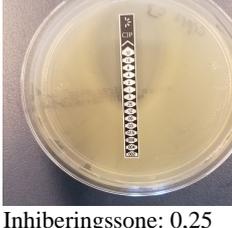
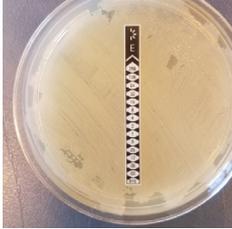
YqgB (virulence promoting factor)	CP023258	99.32	147 / 147	tig00000005	841034..841180	<b>Cec_1</b>	In growth competition experiments, a <b>yqgB</b> deletion mutant is more sensitive to acute acid stress than the wild type
YqgB (virulence promoting factor)	CP023258	99.32	147 / 147	tig00000001	4558485..455863	<b>Cec_2</b>	
YqgB (virulence promoting factor)	CP023258	97.28	147 / 147	tig00000001	3873626..387377	<b>Oda_1</b>	
YqgB (virulence promoting factor)	CP023258	96.60	147 / 147	tig00000001	1 2043410..204355	<b>Oda_2</b>	
zntA	AP010958	96.77	2199 / 2199	tig00000001	681274..683468	<b>Cec_1</b>	Zinc/cadmium/lead-transporting P-type ATPase. Confers resistance to zinc, cadmium and lead
zntA	AP010958	96.86	2199 / 2199	tig00000001	213835..216029	<b>Cec_2</b>	
zntA	AP010958	95.62	2194 / 2199	tig00000001	4403734..440591	<b>Oda_1</b>	
zntA	AP010958	95.81	2194 / 2199	tig00000001	5 2571941..257412	<b>Oda_2</b>	
ZnuA	BA000007	97.61	922 / 933	tig00000001	2603871..260478	<b>Oda_1</b>	High-affinity zinc uptake system protein from O157:H7 EHEC Sakai
ZnuA	BA000007	97.15	913 / 933	tig00000001	6 777221..778123	<b>Oda_2</b>	
znuA	CP027060	98.70	922 / 933	tig00000001	4028496..402941	<b>Cec_1</b>	High-affinity zinc uptake system protein from E. coli K-12
znuA	CP027060	98.37	922 / 933	tig00000001	1 3559782..356069	<b>Cec_2</b>	
ZnuB	BA000007	97.71	786 / 786	tig00000001	2605623..260640	<b>Oda_1</b>	High-affinity zinc uptake system protein from O157:H7 EHEC Sakai
ZnuB	BA000007	97.46	787 / 786	tig00000001	8 778959..779744	<b>Oda_2</b>	
znuB	NC_000913	98.08	782 / 786	tig00000001	4030243..403102	<b>Cec_1</b>	High-affinity zinc uptake system protein from E. coli K-12
znuB	NC_000913	98.08	782 / 786	tig00000001	4 3561526..356230	<b>Cec_2</b>	
ZnuC	BA000007	97.49	756 / 756	tig00000001	4029499..403024	<b>Cec_1</b>	High-affinity zinc uptake system protein from O157:H7 EHEC Sakai
ZnuC	BA000007	97.49	756 / 756	tig00000001	6 3560782..356152	<b>Cec_2</b>	
ZnuC	BA000007	96.16	756 / 756	tig00000001	9 2604874..260562	<b>Oda_1</b>	
ZnuC	BA000007	95.11	756 / 756	tig00000001	6 778217..778962	<b>Oda_2</b>	
zupT	CP027060	99.61	774 / 774	tig00000004	13447..14217	<b>Cec_1</b>	Zinc transporter
zupT	CP027060	97.52	766 / 774	tig00000001	256513..257262	<b>Cec_1</b>	
zupT	CP027060	99.35	774 / 774	tig00000001	4926712..492748	<b>Cec_2</b>	

zupT	CP027060	99.61	774 / 774	tig00000001	4004710..400548 0	<b>Oda_1</b>
zupT	CP027060	99.48	774 / 774	tig00000001	2174244..217501 3	<b>Oda_2</b>

**Gul** er de genen som gjorde den gitte stammen spesiell.

Tabell 1. Samletabell som fremstiller inhiberingssonene til de 13 antimikrobielle stripsene med to gjentak på prøve 2 og 3.

	Gjentak 1		Gjentak 2	
	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 2	Prøve 3
<b>Ampicillin</b>	 Ingen inhibering	 Ingen inhibering	 Ingen inhibering	 Ingen inhibering
<b>Gentamicin</b>	 Inhiberingssone: 0,25	 Inhiberingssone: 0,25	 Inhiberingssone: 0,5	 Inhiberingssone: 0,5
<b>Streptomycin</b>	 Inhiberingssone: 3	 Inhiberingssone: 3	 Inhiberingssone: 3	 Inhiberingssone: 3
<b>Cefotaksim</b>	 Inhiberingssone: 32	 Inhiberingssone: 32	 Inhiberingssone: 32	 Inhiberingssone: 32
<b>Amikacin</b>	 Inhiberingssone: 1	 Inhiberingssone: 1	 Inhiberingssone: 1	 Inhiberingssone: 1

<b>Trimetoprim</b>				
	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,19	Inhiberingssone: 0,94
<b>Meropenem</b>				
	Inhiberingssone: 0,3	Inhiberingssone: 0,3	Inhiberingssone: 0,3	Inhiberingssone: 0,3
<b>Imipenem</b>				
	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,12	Inhiberingssone: 0,25
<b>Kolisitin</b>				
	Inhiberingssone: 1,5	Inhiberingssone: 1,5	Inhiberingssone: 1,5	Inhiberingssone: 1,5
<b>Ciprofloxacin</b>				
	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,25	Inhiberingssone: 0,25
<b>Erytromycin</b>				
	Ingen inhiberingssone	Ingen inhiberingssone	Ingen inhiberingssone	Ingen inhiberingssone

<b>Amoksicillin med klavulansyre</b>				
	Inhiberingssone: 4	Inhiberingssone: 4	Inhiberingssone: 6	Inhiberingssone: 3
<b>Cefepim</b>				
	Inhiberingssone: 6	Inhiberingssone: 1,5	Inhiberingssone: 3	Inhiberingssone: 1,5

Gul farge indikerer at verdiene har forandret seg noe, men dette ansees ikke for å være unormalt eller påvirke resultatene ytterligere. Det ble regnet gjennomsnittsverdier mellom de diskene som hadde ulike inhiberingssoner



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway