



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Funn av en kolistin-resistent bakterie, med en mulig induserbar klasse A- β -laktamase isolert fra utendørs miljø

A colistin-resistant bacterium isolated from an outdoor environment, possibly carrying an inducible class A β -lactamase

Yvonne Yiwen Zhi

Matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven utgjør 30 studiepoeng og er skrevet i det siste året som en del av mastergrads studiet innen Matvaretrygghet, -Kvalitet og -Hygiene ved fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Det har vært interessant og lærerikt å jobbe med denne oppgaven, men også utfordrende, krevende og stressende. Derfor ønsker jeg å takke noen av de som har bidratt på ulike måter i denne prosessen:

Jeg vil først og fremst takke Professor Bjørn-Arne Lindstedt for god veiledning og all hjelp under masteroppgaven. Han har alltid stilt opp med godt humør og gitt gode forklaringer på mine spørsmål. Jeg vil også takke førstemanuensis Hilde Marit Østlie for gjennomlesing og alle konstruktive tilbakemeldinger. Videre vil jeg uttrykke stor takk til stipendiat Misti Dawn Finton for god hjelp og veiledning på alt laboratorisk arbeid. Jeg vil også takke overingeniør Ahmed Abdelghani for gode råd og tips på laboratoriet.

En spesiell takk til min kjære sambo Yang, som har støttet meg på alle måter, ikke minst faglig med sin dype kunnskap innenfor molekylærbiologi underveis i oppgaven.

Til slutt vil jeg takke min mor for hennes varme omtanke og stadige bidrag med praktiske ting, noe som i rikt monn har bidratt til at jeg kunne holde fokus på mine arbeidsoppgaver som master-student. Jeg vil også takke min mor sin samboer Tor Vidar for korrekturlesing for en del av oppgaven selv om han har vært syk i en lang periode. God bedring Tor Vidar!

Oslo, desember 2019

Yvonne Yiwen Zhi

Abstract

Background: The abuse of antibiotics has become a global issue which leads to the development and spread of antibiotic resistance (AR) bacteria in the environment. β -lactams are the most commonly used antibiotic group. This explains the existence of many Gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family which have developed an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) that can inactivate β -lactam antibiotics.

Purpose: In this master's thesis we investigated the presence of ESBL-producing bacteria in the aquatic environment surrounding Norwegian University of Life Sciences (NMBU) campus in Ås. The main purpose of the study is to identify the species of AR bacteria and to reveal their genetic mechanism for AR.

Methods: Water samples were taken from the lakes surrounding NMBU. Samples were filtered and transferred to selective chromogenic dishes ("Brilliance™ ESBL" and "Brilliance™ CRE") to promote the growth of ESBL-producing bacteria. Polymerase chain reaction (PCR) with multiplex and single plex were run to detect resistance genes encoding ESBL. Sanger and Illumina sequencing were performed to identify bacteria species and genes that responsible for AR. An antibiotic sensitivity test (AST) was performed on two selected bacteria strains to confirm their resistance to different types of antibiotics.

Results: A total number of 10 AR bacterial isolates were selected for further analyses. One bacterial isolate from "Brilliance™ ESBL" was identified as *Pseudomonas* spp. The bacteria showed positive bands for primer CAU-1 by single-site PCR, but no β -lactamase gene (*bla*) was identified by Illumina sequencing. However, many genes encoding efflux pumps were found in the bacteria genome. The AST has shown that the bacteria was resistant to ampicillin and trimethoprim. Another selected bacterium was identified as *Herbaspirillum* spp which grew on "Brilliance™ CRE". AST showed that the bacterium was resistant to colistin and sensitive to β -lactam antibiotics. Genes encoding *bla*TOHO-1-like, *bla*HcpA and many efflux pumps were identified in *Herbaspirillum* spp. TOHO-1 was a class A- β -lactamase which has not be identified previously. Furthermore, it may be inducible when β -lactam antibiotics exist in the environment.

Conclusion: The study has identified many different species of AR bacteria in the water surrounding NMBU. In addition, we also identified a class A β -lactamase in *Herbaspirillum* spp. which can be induced by β -lactam antibiotics. Further research was required to study and prevent the spread of AR.

Sammendrag

Bakgrunn: Misbruk og overbruk av antibiotika har ført til utvikling og spredning av antibiotikaresistens (AR). Dette er et økende globalt problem som utgjør en stor helsetrusel. Blant antibiotika er β -laktamer den mest vanlige brukte antibiotikagruppen, derfor har mange Gram-negative bakterier fra *Enterobacteriaceae* familie utviklet β -laktamase med utvidet spektrum (ESBL) som inaktiverer β -laktamantibiotika. Dessuten kan AR spre seg ved at disse bakteriene smitter mellom bl. andre bakterier, dyr og miljø.

Hensikt: Formålet med denne masteroppgaven var å undersøke tilstedeværelse av ESBL-produserende bakterier i akvatiskmiljø fordi det har vært lite fokus på forekomst og spredning av AR i akvatiskmiljøet. Dette er med på å bidra til et helhetlig kunnskap om utbredelse av AR i hele økosystem.

Metode: Vannprøver hentet fra Norges miljø- og biovitenskapelige universitet ble først filtrert og overført til selektive kromogene skåler («*Brilliance*[™] ESBL» og «*Brilliance*[™] CRE») for å fremme vekst av ESBL-produserende bakterier. Videre ble det kjørt multipleks og singelpleks «polymerase chain reaction» (PCR) for detektering av resistensgener som koder for ESBL. Det ble også utført Sanger- og Illumina-sekvensering for identifisering av bakterier, hvorav Illumina-sekvenseringen også kunne påvise alle resistensgener i bakterienes genomer. Til slutt ble det gjort en antibiotika sensitivitetstest (AST) på to utvalgte bakterier for å undersøke bakterienes motstandsdyktighet mot ulike typer antibiotika.

Resultater: Blant 10 undersøkte bakterieisolater vokste 1 bakterieisolat på «*Brilliance*[™] ESBL» som ble senere identifisert som *Pseudomonas* spp. ved Sanger-sekvenseringen for 16S rRNA. Bakterien viste positivt bånd for primer CAU-1 ved singelpleks PCR, men ved Illumina-sekvenseringen ble det ikke detektert noe gener som koder for β -laktamase (*bla*). Det ble derimot funnet mange gener som koder for effluxpumper i bakteriens genomet. Gjennom AST ble det påvist at bakterien var resistent mot ampicillin og trimetoprim. Den andre utvalgte bakterien var *Herbaspirillum* spp. og vokste på «*Brilliance*[™] CRE». AST viste at bakterien var resistent mot kolistin og var følsomme mot β -laktamantibiotika, men etter Illumina-sekvensering ble TOHO-1 lignende gen og *bla*_{HCPA} annotert av PROKKA i tillegg til noe effluxpumper. TOHO-1 var en ny klasse A- β -laktamase fordi det ikke finnes helt identiske β -laktamase registrert i noen databaser. Dessuten er den muligens en induserbar β -laktamase, da den var følsomme mot β -laktamantibiotika men vokste på «*Brilliance*[™] CRE».

Konklusjon: Studien viste at det fantes multiresistente bakterier der prøvene ble hentet. Resultatene er foruroligende med tanke på et funn med ny type induserbar β -laktamase og var samtidig kolistin-resistent. Dette tydet på at AR er under utvikling. Videre forskning var derfor nødvendig for å forebygge ytterligere spredning av AR.

Forkortelse

ABC - Adenosintrifosfat bindende kasett

AR - Antibiotikaresistens

ARB - Antibiotikaresistent bakterie

ARG - Antibiotikaresistent gen

AST - Antibiotika sensitivitetstest

ATP - Adenosintrifosfat

Bp - Basepar

BP - Brytningspunkt

CRE - Karbapenem resistent *Enterobacteriaceae*

CTX-M - Cefotaksimase München (ESBL_A)

ddNTP - Dideoksynukleotid

dNTP - Deoksynukleotid

ECDC - Centers of Disease Control and Prevention

EDTA - Etylen Diamin Tetra Acetat

ESCMID - The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ESBL - β -laktamase med utvidet spektrum

FQ - Fluorokinoloner

G+ - Gram positive bakterier

G- - Gram negative bakterier

HcpA - *Helicobacter pylori* cysteinrik protein A (β -laktamase)

HcpC - *Helicobacter pylori* cysteinrik protein C

HGO - Horisontal genoverføring

IM - Innermembran

KPB - Karbapenemaseproduserende bakterier

MBL - Metallo- β -laktamase

MIC - Minimum inhiberende konsentrasjon

MRSA - Meticillin resistent *Staphylococcus aureus*

MSIS - Det norske meldingssystemet for smittsomme sykdommer

MDR TB - Multidrug resistent tuberkulose

MGE - Mobile genelementer

MH - Muller-Hinton Agar

NDM - New Delhi metallo β -laktamase

NORM - Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober

NORM-VET - NORM fra fôr, dyr og næringsmidler

PBP - Penicillinbindende proteiner

OM - Yttermembran

PCR - Polymerase kjedereaksjon

QAC - Quaternary ammonium compounds

rRNA - Ribosomalt RNA

VIM - Verona Integronkodet Metallo- β -laktamase

VRE - Vancomycinresistente enterokokker

WHO - World Health Organization

XDR TB - Extensively drug resistant tuberkulose

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Abstract	II
Sammendrag	III
Forkortelse	IV
1.0 Introduksjon	1
2.0 Teori.....	2
2.1 Antibiotika	2
2.1.1 Klassifisering av antibiotika	3
2.1.2 Virkningsmekanismer for antibiotika	4
2.1.3 Antibiotikaforbruk	7
2.2 Antibiotikaresistens.....	8
2.2.1 Naturlig og ervervet resistens	8
2.2.2 Virkningsmekanismer for antibiotikaresistens.....	10
2.2.3 Resistensenzymmer - ESBL	12
2.3 Forekomst og spredning av antibiotikaresistens i miljø.....	16
2.4 Tiltak for å hindre utvikling av antibiotikaresistens	18
2.5 Metodisk teori	19
2.5.1 Selektive kromogene skåler	19
2.5.2 Polymerase chain reaction	20
2.5.3 Gelelektroforese.....	21
2.5.4 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av DNA.....	22
2.5.5 Sanger-sekvensering for 16S ribosomalt RNA.....	23
2.5.6 Helgenomsekvensering med Illumina-sekvensering.....	24
2.5.7 Antibiotika sensitivitetstest.....	25
3.0 Materialer og metoder	27
3.1 Flytskjema for prosesser.....	27
3.2 Prøveinnsamling	28
3.3 Isolering og ekstrahering av DNA	29
3.4 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av DNA.....	29
3.5 PCR.....	30
3.6 Agarose gelelektroforese	31
3.7 Sanger-sekvensering for 16S rRNA.....	32
3.7.1 PCR for 16S rRNA.....	32
3.7.2 Rensing av 16S rRNA PCR-produkter.....	33

3.7.3 Kvantifisering av 16S rRNA PCR-produkter	34
3.8 Helgenomsekvensering ved Illumina-sekvensering	34
3.9 Antibiotika sensitivitetstest.....	34
4.0 Resultater	36
4.1 Sammenligning mellom fenotypiske og genotypiske resultater (screeningmetode VS Sanger-sekvenseringen av 16S rRNA).....	36
4.2 Genotypisk påvisning av resistensgener	39
4.2.1 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av ekstraherte DNAet til bakterieisolatene	39
4.2.2 Påvisning av antibiotikaresistente gener ved PCR	40
4.3 Illumina-sekvensering.....	41
4.4 Antibiotika sensitivitetstest for P1 og P10	41
5.0 Diskusjon	43
5.1 Påvisning med fenotypisk metode sammenlignet med Sanger-sekvensering av 16S rRNA	43
5.2 Bakterier funnet i vannprøver	45
5.2.1 <i>Pseudomonas</i> spp.....	45
5.2.2 <i>Herbaspirillum</i> spp.....	47
5.3 Funnenes relevans.....	49
5.4 Forsalg til videre arbeid	50
6.0 Konklusjon	51
7.0 Litteraturliste.....	52
Vedlegg A.....	i
Vedlegg B.....	ii
Vedlegg C.....	iii
Vedlegg D.....	vi
Vedlegg E	ix
Vedlegg F	xii

1.0 Introduksjon

Bekjempelse av infeksjonssykdommer er et viktig tema fordi infeksjoner har alltid vært dominerende sykdoms- og dødsårsak i menneskets sykdomspanorama (Yazdankhah et al., 2013). Til tross for oppdagelse av ulike antibiotika i periode 1920-1960 som reduserte dødsfall forårsaket infeksjoner betraktelig, har økende forekomst av antibiotikaresistens (AR) samt utvikling av nye infeksjoner skapt helseutfordringer i dagens samfunn. Nesten alle antibiotikum benyttes i dag var utviklet under denne perioden, også kalt «antibiotikaens gullalder». Det som er foruroligende er at flere av de antibiotikumene har blitt ineffektive mot mange patogener og ført til høy mortalitet og morbiditet, noe som kan skyldes av utvikling av antibiotikaresistente bakterier (ARB) (Folkehelseinstituttet, 2010a). I forbindelse med dette har mange mikroorganismer fått oppmerksomhet av Verdens helseorganisasjon (WHO), bl.a. *Enterobacteriaceae* som produserer β -laktamase med utvidet spektrum (ESBL), vancomycinresistente enterokokker (VRE), meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) og *Acinetobacter baumannii* (WHO, 2019a). Grunnen er at disse bakteriene er ofte multiresistente (MDR). Dessuten inneholder mange av disse bakteriene resistensgener som kan overføres til andre bakterier og dermed bidra til spredning av AR i hele økosystem, noe som utgjør en både internasjonalt og nasjonalt trussel mot vår framtidige helse.

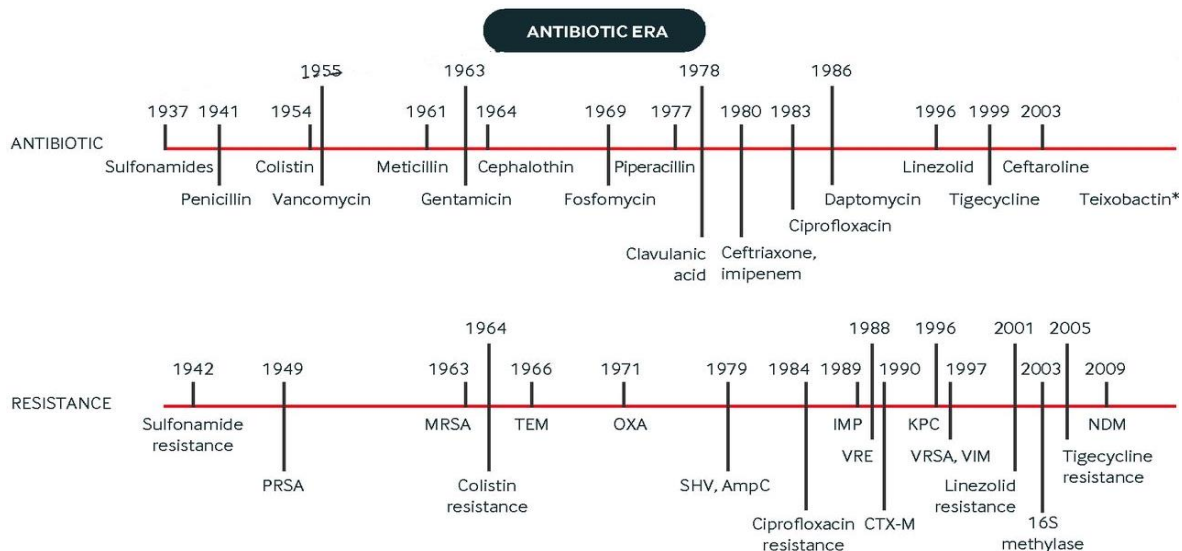
Det har vært mye fokus på AR som forekommer hos mennesker, dyr og i mat, og flere land har etablert overvåkningsprogram for AR og antibiotikabruk for å kunne begrense og forebygge utvikling av AR, men AR i ytre miljø har derimot ikke fått like mye oppmerksomhet på (Steinbakk et al., 2014). Det ytre miljøet er faktisk en viktig del i økosystemet som er med på å spre AR, spesielt i akvatiskmiljø, da antibiotika kan gå gjennom utslipp og spres videre til bl.a. overflatevann og grunnvann. Etter som det er gjort relativt lite undersøkelse om forekomst av AR og om hvor utbredt resistens er i akvatiskmiljøet, trengs det mer og bredere forskning på dette området for å få et helhetlig kunnskap. På bakgrunn av dette ble det i denne studien gjort en rekke undersøkelser rettet mot forekomst av ESBL-produserende bakterier i akvatiskmiljø. Flere vannprøver ble hentet fra områder rundt Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i Ås. Både fenotypiske og genotypiske metoder ble benyttet for å undersøke tilstedeværelse av ESBL-holdige bakteriene og deres virkningsmekanismer.

2.0 Teori

2.1 Antibiotika

Mennesker har alltid forsøkt å kjempe mot infeksjoner. Allerede i 1600-tallet ble alkaloid ekstrakter fra kinabark og ipecacuanhabusken oppdaget og viste effekt mot malaria og amøbiasis i Sør-Amerika (Yazdankhah et al., 2013). I begynnelsen av 1900-tallet innledet Paul Ehrlich (1854 - 1915) antibiotisk æra gjennom arbeide med syntetiske antimikrobielle midler, noe som førte til fremstillingen av flere sulfonamider fra 1932. Sulfonamidene ble anvendt mot en rekke sykdommer, bl.a. lungebetennelse, urinveisinfeksjoner, halsbetennelse, barsel feber osv. Innføring av sulfonamidene er sannsynligvis en viktig stimulus for utvikling av antibiotika.

Penicillin er verdens første antibiotika oppdaget av Alexander Fleming (1881 - 1955) ved et rent tilfelle i sommer 1928, men utvikling stoppet opp ettersom han ikke klarte å produsere nok penicillin til kliniske tester (Tronsmo, 2016). Helt til 1940 påviste professor Howard Florey og kjemiker Ernst Chain (1906 - 1979) penicillinets medisinske virkning ved Oxford universitetet i England (Yazdankhah et al., 2013). De klarte å rense penicillinet slik at det kunne tas i medisinsk bruk. Anvendelse av penicillinet i behandling av mennesker skjedde først gang i 1941 i England, hvor en 40-åring politimann ble nesten frisk ved behandling av penicillinet, men han døde likevel da det var slutt på rensed penicillin. På grunn av krigen og begrenset ressurser i Europa var det vanskelig å få til storskala produksjon av penicillin. Produksjon av penicillinet ble derfor flyttet til USA og ble offentlig introdusert på forsider til alle amerikanske aviser i 1942. Under 2. verdenskrig ble 2.3 millioner doser av penicillin fraktet fra USA til England og benyttet til behandling av soldater av de allierte (Tronsmo, 2016). Enorm etterspørsel etter penicillinet under krigen og dets suksess førte til oppdagelser av flere nye antibiotika under «antibiotikaens gullalder», hvorav streptomycin (første antibiotika mot tuberkulose), kloramfenikol (første bredspektrede antibiotika), gentamicin samt andre viktige antibiotika ble innført (Yazdankhah et al., 2013). Figur 1 viser en tidslinje for innføring av ulike antibiotikum, samt utvikling av resistens til enkelte antibiotikum.



Figur 1. Tidslinje for antibiotika oppdaget fra 1937 og utvikling av resistenser fra 1942. (*Ikke i klinisk bruk) (Iredell et al., 2016).

Ordet «antibiotikum» kommer av gresk og betyr «mot liv». Det ble først definert av Selman Waksman (1888 - 1973) i 1942 som et stoff produsert av mikroorganismer som alt i lave konsentrasjoner dreper eller hemmer veksten av andre mikroorganismer (Yazdankhah et al., 2013). Ettersom antibiotika fikk stor utvikling årene etter og har vært et av de mest sentrale medikamentene i helsevesenet i dag, inkluderer begrepet nå også semisyntetisk og syntetisk antibiotika i tillegg til de som produsert naturlig av muggsopp eller *Actinomyces*-arter (Lund, 2017).

2.1.1 Klassifisering av antibiotika

Det finnes flere måter å kategorisere antibiotika på. Som nevnt kan antibiotika være enten syntetisk, semisyntetisk eller naturlig produsert av muggsopp. I tillegg er det vanlig å klassifisere antibiotika etter bl.a. deres virkningsspekteret, kjemiskstruktur, toksisitet og virkningsmekanisme. Etter virkningsspekteret er antibiotika delt i smalspektret og bredspektret (Lund, 2017). Et smalspektret antibiotika er aktivt mot G+ bakterier som f.eks. penicillin, mens et bredspektret antibiotika er aktivt mot både G+ og G- antibiotika. I denne studien ble det benyttet 13 ulike antibiotika, og disse er klassifisert etter deres kjemiske strukturer (tabell 1).

Tabell 1. 13 antibiotika benyttet i denne studien som er delt i 8 klasser etter deres kjemiske strukturer.

Antibiotikaklasser	Antibiotika
Aminopenicilline (β -laktam)	Ampicillin (3. generasjon) Amoksisilin med klavulansyre
Kefalosporine (β -laktam)	Cefataxim (3. generasjon) Cefepim (4. generasjon)
Karbapeneme (β -laktam)	Imipenem Meropenem
Fluorokinolone	Ciprofloxacin
Aminoglykoside	Amikasin Gentamicin Streptomycin
Makrolide	Erytromycin
Polymyxin	Kolistin
Andre antibiotika	Trimetoprim

Videre skilles antibiotika mellom baktericider og bakteriostatiske antibiotika som har ulike virkningsmekanismer. De fleste baktericider dreper bakterier direkte ved å hemme syntese av DNA, RNA, cellevegg eller protein, mens bakteriostatiske forbindelser hindrer bakteriene i å dele seg uten å drepe dem (Kohanski et al., 2010). Til tross for bakteriostatiske antibiotika ikke dreper bakteriene, kan de være tilstrekkelige for noen pasienter, da antibiotikumene i samarbeid med kroppens immunforsvar i form av fagocytter og «antibody» produksjon kan bekjempe infeksjoner (Lund, 2017; Tronsmo, 2016).

2.1.2 Virkningsmekanismer for antibiotika

Generelt virker antibiotikum på 5 ulike måter (Tronsmo, 2016). De 5 virkningsmekanismene er listet opp nedenfor.

- 1) Inhibering av celleveggsyntese: *β -laktamer*
- 2) Inhibering av proteinsyntesen: *makrolider, aminoglykosider*
- 3) Inhibering av DNA syntese: *fluorokinoloner*
- 4) Polypeptid-antibiotika: *polymyxin*
- 5) Vekstfaktor analoger: *trimetoprim*

2.1.2.1 Inhibering av celleveggsyntese (for β -laktamer)

Blant de antibiotikumene benyttet i denne studien har antibiotika aminopenicilliner (derivater av penicillin), kefalosporiner og karbapenemer denne virkningsmekanismen (Steane, u.å.). Disse er β -laktamantibiotika fordi de inneholder ringstruktur kalt β -laktamring i deres kjemiske struktur. En mulig forklaring på denne virkningsmekanismen er at β -laktamring ligner på struktur til D-alany D-alanin, noe som er en del av peptidkjede i bakteries cellevegg (Kapoor et al., 2017). D-alany D-alanin vil danne kryssbinding med glysinrester vha. penicillinbindende proteiner (PBP) og styrker celleveggen. Ved bruk av β -laktamantibiotika binder PBP til β -laktam i steden for D-alany D-alanin, noe som gjør det umulig for dannelse av ny peptidglykan, og bakteriecellen vil da sprekke seg.

2.1.2.2 Inhibering av proteinsyntesen (for makrolider og glykosider)

Proteinsyntese foregår i to trinn, hvorav DNA blir først transkribert til budbringer RNA (mRNA) som deretter translateres til protein vha. ribosomer (Aarnes, 2011). Ribosomer 70S (Svedberg-enhet) til bakterieceller er satt sammen av to subenheter, 30S og 50S. Antibiotika aminoglykosider og makrolider hemmer translasjonen på ribosomene ved å angripe disse to subenhetene (Kapoor et al., 2017). Aminoglykosider er positiv-ladet. Etersom yttermembran (OM) til bakterier er negativ-ladet, kan aminoglykosider trenge lett gjennom porer i membranen og videre gjennom cytoplasma. I samarbeide med 16S rRNA (en underenhet til 30S subenhet) i cytoplasma vil den føre til feilavlesning, og translasjon av mRNA avsluttes dermed for tidlig.

I stedet for å angripe 30S subenhet, er målet til makrolider underenhet 23S rRNA til 50S ribosomalt subenhet. Makrolider binder seg til 23S rRNA og hemmer aminosyrer binder seg til polypeptidkjede, slik at en ufullstendig polypeptidkjede slippes ut. Translasjon blir dermed hindret (Kapoor et al., 2017; Steane, u.å.). Makrolider har et bredere spekter enn penicillin og er ofte et alternativ for pasienter som er allergiske mot penicillin (Steane, u.å.).

2.1.2.3 Inhibering av DNA syntese (for fluorokinoloner)

Enzymer DNA gyrase og topoisomerase IV er viktig for DNA replikasjon og transkripsjon. Gyrase katalyserer superkveiling til dobbeltrådet DNA (dDNA), slik at dDNA er tvunnet sammen i riktig grad for å kunne replikeres og transkriperes når to tråder er separert, mens topoisomerase IV sørger for separering av dDNA etter replikasjon ved å lage et brudd i dattertråd. Fluorokinoloner vil hemme disse enzymene slik at DNA replikasjon og transkripsjon blir stoppet (Kapoor et al., 2017).

Blant de 13 antibiotikum i tabell 1 tilhører ciprofloxacin denne antibiotikaklassen. Ciprofloxacin er et bredspektret baktericid som også virker på bakterier ligger inne i celler (Hasle, 2009). Den er effektiv mot de fleste infeksjoner i tarmer og urinveier og må derfor ha en begrenset bruk, kun ved alvorlige infeksjoner (Statens legemiddelverk, 2019).

2.1.2.4 Polypeptid-antibiotika (for polymyxin)

Kolistin (polymyxin E) er et eksempel på polymyxin. Den er et gammel antibiotika som ødelegger cellemembran hos mange G- bakterier (Norsk legemiddelhåndbok, 2017). Ved lave doser virker kolistin bakteriostatisk, men virker som baktericid ved høye doser. Kolistin har vært brukt som sistehåndspreparat i behandling av infeksjon forårsaket av multiresistente G- bakterier, når andre mindre toksiske antibakterielle midler ikke er effektive nok (Veterinærinstituttet, u.å.-b). Dessuten kan bruk av kolistin føre til mange bivirkninger og har derfor hatt begrenset bruk.

Positiv-ladet kolistin ødelegger cellemembran ved å binde seg til negativ-ladet lipid A. Lipid A er hydrofob og befinner seg i lipopolysakkarider som utgjør yttermembran hos G- bakterier (Yu et al., 2015). Dette skaper elektrostatiske interaksjoner mellom lipid A og kolistin, slik at kolistin kan trenge lett gjennom cellemembranen og påvirke stabilitet til innermembran (IM). Bakteriecelle går dermed i oppløsning (Yu et al., 2015).

2.1.2.5 Vekstfaktor analoger (syntetisk antibiotika som trimetoprim)

Vekstfaktorer er forbindelser organismer må ha for å stimulere vekst fordi organismene ikke klarer å syntetisere de forbindelsene selv (Tronsmo, 2016). En vekstfaktor analog er en syntetisk forbindelse som har lignende struktur til vekstfaktorer, men som ikke fungerer i cellen. Antibiotika som trimetoprim og sulfonamider er eksempler på vekstfaktor analoger. Trimetoprim hemmer dihydrofolatreduktase, et enzym som er viktig for folsyremetabolisme hos bakterier (Kapoor et al., 2017). Folsyremetabolismen sørger for omdanning av folat til tetrahydrofolat, noe som er nødvendig for celledeling (Andresen, 2019). Når denne mekanismen er hemmet, stopper celledelingen. Det er også grunnen til at gravide ikke skal bruke denne antibiotika siden folsyre er viktig for utvikling av foster.

2.1.3 Antibiotikaforbruk

Bruk av antibiotika er vanlig i forbindelse med behandling av mennesker og dyr, men en tredje del til halvparten av antibiotikabruk er enten unødvendig eller upassende når det gjelder valg av antibiotika, dosering eller varighet av behandlingen (Centers of Disease Control and Prevention, 2016). Ifølge statistikk fra Centers of Disease Control and Prevention (ECDC) ble 47 millioner preskripsjoner med unødvendige antibiotikum utgitt av leger i USA hvert år. I tillegg var USA et av de fleste land utenfor EU som var mulig for bønder å kjøpe antibiotika over disk før 2017 (Schanche, 2019). I 2017 ble det innført nye regler i USA, blant annet kun veterinærere kunne skrive resepter eller selv gi antibiotika til matproduserende husdyr. Effekten av dette var overraskende, hvorav antibiotikabruk i matproduserende husdyr viste en nedgang på 39% i to år. Dette gir en årlig reduksjon på ca. 3000 tonn antibiotika som tilsvarer det totale norske antibiotikaforbruket i over 50 år (Schanche, 2019). Til tross for stor nedgang i denne forbindelsen, er antibiotikaforbruk fortsatt høy på verdensbasis, spesielt i Asia, Afrika og Sør-Europa.

Ifølge en rapport fra World Health Organization (WHO) hvor den viste en statistikk om antibiotikaforbruk fra 65 land mellom 2016-2018, hadde Mongolia høyest forbruk blant de 65 landene. Burundi hadde lavest forbruk siden de oppga kun data fra sykehus, mens mange andre land i Europa oppga statistikk over hele sitt land. Selv om statistikken ikke er helt nøyaktig fordi mange land ikke har veletablert system som kunne samle in komplet data for antibiotikaforbruk, viste den likevel en oversikt over situasjon i verden (WHO, 2018). Generelt har Skandinavia mindre forbruk av antibiotika i forhold til andre land.

Norge er et av de landene som har lavest antibiotikaforbruk (Veterinærinstituttet, u.å.-a). Ifølge en felles rapport utgitt av Norske overvåkningsprogram for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) og Norske overvåkningsprogram for antibiotikaresistens hos mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler (NORM-VET) (2018) ligger det totale antibiotikaforbruket for mennesker, dyr og fisk på 56.3 tonn, hvorav mennesker utgjør 89% av det totale forbruket, mens andel for dyr og fisk ligger henholdsvis på 9% og 2% (NORM & NORM-VET, 2018). Den fellesrapporten viste også at penicillin er den mest brukte antibiotika i Norge helt fra 1993, etterfulgt av sulfonamider og trimetoprim. Allikevel har Norge begynt å bruke unødvendig bredspektrede antibiotika som har ført til utvikling av antibiotikaresistens (AR) (Schanche, 2019). Situasjonen i Norge er heldigvis fortsatt håndterbar. Helse- og omsorgsdepartementet i regjering har allerede laget en handlingsplan med et mål å redusere antibiotikabruk i befolkningen med 30% innen

2020 (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Ved å sammenligne med NORM & NORM-VET rapporten 2018 kan det observeres en ganske jevn nedgang i antibiotikaforbruk siden 2015.

2.2 Antibiotikaresistens

Misbruk og overbruk av antibiotika er hoved årsaker til utvikling av AR (Folkehelseinstituttet, 2012). Når en bakterie er utviklet resistens mot antibiotika, vil ikke antibiotika ha effekt på bakterien lenger. Den kan dermed formere seg videre og fremkalle eller forverre sykdom. Dette er et økende globalt problem som må tas på alvor. Konsekvenser av økt AR er flere. I noe tilfelle kan den føre til bruk av dyrere eller mindre effektive antibiotikum, samt bruk av antibiotika som gir bivirkninger (Enger, 2018). Det som er problemet er at disse vil igjen øke fare for utvikling av AR. Uten effektive antibiotikum kan kirurgi og kreftbehandling bli utfordrende, da infeksjoner med AR er vanskelig å behandle. Hvis infeksjoner er uhelbredelige kan det i verste fall føre til døden (WHO, u.å.).

2.2.1 Naturlig og ervervet resistens

Resistens mot antibiotika kan deles opp i naturlig og ervervet (Folkehelseinstituttet, 2012). Bakterier som er naturlig/iboende resistent mot antibiotika mangler nødvendige strukturer eller metabolske mekanismer, slik at antibiotika ikke har noe angrepspunkter og dermed mister effekt. Dette egenskapet er genetisk betinget som overføres kun ved arv, ikke mellom bakterier, derfor kalles det vertikal genoverføring (Gaustad, 2001). Kefalosporinresistens er eksempel på det fordi at de mangler binding til PBP hos enterokokker. Ervervet resistens er bakterier som kan erverve resistens gjennom mutasjoner eller ved overføring av arvestoff som koder for resistensegenskaper (Folkehelseinstituttet, 2012). Denne type genoverføringen kan skje mellom bakterier eller fra omgivelser til bakterier og kalles derfor horisontal genoverføring (HGO). Naturlig resistens spres ikke til andre bakterier og påvirker derfor ikke antibiotikaforbruk (Wasteson & Lund, 2014). Det er ervervet resistens som er hovedårsak til resistensutvikling og skaper globale helsetrusler. Disse bakteriene er i utgangspunktet bare følsomme mot antibiotikum, men gjennom mutasjoner eller HGO blir de resistente (Folkehelseinstituttet, 2012).

2.2.1.1 Mutasjon

Ved mutasjon skjer det forandring i et gen eller et kromosom til bakterier som gjør dem motstandsdyktige mot antibiotika (Wasteson & Lund, 2014). Hvis bakterier hos en pasient har blitt resistente mot antibiotika gjennom mutasjon, vil de mutantene formere seg på tross av antibiotikabehandling, noe som vil forsinke eller hindre helbredelse (Helsedirektoratet, u.å.).

Mutasjonen oppstår hele tiden i bakterier ved at bakteriene selekterer bort ugunstige arveegenskaper for å overleve. Den er derfor uavhengig av tilstedeværelse av antibiotika. Allikevel vil nærvær av antibiotika øke frekvensen av mutasjonen ettersom bakteriene har blitt stresset av antibiotika, og de vil da selektere ut resistente mutanter gjennom en vekstfordel.

Multiresistens hos tuberkulosebakterie *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) er et eksempel på ervervet resistens gjennom mutasjon (Wasteson & Lund, 2014). Det omtales ofte to typer tuberkulose (TB), «multidrug resistant TB» (MDR TB) og «extensively drug resistant TB» (XDR TB) (Drage & Jürgens, 2015). Ved MDR TB er *M. tuberculosis* resistente mot de to viktigste medikamenter, bl.a. isoniazid og rifampicin, mens XDR TB er ekstremt resistente, da de er resistente mot minst ett florokinolon og minst ett av amikacin, capreomycin og kanamycin i tillegg til isoniazid og rifampicin. Ifølge Moberg, 2012 oppstår resistens mot tuberkulosemedikamenter gjennom en kombinasjon av spontanmutasjoner i genomet til *M. tuberculosis* og seleksjon av resistente stammer. I dette tilfellet er multiresistens et resultat av en trinnsvis prosess, hvorav flere konsekutive mutasjoner oppstår i flere resistensgener, ikke bare i ett enkelt gen (Moberg, 2012). Fremveksten av resistens til tuberkulosebakterien har derfor blitt et globalt helseproblem. Ifølge statistikk fra WHO i 2018 ble 10 millioner mennesker syke i tuberkulose, og 1.5 millioner døde av sykdommen (WHO, 2019b).

2.2.1.2 Horisontal genoverføring

HGO hos bakterier foregår på 3 ulike måter: transformasjon, konjugasjon og transduksjon (Tronsmo, 2016). Ved transformasjon blir nakent DNA tatt opp av bakterie fra omgivelser og inkorporerer den i sitt eget kromosom ved rekombinasjon. En bakterie som ikke er motstandsdyktig mot antibiotika kan derfor ved transformasjon bli resistent hvis den får resistensgen i seg. Transformasjonen foregår naturlig innen samme art, men det ble senere påvist at prosessen foregår også mellom ulike arter eller slekter som er nært beslektet, bl.a. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp. osv. (Gaustad, 2001; Tronsmo, 2016). Det er imidlertid ikke påvist transformasjon mellom G+ og G- bakterier. Konjugasjon skiller fra transformasjon ved at den må skje ved direkte kontakt mellom donor og akseptor, hvorav et replikert plasmid overføres til akseptoren mens donnorcellen beholder original plasmidet (Tronsmo, 2016). For G- bakterier skjer genoverføring gjennom et rør kalt «sex pili» som kobler donorcellen og akseptorcellen sammen, mens for G+ bakterier skjer overføringen gjennom en klebrig overflate som «limer» cellene sammen. HGO ved transduksjon foregår mellom bakterier via bakteriofager (virus). Virus består av arvematerialer omkranset av en proteinkappe. Ved transduksjon blir biter av bakterie DNA pakket inn i proteinkappen istedenfor virus DNA som virus vanligvis gjør. Bakteriens DNA blir så infisert

i kromosom til en ny bakteriecelle for at genene skal komme til uttrykk. Ifølge Helsedirektoratet (2019) er transduksjon sannsynligvis hovedårsak for spredning av meticillinresistensgenet mellom stafylokokker (Helsedirektoratet, 2019).

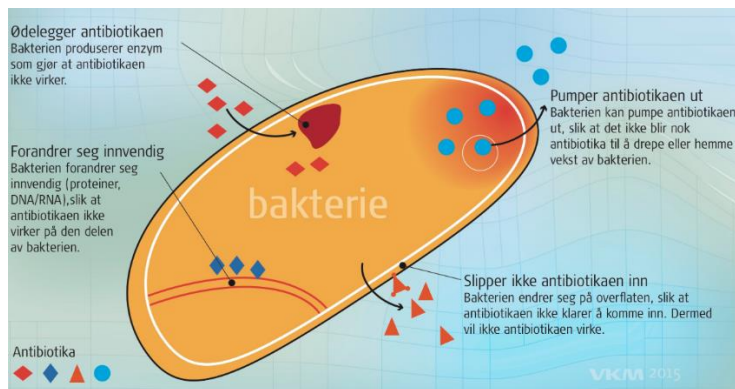
2.2.1.3 Mobile genetiske elementer

Antibiotikaresistensgener (ARG) til bakterier lokaliseres ikke bare i kromosom, også i plasmidet (ekstrakromosomalt). Plasmidene er små sirkulære mobile genelementer (MGE) som replikerer seg selv uavhengig av kromosomene (Tronsmo, 2016). Som nevnt i forrige avsnittet kan plasmidene med ARG spre seg mellom G+ eller G+ bakterier ved konjugasjon. I tillegg finnes det også andre MGE som gir en effektiv mekanisme for resistensgenoverføring mellom bakteriene, bl.a. transposoner og integroner (Gaustad, 2001). Transposoner er «hoppende gener» fordi de inneholder transposase som gjør dem mulig å flytte seg. Noe transposoner er konjugative og er vanligvis integrert i et kromosom eller plasmid. Hvis en konjugativ transposon bærer ARG, kan den overføre ARG til andre bakterie under flytting mellom ulike bakterier ved konjugasjon.

Integroner er egentlig ikke MGE i seg selv, men inngår i et bevegelig genetisk kassettsystem og blir dermed mobile genelementer (Davies & Davies, 2010; Gaustad, 2001). Integroner inneholder 2 konserverte segmenter (områder), 5' og 3', samt et variabelt området der genkassetter kunne integreres (Slette-meås & Sunde, 2008). På den måten kan integronene gjenkjenne og fange opp flere genkassetter. Etersom de fleste genkasettene inneholder ARG, kan integroner overføre resistensgener mellom celler ved hjelp av f.eks. konjugative transposoner og/eller plasmider.

2.2.2 Virkningsmekanismer for antibiotikaresistens

Det finnes hovedsakelig 4 ulike virkningsmekanismer knyttet til AR som hindre antibiotikum å virke (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Disse mekanismene er 1) Redusert opptak av antibiotika 2) Efflukspumpe 3) Modifisering av målsete og 4) Enzymatisk inaktivering av antibiotika (figur 2). Det er ofte at flere mekanismer involverer samtidig hos en resistensbakterie (Munita & Arias, 2016). Fluorokinoloner (FQ) er eksempel på det, da 3 av de 4 mekanismene (1-3) er benyttet av FQ.



Figur 2. Fire hoved virkningsmekanismer for AR (Vitenskapskomiteen for mat og miljø, u.å.).

2.2.2.1 Redusert opptak av antibiotika

Poriner er vannfylte kanaler som befinner seg på OM til G- bakterier (Kapoor et al., 2017). Små hydrofile molekyler som β -laktamer og FQ kan penetrere inn i bakteriecelle gjennom poriner. Antibiotikaresistensbakterier (ARB) kan derimot endre permeabilitet ved å enten lukke eller redusere antall poriner på OM. Dette fører til en redusert permeabilitet på OM slik at ingen/mindre mengde antibiotika kunne komme seg inn i bakteriecellene. Antibiotika mister dermed effekt.

2.2.2.2 Efflukspumpe

Efflukspumpe er et system membranproteiner har der de pumper ut toksiske stoffer ut av bakteriecellen (Kapoor et al., 2017). Dette systemet gjør at antibiotika som har gått inn i bakteriecellen blir pumpet ut igjen før den nå sitt angrepspunkt/målsete. Konsentrasjon til antibiotika i cellen blir dermed for lavt for å kunne virke mot ARB. De fleste efflukspumpene består av membranproteiner lokalisert i cytoplasmamembran. Til tross for noe enkelte efflukspumper er spesifikke mot et substrat, virker de fleste efflukspumpene mer bredspektret, dvs. antibiotika fra flere klasser kan pumpes ut av bakteriecelle (Munita & Arias, 2016). Dette gjør at pumpesystemene virker mot nesten alle antibiotika bortsett fra polymyxin og er derfor et av de viktigste årsakene til utvikling av MDR. Dessuten finnes det MDR efflukspumper som kan pumpe tungmetaller, detergent og organiske løsningsmidler ut av bakteriecelle i tillegg til antibiotika (Blanco et al., 2016). Mutasjon eller induksjon ved eksponering for antibiotika kan gi overuttrykking av efflukspumpene og gjør bakteriene enda mer resistente.

2.2.2.3 Modifisering av målsete

For at et antibiotikum skal kunne virke, må det komme frem til målsete. ARB kan hindre antibiotikumet binde seg til målsetet ved f.eks. strukturendring, amplifisering eller beskyttelse (evt. fravær) av målsetet

under forutsetning av at den nye strukturen beholder alle funksjoner bakterien hadde før strukturendring (Meyer, 2014; Tronsmo, 2016). Ettersom målsetet til antibiotikum er svært spesifikke, har ofte en liten endring stor betydning for ARB (Kapoor et al., 2017). Ved for eksempel endring i subenheter til ribosomer, vil ikke antibiotika som makrolider eller tetrasykliner hemme bakteriens protein syntese lenger. Forandring i PBP vil føre til de fleste G+ bakterier blir resistente, da det blir produsert β -laktamase. I tillegg kan også omstrukturering i cellevegg gjør det mulig for dannelse av peptidglykan. Alt disse reduserer antibiotika sin affinitet til bakterieceller. Mutert gyrase, topoisomerase IV og RNA polymerase inaktiverer FQ eller rifampin, mens ribosomal beskyttelse kan føre til tetrasyklineresistens.

2.2.2.4 Enzymatisk inaktivering av antibiotika

Enzymer som inaktiverer antibiotika er delt i 3 hoved grupper: β -laktamase, aminoglykosid-modifisert enzymer og kloramfenikol acetyltransferase (Kapoor et al., 2017). I denne studien er det fokusert på β -laktamaser, enzymer som produseres av både G+ og G- bakterier. Generelt virker disse enzymene ved å hydrolysere β -laktamringer (med ester og amidbinding), dermed inaktiverer β -laktamantibiotika som penicillin, kefalosporiner, karbapenemer og monobaktamer (Haldorsen & Samuelsen, 2012; Kapoor et al., 2017).

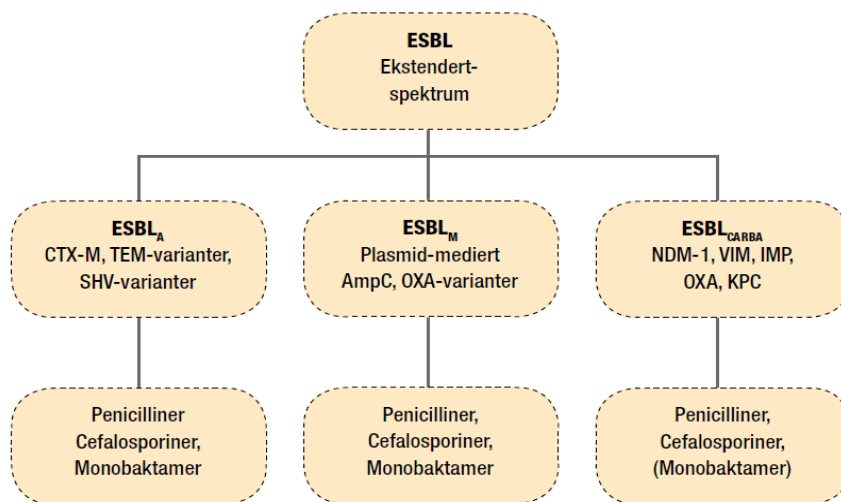
2.2.3 Resistenszymer - ESBL

Allerede i 1940, et år før penicillin ble introdusert, ble β -laktamaser første gang beskrevet som « ekstrakter til *Escherichia coli* (*E.coli*) kunne inaktivere penicilin» (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Noe år etter innføring av penicillin ble det påvist at inaktiveringen skyldtes av spredning av ekstrakromosomalt resistensgen mellom *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Munita & Arias, 2016). For å kunne løse dette problemet, ble et mer bredspektrede β -laktamantibiotika ampicillin innført. Allikevel ble ampicillinresistens oppdaget fra en pasient som heter Temoniera rundt 60-tallet, og β -laktamase fikk dermed navn TEM-1. Til tross for stadig nye antibiotikum ble introdusert under «antibiotikasgulalderen», var bakterienes evne til å motstå antibiotika utviklet også raskt (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Hittil i dag er det beskrevet over 1000 varianter av β -laktamaser (Munita & Arias, 2016).

Gener som koder for β -laktamase kalles for *bla* og er ofte lokalisert i kromosomer eller i MGE (Munita & Arias, 2016). Dersom genet sitter på plasmidet, kan det overføres lettere til andre bakterier og resulterer en raskere spredning av resistens (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Det finnes flere måter å

klassifisere β -laktamaser på, bl.a. å dele β -laktamaser i konstitutive og induserbare (Gaustad, 2001). Bakterier som produserer konstitutive β -laktamaser er resistente hele tiden, mens de med induserbare β -laktamaser uttrykkes kun i nærvær av antibiotika. Noe β -laktamaser er smalspektrede, mens andre er bredspektrede (Folkehelseinstituttet, 2010a). β -laktamaser som inaktiverer kefalosporiner og/eller karbapenemer i tillegg til penicilliner er betegnet som « β -laktamaser med utvidet-spektrum» (ESBL). De fleste ESBL er kodet på MGE og er hovedsakelig produsert av to typer bakterier, *Enterobacteriaceae* (særlig *E.coli* og *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)) og ikke-fermenterende bakterier (f.eks. *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter*).

Det finnes imidlertid ikke noe internasjonal enighet om betegnelser rundt ESBL, men i Norge er det vanlig å skille ESBL-holdige bakterier i 3 grupper: ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA} (figur 3). Det er også denne inndelingen som benyttes i denne studien. Generelt er ESBL_A og ESBL_M resistente mot de fleste β -laktamantibiotika bortsett fra karbapenemer, mens ESBL_{KARBA} er resistente mot alle β -laktamantibiotika, også karbapenemer (Giske et al., 2009).



Figur 3. Oversikt over inndeling av ESBL (Haldorsen & Samuelsen, 2012). *Monobaktamer er ikke aktuelt i denne studien og vil ikke bli omtalt.

2.2.3.1 ESBL_A

Klasse A ESBL inkluderer klassiske enzymer som hydrolyserer penicilliner og kefalosporiner (1. - 4. generasjoner), og kan hemmes av klavulansyre, sulbaktam og tazobaktam (β -laktamase inhibitor) (Bajpai et al., 2017; Giske et al., 2009). De fleste ESBL_A er mutanter av smalspektrede β -laktamaser, bl.a. TEM-1, TEM-2 og SHV-1. Muterte enzymer har annerledes aminosyre konfigurasjon rundt enzymenes

aktiv sete, noe som gjør at de kan nedbryte kefalosporiner i tillegg til penicilliner og er derfor mer motstandsdyktig. Stadig flere TEM-ESBL og SHV-ESBL er beskrevet, og i dag er det registrert tilnærmet 200 ulike TEM-ESBL og 150 ulike SHV-ESBL (Haldorsen & Samuelsen, 2012).

CTX-M har blitt den mest utbredte ESBL_A i dag (Iredell et al., 2016). Disse enzymer hydrolyserer cefotaxime og ble første gang identifisert i München, og derved navnet CTX-M. Det er mulig at opprinnelse til plasmidmedierte CTX-M var *Kluyvera* spp. som flyttet seg over i andre *Enterobacteriaceae* (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Hittil i dag er det funnet mer enn 120 ulike CTX-M varianter.

2.2.3.2 ESBL_M

ESBL_M (M for miscellaneous) er aktive mot penicilliner og utvidet-spektrum kefalosporiner, men de er generelle mer motstandsdyktige enn ESBL_A (Haldorsen & Samuelsen, 2012). ESBL_M hemmes ikke av vanlige β-laktamase inhibitorer, men cloxacillin og boronsyre. ESBL_M omfatter to undergrupper ESBL_{M-C} og ESBL_{M-D} (Bajaj et al., 2016). Plasmidmedierte AmpC tilhører undergruppe ESBL_{M-C}. AmpC er ampicillin hydrolyserende og er naturlig iboende i kromosomet hos mange bakteriearter som vanligvis ikke er uttrykt, men heller uttrykkes ved mutasjon eller vha. en promoter region, som bidrar til innsetting av genetiske elementer foran genet (Haldorsen & Samuelsen, 2012). AmpC ligner litt på ESBL_A ettersom begge virker hydrolyserende, men AmpC hydrolyserer også cefamycin i tillegg til cefoxitin og cefotetan (Bajaj et al., 2016). OXA-enzymet tilhører undergruppe ESBL_{M-D}, men er svært sjeldne i denne gruppen. Det er mulig å påvise ESBL_{M-C} på laboratorier ved fenotypisk metode, men ved påvisning av ESBL_{M-D} må genotypisk metode benyttes (Giske et al., 2009).

2.2.3.3 ESBL_{KARBA}

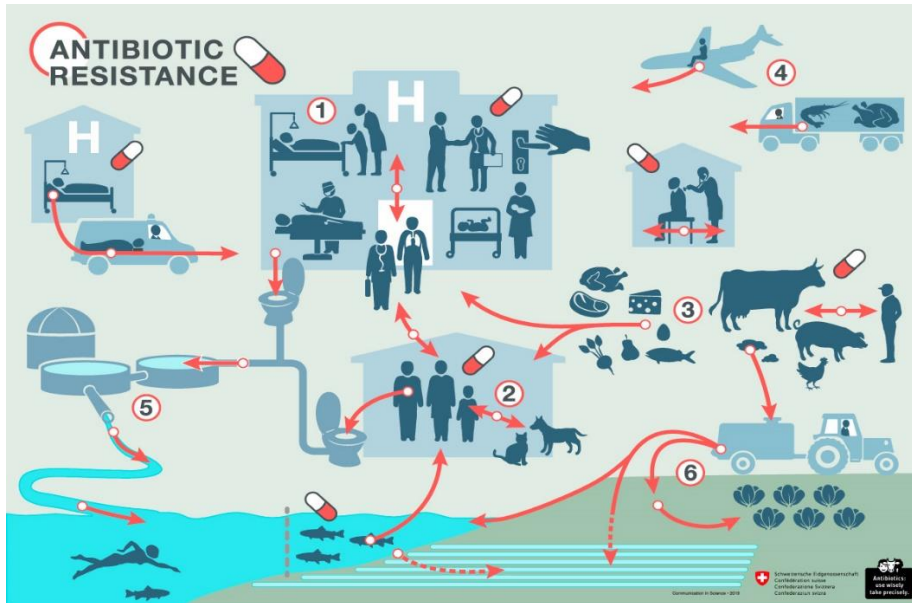
Som nevnt tidligere er kolistin sistehåndspreparat dersom andre antibiotikum ikke er effektive nok mot multiresistente G- bakterier. Samtidig har kolistin en rekke bivirkninger og har derfor hatt begrenset bruk, mens karbapenemer er «siste utvei» blant de virkelige gode antibiotikum (Moe, 2019). ESBL_{KARBA} er en gruppe enzymer som inaktiverer alle β-laktamantibiotikumene til og med karbapenemer (Haldorsen & Samuelsen, 2012). I tillegg blir de ikke inaktivert av β-laktamase inhibitorer som klavulansyre og tazobaktam. ESBL_{KARBA}-produserende bakterier (KPB) er derfor svært resistente. Karbapenemaser kan deles i to undergrupper, serinkarbapenemase og metallo-β-laktamase (MBL). *K. pneumoniae* karbapenemase (KPC) (ESBL_{KARBA-A}) og oxacillin-hydrolyserende metallo-β-laktamase 48 (OXA-48) (ESBL_{KARBA-D}) er de mest utbredte serinkarbapenemasene, hvorav KPC kan hemmes av borsyre

(Bajaj et al., 2016; Haldorsen & Samuelsen, 2012). MBL tilhører ESBL_{KARBA-B}. Enzymene inneholder sink i det aktive seter og lar seg hemme av *Etylen Diamin Tetra Acetat* (EDTA) (Haldorsen & Samuelsen, 2012; Queenan & Bush, 2007). VIM-1, NDM og IMP, som står henholdsvis for Verona integron-encoded metallo- β -laktamase 1, New Delhi metallo- β -laktamase og Imipenem-resistant *Pseudomonas*, er dominerende blant MBLene (Bajaj et al., 2016). De fleste ESBL_{KARBA} er plasmidmedierte (Opal & Pop-Vicas, 2015). Overføring av resistensgener mellom ulike arter kan skje raskt gjennom transposoner og plasmidene. Ved hjelp av genkassettsystemet som settes inn i integroner kan det fort utviklet MDR. Mange av de mest brukte antibiotikumene i dag er ikke effektive mot infeksjoner forårsaket ESBL-produserende bakterier, da de er også ofte resistente mot andre antibiotika, bl.a. FQ og aminoglykosider (Folkehelseinstituttet, 2010a). Dersom en bakterie med *bla*_{KARBA} er i tillegg resistant mot kolistin, betyr det at nesten ingen antibiotika er effektive mot denne bakterien.

Infeksjoner med ESBL-produserende bakterier er økende i verden, særlig i Sør-Europa, Afrika og Asia (Folkehelseinstituttet, 2010a). Blant dem har KPB en svært rask spredningshastighet gjennom HGO. Dette har vekket stor bekymring, da den samtidig også har en høy forekomst. I 2001 ble det registrert < 5% karbapenemresistente *K. pneumoniae*-isolater fra sykehus i Hellas, men tallet økte allerede til >70% i 2006 (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Det ble senere påvist at denne dramatiske spredningen skyldtes av ESBL_{KARBA} karbapenemase VIM. Et annet eksempel på en global spredning er ESBL_{KARBA} karbapenemase NDM som ble første gang registrert i Sverige 2008 hos en pasient som hadde vært på sykehus i India. NDM fikk deretter stor internasjonal oppmerksomhet siden 2010, ettersom NDM-produserende G-bakterier hadde en unormal økning og har blitt identifisert nå i alle europeiske land, inkluderer Norge (Moe, 2019). Utbrudd skjedde i Toscana, Italia siden november 2018 er kanskje det nyeste utbruddet forårsaket *bla*_{NDM} hos *K. pneumoniae*. Ifølge risikovurdering fra ECDC (2019) var det meldt 350 tilfeller mellom november 2018 og mai 2019, hvorav 50 pasienter hadde blodforgiftninger (Centers of Disease Control and Prevention, 2019). *bla*_{NDM} forårsaket dette utbruddet var resistant mot nesten alle antibiotikumene, kun fosfomycin og kolistin viste noe effekt. På grunn av alvorligheten i situasjonen, ble det til og med innført krisetiltak av EU for å hindre spredning av bakterier til andre land, deriblant å sette regler om fri flyt i helsetjenester (Moe, 2019). Allikevel hadde ikke Folkehelseinstituttet (FHI) i Norge gitt råd om å la være å reise til Italia eller andre land med høy forekomst av AR. Norge er et av de landene som har lavest forekomst av infeksjoner med KPB (Folkehelseinstituttet, 2010a). Til tross for at Norge hadde noen infeksjoner med lignende bakterier, ble pasienter enten friske eller var under smittekontroll (Moe, 2019). Dårlig smittevern var derfor et av de hovedårsakene til utbruddet i Italia.

2.3 Forekomst og spredning av antibiotikaresistens i miljø

ARB etablerer seg ofte i tarmflora til mennesker eller pattedyr og kan smitte mellom mennesker og mellom dyr ved f.eks. direkte kontakt (Tønjum, 2019). De er bærere av ARB, men blir sjelden syke selv. ARB kan i tillegg spres indirekte gjennom mat- og dyreproduksjon, jordsmonn og akvatiske miljø, mens dårlig smittevern, manglende hygiene samt dårlig mathåndtering vil øke risiko for spredning av AR (Steinbakk et al., 2014; WHO, u.å.). Ettersom spredning av AR skjer i et totalt økosystem, blir figur 4 tatt med for å få et helhetlig bilde av smitteveier til AR.



Figur 4. Illustrasjon av smitteveier til AR 1) Smitte mellom mennesker (pasienter, besøkere og helsepersonell) eller gjennom kontakt med kontaminert overflate og medisinsk utstyr 2) AR som oppstår under/etter antibiotikabehandling overføres fra mennesker til dyr eller omvendt 3) ARB overføres til slakter, som også kan kontaminere meieriprodukter, egg, fisk og sjømat, frukt og grønnsaker 4) Turister og matimport 5) ARB i akvatiske miljø 6) ARB i husdyrgjødsel spres til avlinger. (<https://www.bag.admin.ch/bag/en/home.html>).

Ved hjelp av figur 4 er det lett å se at spredningen av AR henger sammen med de fleste i miljø. ARB på mennesker og dyr kan smittes til og mellom hverandre gjennom direkte kontakt, mens ARB som finnes i mennesker skilles ut fra kroppen og videre til kommunale avløpsrensaneanlegg. Kommunale rensaneanlegg håndterer forurenset vann som kloakk fra bl.a. husholdning, industri og sykehus. Etter fjerning av fosfor og organiske stoffer blir vannet sluppet ut til ferskvann, elvemunninger og fjorder (Miljødirektoratet, u.å.). Problemet med denne prosessen er at ARB og ARG ikke lar seg fjernet uansett hvor god rengjøringsprosessen er, men tvert imot, rensaneanlegget kan bli en stor plattform for overføring av ARB fra enormt antall mennesker, dyr og miljø (Baquero et al., 2008). Dessuten kan koliforme bakterier være bærere av MGE og medføre spredning av ARG (Waseem et al., 2017). Når rensset vannet slippes ut fra

renseanlegget, spres dermed AR til miljø. I tillegg til AR vil også kloakk inneholde andre stoffer som bidrar til utvikling av AR, bl.a. rester av antibiotika, toksiner, biocider, desinfeksjonsmidler og tungmetaller (Davies & Davies, 2010; Waseem et al., 2017). Bakteriene har evne å tilpasse seg i metallforurenset miljø ved å benytte samme resistensmekanismer når de motvirker antibiotikum (Mariussen & Johnsen, 2017). Ved langtidseksposering for tungmetaller og biocider, kan bakteriene bli mer motstandsdyktige. Samtidig er noe antibiotika som erytromycin og oxytetracyklin ekstra vanskelig å degradere på grunn av deres fysiokjemiske og biologiske karakteristikk (Waseem et al., 2017). Slike eksponeringer, sammen med eksponering til naturlig forekommende antimikrobielle midler, vil øke seleksjonspress og spredning av ABR (Steinbakk et al., 2014). Det finnes imidlertid lite studier om forekomst og konsentrasjoner av antimikrobielle midler og desinfeksjonsmidler i norsk natur, men Gullberg et al. (2011) påpekte at en «minimum inhiberende konsentrasjon» ned til 1/1000 til antibiotika kan virke selektivt (Gullberg et al., 2011).

Dyr kan spre ARB gjennom avføringen som benyttes til gjødsling og videre distribueres til jord, overflatevann og grunnvann (figur 4). Kontaminert grunnvannet og overflatevannet er ofte kilde til drikkevann (Waseem et al., 2017). Waseem et al., 2017 og Zhang et al., 2009 presenterte mange resultater fra ulike studier, hvorav AR ble påvist i drikkevannet i mange land (Waseem et al., 2017; Zhang et al., 2009). Det ble til og med funnet økt mengde ARG etter behandling i rensesanlegg for drikkevann i Kina. Dersom det skal iverksette noe tiltak for forebygging av AR, er det nødvendig å legge fokus på avløpsanlegget. Dette gjelder spesielt for de rensesanleggene som håndterer kloakk fra sykehus eller farmasøytisk industri, da de generelle har en høyere andel av AR og antibiotika enn i andre anlegger og er derfor mer helsetruende. Det er også vist at fugler kan bære ESBL produserende *E. coli* og andre mikroorganismer som fremkaller sykdommer hos mennesker (Steinbakk et al., 2014). Fuglene ansees derfor som en potensiell spredningskilde for AR ettersom de flyr over lange avstander.

Tilstedeværelse av AR i akvatisk miljø spres videre til matplanter og sjømat. Ved inntak av mat og drikke kan mennesker igjen får i seg ARB (figur 4). I dag er det mulig å få tak i matvarer fra mange andre land ved import. Sammen med økt reisevirksomhet bidrar disse til spredning av AR globalt (Folkehelseinstituttet, 2012).

2.4 Tiltak for å hindre utvikling av antibiotikaresistens

Økende forekomst og spredning av AR har medført store globale helseutfordringer. For å kjempe mot AR utvikling må både internasjonalt og nasjonalt tiltak iverksettes, ettersom den globale situasjonen vil også påvirke situasjonen i Norge (Veterinærinstituttet, u.å.-a). Det er viktig å bevare den gunstige situasjonen i Norge, samtidig må en rekke forebyggende tiltak innføres for å begrense AR utviklingen og for å oppnå målet med 30% reduksjon for antibiotikabruk innen 2020.

Kampen mot AR krever styrking av smittevernet i alle deler av samfunnet (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Ifølge handlingsplan fra Helse- og omsorgsdepartementet er det listet opp flere tiltak rettet mot ulike grupper, bl.a. den generelle befolkningen, leger, spesialisthelsetjenester, tannhelsetjeneste og ikke minst kommunale helseinstitusjoner og nasjonal organisasjon. Den hoved tanken bak handlingsplanen er å bli mer restriktive i bruk av antibiotika for å begrense utviklingen av AR. I tillegg til de generelle tiltak som f.eks. god håndhygiene er det nevnt å øke kunnskapsnivå og kompetanse om bruk av antibiotika i befolkningen. Dette omfatter bl.a. å skjønne viktighet om å ta hele antibiotikakuren selv om man er allerede frisk, å levere rester etter fullført kurer til apoteket, ikke lån/lån bort antibiotika osv. Det er også nevnt å innføre vaksinasjonsprogram for voksne for å kunne redusere forekomst av infeksjoner og smittepress (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). Når det gjelder helsepersonell har de behov å øke kunnskapsnivået ytterligere. Basert på det grunnleggende prinsippet for antibiotikaforbruk som å alltid velge mest mulig smalspektrede antibiotika, kan det i tillegg forkorte gyldighetsperiode for antibiotikareseptor (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015; Lund, 2017). Videre skal leger unngå unødvendig antibiotikabruk, spesielt ved urinveisinfeksjoner hos kvinner og ved luftveisinfeksjoner hos barn.

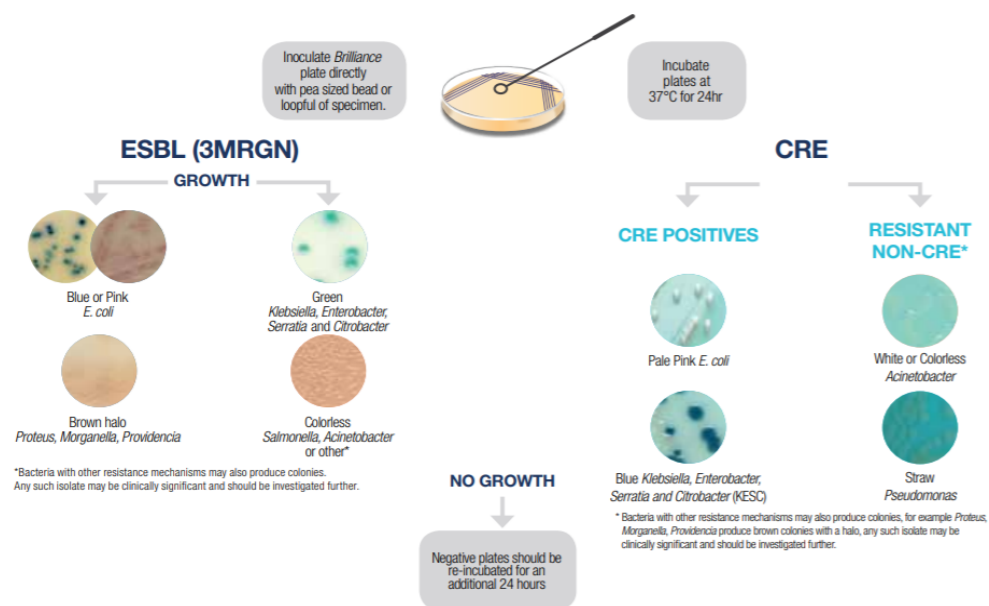
Etttersom antibiotika sprer seg også til dyr og miljø, er det like viktig å forbedre og å innføre regelverk/forskrifter innenfor veterinær, landbruk og industrier. Ifølge Steinbakk et al., 2014 er det presentert flere tiltak for å sikre god dyrehelse og god hygienisk produksjon av både dyrefôr og matplanter i alle prosesslinjer. Dette omfatter blant annet antibiotikabruk i gjødsel, håndtering av biologisk avfall, rensing av kloakk/avløpsvann fra både industri og fra landbruk (Steinbakk et al., 2014). Det er også viktig å formidle kunnskap om hvordan miljø påvirker spredningen av AR, ettersom resistensspredning i miljø ikke har fått like mye oppmerksomhet som resistensspredningen mellom mennesker og mellom dyr.

Norge har veldig gode overvåkingsprogrammer som bidrar til å begrense utvikling av AR. I tillegg til NORM og NORM-VET som nevnt tidligere, er også Norsk meldingssystemet for smittsomme sykdommer (MSIS) og Det europeiske overvåkingsystemet for antibiotikaresistens (EARSS) med på kontroll av resistensutvikling (Simonsen, 2009). Disse overvåkingsprogrammene utfyller hverandre og er viktige redskap for å motarbeide AR. Nasjonal organisasjoner som Helsedirektoratet, Antibiotikasenteret for primærhelsetjenesten (ASP), Nasjonal kompetansetjeneste for antibiotikabruk i spesialisthelsetjeneste (KAS) og mange andre organisasjoner spiller også viktige rolle i kampen mot AR (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). De har ulike oppgaver overfor forebygging av AR, bl.a. å utgi og å oppdatere nasjonale faglige retningslinjer for antibiotikabruk i spesialisthelsetjeneste, å veilede helsepersonell med innføring av tiltakene, å forbedre tilgang til antibiotika ved f.eks. samsvarer pakningsstørrelse med anbefalt behandlingstid. For å iverksette ulike tiltak i arbeide mot utvikling av AR krever derfor et samspill i alle deler i samfunnet.

2.5 Metodisk teori

2.5.1 Selektive kromogene skåler

Bruk av selektive kromogene medier er en rask og enkel screeningmetode for deteksjon av multiresistente bakterier. I denne studien ble *Brilliance*[™] ESBL- og CRE-Agar (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) benyttet. *Brilliance*[™] ESBL Agar inneholder cefpodoxime og andre antibakterielle midler som hemmer vekst av ikke-ESBL *Enterobacteriaceae*, samt undertrykker vekst av AmpC og ikke-ESBL organismer, slik at bakterier som vokser på mediet er hovedsakelig ESBL-produserende *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter* (KESC) (Thermo Fisher Scientific, 2010). For å differensiere disse bakterieslektene om eventuelle vekst på skåler, er det tilsatt kromogene substanser i agar, noe som hydrolyserer enzymer galaktosidase og glukuronidase og gir farge til bakteriekolonier (Gazin et al., 2012). En oversikt over kolonifarge dannes fra overnevnte bakteriene er vist i figur 5. *E. coli* produserer både β -galaktosidase og β -glukuronidase, og vil danne blå kolonier på ESBL-skålene, mens β -galaktosidase negative *E. coli* danner rosa kolonier. KESC-gruppe derimot produserer bare galaktosidase og danner grønn kolonier. Dersom det er vekst av *Proteus*, *Morganella* og *Providencia* vil koloniene omgitt av en brun ring. Om det dannes fargeløse/hvite kolonier, er det sannsynligvis vekst av *Salmonella* og *Acinetobacter* (Thermo Fisher Scientific, 2010).



Figur 5. Oversikt over mulige kolonifarger dannes på Brilliance™ ESBL- og CRE- Agar (Thermo Fisher Scientific, 2014).

Figuren viser også mulige kolonifarger dannes på Brilliance™ CRE Agar skålene. Til forskjell fra Brilliance™ ESBL Agar inneholder Brilliance™ CRE Agar modifisert karbapenem på et anbefalt nivå for å detektere mest mulige varianter av karbapenem-resistente organismer, inkludert New Delhi Metallo β-laktamase 1 (NDM-1). Om det dannes rosa kolonier på Brilliance™ CRE-skålene kan det tyde på vekst av karbapenem-resistent *E. coli*, mens blå kolonier kan skyldes av tilstedeværelse av KESC-gruppen. Det er også mulig for *Acinetobacter* og andre ikke-CRE produserende organismer å vokse på skålene, men de vil danne hvite kolonier (Thermo Fisher Scientific, u.å.-b)

2.5.2 Polymerase chain reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode for amplifisering av en spesifikk DNA-sekvens. Å amplifisere betyr å forsterke, dvs. å lage et enormt antall kopier av den spesifikke DNA-sekvensen. For å kjøre PCR må DNA templat, primerpar (F = «forward» og R = «revers»), DNA polymerase og byggesteiene dNTP (dATP, dGTP, dTTP og dCTP) blandes i et PCR-rør og settes i en PCR-maskin (termosykler). En termosyklus kan programmeres slik at reaksjonsblanding i PCR-røret oppnå ønsket temperatur i hvert trinn, samt hvor lenger hvert trinn skal være. En vanlig PCR gjennomføres i 3 trinn:

- 1) Denaturering: ca. 95 °C
- 2) Hybridisering (primer annealing): ca. 40 – 70 °C
- 3) Polymerisering: ca. 72 °C

Ved første trinn blir reaksjonsblandingen varmet opp til ca. 95 °C slik at DNA-templatet kunne denatureres, deretter senkes temperaturen til ca. 40 – 70 °C (aha. type primer) i det andre trinnet. Her binder primer F og R til hver sin enkelttrådet DNA, slik at deres 3'-ender peker mot mål-sekvens (DNA-sekvens som skal amplifiseres). For å syntetisere nye DNA-tråd ut fra primerne, blir temperatur hevet til ca. 72 °C, da denne temperaturen er den optimale temperaturen til DNA-polymerase. DNA polymerase er et enzym isolert fra en varmestabil bakterie *Thermus aquaticus* og tåler gjentatte oppvarminger til 95 °C. Denne katalyserer DNA replikasjon fra den fri 3'-OH-enden på begge primerne vha. dNTP som byggesteiner. Når disse 3 trinnene (en syklus) er gjennomført, begynner thermosyklusen å kjøre samme syklusen på nytt, hvor primerne kunne feste seg på både syntetiserte DNA og det opprinnelige DNA-templatet. Mengde DNA-tråd dobles etter hver syklus, og syklusen kan gjentas helt frem til ønsket antall sekvenser er oppnådd (Sjøberg, 2013).

I dag fins det flere varianter av PCR, og i denne oppgaven ble multipleks og singelpleks PCR benyttet. I en multipleks PCR benyttes det flere primerpar slik at flere mål-sekvenser kunne amplifiseres på en gang (Watson, 2004). Dette er både tid- og pengersparende. En singelpleks PCR kjøres ofte etter å ha fått positivt resultat fra multipleks PCR, ettersom det benyttes bare et primerpar og amplifiserer kun en spesifikk mål-sekvens av DNA (Watson, 2004).

2.5.3 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode der fragmenter av DNA eller RNA kan separeres ved hjelp av et elektrisk felt (Watson, 2004). DNA er bygget opp av nukleotider, som igjen består av en deoksyribose, en organisk base og en fosfatgruppe. Ved nøytral pH er fosfatgruppe negativ ladet. Det er den negative ladningen som gjør at DNA molekyler vandrer mot den positive polen i elektrisk feltet. Det benyttes ofte en porøs gel, hvor DNA molekylerne kunne gå gjennom. Små DNA fragmenter beveger seg fortere gjennom porene, mens store DNA-molekyler vandrer saktere gjennom. Ettersom DNA-molekyler har ulik størrelse og beveger seg gjennom gelen i ulik hastighet, blir DNA-molekylerne separert og vises som ulik bånd på gelen etter gelelektroforesen.

Det er agarosegel som ofte benyttes i gelelektroforesen. Konsentrasjon til agarosegel ligger vanligvis på mellom 0.5% - 2% (Sjøberg, 2013). Konsentrasjonen påvirker tetthet til gelen. Jo høyere konsentrasjon er, jo tettere blir suktermolekyler i gelen og desto vanskeligere for DNA-molekylerne å trenge gjennom. I denne studien ble agarosegel med konsentrasjon på 1% benyttet. Med denne konsentrasjonen kan

DNA med størrelse på 500-6000 bp separeres (Sjøberg, 2013). Ved tillaging av agarosegelen blandes agarosepulver med en elektroforesebuffer. Elektroforesebufferen inneholder ioner som sørger for at elektrisk strøm kan gå gjennom gelen og holde pH stabil under kjøring av gelelektroforesen (Fredriksen Scientific, u.å.). Det ble benyttet TAE-buffer. TAE står for *Tris base*, *acetic acid* (eddiksyre) og *EDTA*. Tris base sørger for at pH i gelen holder seg stabilt innenfor et pH intervall på 7.5-9. Det er også dette intervallet hvor alle levende organismer finner i. Eddiksyre fungerer som buffer sammen med trisbase og hindrer hydrolyse av DNA, mens EDTA er en chelat som binder toverdige ioner i gelen. Ved å fjerne disse fra gelen blir degradering av DNA hindret under kjøring av gelen. Det er vanlig å lage en 50x TAE-buffer som stock løsning og fortynnes til 1x TAE når den brukes i agarosegel og i elektroforesekar (Fredriksen Scientific, u.å.).

Ved tillaging av gel ble et fargestoff GelRed® (Biotium, Fremont, CA, USA) tilsatt. Det er et fluoriserende stoff som fester seg til DNA og synliggjør DNA-båndene under UV-lys (Biotum, u.å.). GelRed® er både helsevennlig og miljøvennlig. Det er sensitiv mot UV-lys og er svært stabil ved farging av dsDNA, ssDNA eller RNA i agarosegeler. Et annet fargestoff benyttet for gelelektroforesen var Agarose Gel Loading Dye. Dette er en appliseringsbuffer som farger DNA-prøver og lettere gjør applisering av prøvene til brønner i gelen (Fredriksen Scientific, u.å.). I tillegg inneholder denne glyserol som gjør at DNA-prøvene er tyngre enn 1 x TAE-buffer, noe som sikrer prøvene synker ned i brønnene. For å vite størrelser til ukjente DNA-fragmentene etter gelelektroforese, er det nødvendig å tilsette DNA-størrelsemarkør i gelbrønn ved applisering, da denne vises i ulike bånd med kjente størrelse på gelbilde.

2.5.4 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av DNA

Ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer kombinert med Qubit™ Assay Kits (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) kan enten DNA, RNA eller proteiner kvantifiseres. Metoden går ut på å bruke fluoriserende fargestoffer som er selektive for DNA, RNA og proteiner, slik at kun ønsket molekyl måles til tross for kontaminasjon i prøve, bl.a. frie nukleotider, salt, detergenter osv. (Thermo Fisher Scientific, 2011). I tillegg er Qubit® 2.0 fluorometeret svært følsomt og nøyaktig, noe som gjør det mulig å måle lave konsentrasjoner av DNA, RNA eller proteiner.

Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer er et fullspektrum (190 – 840 nm) spektrofotometer som utnytter fiberoptikk teknologi og overflatespenning til væske slik at det trengs bare 0-2 µL av prøvematerialer for konsentrasjonsmåling (Thermo Fisher Scientific, 2009). Ved for

eksempel UV-absorbans på 260 nm måler NanoDrop spektrofotometeret alle molekyler som absorberer UV-lys ved denne bølgelengden i prøven, og dette inkluderer nukleotider, RNA, dsDNA og ssDNA. NanoDrop™ spektrofotometeret er derfor ikke så nøyaktig som Qubit® 2.0 Fluorometer når gjelder kvantifisering av DNA.

I dette forsøket ble NanoDrop spektrofotometeret benyttet til å kontrollere kvalitet til ekstraherte DNA-prøvene. Dette gjennomføres ved å måle prøvens konsentrasjon ved UV-absorbans på henholdsvis 230, 260 og 280 nm. Resultatet til målingen er vist i medfølgende programvaren på PC, hvor ratio til både $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$ er utregnet. $A_{260/280}$ sier noe om renhet til DNA og RNA. Dersom $A_{260/280}$ ligger rundt 1.8, tyder det på at DNA-prøven er ren, mens $A_{260/280}$ til RNA-prøven skal være ~ 2.0 for å regnes som ren (Thermo Fisher Scientific, u.å.-a). Dersom utregnet ratio er lavere enn de overnevnte verdiene, er det sannsynligvis proteiner, fenoler og andre kontaminanter tilstede, da disse absorberer UV-lys ved 280 nm. Ratio $A_{260/230}$ måler renhet til nukleinsyrer og skal ligge mellom 2.0 – 2.2 for å være en «ren» prøve. En lavere $A_{260/230}$ ratio kan tyde på tilstedeværelse av karbohydrater, fenoler og EDTA, noe som absorberer UV-lys rundt 230 nm.

2.5.5 Sanger-sekvensering for 16S ribosomalt RNA

Målet med DNA sekvensering er å få tilgang til organismens genetisk kode ved å bestemme sekvensen av nukleotider i DNA (Haugen, 2019). Det er flere metoder å sekvensere DNA på, og i denne studien ble det benyttet Sanger-sekvensering og Illumina-sekvensering. Sanger-sekvensering er første-generasjons sekvensering som ble utviklet av Frederick Sanger i 1970-tallet. Metoden er også kalt dideoksymetode eller kjedetermineringsmetode (Watson, 2004). For å karakterisere en ukjent bakteriestamme eller isolat med tvetydige informasjon er det vanlig å sekvensere 16S ribosomalt ribonukleinsyre (16S rRNA), da dette genet finnes i nesten alle bakterier og ikke har forandret seg stort over tid. I tillegg er 16S rRNA et relativt stort genet (1500 bp) og inneholder derfor tilstrekkelig geninformasjon til å stamme- og artsbestemme bakterie (Janda & Abbott, 2007).

Sanger-sekvensering for 16S rRNA utføres ved å kjøre PCR først, hvor DNA polymerase, primer som koder for 16S sRNA, deoksylnukleotider (dNTP) og modifiserte dideoksylnukleotider (ddNTP) blandes sammen med DNA-templat (ca. 200 bp) (Haugen, 2019). DNA-polymerase sørger for DNA-replikasjon mens primer bestemmer hvor i genssekvens replikasjonen skal starte. dNTP virker som byggesteiner under prosessen slik at flere kopier av ønsket sekvens blir syntetisert. ddNTP er en modifisert versjon av dNTP,

men mangler hydroksylgruppe i 3'-posisjon. Dette vil hindre dannelse av difosfobinding mellom nukleotidene og stoppe DNA-replikasjonen når ddNTP settes inn i sekvensen.

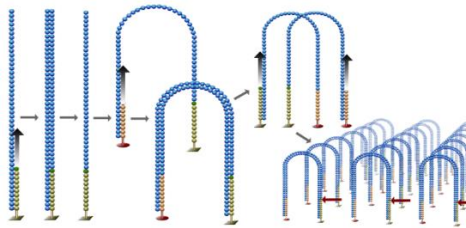
Resultatet av reaksjonen er dannelse av mange DNA-fragmenter med ulike lengde, men alle begynner fra samme primersete og avsluttes med en av de fire ddNTPene (ddATP, ddCTP, ddGTP og ddTTP) (Haugen, 2019). Deretter kjøres det kapillær gelelektroforese for å separere DNA-fragmentene etter størrelse. Korteste fragmenter vil vandre fortest under gelelektroforesen og befinne seg nederst i gelen. Alle fire ddNTP inneholder ulike fluoriserende fargestoffer, noe som gjør det mulig å identifisere dem ved bruk av en laserdetektor (Sigma-Aldrich, u.å.) Laserdetektoren registrerer nukleotidene som topper i et kromatogram og viser DNA-sekvens i riktig baserekkefølge (Lausund & Kjøbli, 2018). Denne sekvensen til ukjent bakterie kan søkes opp mot en database kalt «The Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST). Ved hjelp av BLAST kan sekvensen sammenlignet med kjente DNA-sekvenser som ligger i databasen. På den måten kan den ukjente bakterie identifiseres.

2.5.6 Helgenomsekvensering med Illumina-sekvensering

Illumina-sekvensering er andre-generasjons sekvensering som baserer seg på sekvensering ved syntese (Illumina Inc, u.å.). Prinsippet bak dette er at det blir benyttet dNTP med ulike fluoriserende fargestoffer som kunne inkorporeres i DNA templat vha. DNA polymerase. Det blir produsert millioner kopier av templatet under sekvenseringen, slik at etter endt sekvenseringen har den sannsynligvis sekvensert et helt genom. Metoden er svært nøyaktig og effektiv ettersom hver base blir lest millioner ganger for å minimere feil.

Illumina-sekvensering består hovedsakelig av 4 trinn (Illumina Inc, u.å.). I det første trinnet skal det utføres en bibliotekspreparering hvorav DNA-templat kjøres i PCR for amplifisering. Ved dette trinnet blir DNA-templatet delt i mange små fragmenter, og adaptore vil deretter bindes på endene av fragmentene. Fragmenter uten adaptore og adaptore som ikke har bundet seg vil bli vasket bort vha. magnetiske kuler, da de kulene binder til DNA (Debech, 2018). Det er forholdet mellom mengde DNA og kulene som bestemmer størrelse til fragmentene som vaskes vekk. Videre blir fragmentene med adaptore amplifisert, renses og gjort klare til neste trinn.

Adaptore er komplementære til oligoer bundet til en overflate kalt flowcelle (Illumina Inc, u.å.). DNA-fragmentene kan derfor bindes til disse oligoene når de er plassert på overflaten. Overflaten settes deretter i en sekvenseringsmaskin, hvorav fragmentene syntetiseres mange ganger gjennom Bru-Amplifisering (Figur 6). Resultat til dette er at det blir dannet mange kloner av DNA-fragmenter på ca. 300 bp. Etter endt amplifisering blir revers-fragmenter vasket bort i flere runde slik at det er kun forward-fragmenter som er igjen. Dette lettere gjør sekvensering ettersom alle fragmenter begynner fra samme side, og templatet er dermed klar for sekvensering (Debech, 2018).



Figur 6. Illustrering av Bru-Amplifisering (Wikipedia, u.å.)

Sekvensering foregår i samme maskinen. Som nevnt tidligere skjer sekvenseringen ved inkorporering av fluoriserende dNTP i DNA-kjeder, noe som gjør at 4 nukleotider sender ut ulike signaler under UV-lys og dermed kan rekkefølge av nukleotidene avgjøres (Illumina Inc, u.å.). Sekvenseringen gir bare rå sekvensdata til DNA-fragmenter som ikke gir noe mening, derfor må en rekke dataanalyser utføres, bl.a. fjerning av tilført adaptersekvenser og dårlige sekvenser, å sette fragmenter sammen til en større enheter («contiger»), annotering som oversetter sekvensdata til nyttige informasjon osv.

2.5.7 Antibiotika sensitivitetstest

Antibiotika sensitivitetstest (AST) er en metode å klassifisere bakterier er følsomme eller resistente mot antibiotika (Hoiby & Caugant, 2002). Metoden er utviklet av «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST), i samarbeid med «Clinical & Laboratory Standards Institute» (CLSI) og «National Committee for Clinical Laboratory Standards» (NCCLS). Det er ulike metoder å utføre AST på, og i denne studien ble det benyttet diskdiffusjonsmetode og buljongfortynningsmetode for å undersøke om en bakteriestamme er resistent mot ulike typer antibiotika. Det er vanlig å bruke Mueller-Hinton (MH) Agar/Buljong ettersom denne har blitt en standard medium til AST (Thermo Fisher Scientific, u.å.-c).

MH Agaren benyttes i diskdiffusjonsmetoden inneholder lave konsentrasjoner av tymin-tymidin, samt kalsium og magnesium som begrenser veksten rundt teststriper og muliggjør mer nøyaktig målinger av

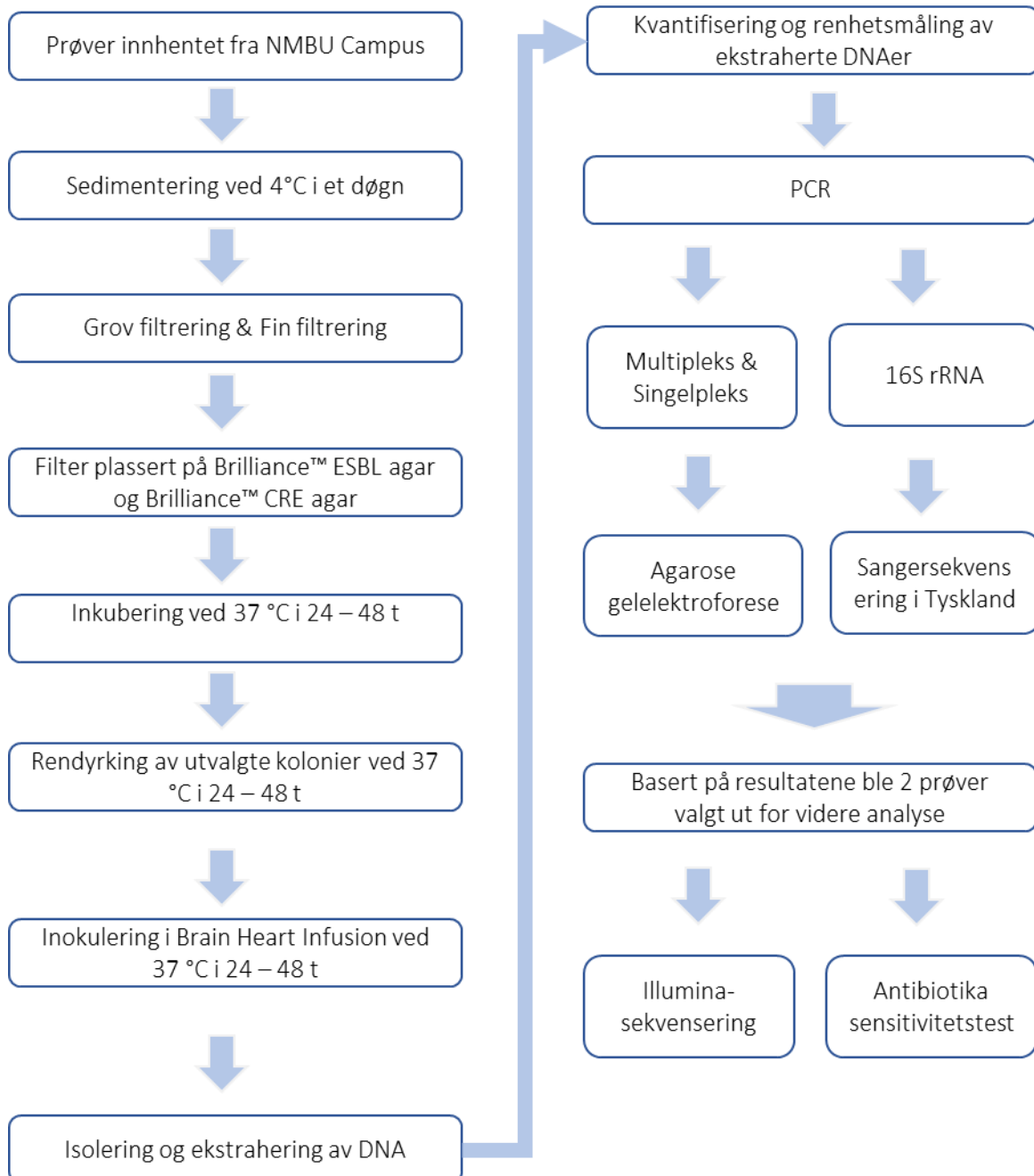
inhiberingssone (Becton Dickinson, 2016). Det er også tilsatt 5% defibrinert hesteblood og 20 mg/L β -nikotinamid adenindinukleotid (β -NAD) i agaren for å tilfredsstille vekstkrav for noen krevende bakterier, samtidig minimerer den innvirkning fra innholdsstoffene i formuleringen på resultatet til AST. I tillegg inneholder agaren kjøtttekstrakt, syrehydrolysat fra kasein og stivelse som tilfører bakterier nødvendige næringsstoffer.

Diskdiffusjonsmetoden gjennomføres ved å benytte MH Agar inokulert med en isolert bakteriestamme. Bakteriestammens konsentrasjon bestemmes gjennom en turbiditet test. Det blir plassert en teststrips som inneholder antibiotikum med konsentrasjon gradient på MH agar. Under inkubering vil antibiotikumet diffundere over til agar og danne inhiberingssone om antibiotikumet hemmer vekst av bakteriestammen (Khan et al., 2019). Størrelse til inhiberingssone tilsvarer konsentrasjon til antibiotika og kan leses av på teststripsen. Denne konsentrasjonen kalt minimum inhiberende konsentrasjon (MIC), dvs. minimum mengde antibiotika (mg/L) som skal til for å hemme vekst av en bakteriestamme i en definert tidsperiode (Haukeland, 2017). Denne MIC-verdien skal sammenlignes med EUCAST kliniske brytningspunkter (BP). Dersom verdien er høyere enn angitt BP, så er bakteriestammen resistent mot det tilsvarende antibiotikumet (EUCAST, 2019).

I denne studien ble buljongfortynningsmetoden brukt for å teste bakteriers følsomhet mot kolistin. I forbindelse med dette ble buljongfortynningsmetoden utført ved hjelp av «Compact Antimicrobial Susceptibility Panel med kolistin» (ComASP™ kolistin) (Liofilchem, Italia). Dette er et panel består av 4 x 7 to-folds fortynningsrekke av kolistin og kan teste 4 bakterieprøver på en gang. De første brønnene i hvert rad av panelet brukes som kontroll og er derfor uten kolistin, mens konsentrasjoner til kolistin øker i hver brønn bortover mot høyre (Liofilchem, 2018). Metoden går ut på å tilsette en fortynnet bakteriestamme i MH buljong som så overføres til hver brønn i panelet. Etter inkubering kan resultatet leses av ved å se om det er vekst i brønnene. Den første brønnen uten vekst med det blotte øye er MIC-verdi, og verdien kan videre sjekkes opp mot EUCAST kliniske BP.

3.0 Materialer og metoder

3.1 Flytskjema for prosesser



3.2 Prøveinnsamling

Det ble benyttet autoklaverte mediaflasker med lokk for å samle inn vannprøver. Vannprøver S1-S4 ble hentet den 19. august 2019 fra Andedammen på Ås, mens S5 var hentet fra Niagarabekken. Etter prøveinnsamling ble prøvene lagret i kjøleskap over natten for å sedimentere vannet.

For å unngå planterester, insekter og andre faste stoffer som kan gi misvisende resultater, ble sedimentert vannprøvene filtrert 2 ganger. Første gang filtrering ble utført ved bruk av autoklaverte Whatman® quantitative filter papers, Grade 589/1 black ribbon, 150 mm (Merck KGaA, Tyskland), samt trakter og mediaflasker. Ved andre gang filtrering (vakuumfiltrering) ble det benyttet apparat Microfil Support Stainless Steel Frit MISP00002 (Merck KGaA, Tyskland) med et plastrør og filtreringspapir EZ-Pak filters (0.45µm 47mm white gridded) (Merck KGaA, Tyskland). Alle deler til apparatet var sterilisert ved bruk av Flameboy og etanol. Til å begynne med ble den andre siden av plastrøret koblet til vasken, deretter ble filtreringspapirene plassert på apparatet hvor 3 plastbeger kunne festet over på filtreringspapirene. I plastbeger ble det fylt opp med 100 mL av hver vannprøve. For å vakuumfiltrere vannprøvene ble vannkranen skrudd opp og lukene i apparatet åpnet, slik at trykket fra vannet kunne trekke vannprøvene gjennom plastrøret og ut i vasken.

Etter vakuumfiltreringen ble filtreringspapirene plassert på midten av selektive skåler. Skålene som ble benyttet var Brilliance™ ESBL agar og Brilliance™ CRE agar. For å få optimal vekst skal bobler mellom filtreringspapir og medium unngås. Skålene ble så inkubert ved 37 °C i 2 døgn. For å rendyrke resistente bakteriekolonier som vokste opp på skålene etter inkuberingen, ble selektive koloniene strøket ut på nye skåler og inkubert ved 37 °C i 1 døgn. I denne studien ble det totalt dyrket 10 bakterieisolater på Brilliance™ ESBL agar og Brilliance™ CRE agar.

Etter rendyrkingen ble bakteriekoloniene overført til «brain heart infusion» buljong med et podenål og inkubert ved 37 °C i 1 døgn (eventuelt 2 døgn for de som ikke hadde mye vekst etter 1. døgn). Dette gjøres for å øke konsentrasjon av bakteriene slik at utbytte av DNA blir større ved DNA-ekstrahering. Etter inkubering ble 500 µL av hver prøve med buljong overført til et 2 mL kryorør (Nunc™CryoTubes™, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Det ble tilsatt 500 µL 60% glyserol før de ble oppbevart ved -80 °C, noe som kan brukes som stockløsning.

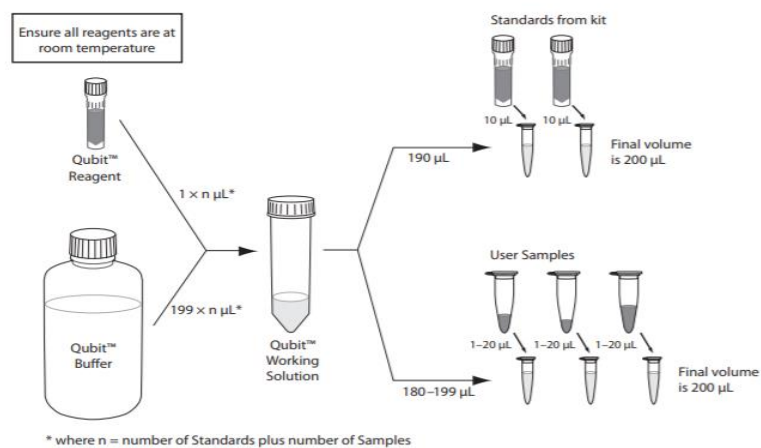
3.3 Isolering og ekstrahering av DNA

DNA ekstrahering av inkuberte prøver i buljong utføres ved å bruke GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). I denne studien ble prosedyre for gram-negativ bakterier fra produsentens protokoll fulgt etter unntatt trinn 10, hvor 25 µL SequalPrep™ Normalization Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ble benyttet istedenfor 200 µL Elution Solution.

På grunn av kvantifisering av ekstraherte DNAet i bakterieisolatene viste lave verdier ved bruk av Qubit® 2.0 fluorometeret (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), ble DNA-ekstraksjon utført på nytt ved bruk av stockløsninger. Denne gangen ble det tilsatt kun 12.5 µL SequalPrep™ Normalization Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) i trinn 10 for å doble mengde DNA i prøvene.

3.4 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av DNA

For å kvantifisere ekstraherte DNA-prøvene ble det benyttet Qubit® 2.0 fluorometeret (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) sammen med Qubit™ Assay Kits (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Fremgangsmåte er illustrert i figur 7, hvor n indikerer antall prøve. I dette forsøket ble det totalt 10 prøver målt i fluorometeret.



Figur 7. Fremgangsmåte for kvantifisering av DNA-prøvene (Life Technologies, 2010).

Figuren viser at en Qubit™ arbeidsløsning til hver DNA-prøve består av 1 µL Qubit™ Reagent og 199 µL Qubit™ Buffer fra kittet. Deretter ble 198 µL arbeidsløsningen pipettert over til et Qubit™ Assay Tube, og 2 µL DNA-prøven ble tilsatt i tuben. Det ble laget standardløsning #1 og #2 som brukes til å lage standardkurve i systemet til fluorometeret, slik at DNA-prøvene med ukjente konsentrasjoner kunne måles etter hvert (Life Technologies, 2010). Standardløsninger ble laget ved å blande 10 µL av hver standard (#1, #2) og 190 µL arbeidsløsningen.

Kvalitet til ekstraherte DNA-prøvene ble undersøkt ved å bruke NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer. For kalibrering av spektrofotometret ble 2 µL dH₂O plassert på den optiske linsen og tørket. Deretter ble 2 µL prøvene plassert på linsen og absorbansinformasjon ble avlest vha. medfulgt programvaren. Konsentrasjoner til DNA-prøvene samt A_{260/280} og A_{260/230} ble notert. Hver gang før applisering av ny prøve må forrige prøven tørkes bort med tørkepapir. Til kvalitetsbestemmelse av DNA ved NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer ble det benyttet prøver fra 2. runde ekstraksjon.

3.5 PCR

Fremgangsmåte for multipleks PCR ble fulgt etter protokoll til «QIAGEN® Multiplex PCR Kit» (Qiagen, Milano, Italia). Det ble laget en reaksjonsmiks som består av ulike reagenser i hver tube til «Applied Biosystems® MicroAmp® 8-Tube Stripes» (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Alle reagensene ble vortexet og sentrifugert i få sekunder før bruk. En oversikt over de ulike reagensene og volum er vist i tabell 2. Det var totalt 14 prøver som ble brukt som DNA-templat. Når det gjelder primermiks ble det benyttet henholdsvis multipleks CAR1-2 (PM1) og ESBL1-3 (PM2) for å undersøke tilstedeværelse av karbapenemaser og ESBL resistensgener. I hver primermiks fins det forskjellige primerpar som koder for spesifikke resistensgener. En oversikt over primerparene og tilsvarende primersekvenser i multipleksene er vist i Vedlegg C.

I tillegg ble det laget en ny primermiks (PM3) etter å ha fått resultater fra sangersekvensering, da det viste ingen positive resultater på gelbilder til PCR ved bruk av PM1-2. PM3 var nylig bestilt av Bjørn-Arne Lindstedt. Oversikt over primerparene og primersekvensene til PM3 er også vist i Vedlegg C. Fremgangsmåte for tillaging av PM3 er beskrevet i samme vedlegg.

Tabell 2. Reagenser og tilsatt volum i hver reaksjonsmiks for multipleks PCR

Reagent	Volum (µl) per reaksjon (PM1-4)
2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12.5
10 x primer mix (2 µM av hver primer)	2.5
Sterilt H ₂ O	9.0
DNA-templat	1.0
Totalt	25.0

Tabell 3. Temperaturprotokoll for DNA-templat kjørt med både CAR- og ESBL-multipleks (PM1-2)

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser (CAR-multipleks)	Antall sykluser (ESBL-multipleks)
Aktivering av DNA polymerase	15:00	95.0	1 x	1 x
Denaturering	00:30	94.0		
Hybridisering	01:30	60.0	30 x	28 x
Polymerisering	01:30	72.0		
Slutt polymerisering	10:00	72.0	1 x	1 x
Avkjøling	∞	4.0	-	-

Tabell 4. Temperaturprotokoll for DNA-templat kjørt med ny multipleks PM3.

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser (Multipleks 4)
Aktivering av DNA polymerase	15:00	95.0	1 x
Denaturering	00:30	94.0	
Hybridisering	01:30	62.0	35 x
Polymerisering	01:00	72.0	
Slutt polymerisering	10:00	72.0	1 x
Avkjøling	∞	4.0	-

3.6 Agarose gelelektroforese

For å separere og identifisere DNA-fragmenter ble alle multipleks PCR-produkter med bruk av PM1-4 kjørt agarose gelelektroforese. Det ble laget både liten og stor gel med konsentrasjon på 1% aha. antall produkter som skulle undersøkes. For en liten 1% agarosegel trengs det 0.5 g SeaKem® LE Agarose (Lonza Rockland Inc., Rockland, USA) og 50 mL 1 x TAE-buffer (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), mens en stor 1% gel trengs det 2 g agarose pulver og 200 mL 1 x TAE-buffer fra samme produsenter. Etter blanding av agarosepulvene og 1 x TAE-bufferen i en Erlenmeyerkolbe ble blandingen først varmet opp i mikrobølgeovn ved maks watt til den begynte å koke, deretter 1 minutt ved 600 W. Gelblandingen ble så kjølt ned på benken før tilsetning av GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, CA, USA) (2.5 µL for liten gel og 10 µL for stor gel).

Det ble benyttet elektroforesekar «Mini-Sub[®] cell GT cell» (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) og «Wide Mini-Sub[®] cell GT cell» (Bio-Rad Laboratories Inc., USA), med støpekar og kam, for å kjøre henholdsvis små og store gel. Nedkjølt gelblanding med tilsatt GelRed™ ble helt over til støpekar med kam. Ettersom det tar tid for gelen stivnes, ble PCR-produktene gjort klare i ventetid. Dette utføres ved å blande 4 µL RNase-fritt vann (Sigma-Aldrich, UK), 4 µL Gel Loading Dye og 3 µL PCR-produkt i brønn til en PCR plate med 96-brønn (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Når gelen var stivnet, ble kammen tatt ut, og gelen ble flyttet til elektroforesekar fylt med 1 x TAE-buffer (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA). Ved applisering ble den første brønnen til gelen tilsatt 7µL «Quick-Load 100 bp DNA ladder» (New England BioLabs[®] Inc., Ipswich, USA), mens resten av brønnene var tilsatt 10 µL av DNA-prøve fra hver brønn i PCR plate.

For å kjøre elektroforese ble elektroforesekar koblet til spenningskilde Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ved spenning på 80 V for multipleks PCR-produktene og 120 V for singelpleks PCR-produktene. Tid for gelelektroforese kjøring varierte fra 1-2 timer aha. hvor godt DNA-fragmentene hadde separert fra hverandre. Etter endt gelelektroforesen ble det tatt bilder av gelene under UV-lys ved bruk av Gel Doc™ XR system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA), og gelbildene ble redigert i dataprogram «Quantity One[®] 1-D analysis software» (Bio-Rad Laboratories Inc., USA).

3.7 Sanger-sekvensering for 16S rRNA

3.7.1 PCR for 16S rRNA

Sanger-sekvensering av prøvene ble utført av firma GATC Biotech AG i Tyskland. Før innsending av prøvene ble det gjort en rekke forberedelse. Det ble først tilberedt en reaksjonsmiks etter produsentens protokoll «iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase» (Bio-Rad Laboratories, USA) i MicroAmp[®] 8-Tube Stripes (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Reagensene og mengde volum tilsatt til hver reaksjon er vist i Tabell 5. Senkvenser til primer F og R som koder for 16S rRNA er vist i Vedlegg C.

Tabell 5. Oversikt over reaksjonsmiks til amplifisering av 16S rRNA genet fra prøvene.

Reagent	Endelig konsentrasjon	Volum (μ l) per reaksjon
5x iProff HF Buffer	1x	8.0
10 mM dNTP miks	200 μ M	0.8
Primer 1F	0.25 μ M	2.0
Primer 5R	0.25 μ M	2.0
Sterilt H ₂ O	-	24.8
iProff DNA polymerase	0.02 U/ μ L	0.4
DNA-templat	7.5 – 150 ng	2.0
Totalt		40

Videre ble PCR-rørene plassert i SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) og tilsvarende PCR-program for 16S rRNA ble kjørt, og oversikt over programmet er vist i tabell 6.

Tabell 6. PCR-program for 16S rRNA, inkluderer tid, temperatur og antall syklus til hvert trinn.

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)	Antall sykluser
Aktivering av DNA polymerase	00:30	98.0	1 x
Denaturering	00:10	98.0	
Hybridisering	00:30	53.0	35 x
Polymerisering	00:45	72.0	
Slutt polymerisering	10:00	72.0	1 x
Avkjøling	∞	4.0	-

Etter endt PCR-kjøring for 16S rRNA ble PCR-produktene kvantifisert ved bruk av Qubit® 2.0

Fluorometer. Prosedyre var det samme som det ble forklart i avsnitt 3.4

3.7.2 Rensing av 16S rRNA PCR-produkter

16S rRNA PCR-produktene ble videre rensset for å fjerne primere, og dette ble utført ved hjelp av et «GenElute™ PCR Clean-Up Kit» (Sigma-Aldrich, USA). Prosedyre ble fulgt etter medfølgende anvisning i kittet.

3.7.3 Kvantifisering av 16S rRNA PCR-produkter

Rensede 16S rRNA PCR-produktene ble igjen kvantifisert i Qubit® 2.0 Fluorometer for å sjekke om det var nok DNA i prøvene til Sangersekvenseringen. Dersom målt DNA-konsentrasjon i prøve var under 20 µg/mL, ble 7 µL av prøven og 3 µL primer overført til et eppendorfrør før innsending til GATC Biotech AG i Tyskland. Det ble tilberedt 2 eppendorfrør for hver prøve da det var to primere (F og R) som blandes med en DNA-prøve. Hvis resultater fra konsentrasjonsmåling viste mer enn 20 µg/mL, trengte det bare 5 µL av prøven og 5 µL primer (Finton, 2019). I dette forsøket ble prøve P1-10 fra multipleks PCR sendt til Tyskland for Sangersekvenseringen. I tillegg ble P1 valgt ut for å kjøre singelpleks PCR. Grunnen til dette er at den fikk et positivt bånd på gelbilde til multipleks PCR ved bruk av PM3 (Vedlegg D).

3.8 Helgenomsekvensering ved Illumina-sekvensering

Etter måling av konsentrasjon til ekstraherte DNA prøver, ble P1 og P10 benyttet til helgenomsekvensering ved bruk av MiSeq™ System (Illumina, USA), hvor alle fragmenter ble satt sammen til «contiger». Videre ble resultater fra MiSeq kjørt i program Trimmomatic for å fjerne adaptersekvenser før resultatene kunne lastes opp til Galaxy Europe. I Galaxy Europe ble det kjørt et «assembly» program kalt Shovill som setter alle «contiger» sammen. Dette programmet gir bare rådata som viser helsekvens til bakterie. For å analysere denne rådataen, ble det benyttet PROKKA, et annoteringsprogram i Galaxy Europe. Helgenomsekvensering og dataanalyse ble utført av professor Bjørn-Arne Lindstedt.

3.9 Antibiotika sensitivitetstest

Av de 10 prøvene ble P1 og P10 valgt ut for videre undersøkelse. Grunnen til at P10 ble valgt ut i tillegg til P1 er at den var sannsynligvis *Herbaspirillum* spp. basert på nBLAST-resultat. Denne slekten er ikke kjent for å være ESBL-resistent, men likevel hadde den vekst på ESBL-skåler ifølge fenotypisk resultater (Govarthanan et al., 2015; Ziga et al., 2010). For å undersøke om hvor følsomme disse to prøvene er mot ulike typer antibiotika ble AST utført. Prøvene ble testet mot 13 antibiotikum i denne studien (listet opp i tabell 1), hvorav 12 antibiotikumene (bortsett fra kolistin) ble testet med antimikrobielle stripser.

Nedfryste bakterieisolater for P1 og P10 ble strøket ut på MH Agar petriskåler (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Det ble laget 2 paralleller for hver prøve for å oppnå et mer pålitelig resultat. Etter inkuberingen ble bakteriekolonier fra P1 og P10 inokulert i saline løsning (vann med 8.5% NaCl). Turbiditeten til saline løsningen skal være visuelt samme som McFarland Standard 0.5 (Pro-lab Diagnostics, Storbritannia) før den ble strøket ut på hele MH agar skåler vha. en steril

bomullspinne. Videre ble antimikrobielle stripser fra 2 firmaer plassert på skålene og inkubert ved 37 °C i 24 timer. For antibiotika amoksisilin med klavulansyre, cefepim (4. generasjon), streptomycin og trimetoprim var det benyttet «MIC Test Strip» (Liofilchem, Italia), mens for resten av antibiotikumene ble «M.I.C. Evaluator™ strips» (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) benyttet. Ved AST for kolistin ble ComASP™ kolistin 0.25 – 16 µg/mL (Liofilchem, Italia) benyttet for å undersøke om P1 og P10 er resistente/følsomme mot dette antibiotikumet. Produsentens protokoll ble fulgt.

Etter endt inkubering ble MIC-verdier lest av fra både MH agar skålene og ComASP™ kolistin og sammenlignet med EUCAST kliniske BP.

4.0 Resultater





4.1 Sammenligning mellom fenotypiske og genotypiske resultater (screnningmetode VS Sanger-sekvenseringen av 16S rRNA)



Det ble benyttet screnningmetode for å undersøke fenotypiske egenskaper til resistensbakteriene ved hjelp av Brilliance™ ESBL Agar og Brilliance™ CRE Agar. Etter filtrering av vannprøvene ble noe interessante kolonier på Whatman® filtreringspapir (Merck KGaA, Tyskland) overført til nye agar skåler for rendyrking. Etter 24 timers inkubering ble 10 av disse skålene valgt ut for videre analyse. Fenotypisk resultater til disse 10 prøvene er presentert i tabell 7, samt hvor prøvene ble tatt. Det ble også gjort en antagelse om hvilke bakterier som vokste på skålene ut ifra kolonifarge. Ettersom det er vanskelig å bestemme bakterieslekt basert kun på kolonifarge, ble også resultater fra Sanger-sekvensering av 16S rRNA (Vedlegg A) tatt med.

Ut ifra fenotypiske resultater hadde P1 beige kolonier på Brilliance™ ESBL Agar. Dette gjør det vanskelig å anta bakteriens identitet, da dette kolonifarget ikke er oppgitt i protokollen. Men resultatet fra nBLAST viste derimot at bakterien var *Pseudomonas* spp. og mest sannsynlig *Pseudomonas putida*. Ifølge BLAST-resultatene ble P2-P4 identifisert som *Novosphingobium* spp., men disse hadde ulike kolonifarger på Brilliance™ CRE skåler. P2 og P3 hadde sterk gul farge, mens P4 hadde mørk grønn farge. Videre ble P5 observert et turkis/lys blå kolonifarge på Brilliance™ CRE skål, noe som indikerer at bakterien kunne være *Klebsiella pneumoniae* ifølge protokollen, men BLAST-resultatet viste likevel at den var *Caulobacter* spp. På Brilliance™ CRE skåler for P6-8 og P10 ble alle observert svake rosa kolonifarge. Dette antydte at disse bakteriene kunne være *E. coli*, men BLAST søk igjen viste annerledes resultater, hvorav P6-8 ble identifisert som *Brevundimonas* spp., og P10 kunne være *Herbaspirillum* spp. Videre ble det observert et oransje aktig kolonifarge på Brilliance™ CRE-Argar for P9, men det var vanskelig å anta bakterieslekt ut ifra dette kolonifarget. Ifølge BLAST-resultater ble det påvist at P9 var mest sannsynlig *Enterococcus* spp.

Tabell 7. Sammenligning mellom fenotypiske resultater fra rendyrking av vannprøver P1-10 på selektive skåler og genotypiske resultater fra Sanger-sekvensering av 16S rRNA.

Prøve nr.	Vannprøver	Selektive skåler	Farge	Antagelse	16S
P1	S1	 <p>Brilliance™ ESBL</p>	Beige	Usikker	<i>Pseudomonas</i> spp. (sannsynligvis putida)
P2	S1	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Gul	Usikker	<i>Novosphingobium</i> spp.
P3	S1	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Gul	Usikker	<i>Novosphingobium</i> spp.
P4	S2	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Grønn	Usikker	<i>Novosphingobium</i> spp.

P5	S4	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Turkis/ lys blå	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Caulobacter</i> spp.
P6	S1	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Svak rosa	<i>E. coli</i>	<i>Brevundimonas</i> spp.
P7	S1	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Svak rosa	<i>E. coli</i>	<i>Brevundimonas</i> spp.
P8	S4	 <p>Brilliance™ CRE</p>	Rosa/Oransj	<i>E. coli</i>	<i>Brevundimonas</i> spp.

P9	S1	 Brilliance™ CRE	Oransj	Usikker	<i>Enterococcus</i> spp.
P10	S3	 Brilliance™ CRE	Svak rosa	<i>E.coli</i>	<i>Herbaspirillum</i> spp.

4.2 Genotypisk påvisning av resistensgener

4.2.1 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av ekstraherte DNAet til bakterieisolatene

Tabell 8 viser DNA-konsentrasjon til prøve P1-10 målt av Qubit® 2.0 Fluorometer og NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer ved bruk av prøvene fra 2. runde ekstraksjon. Generelt hadde prøver målt av Qubit® 2.0 Fluorometer høyere DNA-konsentrasjonsverdier enn prøvene målt av NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer. Blant disse hadde P3 svært lav konsentrasjon som ligget på 2.87 µg/mL, mens P1 hadde høyest konsentrasjon på 115 µg/mL. Optimal $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$ ratio skal ligge henholdsvis rundt 1.8 og mellom 2.0-2.2. Ifølge dette kunne ingen av de prøvene regnes som «rene», og de var mulige kontaminert av proteiner, fenoler, EDTA og andre kontaminanter. P1, P8 og P10 var 3 prøver som hadde $A_{260/280}$ ratio nærmest 1.8 (1.87, 1.75 og 1.75), mens P3 og P5 hadde laveste $A_{260/280}$ ratio (1.41 og 1.39) blant prøvene. Når det gjelder $A_{260/230}$ ratio hadde P1 og P10 høyeste ratio på henholdsvis 1.69 og 1.07. P1 og P10 var derfor relativt renere enn andre prøvene, mens P3 og P5 var minst «rene».

Tabell 8. DNA-konsentrasjon til prøve P1-10 målt av Qubit® 2.0 Fluorometer og NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer, samt renhetsmåling oppgitt i $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$ ratio.

Prøve	Qubit ($\mu\text{g/mL}$)	NanoDrop		
		Mengde ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
P1	115	206.8	1.87	1.69
P2	11.1	32.9	1.53	0.46
P3	2.87	30.0	1.41	0.40
P4	27.9	65.9	1.51	0.54
P5	30.1	63.8	1.39	0.45
P6	10.1	17.8	1.72	0.75
P7	14	35.5	1.68	0.72
P8	10.3	20.4	1.74	0.68
P9	25.1	402.1	1.51	0.74
P10	85.7	167.0	1.75	1.07

Til kvantitativ bestemmelse av PCR-produkter for Sanger-sekvensering ble det benyttet ekstraherte DNA-prøver fra 1. runde ekstraksjon. Målt DNA-konsentrasjon til ekstraherte prøvene, samt PCR-produkter før og etter rensing ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer er presentert i Vedlegg B. I tillegg ble også mengde DNA til PCR-produkt for P1 fra singelpleks (primer CAU1) målt og vist i samme vedlegg.

4.2.2 Påvisning av antibiotikaresistente gener ved PCR

Det ble kjørt PCR for alle prøvene ved bruk av ulike primermikser for å undersøke tilstedeværelse av resistensgener. Gelbilder tatt etter gelelektroforese for både multipleks og singelpleks PCR er vist i vedlegg E. På grunn av det ikke ble observert noe positive bånd på bilder av prøvene kjørt med PM1 og PM2, ble en ny primermiks PM3 bestilt. Gelbilde av prøvene til denne primermiksen viste et positivt bånd rundt 200-300 bp for P1. Det ble derfor kjørt en singelpleks PCR for P1, hvorav primer som koder for CAU1, NPB3L1 og VIM2 ble benyttet. Ut ifra gelbilde av singelpleks PCR kan det observeres et positivt bånd på ca. 250 bp for primer CAU1. Dette tydet på at P1 sannsynligvis inneholdt gener som kodet for CAU1.

4.3 Illumina-sekvensering

P1 og P10 ble helgenomsekvensert ved bruk av Illumina-sekvensering, og relevante resultater fra påfølgende dataanalyse er vist i Vedlegg F. Ut ifra resultater for P1 ble det funnet mange gener som kodet for efflukspumper og for MDR proteiner, men ingen for β -laktamaser. I dette avsnittet nevnes det bare noe viktige gener funnet i dataanalysen fordi det var altfor mange. Blant de genene var AaeAB, ArpB og BepE kodet for efflukspumper, mens MepA, MexA og MdtABCKE kodet for MDR proteiner. Videre ble det også detektert andre proteiner som kodet for resistens mot en del tungmetaller i P1, samt SugE, protein som er resistent mot desinfeksjonsmiddel «Quaternary ammonium compounds» (QAC).

Resultater til P10 viste at bakterien inneholdt 2 β -laktamaser og 1 putativ β -laktamase i tillegg til gener for resistens mot metaller (CzcABC, FieF, ATM1) og mot efflukspumper (AaeA, ArpC, ArcB, BepEF). Den ene β -laktamase er TOHO-1 lignende. Den er ny fordi det finnes ingen helt identiske β -laktamase registrert i noen databaser, og den nærmeste er 99% identisk på proteinnivå. Gjennom CARD databasen ble det funnet at enzymet hadde over 50% likhet med CTX-M type β -laktamase, mens det hadde 87.6% likhet med klasse A- β -laktamase PenP gjennom ExPasy. Den andre β -laktamase funnet i P10 var *Helicobacter pylori* cysteinrik protein A (HcpA), mens *H. pylori* cysteinrik protein C (HcpC) funnet i P10 var en mulig β -laktamase. I tillegg til resistensgener ble også gener fra MerR familie og adenosintrifosfat (ATP) -bindende kasett transportør (ABC-transportør) detektert i P10 ved PROKKA.

4.4 Antibiotika sensitivitetstest for P1 og P10

Det ble gjennomført en AST for P1 og P10 for å undersøke hvor følsomme de er mot 13 ulike antibiotika klassifisert i 8 klasser. Ettersom det ble utført 2 parallelle forsøk til hver prøve, ble gjennomsnitt til avleste MIC verdier for P1 og P10 utregnet og sammenlignet med EUCAST klinisk BP tabell (gyldig fra 1.1.2019) (EUCAST, 2019). Resultater er presentert i tabell 9, mens bildene til MH skåler med inhiberingssoner er vist i Vedlegg E.

Det finnes imidlertid ikke noe MIC-verdier til bakterie *Herbaspirillum* spp. (P10) i EUCAST tabellen, og heller ikke MIC-verdier for enkelte antibiotika til bakterie *Pseudomonas* spp. (P1). Ut ifra tabell 9 kan det observeres at P1 ikke var resistente mot testet antibiotika basert på kjente EUCAST BP, men den hadde MIC-verdi på >256 og >32 mot henholdsvis ampicilin (3. generasjon) og trimetoprim. Dette tydet på at P1 var resistent mot disse to antibiotikumene. Det samme gjelder resultater til P10 *Herbaspirillum* spp. som hadde en MIC-verdi på >16 mot kolistin. Dette indikerte at P10 var kolistin-resistent og var følsomme mot resten av antibiotika.

Tabell 9. Gjennomsnittlig MIC-verdier av 13 antibiotika for P1 og P10 sammenlignet med EUCAST BP.

	EUCAST klinisk BP for MIC (mg/L)	P1 <i>Pseudomonas</i> spp. (mg/L)	P10 <i>Herbaspirillum</i> spp. (mg/L)
Klasse 1 - Aminopenicilline β -laktam, hemmer celleveggsyntesen			
Ampicillin 3. generasjon	-	>256	0.625
Amoksisilin med klavulansyre Aminopenicillin tilsettes klavulansyre om bakterie er resistent	-	48	0.111
Klasse 2 - Kefalosporine β -laktam, angriper PTP			
Cefataxim 3. generasjon	-	16	0.06
Cefepim 4. generasjon	<i>Pseudomonas</i> : >8	1.25	0.016
Klasse 3 - Fluoroquinolone Inhiberer DNA syntese			
Ciprofloxacin	<i>Pseudomonas</i> : >0.5	0.06	0.5
Klasse 4 - Aminoglykoside Bryter ned 30S subenhet			
Amikasin Andre valg om bakterien er resistent mot gentamicin	<i>Pseudomonas</i> : >16	0.625	6
Gentamicin Første valg	<i>Pseudomonas</i> : >4	0.25	1.5
Streptomycin Siste valg – Fremveksten av resistente organismer har begrenset bruken av streptomycin til noen få spesifikke forhold	-	1.5	7
Klasse 5 - Karbapenem β -laktam, hemmer celleveggsyntese			
Imipenem	<i>Pseudomonas</i> : >4	0.5	0.045
Meropenem	<i>Pseudomonas</i> : >8	2	0.079
Klasse 6 - Makrolider Bryter ned 50S subenhet			
Erytromycin Brukes ofte til å behandle pasienter som er allergiske mot penicillin	-	0.48	1, 2
Klasse 7 - Polymyxin Angriper cellemembran			
Kolistin	<i>Pseudomonas</i> : >2	<0.25	>16
Andre antibiotika Inhiberer folsyresyntese			
Trimetoprim Til behandling av turistdiare	-	>32	1.75

- Det finnes ikke EUCAST klinisk BP for verken *Pseudomonas* spp. eller *Herbaspirillum* spp.

5.0 Diskusjon

5.1 Påvisning med fenotypisk metode sammenlignet med Sanger-sekvensering av 16S rRNA

I denne studien ble *Brilliance*[™] ESBL og *Brilliance*[™] CRE benyttet for å undersøke tilstedeværelse av ESBL_{A/M/KARBA} - produserende *Enterobacteriaceae* i akvatisk miljø på NMBU campus. Etter rendyrking ble det valgt ut 10 bakterieisolater, hvorav P1 hadde vekst på *Brilliance*[™] ESBL, mens resten av prøvene (P2-P10) vokste på *Brilliance*[™] CRE. Dette indikerte i at P1 var resistent mot β -laktamer som penicilliner og kefalosporiner, mens P2-P10 var resistente mot alle β -laktamer inkluderer karbapenemer (Thermo Fisher Scientific, 2010; Thermo Fisher Scientific, u.å.-b). Ut ifra resultater vist i tabell 7 stemte nesten ingen av de fenotypiske resultatene med genotypiske resultater fra Sanger-sekvenseringen. Bakterieslekt ble enten tolket feil eller var det helt umulig å tolke basert på kolonifarget og protokollen. Hovedgrunnen til dette er at kromogene selektive skåler og protokollen er i utgangspunktet laget for å differensiere resistente *Enterobacteriaceae* i kliniske sammenhenger, ikke for miljøbakterier. Dessuten er miljøbakteriene ofte mer robuste og resistente enn *Enterobacteriaceae* ettersom de måtte tilpasse seg for å overleve i et mer utfordrende og ustabile vilkår, mens *Enterobacteriaceae* lever i et relativt beskyttet miljø, f.eks. hos pattedyr (Iredell et al., 2016). Dessuten finnes det flere typer bakterier i akvatiske miljø enn i de kliniske miljøene. Disse førte til at bakterieisolatene fortsatt kunne vokse på skålene selv om selektive skålene er laget for å detektere *Enterobacteriaceae* som kanskje er mindre resistente enn mange miljøbakteriene.

Det var umulig å indikere bakterieslekt til P1 ut ifra beige kolonier på *Brilliance*[™] ESBL, men ved Sanger-sekvensering ble det påvist at bakterien var sannsynligvis *Pseudomonas* spp. med 99.7% likhet og 99% «covery». Ifølge Huang et al. (2010) er dette et vanlig fenomen ettersom 78% av *Pseudomonas* spp. de analyserte hadde vekst på *Brilliance*[™] ESBL, med enten beige eller brune kolonier. Denne bakterieslekten var også mest observert ikke-*Enterobacteriaceae* på *Brilliance*[™] ESBL i deres studie (Huang et al., 2010). I denne studien ble P1 tatt med i videre analyse ettersom den fikk et positivt resultat etter multipleks PCR. Det er imidlertid umulig å vite type resistensmekanismer eller resistensgener bakterien benyttet til å uttrykke fenotypisk resistens mot β -laktamer ved screeningmetoden, men det er vanlig at *Pseudomonas* spp. benytter seg av flere resistensmekanismer for å overleve i en toksisk omgivelse, bl.a. å produsere β -laktamaser, å regulere permeabilitet til cellevegg vha. poriner og ved efflukspumper (Iredell et al., 2016).

Bakterieisolater P2 - P4 vokste på *Brilliance*[™] CRE og ble identifisert som *Novosphingobium* spp. vha. Sanger-sekvensering. P2 og P3 hadde gule kolonier på skålene mens P4 hadde grønne kolonier. Dette tydet på at P2-P4 var sannsynligvis forskjellige *Novosphingobium*-arter. *Novosphingobium* spp. er kjent som tetrasykliner resistente og er distribuert i akvatisk miljø, bl.a. ferskvann, marine miljø og spesielt i renseanlegg til grunnvann (Huang et al., 2014). Denne type bakterien har evner til å degradere ulike aromatiske komponenter som polyklorfenoler og polysykliske aromatiske hydrokarboner, derfor benyttes den ofte i bioremidiering av forurenset vann i renseanlegg. Langtidseksponering i forurenset vann kunne være en grunn til at bakterieslekten har utviklet seg resistens.

Videre ble P5 observert en turkis/lys blå kolonifarge på *Brilliance*[™] CRE, noe som kunne indikere *K. pneumoniae* ifølge protokollen, men BLAST-resultatet viste at bakterien var *Caulobacter* spp.. Det samme gjelder P6-P8, hvorav alle 3 bakterieisolatene skulle være *E. coli* basert på rosa kolonifarge, men Sanger-sekvenseringsresultatene viste seg å være *Brevundimonas* spp. Både *Caulobacter* spp. og *Brevundimonas* spp. er miljøbakterier som forekommer ofte i jord og spesielt i avløpsrenseanlegg (Zhang et al., 2019). Timilehin et al. (2019) rapporterte at *Brevundimonas* spp. funnet i kommunale distribusjonssystemer for drikkevann i Nigeria var fenotypisk resistente mot flere antibiotikum, bl.a. gentamicin, kanamycin og steptomycin (Timilehin et al., 2019), men disse miljøbakteriene sammen med P10 *Enterococcus* spp. ble imidlertid ansett som mindre relevant i forhold til P1 og P10 i denne studien.

Bakterieisolatet P10 ble identifisert til å være *Herbaspirillum* spp. (muligens *H. huttiense*) med 99.4% likhet og 99% «covery». Bakterien er egentlig ikke kjent for å være resistent mot β -laktamer til og med karbapenemer (Govarthan et al., 2015; Ziga et al., 2010), men den hadde likevel vekst på *Brilliance*[™] CRE. Derfor ble P10 valgt ut for videre analyse. Generelt virket ikke screeningmetoden så bra for identifisering av miljøbakteriene i denne studien, men metoden ga indikasjoner på fenotypiske egenskaper for bakterier som vokste på selektive skåler. For å undersøke resistensmekanismer eller resistensgener for disse bakteriene, må andre genotypiske metoder som PCR og gensekvensering støtte til. Ettersom ingen av de prøvene (bortsett fra P1) ga positive resultater ved multipleks PCR, er det umulig å vite hvilke mekanismer disse bakteriene hadde benyttet seg av. Allikevel var det interessant å se at mange miljøbakteriene overlevde på β -laktamantibiotika og er potensielle reservoar for AR. Dette kan være foruroligende dersom noe av dem kunne overføre resistensgener til humanpatogene bakterier.

5.2 Bakterier funnet i vannprøver

5.2.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. er G-, ikke-fermentativ stavbakterie som finnes overalt i miljø, hovedsakelig i vann, jord og planter (Peter et al., 2017). I de siste årene er det registrert flere kliniske tilfeller forårsaket av *Pseudomonas* spp. fordi bakterien kan føre til opportunistiske infeksjoner hos mennesker. Blant slekten *Pseudomonas* er *P. aeruginosa* mest vanlig humanpatogen art og kan forårsake infeksjoner med karbapenemresistens eller MDR i alle organsystemer (Folkehelseinstituttet, 2010b). Ifølge Sangersekvensering av 16S rRNA var P1 mest sannsynlig *P. putida*. Denne bakterien er mindre patogene i forhold til *P. aeruginosa*, men kan likevel medføre alvorlige infeksjoner hos immunsvekkede (Ogura et al., 2019). I denne studien var P1 den eneste prøven som viste positivt bånd ved multipleks PCR for PM3. Videre ble den påvist at den kunne inneholde *bla*_{CAU-1} ved singelpleks PCR. Men etter Illumina-sekvensering og påfølgende dataanalyse ble det ikke funnet noe β -laktamaser i P1, noe som kan skyldes av P1 er en miljøbakterie, ikke klinisk. Istedenfor β -laktamase ble det derimot detektert mange gener som kodet for en lang rekke efflukspumper. Det er imidlertid usikkert på om hvor disse genene sitter i P1, men sannsynlighet for overføring av genene gjennom HGO er liten, da efflukspumpe er en forsvarsmekanisme som forekommer naturlig (iboende) hos mange G- bakterier inkluderer *Pseudomonas* spp. (Hansen, 2014).

Det finnes hovedsakelig fem MDR pumpesystemer hos G- bakterier: «resistance-nodulation-division family» (RND), ABC, «small MDR family» (SMR), «major facilitator superfamily» (MFS) og «multiple antibiotic and toxin extrusion family» (MATE) (Blanco et al., 2016). Blant disse er RND det viktigste pumpesystemet forårsaket resistens hos *Pseudomonas* spp (Molina et al., 2014). Samtidig er det også det eneste systemet som inngår i OM i tillegg til IM og periplasma, noe som gjør det mulig for bakteriene å pumpe substrater direkte ut av cellen, mens ved andre pumpesystemene må utpumping skje gjennom porer på OM (Nikaido, 2011). Selve RND pumpesystemet fungerer som transportør og er drevet av proton motiv kraft (Housseini B Issa et al., 2018). De er lokalisert i IM. Mange gener påvist i P1 benytter dette systemet. For eksempel MexA som er membran fusjon protein (MFP) og er lokalisert i periplasma med en lipid del innsatt i IM (Housseini B Issa et al., 2018). Dette proteinkodende genet uttrykkes konstitutivt og kan eksportere de fleste antibiotika, mens mange andre RND-proteiner er mer selektive. MdtA er også MFP, i samarbeide med MdtBC lokalisert i IM kan de pumpe ut f.eks. novobiocin og deoksykolat (Nagakubo et al., 2002). MdfEK er proteiner som kan skille ut bl.a. FQ, trimetoprim, fosfomycin osv. (Nishino & Yamaguchi, 2001). Disse Mdt-genene krever ofte proteiner kalt yttermembran faktor (OMF), noe som er innebygde i OM, for å eksportere substratene ut. Videre ble

det detektert TtgBC i P1. Disse proteiner finnes ofte i *P. putida* og virker svært bredspektret. De sørger for utpumpingen av β -laktamer, nalidiksinsyre og kloramfenikol (Housseini B Issa et al., 2018). Ettersom hovedprinsippet for efflukspumpe er å pumpe ut substratene ut av bakteriecelle, og de fleste påviste genene funnet i P1 benytter RND efflukspumper, blir ikke alle genene diskutert her.

Det ble også detektert mange gener som er resistente mot bl.a. kobber, arsenikk, kobolt-sink-kadmium. Metall-resistente gener er tilstede i nesten alle miljøbakterier. CzcABC funnet i P1 er resistent mot kobolt, sink og kadmium, noe som er vanlige hos mange G- bakterier (Khan et al., 2015). CzcA er antiport, og CzcB er proteiner som sørger for membranfusjon, mens CzcC befinner seg i OM. Til sammen utgjør de et kompleks pumpesystem som pumper ut de tre metallene. Videre finnes det membranproteiner som kan aktivt pumpe arsenikk ut av celler, mens protein A og protein B skiller kobber ut av P1. I tillegg til metall-resistente proteinene kan det også nevnes SugE og OhrA som er resistent mot henholdsvis QAC og hydroperoksid. Resistensmekanismer mot disse biocidene kan gi både kryssresistens til antibiotika og koresistens med andre biocider. Dessuten er koresistens spesielt aktuelt for QAC. QAC er et desinfeksjons- og rengjøringsmiddel som benyttes ofte i næringsmiddelindustri, men kan også tilsettes i kosmetikk og virker som konserveringsmiddel, samt i deodorant og i hårprodukter som fuktighetsmiddel (Lunestad et al., 2009). Resistens mot QAC inngår ofte i MFS- og SMR-familie pumpesystem. Ut ifra resultatet har bruk av biocidene allerede medført utvikling av resistens. Dette kan gi større seleksjonspress og føre til økt forekomst av resistens mot klinisk viktige antibiotika.

P1 var resistent mot ampicillin og trimetoprim med MIC-verdi på henholdsvis >256 mg/L >32 mg/L. Ampicillin er bredspektret antibiotika i gruppe penicillin, mens trimetoprim er bakteriostatisk som benyttes ofte i kombinasjon med sulfonamider (Nordeng, 2018; Nordeng, 2019). Begge virker mot G-bakterier og står på WHO sin liste for essensielle medisiner (WHO, 2019a). Grunnen til P1 var resistent mot disse to antibiotikumene er sannsynligvis et resultat av MDR pumpesystemer. Ifølge Blanco et al. (2016) er MDR efflukspumpene utviklet og påvirket av omgivelse en bakterie lever i, men fenotypiske egenskaper observert hos bakterien er uavhengig av antall efflukspumpe i bakteriens genomet. Ut ifra dette kan AST-resultatet til P1 tydet på en langtidseksponering av ampicillin og trimetoprim, noe som førte til bakterien utviklet god evne til å skille ut spesielle disse to typer antibiotika. I tillegg hadde P1 relativt høy MIC-verdi mot amokosicilin (48 mg/L) og cefataxim (16 mg/L) som også er mest brukt antibiotika.

5.2.2 *Herbaspirillum* spp.

Herbaspirillum spp. er ikke-fermentativ G- stavbakterie som finnes i miljø, jord, grunnvann og distribuert system for drikkevann (Liu et al., 2019). Bakterien er sjeldent knyttet til humane infeksjoner, men kan likevel medføre infeksjoner som blodforgiftning hos immunsvekkede. For pasienter med kreft eller levercirrhose (skrumplever) kan *Herbaspirillum* spp. være opportunistisk patogen. Gjennom AST ble det påvist at P10 *Herbaspirillum* spp. var resistent mot kolistin fordi den hadde MIC-verdi på >16 mg/L. Som nevnt tidligere er kolistin et sistehåndspreparat i behandling av livstruende sykdom forårsaket av MDR som *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* og karbapenem-resistent *Enterobacteriaceae* (Liofilchem, 2018). Bruk av kolistin er sjeldent og skal helst unngås, bare hvis den er absolutt «siste utvei», da den har mange bivirkninger, bl.a. nedsatt nyrefunksjon og nevro- og nefrotoksisitet (Norsk legemiddelhåndbok, 2017). Det er derfor svært uønskede og uforventet at en bakterie er kolistin-resistent. I denne studien ble buljongfortynningsmetode benyttet for å teste bakteriens følsomhet mot kolistin. Den er en standard metode for resistensbestemmelse av kolistin og er godkjent av EUCAST, noe som kunne fastslå at resultatet er pålitelig.

Ved fenotypisk metoden ble P10 observert en vekst på *Brilliance*[™] CRE, noe som tydet på at bakterien var sannsynligvis resistent mot nesten alle β -laktamantibiotika. Dette ble deretter påvist gjennom annoteringsprogrammet PROKKA, hvorav TOHO-1 lignende gen, *bla*_{HcpA} og et mulig *bla*_{HcpC} ble detektert i genomet til P10. *bla*_{TOHO-1} ble først gang funnet på Toho sykehus i Japan i 1995 (Ishii et al., 1995). Genet var produsert av *E. coli* og viste 83% likhet med β -laktamase produsert av *K. oxytoca*, mens det som ble detektert i P10 var ikke identisk med *bla*_{TOHO-1} funnet i Japan, og heller ikke med noe som helst gener registret i databaser i dag. Blant de genene som hadde over 50% likhet med TOHO-1 lignende genet i CARD database kommet *bla*_{CTX-M} mest opp i treff. Et annet navn til TOHO-1 er CTX-M-44 (Shimizu-Ibuka et al., 2011), derfor var dette TOHO-1 lignende genet sannsynligvis også fra CTX-M familie. CTX-M er cefotaximase som utgjør en stor helseutfordring i verden fordi de er resistente mot penicilliner og kefalosporiner opptil 4. generasjon. Dessuten sitter *bla*_{CTX-M} ofte på plasmidene og kan være svært smittsomme (Derakhshan et al., 2019). Ut ifra resultatet er det imidlertid umulig å vite hvor resistensgener sitter i P10, derfor er det usikkert på om resistensgenene kunne overføres til andre bakterier eller ikke. Ved bruk av ExPasy database ble P10 funnet å ha 87.6% likhet med klasse A- β -laktamase PenP. Sekvensen til denne β -laktamasen ligner veldig (>80%) på de kliniske signifikante TEM- og SHV-familie. Som nevnt i avsnitt 2.2.3.1 har TEM- og SHV-ESBL evner til å nedbryte kefalosporiner (1.-4. generasjon) i tillegg til penicilliner. PenP som hadde høy sekvensidentitet med dem også er AR, men med et smalere spekter, fordi de fleste PenP nedbryter bare penicilliner og kefalosporiner opptil 2. generasjon (Pan et al., 2017a; Pan et al., 2017b). Til tross for det ikke finnes helt identiske sekvensen til

TOHO-1 lignende gen et i databasene, foreslo PROKKA å kalle dette gen et for *bla_{TOHO-1}*, og gen et var sannsynligvis en klasse A- β -laktamase.

Videre ble β -laktamase HcpA og en mulig β -laktamase HcpC detektert i genomet til P10. Mittl et al. (2000) mente at HcpA skulle tilhøre en ny klasse β -laktamase, klasse E, da enzymet ikke lar seg hemmes av klavulansyre (hemmer ESBL_A) eller EDTA (hemmer ESBL_{KARBA}). Men enzymet kan derimot inhiberes ved bruk av cloxacillin og oxacillin. HcpA er muligens involvert i celleveggsyntese og nedbryter hovedsakelig 6-aminopenicilin syre. Selv om enzymet nedbryter også 7-aminokefalosporin syre, er effekten mye mindre i forhold til nedbrytning av aminopenicilliner (Mittl et al., 2000). HcpC tilhører samme familie som HcpA. Funksjonen til dette enzymet er muligens samme som HcpA.

Basert på ulike spektre til detekterte β -laktamasene i P10 var P10 sannsynligvis resistent mot alle penicillinene og kefalosporinene (1. – 4. generasjon), men det er imidlertid vanskelig å si om bakterien også var resistent mot karbapenemer selv om den gro på *Brilliance*TM CRE, da det ikke ble funnet noe gener som kodet for ESBL_{KARBA}. Ifølge disse resultatene skulle P10 være resistent mot β -laktamantibiotikum ved AST, men AST-resultatet viste derimot at bakterien var følsomme mot alle testet β -laktamantibiotikumene, kun resistent mot kolistin. Grunnen til dette ble deretter funnet i «PROKKA-annotering», hvorav et gen fra MerR-familie ble detektert. Dessuten ligget dette MerR-genet nesten rett foran TOHO-1 lignende gen et fra CTX-M familien. MerR-familien er transkripsjonsregulator (Brown et al., 2003). Disse genene koder for proteiner som bindes til spesifikke DNA sekvenser (promotorsekvenser) og derved kontrollerer et gen skal uttrykkes eller ikke. Ut ifra dette kan det antas at dette TOHO-1 lignende gen et (*bla_{CTX-M}*) var muligens en induserbar ESBL_A. Transkripsjonsregulatoren sørger dermed for at dette resistensgen et blir uttrykt på riktig tidspunkt og sted i bakterien.

De fleste MerR-genene aktiveres som følge av miljøstimulus, f.eks. når bakterien utsettes for oksidativt stress, tungmetall eller antibiotika (Brown et al., 2003). En mulig forklaring på det som skjedde var at Mer-R genene ble aktivert og sendte ut signaler til TOHO-1 lignende gen et under rendyrking av P10 på *Brilliance*TM CRE, slik at resistensgen et kunne komme til uttrykk og beskytte bakterien mot antibiotika. Prosess fra Mer-genene først detekterer antibiotika helt til *bla_{CTX-M}* kommer til uttrykk skjer ikke på en gang fordi bakterien trenger litt tid for å utføre hele prosessen. Dette kan være et årsak til AST-resultatet. Rendyrkningen av P10 på *Brilliance*TM CRE ved 37 °C tok et døgn, mens teststripsene lagt på MH skåler hvor P10 hadde vekst på tok bare noen sekunder. *bla_{CTX-M}* i bakterien på MH skålene rakk ikke å komme

til uttrykk, og bakterien ble deretter hemmet av antibiotikumene i løpet av natten. Det som er interessant er at P10 vokste igjen på MH skålene etter at teststripsene var fjernet fra MH skålene til tross for bakterien var allerede hemmet av teststripsene med β -laktamantibiotika. AST-resultatet til P10 er derfor svært misvisende fordi det bare indikerte at bakterien var kolistin-resistent selv om resistensmekanisme mot kolistin er imidlertid ukjent.

I tillegg til MerR-genene ble det også detektert ABC-transportører i P10 gjennom «PROKKA». ABC-transportørene er en stor familie av transmembranproteiner som bruker ATP til å frakte stoffer over cellemembraner (Wilkens, 2015). Det er også det eneste pumpesystemet som benytte ATP som energikilde blant de 5 pumpesystemene. ABC-transportørene finnes som importør og eksportør. ATM1-genet funnet i P10 er eksempel på eksportør. Genet inngår i homøostase og avgiftningsprosess ved å skille tungmetaller ut av bakteriecelle (Lee et al., 2014). Dessuten hadde bakterien andre gener for resistens mot metaller, og mange efflukspumper som også bidro til resistens. Virkningsmekanismer for de fleste metallresistensgenene og efflukspumpene funnet i P10 er samme som de påviste genene beskrevet i avsnitt 5.2.1 *Pseudomonas* spp. og vil derfor ikke bli omtalt her.

5.3 Funnenes relevans

Det er meget viktig å ha riktig diagnosen for å kunne gi korrekt behandling til pasienter. Uriktig klassifisering av sensitivitet til bakterie mot ulike antibiotikum kan medføre feilbehandling. Samtidig kan det øke seleksjonspress hos bakterien og bidra til utvikling av AR. Ut ifra AST-resultatet til P10 vil en lege sannsynligvis bruke β -laktamantibiotika som penicilliner til behandling av infeksjon forårsaket av denne bakterien. Men bakterien er egentlig resistent mot mange β -laktamantibiotikumene også fordi en induserbar ESBL_A samt to andre β -laktamasene ble genetisk påvist i bakterien. Dette er et nytt funn for *Herbaspirillum* spp. og har aldri blitt sett i Norge fra før. Det finnes heller ikke noe litteratur om *Herbaspirillum* spp. med induserbar β -laktamase og er samtidig kolistin-resistent, men så ble en artikkel fra Korea funnet, hvor en pasient fikk blodforgiftning forårsaket av *Herbaspirillum* spp. ble presentert. Pasienten var en 98 år gammel mann uten noe alvorlige sykdommer bortsett fra hypertensjon ifølge pasientjournal (Liu et al., 2019). Når han ble innlagt på sykehus, hadde han feber og beslag. Gjennom 16S rRNA-sekvensering ble *Herbaspirillum* spp. identifisert fra hans blodprøve, og *H. huttiense* kommet nærmest (100%) basert på database. Til behandling av denne pasienten ble det først benyttet meropenem og kolistin, men byttet deretter til ceftazidime (3. generasjon kefalosporin), minosyklone (tetrasykliner) og trimetoprim fordi det ble funnet at bakterien var resistent mot kolistin og var følsomme mot alle andre antibiotikum de hadde testet for. Etter 2 måneders behandling ble pasienten

verre, og han ble overført til langtidspleie fasilitet noen uker senere. Liu et al. (2019) mente at *Herbaspirillum* spp. var mer helsetruende enn det som hadde blitt rapportert, ettersom bakterien medførte blodforgiftningen hos en frisk person. I deres studien ble det ikke utført helgenomsekvensering for *Herbaspirillum* spp., og de til slutt hadde ikke skjønnet hvorfor behandlingen ikke viste effekt. Det som ble funnet i denne studien kunne være en forklaring på det. Bakterien de fant var sannsynligvis samme som P10, da begge viste 99%-100% likhet med *H. huttiense*. Dersom bakterien de hadde inneholdt en induserbar β -laktamase, ville MerR-gener begynne å produsere proteiner og aktivere β -laktamasen i kroppen under β -laktamantibiotikabehandling, dermed inaktivere antibiotikumene.

P1 undersøkt i denne studien er en miljøbakterie, hvorav flere efflukspumper bidro til resistens. Det er gjort mange tilsvarende undersøkelser av ESBL-produserende bakterier på NMBU Campus, hvorav *Pseudomonas* spp. var funnet i de fleste studiene. Men ingen av de studiene utførte genomsekvensering av funnet *Pseudomonas* spp. og er derfor umulig å vite hvilke mekanismer bakteriene hadde benyttet seg av. Som nevnt er *Pseudomonas* spp. en oppturnistisk patogen. I Ogura et al. (2019) og Peter et al. (2017) sine studier ble *P. putida* påvist i bl.a. urin, blod, sår, slim og flere steder hos pasienter på sykehus. Disse bakteriene bærer resistensgener, ofte *bla_{VIM}*, som kan overføres til andre bakterier gjennom HGO. Men denne bakterien har ikke fått like mye oppmerksomhet som *P. aeruginosa* pga. lavere virulens og høyere følsomhet mot antibiotika. Selv om *P. aeruginosa* står på WHO sin prioriteringsliste for patogener som er nødt for å ha nye antibiotika mot pga. høy morbiditet og mortalitet, er det ikke meldingspliktig i Norge. Det er klart at *Pseudomonas* spp. er utbruddspoensial, men det finnes imidlertid ikke noe systematisk overvåkning av denne bakterien i Norge, med mindre de er bærere av ESBL_{KARBA} (Steinbakk et al., 2014).

5.4 Forslag til videre arbeid

Generelt bør det innhentes flere vannprøver fra NMBU Campus og fra andre områder for å undersøke forekomst og spredning av AR i akvatiskmiljø. *Pseudomonas* spp. har blitt påvist i flere år på rad mens en ny β -laktamase har blitt påvist i *Herbaspirillum* spp. fra vannområdet ved NMBU. Det kan være nyttig å finne ut om P10 er et tilfeldig funn eller finnes det mer i nærheten, siden lignende bakterie ble funnet både i Norge og i Korea. Det er første gang at både MerR-genet og induserbart TOHO-1 lignende genet ble påvist hos *Herbaspirillum* spp. i hele Norge. Ettersom virkningsmekanisme til de to genene gir misvisende AST-resultat og kan fort medføre feilbehandling, bør denne virkningsmekanismen studeres nærmere. Det kan for eksempel benytte «klippe-lime» teknikk ved å klippe ut disse to genene og sette

inn i plasmidet til en ikke-AR bakterie på laboratoriet, deretter kan bakteriestammen inkuberes med antibiotika for å se om bakterien kunne bli resistent. Da får man endelig bevis for at dette resistensgenet er induserbart. Samtidig kan bakteriestammen inkuberes på et skål uten antibiotika, slik at skål med og uten antibiotika kunne sammenlignes mhp. tiden det tar for aktivering av denne β -laktamasen. I tillegg er P10 kolistin-resistent, noe som er svært foruroligende. Derfor kan det være nyttig å undersøke nærmere om resistensmekanisme mot kolistin. Det er usikkert på om bakterien er resistent mot karbapenemer eller ikke. Ettersom karbapenemer er «siste utvei» blant virkelige gode antibiotikum uten bivirkninger, kan det være lurt å påvise bakteriens følsomhet mot karbapenemene. Videre kan ytterligere genotypiske analyser gjennomføres for å kartlegge hvor resistensgener sitter i P10 og mulighet for overføring av resistensgener til andre bakterier.

6.0 Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke forekomsten av ESBL-produserende bakterier i akvatiskmiljø ved å benytte fenotypisk og genotypisk påvisningsmetode. Det ble detektert en induserbar klasse A- β -laktamase i *Herbaspirillum* spp., en bakterie som egentlig ikke var kjent for å være antibiotika resistent. Dette er urovekkende fordi det kan tydet på en ytterligere utvikling av AR foregår i Norge selv om det var et spennende funn. Gjennom AST ble det funnet at bakterien også var kolistin-resistent, noe som er i utgangspunktet ikke forventet, siden kolistin er «sistehåndspreparat» mot AR og skal i prinsippet ikke brukes. Det er derfor viktig å samle inn flere vannprøver fra NMBU Campus for å undersøke om dette var et tilfeldig funn.

En annen bakterie som ble undersøkt var *Pseudomona* spp. hvorav flere efflukspumper systemer var benyttet av bakterien og bidro til resistens. Bakterien var resistent mot vanlige antibiotika som aminopenicilliner og trimetoprimere. Denne bakteriestammen har blitt funnet flere år på rad i Campus, derfor kan det være lurt å begynne å ha en systematisk overvåking av bakterien i området rundt NMBU. Basert på denne studien bør arbeidet med detektering av ESBL i akvatiskmiljø fortsettes ettersom miljø spiller en viktig rolle i AR utviklingen.

7.0 Litteraturliste

- Aarnes, H. (2011). *Proteinsyntese*: Institutt for biovitenskap, Universitet i Oslo. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/genetikk/protein.html> (Lest 11.11.2019).
- Andresen, P. (2019). *Trimetoprim*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/trimetoprim>.
- Bajaj, P., Singh, N. S. & Viridi, J. S. (2016). Escherichia coli β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in microbiology*, 7: 417-417. doi: 10.3389/fmicb.2016.00417.
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M. & Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna journal of medicine*, 7 (1): 12-16. doi: 10.4103/2231-0770.197508.
- Baquero, F., Martínez, J.-L. & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19 (3): 260-265.
- Becton Dickinson. (2016). *BD Muerller Hinton Fastidious Agar*. Tilgjengelig fra: <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=35115> (Lest 12.10.2019).
- Biotum. (u.å.). *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain*. Tilgjengelig fra: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/> (Lest 05.09.2019).
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. & Martinez, J. L. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, 4 (1): 14.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS microbiology reviews*, 27 (2-3): 145-163.
- Centers of Disease Control and Prevention. (2016). *Get smart about antibiotics week*. Tilgjengelig fra: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6544a9.htm?s_cid=mm6544a9_w (Lest 16.11.2019).
- Centers of Disease Control and Prevention. (2019). *Regional outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Italy, 2018–2019*. Tilgjengelig fra: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/04-Jun-2019-RRA-Carbapenems,%20Enterobacteriaceae-Italy.pdf> (Lest 20.11.2019).
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 74 (3): 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Debech, N. (2018). *NGS-Hva skjer under selve sekvenseringen?*: Norwegian Institute of Public Health. Tilgjengelig fra: <https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/bionigeniordagen-2018/04-teknisk---hva-skjer-under-selve-sekvenseringen-nadia-debech.pdf> (Lest 14.11.2019).
- Derakhshan, S., Farhadifar, F., Roshani, D., Ahmadi, A. & Haghi, F. (2019). Study on the presence of resistant diarrheagenic pathotypes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 12 (4): 348-357.
- Drage, M. & Jürgens, T. (2015). *Resistent tuberkulose*. Tilgjengelig fra: <https://www.lhl.no/lhl-internasjonalsatsningsomrader/resistent-tuberkulose/> (Lest 17.11.2019).
- Enger, H. (2018). *Antibiotikaresistens og resistensmekanismer*. Tilgjengelig fra: <https://relis.no/multimedia/308/Hege-Enger> (Lest 17.11.2019).
- EUCAST. (2019). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 9.0, valid from 2019-01-01*: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Tilgjengelig fra: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf (Lest 12.10.2019).
- Finton, M. D. (2019). *Personlig kommunikasjon med veileder Misti Dawn Finton på lab*. NMBU, Ås.

- Folkehelseinstituttet. (2010a). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/> (Lest 19.11.2019).
- Folkehelseinstituttet. (2010b). *Pseudomonasinfeksjon - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon--veileder-for/> (Lest 27.11.2019).
- Folkehelseinstituttet. (2012). *Antibiotikaresistens, antibiotikabruk og virusresistens - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/temakapitler/antibiotikaresistens/> (Lest 17.11.2019).
- Fredriksen Scientific. (u.å.). *Introksjonsguide til elektroforese*. Tilgjengelig fra: <https://no.frederiksen.eu/Files/Files/Filer-til-Service/Introduksjon-til-elektroforese-NO.pdf> (lest 05.09.2019).
- Gaustad, P. (2001). *Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier*. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2001/10/tema-infeksjoner/mekanismer-utvikling-av-antibiotikaresistente-bakterier> (Lest 17.11.2019).
- Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H. & Malhotra-Kumar, S. (2012). Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -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., Paterson, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63 (1): 1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.
- Govarthanan, M., Lee, S.-M., Kamala-Kannan, S. & Oh, B.-T. (2015). Characterization, real-time quantification and in silico modeling of arsenate reductase (arsC) genes in arsenic-resistant *Herbaspirillum* sp. GW103. *Research in microbiology*, 166 (3): 196-204.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7 (7): e1002158-e1002158. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158.
- Haldorsen, B. C. & Samuelsen, Ø. (2012). *Multiresistente Gram-negative bakterier – et økende globalt helseproblem*. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/34e02e26a0b349d385378cfb103aafc4/multiresistente-gram-negative-bakterier--et-okende-globalt-helseproblem.pdf> (Lest 18.11.2019).
- Hansen, Å. (2014). *Reverserbarheten av antibiotikaresistens: Evolusjonære prinsipper for antimikrobiell resistens og reverserbarhet – en oversikt basert på oppdatert tilgjengelig litteratur*: UiT Norges arktiske universitet.
- Hasle, G. (2009). *Ciprofloxacin*: Store Medisinske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/ciprofloxacin> (Lest 14.11.2019).
- Haugen, M. N. (2019). *Sanger-sekvensering*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Sanger-sekvensering> (Lest 16.10.2019).
- Haukeland, T. S. (2017). *Resistensbestemmelse ved hjelp av buljongfortynningsmetode [PowerPoint-presentasjon]*: Haukeland Universitetssykehus. Tilgjengelig fra: https://helse-bergen.no/seksjon/mikrobiologisk_avdeling/Documents/Foredrag%20fra%20H%C3%B8stkonferansen%20i%20mikrobiologi%202017/Resistensbestemmelse%20ved%20hjelp%20av%20buljongfortynningsmetode,%20H%C3%B8stkonferansen%202017.pdf (Lest 13.10.2019).
- Helse- og omsorgsdepartementet. (2015). *Handlingsplan mot antibiotikaresistens i helsetjenesten*. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/contentassets/915655269bc04a47928fce917e4b25f5/handlingsplan-antibiotikaresistens.pdf> (Lest 16.11.2019).

- Helsedirektoratet. (2019). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/antibiotika-i-sykehus/antibiotikaresistens> (Lest 18.11.2019).
- Helsedirektoratet. (u.å.). *Antibiotikaresistens: Fra akademisk curiositet til folkehelseproblem*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/antibiotikabruk-tannhelse/antibiotikaresistens> (Lest 17.11.2019).
- Hoiby, E. & Caugant, D. A. (2002). Resistensbestemmelse og resistensutvikling hos bakterier. *Tandlægebladet*, 106 (1): 28-35.
- Housseini B Issa, K., Phan, G. & Broutin, I. (2018). Functional Mechanism of the Efflux Pumps Transcription Regulators From *Pseudomonas aeruginosa* Based on 3D Structures. *Frontiers in molecular biosciences*, 5: 57-57. doi: 10.3389/fmolb.2018.00057.
- Huang, K., Tang, J., Zhang, X.-X., Xu, K. & Ren, H. (2014). A comprehensive insight into tetracycline resistant bacteria and antibiotic resistance genes in activated sludge using next-generation sequencing. *International journal of molecular sciences*, 15 (6): 10083-10100. doi: 10.3390/ijms150610083.
- Huang, T.-D., Bogaerts, P., Berhin, C., Guisset, A. & Glupczynski, Y. (2010). Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 48 (6): 2091-2096. doi: 10.1128/JCM.02342-09.
- Illumina Inc. (u.å.). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. Tilgjengelig fra: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.
- Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 352: h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.
- Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi, H., Imajo, S., Ishiguro, M. & Matsuzawa, H. (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (10): 2269-2275.
- 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.
- 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.
- Khan, Z., Nisar, M. A., Hussain, S. Z., Arshad, M. N. & Rehman, A. (2015). Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (24): 10745-10757. doi: 10.1007/s00253-015-6901-x.
- Khan, Z. A., Siddiqui, M. F. & Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics*, 9 (2): 49.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, 8 (6): 423-435. doi: 10.1038/nrmicro2333.
- Lausund, S. & Kjølbi, E. (2018). *Kromatogram*. Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Kromatogram> (Lest 16.10.2019).
- Lee, J. Y., Yang, J. G., Zhitnitsky, D., Lewinson, O. & Rees, D. C. (2014). Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science (New York, N.Y.)*, 343 (6175): 1133-1136. doi: 10.1126/science.1246489.
- Life Technologies. (2010). *Qubit™ Assays*. Tilgjengelig fra: https://www.ieg.uu.se/digitalAssets/176/c_176882-l_3-k_qubitquickrefcard.pdf (Lest 15.10.2019).
- Liofilchem. (2018). *ComASP™ Colistin 0.25-16 µg/mL*. Italia: Liofilchem® srl. Tilgjengelig fra: <https://www.liofilchem.com/images/brochure/ComASP-colistin.pdf> (Lest 13.10.2019).

- Liu, C., Kwon, M. J., Kim, M., Byun, J.-H., Yong, D. & Lee, K. (2019). Septicemia Caused by Herbaspirillum huttiense Secondary to Pneumonia.
- Lund, B. (2017). Antibiotika. *Aktuel nordisk odontologi*, 9 (01): 60-75. doi: 10.18261/ISSN.2058-7538-2016-01-06.
- Lunestad, B., Hegstad, K., Langsrud, S., Nofima, S. A. & Sunde, M. (2009). Quaternary ammonium compounds in cosmetic products, risk assessment of antimicrobial and antibiotic resistance development in microorganisms. *The Norwegian Scientific Committee for Food Safety*: 1e35.
- Mariussen, E. & Johnsen, I. V. (2017). *Metoder for å måle og modellere biotilgjengelighet av ammunisjonsrelaterte metaller i jord og vann i skyte- og øvingsfelt*. Tilgjengelig fra: <https://publications.ffi.no/nb/item/asset/dspace:2648/16-02335.pdf> (Lest 24.11.2019).
- Meyer, P. (2014). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://legeforeningen.no/PageFiles/205043/ABresistens2v2.pdf> (Lest 19.11.2019).
- Miljødirektoratet. (u.å.). *Avløpsrensplanlegg*. Tilgjengelig fra: <https://www.norskeutslipp.no/no/Avlopsannlegg/?SectorID=100> (Lest 22.11.2019).
- Mittl, P. R., Lüthy, L., Hunziker, P. & Grütter, M. G. (2000). The Cysteine-rich Protein A from *Helicobacter pylori* is a β -Lactamase. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (23): 17693-17699.
- Moberg, I. K. (2012). *Multiresistent Tuberkulose: et økende problem!*
- Moe, T. H. (2019). *EU ønsker krisetiltak etter utbrudd av superresistent bakterie i Italia*. Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/partner-sykdommer-uit-norges-arktiske-universitet/eu-onsker-krisetiltak-etter-utbrudd-av-superresistent-bakterie-i-italia/1347157> (20.11.2019).
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., de la Torre, J., Segura, A., Plesiat, P., et al. (2014). Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. *PloS one*, 9 (1): e81604-e81604. doi: 10.1371/journal.pone.0081604.
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4 (2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2002). The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *Journal of bacteriology*, 184 (15): 4161-4167. doi: 10.1128/jb.184.15.4161-4167.2002.
- Nikaido, H. (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 77: 1-60. doi: 10.1002/9780470920541.ch1.
- Nishino, K. & Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183 (20): 5803-5812.
- Nordeng, H. (2018). *Ampicillins*: Store Medisinske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/ampicillin> (Lest 04.12.2019).
- Nordeng, H. (2019). *Trimetoprim*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/trimetoprim> (Lest 04.12.2019).
- NORM & NORM-VET. (2018). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway Tromsø / Oslo 2019*.
- Norsk legemiddelhandbok. (2017). *Kolistin*. Tilgjengelig fra: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.16.3/Kolistin> (Lest 14.11.2019).
- Ogura, K., Shimada, K. & Miyoshi-Akiyama, T. (2019). A multilocus sequence typing scheme of *Pseudomonas putida* for clinical and environmental isolates. *Scientific reports*, 9 (1): 13980-13980. doi: 10.1038/s41598-019-50299-6.
- Opal, S. M. & Pop-Vicas, A. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. I: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, s. 235-251. e3: Elsevier.
- Pan, X., He, Y., Chen, T., Chan, K.-F. & Zhao, Y. (2017a). Modified Penicillin Molecule with Carbapenem-Like Stereochemistry Specifically Inhibits Class C β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61 (12): e01288-17. doi: 10.1128/aac.01288-17.

- Pan, X., He, Y., Lei, J., Huang, X. & Zhao, Y. (2017b). Crystallographic snapshots of Class A β -lactamase catalysis reveal structural changes that facilitate β -lactam hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (10): 4022-4033.
- Peter, S., Oberhettinger, P., Schuele, L., Dinkelacker, A., Vogel, W., Dörfel, D., Bezdán, D., Ossowski, S., Marschal, M., Liese, J., et al. (2017). Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC genomics*, 18 (1): 859-859. doi: 10.1186/s12864-017-4216-2.
- Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20 (3): 440-458. doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- Schanche, T. (2019). *Nye regler ga stor reduksjon i antibiotikabruk i USA: Forskning.no*. Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/husdyr-medisiner-partner/nye-regler-ga-stor-reduksjon-i-antibiotikabruk-i-usa/1276062> (Lest 16.11.2019).
- Shimizu-Ibuka, A., Oishi, M., Yamada, S., Ishii, Y., Mura, K., Sakai, H. & Matsuzawa, H. (2011). Roles of residues Cys69, Asn104, Phe160, Gly232, Ser237, and Asp240 in extended-spectrum beta-lactamase Toho-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (1): 284-290. doi: 10.1128/AAC.00098-10.
- Sigma-Aldrich. (u.å.). Sanger Sequencing Steps & Method.
- Simonsen, G. S. (2009). *Overvåking og forekomst av antibiotikaresistens i Norge*. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2009/03/oversiktsartikkel/overvaking-og-forekomst-av-antibiotikaresistens-i-norge> (21.11.2019).
- Sjøberg, N. O. (2013). *Molekylær genetikk : genteknologi, humant DNA*. 5. utg. utg. Høvik: Vett & viten.
- Slettemeås, J. S. & Sunde, M. (2008). *Antibiotikaresistens hos E. coli isolater fra ville dyr*. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/957fae69c08849ecbb4dcec27dedb67e/antibiotikaresistens-hos-e-coli-isolater-fra-ville-dyr.pdf> (Lest 18.11.2019).
- Statens legemiddelverk. (2019). *Kinoloner skal kun brukes ved alvorlige infeksjoner*. Tilgjengelig fra: <https://legemiddelverket.no/nyheter/kinoloner-risiko-for-invalidiserende-og-langvarige-bivirkninger>.
- Steane, R. (u.å.). *Types of antibiotics*. England: BioTopics.co.uk. Tilgjengelig fra: http://www.biotopics.co.uk/g11/antibiotic_types.html#quinolones (Lest 11.11.2019).
- Steinbakk, M., Sunde, M., Urdal, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B. T., Bonhorst, J. Ø., Nielsen, K. M., Lindbæk, M. & Bjørnholt, J. (2014). Antibiotikaresistens-kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Rapport fra tverrsektoriell ekspertgruppe.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual* Tilgjengelig fra: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf> (Lest 14.10.2019).
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *Brilliance ESBL*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxid.com/pdf/oxid-Brilliance-ESBL.pdf> (Lest 30.09.2019).
- Thermo Fisher Scientific. (2011). *The Qubit® 2.0 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobables-journal-of-cell-biology-applications/bioprobables-issues-2011/bioprobables-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html> (Lest 14.10.2019).
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *Quick and easy, ESBL and CRE screening*. Tilgjengelig fra: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Brilliance-CRE-ESBL-Biplate-Product-Overview.pdf> (Lest 30.09.2019).
- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-a). *260/280 and 260/230 Ratios, T042 - TECHNICAL BULLETIN for NanoDrop Spectrophotometers*. Tilgjengelig fra: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> (Lest 14.10.2019).

- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-b). *Brilliance CRE Agar*. Tilgjengelig fra: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1226&c=UK&lang=EN (Lest 30.09.2019).
- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-c). *Muller-Hinton Agar*. Tilgjengelig fra: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0337&c=UK&lang=EN (Lest 12.10.2019).
- Timilehin, A. A., Olufemi, O. I. & Adeniyi, O. A. (2019). Genotypic Characterization of Aminoglycoside Resistance Genes from Bacteria Isolates in Selected Municipal Drinking Water Distribution Sources in Southwestern Nigeria. *Ethiopian journal of health sciences*, 29 (3): 321-332. doi: 10.4314/ejhs.v29i3.4.
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforl.
- Tønjum, T. (2019). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antibiotikaresistens> (Lest 22.11.2019).
- Veterinærinstituttet. (u.å.-a). *Antibiotikaforbruk og resistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/fagomrader/antibiotikaforbruk-og-resistens> (Lest 16.11.2019).
- Veterinærinstituttet. (u.å.-b). *Kolistin og kolistinresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kolistin-og-kolistinresistens> (Lest 13.10.2019).
- Vitenskapskomiteen for mat og miljø. (u.å.). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.antibiotika.no/om-resistens/> (Lest 18.11.2019).
- Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D. & Hashsham, S. A. (2017). Antimicrobial resistance in the environment. *Water Environment Research*, 89 (10): 921-941.
- Wasteson, Y. & Lund, T. L. a. (2014). *Antibiotikaresistens «undercover»: Slik blir bakterier resistente*. Tilgjengelig fra: <https://www.aftenposten.no/viten/i/rLeLk/antibiotikaresistens-undercover-slik-blir-bakterier-resistente> (Lest 17.11.2019).
- Watson, J. D. (2004). *Molecular biology of the gene*: Pearson Education India.
- WHO. (2018). WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016 - 2018 Early implementation.
- WHO. (2019a). *Model List of Essential Medicines*. Tilgjengelig fra: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1> (Lest 04.12.2019).
- WHO. (2019b). *Tuberculosis Key Facts*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (17.11.2019).
- WHO. (u.å.). *About AMR*. Tilgjengelig fra: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/about-amr> (Lest 17.11.2019).
- Wikipedia. (u.å.). *DNA Sequencing Bridge Amplification.png*. Tilgjengelig fra: https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_Sequencing_Bridge_Amplification.png#file.
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime reports*, 7: 14-14. doi: 10.12703/P7-14.
- Yazdankhah, S., Lassen, J., Midtvedt, T. & Solberg, C. O. (2013). Historien om antibiotika. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 133 (23-24): 2502-2507. doi: 10.4045/tidsskr.13.0145.
- Yu, Z., Cai, Y., Qin, W., Lin, J. & Qiu, J. (2015). Polymyxin E induces rapid *Paenibacillus polymyxa* death by damaging cell membrane while Ca²⁺ can protect cells from damage. *PLoS One*, 10 (8): e0135198.
- Zhang, J., Li, W., Chen, J., Wang, F., Qi, W., Li, Y. & Xie, B. (2019). Effect of hydraulic conditions on the prevalence of antibiotic resistance in water supply systems. *Chemosphere*.
- Zhang, X.-X., Zhang, T. & Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 82 (3): 397-414.
- Ziga, E. D., Druley, T. & Burnham, C.-A. D. (2010). *Herbaspirillum* species bacteremia in a pediatric oncology patient. *Journal of clinical microbiology*, 48 (11): 4320-4321.

Vedlegg A. Påvist bakterieidentitet etter Sanger-sekvensering av 16S rRNA ved bruk av nBLAST

Prøve	Bakterieidentitet i nBlast (Sanger-sekvensering)	Identitet Prosent i nBlast (%)	Query Cover (%)
P1	<i>Pseudomonas</i> spp. (mulig <i>P. putida</i>)	99.7	99
P2	<i>Novosphingobium</i> spp.	99.2	99
P3	<i>Novosphingobium</i> spp.	99.2	99
P4	<i>Novosphingobium</i> spp.	99.8	99
P5	<i>Caulobacter</i> spp.	97.1 / 98.1	98-100
P6	<i>Brevundimonas</i> spp.	99.7	99
P7	<i>Brevundimonas</i> spp.	99.7	99
P8	<i>Brevundimonas</i> spp.	99.2	99-100
P9	<i>Enterococcus</i> spp.	99.5	99
P10	<i>Herbaspirillum</i> spp. (mulig <i>H. huttiense</i>)	99.4	99

Vedlegg B. Kvantifisering av 1. runde DNA-ekstrasjon ved Qubit® 2.0 Fluorometer, samt målt konsentrasjon til PCR-produkter for Sanger-sekvensering før rensing, etter rensing og singelpleks for P1.

Prøve	DNA-konsentrasjon (µg/mL)			
	1. runde ekstraksjon	PCR-produkter (Før rensing)	PCR-produkter (Etter rensing)	Singelpleks P1 (Primer CAU1)
P1	24.1	115	16.3	6.41
P2	<0.01	59.0	41.0	
P3	3.52	89.1	28.2	
P4	3.94	56.6	27.7	
P5	5.51	58.0	26.7	
P6	6.10	82.9	44.1	
P7	4.82	69.9	41.9	
P8	1.99	69.3	23.4	
P9	9.86	36.0	36.9	
P10	5.54	49.8	41.9	

Vedlegg C. Oversikt over primere brukt for 16S, multipleks og singelpleks PCR

Tabell C1. Primerpar som koder for 16S rRNA genet

Primer for 16S rRNA genet	Sekvens	Produktstørrelse (bp)
1F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1505
5R	GTTACCTTGTTACGACTT	

Tabell C2. Karbapenemase-primere (PM1) for multipleks PCR

Primermiks CAR (PM1)	Sekvens	Produktstørrelse (bp)
CAR 1		
CMY2-F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	188
CMY2-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACG	
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	281
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	393
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT	
VIM_F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	564
VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	
CAR 2		
NDM_F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	157
NDM_R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	
SFC1-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	268
SFC1-R	CACTGTACTGCAGAGTGGCA	
KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	460
KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC	

Tabell C3. ESBL-primere (PM2) for multipleks PCR

Primermiks ESBL (PM2)	Sekvens	Produktstørrelse (bp)	Målgjen
ESBL 1			
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	281	OXA-48
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
MultiCTXMGp2_F	CGTTAACGGCAGATGAC	404	CTXM
MultiCTXMGp2_R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiTSOO_F	GGCACCAGATTCAACTTTC AAG	564	OXA
MultiTSOO_R	GACCCCAAGTTTCTGTAAGTG		
MultiTSOS_F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713	SHV
MultiTSOS_R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
ESBL 2			
MultiCTXMGp9_F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561	CTXM
MultiCTXMGp9_R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCTXMGp1_F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	CTXM
MultiCTXMGp1_R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiTSOT_F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	TEM
MultiTSOT_R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
ESBL 3			
NDM_F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	157	NDM
NDM_R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
VIM_F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	564	VIM
VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	460	KPC
KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		

Tabell C4. Nye primere PM3 for multipleks og singelpleks PCR

Primermiks (PM3)	Sekvens	Produktstørrelse (bp)
CAU1 F	ATATCTATGGCCCAACGCCG	293
CAU1 R	CACGTCGGTAGGAATGGCG	
NPB3L1F	CGACATGGACAGGGGGAAAG	186
NPB3L1R	ACGTACGCTGGATTCTCACC	
VIM1347F	TGTTCTACATGACCGCCTCTC	566
VIM1347R	ACCACCGTATAGCACGTTTCG	
VIM2F	GAAGGACTCTCATCGAGCGG	322
VIM2R	AGCGATTTGTGTGCGCTTTT	

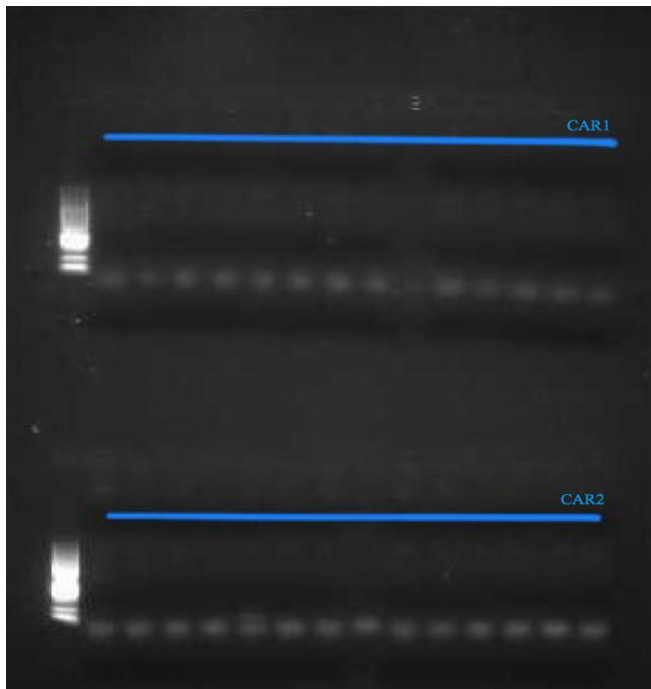
Tillaging av primermiks PM3

PM3 består av 4 primerpar og er nylig bestilt av Bjørn Arne Lindsedt. Disse kommer i pulverform og må derfor løses opp i RNase-fritt vann (Sigma-Aldrich, UK) før bruk. På skiltet til hver primer er det oppgitt primerkonsentrasjon i «nmol». Mengde RNase-fritt vann tilsettes i hver primer må regnes ut ved å multiplisere antall nmol med 10.

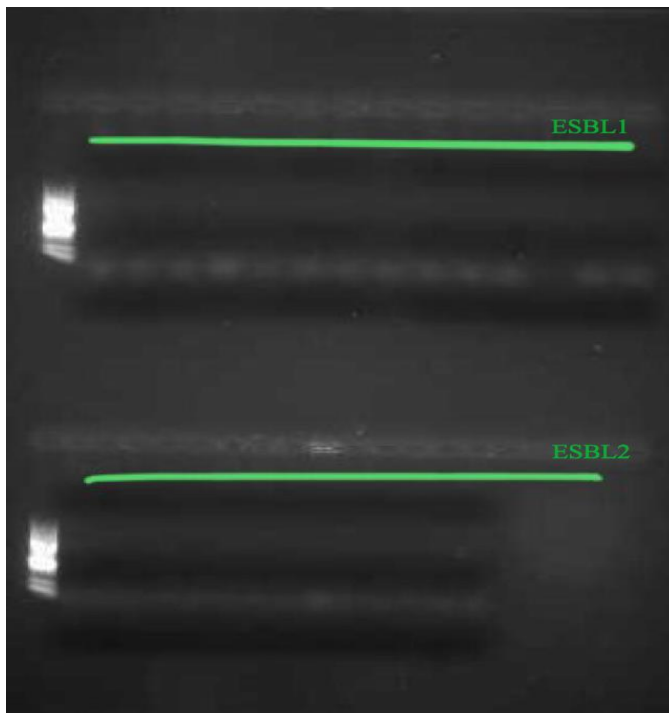
F.eks. 28.2 nmol på skiltet * 10 = 282 µL RNase-fritt vann

Primerne ble vortextet etter tilsetning av vann for å få en homogen løsning, deretter ble 10 µL av hver primer pipetert over til et nytt eppendorfrør. Primermiksen ble så vortextet og sentrifugert og er klar til bruk. Tilaging av primermiks M4 ble utført av Misti Down Finton.

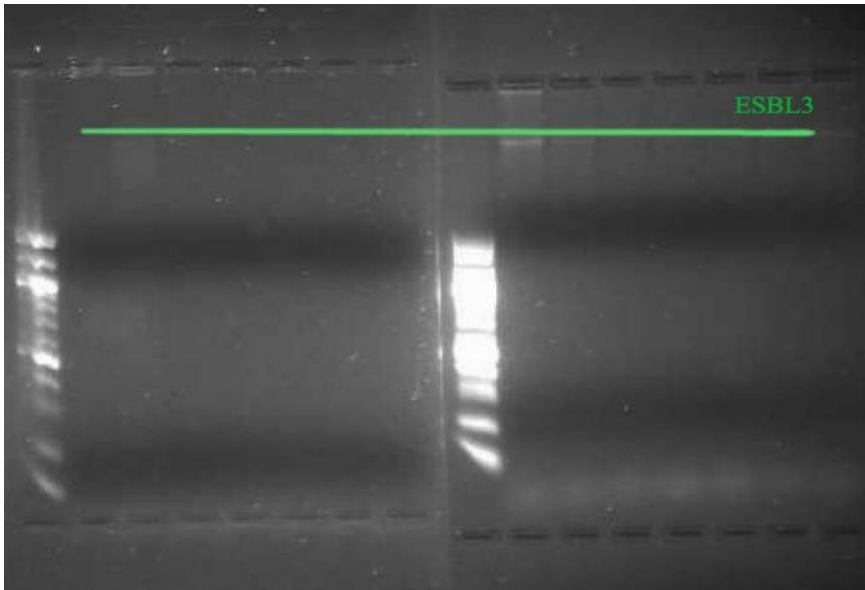
Vedlegg D. Gelbilder av PCR produkter



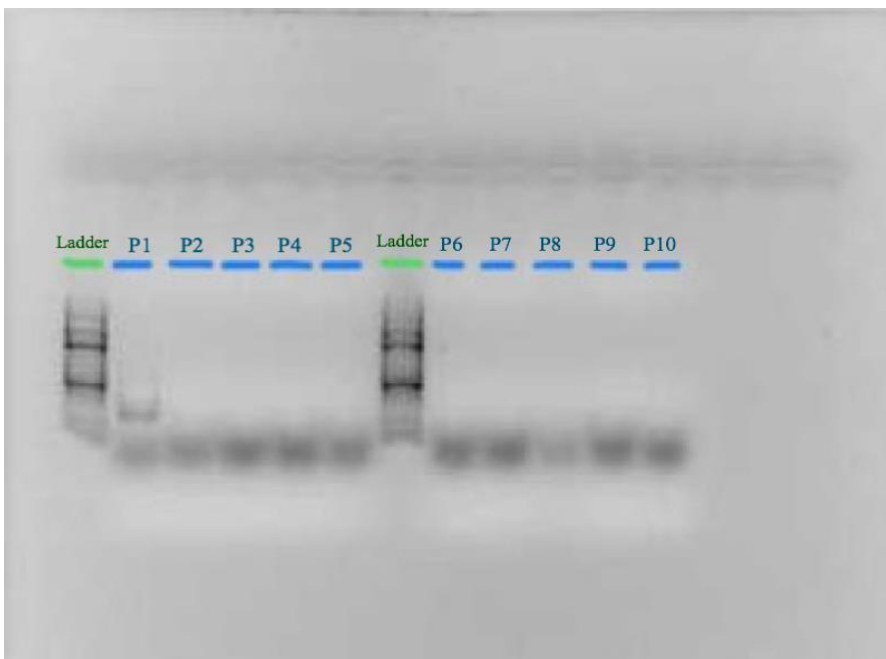
Figur D1. Gelbilde av multipleks PCR med CAR1 og CAR2. Ingen positive bånd ble observert.



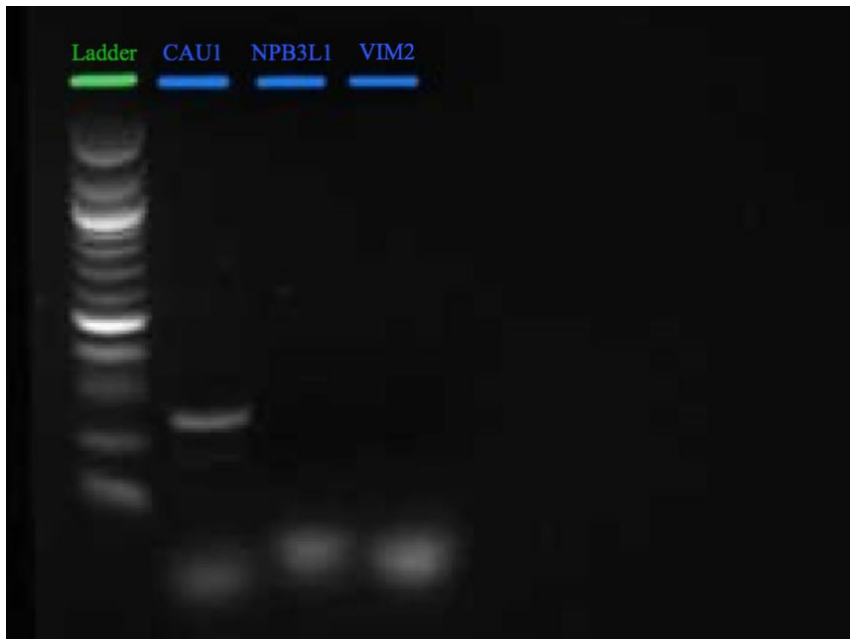
Figur D2. Gelbilde av multipleks PCR med ESBL1 og ESBL 2. Ingen positive bånd ble observert.



Figur D3. Gelbilde av multipleks PCR med ESBL3. Ingen positive bånd ble observert.


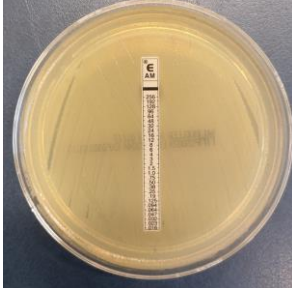
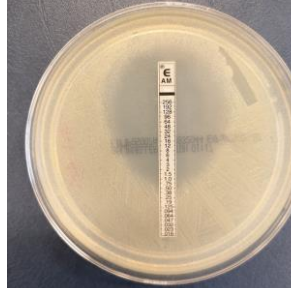

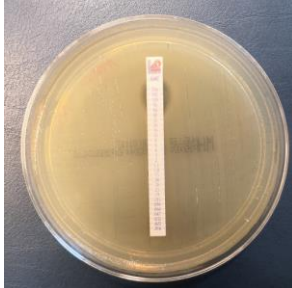
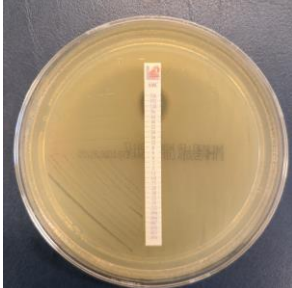
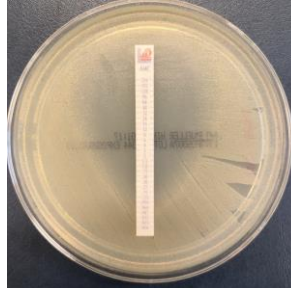
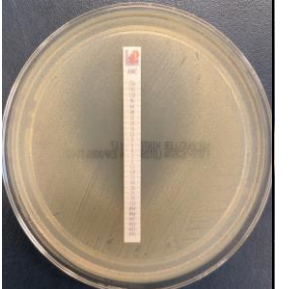
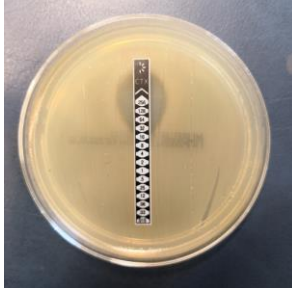

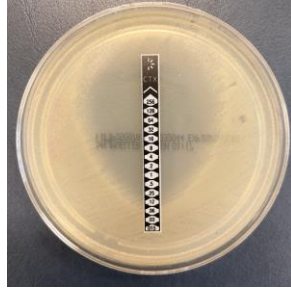
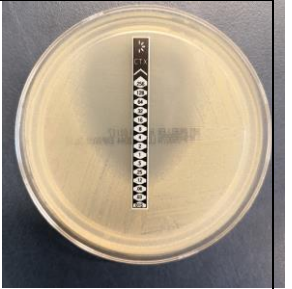
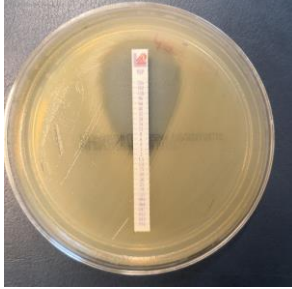
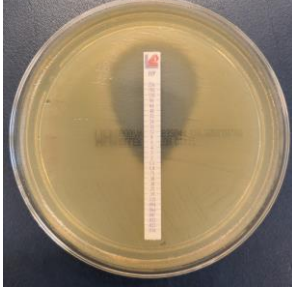
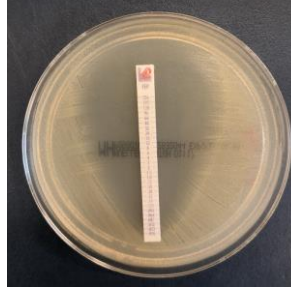
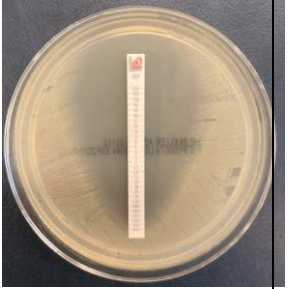


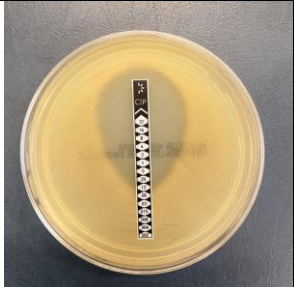
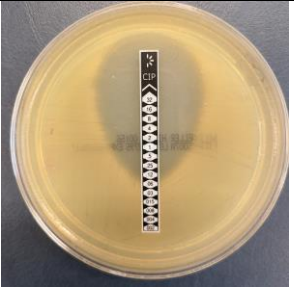
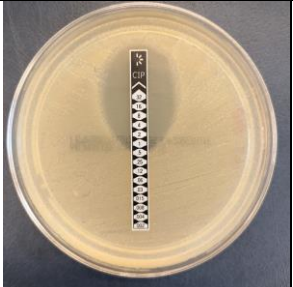
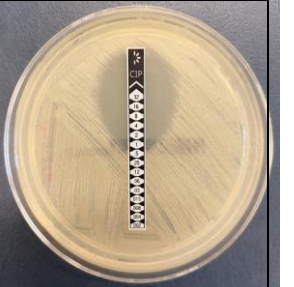

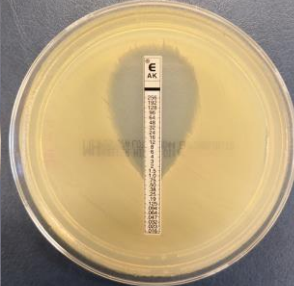
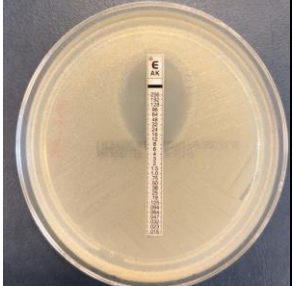
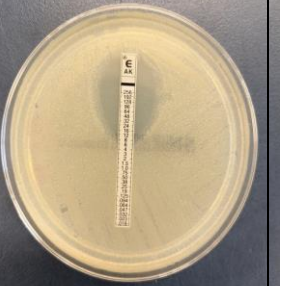


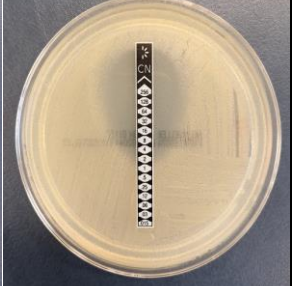

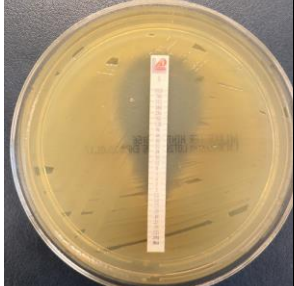
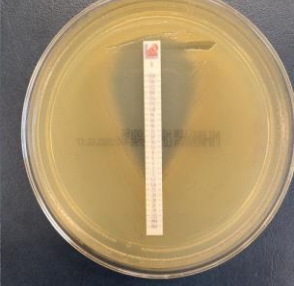
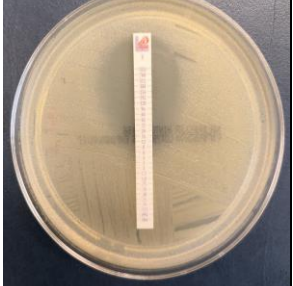
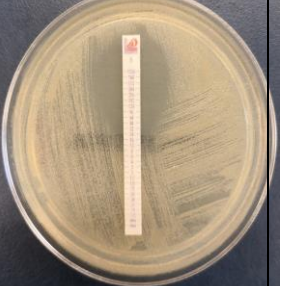
Figur D4. Gelbilde av multipleks PCR med PM3 for P1-10, hvorav P1 hadde et positiv bånd.

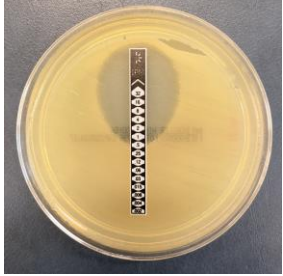
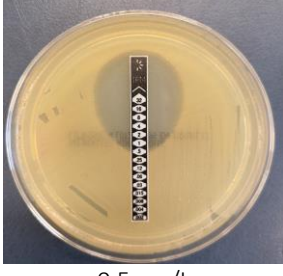
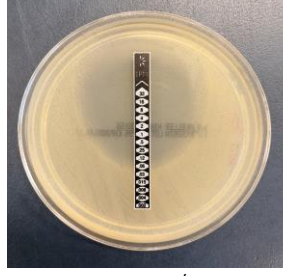
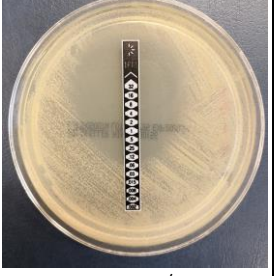


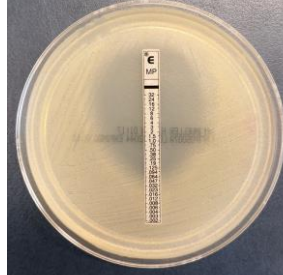

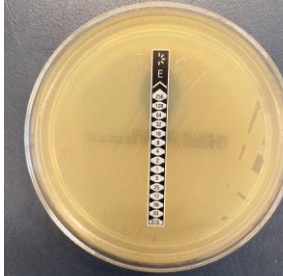
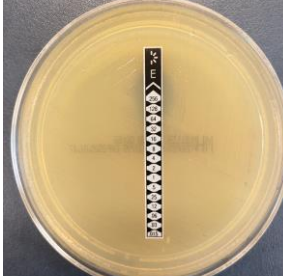
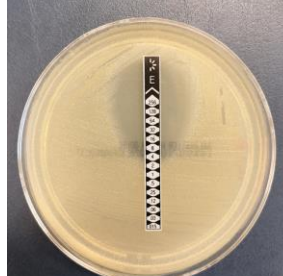
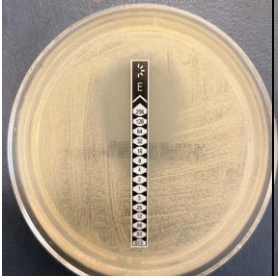
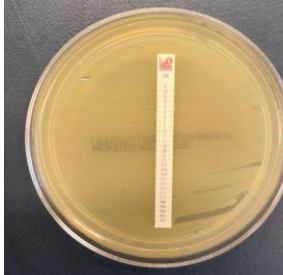
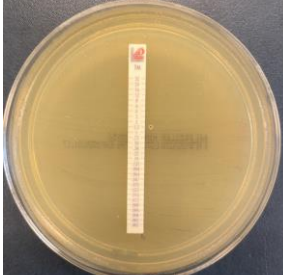
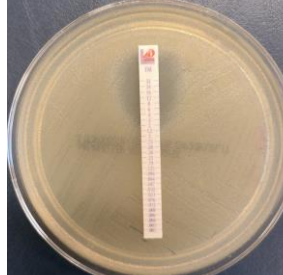
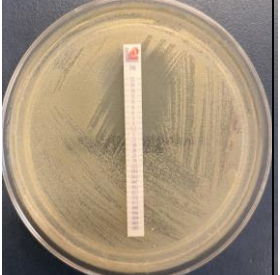


Figur D5. Gelbilde av singelpleks PCR for P1, hvor P1 hadde et positiv bånd på ca. 250 bp for primer CAU1.

Vedlegg E. Tabell som viser bilder av resultater for P1 og P10 fra AST, med 2 paralleller for hver prøve.

	<i>Prøve 1 – Pseudomonas ssp.</i>		<i>Prøve 10 – Herbaspirillum ssp.</i>	
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 1	Parallell 2
Klasse 1 - Aminopenicilline β-laktam, hemmer celleveggsyntesen				
Ampicillin 3. generasjon	 >256 mg/L	 >256 mg/L	 0.5 mg/L	 0.75 mg/L
Amoksisilin med klavulansyre Aminopenicillinen tilsettes klavulansyre om bakterie er resistent	 48 mg/L	 48 mg/L	 0.047 mg/L	 0.064 mg/L
Klasse 2 - Kefalosporine β-laktam, angriper penicillinbindende proteiner				
Cefotaxime 3. generasjon	 16 mg/L	 16 mg/L	 0.06 mg/L	 0.06 mg/L
Cefepime 4. generasjon	 1.5 mg/L	 1.0 mg/L	 < 0.016mg/L	 < 0.016mg/L

Klasse 3 - Fluoroquinolone Inhiberer DNA syntese					
Ciprofloxacin					
	0.06 mg/L	0.06 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	
	Klasse 4 - Aminoglykoside Bryter ned 30S subunit				
	Amikacin Andre valg om bakterien er resistent mot gentamicin				
0.75 mg/L		0.5 mg/L	6 mg/L	6 mg/L	
Gentamicin Første valg					
		0.25 mg/L	0.25 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
	Streptomycin Siste valg – Fremveksten av resistente organismer har begrenset bruken av streptomycin til noen få spesifikke forhold				
		1.5 mg/L	1.5 mg/L	6 mg/L	8 mg/L

Klasse 5 - Karbapenem β -laktam, hemmer celleveggssyntese					
Imipenem					
	0.5 mg/L	0.5 mg/L	0.03 mg/L	0.06 mg/L	
	Meropenem				
		2 mg/L	2 mg/L	0.064 mg/L	0.094 mg/L
Klasse 6 - Macrolide Bryter ned 50S subunit					
Erytromycin brukes ofte til å behandle pasienter som er allergiske mot penicillin					
	32 mg/L	64 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	
	Klasse 7 - Polymyxin Angriper cellemembran				
	Colistin	<0.25	<0.25	>16	>16
Andre antibiotika Inhiberer folsyresyntese					
Trimethoprim Til behandling av turistdiare.					
	>32 mg/L	>32 mg/L	2 mg/L	1.5 mg/L	

Vedlegg F. Resultater fra Illumina-sekvensering

Tabell F1. Resultater til «CARD database» for P1

GENE	COVERAGE_MAP	%COVERAGE
OpmH	=====/=====	96.76
MexB	=====/=====	98.03
OprM	=====/=====	94.99
Bifidobacterium_adolescentis_rpoB_conferring_resistance_to_rifampicin=...	4.83
Nocardia_rifampin_resistant_beta-subunit_of_RNA_polymerase_(rpoB2)/...===	10.17
Pseudomonas_aeruginosa_CpxR	=====/=====	98.53
mexW	=====/=====	98.27
MuxB	==.....	9.26
mexK	=====/=====	98.73
mexN=/=====	44.29
MexE	=====/=====	93.73
MexF	=====/=====	98.43
OprN	=====/=====	93.80
TriC	=====/=====	98.36
mexI	====.....	30.06
MuxB	..=====/=====	75.89
mexN	==.....	8.97
K._pneumoniae_KpnG===.	13.30
mexI	...===/=====.	51.91
mexI==	4.85

Resultater til «Selected genes » for P1

/product="p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeA"

/product="Multidrug/solvent efflux pump periplasmic linker protein MepA"

/product="Antibiotic efflux pump membrane transporter ArpB"

/product="Toluene efflux pump outer membrane protein TtgC"

/product="Toluene efflux pump membrane transporter TtgB"

/product="Efflux pump membrane transporter BepE"

/product="Arsenical pump membrane protein"

/product="Efflux pump membrane transporter BepE"

/product="Solvent efflux pump outer membrane protein SrpC"

/product="p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeB"

/product="Ferrous-iron efflux pump FieF"

/product="Multidrug resistance protein 3"

/product="Bicyclomycin resistance protein"

/product="Multidrug resistance protein MexA"
/product="Multidrug resistance protein MdtA"
/product="Multidrug resistance protein MdtB"
/product="Multidrug resistance protein MdtK"
/product="Multidrug resistance protein MdtC"
/product="Arsenic resistance transcriptional regulator ArsR2"
/product="Copper resistance protein B"
/product="Copper resistance protein A"
/product="Quaternary ammonium compound-resistance protein SugE"
/product="putative multidrug resistance protein EmrK"
/product="Fosmidomycin resistance protein"
/product="Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcB"
/product="Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA"
/product="Multidrug resistance protein MdtE"
/product="putative multidrug resistance protein EmrY"
/product="Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator"
/product="Organic hydroperoxide resistance protein OhrA"
/product="Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcC"
/product="Multidrug transporter"
/product="Putative multidrug export ATP-binding/permease protein"
/product="Multidrug transporter MdfA"
/product="Multidrug export protein EmrB"
/product="Modulator of drug activity B"
/product="putative multidrug ABC transporter permease YbhR"
/product="Multidrug export protein EmrA"

/product="Putative beta-lactamase HcpC"

/product="Beta-lactamase Toho-1" class A beta-lactamase [*Herbaspirillum huttiense*] *

/product="Antibiotic efflux pump outer membrane protein ArpC"

/product="Multidrug/solvent efflux pump membrane transporter MepB"

/product="Multidrug efflux pump subunit AcrB"

/product="Efflux pump membrane transporter BepE"

/product="Efflux pump periplasmic linker BepF"

/product="putative manganese efflux pump MntP"

/product="Ferrous-iron efflux pump FieF"

/product="p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeA"

/product="ATM1-type heavy metal exporter"

/product="Autotransporter adhesin UpaG"

***MATCHES => 50% AA identity from CARD database for /product="Beta-lactamase Toho-1" class A beta-lactamase [*Herbaspirillum huttiense*] ***

Name	Identity	Species	Comment
LRA-1	54	uncultured bacterium BLR1	LRA-1 is a beta-lactamase isolated from soil samples in Alaska
FAR-1	52	<i>Nocardia farcinica</i>	FAR-1 is a class A beta-lactamase gene found in <i>Nocardia farcinica</i> .
SHV-53	52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-53 is a beta-lactamase that has been found in clinical isolates.
CTX-M-7	51	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	CTX-M-7 is a beta-lactamase found in <i>Salmonella typhimurium</i>
OKP-B-12	51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OKP-B-12 is a beta-lactamase found in <i>Klebsiella pneumoniae</i>
CTX-M-122	50	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-122 is a beta-lactamase. From the Lahey list of CTX-M beta-lactamases.
CTX-M-83	50	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Derby	CTX-M-83 is a beta-lactamase found in <i>Salmonella enterica</i>
CTX-M-38	50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-38 is a beta-lactamase found in <i>Escherichia coli</i>
CTX-M-121	50	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-121 is a beta-lactamase found in <i>Escherichia coli</i>
CTX-M-113	50	<i>Shigella</i> sp. SH284	CTX-M-113 is a beta-lactamase found in <i>Shigella</i> spp.
CTX-M-67	50	<i>Escherichia coli</i>	From the Lahey list of beta-lactamases.
CTX-M-160	50	<i>Escherichia coli</i>	From the Lahey list of beta-lactamases.
CTX-M-84	50	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Derby	CTX-M-84 is a beta-lactamase found in <i>Salmonella enterica</i>

CTX-M-17	50	Klebsiella pneumoniae	CTX-M-17 is a beta-lactamase found in Klebsiella pneumoniae
CTX-M-14	50	Escherichia coli	CTX-M-14 is a beta-lactamase found in the Enterobacteriaceae family
CTX-M-50	50	Klebsiella pneumoniae	CTX-M-50 is a beta-lactamase found in the Enterobacteriaceae family
CTX-M-86	50	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona	CTX-M-86 is a beta-lactamase found in Salmonella enterica
CTX-M-112	50	Shigella sp. SH257	CTX-M-112 is a beta-lactamase found in Shigella spp.
FONA-6	50	Serratia fonticola	FONA-6 is a class A beta-lactamase gene found in Serratia fonticola.

***ExPasy BLAST**

87.6% Protein Identity

penP: Beta-lactamase. Belongs to the class-A beta-lactamase family.

Herbaspirillum seropedicae (strain SmR1)

Nucleotide: HerbaspirillumSmR1 betalactamaseA **84.28% identity**



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway