



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2019 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Påvisning av multiresistent og ESBL-produserende uropatogen *Escherichia coli* (UPEC) i akvatisk miljø**

Detection of multi resistant and ESBL producing uropathogen *Escherichia coli* (UPEC) in aquatic environment

Oda Karin Ytreøy

Mastergrad i Matvitenskap



## Forord

Dette er en masteroppgave som utgjør 30 studiepoeng. Den er skrevet som en avsluttende del på masterstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved fakultetet for kjemi, biovitenskap og matvitenskap (KBM). Det har vært svært interessant å fordype seg i problemstillingen som antibiotikaresistens omhandler. Det har i tillegg vært tankevekkende, og det har føltes meningsfylt å få gjøre et lite bidrag i jobben med å undersøke forekomsten av resistens i ytre miljø.

Jeg vil først og fremst takke hovedveileder professor Bjørn-Arne Lindstedt for å vise stor entusiasme for fagfeltet, for alltid svare på spørsmål og for gode tilbakemeldinger. Takk for muligheten for å skrive masteroppgave innen et så spennende felt. Videre vil jeg takke biveileder Hilde Marit Østlie for gode tilbakemeldinger. Jeg setter veldig stor pris på nøyaktigheten du viser når du gir tilbakemelding på arbeid som er utført. Takk til Misti Dawn Finton for god veiledning på lab og for å ha gjort lab-arbeidet veldig hyggelig. Takk til Cecilie Fagerland, som jeg har skrevet oppgave parallelt med og jobbet mye med på lab. Det har vært utrolig hyggelig å samarbeide med deg.

Videre vil jeg takke Liv for gode tilbakemeldinger og for å tålmodig ha lest gjennom de mange utkastene underveis i prosessen, og for å være en utrolig god venninne og støtte underveis! Takk til Kristine, mamma og pappa som har vært barnevakt og har gjort denne prosessen utrolig mye lettere. Takk til storesøster Merete som alltid har tid til å prate når panikken har tatt overhånd. Takk til øvrig familie og venner som har vist støtte. Sist men ikke minst, tusen takk til kjæresten og bestevennen min Mats! Takk for at du viser tålmodighet og støtte når jeg stresser som verst. Og til Olivia, herlige jenta mi, nå gleder jeg meg til å gi deg 100% av oppmerksomheten min!

Oslo, mai 2019.

Oda Karin Ytreøy

## Abstract

The increasing prevalence of antibiotic resistant bacteria is a growing problem for the global public health. Among antibiotic drugs,  $\beta$ -lactams are the most widely used, but there is observed an increased resistance to extended spectrum of  $\beta$ -lactam (ESBL) antibiotics. The study of antimicrobial resistance in the environment is limited, and there are knowledge gaps in how widespread resistance is in nature and the potential for spreading antibiotic resistant bacteria in to the food chain. The purpose of this study is to examine the prevalence of clinically significant ESBL and carbapenemase producing bacteria in aquatic environment at The Norwegian University of Life Science (NMBU) and at Ellingsrud industrial area in Ski in Norway. This is a contribution to the work that concerns mapping the occurrence of antibiotic resistant bacteria in natural environment in Norway.

Water samples was collected and filtrated, whereupon the filters were placed on chromogenic agars that selects the growth of ESBL- and carbapenemase producing bacteria within the genus *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Citrobacter* (KESC), in addition to *Escherichia coli*. DNA from isolated bacteria was extracted and analyzed by using 16S rRNA PCR and Sanger sequencing and multiplex PCR. The genomes were also analyzed by the use of whole genom sequencing. In addition, the sensitivity to selected antibiotics for the different bacteria samples were tested by the use of antibiotic disk diffusion test. The results showed two bacteria strains that were multi resistant and identified as uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) serotype O25:H18. The antibiotic disk diffusion test showed resistance to the antibiotics cefotaxime, ampicillin, erythromycin and trimethoprim with a high minimum inhibitory concentration (MIC). In addition, there were detected several resistance factors and virulence factors by the use of whole genom sequencing. Among others, the gene *bla*<sub>CTX-M</sub> which encodes one of the most prevalent ESBL, the enzyme CTX-M was detected. This is clinically significant as it creates great challenges for health facilities.

## Sammendrag

Økende forekomst av antibiotikaresistens skaper utfordringer for den globale folkehelsen. Det fryktes at det om ikke så lenge vil være svært utfordrende å kurere «enkle» infeksjoner som følge av at bakterier har utviklet resistens. Blant antibiotika er  $\beta$ -laktam det hyppigste brukte legemiddelet, og det er observert en økende forekomst av bakterier som er resistent mot et utvidet spekter av  $\beta$ -laktam antibiotika. Utbredelsen av antibiotikaresistens i det ytre miljøet har fått lite oppmerksomhet, dermed er det store kunnskapshull om hvor utbredt antibiotikaresistens er i naturen og om dette kan spres til mennesker gjennom blant annet matkjeden. Hensikten med denne studien er derfor å undersøke forekomsten av klinisk signifikante bakterier som produserer et utvidet spektrum av  $\beta$ -laktamaser (ESBL) og karbapenemaser i akvatisk nærmiljø på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) og ved Ellingsrud industriområde i Ski. Studien er et bidrag i arbeidet for å undersøke og kartlegge forekomsten av antibiotikaresistens i ytre miljø i Norge. I den forbindelse ble det samlet inn vannprøver fra Andedammen og Niagarabekken, samt Ellingsrud industriområde. Vannprøvene ble filtrert og filteret ble plassert på kromogene selektive medier som fremmer vekst av ESBL- og karbapenemaseproduserende bakterier innen genusene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter* (KESC), samt *Escherichia coli*. Etter isolasjon av DNA for de aktuelle bakteriene ble det foretatt genotypiske undersøkelser ved hjelp av ulike typer PCR. Bakteriene ble artsbestemt ved 16S rRNA sekvensering samt helgenomsekvensering. I tillegg ble det screenet etter aktuelle resistensgener ved multipleks PCR og utført antibiotika sensitivitetstesting (AST) på de aktuelle stammene.

Det ble påvist to bakteriestammer som var multiresistente og ESBL-produserende uropatogen *Escherichia coli* (UPEC) serotype O25:H18. Bakteriestammene var resistent mot antibiotikaene cefotaxime, ampicillin, erytromycin og trimetoprim med tydelig høyt minimum inhiberende konsentrasjon (MIC). I tillegg ble det påvist gen som koder for resistens mot tetrasyklin ved nanoporesekvensering. Enzymet CTX-M påvist i ene bakteriestammen, og dette er blant de mest spredte ESBL-enzymene globalt. Funnene viser forekomst av multiresistente humanpatogene bakterier med resistensfaktorer som er klinisk signifikant og som skaper store utfordringer for helsevesenet. Dette indikerer at reservoaret av antibiotikaresistente gener av klinisk signifikans finnes i naturlig miljø i Norge.

## Forkortelser

AmpC - ampicillin hydrolyserende

AR – antibiotikaresistens

ARB – antibiotikaresistente bakterier

ARG – antibiotikaresistent gen

AST - antibiotika sensitivitetstest

BHI - Brain Heart Infusion

BR – broad range

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CFU - colony forming units

CTX-M - cefotaximase, identifisert i München

dsDNA – double stranded DNA

ddNTP - dideoksybaser

dNTP – deoksynukleotid

DTU - Technical University of Denmark DTU

ECDC - European Center for Disease Prevention and Control

ECOFF - Ecological Cut-Off

ESCMID - The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ESBL –  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum

ExPEC - extraintestinal *E. coli*

FQ – fluorokinoloner

IMP - Imipenem-resistent *Pseudomonas*

KESC - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* karbapenemase

KRE – karbapenem-resistent *Enterobacteriaceae*

LPS - lipopolysakkarid

MBL - Metallo-  $\beta$ -laktamase

MIC - minimum inhibitor konsentrasjon

M.I.C.E – minimum inhibitor concentration evaluator™

MH - Mueller-Hinton

nBLAST - Nucleotid Basic Local Alignment Search Tool

NAM - N-acetylmuraminsyre

NAG - N-acetylglukosamin  
PCR – polymerase kjedereaksjon  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
NDM-1 - New Dehli metallo- $\beta$ -laktamase-1  
NMBU – Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
NORM - Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober  
NORM-VET - Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler  
ONT – Oxford Nanopore Technologies  
OXA-ESBL - oxacillin hydrolyserende-ESBL  
PBP – penicillin bindende protein  
RAST - Rapid Annotation Subsystems Technology  
rRNA – Ribosomalt RNA  
SHV – sulfhydryl variabel  $\beta$ -laktamase  
SPI-1 - *Salmonella* pathogenicity island 1  
T3SS - type III utskillingssystem  
TEA - Tris-acetat-EDTA  
TEM - temoneira  $\beta$ -laktamase  
UNN – Universitetssykehuset i Nord-Norge  
UPEC – uropatogen *Escherichia coli*  
UVI - urinveisinfeksjon  
VIM - Verona intergron-encoded metallo-  $\beta$ -laktamase  
VRE – Vancomycin-resistant enterococci  
WIMP - «*What's in my pot*»





# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>iii</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Antibiotika .....	3
1.2 Antibiotikaresistens .....	10
1.3 Forekomst og spredning av antibiotikaresistens i miljøet .....	18
1.4 Tiltak for å hindre spredning av antibiotikaresistens .....	21
1.5 Metodisk teori .....	22
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>28</b>
2.1 Oversikt over prosessene og metodene som er benyttet .....	28
2.2 Prøveuttak .....	29
2.3 Fenotypisk deteksjon av ESBL-resistente og KRE-resistente bakterier med selektive medier .....	29
2.4 Isolering og ekstrahering av DNA, samt nedfrysning av bakterier .....	31
2.5 Kvantifisering og renhetsmåling av DNA .....	31
2.6 Screening etter antibiotikaresistente gener .....	32
2.7 Sangersekvensering av 16S rRNA .....	36
2.8 Nanoporesekvensering med MinION .....	38
2.9 Dataanalysering .....	38
2.10 Antibiotika sensitivitetstesting .....	39
<b>3 Resultater</b> .....	<b>40</b>
3.1 Indikasjon på ESBL-produserende bakterier som ble funnet i vannprøver .....	40
3.2 Påvisning av antibiotikaresistente gener ved multipleks PCR .....	42
3.3 Screening etter bakterieidentitet ved Sangersekvensering av 16S rRNA .....	43
3.4 Tilstedeværelse av resistensgener ved nanoporesekvensering (MinION) .....	44

3.5 Påvisning av resistens mot cefotaxime, ampicillin, erytromycin og trimetoprim ved antibiotika sensitivitetstesting .....	46
<b>4 Diskusjon.....</b>	<b>48</b>
4.1 Påvisning av ESBL-produserende bakterier .....	48
4.2 Påvisning av multiresistente, ESBL-produserende UPEC .....	50
4.3 Funneenes relevans.....	56
4.4 Forslag til videre arbeid.....	57
<b>5 Konklusjon .....</b>	<b>59</b>
<b>Litteraturliste .....</b>	<b>60</b>
<b>Vedlegg.....</b>	<b>i</b>
Vedlegg A.....	i
Vedlegg B.....	iii
Vedlegg C.....	iv
Vedlegg D.....	vii
Vedlegg E.....	x

# 1 Introduksjon

Økende forekomst av antibiotikaresistens (AR) er en global helseutfordring og står på Verdens helseorganisasjons (WHO) liste over topp ti trusler mot global helse (WHO, 2019). Det fryktes at dersom utviklingen forsetter vil menneskene være tilbake i den medisinske æraen da antibiotika enda ikke var oppdaget, og langt flere ble syke og døde av «enkle» infeksjoner.

Blant resistente og sykdomsfremkallende bakterier er det noen som skiller seg ut. På listen over patogene bakterier som er kritisk viktig å utvikle nye antibiotikum for fremhever WHO karbapenem-produserende *Acinetobacter baumannii* og *Pseudomonas aeruginosa*, samt bakterier innen *Enterobacteriaceae* som er resistent mot tredje generasjons cefalosporiner og karbapenem. Bakteriene innen *Enterobacteriaceae* inkluderer *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. og *Morganella* spp. (WHO, 2017b). Av disse trekker Centers for Disease Control and Prevention (CDC) frem blant annet karbapenem-resistent *Enterobacteriaceae* (KRE) på listen over trusler klassifisert som spesielt presserende, mens på listen over alvorlige trusler finnes blant annet *Enterobacteriaceae* som produserer  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL), sammen med multiresistent *Acinetobacter* og *P. aeruginosa* (CDC, 2013).

Blant Gram-negative patogene bakterier forekommer *E. coli* og *K. pneumoniae* ofte som årsak til sykdom hos dyr og mennesker.  $\beta$ -laktam benyttes hyppig til behandling av infeksjoner forårsaket av disse bakteriene (Davies & Davies, 2010), og dette er blant de mest brukte antibiotikaene i verden for å behandle bakterielle infeksjoner (Bush & Bradford, 2016). Resistens mot denne typen antibiotika betraktes derfor som svært alvorlig fordi det fører til økt bruk av medisiner som anses som «siste utvei»-antibiotika, som karbapenem og kolistin.

Norge er i en gunstig situasjon når det gjelder AR, men det kan endre seg. Derfor er det viktig å fortsette med tiltak som forebygger utvikling av resistens (Folkehelseinstituttet, 2012). På bakgrunn av dette har regjeringen utarbeidet en handlingsplan for å redusere forekomsten av AR i perioden 2015-2020. Noen av målene i handlingsplanen er å redusere forbruket av antibiotika, fokusere på riktig bruk av antibiotika, samt øke kunnskapen om spredningsmekanismer som fører til resistensutvikling. Norge skal være en pådriver internasjonalt og bidra til ansvarlig bruk, fremstilling av nye typer antibiotika, vaksiner og

utvikling av hjelpemidler som bidrar til bedre diagnostikk (Miljødirektoratet, 2018; Regjeringen, 2015; Steinbakk et al., 2014).

Miljø i naturen har en viktig rolle når det gjelder spredning av antibiotikaresistente bakterier (ARB) og antibiotikaresistente gener (ARG). Dette aspektet av resistensforekomst har tidligere fått lite fokus, men det er nå kjent at dette er et viktig område med hensyn til utvikling og spredning av AR. For å forstå hvordan miljø i naturen bidrar til å øke forekomsten av AR er det viktig å kartlegge tilstedeværelse av ARB i jord, ferskvann, sjø, sedimenter, villlevende dyr og husdyr (Miljødirektoratet, 2018; Regjeringen, 2015).

Å ha et helhetlig blikk på utfordringen som AR representerer kan se ut til å være nødvendig, og i den forbindelse har WHO foreslått å ha en «One Health» tilnærming. «One Health» har som mål å samle ulike fagområder, og arbeidet inkluderer å jobbe med mattrygghet, bedre kontroll på zoonoser og å bekjempe AR. Årsaken til at denne tilnærmingen er nyttig er fordi mange av mikrobene som infiserer dyr også infiserer mennesker, i tillegg til at de deler økosystem. Om bare ett fagområde gjør tiltak for å bekjempe problemet vil ikke dette ha like stor effekt som hvis flere fagområder samler seg (WHO, 2017c). «One Health» er med andre ord en erkjennelse av at det er sammenheng mellom miljøet vi er i, og menneskers og dyrs sykdom og helse. Samspillet mellom dyr, mennesker og miljø må ses på som en helhet for å oppnå bedre forståelse for både opprinnelsen og spredningen av smittsomme sykdommer (Steinbakk et al., 2014).

Hensikten med denne studien er å undersøke forekomsten av ESBL-produserende bakterier i ytre miljø. Når det er mer kunnskap om prevalensen av AR kan det videre undersøkes hvordan dette kan spres til mennesker og dyr. En mulig vei er gjennom matkjeden. Nivået av AR i matkjeden forventes å øke på grunn av endrede matvaner og hyppigere reisevirksomhet. Det ytre miljøet er pr. i dag lite undersøkt, og det er derfor en potensiell kilde for både gamle og nye AR bakteriestammer. Kartlegging av hvilke stammer som finnes samt hvilke resistensmekanismer som opptrer i miljøet er derfor viktig i arbeidet for å begrense prevalensen av AR. Formålet med studien er derfor å bidra med å kartlegge resistensmekanismer i ytre miljø, og bygge et godt grunnlag for videre arbeid med å undersøke spredningsfaren oppover i matkjeden.

I den forbindelse ble det hentet vannprøver fra Andedammen og Niagarabekken, som ligger på campus for Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i Ås, og fra Ellingsrud industriområde i Ski. Gjennom fenotypiske dyrkningsmetoder og genotypisk analyse ved bruk av blant annet helgenomsekvensering ble bakteriestammene uropatogen *E. coli* (UPEC) serotype O25:H18 påvist i to unike isolater. Ved bruk av metoden antibiotika sensitivitetstesting (AST) ble det påvist at bakteriestammene i tillegg var klinisk resistent mot antibiotikaene trimetoprim, erytromycin, ampicillin (tredje generasjon) og cefotaxime (tredje generasjon).

Forekomsten av multiresistente bakterier er økende og kan gjøre det vanskelig å finne passende behandling om en person blir infisert av denne typen bakterier. Resistensutvikling mot disse anses derfor som svært alvorlig og skaper store utfordringer for helsevesenet.

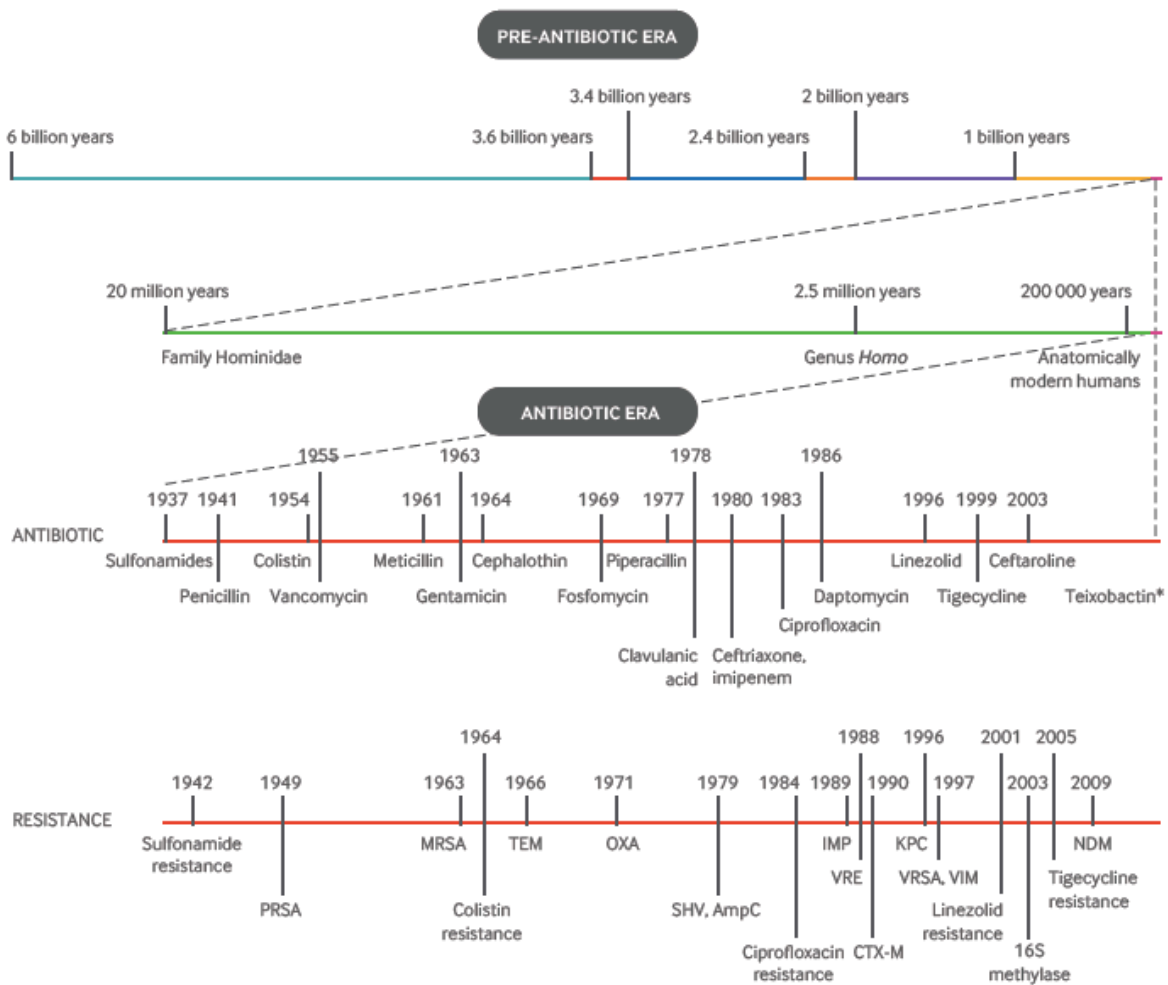
## 1.1 Antibiotika

Antibiotika defineres som en kjemisk substans som produseres naturlig av sopp eller bakterier som en del av deres konkurranse og forsvar mot andre mikroorganismer, med hensikt om å drepe eller hemme bakteriell vekst. Denne forståelsen kan også defineres bredere, da det i tillegg refereres til antimikrobielle midler som produseres både naturlig og syntetisk. Man anser antibiotika som medisin som brukes for å bekjempe bakterielle infeksjoner (Smith et al., 2015).

Penicillin ble oppdaget av Alexander Flemming i 1928, noe som markerte starten på antibiotika-æraen. Det første antibiotikumet som kom på markedet var sulfonamidene i 1937 (Davies & Davies, 2010) etterfulgt av penicillin i 1944, som da ble brukt av de allierte i 2.verdenskrig for å behandle sårede soldater (Tronsmo, 2016). Videre ble streptomycin introdusert i 1944 for å kurere pasienter som var smittet av tuberkulose (Davies & Davies, 2010). Før antibiotikaenes inntog ble det benyttet medisiner som inneholdt blant annet kvikksølv eller arsenikk, som kunne gi alvorlige bivirkninger til pasientene som ble behandlet (Tronsmo, 2016). Bruken av antibiotika forandret dette betraktelig, da dette var en medisin som kurerte infeksjoner uten å gi alvorlige bivirkninger hos pasientene som brukte dem. Dette gav optimisme om at infeksjoner forårsaket av bakterier kunne forhindres og bekjempes (Kapoor et al, 2017).

Kort tid etter introduksjonen av antibiotika begynte man å oppdage resistente bakteriestammer, og det tok ikke lang tid før disse gjorde seg gjeldende. Nye sorter antibiotikum ble derfor

introdusert for å løse økende grad av resistens blant mikroorganismene (Ventola, 2015). 1960- og 1970-tallet anes derfor å være antibiotikumets gullalder ettersom det i denne perioden ble oppdaget flere nye klasser antibiotikum. I tillegg ble det gitt midler til forskning for å utvikle og syntetisere nye antibiotikum, blant annet for å bekjempe resistente stammer. Figur 1 viser en oversikt over utviklingen av antibiotika og påfølgende AR. Som det fremkommer i figuren er det blitt utviklet resistens kort tid etter introduksjon av ny antibiotika.



Figur 1.1. Oversikt over når ulike antibiotikum ble tatt i bruk og påfølgende resistensutvikling. Hentet fra Iredell et al. 2016.

### 1.1.1 Virkemåter for antibiotika

Forskjellige antibiotikum har ulike angrepssteder i bakteriecellen. Det finnes flere måter å klassifisere antibiotika på og i denne studien er det valgt å dele dem inn basert på hvor i bakteriecellen de angriper:

- (i) Antibiotika som angriper celleveggen (penicillin, cefalosporin, glykopeptider)
- (ii) Antibiotika som hemmer proteinsyntese (aminoglykosider, makrolider, tetrasykliner)
- (iii) Antibiotika som hemmer replikasjon av DNA (fluorokinoloner (FQ))
- (iv) Peptidantibiotika som gir endring i membranens permeabilitet (polymyxin B, kolistin)
- (v) Antibiotika som fungerer som vekstanaloger (sulfonamider, trimetoprim)

(Tronsmo, 2016). Videre skilles det mellom bredspektret og smalspektret antibiotika. Bredspektret antibiotika vil kunne uskadeliggjøre både Gram-positive og Gram-negative bakterier, mens smalspektret angriper kun et fåtall av bakterier for eksempel enten Gram-positive eller kun Gram-negative. Årsaken til dette er at Gram-negative bakterieceller har en mer komplisert oppbygd cellevegg enn Gram-positive celler. Hos Gram-positive celler består celleveggen hovedsakelig av omtrent 90% peptidoglukan. Peptidoglukan er et nettverk bestående av repeterende disakkarider: N-acetylmuraminsyre (NAM) og N-acetylglukosamin (NAG) som igjen er bundet sammen med polypeptider. I celleveggen hos Gram-negative bakterier er det kun 10% peptidoglukan. Ytterst i celleveggen er det et lipopolysakkaridlag (LPS) hvor det blant annet er efflux-pumper, porinkanaler og lipid A. Effluxpumper er utløpspumper som kan pumpe ut for eksempel toksiner, i porinkanalene foregår det transport inn og ut av cellen, mens lipid A er et molekyl som kan fungere som endotoksin. Innenfor LPS-laget er det et periplasmisk rom, en gellignende substans hvor det finnes transportproteiner, hydrolytiske enzymer, bindingsproteiner og kjemoreseptorer. Videre er det et tynt lag med peptidoglukan før cytoplasmamembranen. Fordi celleveggen er ulikt oppbygd hos Gram-positive og Gram-negative bakterier reagerer de også ulikt dersom de eksponeres for toksiner eller antibiotika (Tronsmo, 2016). Tilstedeværelsen av effluxpumper og poriner hos Gram-negative bakterier gjør dem mer motstandsdyktige mot toksiske stoffer som antibiotika fordi disse mekanismene de utfører bidrar til å kontrollere hvorvidt et antibiotikum kommer inn i cellen.

### 1.1.1.1 Antibiotika som angriper celleveggen: $\beta$ -laktam-antibiotikum

$\beta$ -laktam er en type antibiotika som inneholder en  $\beta$ -laktam-ring i strukturen og hovedsakelig vil dette antibiotikumet hemme celleveggsyntese. Dette utføres ved at den etterligner D-alanyl-alanine delen av peptidkjeden av peptidoglukanet i celleveggen. Penicillin bindende protein (PBP) som vanligvis vil bindes til denne under celleveggsyntese vil isteden bindes til  $\beta$ -laktam. PBP blir dermed ikke tilgjengelig for celleveggsyntese når nytt peptidoglukan skal lages. Cellen klarer ikke å motstå det osmotiske trykket på grunn av svekket cellevegg og cellen går i lysis (Kapoor et al., 2017).

Første  $\beta$ -laktam som ble detektert var penicillin, og ikke lenge etter dette ble  $\beta$ -laktamase oppdaget, et enzym som kan kløyve  $\beta$ -laktam. Dette førte til at det ble produsert kjemiske modifikasjoner av penicillin for å håndtere utvikling av resistens. I dag finnes det svært mange typer  $\beta$ -laktam antibiotika som enten er naturlig forekommende, delvis syntetisk eller hel-syntetisk (Tronsmo, 2016). Underklasser av  $\beta$ -laktam inkluderer cefalosporin, monobaktam, penicillin og karbapenem. Innen cefalosporin er det flere generasjoner: første, andre, tredje og senere generasjoner, hvor tredje generasjon er nødvendig å ta i bruk for å hemme vekst av ESBL-produserende bakterier (Iredell et al., 2016). Antibiotikumet kan også brukes av en pasient sammen med inhibitorer for  $\beta$ -laktamase. Vanlige inhibitorer er amoxicillin-klavulansyre, ampicillin-sulbaktam og cefoperazone-sulbaktam da disse øker effektiviteten til  $\beta$ -laktam antibiotikumet (Rodríguez-Baño et. al., 2018).

På 1960-tallet ble det observert en økende forekomst av resistens mot  $\beta$ -laktam antibiotika og man fortsatte med å finne nye antibiotikum for å hindre utvikling av resistens. Løsningen ble karbapenem-antibiotikum. Den første karbapenemen var thienamycin, og denne endte opp med å fungere som modell for senere karbapenemer. Denne hadde en hydroksyetyl sidekjede som gjorde at den skilte seg fra andre penicilliner og cefalosporiner, som isteden har en acylamino substituent på sidekjeden på  $\beta$ -laktam ringen. Hydroksyetylkjeden er viktig på grunn av dens stereokjemi og for antibiotikumets aktivitet generelt. Men selv om thienamycin var et gjennombrudd i videre utvikling av antibiotika viste det seg at denne var uegnet fordi den var kjemisk ustabil i blant annet vandige løsninger. Den var derimot forløper til andre karbapenemer som er i bruk i dag, som imipenem som i 1985 var den første karbapenemen som var tilgjengelig for behandling. Videre ble enda mer stabile karbapenemer tatt i bruk som også hadde et enda bredere spekter, blant annet meropenem, ertapenem og doripenem (Papp-Wallace



et al., 2011). Karbapenem har vist seg å være et gunstig antibiotikum da det gir lite eller ingen kryss-allergiske reaksjoner, samtidig som det er konsentrasjonsuavhengig. I tillegg er det bredspektret og fungerer mot Gram-negative, Gram-positive og anaerobe bakterier (Codjoe & Donkor, 2018).

Tabell 1.1. Oversikt over ulike  $\beta$ -laktam antibiotika: penicilliner, cefalosporiner (med underklasser) og karbapenemer (Bush & Bradford, 2016).

<b><math>\beta</math>-laktam antibiotikum</b>			
<b>Penicilliner</b>	<b>Cefalosporiner med underklasser</b>		<b>Karbapenemer</b>
Benzylpenicillin	Cefalexin	Cefalosporin I	Thienamycin
Ampicillin	Cefuroxime	Cefalosporin II	Imipenem
Amoxicillin	Ceftazidime	Cefalosporin III	Meropenem
	Cefotaxime	Cefalosporin III	Doripenem
	Cefepime	Cefalosporin IV	Ertapenem

### 1.1.1.2 Antibiotika som angriper proteinsyntese: Aminoglykosider og makrolider

Aminoglykosider og makrolider er antibiotikum som hindrer proteinsyntese. Proteinsyntesen foregår på bakterienes ribosomer. Et bakterielt ribosom består av flere underenheter, nemlig 30S (Svedberg-enhet) og 50S som tilsammen utgjør 70S. 30S ribosomal underenhet inneholder en 16S rRNA (ribosomalt RNA) underenhet og 21 proteiner. 50S inneholder 23S rRNA, 5S rRNA og 34 proteiner (Tronsmo, 2016). 16S rRNA genet er høyt konservert gjennom evolusjonen og egner seg derfor særdeles godt for å bestemme fylogenetisk slektskap mellom bakteriearter (Janda & Abbott, 2007; Tronsmo, 2016).

Aminoglykosider er et positivt ladet molekyl som vil feste seg til den negativt ladde cellemembranen til bakterien hvor de videre entrer cellen gjennom porer i cellemembranen. Når de kommer til ribosomene i cytoplasma forårsaker de feilavlesning av RNA ved at de interagerer med 16S rRNA på 30S underenheten. Dette resulterer i at translasjonen avsluttes for tidlig (Kapoor et al., 2017). Eksempel på aminoglykosidantibiotikum er amikacin, gentamicin og streptomycin.

Makrolider er antibiotikum som retter angrepet mot 23S rRNA i 50S ribosomal underenhet, nærmere bestemt peptidyl transferase senteret av molekylet. Det fører til at en uferdig

polypeptidkjede slippes for tidlig (Kapoor et al., 2017). Eksempel på makrolidantibiotikum er erytromycin.

### **1.1.1.3 Antibiotika som hemmer replikasjon av DNA: Fluorokinoloner (FQ)**

Fluorokinoloner (FQ) er et antibiotikum som hemmer enzymet DNA gyrase og topoisomerase IV. Disse enzymene er nødvendig for at bakteriecellen skal kunne utføre transkripsjon og replikasjon av DNA molekylet. DNA gyrase sin oppgave er å lage nick i dobbeltrådig DNA (dsDNA) slik at det får negativ supercoil når det er separert under gjennomføring av transkripsjon eller replikasjon (Kapoor et al., 2017), mens topoisomerase IV er viktig for at kromosomet skal separeres (Lindgren et al., 2003). Ciprofloxacin er eksempel på FQ-antibiotikum.

### **1.1.1.4 Peptidantibiotika som gir endring i membranens permeabilitet: Kolistin**

Polymyxin brukes for å behandle infeksjoner forårsaket av Gram-negative bakterier, og fungerer ved at det gir celleveggen økt permeabilitet gjennom hydrofile og polare interaksjoner (Sun et al., 2018). Polymyxin E, også kjent som kolistin, har et polykationisk peptid som har både lipofil og hydrofil domene. Den kationiske delen av molekylet vil interagere med LPS-laget i den Gram-negative bakteriens cellevegg (Caniaux et al., 2017). Det skapes en elektrostatisk interaksjon mellom det negativt ladde molekylet lipid A i bakteriens cellevegg og de positivt ladde kationene hos polymyxin (Sun et al., 2018). Den økende permeabilitet i bakteriens cellevegg resulterer i at bakteriecellen går i oppløsning (Caniaux et al., 2017).

Kolistin er et antibiotikum som lenge har vært brukt i landbruk, blant annet for å kontrollere infeksjoner hos produksjonsdyr, og i noen land har det vært brukt som vekstpromotor. De siste årene har man derimot sett at dette er et antibiotikum som kan være verdifullt som «siste utvei» antibiotikum for mennesker og kan virke dersom annet antibiotikum ikke fungerer. Om en bakterie er resistent mot for eksempel karbapenem kan kolistin vært et alternativ. Kolistin har vist seg å være effektiv mot infeksjoner som er forårsaket av bakterier som *E. coli*, *Klebsiella* spp. og *P. aeruginosa* (Caniaux et al., 2017; Sun et al., 2018).

### **1.1.1.5 Antibiotika som hemmer metabolismeveier: Trimetoprim**

Noen antibiotika kan fungere som vekstfaktoranaloger. En vekstfaktoranalog er et molekyl som ligner på vekstfaktoren som cellen er avhengig av, men som ikke fungerer. Cellen får dermed

ikke produsert produkter som den er avhengig av for å overleve (Tronsmo, 2016). Trimetoprim er en konkurrerende hemmer for enzymet dihydrofolatreduktase, som er et nødvendig enzym innen folsyremetabolisme (Kapoor et al., 2017). Dihydrofolatreduktase omdanner næringsstoffet folat til tetrahydrofolat, som er den aktive formen for folat i cellene som blant annet er avgjørende for å danne nukleinsyrer. Trimetoprim brukes ofte for å behandle urinveisinfeksjon (UVI) da det er et antibiotikum som skilles ut i nyrene, dermed gir det antibakteriell effekt i urinen (Andersen, 2019).

### 1.1.2 Antibiotikaforbruk og seleksjonspress

Overbruk av antibiotika anses som en av de viktigste årsakene til utvikling av resistens (Ventola, 2015), og det er stor variasjon mellom ulike nasjoner med tanke på hvor regulert bruken av antibiotika er. I Norge er den totale bruken av antibiotika hos mennesker blitt redusert med 21% siden 2012, og generelt er forekomsten av AR lav i forhold til andre land. Tiltak som er blitt gjort for å redusere forekomsten av AR ser ut til å være vellykkede (NORM/NORM-VET, 2017). Allikevel er det viktig å opprettholde en forsiktig bruk for å hindre videre spredning av resistens. Etter at antibiotika kom på markedet er det globalt blitt distribuert millioner av tonn antimikrobielle midler som har blitt benyttet til å behandle mennesker og dyr, samt brukt i renholdsmidler og lignende (Davies & Davies, 2010; Smith et al., 2015). Det er blant annet estimert at omtrent 80% av antibiotika-forbruket i USA benyttes på produksjonsdyr, enten som vekstpromotor eller til behandling (Ventola, 2015). Store mengder antibiotika, produsert med og uten resept, blir distribuert og benyttet i jordbruk og aquakultur, og blir i enkelte deler av verden sluppet direkte ut i miljøet og spredt i svært stor grad (Davies & Davies, 2010). Ikke alle land har like streng regulering, og antibiotika kan noen steder kjøpes over disk uten resept. Videre har netthandel bidratt til at det kan kjøpes antibiotika fra land med dårlig regulering til land hvor reguleringen er langt strengere. Disse faktorene bidrar til overbruk (Ventola, 2015). Videre har ukorrekt og ukritisk bruk bidratt til økt forekomst av AR. For eksempel fungerer ikke antibiotika mot virus, allikevel blir antibiotika foreskrevet ved forkjølelse, halsbetennelse, ørebetennelse og ved andre luftveisinfeksjoner selv om det ikke har noen virkning, i tillegg er det en ukritisk bruk av bredspektret antibiotika. Denne typen antibiotika dreper langt flere bakterier, men den bidrar også til økt forekomst av ARB. Ved bruk av smalspektret antibiotika blir angrepet mot den aktuelle bakterien mer målrettet (Folkehelseinstituttet, 2018). Dessuten vil smalspektret antibiotika i mindre grad uskadeliggjøre resten av mikrobiotaen i tarmen. Mengden av antibiotika som utleveres bør altså

være restriktiv, men den må samtidig ha en tilstrekkelig virkning slik at gjenlevende patogene bakterier ikke utvikler resistens (Tronsmo, 2016)

I tillegg til antibiotika er det mange uheldige stoffer som mennesker har sluppet ut i naturen, særlig etter den industrielle revolusjonen. Miljøet har blitt utsatt for petroleums kjemikalier, løsemidler, søppel, avfallsprodukter fra industrielle prosesser for å nevne noe. Videre har det blitt dumpet både organiske og uorganiske toksiner i elver, på land, i luften og i havet. Tidligere ble arsenikk, kvikksølv og jod brukt både industrielt og som medisin før antibiotika gjorde sitt inntog. Mikroorganismer har dermed i lang tid levd i fiendtlige miljøer hvor de har vært avhengig av å ha gode forsvarsmekanismer for å overleve. Blant annet bruker noen mikroorganismer pumpesystemer, effluxpumper, for å skille ut toksiske stoffer (Davies & Davies, 2010). Dette kan muligens ha bidratt til økt seleksjon av bakterier som i større grad har klart å beskytte seg mot fiendtlige miljøer og dermed gjort veien til AR kortere. Singer et al., 2016 påpeker at ARG ofte finnes i bakterier sammen med gener som koder for resistens mot kjemikalier som også kan være skadelig for bakteriecellen. Mikroorganismer utsettes i stor grad for både biocider og desinfeksjonsmidler, både gjennom renholdsmidler i hjemmet og i industri. Dersom dette ikke utføres grundig nok vil ikke alle bakteriene drepes, og de utvikler resistens mot disse midlene. Noen resistensmekanismer er vanlig for både biocider og antibiotikum, og på den måten kan det utvikles AR når en bakterie utsettes for desinfeksjonsmidler. Det burde dermed muligens omtales som resistensgener, fremfor ARG, fordi genene ikke eksplisitt koder for AR, men resistens generelt (Singer et al., 2016).

## 1.2 Antibiotikaresistens

Dersom en bakterie har utviklet resistens betyr det at den har egenskaper som gjør at den er motstandsdyktig mot legemidlene som skal uskadeliggjøre den. På den måten kan den fortsette å formere seg og fremkalle sykdom til tross for at den lever i et miljø med antibiotika (Folkehelseinstituttet, 2012). Utvikling av resistens har funnet sted i tusenvis av år før mennesker begynte å bruke antibiotika som legemiddel da det er en del av bakterienes naturlige forsvar og deres konkurranse for å overleve i ulike miljø. Det er funnet ARB og ARG på øde og avsidesliggende steder som underbygger nettopp dette. Økt bruk av antibiotika hos mennesker og dyr, samt større utslipp av toksiner i miljøet har derimot bidratt til et større seleksjonspress blant mikrobene.

Om en bakterie er resistent mot et antibiotikum kan avgjøres ut fra minimum inhiberende konsentrasjon (MIC). Dette er den minimale konsentrasjonen av et antibiotikum som er nødvendig for at bakterien skal hemmes under standardiserte forhold. Brytningspunktet til MIC viser hvor utsatt eller resistent en bakteriestamme er for et aktuelt antibiotikum (Iredell et al., 2016). Dersom en person er infisert av en resistent bakterie må det benyttes et antibiotikum med et bredere spekter, alternativet kan være å bruke et «siste utvei»-antibiotikum. Ved infeksjon av resistente mikrober kan det også være aktuelt å benytte kombinasjonsterapi. Dersom en bakterie er totalt resistent kan det være svært utfordrende å behandle pasienten. At det utvikles resistens mot antibiotika anses derfor som svært alvorlig.

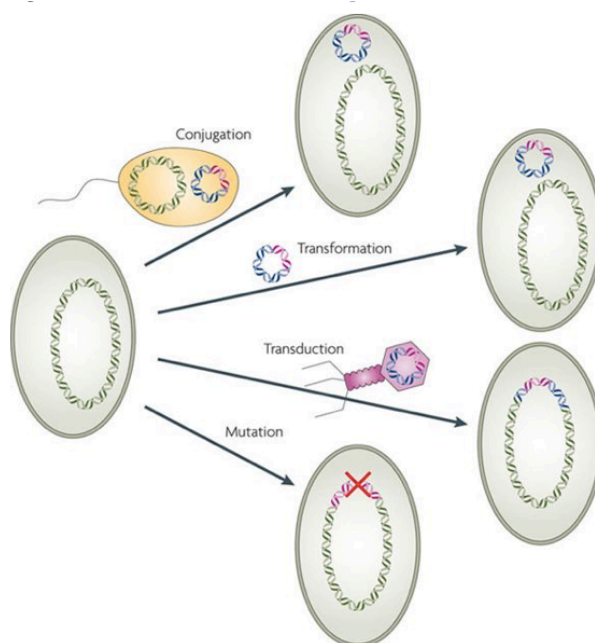
### 1.2.1 Iboende og ervervet resistens

Resistens mot antibiotika kan være en iboende eller en ervervet egenskap hos bakterier. Noen bakterier er naturlig resistent mot antibiotika, og dersom de utsettes for et miljø med antibiotika vil de som uttrykker resistensmekanismer selekteres og overleve (Folkehelseinstituttet, 2012). Dette er en egenskap som er felles for taksonomisk relaterte organismer. Genene som koder for resistensmekanismen er da er lokalisert på kromosomet til organismen, og kan ikke overføres horisontalt, kun vertikalt gjennom celledeling. Eksempel på iboende resistens kan være effluxpumper. Ved ervervet resistens til et antibiotikum har en organisme tilstedeværelse av et gen som ikke er opprinnelig tilstede hos andre taksonomisk relaterte organismer. Dette kan spres mellom bakteriene ved horisontal genoverføring (HGO) (Perry et al., 2014). At gener kan deles horisontalt, og ikke kun vertikalt gjennom celledeling, er en viktig årsak til at resistens spres raskt mellom bakterier. Dette fenomenet ble oppdaget i Japan på midten av 1950-tallet (Davies & Davies, 2010). Bakterier kan for eksempel dele plasmider ved HGO. Et plasmid er et sirkulert DNA som replikeres uavhengig av bakteriens hovedkromosom. I tillegg har det gener som bakterien ikke nødvendigvis er avhengig av for å overleve, som for eksempel AR (Tronsmo, 2016).

Ervervet resistens kan oppstå dersom det er en mutasjon i genomet til organismen. En mutasjon forekommer når en basesekvens endres, noe som kan føre til endring i proteinet som uttrykkes hos organismen. Dette kan skje spontant eller ved at organismen eksponeres for kjemikalier eller stråling. Konsekvensene kan være skadelig, nøytrale eller fordelaktig. En skadelig effekt kan være at et enzym bli inaktivt, mens en fordelaktig konsekvens kan være at organismen får større evne til å overleve i et miljø, for eksempel et miljø med antibiotika (Tronsmo, 2016).

Eksempel på ervervet resistens kan være gener som koder for  $\beta$ -laktamaser. Gener som koder for disse enzymene er svært utbredt, samtidig som mutasjoner fører til økt spekter av resistens (Davies & Davies, 2010).

En bakterie kan oppnå ervervet resistens på flere måter: gjennom transformasjon, transduksjon eller konjugasjon. Ved transformasjon blir fritt DNA tatt opp fra omgivelsene, noe som kan foregå naturlig i ulike økosystemer. Dette skjer ved at DNA fra lyserte celler blir tatt opp av levende bakterier. Det fremmede DNAet må videre tas opp av hovedkromosomet og integreres ved rekombinasjon. Bakterielt DNA kan også deles gjennom transduksjon, hvor virus vil være årsak til overføringen. Virus kan angripe bakterier og formere seg ved at de overfører sitt eget arvemateriale til cellen, og viruset sitt arvestoff tar over bakterien. Ved transduksjon går ikke alltid angrepet av bakteriecellen som planlagt. I stedet for at viruset sitt DNA blir pakket inn i viruset sin proteinkappe blir heller deler av bakteriens DNA pakket inn. For at genene skal komme til uttrykk må de inkorporeres i genomet til den bakterien som mottar dem. En annen form for genoverføring er konjugasjon som er overføring av plasmid mellom ulike bakterier (Tronsmo, 2016). Inc/rep er vanligste måte å klassifisere plasmid på, og det er funnet 28 Inc typer hos *Enterobacteriaceae*. IncF er et av de mest vanlige plasmidene og kommer fra *E. coli*. På dette plasmidet er det beskrevet gener som koder for ESBL, karbapenemase, aminoglysid-modifiserende enzymer, samt gener som koder for plasmid-mediert kinolon-resistens (Rozwandowicz et al., 2018). I figur 1.2 vises en oversikt over hvordan gener kan deles eller endres ved konjugasjon, transformasjon, transduksjon og mutasjon.



Figur 1.2. Ulike mekanismer for ervervet resistens. Hentet fra Andersson & Hughes, 2010.

I tillegg til ekstrakromosomale plasmid inneholder bakterielt DNA flere flyttbare elementer som fasiliterer for deling av gener som potensielt kan kode for AR. Disse kan være transposoner og integroner, som er mobile gen-elementer (MGE). Disse kan flyttes på innen et genom i en celle (Iredell et al., 2016). De kan videre spres mellom ulike bakterier dersom genene for eksempel er lokalisert på et plasmid.

Transposoner ble først beskrevet som «hoppende gener» av Barbara McClintoc (Tronsmo, 2016). På endene av DNAet som koder for transposonet finnes det korte, omvendte, repeterende sekvenser, samt enzymet transportase, som er nødvendig for å flytte på sekvensen. Transposoner inneholder gener som kan være viktig for organismen, som for eksempel AR, og genene kan deles horisontalt mellom bakterier gjennom konjugasjon (Tronsmo, 2016).

Integroner er genetiske elementer i bakterielt DNA som inneholder et rekombinasjonssystem. Disse er i stand til å integrere, uttrykke og utveksle genkassetter. Integroner anses ikke for å være et MGE, men genkassetene er mobile fordi de kan flyttes til andre integroner eller til andre steder i organismens genom. Det er blitt identifisert over hundre genkassetter, og blant disse finner man de vanligste klassene av AR. Integroner anses dermed som svært viktig for uttrykking av resistensgener (Davies & Davies, 2010; Domingues et al., 2012). Blant gener som koder for AR er det funnet  $\beta$ -laktamaser, trimetoprim og kinoloner. Blant integronene som er

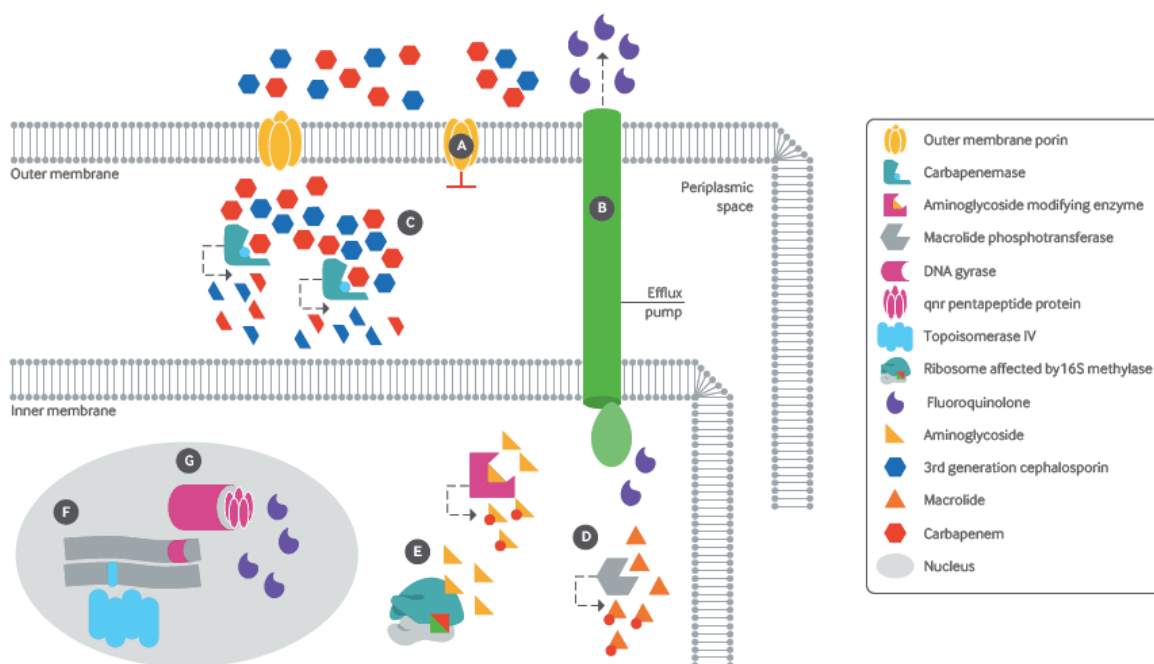
mest utbredt finnes klasse 1 integroner. Disse kan se ut til å ha vært tilstede allerede før antibiotika-æraen, og har vært viktig for spredning av resistens (Domingues et al., 2012).

Det finnes mye kunnskap om genoverføring blant mikroorganismer og hvordan dette påvirker utvikling av resistens. Allikevel mangler det fortsatt kunnskap om hvilke faktorer som bidrar til å styre disse prosessene i bakteriepopulasjoner. Det er for eksempel ikke noen definerte grenseverdier for hva som er relevante HGO frekvenser for overføring av resistensgen som fører til resistensutvikling hos en organisme som gir klinisk signifikant effekt (Steinbakk et al., 2014).

### 1.2.2 Resistensmekanismer

Bakterier har utviklet ulike mekanismer for resistens som hindrer antibiotikumet å fungere som det skal. Ulike bakterier har ulike mekanismer for å utføre dette. En bakterie kan produsere spesifikke enzymer som hydrolyserer antibiotikumet slik at det ikke lenger er aktivt. Eksempel på dette er  $\beta$ -laktamase som hydrolyserer  $\beta$ -laktam-antibiotika i periplasmisk rom slik at antibiotikumet ikke forstyrrer syntese av celleveggen. Gram-negative organismer kan dessuten forhindre at antibiotikumet kommer inn i cellen ved at poriner i ytre cellemembran lukkes eller antall poriner reduseres.  $\beta$ -laktamase og FQ er små hydrofile molekyler som kommer inn i Gram-negative celler gjennom porinene, og en reduksjon i antall poriner fører til lavere konsentrasjon av antibiotika i cellen. Bakteriecellen kan endre strukturen hvor antibiotikumet skal bindes, men en viktig forutsetning er at dette ikke påvirker funksjonen til strukturen. Et eksempel kan være endring i ribosomenes underenhet, noe som kan føre til at antibiotikumet ikke kan bindes, og forhindrer proteinsyntese. Bindingssetet for PBP kan også endres, noe som er en foretrukket mekanisme hos Gram-positive bakterier. Hos Gram-negative bakterier er produksjon av  $\beta$ -laktamase en foretrukket mekanisme for resistens. I tillegg bruker Gram-negative bakterier effluxpumper som effektivt pumper ut antibiotika og toksiner som kommer inn i cellen. Dermed blir ikke konsentrasjonen høy nok til at det blir gjort skade på bakteriecellen. Bakteriecellen kan også gjennom mutasjon endre et trinn i en metabolsk vei slik at trinnet ikke lenger er inkludert i metabolismen som antibiotikumet skal blokkere (Kapoor et al., 2017; Tronsmo, 2016). Figur 1.3 (Iredell et al., 2016) illustrerer ulike mekanismer for AR hos *Enterobacteriaceae*.





Figur 1.3. Ulike mekanismer for antibiotikaresistens hos *Enterobacteriaceae*. (A) Poriner som hindrer antibiotika å komme inn i cellen. (B) Effluxpumper som pumper ut antibiotika og toksiske stoffer som har kommet inn i cellen. (C)  $\beta$ -laktamase som hydrolyserer  $\beta$ -laktam antibiotika i periplasmisk rom slik at det ikke forstyrrer syntisering av peptidoglukan. (D) Intracellulære enzymer som degraderer antibiotika. (E) 16S rRNA metylase hindrer at aminoglycide blir bundet. (F) FQ-antibiotika bli ineffektiv på grunn av mutasjon i DNA gyrase og topoisomerase IV gener. (G) FQ blir ikke bundet til DNA gyrase fordi pentapeptid Qnr proteiner imiterer målet. Hentet fra Iredell et al. 2016.

### 1.2.2.1 Resistensenzymmer - ESBL

Som følge av utbredt bruk av  $\beta$ -laktam antibiotika er det blitt selektert frem bakterier som produserer  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL). ESBL er enzymer som er i stand til å hydrolysere  $\beta$ -laktam-antibiotika som penicillin, første-, andre-, tredje generasjons cefalosporiner og aztreonam. Temoneira  $\beta$ -laktamase (TEM) og sulfhydryl variabel  $\beta$ -laktamase (SHV) er  $\beta$ -laktamaser med smalt spektrum (Paterson & Bonomo, 2005), og disse var blant de første detekterte penicillinase. ESBLene som ble detektert for første gang på 80-tallet var hovedsakelig varianter av disse (Bajaj et al., 2016). Cefalosporin-antibiotikum ble dermed introdusert, noe som ble ansett som et viktig steg i kampen for å hindre AR mot  $\beta$ -laktam antibiotikum. I 1983 ble det derimot rapportert om  $\beta$ -laktamaser som kunne hydrolysere et utvidet spektrum av cefalosporiner. Genet for enzymet ble funnet på plasmidet hos organismen, og det var en mutasjon i et nukleotid som førte til endringen. Genet kodet originalt for SHV-1 (Paterson & Bonomo, 2005).

I dag finnes det utallige enzymer innen ESBL, men det er ikke internasjonal enighet om hvilke betegnelser som skal benyttes for å omtale disse (Folkehelseinstituttet, 2010). På grunn av økende kompleksitet i nomenklaturen separerte Giske et al. (2008) de ulike ESBL-holdige bakteriene inn i følgende grupper: ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> og ESBL<sub>KARBA</sub>. Hvor ESBL<sub>A</sub> inkluderer enzymer som kan hydrolysere penicilliner og de fleste cefalosporiner. Disse er ikke resistent mot karbapenemer. ESBL<sub>M</sub> betegner diverse ESBL, hvorav M står for «miscellaneous». Videre er ESBL<sub>M</sub> delt inn i to undergrupper, nemlig ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>M-D</sub>. I undergruppen ESBL<sub>M-C</sub> finnes plasmid-mediert ampicillin hydrolyserende (AmpC) β-laktamase, mens i ESBL<sub>M-D</sub> er oxacillin hydrolyserende-ESBL (OXA-ESBL). Den siste gruppen, ESBL<sub>KARBA</sub>, finnes enzymene som hydrolyserer karbapenem-antibiotika. Denne gruppen har også undergrupper, nemlig ESBL<sub>KARBA-A</sub>, ESBL<sub>KARBA-B</sub> og ESBL<sub>KARBA-D</sub> (Giske et al., 2008).

En oversikt over denne inndelingen vises i tabell 1.2, hvor enzymene som er inkludert er blitt screenet etter i denne studien.

*Tabell 1.2. Oversikt over ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> og ESBL<sub>KARBA</sub> som det er blitt screenet etter i studien.*

ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M</sub>	ESBL <sub>KARBA</sub>		
	ESBL <sub>M-C</sub>	ESBL <sub>KARBA-A</sub>	ESBL <sub>KARBA-B</sub>	ESBL <sub>KARBA-D</sub>
CTX-M	CMY	KPC	IMP	OXA-48
TEM-ESBL			VIM	
SHV-ESBL			NDM-1	
SFO-1				

I den første undergruppen ESBL<sub>A</sub> finnes varianter av TEM og SHV som har et bredere spekter av substrat, og kalles i hovedsak TEM-ESBL og SHV-ESBL (Bush & Jacoby, 2010). Videre ble det på 1990-tallet rapportert om enzymet cefotaximase, identifisert i München (CTX-M), som kunne hydrolysere cefalosporiner på et klinisk signifikant nivå (Davies & Davies, 2010). CTX-M er i dag blant de mest vanlige klassene av ESBL enzymer og gjenkjennes ved at det hydrolyserer antibiotikumet cefotaxime (Iredell et al., 2016). Genene for dette enzymet og deres varianter overføres gjennom HGO, og er dermed svært utbredt og distribuert internasjonalt (Davies & Davies, 2010). Fenotype CTX-M har blitt funnet i friske mennesker, i matprodukter, produksjonsdyr og i kloakk, noe som underbygger at det er utbredt, og det ser ut til å være mest

utbredt innen *Enterobacteriaceae* (Bajaj et al., 2016). CTX-M hydrolyserer cefotaxime lettere enn ceftazidime, i tillegg er det noen CTX-M som også hydrolyserer cefepime (4.generasjon). SFO-1 er en ESBL som er mindre relatert til TEM og SHV enn CTX-M (Bush & Jacoby, 2010). SFO-1 hydrolyserer et bredt spekter av  $\beta$ -laktam antibiotika, men ikke cefamycin eller karbapenem (Matsumoto & Inoue, 1999). I tillegg kan SFO-1 hemmes av  $\beta$ -laktam inhibitorer som klavulansyre (Bush & Jacoby, 2010).

ESBL<sub>M</sub> inkluderer undergruppene ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>M-D</sub>. ESBL<sub>M-C</sub> inkluderer plasmid-mediert AmpC som har en hydrolytisk profil som ligner ESBL<sub>A</sub>, hvor AmpC hydrolyserer penicillin, aztreonam og første, andre og tredje generasjons cefalosporin. I tillegg hydrolyserer AmpC cefamycin. Den hemmes ikke av samme inhibitorer som enzymene i ESBL<sub>A</sub>, men av cloxacillin og boronsyre. Ett av de mest vanlige enzymene hos plasmid-mediert AmpC er CIT, og i CIT-familien av enzymer finnes CMY-2. Hos varianter av *bla*<sub>CMY-2</sub> har det blitt observert en økt MIC mot antibiotikum som cefotaxime, cefepime, ceftazidime og aztreonam (Bajaj et al., 2016). ESBL<sub>M-D</sub> inkluderer OXA-ESBL, som hydrolyserer oxacillin. OXA-ESBL inkluderer blant annet OXA-18 og -45, som medfører resistens mot cefotaxime. Noen ganger er bakteriene også resistent mot aztreonam og ceftazidime. Det er generelt lite data på hvor spredt OXA-ESBL er (Bajaj et al., 2016).

ESBL<sub>KARBA</sub> er en gruppe av enzymer som er i stand til å hydrolysere «siste utvei»-antibiotikumet karbapenem. Blant de mest spredte karbapenemasene finnes *K. pneumoniae* karbapenemase (KPC), metallo- $\beta$ -laktamase (MBL), oxacillin-hydrolyserende metallo  $\beta$ -laktamase (OXA), som også er klinisk signifikante (Bajaj et al., 2016). KPC går innunder ESBL<sub>KARBA-A</sub> og er blant de mest forekommende karbapenemasene i denne klassen. Genene som koder for dette enzymet er lokalisert på plasmidet, og bakterier med dette plasmidet er svært spredt i ulike deler av verden (Codjoe & Donkor, 2018).

Innen ESBL<sub>KARBA-B</sub> er noen av de mest forekommende karbapenemasene innen MBL, som Verona intergron-encoded metallo- $\beta$ -laktamase (VIM), New Delhi metallo- $\beta$ -laktamase-1 (NDM-1), samt Imipenem-resistent *Pseudomonas* (IMP). VIM og IMP har noen likheter, blant annet at genet som koder for disse enzymene bæres på plasmidet, og er forbundet med integroner. ESBL<sub>KARBA-D</sub> inkluderer blant annet OXA-48 som foreløpig er blant de mest spredte og vanlige karbapenemasene i *K. pneumoniae*. OXA-karbapenemase har vist seg og raskt kunne mutere og utvide dens spekter av aktivitet (Codjoe & Donkor, 2018).

### 1.3 Forekomst og spredning av antibiotikaresistens i miljøet

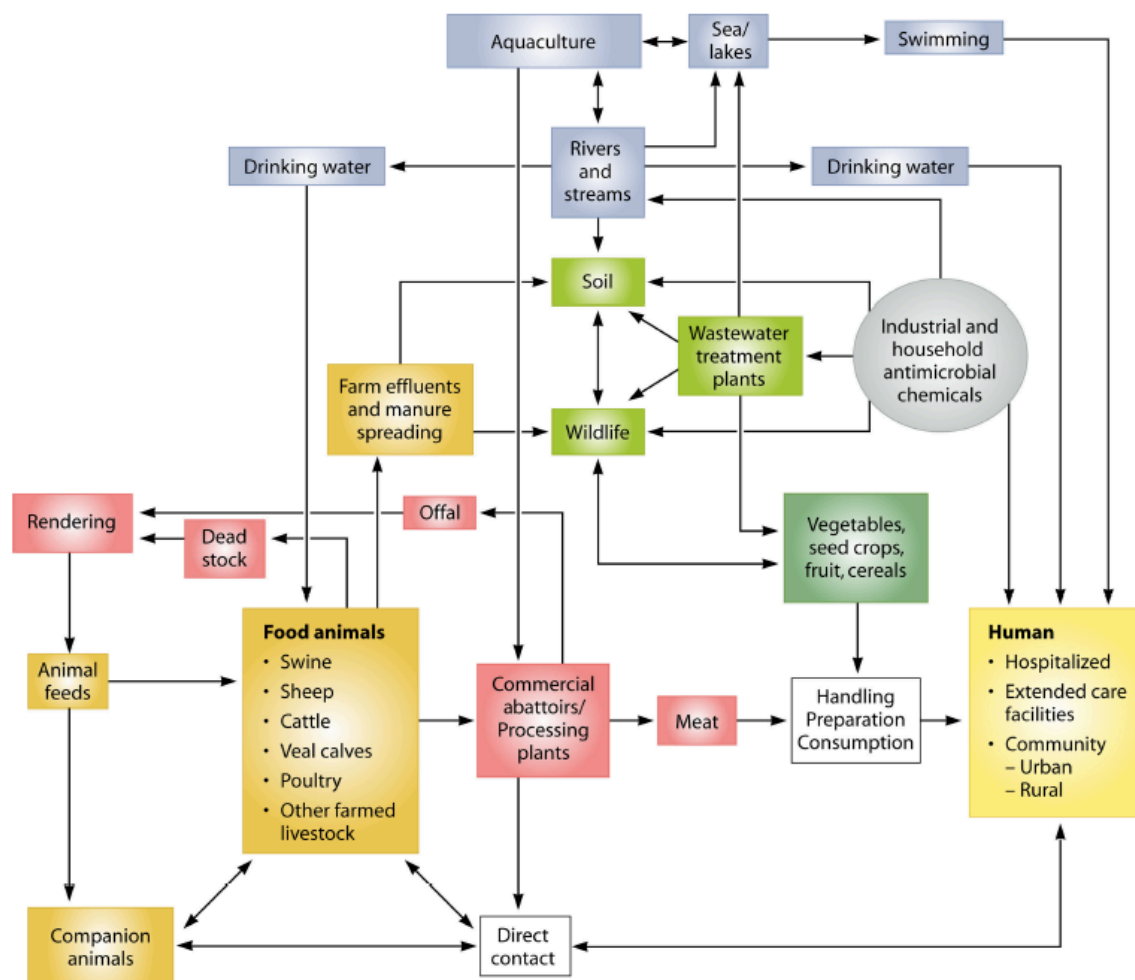
Utfordringen og alvoret som AR representerer er godt kjent i ulike fagmiljø. Det har vært mye fokus på AR på sykehus og blant mennesker som trenger medisinsk hjelp. Frem til nylig har ikke utbredelse av AR i naturlig miljø fått like stor oppmerksomhet. Det har derimot blitt mer kunnskap om hvordan miljø spiller en viktig rolle i spredningen av ARB og ARG. Dersom det skal produseres handlingsplaner og iverksettes tiltak for å redusere prevalensen av AR må naturlig miljø inkluderes (Singer et al., 2016). Nyere studier har nemlig vist at dette kan være kilde til resistensgener som kan spres til humanpatogene organismer og infisere mennesker gjennom dyr eller matkjeden. Resistens i naturlig miljø kan også øke som følge av mer eksponering av antibiotika gjennom gjødsling eller kloakk. Dette aspektet av AR må forstås for å ha en holistisk tilnærming til problemstillingen (Steinbakk et al., 2014).

Det er en utbredt bruk av antibiotika i husdyrhold og jordbruk. Dette bidrar til antibiotika-kontaminering av møkk som kan brukes videre som gjødsel (Baquero et al., 2008). Det er kjent at antibiotika brukes i husdyrproduksjon for å promotere vekst og for å virke sykdomsforebyggende, ikke nødvendigvis bare til terapeutisk bruk. Det er stor variasjon mellom land hvor utbredt dette er, men det ser ut til å utgjøre en risiko for spredning av AR. Avløp i forbindelse med husdyrproduksjon kan derfor være en viktig kilde for spredning av ARG og ARB til miljø (Waseem et al., 2017).

Generelt kan bakterier som slippes ut i vandig miljø via avløp og renseanlegg inneholde ARG. Disse kan settes inn i transposoner, integroner og plasmid, og på denne måten blir vandige miljø en stor plattform for deling av ARG mellom bakterier som kan være humanpatogene. Samtidig blir genene introdusert til bakterier som har sitt naturlige habitat i miljøet og som ikke ellers ville blitt eksponert for AR. Selv om dette ikke nødvendigvis er humanpatogene bakterier kan de bli bærere av ARG og være en kilde til AR som kan overføres til patogene mikroorganismer (Baquero et al., 2008). Det er dessuten en kompleks sammensetning av faktorer som bidrar til forekomsten av ARG blant bakterier når de er i miljøet. Dette kan være miljøfaktorer som temperatur, konkurranse fra andre organismer og generelt hvor fiendtlig miljøet er. Det er med andre ord en dynamisk balanse som påvirker om de ARG er verdt å beholde for bakteriene. Disse tar nemlig plassen til andre gener som kan bidra til større grad av overlevelse, og det koster bakteriene å holde på dem (Singer et al., 2016).

Kommunale renseanlegg kan være mulig kilde for spredning av AR. I denne type anlegg er det både høy tetthet av bakterier og antibiotika, samt at det produseres avløpslam som biprodukt hvor det kan være høy tetthet av ARB og ARG (Waseem et al., 2017). I avløpsvann blandes det mange typer biologiske rester og mikroorganismer fra et stort antall mennesker (Baquero et al., 2008). Dette bidrar til at det er en stor plattform for utveksling av AR og ARG mellom bakteriene. På grunn av mulig tilstedeværelse av koliforme bakterier som kan være bærer av MGE kan behandlingsanlegg for drikkevann også være kilde for AR (Waseem et al., 2017). I tillegg er det stort fokus på avløp og avløpsanlegg som er i forbindelse med sykehus eller andre institusjoner innen helsevesenet. Dette er etablissement hvor det foregår behandling ved bruk av antibiotika. Det antas derfor det at det er høyere andel av antibiotika og AR her enn i andre avløpsanlegg, og har dermed en høy grad av bakteriell utveksling av ARG (Baquero et al., 2008; Waseem et al., 2017). Dessuten er det ikke alle typer antibiotika som degraderes like lett. Dette kan skyldes deres fysiokjemiske og biologiske karakteristikk (Waseem et al., 2017), og som dermed fører til at det kan gå gjennom renseanleggene uforandret og muligens komme ut i miljøet.

Davies & Davies (2010) påpeker at det har blitt rapportert om enorme mengder toksisk avfall, biocider, desinfeksjonsmiddel, metaller og andre residuer fra industri, som dumpes i miljøet. Her vil det være stor variasjon mellom ulike land på grunn av ulikt miljøvern og regulering. Blant de mest ekstreme tilfellene kan det nevnes at det i Hyderabad i India ble dumpet over 50 kg ciprofloxacin i elver pr. dag av en farmasøytisk fabrikk (Davies & Davies, 2010). Til tross for at mye rapporteres er det mest sannsynlig store mørketall. Menneskelig aktivitet har i stor grad bidratt til å øke seleksjonspresset blant mikroorganismer. Dette har igjen økt forekomsten av reservoaret av resistens i naturen og muligens omfanget av virulensgener (Davies & Davies, 2010). I figur 1.4 vises en illustrasjon av hvordan antibiotika og AR kan spres til blant annet miljø, mennesker, landbruk, akvakultur, renseanlegg for avløpsvann og mye mer.



Figur 1.4. Illustrasjon av spredning av antibiotika og AR innen samfunn, landbruk, sykehus, behandling av avløpsvann og miljø. Hentet fra Davies & Davies, 2010.

Som det fremkommer av figur 1.4 er spredning av antibiotikaresistens et komplekst kretsløp som består av mange faktorer som omhandler menneskeskapt aktivitet og mikrobenes naturlige evolusjon og tilpasning til miljøet de lever i. Det er sammenheng mellom matproduksjon, dyr, jordbruk og miljø, noe som krever at helheten i utfordringen forstås (Steinbakk et al., 2014). Som figur 1.4 viser er det mange veier for ARB og ARG for å nå ut til miljøet. Deretter kan det finne veien tilbake til mennesker gjennom matkjeden, og potensielt utgjøre risiko dersom disse er patogene bakterier.

## 1.4 Tiltak for å hindre spredning av antibiotikaresistens

Det er stor variasjon i utbredelsen av AR mellom ulike land og verdensdeler. I noen land er dette nøye regulert og det jobbes iherdig med å kartlegge omfanget av resistens, mens i andre områder, særlig i u-land, er det mindre grad av regulering. Selv i land med nøye regulering kan resistens øke. Det er blant annet blitt observert økning av ESBL hos *E. coli* i Canada og Australia. Videre har forekomsten av resistens mot ciprofloxacin økt hos *E. coli* i de samme landene (Iredell et al., 2016).

I Norge er det blitt gjort en rekke tiltak for å redusere forbruket av antibiotika. I 1999 ble Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) opprettet, og Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler (NORM-VET) ble etablert i 2000. Hensikten med disse organene er å kartlegge omfanget av AR, og å overvåke utviklingen av resistens over tid, samt å se dette i forhold til hvordan situasjonen er i Norge kontra andre land (UNN, u.å; Vetrinærinstituttet, u.å). I NORM og NORM-VET sin rapport fra 2017 fastslås det at forekomsten av AR i Norge er lav hos mennesker og dyr. Dette kan skyldes et generelt lavt forbruk og et fordelaktig forbruksmønster (NORM/NORM-VET, 2017). I mars 2018 var European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) i Norge for å kartlegge håndteringen av AR-problematikken her til lands. Selv om det generelt er lav forekomst av antimikrobiell resistens i Norge er det viktig å påpeke at forekomsten av ESBL-produserende bakterier har økt de siste ti årene. Dette inkluderer tredje generasjons cefalosporiner. Videre har norske sykehus siden 2010 opplevd utbrudd av vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VRE). Det er viktig å håndtere dette på et tidlig stadium da utbrudd på sykehus i Europa har vist at AR raskt kan spres (ECDC, 2019). Til tross for forsiktig bruk av antibiotika ser forekomsten av resistens ut til å øke, også i Norge.

I rapporten «Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak» (Steinbakk et al., 2014) presenteres flere tiltak som bør iverksettes for å hindre spredning av AR. Blant annet trekkes det frem at det må innhentes mer kunnskap om forekomst AR fra ulike miljø, med hovedvekt på bakterier som finnes i tarmfloraen til mennesker og dyr, samt tilsvarende mikrober som finnes i havet og i jord. Det må anerkjennes at mikrober spres via matvarer og at det derfor er nødvendig å overvåke matvarer, både importerte og de som produseres innenlands. I tillegg må det utvikles vaksiner, og eksisterende vaksiner må benyttes, for mennesker, landdyr og fisk for å begrense bruken av antibiotika, og dermed begrense seleksjonspresset blant

mikrobene. Videre må det utvikles bedre diagnostiske verktøy, slik at behandling av sykdom blir mer målrettet og at det unngås å foreskrive antibiotika ved for eksempel virusinfeksjoner (Steinbakk et al., 2014).

Tilslutt må det erkjennes at AR er en global utfordring, og derfor er det nødvendig med internasjonalt samarbeid for løse problemet som ARB representerer. Norge må være en pådriver i jobben med å fremme tiltak internasjonalt som bidrar til å hindre forurensning av miljø med antimikrobielle midler, samt bidra til en mer optimal bruk av antibiotika hos mennesker og dyr (Steinbakk et al., 2014).

## 1.5 Metodisk teori

### 1.5.1 Fenotypisk deteksjon av ESBL-produserende bakterier

For å screene etter ARB benyttes selektive skåler for dyrkning. Selektive medier inneholder komponenter som fremmer veksten av bakteriene som skal isoleres (Adams et al., 2016). I dette tilfellet ble det screenet etter ESBL-produserende bakterier, samt karbapenemase-produserende bakterier. Skålene som ble benyttet var Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE Agar (Thermo Fisher Scientific Inc, Basingstoke, Storbritannia) og Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar (Thermo Fisher Scientific Inc, Basingstoke, Storbritannia).

Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar (Thermo Fisher Scientific Inc) er kromogene selektive skåler som inneholder ceftodoxime sammen med andre antimikrobielle midler. Disse fremmer vekst av ESBL-produserende *E. coli* og organismer innen KESC, samt det vil undertrykke vekst av ikke ESBL-produserende mikroorganismer. Når et kromogent substrat tilsettes til mediet vil det gi farge til bakteriekoloniene når et spesifikt enzym hydrolyserer det (Gazin et al., 2012). Mikroorganismer innenfor KESC produserer galaktosidase som gir grønne kolonier. Dersom det produseres galaktosidase og glukuronidase vil koloniene bli blå, og bakteriestammen vil mest sannsynlig være *E. coli*. Det kan også dannes rosa kolonier dersom *E. coli*-stammen er galaktosidasenagativ (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a).

Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE Agar (Thermo Fisher Scientific Inc) er agar som inneholder et modifisert karbapenem som bidrar til identifisering av en rekke karbapenem-resistent bakterier, inkludert bakterier som produserer NDM-1. Det antas at rosa kolonier er karbapenemen-



resistent *E. coli*, mens blå kolonier antas å være karbapenemen-resistente organismer innen KESC ( Thermo Fisher Scientific Inc, 2011).

## 1.5.2 Molekylærbiologiske metoder

### 1.5.2.1 Polymerase kjedereaksjon

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode som benyttes for å amplifisere en spesifikk DNA-sekvens. I første trinn vil temperaturen økes slik at DNA-dobbel heliksen denatureres. Videre brukes det to oligonukleotid primere som bindes til 5' enden av det denaturerte DNA-molekylet. DNA-polymerase vil så katalysere den videre reaksjonen hvor nukleidbasene bindes til primerne og sekvensen dupliseres. Prosessen foregår som følger:

- i) DNA varmes opp til 94-98 °C for å denaturere DNA-tråden.
- ii) Temperaturen senkes til 37-65°C for at primerne skal bindes til bindingssetene på DNA-molekylet.
- iii) Temperaturen økes til 72°C slik at DNA-polymerase kan sørge for at nukleidbasene bindes til DNA-tråden og DNA-molekylet amplifiseres.

Disse trinnene gjentas i flere sykluser for å amplifisere store mengder DNA. DNA-polymerasen som benyttes kalles Taq polymerase og er isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*. Taq polymerase er dermed varmestabil og tåler den høye temperaturen som benyttes i PCR-reaksjonen uten å denaturere (Adams et al., 2016).

For å screene etter gener som koder for ulike ARG kan det benyttes multipleks PCR. Da brukes flere primerpar for å amplifisere flere målgen (Adams et al., 2016). For screening etter gener som koder for ESBL enzymer er det utviklet en multipleks PCR-analyse for å kjapt kunne detektere de mest forekommende genene innen  $\beta$ -laktamaser. Dette inkluderer primere som koder for blant annet CTX-M, TEM-ESBL, SHV-ESBL, NDM, VIM og KPC. CTX-M inkluderer gruppe 1, gruppe 2 og gruppe 9. Hvor det i gruppe 1 er CTX-M-1, CTX-M-3 og CTX-M-15. Gruppe 2 inkluderer CTX-M-2, mens gruppe 9 inkluderer CTX-M-9 og CTX-M-14 (Dallenne et al., 2010).

### 1.5.2.2 Renhetsmåling og kvantifisering av DNA

For å måle renheten til et DNA molekyl benyttes NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, MA, USA), samt den medfølgende programvaren. Da vil absorbansen til molekyler måles på innstilt bølgelengde. For å måle renheten til DNA brukes ratioen  $A_{260/280}$

nm. Dersom verdien er 1.8 er DNA molekylet rent, dersom det er lavere kan prøven være kontaminert av proteiner, fenoler eller andre kontaminanter som absorberes ved 280 nm. Ved måling av  $A_{260/230}$  nm bør verdien være mellom 2.0 og 2.2. Er den lavere enn dette kan det være kontaminanter tilstede som absorberes ved 230 nm som karbohydrater eller fenoler (Finton, 2019; Lindstedt, 2019).

For å måle mengde DNA som er tilstede i prøvene som skal analyseres kan Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Grand Island, NY, USA) brukes, som er en svært nøyaktig fluorescensbasert kvantitetsanalyse. Den kan måle kvantiteten til DNA, RNA og protein. Måten det gjøres på er at det brukes fargestoff som er selektiv for dsDNA, RNA og protein (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010b).

### **1.5.2.3 Agarose gelelektroforese**

Gelelektroforese er en metode som brukes for å skille DNA-fragmenter fra hverandre basert på deres negative ladning og ulike størrelse. Dette gjøres for å kontrollere at en PCR-reaksjon har vært vellykket og at det har blitt amplifisert DNA som har tilsvarende størrelse som transkriptet som primeren i PCR dekker (Nelson & Cox, 2005). For å utføre gelelektroforese lages en porøs agarose gel som blir plassert i et elektrisk felt. Agarosen lager et nettverk i gelen som gjør at små biter av DNA beveger seg raskere gjennom gelen enn større biter. Hastigheten på migrasjonen blir også påvirket av om det er sirkulært eller lineært DNA. Videre utnytter en at fosfatgruppene i DNA er negativt ladet og vil bevege seg mot den positive polen i strømfeltet. For at DNA-molekylet skal være synlig tilsettes fargestoff (Tronsmo, 2016). Fargestoff som kan tilsettes er GelRed® (Biotium, Fremont, CA, USA) som er fluoriserende farge som bindes til nukleinsyrer (Biotium, 2019). Disse vil fluorisere under ultrafiolett lys (UV), slik at båndene til DNA-molekylene blir synlig. For å vite hvor store båndene er benyttes en markør, såkalt ladder. Da sammenlignes båndene fra DNA med ladder for å finne størrelsen på DNA-fragmentene (Tronsmo, 2016).

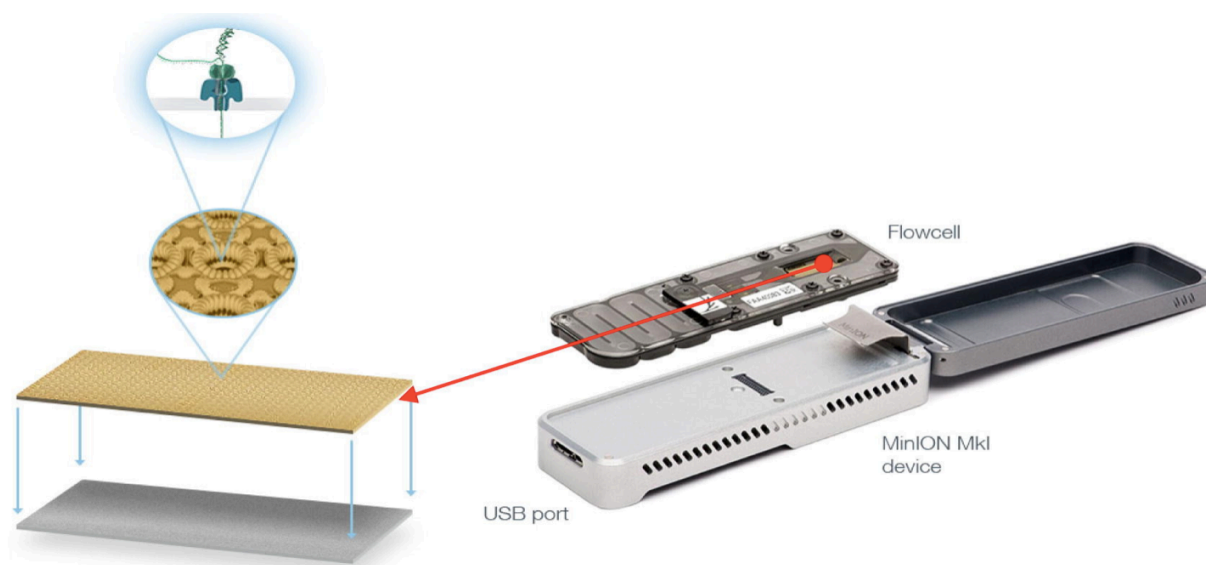
### **1.5.2.4 DNA-sekvensering med Sanger-metoden**

For å finne nukleinbasenes rekkefølge i en gensekvens kan Sanger-metoden brukes. Denne ble utviklet på 70-tallet og brukes fortsatt i dag, med noen modifikasjoner. For å gjennomføre Sanger-metoden blir det laget mange kopier av DNA-tråden ved bruk av PCR. I PCR miksen tilsettes DNA polymerase og deoksybasene (dNTP) adenin, guanin, tymin og cytosin, samt de fire tilsvarende dideoxybasene (ddNTP). ddNTP vil hindre at DNA-molekylet forlenges. I

motsetning til vanlig PCR benyttes bare én primer til Sanger PCR-reaksjon (Tronsmo, 2016). Skal en bruke «forward» og revers primer tilsettes de separat til to like prøver. Fordi ddNTP settes inn isteden for dNTP vil det produseres DNA med ulik lengde. ddNTP for hver av de ulike basene er fluoriserende merket slik at posisjonen til de ulike basene kan påvises. Videre brukes kapillærelektroforese for å separere basene før påvisning av de ulike basene med laser (Tronsmo, 2016). For å studere slektskapet mellom ulike bakterier sekvenseres ofte genet som koder for 16S rRNA (Janda & Abbott, 2007; Tronsmo, 2016).

#### **1.5.2.5 Nanoporesekvensering med MinION**

MinION (Oxford Nanopore Technologies) sekvensering er en metode som bruker nanopore-sensorer. Denne teknologien gjør det mulig å lese lange sekvenser av DNA ( $10^4$ - $10^6$  baser), i tillegg krever det lite utstyr og er mer kostnadseffektivt enn tidligere generasjoners sekvensering. Prinsippet for teknologien går ut på at porene som er på størrelse med en nanometer er en del av en biologisk membran. Denne membranen separeres av to kamre, *cis* og *trans*, som inneholder ledende elektrolytter. Det er elektroder i hvert kammer, og når spenningen skrues på vil elektrolyttionene bevege seg gjennom porene og generere et ionisk signal. Det negativt ladde DNA-molekylet tilsettes *cis*-kammeret og vil blokkere signalet når det går gjennom poren. Da vil de fysiske og kjemiske egenskapene til molekylet bli analysert (Feng et al., 2015). Oxford Nanopore Technologies (ONT) har utviklet et nanopore-basert DNA sekvenseringssystem kalt MinION. Dette er en liten enhet som ikke tar større plass enn en håndflate. Dessuten er det en billig og tidsbesparende metode (ONT, u.å.b). Figur 1.5 viser en illustrasjon av hvordan MinION-apparatet er oppbygd (Lu et al., 2016).



Figur 1.5. Illustrasjon av oppbygging av MinION-apparatet. Hentet fra Lu et al. 2016.

Basert på dataene som oppnås etter MinION sekvensering kan det utføres et raskt søk etter resistensgener gjennom ARMA, en analyse som brukes for å detektere AR mikroorganismer (ONT, u.å.a). For å sette sammen dataene som ble oppnådd kan programmet «CANU» benyttes. Dette er et program spesialisert på «assembly» for data fra blant annet nanoporesekvensering fra MinION. Programmet har tre faser: korreksjon, trimming og «assembly». I korreksjonsfasen vil informasjonen samles og basenes nøyaktighet forbedres. I andre fase vil sekvensene trimmes slik at det oppnås sekvenser av høyest mulig kvalitet. I «assembly» fasen forøkes det å identifisere de siste sekvenserings-feilene slik at sekvensene arrangeres i «contigs» og det oppnås best mulig overlapp-grafer, «assembly»-grafer og statistikk-grafer (Koren et al., 2017).

For verifisering av resultat etter nanoporesekvensering med MinION kan data sekvenserer på nytt ved bruk av MiSeq fra Illumina. Deretter kan data fra begge samlingene settes sammen ved hybrid «assembly» til én resultatfil, som da vil være av høy kvalitet. Dette ble ikke utført i denne studien, men skal gjennomføres etter innlevering. Resultatene sendes deretter til GenBank i USA (Lindstedt, 2019).

### 1.5.3 Antibiotika sensitivitetstest

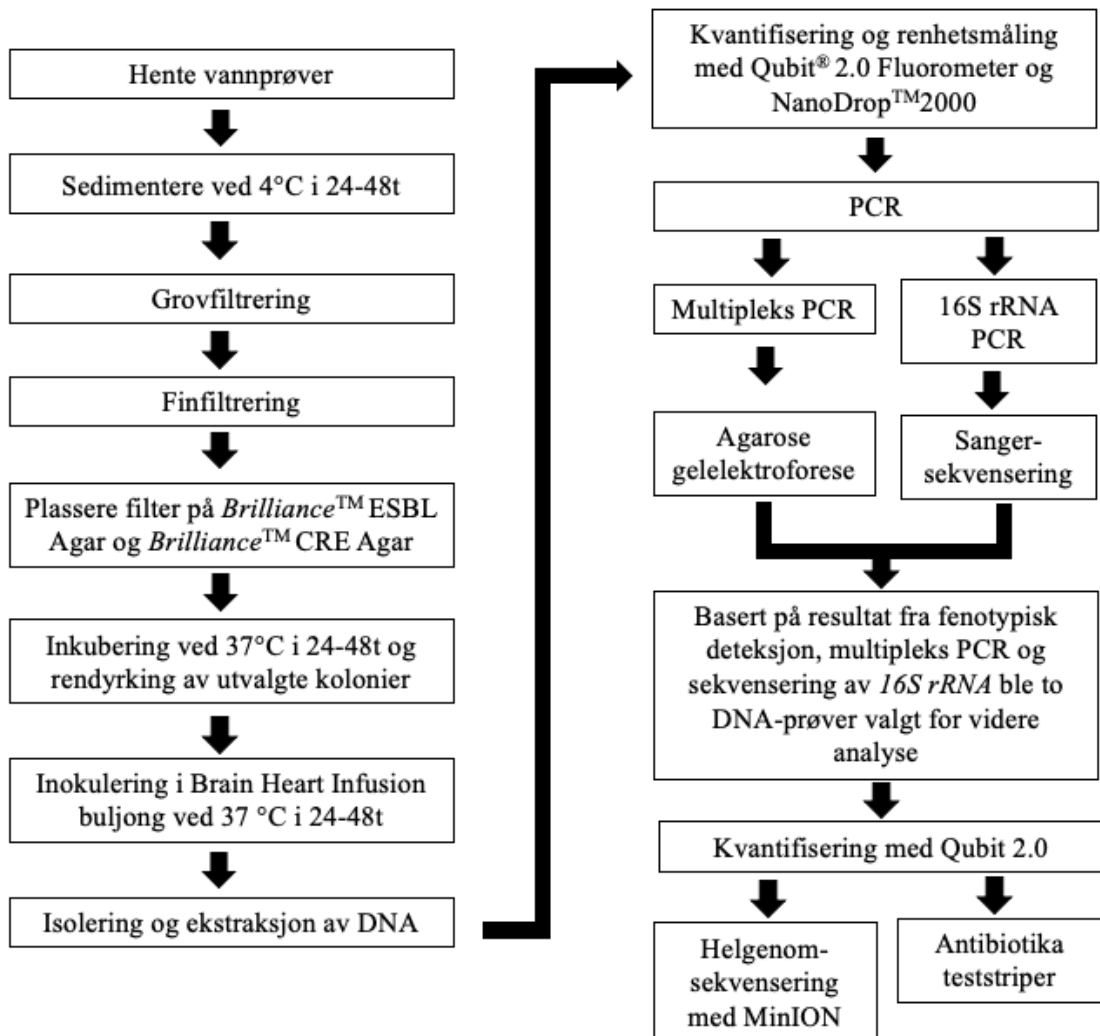
For å undersøke om en bakteriestamme er resistent mot flere ulike typer antibiotika kan det benyttes antibiotika sensitivitetstest (AST). «*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*» (EUCAST) har, i samarbeid med «*The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*» (ESCMID), utviklet en diskdiffusjonsmetode som samsvarer med MIC brytningspunkt. Denne er basert på Mueller-Hinton (MH) agar og inokulum som tilsvarer McFarland 0,5 standard i turbiditet (Matuschek et al., 2014). I denne oppgaven ble det brukt MH agar som inneholdt 5% saueblod, for å tilfredsstille behovene til krevende bakterier. Agaren inneholder i tillegg kjøtttekstrakt og syrehydrolysat fra kasein som skal tilføre vitaminer, mineraler, aminosyrer og nitrogen som er nødvendig for vekst. Videre er det lavt innhold av tymin og tymidin da disse kan hemme antibiotikumet trimetoprim (Thermo Fisher Scientific Inc, 2012).

På teststripsene er det ulik konsentrasjon av antibiotika, fra lav til høyere. Dersom bakteriestammen hemmes av aktuell konsentrasjon vil det ikke være vekst rundt område av teststripsen. Dersom bakterien er resistent vil ikke veksten hemmes. Hemmingssonene sammenlignes deretter med aktuelle MIC-verdier for antibiotikumet og bakterien som undersøkes ( Thermo Fisher Scientific Inc, 2012).

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Oversikt over prosessene og metodene som er benyttet

Identifiseringsprosessen besto av flere ulike trinn når det ble screenet etter ESBL- og KRE-produserende bakterier. I figur 2.1 vises en skjematisk oversikt over hvilke trinn som ble utført og i hvilken rekkefølge.



Figur 2.1. Skjematisk fremstilling av prosessene og metodene som er benyttet.

## 2.2 Prøveuttak

I begynnelsen av februar 2019 ble det hentet én vannprøve fra Andedammen og to fra Niagarabekken på NMBU, Campus Ås (Figur 2.2A). Prøvene ble sedimentert ved 4 °C i 24-48 timer før filtrering, og blir heretter referert til som:

S1: Andedammen

S2: Niagarabekken

S3: Niagarabekken

Siste vannprøve ble hentet av Professor Bjørn-Arne Lindstedt ved Ellingsrud industriområde i Ski i samme tidsperiode. Prøven ble sedimentert ved 4°C i 24-48 timer før filtrering og refereres heretter til som:

S4: Ellingsrud industriområde i Ski (Figur 2.2B).

Totalt ble det samlet inn fire vannprøver som ble filtrert og dyret på selektiv agar.



Figur 2.2. Kart over områdene hvor vannprøvene S1, S2, S3 (A) og S4 (B) ble innsamlet.

## 2.3 Fenotypisk deteksjon av ESBL-resistente og KRE-resistente bakterier med selektive medier

Whatman™ Quantitative filtreringspapir (589/1, svart bånd, 15 cm diameter) ble brukt til å grovfiltre 200 ml av hver vannprøve for å fjerne smuss. 100 ml av hver prøve ble deretter vakuumfiltrert gjennom EZ-Pak™ Membran Filter (0,22 µm porestørrelse, «white gridded», 47 mm) ved bruk av Millipore Microfil Support Frit (Merck, Darmstadt, Tyskland). Ett filter fra vannprøve S1, S2, S3 og S4 ble plassert på Oxoid Brilliance™ CRE Agar (Thermo Fisher

Scientific Inc, Basingstoke, Storbritannia) og ett filter av alle prøvene ble plassert på Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar (Thermo Fisher Scientific Inc, Basingstoke, Storbritannia), tilsammen åtte skåler. Disse ble inkubert i varmeskap med 37°C i 24-48 timer. Videre ble det valgt ut kolonier fra alle vannprøvene fra *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar og fra *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE Agar basert på fargescreening etter produsentens protokoll (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a; Thermo Fisher Scientific Inc, 2011). Disse ble strøket ut med steril podenål i plastikk på nye tilsvarende plater og inkubert i 24-48 timer ved 37°C. Tilsammen ble alle prøvene platet ut to ganger for å kunne slå fast at bakteriene vokste til tross for tilstedeværelse av antibiotika. Da kan det med større sikkerhet slås fast at bakteriene i koloniene er resistent mot antibiotikaene som er tilstede.

Når alle prøvene hadde blitt dyrket i to omganger på agarskålene ble det valgt ut syv kolonier fra S1 og S4. Årsaken til at disse ble valgt ut var fordi de viste tydelig vekst, i tillegg til at to av prøvene hadde en mørk blå farge noe som indikerer tilstedeværelse av *Escherichia* spp. I tabell 2.1. vises en oversikt over hvilke vannprøver som ble valgt og hvilken agar de vokste på.

Tabell 2.1 Oversikt over bakterieprøver som ble valgt ut til videre screening etter ESBL-resistens.

Prøve	Hentet fra	Agar
P1	S1- Andedammen	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar
P2	S1- Andedammen	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar
P3	S1-Andedammen	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar
P4	S4- Ellingsrud industriområde	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar
P5	S4- Ellingsrud industriområde	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar
P6	S4- Ellingsrud industriområde	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> CRE Agar
P7	S4- Ellingsrud industriområde	<i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> CRE Agar

Som tabell 2.1 viser var det fem bakteriestammer som vokste på *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar og to vokste på *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE Agar. Heretter blir prøvene referert til som P1-P7 utfra denne tabellen.



## 2.4 Isolering og ekstrahering av DNA, samt nedfrysning av bakterier

Bakteriekultur ble inokulert i 500 µl Brain Heart Infusion buljong (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Storbritannia) og dyrket i 1-2 døgn ved 37°C. BHI buljong ble laget etter produsentens anvisning. Videre ble DNA fra P1-P7 isolert og ekstrahert ved bruk av «*GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit*» fra Sigma-Aldrich (Merck, St.Louis, USA). Utførelsen ble gjort i henhold til produsentens anvisning for Gram-positive bakterier (Sigma-Aldrich, 2019). Elueringsbuffer i dette kittet ble ikke brukt, isteden ble det brukt «*SequalPrep™ Normalization Elution Buffer*» (Thermo Fisher Scientific Inc, Carlsbad, CA, USA). Årsaken er at Sigma-Aldrich sitt elueringsbuffer inneholder EDTA som kan forstyrre DNA-sekvensering.

500 µl bakteriekultur ble hver for seg overført til 2 ml kryorør (Nunc™CryoTubes™, Thermo Fisher Scientific Inc). Det ble tilsatt 500 µl 60% glycerol til rørene før de ble plassert i fryser ved -80°C for langtidsoppbevaring.

## 2.5 Kvantifisering og renhetsmåling av DNA

For å måle kvantiteten av DNA ble Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc) benyttet. Utførelsen ble gjort i henhold til produsentens bruksanvisning for dsDNA «broad range» (BR) kvantifisering. For å lage standard 1 og 2 ble det tilsatt 190 µl arbeidsløsning og 10 µl Qubit® dsDNA (double stranded DNA) BR Standard (Life technologies, Thermo Fisher Scientific) til prøverør (Life technologies, Thermo Fisher Scientific). For å måle kvantitet av DNA ble 198 µl Qubit® arbeidsløsning pipettert til prøverør, samt 2 µl av DNA-prøven som skulle måles. Prøverør ble tilsatt til Qubit®2.0 Fluorometer og verdiene ble avlest.

Renheten til DNA-molekylet ble kontrollert ved bruk av spektrofotometeret NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc) og programvaren som medfulgte. For kalibrering av apparatet ble 2 µl destillert vann plassert på linsen. Prøvene ble applisert på apparatet og det ble avlest på  $A_{260/280}$  (nm) og  $A_{260/230}$  (nm). Mellom hver prøve som ble avlest ble linsen tørket med papir.

## 2.6 Screening etter antibiotikaresistente gener

### 2.6.1 Multipleks PCR

For amplifisering av aktuelle resistensgener ble det brukt multipleks PCR. Primere som ble tilsatt hver mastermix 1, 2, 3 og 4 (M1, M2, M3 og M4) er oppgitt i tabell 2.2. Primerne er spesifikke for de ulike resistensgenene og positive resultat indikerer dermed tilstedeværelsen av gener som koder for aktuelle ESBL. For gener som koder for karbapenem-resistens ble primerne CAR1 og CAR2 benyttet, som er oppgitt i tabell 2.3.

Tabell 2.2 og tabell 2.3 viser oversikt over hvilke gener de ulike primerne bindes til i henholdsvis M1-4 og CAR1-2.

Tabell 2.2. Primere benyttet for å screene etter aktuelle gener som koder for ESBL, samt oversikt over primersekvens, gen og størrelse på PCR produktet.

Primer	Primersekvens (5'-3')	Gen	Antall basepar
<b>Mastermix 1 (M1)</b>			
MultiOxa48-Forward (F)	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> <sub>OXA48</sub>	281
MultiOxa48-Reverse (R)	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
MultiCTXMGp2-F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> <sub>CTX-M (gr 2)</sub>	404
MultiCTXMGp2-R	CGATATCGTTGGTGGTTCAT		
MultiTSOO-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	564
MultiTSOO-R	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG		
MultiTSOS-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	713
MultiTSOS-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
<b>Mastermix 2 (M2)</b>			
MultiCTXMGp9-F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla</i> <sub>CTX-M (gr 9)</sub>	561
MultiCTXMGp9-R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCTXMGp1-F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla</i> <sub>CTX-M (gr 1)</sub>	688
MultiCTXMGp1-R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiTSOT-F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	800
MultiTSOT-R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<b>Mastermix 3 (M3)</b>			
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	157
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
VIM-F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	564
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	460
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		

<b>Mastermix 4 (M4)</b>			
<i>rpoB</i> -F	CAGGTCGTCACGGTAACAAG	<i>rpoB</i>	512
<i>rpoB</i> -R	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC		
<i>16S</i> -F	AGAGTTTGATCXTGGCTCAG	<i>16S rRNA</i>	1505
<i>16S</i> -R	GXTACCTTGTTACGACTT		

Som tabell 2.2 viser kodet primerne som ble brukt for *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> (gr 1, gr 2 og gr 9), *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> og *bla*<sub>KPC</sub>. M4 ble brukt som kontroll, hvor primerne kodet for genet som uttrykker 16S rRNA og *rpoB*.

Tabell 2.3 Primere benyttet for å screene etter aktuelle gener som koder for karbapenemase-resistens, samt oversikt over primersekvens, gen og størrelse antall basepar.

<b>Primer</b>	<b>Primersekvens (5'-3')</b>	<b>Gen</b>	<b>Antall basepar</b>
<b>Mastermix CAR1 (CAR1)</b>			
CMY2-F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	188
CMY2-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACG		
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> <sub>OXA48</sub>	281
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	393
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT		
VIM-F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	564
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
<b>Mastermix CAR2 (CAR2)</b>			
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	157
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
SFC-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	<i>bla</i> <sub>SFC</sub>	268
SFC-R	CACTGTACTGCAGAGTGGCA		
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	460
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		

Som tabell 2.3 viser ble det screenet etter genene *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SFC</sub> og *bla*<sub>KPC</sub>.

For utførelse av multipleks PCR ble «*QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR Kit*» benyttet (Qiagen, Hilden, Tyskland). I tabell 2.4 vises oversikt over reagenser.

*Tabell 2.4. Oversikt over reagensene brukt til multipleks PCR. Primere var CAR1, CAR2, M1, M2, M3 eller M4.*

Reagenser	Volum ( $\mu$ l) (1 reaksjon)
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5
10x primer (2 $\mu$ M av hver primer)	2,5
RNAse-fritt vann	9
Templat DNA	1
<b>Totalt</b>	<b>25</b>

Som tabell 2.4 viser ble QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR Master Mix blandet med primer og RNAse fritt vann. Total mengde for åtte reaksjoner ble først blandet sammen i eppendorfrør. 24  $\mu$ l ble videre fordelt i 7 MicroAmp<sup>™</sup> 8-Tube Strip (0,2 mL) fra Applied Biosystems (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Kina) før 1  $\mu$ l templat DNA fra hver P1-7 ble pipettert til henholdsvis rør 1-7, hvorav totalt volum ble 25  $\mu$ l. Deretter ble MicroAmp<sup>™</sup> 8-Cap Strip (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Kina) plassert på rørene før prøvene ble kjørt i PCR-maskinen SimpliAmp<sup>™</sup> Thermal Cycler (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc). Temperaturprotokoll, tider ved hvert trinn og antall sykluser for PCR ved bruk av primerne M1, M2, M3 og M4 vises i tabell 2.5

*Tabell 2.5. Temperaturprotokoll, tider ved hvert trinn og antall sykluser brukt ved multipleks PCR med primere M1, M2, M3 og M4.*

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Antall sykluser
Aktivering av DNA-polymerase	15:00	95	1
Tre-trinnssyklus:			28
Denaturering	00:30	94	
Primer annealing	01:30	60	
Primer ekstensjon	01:30	72	
Endelig ekstensjon	10:00	72	1
Avkjøling	$\infty$	4	1

For CAR1 og CAR2 primere ble det benyttet en andre PCR-betingelser, disse vises i tabell 2.6.

Tabell 2.6. Temperaturprotokoll, tider ved hvert trinn og antall sykluser brukt ved PCR til multipleks CAR1 og CAR2.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser
Aktivering av DNA-polymerase	15 :00	95	1
Tre-trinnssyklus:			30
Denaturering	00:30	94	
Primer annealing	01:30	62	
Primer ekstensjon	01.30	72	
Endelig ekstensjon	10:00	72	1
Avkjøling	∞	4	1

## 2.6.2 Agarose gelelektroforese

PCR produkt fra prøvene P1-P7 fra multipleks PCR med bruk av primere M1, M2, M3, M4, CAR1 og CAR2 ble kontrollert ved bruk av agarose gelelektroforese.

Det ble laget liten og stor gel for kjøring av agarose gelelektroforese. Ved liten 1% agarosegel ble det blandet sammen 0,5 g SeaKem® LE agarosepulver (Lonza Rockland, ME, USA) og 50 ml 1X Tris-acetat-EDTA (TEA)-buffer (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA). Dette ble varmet opp i mikrobølgeovn i 01:30 min ved 750 W. Flasken ble nedkjølt før 2,5 µl GelRed™ Nucleic Acid (Biotium, Fremont, CA, USA) ble tilsatt. Gel-blandingen ble deretter støpt med brønnkam, hvor DNA-prøvene senere skulle tilsettes. For støpning av stor gel ble det brukt 2 g SeaKem® LE agarosepulver (Lonza Rockland, ME, USA), 200 ml 1X TEA-buffer og 10 µl GelRed™ Nucleic Acid (Biotium, Fremont, CA, USA), prosedyren ble ellers utført på samme måte som ved støping av liten gel. Liten gelen ble plassert i Mini Sub Gel elektroforesekar (Bio-Rad Laboratories Inc) og stor gel ble plassert i elektroforesekar Sub-cell GT (Bio-Rad Laboratories Inc).

Før applisering på gel ble alle DNA-prøvene tilsatt loading dye og vann. Det ble blandet 3 µl Agarose Gel Loading Dye, Ultra Pure Grade (6X) (VWR Life Science) med 4 µl H<sub>2</sub>O og 3 µl DNA. Når Agarose gel loading dye ultrapure (6X) (VWR Life Science) ble brukt opp ble Gel Loading Dye (6X) (Biolabs Inc, New England) benyttet. Det ble tilsatt 5-8 µl til brønnene av denne blandingen. Det ble også i noen brønner tilsatt 10 µl Quick-Load® 100 bp DNA ladder (New England Biolabs® Inc, Ipswich, England). Det ble brukt 80-100 V for kjøring av

elektroforese ved bruk av en Bio-Rad Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc). Prosessen tok en til to timer. Bildet av gelen ble tatt i GelDoc™ XR-maskin (Bio-Rad Laboratories Inc). Disse ble videre redigert i programmet GelDoc™ XR i Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc).

## 2.7 Sangersekvensering av 16S rRNA

### 2.7.1 PCR av 16S rRNA

For amplifisering av 16S rRNA ble kittet «*iProof™ High-Fidelity DNA polymerase*» (Bio-Rad Laboratories Inc) benyttet. Utførelsen ble gjort etter produsentens anvisning. Alle reagensene utenom templat DNA ble blandet sammen. Videre ble det tilsatt 38 µl til 7 MicroAmp™ 8-Tube Strip fra Applied Biosystems før 2 µl templat DNA fra hver P1-P7 ble tilsatt til henholdsvis rør 1-7. Oversikt over reagenser og volum vises i tabell 2.7. Oversikt over primersekvenser vises i tabell 2.8.

Tabell 2.7 Reagenser, konsentrasjon og volum av *iProof™ High-Fidelity DNA polymerase* (Bio-Rad Laboratories) benyttet til 16S rRNA PCR.

Reagens	Endelig konsentrasjon	Volum (µl) (1 reaksjon)
Iproof™ HF buffer	1x	8
dNTP	200 µM	0,8
«Forward»	0,25 µM	2
Revers	0,25 µM	2
PCR grade H <sub>2</sub> O	<b>Totalt 40 µl</b>	24,8
Iproof™ DNA polymerase	0,02 µl	0,4
Templat DNA	7,5-150 ng	2
	<b>TOT</b>	<b>40</b>

Tabell 2.8. Oversikt over primersekvens som ble benyttet for amplifisering av genet som koder for 16S rRNA før innsending til Sangersekvensering.

Primer	Sekvens (5' - 3')	Målgen	Produktstørrelse (bp)
«Forward»	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	~1500
«Revers»	GGTTACCTTGTTACGACTT		

PCR-rørene (MicroAmp™ 8-Tube Strip) ble deretter plassert i PCR-maskinen (SimpliAmp™ Thermal Cycler). Oversikt over temperaturprotokoll, tider ved hvert trinn og antall sykluser vises i tabell 2.9.

Tabell 2.9. Oversikt over temperaturprotokoll, tider ved hvert trinn og antall sykluser brukt ved PCR 16S rRNA.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser
Aktivering av DNA-polymerase	00:30	98	1
Tre-trinnssyklus:			35
Denaturering	00:10	94	
Primer annealing	00:30	60	
Primer ekstensjon	00:45	72	
Endelig ekstensjon	10:00	72	1
Avkjøling	∞	4	1

Videre ble det utført kvantitetsmåling av PCR-produktet ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer. Prosessen ble utført i henhold til produsentens bruksanvisning som nevnt under kapittel 2.5.

2.7.2 Rensing av 16S rRNA PCR-produkt og klargjøring til Sangersekvensering  
Kittet som ble brukt var «GenElute™ PCR Clean-Up Kit» (Sigma-Aldrich, Merck, USA). Prosedyren ble utført etter produsentens anvisning. Det ble tilsatt 5 x «bindings solution» volum, dvs 180 µl. I steg 5 av manualen ble det tilsatt 25 µl elueringsbuffer, isteden for 50 µl.

Etter rensing av PCR-produkt ble det gjennomført kvantitetsmåling ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer. Før innsending ble det tilsatt 5 µl PCR produkt og 5 µl 16S rRNA primer (Sigma-Aldrich, Merck, USA). Tilslutt ble DNA-prøvene sendt til Eurofins Genomics i Tyskland for sekvensering.

Basert på resultat fra fenotypisk påvisning, multipleks PCR og 16S rRNA sekvensering ble P1 og P2 analysert videre med nanoporesekvensering (MinION) og AST.

## 2.8 Nanoporesekvensering med MinION

Forberedelse og gjennomføring av nanoporesekvensering ble gjennomført av stipendiat Misti Dawn Finton. Før sekvensering ble kvantiteten til DNA-prøvene kontrollert med Qubit®2.0 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Grand Island, NY). Helgenomsekvensering ble gjennomført med kittene «*Flow Cell priming Kit*» (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Storbritannia) og «*Rapid Barcoding Kit*» (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Storbritannia) og ble utført etter produsentens protokoll.

## 2.9 Dataanalyse

### 2.9.1 Dataanalyse fra Sangersekvensering

For å analysere sekvensene fra 16S rRNA Sangersekvensering ble Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (nBLAST) benyttet fra nettsiden til National Center for Biotechnology Information (NCBI, u.å). Sekvensene som ble tilbakesendt fra Tyskland ble kopiert inn på denne nettsiden og «blastet». «Forward» og revers sekvens ble «blastet» hver for seg. I resultatene er det inkludert bakterier som ble vist i søk hos både «forward» og revers, samt at de har over 99% med samsvarende identitet som sekvensen som ble «blastet».

### 2.9.2 Dataanalyse fra nanoporesekvensering med MinION

Dataanalyse fra helgenomsekvensering med MinION (Oxford Nanopore Technologies) ble utført av stipendiat Misti Dawn Finton, professor Bjørn-Arne Lindstedt og Dr. Roger Meisal. Det ble først utført et raskt søk fra rådataene fra MinION (Oxford Nanopore Technologies) etter resistensgener gjennom ARMA, en analyse som benyttes for å identifisere antibiotikaresistente mikroorganismer. Rådataene ble i tillegg overført til NMBU sin tungregnemaskin, ORION (CIGENE, u.å) for «assembly». Dette arbeidet ble utført av Dr. Roger Meisal. ORION bruker «assembly»-programmet CANU. Deretter utførte Professor Bjørn-Arne Lindstedt søk etter resistens, serotyper og virulensgener i data fra ORION ved bruk av Center for Genomic Epidemiology ved Technical University of Denmark (DTU) (Joensen et al., 2015), en egenutviklet database, samt Rapid Annotation Subsystems Technology (RAST) (Aziz et al., 2008). Deretter ble relevante funn presentert slik at det kunne gjengis i denne studien.



## 2.10 Antibiotika sensitivitetstesting

Antibiotika sensitivitetstesting (AST) ble utført for å undersøke om P1 og P2 kunne være resistent mot flere sorter antibiotika og hvilken MIC de i så fall hadde. Nedfryste bakterieprøver ble strøket ut på Mueller-Hinton (MH) agar. Disse skålene ble deretter inkubert ved 37°C i 24 timer. Videre ble bakteriekultur fra P1 og P2 inokulert i steril saltløsning (0,85% NaCl i vann). Bakterieprøvene ble deretter visuelt sammenlignet med McFarland Standard 0,5 (Pro-lab Diagnostics, Storbritannia) før de ble strøket ut på MH agar (Pro-lab Diagnostics, u.å).


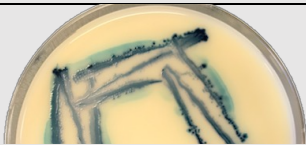


Det ble brukt test strips fra to ulike selskap. «MIC Test Strip for Antimicrobial Susceptibility Testing» fra Liofilchem Diagnostici (Roseto degli Abruzzi, Italia) ble brukt til å teste for trimetoprim, kolistin, streptomycin, cefepime og amoxicillin – klavulansyre. Amoxicillin – klavulansyre, cefepime og kolistin testet bakterienes evne til å tåle et miljø i antibiotikakonsentrasjoner på mellom 0,016 – 256 mg/L, mens trimetoprim ble undersøkt i konsentrasjonsområdet 0,002 – 32 mg/L og streptomycin i 0,064 - 1024 mg/L. Videre ble Oxoid M.I.C.Evaluator™ (M.I.C.E) test strips (Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, Storbritannia) plassert på MH agar hvor det ble testet for resistens mot erytromycin, gentamicin, amikacin, cefotaxime, ampicillin, meropenem, imipenem og ciprofloxacin. Stripsene som testet bakterienes evne til å tåle antibiotikumkonsentrasjon på mellom 0,015 - 256 mg/L var erytromycin, gentamicin, amikacin, cefotaxime og ampicillin. Meropenem, imipenem og ciprofloxacin testet bakterienes evne til å tåle antibiotikakonsentrasjon mellom 0,002 - 32 mg/L. For klinisk brytningspunkt ble det tatt utgangspunkt i The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) sine brytningspunkttabeller for å tolke inhiberingssoner og MIC (EUCAST, 2019). Det ble laget to paralleller av alle prøvene.




## 3 Resultater

### 3.1 Indikasjon på ESBL-produserende bakterier som ble funnet i vannprøver

Ved fenotypisk screening ble filter fra filtrerte vannprøver plassert på Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE Agar og *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar. Disse ble rendyrket og strøket ut på nye skåler to ganger for å kontrollere at de overlevde i miljø med  $\beta$ -laktam- og karbapenem-antibiotikum. Det ble tilsammen valgt ut syv prøver for videre analyse. Fenotypisk resultat av P1-P7 er presentert i tabell 3.1.

Tabell 3.1. Resultat fra screening etter ESBL- og KRE-produserende bakterier ved *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE Agar og *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar.

Prøve	Vannprøve	Bilde	Farge	Tolkning
P1	S1 Andedammen	 <i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar	Mørk blå	ESBL-positiv
P2	S1 Andedammen	 <i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar	Mørk blå	ESBL-positiv
P3	S1 Andedammen	 <i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> CRE Agar	Mørk gul	ESBL-negativ
P4	S4 Ellingsrud industriområde i Ski	 <i>Brilliance</i> <sup>TM</sup> ESBL Agar	Beige/ lys brun	ESBL-negativ

P5	S4 Ellingsrud industriområde i Ski	 <i>Brilliance™ ESB� Agar</i>	Beige/ lys brun	ESBL- negativ
P6	S4 Ellingsrud industriområde i Ski	 <i>Brilliance™ CRE Agar</i>	Beige/ lys brun	KRE-negativ
P7	S4 Ellingsrud industriområde i Ski	 <i>Brilliance™ CRE Agar</i>	Beige/ lys brun	KRE-negativ

Av prøvene som ble valgt ut for videre analyse var tre fra S1 (Andedammen) og fire fra S4 (Ellingsrud industriområde). P1 og P2 hadde mørkeblå kolonier, noe som indikerer at det er ESBL-produserende *E. coli* tilstede. P3 hadde en mørk gul farge som skilte seg fra de andre prøvene og P4 og P5 hadde en lys gul farge. Disse ble derfor tolket som ESBL-negativ. Koloniene som vokste på *Brilliance™ CRE Agar*, P6 og P7, hadde en beige/lys brun farge og var dermed KRE-negativ. Alle syv skålene ble tatt med videre i analysen.

### 3.2 Påvisning av antibiotikaresistente gener ved multipleks PCR

Det ble utført multipleks PCR og agarose gelelektroforese av alle prøvene for å screene etter aktuelle resistensgener. Primere for screening etter ESBL som ble brukt var *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> (gr 1, gr 2 og gr 9), *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> og *bla*<sub>KPC</sub>, mens primerne som ble bruk i screening etter karbapenem-resistens var *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SFC</sub> og *bla*<sub>KPC</sub>.

M4 ble benyttet som kontroll og inneholder primere som detekterer genene *rpoB* og *16S rRNA*. Resultatet kan ses i tabell 3.4 som er laget med utgangspunkt i bildene som er tatt i forbindelse med agarose gelelektroforese (vedlegg A).

Tabell 3.4. Tolkning av bilder fra agarose gelelektroforese som viser tilstedeværelse av gener som koder for aktuell antibiotikaresistens.

Prøve	CAR1	CAR2	M1	M2	M3	M4	
Primere	CMY, OXA48, IMP, VIM	NDM, SFC, KPC	OXA48, OXA, SHV, CTX-M (gr.2)	TEM, CTX-M (gr. 1), CTX-M (gr.9)	NDM, VIM, KPC	<i>rpoB</i>	16S rRNA
P1	-	-	-	-	-	+	+
P2	-	-	-	-	-	+	+
P3	-	-	-	-	-	+	+
P4	-	-	-	-	-	+	+
P5	-	-	-	-	-	+	+
P6	-	-	-	-	-	+	-
P7	-	-	-	-	-	+	-

Agarose gelelektroforese ble utført av PCR-produktene for å se om DNA til de ulike bakteriene kunne inneholde gener for resistens som det ble screenet etter. Som tabell 3.4 viser ble det ikke gjort positivt funn av aktuelle resistensgener.

### 3.3 Screening etter bakterieidentitet ved Sangersekvensering av 16S rRNA

DNA fra de ulike koloniene fra P1-P7 som koder for 16S rRNA ble amplifisert ved PCR og sendt til Eurofins Genomics i Tyskland for sekvensering. Sekvenser for «forward» og revers sekvens ble kopiert til nBLAST, hvorav bakterieidentitet ble vist. Resultatene som er presentert i tabell 3.5 er bakterier som ble påvist ved blast av «forward» og revers primer sekvens.

Tabell 3.5. Påvist bakterieidentitet etter Sangersekvensering og nBLAST søk for P1-P7 ved bruk av «forward» og revers primer.

Prøve	Bakterieidentitet	% «covery»	% identitets-sikkerhet i nBLAST
P1	<i>Shigella</i> spp. <i>Escherichia</i> spp.	98-100	>99
P2	<i>Escherichia</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	98-100	>99
P3	<i>Pseudomonas</i> spp.	99-100	>99
P4	-		<99
P5	-		<99
P6	<i>Enterococcus</i> spp	100	>99
P7	<i>Enterococcus</i> spp	100	>99

I tabell 3.5 vises bakteriestammene som vokste på de kromogene, selektive skålene. I P1 og P2 vises det over 99% likhet med *Escherichia* spp. og *Shigella* spp, med «covery» på 98-100%. P3 viser tilstedeværelse av *Pseudomonas* spp. med 99% likhet og 100% «covery». Sekvensene som ble sendt tilbake fra Sangersekvensering av P4 og P5 hadde korte sekvenser (Vedlegg C). I disse prøvene ble det ikke detektert bakterieidentitet som hadde over 99% likhet med noen bakterieslekt, som samsvarte med både «forward» og revers sekvens. P6 og P7 viste over 99% samsvarende identitet med *Enterococcus* spp, med 100% «covery».

Fordi det ble screenet etter ESBL- og KRE-produserende bakterier med klinisk relevans ble P1 og P2 valgt for videre analyse, da det var mulig at disse bakteriestammene kunne være *E. coli*.

### 3.4 Tilstedeværelse av resistensgener ved nanoporesekvensering (MinION)

Basert på fenotypisk og genotypisk resultat ble bakteriestammene i P1 og P2 valgt ut til helgenomsekvensering med MinION (Oxford Nanopore Technologies). Resultat fra helgenomsekvensering og «*What's in my pot*» (WIMP) bekreftet at bakteriestammene i både P1 og P2 var *E. coli*. Ved ytterligere analyser gjennom CANU ble det påvist gener som indikerte at begge bakteriestammene var uropatogen *E. coli* (UPEC). Dette fremkom da bakteriestammene inneholdt genene *yfcV*, *vat*, *fyuA* og *chuA*. Bakterien må inneha genene *yfcV* og *vat*, eller *chuA* sammen med *fyuA* for å være UPEC (Spurbeck et al., 2012). Stammene i P1 og P2 hadde alle fire (Vedlegg E). Ved bruk av «SeroType Finder» (Joensen et al., 2015) ble det påvist at bakteriestammene var UPEC serotype O25:H18. Det ble i tillegg påvist flere resistensfaktorer. De mest relevante resistensgenene som ble detektert er presentert i tabell 3.6.

Tabell 3.6. Oversikt over relevante resistensgen hos P1 og P2 ved nanoporesekvensering.

Prøve	Antibiotikaresistens	Identitet	Fenotype
P1	<b><math>\beta</math>-laktam</b>		
	$\beta$ -laktamase (uten navn, ampC-lignende gen)	96,60	Ceftazidim resistens
	<b>Makrolid</b>		
	<i>mdf(A)</i>	96,75	
	<i>mph(A)</i>	99,78	Makrolid resistens
	<b>Tetrasyklin</b>		
	<i>tet(B)</i>	99,59	Trimetoprim resistens
	<b>Trimetoprim</b>		
	<i>drfA5</i>	88,79	Trimetoprim resistens
P2	<b><math>\beta</math>-laktam</b>		
	<i>bla<sub>CTX-M-182</sub></i>	98,51	
	<b>Makrolid</b>		
	<i>mdf(A)</i>	96,91	
	<i>mph(A)</i>	99,34	Makrolid resistens
	<i>mph(A)</i>	99,78	Makrolid resistens
	<b>Tetrasyklin</b>		
	<i>tet(B)</i>	99,09	Tetrasyklin resistens
<b>Trimetoprim</b>			
	<i>drfA14</i>	98,76	Trimetoprim resistens

Som tabell 3.6 viser ble det gjennom nanoporesekvensering detektert flere gener som koder for ulike resistensfaktorer. I P1 ble det påvist gen som koder for resistens mot makrolid-antibiotikum, tetrasyklin og trimetoprim. I tillegg ble det detektert en  $\beta$ -laktamase som ikke har

noe navn, men genet var ampC-lignende. I P2 ble genet *bla*<sub>CTX-M</sub> detektert med 98,51% likhet til *bla*<sub>CTX-M-182</sub>. *bla*<sub>CTX-M</sub> koder for resistens mot  $\beta$ -laktam-antibiotikum. Videre ble det påvist gener som koder for resistens mot makrolid- og trimetoprim-antibiotikum. Genet som koder for tetrasyklin, *tet(B)*, ble detektert ved bruk av «ResFinder» (Zankari et al., 2012).

Det detektert flere virulensfaktorer hos bakteriestammene, blant annet papG, Ag43 og UpaG. I tillegg ble genene *invA* og *invE* påvist, som er invasjonsrelaterede gener, som er unike for UPEC. Det ble videre detektert gen som koder for integron for integrase klasse 1, samt påvist mutasjon i genet *parC*, som er relatert til topoisomerase IV.

For mer utfyllende tabell om hvilke gener som bakteriestammene i P1 og P2 hadde, se vedlegg E.

### 3.5 Påvisning av resistens mot cefotaxime, ampicillin, erytromycin og trimetoprim ved antibiotika sensitivitetstesting

P1 og P2 ble inokulert til saltløsning (0,85% NaCl i vann) og strøket ut på MH agar. Deretter ble det plassert på teststrips som inneholdt ulike antibiotikum med ulik konsentrasjonsgradient. Bakteriekulturene viste seg å være resistent mot flere av antibiotikaene de ble testet for. Resultatet er presentert i tabell 3.7 som viser gjennomsnittlig MIC ved vekst av to paralleller.

Tabell 3.7. Gjennomsnittlig MIC av P1 og P2 med to paralleller. \*Verdi som overstiger MIC for aktuelt antibiotikum.

	Klinisk brytningspunkt (mg/L) (EUCAST) <sup>1</sup>	Prøve 1 (mg/L)	Prøve 2 (mg/L)
<b><math>\beta</math>-laktam antibiotikum – hemmer celleveggsyntese</b>			
Penicillin: Ampicillin (tredje generasjon)	8	>256*	>256*
Penicillin: Amoxicillin med klavulansyre	8	4	5
Cefalosporin: Cefotaxime (tredje generasjon)	2	>32*	>32*
Cefalosporin: Cefepime fjerde generasjon	4	1,25	1,5
Karbapenem: Imipenem	8	0,12	0,12
Karbapenem: Meropenem	8 (ECOFF <sup>2</sup> = 0.125)	0,3	0,3
<b>FQ antibiotikum – hemmer DNA replikasjon</b>			
Ciprofloxacin	0,5	0,12	0,12
<b>Aminoglykosider – angriper 30S rRNA</b>			
Amikacin	16	1,5	1
Gentamicin	4	0,5	0,5
Streptomycin	64	3	4
<b>Makrolid antibiotikum – angriper 50S rRNA</b>			
Erytromycin	> eller = 0,8	>256*	>256*
<b>Polymyxin antibiotikum – angriper celleveggen</b>			
Kolistin	> eller = 2	1,5	1,5
<b>Vekstanalogt antibiotikum – hemmer folsyremetabolisme</b>			
Trimetoprim	4	>32*	>32*

<sup>1</sup> EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

<sup>2</sup> ECOFF - Ecological Cut-Off



Resultatene fra AST viste at bakteriestammene fra P1 og P2 var resistent mot fire ulike antibiotika. Begge viste resistens med en MIC som var tydelig høy mot ampicillin (tredje generasjon), cefotaxime (tredje generasjon), erytromycin og trimetoprim. P1 og P2 var ikke klinisk resistent mot de andre antibiotikaene de ble testet for, nemlig amoxicillin med klavulansyre, cefepime (fjerde generasjon), imipenem, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, streptomycin og kolistin.

Videre ble det påvist at bakteriestammene tålte et miljø som inneholdt 0,3 mg/L av antibiotikumet meropenem. EUCAST sin MIC-verdi ligger på 8 mg/L, men som notat på brytningspunkttabeller skriver EUCAST at for screening etter meropenem anbefales det en cut-off på >0,125 mg/L, som er Ecological Cut-Off (ECOFF)-verdi.

På bakgrunn av fenotypiske og genotypiske analyser som ble gjennomført ble det påvist to bakteriestammer som ble identifisert som UPEC O25:H18. Begge bakteriestammene var multiresistent og ESBL-produserende, i tillegg til at det ble detektert flere gener som koder for resistens- og virulensmekanismer.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Påvisning av ESBL-produserende bakterier

I denne studien er forekomsten av ESBL<sub>A/M/KARBA</sub>-produserende bakterier i akvatisk miljø på NMBU blitt undersøkt. NMBU er et internasjonalt universitet med mange utvekslingsstudenter og tilreisende. I tillegg er det et landbruksuniversitet med aktivitet som omhandler husdyrhold. Allikevel er det ikke et område hvor det nødvendigvis forventes at det skal detekteres multiresistente bakterier. I 2018 ble det gjort en tilsvarende studie av to masterstudenter fra NMBU hvor det blant annet ble detektert ESBL-produserende *E. coli* (Skaflem, 2018; Solberg, 2018). Isolatene ble hentet fra Niagara, bekken som springer ut fra Andedammen. Derfor var det interessant å undersøke om det var mulig å finne tilsvarende resultat to år på rad. Ellingsrud industriområde i Ski ble undersøkt for å studere et bredere utvalg av vannområder for prevalens av ESBL-produserende bakterier. Området er valgt ut på bakgrunn av mye industrivirksomhet, i tillegg til at det drives mye jordbruk der.

Bakteriene som vokste frem på to av skålene med Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar hadde mørkeblå kolonier, noe som gav en sterk indikasjon på at dette var fremvekst av ESBL-produserende *E. coli*. Mistanken om at dette var resistensbakterier ble verifisert ved hjelp av genotypiske metoder som er nødvendig for å bekrefte et fenotypisk resultat. Fenotypiske metoder som utplating på selektive agarskåler fungerer godt som screeningmetode etter potensielle bakteriestammer. Det kan gi en rask antydning på hvilken bakterie som kan ha forårsaket en mulig infeksjon i klinisk sammenheng (Gazin et al., 2012). I dette tilfellet gav det tidlig indikasjon på at funnene mest sannsynligvis var relevante i henhold til studiens hensikt. Fenotypisk screening vil derimot ikke vise hvilke resistensmekanismer bakteriestammene har benyttet for å overleve på agar med innhold av antibiotika, altså om veksten skyldes  $\beta$ -laktamaser, poriner eller effluxpumper. Redusert membranpermeabilitet er tross alt vanlige motstandsmekanismer som benyttes av Gram-negative bakterier når de utsettes for toksiske stoffer som antibiotika (Iredell et al., 2016).

Ved Sangersekvensering ble det påvist at bakteriestammene i P1 og P2 muligens var *Escherichia* spp. eller *Shigella* spp.. *Shigella* spp. er en Gram-negativ stavbakterie. Denne bakterien er følsom for en rekke miljøfaktorer, og dør raskt dersom den er utenfor sitt naturlige habitat i mennesketarmen (Adams et al., 2016). Det er svært usannsynlig at denne har overlevd vinteren i Norge. *E. coli* er en Gram-negativ stavbakterie innen *Enterobacteriaceae*, og finnes

hovedsakelig i tarmen til mennesker og dyr. *E. coli* har et symbiotisk forhold til verten og tilfører denne mange fordeler, som at den for eksempel forhindrer kolonisering av humanpatogene bakterier. Det finnes derimot flere *E. coli*-bakterier som er årsak til sykdom (Wiles et al., 2008). På grunn av fargen på koloniene under fenotypisk metode var det god grunn til å anta at bakteriene i P1 og P2 var *E. coli* (Lindstedt, 2019). Sekvensene som ble benyttet etter Sangersekvensering var derimot korte, og de ble ikke redigert eller sydd sammen med redigeringsprogram. Sangersekvensering ble dermed brukt til screening for å gi en indikasjon om hvilke bakteriestammer som var tilstede på skålene. Generelt fungerer Sangersekvensering bra for å finne familien til bakterien, mens forskjell mellom bakteriestammer er mer usikkert fordi genet er så konservert.

Identiteten til bakteriestammene i P3 var lik identiteten til *Pseudomonas* spp. med over 99%, med 100% «covery». *Pseudomonas* spp. er en Gram-negativ stavbakterie som er vanlig å finne i jord og vann. I tillegg kan den være opportunistisk humanpatogen og kan forårsake sykdom (Tønjum et al., 2018). Som forsvar mot antibiotika produserer *Pseudomonas* spp. hydrolyserende enzymer. I tillegg har den effluxpumper og poriner som regulerer hvor permeabel celleveggen er. Fordi det er en miljøbakterie har *Pseudomonas* spp. utviklet seg til å tåle toksiske omgivelser, noe som gjør den til en sterk resistent fenotype (Iredell et al., 2016).

DNA fra bakteriestammene i P4 og P5 hadde svært korte sekvenser etter Sangersekvensering, og det ble ikke påvist pålitelig resultat som gav god indikasjon på hvilken familie de tilhørte. Dersom fenotypisk metode hadde gitt antydning til mer klinisk relevant resultat burde Sangersekvensering blitt gjentatt for å få bedre sekvenser. Eventuelt kunne DNA blitt analysert videre med helgenomsekvensering. Dette ble imidlertid ansett som unødvendig. Videre ble det detektert at P6 og P7 var *Enterococcus* spp. Det ble dermed bekreftet at disse bakterieprøvene var mindre relevant for videre analyser i denne studien sammenlignet med bakteriestammene i P1 og P2. Det som derimot er interessant er at miljøbakterier har vist seg å fungere som reservoar for ARG. For eksempel er det funnet at vannbårne *Aeromonas* stammer bærer integron 1, som inneholder AR-gener i like stor grad som *Enterobacteriaceae*. Det kan tenkes at dette ikke er utelukkende på grunn av selektiv fordel på grunn av antibiotika, men at de bæres fordi de blant annet er plassert på plasmid med flere andre funksjonelle gener (Baquero et al., 2008). Gener som koder for AR hos miljøbakterier kan potensielt overføres til humanpatogene bakterier ved HGO. Selv om flere av bakteriestammene i denne studien ikke var relevant for videre analyser er det interessant å observere at de overlevde flere utplatinger på medier som

inneholdt antibiotika. Resistensmekanismene som ble benyttet av bakteriene for å overleve kan det derimot ikke gjøres noen antakelse om, og derfor er det også uvisst om disse kunne blitt delt ved HGO. Multipleks PCR som ble benyttet for å screene etter aktuelle gener som koder for ESBL-enzymmer gav negativt resultat. Dermed kunne det foreløpig ikke antas noe om hvilke resistensmekanismer som lå bak fenotypisk resultat.

## 4.2 Påvisning av multiresistente, ESBL-produserende UPEC

### 4.2.1 Patogenese og virulensfaktorer hos UPEC

Ved nanoporesekvensering og påfølgende dataanalyse ble det påvist at begge bakteriestammene var UPEC serotype O25:H18. UPEC er en humanpatogen bakterie som forårsaker urinveisinfeksjon (UVI), inkludert blærebetennelse og nyrebekkenbetennelse. UPEC er gruppert under extraintestinal *E. coli* (ExPEC) som defineres ved at den kan kolonisere utenfor vertsnisjen - i blod, sentralnervesystem og urinveiene, noe som kan resultere i sykdom. Det er en opportunistisk bakterie som kan bruke flere virulensfaktorer for å kolonisere verten dersom verten endrer oppførsel (Wiles et al., 2008). UPEC O25:H18 er en sjelden serotype, og det finnes ikke, som vi vet, publikasjoner om denne. Serogruppe O25 er derimot svært kjent da denne er assosiert med klonen *E. coli* ST131, som er humanpandemisk (Lindstedt, 2019; Peirano & Pitout, 2010). Denne klonen tilhører en svært virulent fylogenetisk gruppe som blant annet innehar IncFII-plasmider med gener som koder for multiresistens (Peirano & Pitout, 2010). Selv om serotypen til bakteriene som er detektert i denne studien er lik, er det ikke identiske bakterier, og de ulike isolatene er derfor unike (Lindstedt, 2019).

UVI forårsaket av UPEC er en svært vanlig bakteriell infeksjon. For å ha kliniske tegn til infeksjon er det nødvendig at bakterien kommer inn i urinveiene, og at mer enn  $10^5$  cfu/ml er å finne i urinen. Utvikling av UVI er en kompleks prosess som krever at bakteriene kommer inn i blæren og bindes til epitelvev ved bruk av adhesinfaktorer. I blærecellenes cytoplasma danner UPEC intracellulære bakteriesamfunn og en biofilm-lignende struktur. Virulensfaktorer som blir benyttet inkluderer adhesiner, utskilte toksiner, flagella, ytre membranprotein og LPS. I tillegg benyttes jernfangende reseptorer som tar opp jern fra urinen (Karam et al., 2019). O-antigenet er et LPS som finnes i ytre del av membranen hos UPEC, og det er blitt observert høy andel av O25 blant isolater av UPEC. Det ble videre detektert en rekke virulensfaktorer hos P1 og P2 gjennom bioinformatikken som ble utført etter helgenomsekvensering. Blant adhesinfaktorene som kan benyttes av UPEC ble P pili detektert i form av genene som koder for blant

annet PapG. P pili er viktig for kolonisering av UPEC i nyrene, og forekomst av pili er ofte observert hos *E. coli* som er årsak til mer alvorlige infeksjoner som nyrebekkenbetennelse, hjernehinnebetennelse og sepsis. Blant ikke-fimbriale adhesiner ble Ag43 detektert. Dette er en overflatefaktor som viser ulike roller i patogenese hos UPEC-stammer som kolonisering, binding og dannelse av biofilm. I tillegg bidrar den til langvarig stabilitet hos bakterien i blæren. Genet som koder for upaG ble også påvist. Dette er et ytre membranprotein som også er involvert i å binde bakteriecellen til epitelet i blæren, i tillegg til å blant annet danne biofilm. Gene som koder for virulensfaktorene kan overføres av plasmid, transposoner og bakteriofager (Karam et al., 2019). I tillegg ble genene *invA* og *invE* påvist, som er involvert i *E. coli* utskillingssystem 2 (ETT2). Dette er invasjonsrelaterte gener og er unike for denne bakteriestammen (Lindstedt, 2019). Gene *invA* og *invE* i *E. coli* er involvert i genklusteret ETT2 som ligner på type III utskillingssystem (T3SS) som er lokalisert på «*Salmonella* pathogenicity island 1» (SPI-1) system. Mange ETT2-kluster ser ikke ut til å være funksjonelle, blant annet på grunn av mutasjoner. Men i *E. coli*-stammer som kan forårsake sepsis kan klusteret ETT2<sub>SEPSIS</sub> bidra til patogenese (Ideses et al., 2005). Dermed kan det være sannsynlig at disse genene kommer fra *Salmonella*.

Det faktum at det er detektert en rekke virulensfaktorer viser at bakteriestammene potensielt kan utgjøre en smittefare. I tillegg kan genene spres ved HGO til andre bakterier. Klonen *E. coli* ST131 er en svært spredt bakteriestamme, blant annet på grunn av dens virulensfaktorer, samt at den har tilstedeværelse av IncF-type plasmid som er spesielt vanlig hos *E. coli* (Iredell et al., 2016). Det kan dermed tenkes at bakteriestammene som er detektert i denne studien har potensiale til å gjøre det samme, selv om det kanskje er i mindre skala.

#### 4.2.2 Påvist antibiotikaresistens hos bakterieprøver

For behandling av ukomplisert UVI benyttes antibiotikaene  $\beta$ -laktam og trimetoprim (Karam et al., 2019). For komplisert UVI, hvor pasienten har anatomiske eller nevrologiske forstyrrelser som påvirker drenasjen, eller inflammatoriske endringer som gjør at infeksjonen gjentar seg, (Folkehelseinstituttet, 2013 ) benyttes ofte FQ-antibiotika (Karam et al., 2019). I noen land, som Pakistan, Iran og USA, er det blitt observert en økende forekomst av resistente UPEC-stammer. Derfor blir det i større grad benyttet FQ-antibiotika og et bredere spekter av cefalosporiner til behandling (Karam et al., 2019). Dette kan selektere frem bakterier som produserer et bredere spekter av resistensmekanismer og  $\beta$ -laktamaser.

Genomet til bakteriestammene i P1 og P2 inneholdt flere gener som koder for resistens for ulike antibiotikum som først ble detektert gjennom WIMP og ARMA, og deretter gjennom CANU. Blant annet inneholdt P2 genet *bla*<sub>CTX-M-182</sub> (ESBL<sub>A</sub>). MinION sekvensering vil derimot ikke kunne vise helt sikkert at enzymet er nummer 182, men det var dette genet som kom nærmest basert på data fra helgenomsekvensering. Det kan endres dersom MiSeq fra Illumina benyttes (Lindstedt, 2019), eller andre metoder for neste generasjons sekvensering som verifisering. I tillegg ble det detektert en ampC-lignende  $\beta$ -laktamase hos P1. Disse funnene viser muligens hvordan bakteriestammene var i stand til å bryte ned cefotaxime og ampicillin ved bruk av AST. Videre fremkom det av bioinformatikken utført etter nanoporesekvensering at genet som kodet for CTX-M var lokalisert på plasmidet hos bakterieprøve P2. Det er fordi det var lokalisert på samme «contig» som gener som er forbundet med plasmider (Lindstedt, 2019). Dette kan sannsynligvis fasilitere for at genet deles gjennom HGO. CTX-M er den mest vanlige av ESBL-enzymene og utgjør en stor utfordring for helsevesenet da det inaktiverer antibiotikumet cefotaxim på et klinisk signifikant nivå. Noen CTX-M hydrolyserer cefotaxim så grundig at det ikke er nødvendig med andre resistensmekanismer (Iredell et al., 2016). I masteroppgaven til Hedvig Bentsen Skaflem (2018), hvor det ble utført tilsvarende arbeid som i denne studien, ble det detektert ESBL-produserende *E. coli* som inneholdt enzym fra CTX-M-familien. Når samme bakterie blir funnet med samme type resistensmekanisme to år på rad kan det tyde på at bakteriene er etablert i området (Lindstedt, 2019). I denne studien ble det derimot ikke gjennomført helgenomsekvensering eller AST. Det kan dermed tenkes at det hadde blitt funnet flere resistensfaktorer dersom disse metodene hadde blitt inkludert. Studien ble utført på vinterhalvåret og er derfor sammenlignbar.

Videre ble det detektert resistens mot ampicillin hos både P1 og P2 gjennom AST. Genet *bla*<sub>TEM</sub> er genet som koder for noen av de vanlige mekanismene for ampicillin-resistens i *E. coli* (Briñas et al., 2002), men det ble ikke detektert tilstedeværelse av dette genet gjennom nanoporesekvensering. Foreløpig er den detekterte resistensmekanismen CTX-M hos P2 og den uidentifiserte  $\beta$ -laktamasen hos P1.

Ifølge rapporten til NORM/NORM-VET (2017) ble det funnet *E. coli*-isolater i urinveiene hos mennesker, hvor 3% av isolatene produserte ESBL. Dette var samme nivå som i 2015 og 2016. Alle de ESBL-produserende isolatene var resistent mot ampicillin og cefotaxime, og de fleste av isolatene var resistente mot cefazidime. I tillegg var det flere av de ESBL-produserende

isolatene som var resistente mot kinoloner og trimetoprim-sulfamethoxazole (NORM/NORM-VET, 2017). Dette kan sammenlignes med funnene i denne studien, da begge UPEC-isolatene var resistent mot både ampicillin og cefotaxime.

AST påviste også resistens mot trimetoprim hos P1 og P2. I tillegg ble genet *drfA14* detektert hos P2 gjennom nanoporesekvensering, mens *drfA5* ble detektert hos P1. MinION-sekvensering kan derimot ikke avgjøre med 100% sikkerhet at det er versjon 5 eller 14 av *drfA* genet. Da er det nødvendig med ytterligere verifiserende analyser gjennom for eksempel MiSeq (Lindstedt, 2019). Trimetoprim er et antibiotikum som benyttes til å behandle blant annet UVI. For å nøytralisere inhiberingen som trimetoprim skaper, blir genet som koder for dihydrofolatreduktase (*drf*) modifisert, og det resulterer i resistens (Al-Assil et al., 2013; Sköld, 2001). Det kan dessuten se ut til at genet *drfA* kan være assosiert med integron 1. I tillegg er det påvist i tidligere studier at det er sterk korrelasjon mellom redusert mottagelighet til individuelle antibiotikum, produksjon av ESBL og multiresistens. Det er dermed sannsynlig at ARG blir båret på samme genelement som integroner, i form av transposoner eller konjugative plasmid (Al-Assil et al., 2013). Disse deles deretter mellom bakterier og fører til økt spredning av multiresistens. Det kan dermed tenkes at P1 og P2 har mottatt *drfA* gjennom HGO.

P1 og P2 viste begge resistens mot makrolid-antibiotikumet erytromycin ved AST. Resistens mot dette antibiotikumet kan foregå på flere måter: modifikasjon av målsetet, inaktivering av antibiotikumet eller ved bruk av effluxpumper (Noguchi et al., 2000). Genene *mphA* og *mdfA*, som koder for resistens mot makrolid, ble detektert hos P1 og P2 ved nanoporesekvensering, og bekrefter dermed at disse med stor sannsynlighet er årsak til resistens i dette tilfellet. Genet *mphA* koder for enzymet makrolid 2'-fosfotransferase I [Mph(A)], som inaktiverer erytromycin, (Zheng et al., 2009), mens genet *mdfA* koder for en utløpspumpe med et bredt spekter av legemidler som inkluderer tetrasyklin og erytromycin (Weisblum, 1998). Det kan i tillegg nevnes at genet *tet(B)* ble detektert gjennom helgenomsekvensering og «ResFinder» (Zankari et al., 2012). Dette koder for en utløpspumpe som skiller ut tetrasyklin, og fører til at konsentrasjonen av tetrasyklin i bakteriecellen blir lavere og bidrar til økt resistens (Roberts, 2005). Det ble ikke testet for resistens mot tetrasyklin ved bruk av AST, men det kunne vært interessant å undersøke om bakteriestammene var klinisk resistent mot et ytterligere antibiotikum.

Det ble ikke detektert klinisk resistens mot ciprofloxacin ved AST. Det kan derimot nevnes at det ble detektert en mutasjon i genet *parC* gjennom helgenomsekvensering. Genet *parC* koder for en underenhet i topoisomerase IV, enzymet som katalyserer reaksjonen hvor bakteriens kromosom separeres under replikasjon og transkripsjon. Det er vist at enkle mutasjoner i genene som koder for topoisomerase IV eller DNA gyrase er forbundet med lavt nivå av kinolon-resistens, mens flere mutasjoner er forbundet med høyere nivå av resistens (Lindgren et al., 2003). Hadde det i tillegg blitt detektert mutasjon i genet *gyrA*, som koder for DNA gyrase, hadde observasjonen vært mer alvorlig. Selv om dette ikke var en signifikant endring illustrerer det hvordan bakteriens genom endrer seg som følge av mutasjon, noe som kan føre til et bredere spekter av resistens.

Det ble heller ikke detektert klinisk resistens mot karbapenem-antibiotikum i denne studien, og det er heller ikke blitt gjort funn av karbapenemase-produserende *E. coli* i Norge ifølge rapporten til NORM/NORM-VET (2017). Dette er positivt da det fortsatt vil være behandlingsalternativer tilgjengelig dersom en skulle blitt infisert av tilsvarende bakterier som her er blitt påvist, og som i tillegg har virulente egenskaper. P1 og P2 hadde derimot en MIC-verdi på 0,3 mg/L for karbapenem-antibiotikumet meropenem. For å være klinisk resistent må MIC-verdien ligge på over 8 mg/L, og dermed hadde bakteriestammene vært utsatt dersom de ble eksponert for antibiotikumet under behandling av en infisert pasient. ECOFF-verdien har derimot et brytningspunkt på 0,125 mg/L. ECOFF beskriver den vanlige fordelingen av AR blant villtype-bakteriene (Iredell et al., 2016). «Villtype» er den fenotypiske formen som er typisk for organismen slik den fremstår i naturen (Tronsmo, 2016). Når P1 og P2 viste antydning til resistens med 0,3 mg/L, reagerer den annerledes enn hva som forventes av villtypen til denne bakterien. Det kan dermed se ut til at bakteriestammene tilegner seg resistens, muligens gjennom mutasjoner eller fordi de har mottatt resistensgen fra en annen organisme gjennom HGO. Dersom en bakterie er resistent mot «siste utvei»-antibiotikum er det ikke flere behandlingsmuligheter tilgjengelig. Karbapenem-antibiotikum benyttes da som siste utvei, dersom annet ikke fungerer. Bruken av karbapenemer bør være restriktiv for å begrense seleksjonspresset blant mikrobene, og for å unngå videre spredning av resistens. Det er observert at økende grad av resistens mot tredje og fjerde generasjons cefalosporiner bidrar til økt bruk av karbapenemer. Dette resulterer videre i økt seleksjon av karbapenemase-produserende bakterier (Mazzariol et al., 2017).



Når en bakterie blir resistent mot et antibiotikum som benyttes som siste utvei er det svært vanskelig, kanskje umulig å behandle infeksjonen. Karam et al. (2019) foreslo dermed å undersøke om utvikling av vaksiner kan være et alternativ for å hindre sykdom som forårsakes av vanlige bakterielle infeksjoner, som UVI. Da vil bruken av antibiotika reduseres, i tillegg til å redusere seleksjonspresset og AR blant mikrobene. Ved utvikling av vaksiner kan denne benyttes av mennesker som opplever gjentatte infeksjoner av UPEC for å unngå at infeksjonen blir mer komplisert (Karam et al., 2019). Utvikling av vaksiner har tidligere vist gode resultater. Det ble for eksempel benyttet mye antibiotika i fiskeoppdrett i Norge frem til 1990-tallet. I 2012 var derimot totalsalget av antibiotika for terapeutisk bruk i fiskeoppdrett på 1591 kg aktiv substans. Det er en reduksjon i forbruket med 99% siden 1989. Årsaken er forebygging av infeksjoner ved innføring av vaksiner til laks og ørret (NORM/NORM-VET, 2012). Det kan dermed tenkes at vaksiner mot noen av de vanligste bakterielle infeksjonene kan være gunstig, spesielt hos mennesker som opplever gjentatte infeksjoner, eller som har et svekket immunsystem. Vaksiner trekkes i tillegg frem av Steinbakk et al. (2014) i rapporten «Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak» som et viktig tiltak for å minimere sykdomsbyrde, i tillegg til å redusere antibiotikaforbruket.

Andre alternativer er å ta i bruk eldre antibiotikum som foreløpig er lite brukt. Fosfomycin trometamol er et alternativ for å håndtere økende resistens hos bakterier som forårsaker UVI. Dette har et bredt spekter av aktivitet mot Gram-positive og Gram-negative bakterier, og det har vist at bakterier som *E. coli* og *K. pneumoniae* er utsatt mot dette antibiotikumet (Mazzariol et al., 2017). Undersøkelse av resistens mot fosfomycin ble inkludert i NORM/NORM-VET for første gang i 2017, hvor det ble påvist at de fleste av isolatene (96,6%) ble hemmet av dette antibiotikumet (NORM/NORM-VET, 2017).

UPEC-stammene som ble detektert i denne studien hadde gener som koder for AR som ofte er assosiert med MGE, som integron og plasmid. Blant disse er *drfA* assosiert med integron 1, samt gener som koder for makrolid-resistens. Dette er interessant da det ble detektert integrase for integron klasse 1 gjennom helgenomsekvensering. Det er derimot vanskelig å si med sikkerhet om dette betyr at resistensgenene ble båret på et integron 1 basert på dette funnet. Videre ble det i denne studien illustrert hvordan bakterier kan tilegne seg resistens gjennom HGO eller mutasjoner ved at stammene tilegnet seg resistens mot meropenem. Dette viser bakterienes evne til å tilpasse seg miljøet de lever i gjennom naturlig seleksjon. Det faktum at

bakterier er i stand til å dele gener som koder for resistensmekanismer på tvers av bakterieslekt- og art, kombinert med seleksjonspresset de utsettes for, gjør at AR spres i et raskt tempo.

### 4.3 Funnenes relevans

Bakteriene i P1 og P2 er multiresistente, noe som ble påvist ved å ha tydelig høy MIC mot fire ulike antibiotika. Blant disse er cefotaxime, ampicillin og erytromycin på WHO sin liste over essensielle medisiner (WHO, 2017a). I tillegg viste nanoporesekvensering resistensgenet mot tetrasyklin, som bakteriene potensielt kan ha vært resistente mot. Fremveksten av multiresistente bakterier innen *Enterobacteriaceae* er blitt et økende helseproblem. Det er utfordrende å behandle pasienter som har fått infeksjoner som er forårsaket av denne type bakterier fordi det ofte må benyttes kombinasjonsbehandlinger for å bli frisk. Bakterier innen *Enterobacteriaceae* er vanlige humanpatogener, og forårsaker ulike typer infeksjoner. Resistens innen denne gruppen er dermed ganske alvorlig, og behandling av multiresistente *Enterobacteriaceae* bør derfor være individuelt tilpasset (Rodríguez-Baño et al., 2018). Det er ikke uten grunn at ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* står på WHO sin liste over kritiske patogenbakterier hvor det er nødvendig å utvikle nye antibiotikum for.

Bakteriestammene i P1 og P2 var *E. coli*, som er en vanlig tarmbakterie hos mennesker og dyr. Det er dermed sannsynlig at Andedammen er utsatt for forurensing av urin eller avføring. I tillegg er *E. coli* en zoonotisk organisme, noe som betyr at den kan smittes mellom dyr og mennesker. Om noen mennesker kunne fått UVI fra UPEC-bakteriene som er detektert fra Andedammen er vanskelig å si noe om. Andedammen er et område hvor mennesker og dyr ferdes da det er lokalisert på en sentral plass på campus i Ås på NMBU. *E. coli* kan smitte mennesker gjennom blant annet mat, direkte kontakt med dyr eller via badevann (Folkehelseinstituttet, 2017). Mest sannsynlig vil de med nedsatt immunsystem være langt mer utsatt for klinisk infeksjon enn friske mennesker. Dersom en da skulle fått en UVI etter smitte av UPEC-stammene eller tilsvarende som er detektert, ville infeksjonen vært vanskelig å behandle. Uavhengig av dette kan bakteriene spres videre ved trekkfugler eller til dyr som ferdes i området. *E. coli* har i tillegg flageller, noe som bidrar til at den kan bevege seg og dermed lettere spres enn bakterier uten flageller. Niagara, bekken som springer ut fra Andedammen, renner gjennom campus og kan potensielt spre bakterier videre. Hvor stort potensiale det er for at bakteriene kan spres til matkjeden er vanskelig å si noe om. I Norge er det gode overvåkningsprogram som stadig undersøker tilstedeværelsen av AR mikrober hos

produksjonsdyr. Det kan dermed tenkes at en økning i prevalensen av ARB blir registrert. For å videre undersøke spredningspotensialet oppover i matkjeden bør arbeidet med å undersøke omfanget av AR i ytre miljø fortsette.

Det er tidligere gjort tilsvarende undersøkelser av ESBL-produserende bakterier på campus Ås, NMBU på sommerhalvåret. Det ble ikke gjort positivt funn av ESBL-produserende bakterier på dette tidspunktet. Årsaken til dette er uvisst, men en mulig teori kan være at det er mer konkurranse mellom bakteriene om sommeren, og at det derfor ikke lønner seg å ha gener som koder for AR. Potensielt kan vekst av langt flere bakterier på grunn av økt temperatur føre til at de ARB ikke blir fanget opp (Lindstedt, 2019). Det er en kompleks sammensetning av faktorer som påvirker hvilke bakterier som selekteres frem. Alt fra ytre faktorer som temperatur, tilgang på næring, konkurranse og i hvor stor grad det er toksiske stoffer i miljøet som bakteriene lever i, for å nevne noen (Singer et al., 2016). På den annen side kan det tenkes at et for lavt antall prøver er undersøkt for ARB i denne tidsperioden, men at positivt resultat kan avdekkes dersom arbeidet med kartlegging av resistens opprettholdes.

At det naturlige miljø er blitt et reservoar av ARG som kan deles mellom ulike bakterier er urovekkende. Det er blitt påvist ARB og ARG av klinisk signifikans i denne studien, noe som potensielt kan spres i enda større grad ettersom området de ble funnet i aktivt blir benyttet av dyr og mennesker. Om det er risiko for å bli infisert med multiresistente UPEC er det vanskelig å si noe om, men at ARG spres mellom bakteriene og potensielt øker prevalensen i naturlig miljø virker svært sannsynlig. Dermed understrekes viktigheten av å inkludere prevalens av AR i naturlig miljø for å forstå helheten i problemet som AR representerer, og at en «One Health» tilnærming er nødvendig.

#### 4.4 Forslag til videre arbeid

Dette er andre året at det påvises ESBL-produserende bakterier i akvatiske miljø på NMBU. Med stor sannsynlighet kan det dermed slås fast at multiresistente bakterier av typen ESBL-produserende *E. coli* er etablert i området ved Andedammen/Niagarabekken ved NMBU. Arbeidet med å screene etter ESBL-produserende bakterier burde derfor fortsette. Da vil kunnskap om omfanget av AR i miljøet bli tydeligere. Videre kan det innhentes vannprøver fra flere områder hvor det er mistanke om ARB. I denne studien ble Ellingsrud industriområde i Ski tatt med for å undersøke flere vannområder. Funnene viste ikke fremvekst av ESBL-

produserende bakterier, men det er allikevel viktig å fortsette arbeidet med å kartlegge omfanget av AR. Miljøprøver fra vannområder hvor det foregår jordbruk eller som har forbindelse med rensesanlegg av avløpsvann kan være interessant å undersøke da det i disse områdene kan være stort potensiale for deling og spredning av ARG og ARB.

I tillegg til *E. coli* ble det detektert flere miljøbakterier som viste vekst til tross for tilstedeværelse av antibiotika. Blant disse ble *Pseudomonas* spp. detektert. Med tanke på at *Pseudomonas* spp. er opportunistisk humanpatogen kan det være aktuelt å undersøke disse bakteriestammene nærmere. Karbapenemase-produserende *P. aeruginosa* står på WHO sin prioriteringsliste over patogene bakterier som det er kritisk viktig å utvikle nye antibiotikum mot. Med tanke på at denne bakteriestammen vokste på Oxoid *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL Agar, kunne det vært interessant å se nærmere på hvilke resistensmekanismer som ble benyttet av bakteriestammen for å overleve.

## 5 Konklusjon

I denne studien er det blitt påvist multiresistente og ESBL-produserende UPEC i akvatisk, ytre miljø. Bakterier innen *Enterobacteriaceae*, som produserer  $\beta$ -laktamaser som inaktiverer tredje generasjons cefalosporin, skaper store utfordringer for helsevesenet. Det anses derfor som svært alvorlig at det utvikles resistens mot disse antibiotikaene. Disse står på WHO sin liste over patogene organismer som det er kritisk viktig å utvikle nye antibiotikum for. Dersom resistens mot tredje generasjons cefalosporin øker i omfang må det benyttes antibiotikum med bredere spekter, som karbapenem og kolistin, noe som kan føre til videre selektering og resistensutvikling blant mikrobene. Dersom dette finner sted vil det være få behandlingsalternativer igjen for å kurere enkle bakterielle infeksjoner.

I denne studien er det blitt presentert resultat som viser tilstedeværelse av humanpatogene, multiresistente bakterier i ytre miljø i Norge. Men det er fortsatt lite kunnskap om hvor stort omfanget av AR i miljø er. Det er derfor viktig at kartleggingen av resistens i ytre miljø fortsetter, da det vil bidra til å gi et helhetlig bilde på utfordringen som AR representerer. Dette er nødvendig for å begrense spredningen av resistens i størst mulig grad.

## Litteraturliste

- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. (2016). *Food Microbiology* (4th ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Al-Assil, B., Mahfoud, M., & Hamzeh, A. R. (2013). First report on class 1 integrons and Trimethoprim-resistance genes from dfrA group in uropathogenic *E. coli* (UPEC) from the Aleppo area in Syria. *Mobile genetic elements*, 3(3), e25204.  
doi:10.4161/mge.25204
- Andersen, P. (2019). *Trimetoprim*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/trimetoprim> (lest: 24.04.19).
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 260–271.  
doi:10.1038/nrmicro2319
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, EM., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli*  $\beta$ -Laktamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, 7(417). doi:10.3389/fmicb.2016.00417
- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in microbiology*, 19, 260-265.  
doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006
- Biotium. (2019). *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain*. Tilgjengelig fra: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/> (lest: 26.03.19).
- Briñas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Torres, R.-L., Fernanda, & Carmen. (2002).  $\beta$ -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3156-3163.  
doi:10.1128/AAC.46.10.3156-3163.2002
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247.  
doi:10.1101/cshperspect.a025247

- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
- Caniaux, I., van Belkum, A., Zambardi, G., Poirel, L., & Gros, M. F. (2017). MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(3), 415–420. doi:10.1007/s10096-016-2846-y
- CDC. (2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (lest: 10.05.19).
- CIGENE. (u.å). *CIGENE computational unit*. Tilgjengelig fra: <https://cigene.no/lab-resources/cigene-computational-unit/> (lest: 10.05.19).
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2018). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Science*, 6(1), 1-28. doi:10.3390/medsci6010001
- ECDC. (2019). *ECDC country visit to Norway to discuss antimicrobial issues 12–16 March 2018*. Stockholm: ECDC.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, 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. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Domingues, S., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile genetic elements*, 2(5), 211-223. doi:10.4161/mge.22967
- Feng, Y., Zhang, Y., Ying, C., Wang, D., & Du, C. (2015). Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13(1), 4-16. doi:10.1016/j.gpb.2015.01.009
- Finton, M. D. (2019). *Personlig kommunikasjon*. Ås: NMBU (Våren 2019).
- Folkehelseinstituttet. (2010). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veiledere for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/> (lest: 11.03.19).
- Folkehelseinstituttet. (2012). *Om antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-antibiotikaresistens/> (lest: 08.04.19).

- Folkehelseinstituttet. (2013 ). *Grunnleggende om urinveisinfeksjon*. Tilgjengelig fra:  
<https://www.fhi.no/nettpub/urinveisinfeksjoner/urinveisinfeksjoner/grunnleggende-om-urinveisinfeksjone/> (lest: 01.05.19).
- Folkehelseinstituttet. (2017). *E. coli-tarminfeksjon*. Tilgjengelig fra:  
<https://helsenorge.no/sykdom/mage-og-tarm/ecoli> (lest: 28.04.19).
- Folkehelseinstituttet. (2018). *Om antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra:  
<https://helsenorge.no/legemidler/om-antibiotikaresistens> (lest. 08.04.19).
- 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. doi:10.1128/JCM.06852-11
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Patersen, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. L. (2008). Redefining extended-spectrum b-lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *63*(1), 1-4. doi:10.1093/jac/dkn444
- Ideses, D., Gophna, U., Paitan, Y., Chaudhuri, R. R., Pallen, M. J., & Ron, E. Z. (2005). A degenerate type III secretion system from septicemic *Escherichia coli* contributes to pathogenesis. *Journal of bacteriology*, *187*(23), 8164-8171.  
doi:10.1128/JB.187.23.8164–8171.2005
- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic Resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *Bmj*, *352*(h6420). doi:10.1136/bmj.h6420
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 2761–2764. doi:10.1128/JCM.01228-07
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) 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
- Karam, M. R. A., Habibi, M., & Bouzari, S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic



- Escherichia coli*. *Molecular immunology*, 108, 56-67.  
doi:10.1016/j.molimm.2019.02.007
- 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 k-mer weighting and repeat separation. *Genome research*, 27(5), 722-736. doi:10.1101/gr.215087.116
- Lindgren, P. K., Karlsson, Å., & Hughes, D. (2003). Mutation rate and evolution of fluoroquinolones resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3222-3232. doi: 10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003
- Lindstedt, B.-A. (2019). *Personlig kommunikasjon*. Ås: NMBU (Våren 2019).
- Lu, H., 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
- Matsumoto, Y., & Inoue, M. (1999). Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 307-313. doi:10.1128/AAC.43.2.307
- Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). 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
- Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29(sup1), 2-9. doi:10.1080/1120009X.2017.1380395
- Miljødirektoratet. (2018). *Har kartlagt antibiotikaresistens i norsk natur*. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/aktuelt/nyheter/2018/mars-2018/har-kartlagt-antibiotikaresistens-i-norsk-natur/> (lest: 08.04.19).
- NCBI. (u.å). *Basic Local Alignment Search Tool*. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest: 10.05.19).
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). New York: WH Freeman and Company.
- Noguchi, N., Takada, K., Katayama, J., Emura, A., & Sasatsu, M. (2000). Regulation of Transcription of the mph (A) Gene for Macrolide 2'-Phosphotransferase I in *Escherichia coli*: Characterization of the Regulatory Gene mphR (A). *Journal of bacteriology*, 182(18), 5052-5058. doi:10.1128/JB.182.18.5052-5058.2000

- UNN. (u.å). *NORM - Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober*. Tilgjengelig fra: <https://unn.no/fag-og-forskning/norm-norsk-overvakingssystem-for-antibiotikaresistens-hos-mikrober#formålet-med-norm> (lest: 22.03.19).
- NORM/NORM-VET. (2012). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Retrieved from Tromsø/Oslo
- NORM/NORM-VET. (2017). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Oslo/Tromsø.
- ONT (u.å.a). *MinION*. Tilgjengelig fra: <https://nanoporetech.com/products/minion> (lest: 18.03.19).
- ONT (u.å.b). *Real-time detection of antibiotic-resistance genes using Oxford Nanopore Technologies' MinION*. Tilgjengelig fra: <https://nanoporetech.com/resource-centre/real-time-detection-antibiotic-resistance-genes-using-oxford-nanopore-technologies> (lest: 10.05.19).
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943-4960. doi:10.1128/AAC.00296-11
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Peirano, G., & Pitout, J. D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 316-321. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003
- Perry, J. A., Westman, E. L., & Wright, G. D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Current opinion in microbiology*, 21, 45-50. doi:10.1016/j.mib.2014.09.002
- Pro-lab Diagnostics. (u.å). *McFarland Standards*. Tilgjengelig fra: [https://www.pro-lab.com/wp-content/uploads/2017/01/SD2300-SD2350\\_en.pdf](https://www.pro-lab.com/wp-content/uploads/2017/01/SD2300-SD2350_en.pdf) (lest: 03.04.19).
- Regjeringen. (2015). *Nasjonal strategi mot antibiotikaresistens 2015-2020*. Tilgjengelig fra: [https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi\\_antibiotikaresistens\\_230615.pdf](https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi_antibiotikaresistens_230615.pdf) (lest: 01.02.19).
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS microbiology letters*, 245(2), 195-203. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.034
- Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-

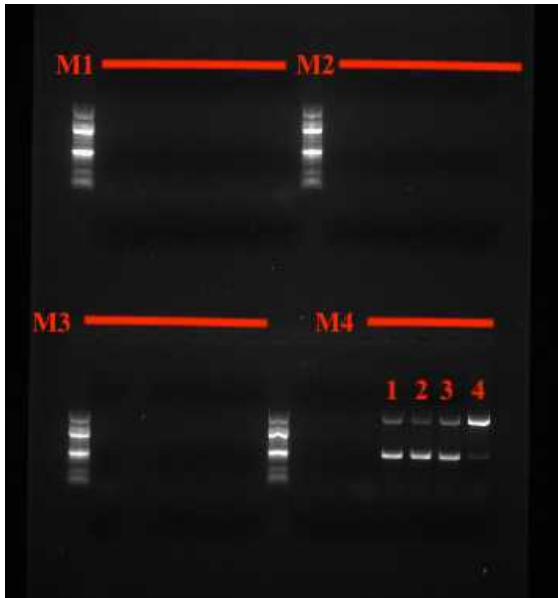
- producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(2), e00079-00017. doi:10.1128/CMR.00079-17
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J. & Hordijk, J. (2018). Plasmid carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121-1137. doi:10.1093/jac/dkx488
- Sigma-Aldrich. (2019). *GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit Protocol*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/genelute-bacterial-genomic-dna-kit.html> (lest: 04.03.19).
- 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). doi:10.3389/fmicb.2016.01728
- Skaflem, 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*. Masteroppgave. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Tilgjengelig fra: <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2570744> (lest: 14.01.19).
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3-4), 261-273. doi:10.1051/vetres:2001123
- 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*. Masteroppgave. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Tilgjengelig fra: [https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2573382/Solberg\\_Sissel\\_2018\\_master.pdf?sequence=4](https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2573382/Solberg_Sissel_2018_master.pdf?sequence=4) (lest: 15.01.19).
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J.R & Mobley, H. L. (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., Urdahl, A. M., Barkbu, K. N., Sørsum, H., Lunestad, B.-T.,

- Bonhorst, J. Ø., Nielsen, K. M., Lindbæk, M. & Bjørnholt, J. V. (2014). *Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2014/2014-antibiotikaresistens.pdf> (lest: 09.04.19).
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y.-H., & Feng, Y. (2018). Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends in Microbiology*, 26(9), 794-808. doi:10.1016/j.tim.2018.02.006
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010a). *Brilliance ESBL*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/oxoid-Brilliance-ESBL.pdf> (lest: 04.02.19).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2011). *Brilliance CRE*. Tilgjengelig fra: <http://ams.ro/wp-content/uploads/2012/09/Brilliance-CRE.pdf> (lest: 04.02.19).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2012). *Remel - MUELLER HINTON AGAR w/ and w/o 5% SHEEP BLOOD*. Tilgjengelig fra: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU1620-PI.pdf> (lest: 06.04.19).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010b). *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/bioprobes-issues-2011/bioprobes-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html> (lest: 14.03.19).
- EUCAST. (2019). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Tilgjengelig fra: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf) (lest: 06.04.19).
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforlaget.
- Tønjum, T., Bøvre, K., & Sletten, A. (2018). *Pseudomonas*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Pseudomonas> (lest: 28.04.19).
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis, Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Vetrinærinstituttet. (u.å). *Overvåkningsprogrammet for antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/overvaking/antibiotikaresistens-norm-vet> (lest: 22.03.19).
- 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
- Weisblum, B. (1998). Macrolide resistance. *Drug Resistance Updates*, 1(1), 29-41. doi:10.1016/S1368-7646(98)80212-4

- WHO. (2017a). *Executive Summary The Selection and Use of Essential Medicines*. Tilgjengelig fra:  
[https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML\\_2017\\_ExecutiveSummary.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2017_ExecutiveSummary.pdf?ua=1) (lest: 12.04.19).
- WHO. (2017b). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Tilgjengelig fra:  
[https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1) (lest: 12.04.19).
- WHO. (2017c). *One Health*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/> (lest: 09.04.19).
- WHO. (2019). *Ten Threats to Global Health*. Tilgjengelig fra:  
<https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019> (24.04.19).
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 11-19.  
doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.007
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M. & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640-2644.  
doi:10.1093/jac/dks261
- Zheng, J., Sagar, V., Smolinsky, A., Bourke, C., LaRonde-LeBlanc, N., & Cropp, T. A. (2009). Structure and function of the macrolide biosensor protein, MphR (A), with and without erythromycin. *Journal of molecular biology*, 387(5), 1250-1260.  
doi:10.1016/j.jmb.2009.02.058

# Vedlegg

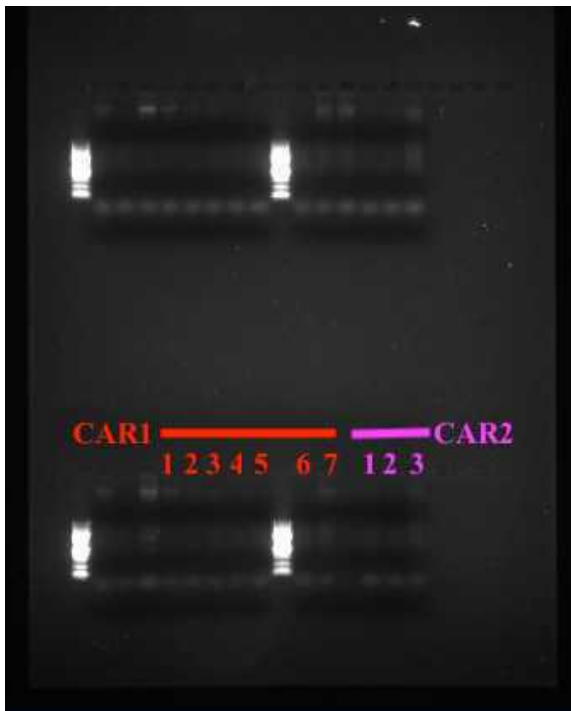
## Vedlegg A



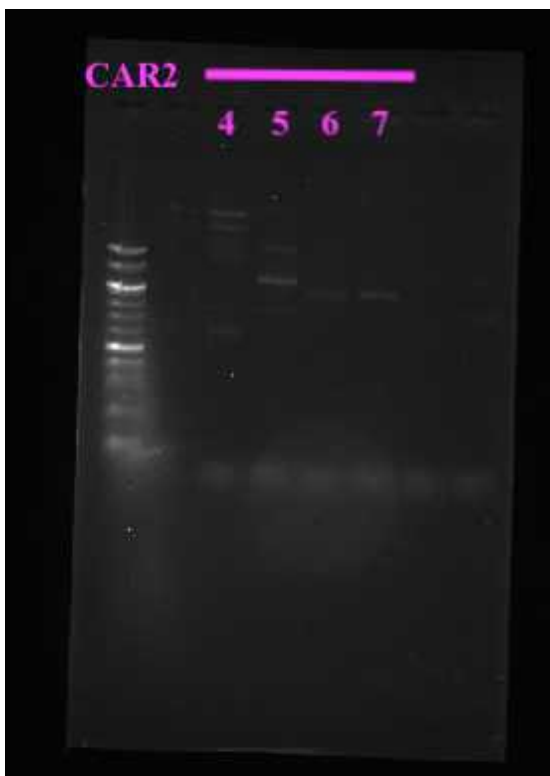
Figur A1. Bilde av gel etter Multiplex PCR med primere M1, M2, M3 og M4 og DNA fra P1, P2, P3, P4. Bildet viser fire laddere, to til venstre og to i midten.



Figur A2. Bilde av gel etter multipleks PCR med M4 primere og P5, P6 og P7. Til venstre på bilde er ladder.



Figur A3. Bilde av gel etter multipleks PCR med CAR-primere: CAR1 og CAR2 (kun prøve 1,2,3.). Bildet viser fire laddeer, to til venstre og to i midten.



Figur A4. Bilde av gel etter multipleks PCR med CAR-primere: CAR2 (kun prøve 4,5,6 og 7). Til venstre på bilde er ladder.

## Vedlegg B

Tabell B1. Renhetsmåling og kvantifisering av DNA etter isolering og ekstrahering. Absorbans målt ved 260/280 nm og 260/230 nm ved bruk av NanoDrop™ 2000 og mengde DNA (µg/ml) ble målt med Qubit® 2.0 Fluorometer

Prøve	Mengde DNA (µg/ml)	A <sub>260/280</sub> (nm)	A <sub>260/230</sub> (nm)
P1	19,6	1,81	1,09
P2	13,3	1,63	0,58
P3	6,07	1,76	0,58
P4	11,7	1,78	0,61
P5	32,3	1,78	0,99
P6	6,77	1,45	0,78
P7	12,7	1,89	1,20

Tabell B2. Renhetsmåling (µg/ml) av DNA-prøvene, 16S rRNA PCR-produkt, samt rensset 16S rRNA PCR produkt.

Prøve	DNA (µg/ml)	16S rRNA PCR (µg/ml)	16S rRNA PCR rensset (µg/ml)
1	19,6	76,9	62,6
2	13,3	32,4	47,8
3	6,07	51,0	44,1
4	11,7	65,3	57,4
5	32,3	30,0	8,89
6	6,77	66,7	50,5
7	12,7	75,4	51,5



## Vedlegg C

Tabell C1. Sekvenser av gen som koder for 16S rRNA mottatt fra Eurofins Genomics i Tyskland for P1-P7.

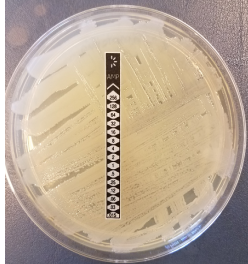
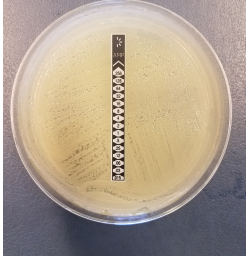
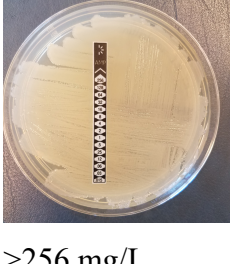
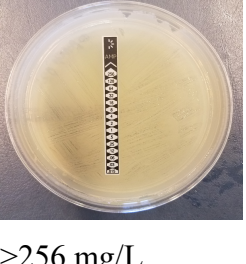
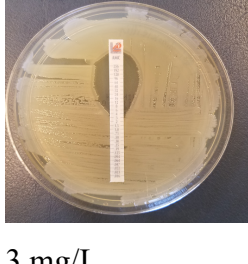
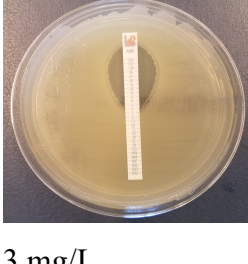
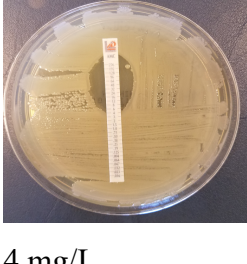
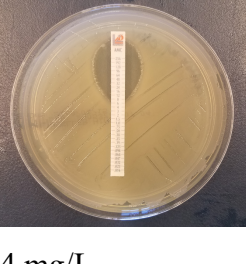
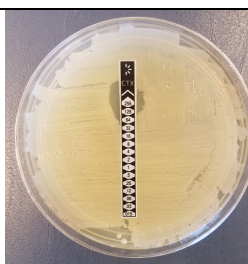
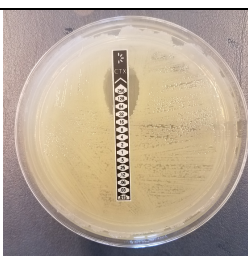
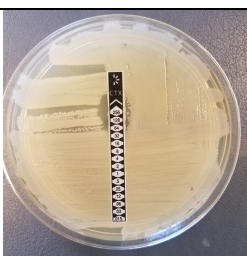
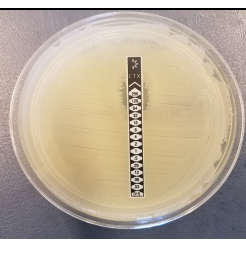
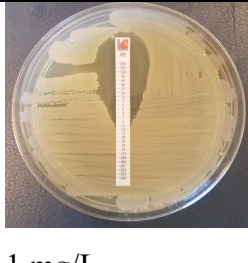
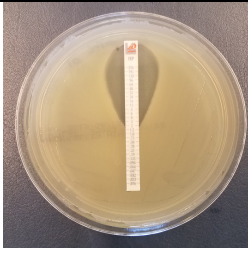
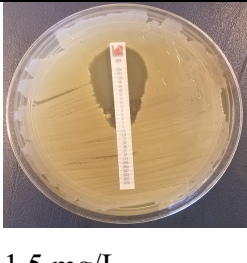
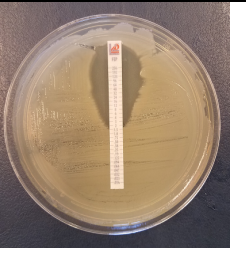
Prøve	Sekvens
P1 Forward	ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATT AGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGATGGTCTGAG AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGT AAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTACAGATGTGAAATCCCCGGGCT CAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTA GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC GAAGGCG
P1 Revers	ATACTATCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC CGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTT CATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCC GCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAG CCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTA TCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGACCGCTGGCAACAAAGGATAAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACA GCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCTTTCC
P2 Forward	CTCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG CCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA GGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTACTCATTGACGTTACCC
P2 Revers	TCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA CGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAG TCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCT CTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGT CGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGG CAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCG CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGC AGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCTTTCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGG ATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCC ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACA ACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT GCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCAGGGGGCCGCTTCGC CACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGATTTACCGCTACACCTGGAATTCTAC CCCCTACGAGACTCAAGCTTGCCAGTATCAGATGCAGTCCCAGGTTGAGCC CGGGATTTACACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTA ATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA GCCGGTGCTTCTCTGCGGGTAACGTCAATGAGTAAAGGTATTAACCTTTACTC
P3 Forward	AGGAAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCCTAGGTCG GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTC TGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGG AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC GCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG GCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCT AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT ACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG GCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGT GGTGAATTTCTGTGTA
P3 Revers	GCTACTATCTGAGTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG CCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGAC

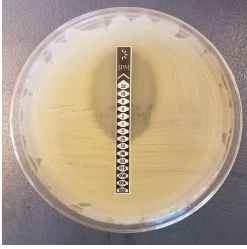
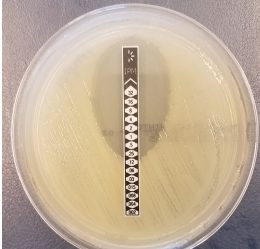
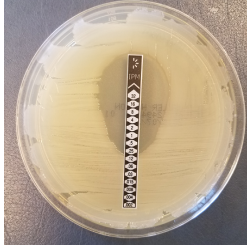
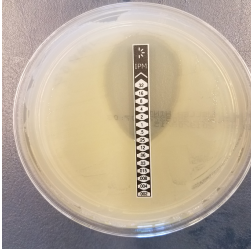
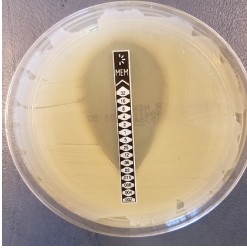
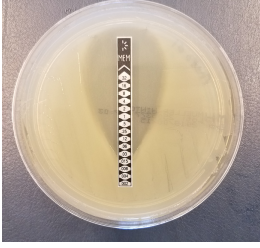
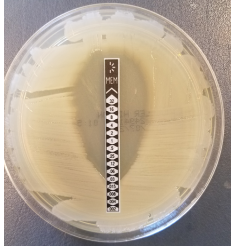
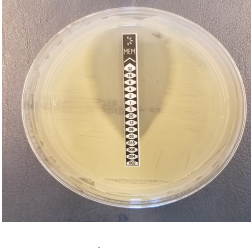
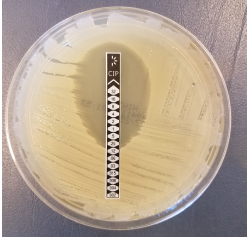
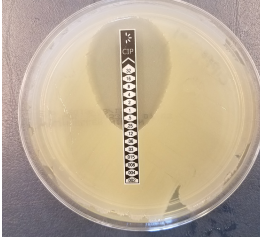
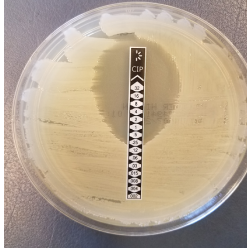
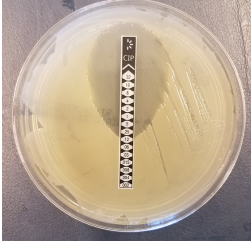
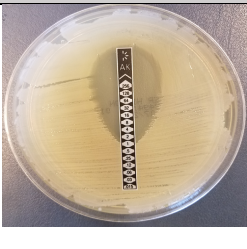
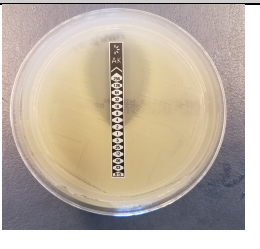
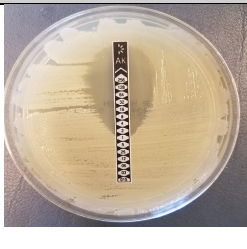
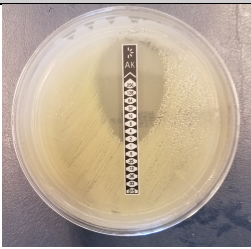
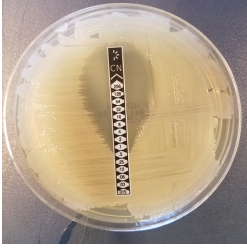
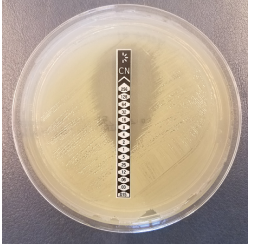
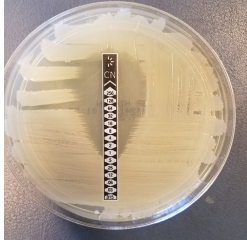
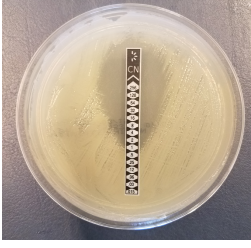
	TTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGAT TAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGT AGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGT TTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGA CAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC GACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAG AAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT TGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAG CTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA TCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGG TGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACAC AGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTC CCA
P4 Forward	GTAACCACAACCAGACA
P4 Revers	GGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATGCTGATCCGCG ATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTA CGATCGGGTTTCTGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCGACCCTCTGTCCCGA CCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTGCCATA
P5 Forward	CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG GGAATTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCC GCGTGTGCGATGA AGGCCTTCGG
P5 Revers	TACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTAAACGGGCGGTGTGTACAAGACCCG GGAACGTATTCACCGCGACATGCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCA CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGGTTTTGTGAGATTG
P6 Forward	CTCTTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGAC CGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTA GAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGA AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG TGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT GCA
P6 Revers	CGCGACATCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC CCGGGAACGTATTCACCGCGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCT TCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAGCTTTAAGAGATT AGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTT GTCACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA ACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTG GTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCG GTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGG AAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGA GCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACAT GGAATTCACACTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCC CGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTT ACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG CACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGGTGAACAGTTAC TCTCACCTTATTCTTCTCTAACAACAAAATTTTACAATCCCAAAACCTTCTTC
P7 Forward	TCTTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACC GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAG AGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG CAGAACAG

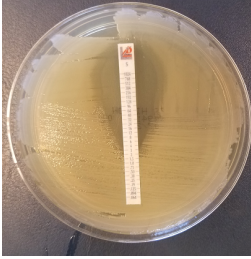
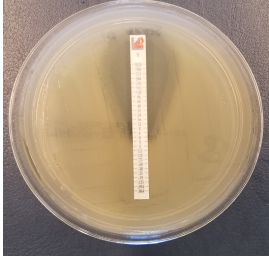
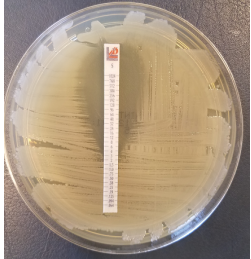

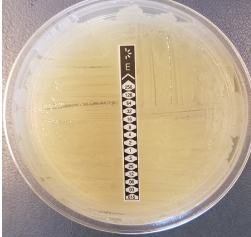
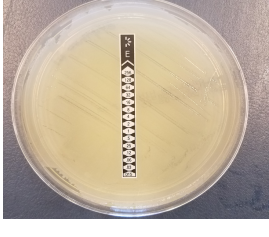
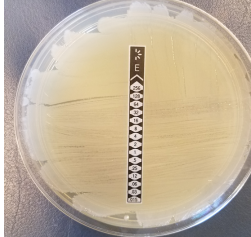
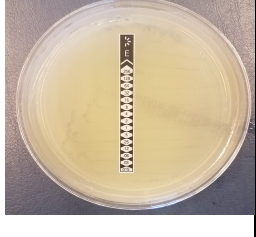
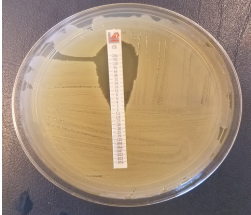
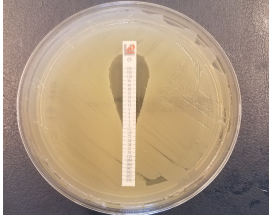
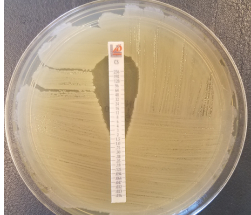
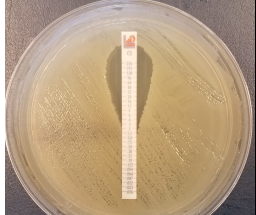
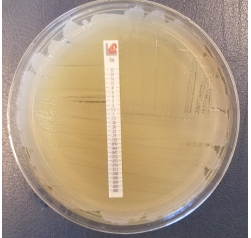
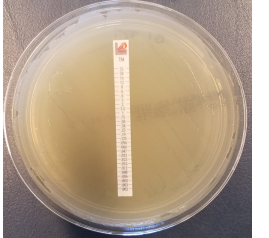
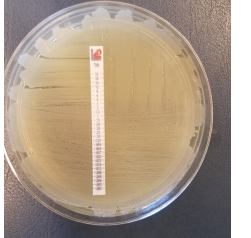
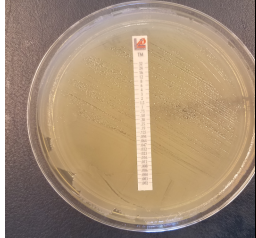
P7 Revers	CCCGACATCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC CCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCT TCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATT AGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTT GTCACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTACAATAAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA ACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTG GTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCG GTCGTA TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGG AAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGA GCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACAT GGAATCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCC CGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCGGCGCTCGCTTT ACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG CACGTAATTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGGTGAACAGTTAC TCTCACCTTATTCTTCT
-----------	---

## Vedlegg D

Tabell D1. Bilde av resultat fra AST, fra 1. og 2.test

	P1 1.test	P1 2.test	P2 1.test	P2 2.test
<b><math>\beta</math>-laktam antibiotikum – hemmer cellevegg syntese</b>				
Penicillin: Ampicillin 3.generasjon	 >256 mg/L	 >256 mg/L	 >256 mg/L	 >256 mg/L
Penicillin: Amoxicillin med klavulansyre	 3 mg/L	 3 mg/L	 4 mg/L	 4 mg/L
Cefalosporin: Cefotaxime 3.generasjon	 >32 mg/L	 >32 mg/L	 >32 mg/L	 >32 mg/L
Cefalosporin: Cefepime 4.generasjon	 1 mg/L	 1 mg/L	 1,5 mg/L	 1,5 mg/L

		1,5 mg/L		1,5 mg/L
Karbapene m: Imipenem				
	0,12 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L
Karbapene m: Meropenem				
	0,3 mg/L	0,3 mg/L	0,3 mg/L	0,3 mg/L
<b>FQ antibiotikum – hemmer DNA replikasjon</b>				
Ciprofloxa cin				
	0,12 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L
<b>Aminoglykosider – angriper 30S rRNA</b>				
Amikacin				
	1 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Gentamici n				
	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L

Streptomycin				
	3 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	4 mg/L
<b>Makrolid antibiotikum – angriper 50S rRNA</b>				
Erytromycin				
	>256 mg/L	>256 mg/L	>256 mg/L	>256 mg/L
<b>Polymyxin antibiotikum – angriper celleveggen</b>				
Kolistin				
	1,5 mg/L	1,5 mg/L	1,5 mg/L	1,5 mg/L
<b>Vekstanalogt antibiotikum – hemmer folsyremetabolisme</b>				
Trimetoprim				
	>32 mg/L	>32 mg/L	>32 mg/L	>32 mg/L

## Vedlegg E

Tabell E1. Resultat fra nanoporesekvensering med MinIon (Oxford Nanopore Technologies) og «assembly» ved bruk av CANU. Gener merket med gult er unike for stammen. Tabell er mottatt av professor Bjørn-Arne Lindstedt.

GENE	ACCESSION	% Sim	Coverage	Contig	Position	Strain
AcrA	NC_000913	98.66	1194 / 1194	tig00000001	994865..996057	Oda_1
AcrA	NC_000913	98.58	1194 / 1194	tig00000004	1042591..1043782	Oda_2
acc77 (yeeW-like protein)	NZ_CP023820	95.89	341 / 489	tig00000001	3932966..3933305	Oda_1
acc77 (yeeW-like protein)	NZ_CP023820	95.89	341 / 489	tig00000001	2102606..2102945	Oda_2
air (Enteroaggregative Immunoglobulin Repeat protein)	CP003034	93.96	5179 / 5192	tig00000001	4679085..4684250	Oda_1
air (Enteroaggregative Immunoglobulin Repeat protein)	CP003034	93.90	5179 / 5192	tig00000001	2847014..2852176	Oda_2
antigen43	NZ_NKOF01000084	97.69	3120 / 3120	tig00000001	294517..297619	Oda_1
antigen43	NZ_NKOF01000084	97.34	3120 / 3120	tig00000004	343237..346330	Oda_2
aslA (arylsulfatase)	CU928163	99.34	1656 / 1656	tig00000001	4835768..4837415	Oda_1
aslA (arylsulfatase)	CU928163	99.09	1656 / 1656	tig00000001	3003391..3005035	Oda_2
atoC	NC_011751	99.13	1386 / 1386	tig00000001	3081615..3082992	Oda_1
atoC	NC_011751	98.48	1386 / 1386	tig00000001	1253946..1255313	Oda_2
atoE	NC_011751	99.62	1323 / 1323	tig00000001	3084489..3085807	Oda_1
atoE	NC_011751	98.87	1324 / 1323	tig00000001	1256803..1258114	Oda_2
atoS	NC_011751	99.12	1827 / 1827	tig00000001	3079800..3081618	Oda_1
atoS	NC_011751	99.18	1827 / 1827	tig00000001	1252131..1253949	Oda_2
Auto-Transporter gene	NZ_KE701455	98.72	2664 / 2664	tig00000001	1847135..1849779	Oda_1
Auto-Transporter gene	NZ_KE701455	98.79	2653 / 2664	tig00000001	24242..26877	Oda_2
BapA-domain Containing Protein	NZ_AYOG01000034	94.74	20781 / 20778	tig00000001	1025060..1045763	Oda_1
BapA-domain Containing Protein	NZ_AYOG01000034	94.77	20781 / 20778	tig00000004	1072646..1093347	Oda_2
bcr	CP027060	96.81	1191 / 1191	tig00000001	3040433..3041620	Oda_1
bcr	CP027060	96.94	1178 / 1191	tig00000001	1212861..1214036	Oda_2
BlaAMPH	AP012030	95.42	1158 / 1158	tig00000001	902500..903644	Oda_1
BlaAMPH	AP012030	95.51	1158 / 1158	tig00000004	950468..951614	Oda_2
blaEC family C-type betalactamase (AmpC)	NZ_ADIK01000065	97.97	1134 / 1134	tig00000001	127443..128571	Oda_1
blaEC family C-type betalactamase (AmpC)	NZ_ADIK01000065	97.18	1134 / 1134	tig00000004	176848..177967	Oda_2
casI	BA000007	96.75	924 / 924	tig00000001	3644641..3645564	Oda_1
casI	BA000007	96.32	925 / 924	tig00000001	1815115..1816034	Oda_2
casA	BA000007	94.95	1563 / 1563	tig00000001	3648534..3650090	Oda_1
casA	BA000007	94.75	1563 / 1563	tig00000001	1818998..1820553	Oda_2
casE CRISPR-associated Protein	BA000007	97.47	789 / 789	tig00000001	3645561..3646343	Oda_1
casE CRISPR-associated Protein	BA000007	96.83	789 / 789	tig00000001	1816031..1816811	Oda_2
chuA	CP025573	98.18	1983 / 1983	tig00000001	4470578..4472554	Oda_1

chuA	CP025573	97.98	1983 / 1983	tig00000001	2638740..2640712	Oda 2
cirA	CP018206	98.13	1980 / 1980	tig00000001	3006793..3008760	Oda 1
cirA	CP018206	98.08	1981 / 1980	tig00000001	1179309..1181276	Oda 2
class-1 integron Integrase	CP031216	98.50	667 / 944	tig00000017	67199..67861	Oda 1
class-1 integron Integrase	CP031216	98.65	667 / 944	tig00000014	35374..36038	Oda 2
copA	CP027060	95.85	2505 / 2505	tig00000001	1018291..1020785	Oda 1
copA	CP027060	95.73	2505 / 2505	tig00000004	1066007..1068501	Oda 2
csgA	NC 007946	99.12	456 / 456	tig00000001	1651465..1651920	Oda 1
csgA	NC 007946	99.12	456 / 456	tig00000004	1697624..1698079	Oda 2
csgB	CP027060	98.90	456 / 456	tig00000001	3015757..3016207	Oda 1
csgB	CP027060	98.89	452 / 456	tig00000001	1650974..1651424	Oda 2
csgE	NC 011750	98.97	390 / 390	tig00000001	1649196..1649581	Oda 1
csgE	NC 011750	99.23	390 / 390	tig00000004	1695360..1695746	Oda 2
csgF	NC 011750	98.32	417 / 417	tig00000001	1648757..1649172	Oda 1
csgF	NC 011750	98.08	417 / 417	tig00000004	1694922..1695336	Oda 2
csgG	LT903847	98.80	834 / 834	tig00000001	1647897..1648730	Oda 1
csgG	LT903847	98.80	834 / 834	tig00000004	1694063..1694895	Oda 2
cusA	NZ NMMD01000001	97.68	3144 / 3144	tig00000001	1167470..1170598	Oda 1
cusA	NZ NMMD01000001	97.52	3144 / 3144	tig00000004	1214693..1217822	Oda 2
CvaA colicin-V secretion protein	GG773553	97.67	1242 / 1242	tig00000001	4249294..4250527	Oda 1
CvaA colicin-V secretion protein	GG773553	97.34	1242 / 1242	tig00000001	2417957..2419186	Oda 2
DUF3987-domain Protein	NZ BGQI01000015	93.47	1363 / 1509	tig00000001	290697..292045	Oda 1
DUF3987-domain Protein	NZ BGQI01000015	93.19	1381 / 1509	tig00000004	339400..340766	Oda 2
ecotin	CP025268	97.14	419 / 419	tig00000001	3064379..3064796	Oda 1
ecotin	CP025268	96.90	419 / 419	tig00000001	1236723..1237139	Oda 2
ecpA common pilus	BA000007	97.91	573 / 588	tig00000001	807594..808163	Oda 1
ecpA common pilus	BA000007	97.95	584 / 588	tig00000004	855661..856239	Oda 2
ecpB	NZ QOON01000045	97.76	669 / 669	tig00000001	806864..807527	Oda 1
ecpB	NZ QOON01000045	97.76	669 / 669	tig00000004	854940..855605	Oda 2
EcpD	CP019777	98.84	1644 / 1644	tig00000001	802707..804345	Oda 1
EcpD	CP019777	98.48	1644 / 1644	tig00000004	850780..852415	Oda 2
ECs3737 (ETT2)	NC 002695	96.51	602 / 606	tig00000001	3781444..3782041	Oda 1
ECs3737 (ETT2)	NC 002695	96.51	602 / 606	tig00000001	1951463..1952060	Oda 2
eilA (hilA homologue)	CP023364	97.88	1698 / 1698	tig00000001	4672278..4673963	Oda 1
eilA (hilA homologue)	CP023364	97.88	1698 / 1698	tig00000001	2840212..2841897	Oda 2
eivC (ETT2)	KU684470	97.80	1321 / 1320	tig00000001	3772885..3774197	Oda 1
eivC (ETT2)	KU684470	98.03	1320 / 1320	tig00000001	1942924..1944234	Oda 2
eivF (ETT2)	NC 002695	98.38	742 / 750	tig00000001	3779072..3779813	Oda 1
eivF (ETT2)	NC 002695	97.84	742 / 750	tig00000001	1949098..1949834	Oda 2
eivG (ETT2)	NC 002695	95.95	1704 / 1704	tig00000001	3777381..3779068	Oda 1
eivG (ETT2)	NC 002695	95.72	1704 / 1704	tig00000001	1947411..1949094	Oda 2
eivH (ETT2)	DQ077151	96.62	296 / 294	tig00000001	3767510..3767804	Oda 1
eivH (ETT2)	DQ077151	97.28	294 / 294	tig00000001	1937538..1937830	Oda 2



eivI (ETT2)	KU684470	95.55	427 / 426	tig00000001	3772484..3772904	Oda 1
eivI (ETT2)	KU684470	96.49	427 / 426	tig00000001	1942519..1942943	Oda 2
eivJ (ETT2)	KU684470	93.39	348 / 348	tig00000001	3771599..3771942	Oda 1
eivJ (ETT2)	KU684470	94.83	348 / 348	tig00000001	1941633..1941980	Oda 2
elaD	NC_011750	96.53	1209 / 1209	tig00000001	3145157..3146352	Oda 1
elaD	NC_011750	96.36	1209 / 1209	tig00000001	1317351..1318542	Oda 2
entA	CP027060	95.58	747 / 747	tig00000001	1196849..1197594	Oda 1
entA	CP027060	95.45	747 / 747	tig00000004	1244059..1244803	Oda 2
entE	CP027060	95.10	1611 / 1611	tig00000001	1194375..1195980	Oda 1
entE	CP027060	95.03	1611 / 1611	tig00000004	1241587..1243190	Oda 2
entH	CP027060	95.65	414 / 414	tig00000001	1197597..1198010	Oda 1
entH	CP027060	95.57	406 / 414	tig00000004	1244813..1245218	Oda 2
epaO (ETT2)	KU684470	92.09	948 / 948	tig00000001	3770662..3771599	Oda 1
epaO (ETT2)	KU684470	92.30	948 / 948	tig00000001	1940696..1941633	Oda 2
epaP ECs3725 (ETT2)	NC_002695	97.45	666 / 666	tig00000001	3770011..3770672	Oda 1
epaP ECs3725 (ETT2)	NC_002695	97.75	666 / 666	tig00000001	1940043..1940706	Oda 2
epaQ (ETT2)	NC_002695	94.64	261 / 261	tig00000001	3769746..3770001	Oda 1
epaQ (ETT2)	NC_002695	95.40	261 / 261	tig00000001	1939776..1940033	Oda 2
epaR (ETT2)	KU684470	95.62	754 / 768	tig00000001	3768985..3769733	Oda 1
epaR (ETT2)	KU684470	95.67	763 / 768	tig00000001	1939014..1939770	Oda 2
epaS1 (ETT2)	KU684470	94.41	429 / 468	tig00000001	3768552..3768976	Oda 1
epaS1 (ETT2)	KU684470	93.16	468 / 468	tig00000001	1938550..1939005	Oda 2
epaS2 (ETT2)	KU684470	94.77	363 / 363	tig00000001	3767864..3768224	Oda 1
epaS2 (ETT2)	KU684470	94.77	363 / 363	tig00000001	1937891..1938252	Oda 2
eprH (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	97.98	1191 / 1191	tig00000001	3765587..3766761	Oda 1
eprH (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	99.16	1191 / 1191	tig00000001	1935605..1936787	Oda 2
EprI (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_002695	98.33	240 / 240	tig00000001	3765334..3765573	Oda 1
EprI (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_002695	98.33	240 / 240	tig00000001	1935352..1935591	Oda 2
EprJ (putative type-III secretion component) (ETT2)	KU684470	97.90	333 / 333	tig00000001	3764987..3765315	Oda 1
EprJ (putative type-III secretion component) (ETT2)	KU684470	98.80	333 / 333	tig00000001	1935001..1935332	Oda 2
eprK (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	100.00	727 / 735	tig00000001	3764264..3764990	Oda 1
eprK (putative type-III secretion component) (ETT2)	NC_011751	99.72	727 / 735	tig00000001	1934280..1935004	Oda 2
espL2/shET2 effector toxin	NC_002655	95.84	1899 / 1899	tig00000001	2464719..2466603	Oda 1
espL2/shET2 effector toxin	NC_002655	95.84	1899 / 1899	tig00000001	638921..640803	Oda 2
espL2/ShET2-family effector toxin	NZ_AYOG01000052	97.30	2187 / 2187	tig00000001	5075641..5077815	Oda 1

espL2/ShET2-family effector toxin	NZ_AYOG01000052	97.03	2187 / 2187	tig00000004	22699..24867	Oda 2
espR1	BA000007	93.61	1251 / 1260	tig00000001	2169918..2171163	Oda 1
espR1	BA000007	93.53	1251 / 1260	tig00000001	345818..347060	Oda 2
espR2 (T3SS effector-like protein)	BA000007	94.46	505 / 504	tig00000001	2171974..2172474	Oda 1
espR2 (T3SS effector-like protein)	BA000007	94.46	505 / 504	tig00000001	347874..348373	Oda 2
espX1	CP003034	96.42	1423 / 1422	tig00000001	472675..474088	Oda 1
espX1	CP003034	96.27	1422 / 1422	tig00000004	521252..522659	Oda 2
espX4	NC_017646	98.38	1232 / 1539	tig00000001	5110165..5111390	Oda 1
espX4	NC_017646	98.24	1532 / 1539	tig00000001	7571..9091	Oda 1
espX4	NC_017646	98.56	1532 / 1539	tig00000004	57073..58598	Oda 2
espX5	NC_013008	95.42	1289 / 1293	tig00000001	38584..39867	Oda 1
espX5	NC_013008	95.42	1289 / 1293	tig00000004	88105..89387	Oda 2
espY1	NC_002695	91.64	586 / 753	tig00000001	512129..512708	Oda 1
espY1	NC_002695	91.64	586 / 753	tig00000004	560670..561250	Oda 2
espY3	NC_002695	95.42	1572 / 1572	tig00000001	946135..947701	Oda 1
espY3	NC_002695	95.36	1572 / 1572	tig00000004	994054..995619	Oda 2
espY4	NC_002695	95.37	2398 / 2409	tig00000001	4746513..4748886	Oda 1
espY4	NC_002695	95.25	2398 / 2409	tig00000001	2914466..2916836	Oda 2
etrA (ETT2)	KU684467	99.00	501 / 501	tig00000001	3767011..3767508	Oda 1
etrA (ETT2)	KU684467	99.60	501 / 501	tig00000001	1937036..1937536	Oda 2
evfA (T6SS gene)	JN837480	92.29	480 / 480	tig00000001	689879..690356	Oda 1
evfA (T6SS gene)	JN837480	91.67	480 / 480	tig00000004	738079..738555	Oda 2
evfC (macrophageToxin)	JN837480	97.45	3016 / 3018	tig00000001	691739..694738	Oda 1
evfC (macrophageToxin)	JN837480	97.45	3016 / 3018	tig00000004	739934..742931	Oda 2
evfQ	JN837480	94.68	1842 / 1842	tig00000001	705108..706941	Oda 1
evfQ	JN837480	94.68	1842 / 1842	tig00000004	753281..755111	Oda 2
evfW	JN837480	92.77	1591 / 1983	tig00000001	2150955..2152530	Oda 1
evfW	JN837480	94.89	1468 / 1983	tig00000001	710800..712253	Oda 1
evfW	JN837480	93.34	1591 / 1983	tig00000001	326836..328416	Oda 2
evfW	JN837480	94.89	1468 / 1983	tig00000004	758971..760423	Oda 2
fdeC	NZ_QOON01000045	94.40	4250 / 4254	tig00000001	818137..822366	Oda 1
fdeC	NZ_QOON01000045	94.28	4250 / 4254	tig00000004	866189..870415	Oda 2
fecA	NC_011751	99.48	2325 / 2325	tig00000001	275543..277861	Oda 1
fecA	NC_011751	99.44	2325 / 2325	tig00000004	324261..326578	Oda 2
feoB	CP019777	97.15	2318 / 2322	tig00000001	4331057..4333370	Oda 1
feoB	CP019777	97.15	2318 / 2322	tig00000001	2499337..2501649	Oda 2
fepA	CP000468	95.52	1944 / 1947	tig00000001	1179105..1181039	Oda 1
fepA	CP000468	95.32	1944 / 1947	tig00000004	1226324..1228255	Oda 2
fepB	AE014075	97.28	957 / 957	tig00000001	1192051..1193004	Oda 1
fepB	AE014075	97.39	957 / 957	tig00000004	1239271..1240223	Oda 2
fepC	AE014075	96.66	809 / 816	tig00000001	1187910..1188714	Oda 1
fepC	AE014075	96.29	809 / 816	tig00000004	1235123..1235926	Oda 2

fepD	AE014075	95.87	1017 / 1017	tig00000001	1189693..1190708	Oda 1
fepD	AE014075	95.87	1017 / 1017	tig00000004	1236907..1237923	Oda 2
fepE	AE014075	93.21	1134 / 1134	tig00000001	1186780..1187906	Oda 1
fepE	AE014075	93.12	1134 / 1134	tig00000004	1233994..1235119	Oda 2
fepG	CP025573	97.57	989 / 993	tig00000001	1188714..1189696	Oda 1
fepG	CP025573	97.57	989 / 993	tig00000004	1235926..1236910	Oda 2
fes	CP027060	96.89	1125 / 1125	tig00000001	1181359..1182480	Oda 1
fes	CP027060	96.80	1125 / 1125	tig00000004	1228575..1229695	Oda 2
fiu Siderophore Receptor	CP023820	98.29	2283 / 2283	tig00000001	1398661..1400934	Oda 1
fiu Siderophore Receptor	CP023820	98.12	2283 / 2283	tig00000004	1445345..1447614	Oda 2
flgD	CP027060	97.84	696 / 696	tig00000001	1678693..1679383	Oda 1
flgD	CP027060	97.70	696 / 696	tig00000004	1724678..1725368	Oda 2
flgM	CP028192	99.32	294 / 294	tig00000001	1676681..1676972	Oda 1
flgM	CP028192	98.30	294 / 294	tig00000004	1722677..1722966	Oda 2
fmlA F9-fimbriae	BA000007	96.28	564 / 564	tig00000001	2220235..2220792	Oda 1
fmlA F9-fimbriae	BA000007	96.99	564 / 564	tig00000001	395992..396554	Oda 2
fsr Fosmidomycin Resistance	CP027060	97.79	1221 / 1221	tig00000001	1013547..1014763	Oda 1
fsr Fosmidomycin Resistance	CP027060	97.71	1221 / 1221	tig00000004	1061263..1062481	Oda 2
fyuA	CP016828	98.76	2022 / 2022	tig00000001	2734177..2736190	Oda 1
fyuA	CP016828	98.47	2022 / 2022	tig00000001	907273..909279	Oda 2
hlyD-family gene	NZ_CP023820	97.11	1176 / 1176	tig00000001	1047920..1049089	Oda 1
hlyD-family gene	NZ_CP023820	96.53	951 / 1176	tig00000004	1095501..1096437	Oda 2
hlyE	BA000007	98.15	918 / 918	tig00000001	1856968..1857877	Oda 1
hlyE	BA000007	98.58	918 / 918	tig00000001	34040..34952	Oda 2
hutX	NZ_CP023820	97.78	495 / 495	tig00000001	4475498..4475992	Oda 1
hutX	NZ_CP023820	97.78	495 / 495	tig00000001	2643655..2644149	Oda 2
ibrA	CP003034	97.49	1196 / 1185	tig00000001	2758010..2759193	Oda 1
ibrA	CP003034	97.58	1196 / 1185	tig00000001	931017..932201	Oda 2
invA (ETT2)	CU928163	99.08	2061 / 2061	tig00000001	3774202..3776250	Oda 1
invA (ETT2)	CU928163	98.98	2061 / 2061	tig00000001	1944239..1946281	Oda 2
invasion related gene	NZ_CP018206	96.73	1437 / 1437	tig00000001	1867544..1868969	Oda 1
invE (ETT2)	NC_011751	98.87	1146 / 1146	tig00000001	3776243..3777376	Oda 1
invE (ETT2)	NC_011751	98.87	1146 / 1146	tig00000001	1946274..1947406	Oda 2
ipaD-family gene	NZ_CP023820	95.93	1350 / 1350	tig00000001	4670733..4672076	Oda 1
ipaD-family gene	NZ_CP023820	95.93	1350 / 1350	tig00000001	2838666..2840010	Oda 2
Iron binding protein	NC_013175	99.23	1941 / 1941	tig00000017	51829..53762	Oda 1
Iron binding protein	NC_013175	98.66	1942 / 1941	tig00000014	49410..51339	Oda 2
irp1	CU928163	99.07	9492 / 9492	tig00000001	2721134..2730586	Oda 1
irp1	CU928163	99.05	9492 / 9492	tig00000001	894242..903684	Oda 2
irp2	CP006834	98.67	6108 / 6108	tig00000001	2714969..2721046	Oda 1
irp2	CP006834	98.79	6108 / 6108	tig00000001	888073..894154	Oda 2
iss	CP030791	95.45	308 / 309	tig00000001	1809699..1810005	Oda 1
iss	CP030791	94.81	308 / 309	tig00000004	1855319..1855622	Oda 2

ivy	CP025268	98.10	474 / 474	tig00000001	723227..723698	Oda 1
ivy	CP025268	98.31	474 / 474	tig00000004	771382..771854	Oda 2
kpsC	AWDO01000031	95.68	1946 / 2028	tig00000001	3940394..3942329	Oda 1
kpsC	AWDO01000031	95.32	1946 / 2028	tig00000001	2110025..2111953	Oda 2
kpsD	NC 007946	98.63	1677 / 1677	tig00000001	3937977..3939649	Oda 1
kpsD	NC 007946	98.63	1677 / 1677	tig00000001	2107605..2109277	Oda 2
kpsS	CU928163	94.42	1022 / 1233	tig00000001	3942445..3943462	Oda 1
kpsS	CU928163	94.32	1022 / 1233	tig00000001	2112069..2113084	Oda 2
lktB (Sakai lktB homologue)	NC 002695	94.15	2121 / 2121	tig00000001	1045807..1047923	Oda 1
lktB (Sakai lktB homologue)	NC 002695	94.11	2121 / 2121	tig00000004	1093390..1095504	Oda 2
lpfA	FN554766	99.48	573 / 573	tig00000001	4763679..4764248	Oda 1
lpfA	FN554766	99.30	573 / 573	tig00000001	2931591..2932160	Oda 2
matD	HM102365	97.51	2526 / 2526	tig00000001	804335..806838	Oda 1
matD	HM102365	97.59	2526 / 2526	tig00000004	852405..854914	Oda 2
mdfA	Y08743	96.75	1229 / 1233	tig00000001	1448694..1449916	Oda 1
mdfA	Y08743	96.01	1229 / 1233	tig00000004	1495269..1496481	Oda 2
mdtH	CP019777	98.26	1209 / 1209	tig00000001	1670992..1672195	Oda 1
mdtH	CP019777	95.94	1182 / 1209	tig00000004	1717046..1718203	Oda 2
merA (mercury resistance)	GQ259888	99.44	1614 / 1614	tig00000017	75380..76987	Oda 1
merA (mercury resistance)	GQ259888	99.50	1614 / 1614	tig00000014	26218..27825	Oda 2
merA (mercury resistance)	GQ259888	99.32	1614 / 1614	tig00000016	6060..7668	Oda 2
mphA	DQ445270	99.78	906 / 906	tig00000017	70967..71871	Oda 1
mphA	DQ445270	99.34	906 / 906	tig00000016	1642..2541	Oda 2
mphA	DQ445270	99.78	906 / 906	tig00000014	31349..32252	Oda 2
nikA	CU928163	99.17	1575 / 1575	tig00000001	4426649..4428216	Oda 1
nikA	CU928163	98.98	1575 / 1575	tig00000001	2594848..2596411	Oda 2
ompA	CP027060	97.69	1041 / 1041	tig00000001	1582507..1583542	Oda 1
ompA	CP027060	97.21	1041 / 1041	tig00000004	1628772..1629804	Oda 2
ompW	CP027060	97.99	548 / 639	tig00000001	1946632..1947176	Oda 1
ompW	CP027060	97.08	548 / 639	tig00000001	123291..123830	Oda 2
papC	CP003034	98.93	2532 / 2532	tig00000001	3921827..3924342	Oda 1
papC	CP003034	98.74	2532 / 2532	tig00000001	2091498..2094005	Oda 2
papD	NC 011751	98.78	735 / 735	tig00000001	3921030..3921758	Oda 1
papD	NC 011751	98.37	735 / 735	tig00000001	2090704..2091429	Oda 2
papF	JSXL01000087	99.01	504 / 504	tig00000001	3918750..3919249	Oda 1
papF	JSXL01000087	99.01	504 / 504	tig00000001	2088439..2088938	Oda 2
papG	UFZN01000003	99.20	502 / 630	tig00000001	3916933..3917431	Oda 1
papG	UFZN01000003	99.60	502 / 630	tig00000001	2086624..2087123	Oda 2
papX	CP025251	96.01	552 / 552	tig00000001	3914922..3915464	Oda 1
papX	CP025251	96.20	552 / 552	tig00000001	2084618..2085161	Oda 2
pemK-toxin	NC 022885	99.70	333 / 333	tig00000017	79988..80319	Oda 1
pemK-toxin	NC 022885	100.00	333 / 333	tig00000016	10661..10993	Oda 2
pemK-toxin	NC 022885	100.00	333 / 333	tig00000014	22880..23212	Oda 2

pkgA ECs3736 (ETT2)	NC_002695	97.04	1047 / 1059	tig00000001	3780402..3781440	Oda_1
pkgA ECs3736 (ETT2)	NC_002695	96.85	1047 / 1059	tig00000001	1950424..1951459	Oda_2
ppk	CP025268	98.36	2067 / 2067	tig00000001	3363207..3365269	Oda_1
ppk	CP025268	98.21	2067 / 2067	tig00000001	1534363..1536419	Oda_2
sapA	NC_011751	99.26	1629 / 1644	tig00000001	2037204..2038821	Oda_1
sapA	NC_011751	98.83	1630 / 1644	tig00000001	213509..215123	Oda_2
sfmC (fimbrial chaperone)	NSBV01000011	99.13	693 / 693	tig00000001	1090394..1091084	Oda_1
sfmC (fimbrial chaperone)	NSBV01000011	98.85	693 / 693	tig00000004	1137728..1138415	Oda_2
shiA	NC_011751	97.71	1311 / 1317	tig00000001	2741159..2742459	Oda_1
shiA	NC_011751	97.94	1311 / 1317	tig00000001	914236..915537	Oda_2
sinH	CP023644	99.54	2174 / 2178	tig00000001	3386840..3389007	Oda_1
sinH	CP023644	99.22	2174 / 2178	tig00000001	1557916..1560076	Oda_2
sitA	FQ482074	96.57	903 / 915	tig00000001	1836168..1837062	Oda_1
sitA	FQ482074	96.46	903 / 915	tig00000001	13283..14176	Oda_2
sitB	NC_017659	97.21	825 / 825	tig00000001	1835349..1836165	Oda_1
sitB	NC_017659	97.09	825 / 825	tig00000001	12465..13280	Oda_2
sitC	CP000836	98.25	858 / 858	tig00000001	1834501..1835352	Oda_1
sitC	CP000836	97.55	858 / 858	tig00000001	11623..12468	Oda_2
sitD	UGFR01000001	96.50	858 / 858	tig00000001	1833651..1834504	Oda_1
sitD	UGFR01000001	96.04	858 / 858	tig00000001	10775..11626	Oda_2
stcD (fimbrial adhesin)	NC_018658	96.51	1031 / 1035	tig00000001	2944107..2945133	Oda_1
stcD (fimbrial adhesin)	NC_018658	96.61	1031 / 1035	tig00000001	1116572..1117599	Oda_2
sugE	CP018976	99.36	313 / 318	tig00000001	126516..126828	Oda_1
sugE	CP018976	99.03	310 / 318	tig00000004	175927..176234	Oda_2
<b>TISS-protein</b>	<b>NZ_JSLB01000085</b>	<b>98.07</b>	<b>1296 / 1296</b>	<b>tig00000001</b>	<b>1023660..1024951</b>	<b>Oda_1</b>
tehA	CP027060	97.48	993 / 993	tig00000001	2123590..2124577	Oda_1
tehA	CP027060	97.38	993 / 993	tig00000001	299530..300515	Oda_2
tehB	CP027060	97.12	590 / 594	tig00000001	2124574..2125162	Oda_1
tehB	CP027060	96.43	589 / 594	tig00000001	300512..301094	Oda_2
tonB	CP027060	98.33	720 / 720	tig00000001	1943713..1944430	Oda_1
tonB	CP027060	98.06	720 / 720	tig00000001	120379..121094	Oda_2
traT	AY214164	98.34	722 / 831	tig00000018	5943..6664	Oda_1
traT	AY214164	96.91	808 / 831	tig00000017	95075..95879	Oda_1
traT	AY214164	98.10	735 / 831	tig00000014	5905..6639	Oda_2
Type-III effector protein gene	NZ_CP023820	97.81	1189 / 1188	tig00000001	4749186..4750365	Oda_1
Type-III effector protein gene	NZ_CP023820	97.47	1188 / 1188	tig00000001	2917134..2918306	Oda_2
Type-III effector protein gene	NZ_JSLB01000038	98.97	2520 / 2520	tig00000001	4750832..4753332	Oda_1
Type-III effector protein gene	NZ_JSLB01000038	99.09	2520 / 2520	tig00000001	2918775..2921275	Oda_2
upaG-like Adhesin	NZ_CP024862	96.20	5265 / 5262	tig00000001	4597457..4602675	Oda_1
upaG-like Adhesin	NZ_CP024862	96.30	5265 / 5262	tig00000001	2765466..2770689	Oda_2
ybbP putative ABC-transporter Permease	NC_011751	99.54	2415 / 2415	tig00000001	1058839..1061247	Oda_1
ybbP putative ABC-transporter Permease	NC_011751	99.54	2415 / 2415	tig00000004	1106190..1108597	Oda_2

ybtA	CP028714	98.96	960 / 960	tig00000001	2713825..2714782	Oda 1
ybtA	CP028714	98.65	960 / 960	tig00000001	886931..887885	Oda 2
ybtQ	CP003034	98.78	1803 / 1803	tig00000001	2710084..2711877	Oda 1
ybtQ	CP003034	98.89	1803 / 1803	tig00000001	883193..884988	Oda 2
ybtX	CP003034	98.75	1281 / 1281	tig00000001	2708817..2710091	Oda 1
ybtX	CP003034	99.06	1281 / 1281	tig00000001	881924..883200	Oda 2
ycgV autotransporter	NZ_CP024862	97.30	2887 / 2886	tig00000001	1888401..1891257	Oda 1
ycgV autotransporter	NZ_CP024862	96.88	2888 / 2886	tig00000001	65281..68123	Oda 2
ydeR	CU928163	98.61	504 / 504	tig00000001	2215457..2215958	Oda 1
ydeR	CU928163	98.38	495 / 504	tig00000001	391211..391702	Oda 2
yecl (ferritin-like protein-2)	AE014075	98.61	504 / 504	tig00000001	2647168..2647669	Oda 1
yecl (ferritin-like protein-2)	AE014075	98.41	504 / 504	tig00000001	820418..820919	Oda 2
yejO	NC_011750	97.49	2511 / 2511	tig00000001	3048227..3050727	Oda 1
yejO	NC_011750	97.33	2511 / 2511	tig00000001	1220630..1223124	Oda 2
yfcI	NC_011750	95.44	878 / 903	tig00000001	3180856..3181719	Oda 1
yfcI	NC_011750	95.44	878 / 903	tig00000001	1352929..1353792	Oda 2
yfcV	GG774912	99.47	567 / 567	tig00000001	3213988..3214553	Oda 1
yfcV	GG774912	99.65	567 / 567	tig00000001	1386015..1386581	Oda 2
yfhA	AQEJ01000033	91.40	477 / 477	tig00000018	22504..22977	Oda 1
ygeF ECs3707 (ETT2)	NC_002695	95.53	492 / 492	tig00000001	4664623..4665108	Cec 2
ygeF ECs3707 (ETT2)	NC_002695	93.39	484 / 492	tig00000001	3758357..3758834	Oda 1
ygeF ECs3707 (ETT2)	NC_002695	94.01	484 / 492	tig00000001	1928305..1928784	Oda 2
ygeG (ECs3708) (ETT2)	NC_002695	96.52	488 / 492	tig00000001	3759069..3759554	Oda 1
ygeG (ECs3708) (ETT2)	NC_002695	96.11	488 / 492	tig00000001	1929020..1929504	Oda 2
ygeH (ETT2)	NC_002695	93.68	1377 / 1377	tig00000001	3759889..3761255	Oda 1
ygeH (ETT2)	NC_002695	94.12	1377 / 1377	tig00000001	1929838..1931205	Oda 2
ygeJ (PBL) (ETT2)	NC_000913	90.02	501 / 503	tig00000001	1931673..1932168	Oda 2
ygeK (ECs3712) (ETT2)	NC_002695	96.61	443 / 633	tig00000001	3762231..3762671	Oda 1
ygeK (ECs3712) (ETT2)	NC_002695	96.68	633 / 633	tig00000001	1932186..1932815	Oda 2
ygfl	CU928163	99.44	889 / 897	tig00000001	3848161..3849045	Oda 1
ygfl	CU928163	98.88	889 / 897	tig00000001	2017994..2018876	Oda 2
ypjA	NC_011751	99.58	4575 / 4575	tig00000001	3543404..3547965	Oda 1
ypjA	NC_011751	99.61	4575 / 4575	tig00000001	1714005..1718569	Oda 2
yqeH (ETT2)	NC_000913	94.63	633 / 633	tig00000001	3755156..3755762	Oda 1
yqeH (ETT2)	NC_000913	97.95	633 / 633	tig00000001	1925074..1925702	Oda 2
yqel (ETT2)	NC_011750	98.64	810 / 810	tig00000001	3756094..3756898	Oda 1
yqel (ETT2)	NC_011750	98.47	261 / 261	tig00000001	3761380..3761638	Oda 1
yqel (ETT2)	NC_011750	98.89	810 / 810	tig00000001	1926036..1926843	Oda 2
yqel (ETT2)	NC_011750	98.47	261 / 261	tig00000001	1931331..1931589	Oda 2
yqeJ (ETT2)	NC_011750	98.08	469 / 483	tig00000001	3756902..3757365	Oda 1
yqeJ (ETT2)	NC_011750	98.14	483 / 483	tig00000001	1926836..1927312	Oda 2
yqeK ECs3706 (ETT2)	NC_002695	96.71	426 / 426	tig00000001	3757515..3757933	Oda 1
yqeK ECs3706 (ETT2)	NC_002695	97.42	426 / 426	tig00000001	1927460..1927881	Oda 2

yqfA (hemolysin-III family gene)	CP027060	96.52	660 / 660	tig00000001	3825429..3826088	Oda 1
yqfA (hemolysin-III family gene)	CP027060	96.52	660 / 660	tig00000001	1995305..1995963	Oda 2
YqgB (virulence promoting factor)	CP023258	97.28	147 / 147	tig00000001	3873626..3873771	Oda 1
YqgB (virulence promoting factor)	CP023258	96.60	147 / 147	tig00000001	2043410..2043554	Oda 2
zntA	AP010958	95.62	2194 / 2199	tig00000001	4403734..4405915	Oda 1
zntA	AP010958	95.81	2194 / 2199	tig00000001	2571941..2574127	Oda 2
ZnuA	BA000007	97.61	922 / 933	tig00000001	2603871..2604786	Oda 1
ZnuA	BA000007	97.15	913 / 933	tig00000001	777221..778123	Oda 2
ZnuB	BA000007	97.71	786 / 786	tig00000001	2605623..2606408	Oda 1
ZnuB	BA000007	97.46	787 / 786	tig00000001	778959..779744	Oda 2
ZnuC	BA000007	96.16	756 / 756	tig00000001	2604874..2605626	Oda 1
ZnuC	BA000007	95.11	756 / 756	tig00000001	778217..778962	Oda 2
zupT	CP027060	99.61	774 / 774	tig00000001	4004710..4005480	Oda 1
zupT	CP027060	99.48	774 / 774	tig00000001	2174244..2175013	Oda 2



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway