



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Detektering av antibiotikaresistente bakterier i kumelk ved hjelp av dyrkningsbaserte og molekylærbiologiske metoder

Detection of antibiotic resistant bacteria in cow's milk through cultivation based and molecular biological methods

Oda Mamen

Master i bioteknologi



Agan Voda
Mamen

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet mellom september 2019 og mai 2020 og utgjør 60 studiepoeng. Oppgaven markerer avslutningen av et femårig studie i bioteknologi ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges Miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Temaet antibiotikaresistens har vært gjennomgående i min studietid, og vil være veldig relevant i alle de jobbene jeg kan ønske meg, så det var perfekt å avslutte min masterutdannelse med å fordype meg i akkurat dette temaet. Det har faktisk vært så gøy og spennende at jeg ønsker å jobbe videre med dette temaet mot en doktorgrad. For det må jeg først og fremst gi en stor tusen takk til hovedveileder Bjørn-Arne Lindstedt, som ga meg muligheten til å jobbe med dette, og enda en takk til tilleggsveileder Judith Narvhus, som fikk knyttet oppgaven min til prosjektet JurFrisk, som var en ny og spennende vri på den opprinnelig planlagte oppgaven, om antibiotikaresistente bakterier i miljøet. Jeg har lagt merke til at det er mange forskjellige typer veileder man kan få, og jeg har stor tro på at det er minst like viktig å ha riktig type veileder, som å ha et spennende tema å skrive om. Jeg føler jeg var veldig heldig med mine veiledere! Bjørn-Arne Lindstedt har gitt meg mye frie tøyler, men har også vært tilgjengelig for alle henvendelser, og har vært veldig tålmodig når jeg har blitt litt overdrevent ivrig med spørsmål. Takk for all hjelp og alle tilbakemeldinger.

Jeg fikk ikke bare hjelp og gode råd av veilederne mine, men også av flere som jobber på laben, så takk til Ahmed Abdelghani, Davide Porcellato og Alberto Bombelli for all hjelp. En spesiell takk må jeg gi til Misti Dawn Finton, en ekstremt smart, flink og tålmodig person, som alltid svarer raskt og nøyte på alle spørsmål og som har hjulpet meg gjennom hele oppgaven. Hennes selskap har gjort jobben på patogenlaben i meieribygget så hyggelig. På masterlesesalen var det også mye støtte å få, oppgavetiden ble gjort ekstra minneverdig takket være de hyggelige og engasjerte studentene der. Spesielt Beate Bjørgan, en god venn gjennom hele utdannelsen min, som skrev sin masteroppgave samtidig som meg, og som alltid møtte opp med et stort smil og en latter som bar gjennom hele meieribygget. Hun har gjort det veldig vanskelig å være negativt innstilt til noe som helst.

I tillegg til alle fra universitetet, må jeg også si takk til hele familien min, som alle har vært veldig støttende og som har orket å høre på alt jeg har å si, som helt sikkert må ha blitt oppfattet som svært ensporet etter hvert. Spesielt må jeg takke Henrik Akerhaugen, mannen min, som har diskutert oppgaven med meg, hjulpet meg å krangle med Excel, lest alt jeg har

skrevet og holdt meg positiv, og som ikke én eneste gang har klaget på å sitte i Corona-karantene eller ha tvunget hjemmekontor med en stressa masterstudent.

Hva karantene angår, må jeg gi en spesiell ikke-takke til SARS-CoV-2, som forårsaket pandemien som sørget for stengt lab, stengt lesesal, stengt bibliotek og som medførte noe mangler i denne oppgaven. Jeg har ikke blitt spesielt hardt rammet av denne pandemien, i hvert fall ikke sammenliknet med andres tragedier, men jeg kan ikke nekte for at det gjorde oppgaveskrivingen noe utfordrende. Det er en del informasjon som burde ha vært inkludert i denne oppgaven som hverken jeg eller noen andre har tilgang til nå, og noen få resultater er låst inn på laben. I tillegg er enkelte tilleggs-tester ikke utført, da laben er låst og det ikke kan bestilles ytterligere materialer. Virus gjorde det også helt umulig å jobbe videre med melkeprøver, som skulle være en ganske stor del av denne oppgaven. Men jeg skal ikke gråte over spilt melk. Siden oppgaven min var på 60 poeng fikk jeg heldigvis muligheten til å starte tidlig og dermed fullføre store deler av det praktiske arbeidet, da det aller meste var ferdig i februar. Jeg har hatt mye å skrive om, selv om jeg skulle ønske jeg hadde hatt muligheten til å gjøre den helt komplett. Jeg håper jeg har klart å gjøre det beste ut av situasjonen.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2020

Oda Mamen

Abstract

Antibiotic resistant microorganisms are one of the biggest concerns of today, and little is known about how resistant bacteria enter the food chain, but the environment and foodstuffs in Norway is a possible and not thoroughly studied source. Among the foodstuffs is milk, where little is done to map what kind of resistance mechanisms exist in the bacteria, and whether this can spread to and become a problem in humans. The purpose of the work in this thesis was to search for antibiotic resistant bacteria in milk from cows that have never received antibiotics, and what kind of antibiotics they are resistant against, and what mechanisms grant this resistance. The goal was to map resistance mechanisms in bacterial isolates gathered as a part of the JurFrisk project, and study the proliferation potential, deviation from wild types and clinical relevance by genotyping/sequencing and MIC determinations. 81 isolates from the milk of healthy cows were grown on blood agar from deep frozen glycerol stocks, and then transferred to ESBL, CRE and MRSA plates. In addition to this, 12 isolates from cows with mastitis, which had already grown on ESBL plates, were re-cultivated for further study, to see what exactly gave them resistance. DNA was extracted and all resistant samples were screened for typical resistance genes using PCR/qPCR multiplexing. DNA from several of these samples was whole genome sequenced to find resistance and virulence genes. All of this was supposed to be done with milk samples as well, but none of the 40 milk samples gave a single colony on any of the antibiotic plates. Of the freezer samples, none of the multiplexes gave any positives, but several resistance and virulence genes were found by sequencing. They had genes that can grant resistance to many kinds of antibiotics, like tetracycline, fluoroquinolones, rifampins and betalactams, meaning they have defense mechanisms against the four main targets for antibiotics: the protein synthesis, the DNA synthesis, the RNA synthesis and the cell wall synthesis. The resistance mechanisms discovered was both protection of the target, inactivation of the antibiotic, modified target and, mainly, efflux pumps. The MIC testing suggested an acquired and clinically relevant resistance in some of the bacteria and it was also found genes associated with mobile genetic elements, that can cause an increased proliferation of resistance genes. Several virulence genes were also discovered in the resistant bacteria, that can aid the organisms in colonization, survival and proliferation in host, in addition to causing additional harm during an infection. It would seem that even cows that don't receive antibiotics can carry, and help spread, virulent bacteria with clinically relevant, acquired resistance genes. Further studies could help discover how exactly resistant microbes enter the food chain.

Sammendrag

Antibiotikaresistente mikroorganismer er en av de største utfordringene vi møter i dag, og man vet foreløpig lite om hvordan resistente bakterier inntar matkjeden, men miljøet og næringsmidler i Norge er en mulig og lite undersøkt kilde. Disse næringsmidlene inkluderer melk, hvor det er gjort lite for å kartlegge hvilke typer resistensmekanismer som eksisterer i bakteriene, og hvorvidt disse kan spres til og bli et problem hos mennesker. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om det finnes antibiotikaresistente bakterier i melk fra kyr som aldri har fått antibiotika, og hva slags antibiotika de er resistente mot, samt hvilke resistensmekanismer som gir denne resistensen. Målet var å kartlegge resistensmekanismer i bakterielle isolater oppsamlet som en del av JurFrisk-prosjektet og undersøke spredningspotensialet, avvik fra villtyper, og klinisk relevans ved genotyping/sekvensering og MIC-bestemmelser. 81 isolater, isolert fra melk fra friske kyr, ble vekket til live fra glyserolstocks på blodagar. Prøvene ble sådd ut på ESBL-, CRE- og MRSA-skåler, i tillegg ble 12 isolater fra kyr med mastitt, som var plukket fra vekst på ESBL-skåler, også vekket for videre undersøkelser av hva som gjør dem resistente. DNA ble ekstrahert og alle resistente prøver ble screenet med PCR/qPCR multipleks for typiske resistensgener. DNA fra flere av disse prøvene ble helgenomsekvansert for å finne resistensgener og virulensgener. Alt dette skulle også ha blitt gjort med melkeprøver, men ingenting fra 40 forskjellige melkeprøver ga vekst på noen antibiotikaskåler. Hos de frysede prøvene var hver multipleks negativ, men det ble funnet mange resistens- og virulensgener i sekvenseringen. Bakteriene hadde gener som kan gi resistens mot mange typer antibiotika, som tetracyclin, fluoroquinoloner, rifampiner og betalaktamer, som betyr at det ble funnet forsvarsmekanismer mot alle de fire typiske angrepspunktene til antibiotika, nemlig proteinsyntesen, DNA-syntesen, RNA-syntesen og cellevegg-syntesen. Resistensmekanismene som ble oppdaget var både beskyttelse av angrepspunktet, inaktivering av antibiotika, modifisert angrepspunkt, og i all hovedsak efflukspumper. MIC-testene antydte en ervervet og klinisk relevant resistens hos enkelte av bakteriene, og det ble funnet gener forbundet med mobile genelementer, som kan bidra til økt spredning av resistens. Det ble også funnet mange virulensgener hos alle de resistente bakteriene, som kan hjelpe dem med kolonisering, overlevelse og spredning i verten, samt utgjøre ytterligere skade under en infeksjon. Tilsynelatende kan selv kyr som ikke får antibiotika være bærere, og bidra til spredningen av, virulente bakterier med klinisk relevante, ervervede resistensgener. Videre undersøkelser av dette kan være et ledd i å avdekke hvordan resistente mikrober kommer inn i matkjeden.

Forkortelser

ABC	ATP-binding cassette
BHI	Brain Heart Infusion
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CDC	Centers for disease control
CDC NARMS	CDC National Antimicrobial Resistance Monitoring System
CF	Cystisk fibrose
CI	Ciprofloxacin
CRE	Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae
CTX	Cefotaksim
DDD	Definerte døgndoser
ECDC	European centre for disease prevention and control
ECOFF	Epidemiological cut-off value
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ESBL	Extended spectrum β -lactamase
ESS	ESAT-6 secretion system
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Cefepim
IPM	Imipenem
IS	Inserjonssekvenser
LPG	Lysyl-phosphatidylglyserol
LPS	Lipopolysakkarid
MaldiTOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion efflux
MFS	Major facilitator superfamily
MGE	Mobile gen-elementer
MH	Mueller Hinton
MIC	Minimum inhibitory concentration
MP	Meropenem
MRSA	Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>

NRF	Norsk rødt fe
ORF	Open reading frame
PBP	Penicillin binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
PNAG	Poly- β (1-6)- <i>N</i> -acetylglucosamine
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
rMLST	Ribosomal multilocus sequence typing
RND	Resistance-nodulation-division
RPP	Ribosomal protection protein
S	Streptomycin
SMR	Small multidrug resistance
T2SS	Type 2 secretion system
T3SS	Type 3 secretion system
T4SS	Type 4 secretion system
T6SS	Type 6 secretion system
T7SS	Type 7 secretion system
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tetracyclin
TM	Trimetoprim
Tn	Transposoner
VFDB	Virulence factors database
VISA	Vancomycin intermediade-resistant <i>S.aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistant <i>S.aureus</i>
WHO	World health organization

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Abstract	3
Sammendrag	4
Forkortelser	5
Innholdsfortegnelse	7
1. Introduksjon	9
1.1 Hva er antibiotika?	9
1.2 Hva er antibiotikaresistens?	13
1.3 Resistente bakterier	20
1.4 Virulens	21
1.5 Antibiotika-forbruk og spredning av resistens	24
1.6 Tiltak mot antibiotikaresistens	29
1.7 Metodeteori	32
2. Materialer og metoder	42
2.1 Flytskjemaer for oppgaven	43
2.2 Prøvene	46
2.3 Dyrkningsbaserte metoder	52
2.4 MIC-testing	53
2.5 Ekstrahering av DNA	54
2.6 Kvantifisering av DNA	54
2.7 PCR	55
2.8 Sekvensering	61
2.9 Behandling av data	61
3. Resultater	63
3.1 Resultater for dyrkning av F-bakterier	63
3.2 MIC-resultater for F-bakterier	68
3.3 Ekstrahert DNA fra F-bakterier	74
3.4 PCR-resultater for bakterier for F-bakterier	74
3.5 Sekvenserte F-bakterier	75
3.6 Resultater for dyrkning av S-bakterier	78
3.7 MIC-resultater for S-bakterier	79
3.8 Ekstrahert DNA fra S-bakterier	84
3.9 PCR-resultater for S-bakterier	85

3.10 Sekvenserte S-bakterier.....	85
3.11 Resultater for melkeprøver	88
3.12 Oppsummering av alle sekvenserte prøver	88
4. Diskusjon.....	91
4.1 Forklaring av resistensgener.....	91
4.2 Forklaring av virulensgener	102
4.3 Diskusjon av F- og S-bakterier	107
4.4 Melkeprøvene	127
4.5 Videre forskning/forslag til endringer i oppgaven	128
5. Konklusjon.....	129
6. Litteraturliste.....	131
Vedlegg	142
Vedlegg 1.....	142
Vedlegg 2.....	144
Vedlegg 3.....	145
Vedlegg 4.....	146
Vedlegg 5.....	149

1. Introduksjon

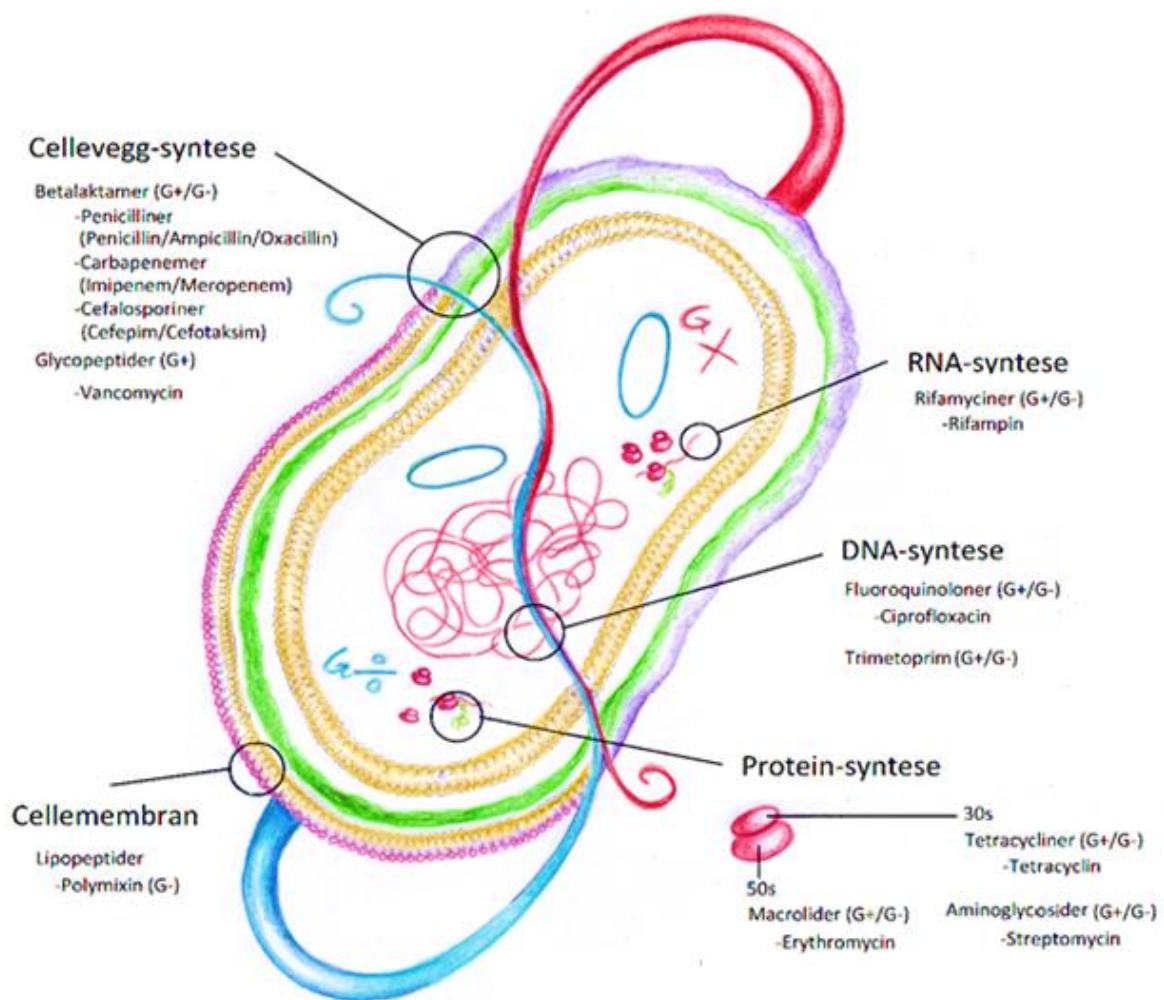
Antibiotika-resistens er et økende problem i verden. Det er fascinerende hvordan bakterier klarer å utvikle forsvarsmekanismer mot stoffene vi bruker for å bekjempe dem, og det er like spennende, og dessuten svært viktig, å kartlegge disse mekanismene. Vi har ennå ingen fullgode alternativer til antibiotika, som er klare til å erstatte bruken av disse stoffene. Dersom resistens utvikles raskere enn nye typer antibiotika eller alternative medisiner vil selv små infeksjoner kunne utgjøre en stor trussel. Antibiotikaresistens har vært et kjent problem ganske lenge, og man har lenge visst at økt forbruk av antibiotika hos mennesker og dyr vil få fortgang i økningen av resistens (Ventola, 2015), men man har ennå ikke sett så mye på forekomsten av antibiotikaresistente bakterier i miljøet rundt oss. Tidligere masteroppgaver har tatt tak i dette, og undersøkt forekomsten av resistente bakterier i miljøet og funnet flere antibiotika-resistente bakterier i prøver fra både vann og jord (se for eksempel Bentsen Skaflem, 2018; Lillebakk, 2017; Støle, 2017), men hvorfor stoppe der? Siden disse bakteriene finnes i jord og vann, er det grunn til å tro at de kan spre seg langt i næringskjeden, fra jord og vann til planter og dyr, og videre til mennesker, til andre mennesker, og tilbake til jord og vann. Det er mye det går an å undersøke her, men for å begrense det til én problemstilling det er gjennomførbart å finne et svar på i løpet av denne oppgaven: hvis det finnes antibiotikaresistente bakterier i melk, hva slags resistensgener har de, hva slags resistensmekanismer gir genene, og hva slags antibiotika er de resistente mot? Det kan være lett å forestille seg at dersom en syk ku har fått antibiotika, så vil det gi mening at man etter hvert finner resistente bakterier i melken, men hva om de aldri får antibiotika? I denne oppgaven vil dette undersøkes, i samarbeid med prosjektet JurFrisk, ved å teste bakterier hentet fra melk fra friske og syke kyr, som aldri noen gang har fått antibiotika, gjennom tradisjonelle dyrkningsbaserte metoder og moderne molekylærbiologiske metoder. Målet med å finne svaret på denne problemstillingen vil være å forhåpentligvis styrke kartleggingen av resistente bakterier i miljøet.

1.1 Hva er antibiotika?

Antibiotika er definert som antimikrobielle forbindelser, produsert av mikroorganismer som kan hemme andre mikroorganismer, selv ved svært lav konsentrasjon. Det ble først oppdaget ved et uhell av den skotske legen Alexander Fleming i 1928, da en skål med stafylokokker ble infisert med en ukjent sopp som hemmet veksten av bakteriene. Soppen ble senere bestemt til å være *Penicillium notatum*, og var starten på et revolusjonerende steg i legemiddelindustrien

(Tronsmo, 2016). Selv om penicillin ble oppdaget allerede i 1928, var det ikke et utbredt legemiddel før 1943, men etter at antibiotika ble tatt i bruk, har det reddet millioner av liv som ellers ville gått tapt til infeksjoner (Ventola, 2015)

Det finnes i dag mange varianter av antibiotika, som klassifiseres basert på hvilken cellekomponent de angriper, i tillegg til om de induserer celledød (baktericide egenskaper) eller kun hemmer videre vekst hos cellen (bakteriostatiske egenskaper). De aller fleste typer antibiotika som benyttes i dag angriper bakteriens syntese av proteiner, DNA, RNA eller cellevegg (Kohanski et al., 2010), som vist i figur 1:



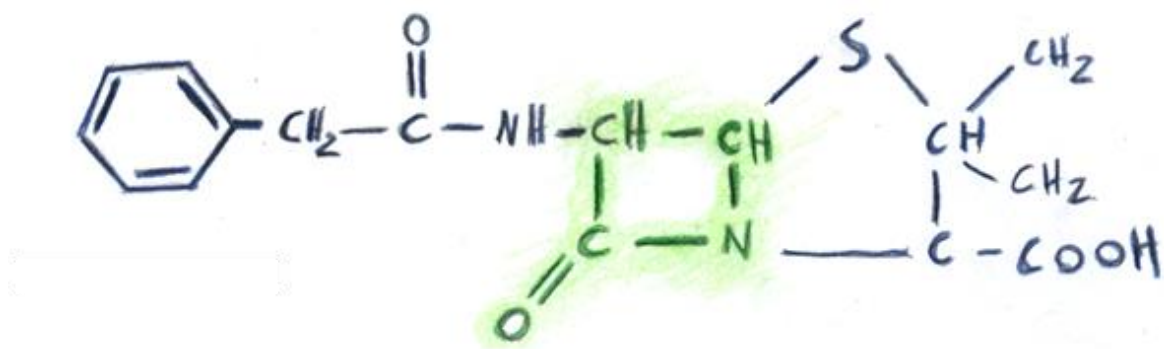
Figur 1 viser en bakteriecelle, både som Gram-positiv og Gram-negativ, og punktene i cellen forskjellige typer antibiotika kan angripe (Kohanski et al., 2010). Illustrasjon: Oda Mamen

Figur 1 fremstiller de fire vanligste angrepspunktene til antibiotika hos en bakteriecelle, samt noen eksempler på vanlige varianter av antibiotika. Ett eksempel for cellemembranen er også inkludert, men vil ikke diskuteres videre, da det meste av antibiotika angriper cellevegg-

syntese, proteinsyntese, DNA-syntese og RNA-syntese. Mange typer antibiotika virker på både Gram-positive og Gram-negative bakterier, men enkelte er beregnet på kun én variant, dette er markert i parentes bak antibiotikumet. Medisin som virker mot mange forskjellige patogener, for eksempel både Gram-negative og Gram-positive bakterier klassifiseres som bredspektret, mens medisin som kun er effektiv mot et snevert utvalg regnes som smalspektret (Willey et al., 2014). For eksempel vil vancomycin regnes som et smalspektret antibiotikum da det kun brukes mot Gram-positive bakterier, mens ampicillin kan brukes mot Gram-positive og i tillegg være effektiv mot mange Gram negative, og regnes derfor som bredspektret (Willey et al., 2014).

Angripe celleveggen

Felles for alt av antibiotika er at de i størst mulig grad skal angripe strukturer som er unike for bakteriecellen, slik at våre egne celler ikke skal ta skade av stoffet. Det må nevnes at selv om antibiotika ikke er tiltenkt å skade våre celler, kan høye doser av antibiotika likevel ha toksiske effekter på mennesker (Heta & Robo, 2018). Men celleveggen er et godt angrepspunkt, da dyreceller mangler denne strukturen fullstendig, og i riktige doser skal det være trygt å administrere antibiotika som angriper celleveggen. Eksempler på denne typen antibiotika er penicillinene, hvor det primære angrepspunktet i celleveggsyntesen er penicillin-bindene proteiner (PBP) (Kohanski et al., 2010). Den viktigste strukturen i penicillinene er betalaktam-ringen:



Figur 2 viser strukturen til penicillin G, hvor betalaktam-ringen er uthevet i grønt. Illustrasjon: Oda Mamen

I figur 2 benyttes penicillin G som eksempel, ikke alle penicilliner ser slik ut, men ringen, uthevet i grønt, er felles for alle. Strukturen til penicilliner ligner på en struktur man finner i peptidoglykan. Denne likheten kan medføre blokkering av enzymet som katalyserer kryssbindingen i peptidoglykanet, som vil medføre en ufullstendig celleveggsyntese, som igjen vil medføre at cellen lyserer under osmotisk trykk (Willey et al., 2014). Stoffer som ødelegger celleveggsyntese vil altså være baktericide, da bakteriecellen ikke vil overleve. Det

ikke kun penicilliner som har denne ringen, carbapenemer (som imipenem og meropenem) og cefalosporiner (som cefepim og cefotaksim) er også betalaktamer, som vist i figur 1. Av betalaktamene som er tilgjengelige i dag, er carbapenemer mye brukt da de er veldig bredspektrede, og ofte er resistente mot hydrolyse utført av betalaktamaser, altså enzymer som ødelegger betalaktam-ringen (Papp-Wallace et al., 2011). Cefalosporiner er en stor gruppe av betalaktamer som har blitt mye brukt takket være lav toksisitet, og fordi dette er relativt bredspektret. De har blant annet blitt mye brukt mot lungebetennelse, infeksjoner i huden, bakteriemi og meningitt, men stort forbruk av cefalosporiner har gjort resistens relativt vanlig. Nye varianter av cefalosporiner utvikles for å bekjempe resistens, som for eksempel cefepim, et fjerde generasjons cefalosporin som benyttes for å bekjempe resistente infeksjoner (Marshall & Blair, 1999). Betalaktamer generelt er i dag den mest brukte typen av antibiotika, og varianter av dette har blitt benyttet svært lenge (Bush & Bradford, 2016).

Angripe proteinsyntesen

Proteinsyntese er en kritisk funksjon for alle celler, både prokaryote og eukaryote, og dersom proteinsyntesen skal forstyrres, er ribosomene et godt mål. På grunn av forskjellen mellom ribosomstrukturene i prokaryoter og eukaryoter er det kun prokaryot proteinsyntese som skal angripes når man benytter antibiotika som forstyrrer proteinsyntesen. Bakterieribosomene er forskjellige nok fra eukaryote ribosomer, til at det normalt er trygt å administrere antibiotika som angriper disse strukturene (Böttger et al., 2001). Både 50S og 30S i bakterieribosomet er utsatt. 50S er angrepspunktet for macrolider som erythromycin, mens 30S er målet for tetracycliner som tetracyclin og aminoglycosider som streptomycin. Tetracyclin er et bakteriostatisk stoff som hemmer veksten til bakterien når det forhindrer translasjon ved å stanse binding av aminoacyl tRNA til ribosomet, mens streptomycin er et baktericid som binder til 30S og sørger for at det blir satt inn feil aminosyrer i et protein (Kohanski et al., 2010).

Angripe DNA-syntesen

For at en celle skal kunne dele seg må DNA replikeres, dersom dette stoppes vil celledelingen også stoppe opp. Trimetoprim er et eksempel på antibiotika som forstyrrer denne prosessen. Dette er et bredspektret antimikrobielt stoff som er hyppig brukt mot blant annet urinveisinfeksjoner (Coque et al., 1999). Trimetoprim er et 2,4 diaminopyrimidin og hemmer enzymet dihydrofolat reduktase, som medfører forstyrrelser syntesen av folsyre og dermed syntesen av pyrimidiner (Zinner & Mayer, 2015). Fluoroquinoloner er også antibiotika som angriper DNA-syntese. Dette er syntetiske antimikrobielle stoffer som brukes mot en rekke

bakterielle infeksjoner hos både mennesker og dyr. De virker ved å inhibere DNA-gyrase, en type topoisomerase som håndterer superkveiling av DNA i replikasjonen (Brown, 1996). Ciprofloxacin er et eksempel på dette.

Angripe RNA-syntesen

RNA er viktig for cellen, ikke bare for transkripsjon og translasjon i proteinsyntesen, men også for oppbygning av ribosomer og mange regulatoriske mekanismer. Rifamyciner som rifampin hemmer DNA-avhengig transkripsjon ved å binde til β -subenheten (kodet av *rpoB*-genet) til en RNA-polymerase som binder til DNA (Kohanski et al., 2010).

1.2 Hva er antibiotikaresistens?

At en bakterie er resistent mot et antibiotikum betyr at den kan leve og formere seg med antibiotikumet til stede, hvor andre bakterier vil dø eller slutte å vokse. Mekanismene en bakterie benytter for å beskytte seg mot antibiotika kan grovt deles inn i fire hovedgrupper (Reygaert, 2018):

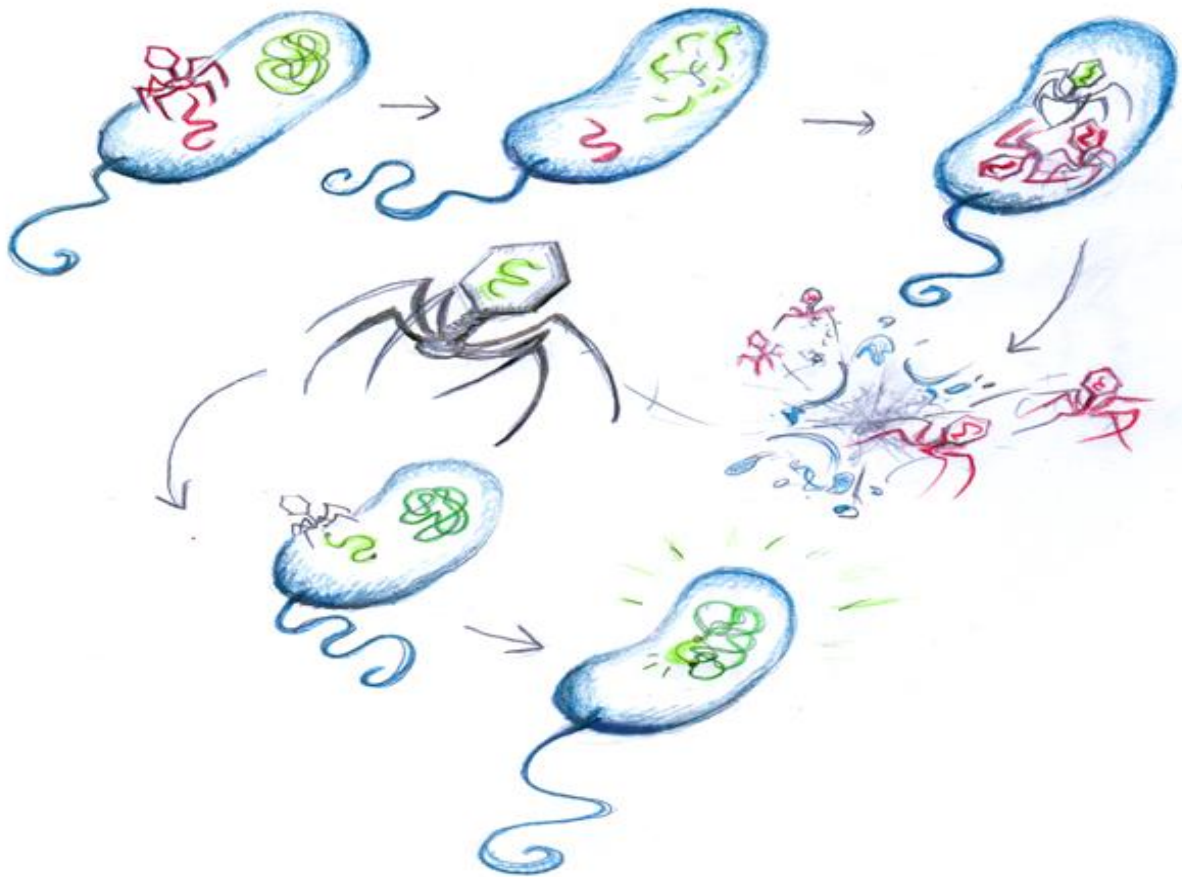
- begrense opptaket av antibiotika inn i cellen
- inaktivere antibiotika
- modifisere/bytte ut angrepspunktet til antibiotika
- aktiv utpumping av antibiotika med efflukspumper

Disse resistensmekanismene kan være naturlige eller ervervet. Naturlig resistens er genetisk betinget, og vil gå i «arv» ved celledeling. For eksempel vil Gram-negative bakterier ha naturlig resistens mot vancomycin, da de har en «medfødt» beskyttende cellemembran rundt seg som vancomycinen ikke kan trenge gjennom for å nå celleveggen, som er angrepspunktet til dette glycopeptidet. Eller det kan være snakk om at angrepspunktet til antibiotikumet rett og slett ikke eksisterer i bakterien (Gaustad, 2001). For eksempel finnes det bakterier, som *Mycoplasma* spp, som fullstendig mangler cellevegg, og dermed er naturlig resistente mot alle stoffer som angriper celleveggen. Naturlig resistens kan defineres som en egenskap som er delt hos alle medlemmer av en bakterieart, som er uavhengig av om bakterien har vært i kontakt med antibiotika, og som ikke er forbundet med horisontal genoverføring (Reygaert, 2018).

Ervervet resistens, derimot, skyldes nye egenskaper som bakterien tilegner seg ved mutasjoner eller horisontal genoverføring, altså gener som overføres mellom eksisterende bakterier, og ikke fra morcelle til dattercelle gjennom celledeling (Gaustad, 2001). Horisontal

genoverføring kan skje på tvers av stammer og arter, og kan dermed bidra til rask spredning av resistens hos bakterier (Lerminiaux & Cameron, 2019). Horisontal genoverføring skjer gjennom tre mekanismer, transduksjon, transformasjon eller konjugasjon (Daubin & Szöllösi, 2016), som bakterier drar nytte av ved at det skaper en større grad av genetisk diversitet, og kan gi enkeltbakterien nødvendige fordeler i konkurranse eller overlevelse.

Transduksjon:

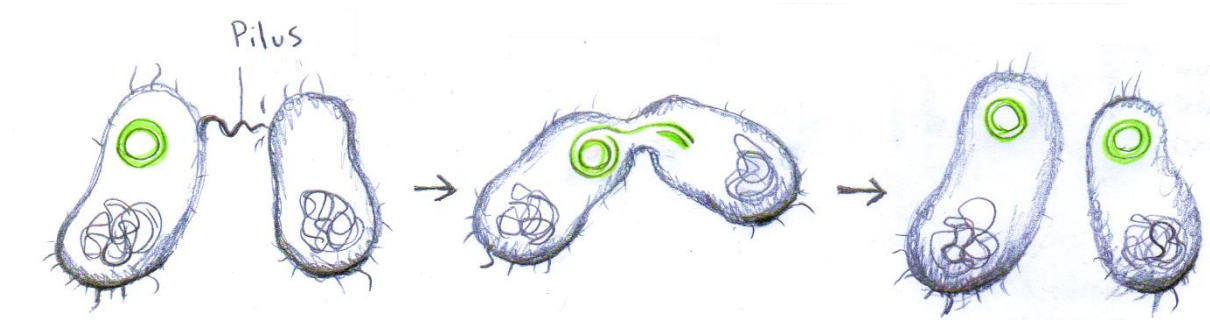


Figur 3: Transduksjon. Illustrasjon: Oda Mamen

Ved transduksjon overføres DNA fra en bakterie til en annen ved hjelp av et virus som infiserer bakterieceller, en såkalt bakteriofag, som vist i figur 3. Bakteriofagen angriper sin bakterievert og injiserer eget arvestoff. I prosessen vil vertens DNA fragmentere, og når nye bakteriofager settes sammen inni bakterien, kan en bakteriofag ved et «uhell» fylles med bakterie-DNA fremfor bakteriofag-DNA. Feil DNA vil ikke stoppe bakteriofagen fra å ellers oppføre seg som normalt, så når bakterien lyses, og bakteriofagene slipper fri, vil bakteriofagen med bakterie-DNA angripe en ny bakterie, og injisere arvestoffet sitt, og dermed fungere som en vektor. Transduksjon vil normalt være en ganske begrenset prosess,

da virus er svært spesifikke når det gjelder vertscelle, og dermed vil ikke gen overføres til en hvilken som helst art (Daubin & Szöllósi, 2016).

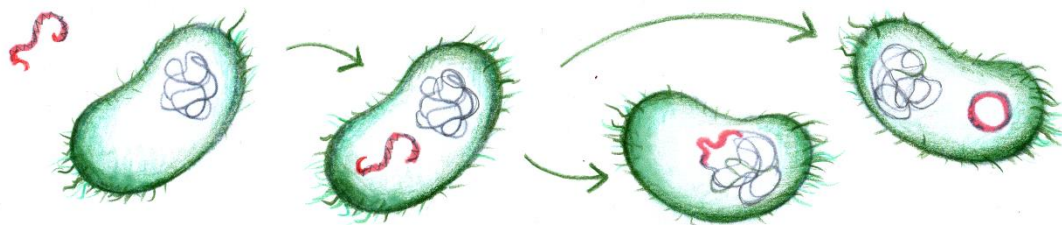
Konjugasjon:



Figur 4: Konjugasjon. Illustrasjon: Oda Mamen

Konjugasjon er en type horisontal genoverføring hvor genetisk materiale overføres fra én celle til en annen, gjennom en pilus, som vist i figur 4. To bakterier ligger inntil hverandre, og den ene strekker ut en pilus, også kjent som en sex-pilus, og haker tak i den andre bakterien og danner en konjugasjonsbro, hvor deler av kromosomet eller et plasmid kan overføres. Den nye bakterien vil få en kopi av det overførte materialet, slik at den opprinnelige bakterien også beholder den genetiske informasjonen. Den nye bakterien vil også få evnen til å danne en sex-pilus og kan dermed dele genene videre (Daubin & Szöllósi, 2016).

Transformasjon:



Figur 5: Transformasjon. Illustrasjon: Oda Mamen

Transformasjon er en prosess hvor bakterier kan ta opp løst DNA fra miljøet, og inkorporere det i eget genom. DNA-fragmentet vil enten ende opp i bakteriens kromosom, eller som et løst plasmid, som vist i figur 5 (Daubin & Szöllósi, 2016).

Beskytte celleveggen

Mange Gram-positive bakterier har utviklet resistens mot betalaktamer ved å endre strukturen og/eller antallet penicillin-bindene proteiner (PBP), som er transpeptidasene involvert i konstruksjonen av peptidoglykan i celleveggen. Ved å endre det normale antallet PBP vil det påvirke hvor stor andel av antibiotikumet som kan binde, og dermed påvirke effektiviteten til medisinen. De kan også endre strukturen på disse proteinene, slik *Staphylococcus aureus* gjør når den tilegner seg *mecA*-genet som koder for penicillin-bindende protein 2 a (PBP2a). Endret struktur på disse proteinene kan redusere bindingsevnen til betalaktamer, eller fjerne evnen fullstendig (Reygaert, 2018).

En annen viktig mekanisme for å beskytte celleveggen finnes hos ESBL-produserende bakterier. ESBL står for “extended spectrum β -lactamase”, som er enzymer bakteriene produserer for å ødelegge betalaktam-ringen i betalaktamer med utvidet spektrum, slik som tredje generasjons cefalosporiner (Brolund, 2014). Flere typer antibiotika er utviklet for å håndtere blant annet infeksjoner med ESBL-produserende bakterier. Carbapenem-antibiotika som imipenem og meropenem er hyppig brukt mot infeksjoner med multiresistente Gram-negative bakterier, inkludert ESBL-produsenter. Likevel har resistens utviklet seg, hos bakterier kjent som «carbapenem-resistant enterobacteriaceae» (CRE), som produserer carbapenemaser, den mest allsidige familien av betalaktamasene (Queenan & Bush, 2007; Thermo Scientific, 2020a).

Beskytte proteinsyntesen

Resistens mot antibiotika som angriper ribosomene, som tetracyclin og streptomycin, oppstår gjerne gjennom mutasjoner i ribosomene, metylering av ribosomale subenheter, eller «Ribosomal protection proteins» (RPP). RPP er proteiner som fjerner antibiotikumet som har bundet seg til ribosomet (Connell et al., 2003; Reygaert, 2018).

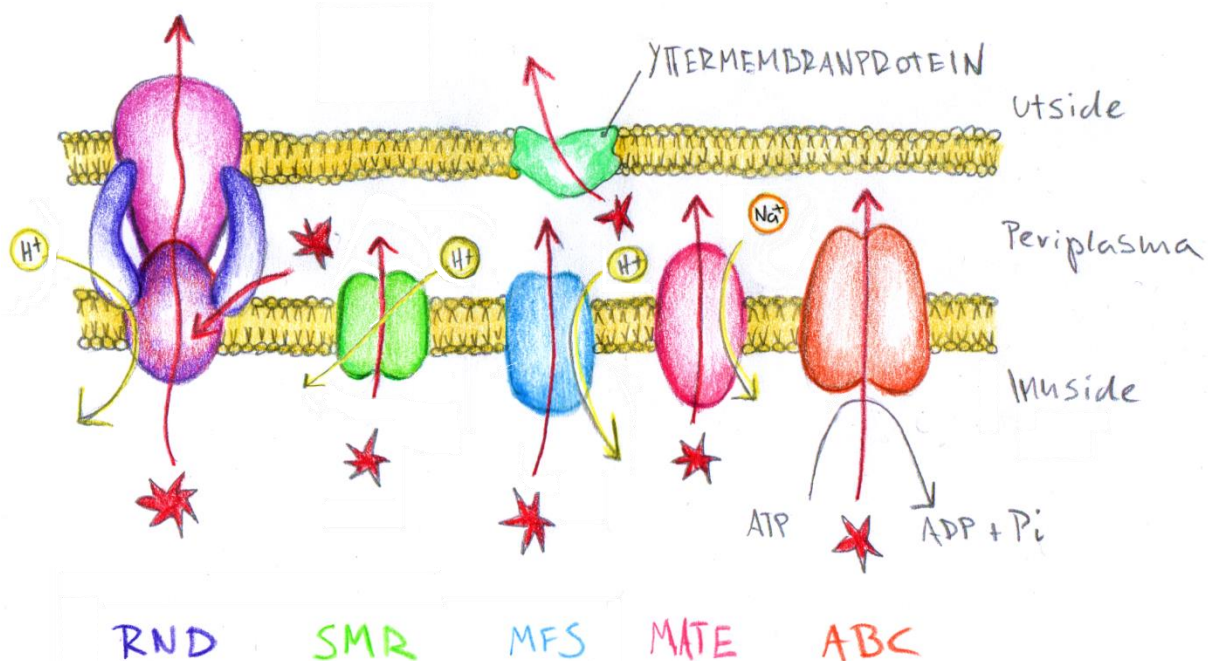
Beskytte DNA-syntesen

Fluoroquinoloner som ciprofloxacin forstyrrer DNA-syntesen, og resistens mot dette oppnås gjennom å modifisere enzymet som angripes. Mutasjoner i gyrase/topoisomerase sørger for endret struktur i enzymet, og dermed også at antibiotika ikke binder til målet sitt (Reygaert, 2018).

Beskytte RNA-syntesen

Resistens mot antibiotika som forstyrrer RNA-syntesen, som rifampin, skjer hovedsakelig gjennom kromosomale mutasjoner i *rpoB*-genet, som koder for β -subenheten i RNA-polymerase (Alifano et al., 2015).

Dette er kun noen eksempler på mekanismer bakterier har utviklet for å beskytte de forskjellige angrepspunktene. Noen egenskaper vil også kunne beskytte flere eller alle angrepspunktene, som blant annet mange av de naturlige resistensmekanismene, som vil være tilfelle med for eksempel en beskyttende yttermembran hos Gram-negative bakterier. Effluxpumper er også et godt eksempel på mekanismer som kan gi beskyttelse mot flere typer antibiotika, og andre skadelige stoffer. Disse er ofte induisert naturlig resistens, altså er det noe bakterien alltid har, men det blir ikke nødvendigvis uttrykt før det er behov for det. Ikke alle er naturlige heller, da det finnes noen Gram-positive effluxpumper som overføres via plasmider (Reygaert, 2018). Generelt finnes det fem hovedfamilier av effluxpumper, klassifisert basert på struktur og energikilde. Disse familiene er illustrert i figur 6:



Figur 6 viser den generelle strukturen til de fem hovedfamiliene av effluxpumper (Reygaert, 2018). Illustrasjon: Oda Mamen

RND står for «resistance-nodulation-division». Denne familien består av effluks-systemer som krysser både yttermembranen og innermembranen, og pumper skadelige stoffer ut av cellen via en substrat-/proton-antiport-mekanisme. RND finnes hos flere forskjellige Gram-negative bakterier, og hjelper med å pumpe ut mange forskjellige stoffer. Hos noen bakterier er pumpene ganske spesifikke for hva de klarer å pumpe ut, som for eksempel Tet-pumpene

som kvitter cellen med tetracyclin, men andre har et bredere spekter, som MexAB-OprM-pumper som gir naturlig resistens mot blant annet betalaktamer, tetracyclin, trimetoprim og enkelte fluoroquinoloner (Reygaert, 2018).

SMR står for «Small multidrug resistance». Denne familien består av hydrofobe pumper kodet fra kromosomet, transposerbare elementer, eller plasmider, og får energien sin fra proton motiv-kraft. De pumper stort sett kun lipofile kationer og har dermed ofte et snevert spekter. Enkelte av disse pumpene kan hjelpe bakterien å beskytte seg mot antibiotika, normalt betalaktamer og aminoglycosider (Reygaert, 2018).

MFS står for «major facilitator superfamily» og katalyserer transport gjennom en antiport-mekanisme med oppløst stoff /protoner, alternativt gjennom en symport-mekanisme med oppløst stoff/proton eller Na^+ (ikke vist i figur 6). Som gruppe har disse pumpene størst diversitet, men individuelt er de ofte svært spesifikke. En mindre spesifikk variant er NorA-pumpen, som kan pumpe både fluoroquinoloner og andre strukturelt ulike stoffer (Reygaert, 2018).

MATE står for «multidrug and toxic compound extrusion efflux» som utnytter en Na^+ - gradient til en antiport-mekanisme for å kvitte cellen med blant annet flere typer fluoroquinoloner. Enkelte MATE-pumper kan også fjerne aminoglycosider. Disse pumpene finnes normalt hos Gram-negative bakterier (Reygaert, 2018).

ABC står for «ATP-binding cassette», og er en familie som brukes til både opptak og effluks. Det unike med denne familien er at pumpene drives av ATP-hydrolyse. Pumpene transporterer mange forskjellige enheter, som for eksempel aminosyrer, ioner eller legemidler. Pumpene er ofte spesifikke (Reygaert, 2018).

Stoffer pumpet fra cytoplasma til periplasma kan videre tømmes helt fra cellen gjennom yttermembranen, via yttermembranproteiner (Blanco et al., 2016).

De aller fleste pumpene kodes fra faste plasser i kromosomet, men pumper kan lettere deles mellom bakterier hvis de kodes fra plasmider, som er mobile gen-elementer (Reygaert, 2018). Det er også viktig å nevne at plasmider ikke er de eneste gen-elementene som er mobile, de er en del av et større konsept, kjent som mobile gen-elementer (MGE), et begrep som benyttes om elementer som fremmer både intracellulær og intercellulær forflytting av DNA (Partridge et al., 2018). Med intercellulær forflytting menes det at DNA-segmenter finner ny plass i cellen, hvor gener «hopper» i kromosomet, plasmidene, eller mellom disse, og med

intercellulær forflytting menes det forflytting av gener mellom celler, slik som skjer via konjugasjon, samt transduksjon og transformasjon. MGE har mye av ansvaret for anskaffelse, akkumulering og spredning av resistensgener. I tillegg til plasmider finnes insersjonssekvenser (IS) og transposoner (Tn), som er mobile genelementer som kan flytte seg selv (med for eksempel resistensgener inkludert) til andre tilfeldige steder i cellens genom. Integroner (In) er MGE som flytter seg til spesifikke plasser i genomet. At et resistensgen flyttes fra et sted i cellen kan bidra til økt resistens og spredning, dersom det flyttes (eller kopieres og flyttes, som også er mulig med replikativ transposisjon) til et sted hvor genet blir transkribert i større grad, eller det flytter seg til et plasmid som blir delt med andre bakterier. Alle disse variantene av MGE finnes det normalt mer enn én kopi av, fordelt på forskjellige steder i genomet, og like eller lignende segmenter kan gjennomgå homolog rekombinasjon, hvor DNA-sekvenser byttes ut med sekvenser som er plassert på homologen (Partridge et al., 2018). Ikke alle tilfeldige endringer i DNA er positive, faktisk vil det som oftest gi ingen eller en fatal effekt (Desai & Fisher, 2007), men bakterier er mange og har kort generasjonstid, så positive uhell oppstår relativt ofte. Selv om mange av disse endringene i DNA er tilfeldige, for eksempel mutasjoner fremtvunget av DNA-skade, er det noen prosesser bakteriene har mer kontroll over. For eksempel vil en bakterie være mer mottakelig for transformasjon dersom den blir stresset av et endret miljø, som er det som skjer når det behandles med antibiotika. Dersom bakteriens alternativ er å dø, så gir det mening at cellen heller vil se etter alternative løsninger, og antibiotikakurer gir bakteriene en gyllen mulighet til å implementere endringer i DNA som kan resultere i en ny resistensmekanisme. Men utvikling av resistens er ikke utelukkende menneskeforysdyt, bakteriene har hatt nytte av dette lenge før mennesker begynte å utnytte de antimikrobielle egenskapene til antibiotika. For eksempel ble resistens mot en penicillin registrert allerede i 1940 (Ventola, 2015) og penicillin var ikke i hyppig bruk før 1943, og var ikke en gang testet på en person før 1941 (Gaynes, 2017), som betyr at penicillin-resistens faktisk ble oppdaget før penicillin ble administrert for første gang. Antibiotikaresistens er altså ikke noe nytt fenomen, som er ganske naturlig med tanke på at dette er stoffer som i bunn og grunn er utviklet av mikroorganismer for å bekjempe andre mikroorganismer i naturen. Bakterier har vært i kontakt med dette før, og har hatt behov for å beskytte seg mot disse antimikrobielle stoffene lenge før mennesker oppdaget dem. Når det er sagt, er det ikke lenger mye tvil om at overdreven bruk av antibiotika har provosert frem en kraftig økning i resistente bakterier siden det ble tatt i bruk som medisin, og antibiotikaresistens regnes i dag som en av de største truslene mot vår helse (Blair et al., 2015).

1.3 Resistente bakterier

Selv om antibiotikaresistens finnes hos mange bakteriearter, er det gjerne noen enkelte som trekkes frem som de store helsetruslene, spesielt de multiresistente artene. Disse har typisk vært forbundet med nosokomiale infeksjoner (infeksjon oppstått på sykehus), men mange har etter hvert spredt seg ut i samfunnet (van Duin & Paterson, 2016). En av de mest kjente multiresistente bakteriene er meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). *S. aureus* er en Gram-positiv bakterie som kan gi sykdom i mange former, som blant annet hudinfeksjoner, urinveisinfeksjoner, tarminfeksjoner, lungebetennelse, endokarditt, toksisk sjokk syndrom, meningitt og mastitt (Nair et al., 2014). Meticillin ble tatt i bruk i 1960, og det ble brukt svært ukritisk, blant annet ble det til tider sprayet rett ut i luften på sykehus, for å redusere smitte hos nyfødte. Dette fungerte bra i begynnelsen, men det tok ikke lang tid før resistens ble oppdaget. Meticillin produseres ikke lenger i dag, men navnet består (Newsom, 2004), og i tillegg til de fleste betalaktamer, er MRSA gjerne resistent mot flere andre typer antibiotika, blant annet tetracyclin, aminoglycosider og fluoroquinoloner (Kaur & Chate, 2015).

Vancomycin ble etter hvert det foretrukne våpenet mot alvorlige MRSA-infeksjoner, derfor skapte «vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*» (VISA) bekymring da det ble oppdaget i 1990. I 2002 ble det i USA rapportert om en «vancomycin-resistant *S. aureus*» (VRSA), så i dag er heller ikke dette en sikker redning mot infeksjoner fra *S. aureus* (McGuinness et al., 2017). Basert på alle antibiotikaene denne bakterien har klart å oppnå resistens mot, er det ganske tydelig at den er svært adaptiv. Det er verdt å legge merke til at dette er en bakterie som 20-50% av mennesker er bærere av, uten at de nødvendigvis er syke, da bakterien koloniserer både nese og svelg, samt hud, hår og sår (Granum, 2015). Dette må nødvendigvis bety at den ofte er til stede når pasienter behandles med antibiotika, selv i de tilfellene der det ikke er denne bakterien som forårsaker sykdommen. Dette bør igjen medføre at den ganske ofte vil bli presset til å utvikle resistens, i hvert fall sammenliknet med «skumlere» bakterier som ikke lever på og i oss kommensalt. *S. aureus* er heller ikke den eneste stafylokokken man trenger å bekymre seg for, da andre stafylokokker som *Staphylococcus haemolyticus* også er utbredte sykehusbakterier, godt kjent for å utvikle resistens (Barros et al., 2012).

Multiresistente *Pseudomonas* spp, regnes også som et økende problem. Disse Gram-negative bakteriene er en viktig årsak til infeksjoner på sykehus, som bakteriemi, urinveisinfeksjoner, infeksjoner i operasjonssår, og aller mest luftveisinfeksjoner. De kan også være en årsak til mastitt. Bakteriens biofilmproduksjon bidrar til økt spredning av resistens, da bakteriene er i tett kontakt i biofilmen, som gjør deling av plasmider svært lett (Gupta et al., 2016;

Swartz & Petersson-Wolfe, 2016). Den opportunistiske *Pseudomonas aeruginosa* utnytter ofte svekkede individer, for eksempel de som lider av cystisk fibrose, og mange syke pasienter på sykehus. Utbredt bruk av antibiotika på sykehus har selektert frem mange resistente stammer, noe som har redusert behandlingsalternativene kraftig. Det at bakterien trives godt i sykehusmiljøer, som i avløpsrør, respiratorer, på frisk frukt som blir servert, eller til og med på fingrene til helsearbeidere, gjør ikke situasjonen noe bedre. Det positive med denne bakterien, er at den foreløpig virker å hovedsakelig være et problem forbeholdt sykehus, og er enda ikke godt utbredt ellers i miljøet, i motsetning til bakterier som MRSA (van Duin & Paterson, 2016).

Men i likhet med MRSA, er det andre resistente bakterier som har etablert seg godt i miljøet, som ESBL-produsentene, som oftest er forbundet med *Enterobacteriaceae*-familien, hvor *Escherichia coli* er en av de aller viktigste (Brolund, 2014; van Duin & Paterson, 2016). *E.coli* er Gram-negative, normalt harmløse bakterier som er en viktig del av den normale floraen i tykktarmen hos varmblodige dyr, inkludert mennesker. Det finnes flere varianter, hvor noen av dem kan forårsake problemer som urinveisinfeksjoner eller tarminfeksjoner, eller hemolytisk-uremisk syndrom om man skulle være spesielt uheldig med bakterie-typen. Den kan dessuten forårsake mastitt (Suojala et al., 2013). *E.coli* kan også være carbapenem-resistent, selv om det foreløpig er mindre vanlig (van Duin & Paterson, 2016).

Enterokokker er en type Gram-positive bakterier som også normalt lever i tarmen, men noen kan forårsake sykdom som urinveisinfeksjoner, meningitt eller infeksiøs endokarditt. Behandling av denne typen infeksjoner har blitt utført med ampicillin, vancomycin og aminoglycosider (som streptomycin), men flere multiresistente stammer har utviklet seg og gjort behandlingen av disse infeksjonene utfordrende (Munita et al., 2012). Disse opportunistiske bakteriene har også vist seg å kunne være en årsak til mastitt (Róžańska et al., 2019).

1.4 Virulens

Selv om de fleste bakterier er harmløse, og i mange tilfeller nyttige eller til og med kritisk nødvendige, er en god del bakterier patogene, altså sykdomsfremkallende (Balloux & van Dorp, 2017). Ofte er de kun opportunistiske, og er normalt ikke et problem hos friske individer, men selv disse kan forårsake alvorlig sykdom, og det er i bunn og grunn kun sykdomsfremkallende bakterier som gjør at antibiotikaresistens er et problem. Hadde de ikke forårsaket infeksjon, hadde det ikke vært et behov for behandling, dermed er evnen til å

fremkalle sykdom et viktig tema når man diskuterer resistens. En patogen mikroorganisme er en som har evnen til å fremkalle sykdom, og man kan si at virulensen til et patogen er et mål på hvor alvorlig sykdommen kan bli. Hos resistente bakterier snakker man ofte om virulensfaktorer, altså faktorer som vil gjøre bakterien mer virulent. Eksempler på slike faktorer er mange, det er ofte faktorer som gir bakterien evnen til å spre seg, kolonisere effektivt, beskytte seg eller påføre verten skade, og mange faktorer oppnår flere av disse målene samtidig. Blant annet vil alle gener som er assosiert med en flagell kunne regnes som en virulensfaktor. Flageller er bevegelsesorganeller som hjelper bakterien å flytte seg til mer fordelaktige områder, og dermed øke overlevelsessevnen. Dette har lenge vært nok til å kalle flageller en virulensfaktor, men i senere tider har man også oppdaget at flageller spiller en rolle i flere prosesser, inkludert adhesjon, biofilmdannelse, manipulering av vertens immunsystem og sekresjon av andre virulensfaktorer (Duan et al., 2013).

Pili er små hårlignende strukturer på bakterien, som er mindre og flere enn flageller, men de har ikke fullstendig urelaterte funksjoner. Pili hos en bakterie vil kunne gi den evnen til å feste seg bedre til overflater, enten abiotiske, eller til celler hos organismen den infiserer, som gjør den vanskeligere å bli kvitt. Pili kan også hjelpe med biofilmformasjon, bevegelse og DNA-overføring (Berne et al., 2015). Både flageller og pili bidrar til biofilmformasjon, som i seg selv er en virulensfaktor.

Biofilm er en populasjon av celler som vokser samlet i en kompleks matriks på forskjellige overflater, disse er godt beskyttet og veldig vanskelig å fjerne. Bakterier i biofilm sitter godt fast der de har etablert seg, i tillegg til at matriksen som omringer dem bidrar til beskyttelse mot mange skadelige faktorer, som for eksempel antibiotika (Lewis, 2001).

Når det gjelder skade på strukturer, så er listen lang, og inkluderer nedbrytningsenzymer som proteaser og lipaser, samt endotoksiner og eksotoksiner. Endotoksiner er lipopolysakkarider (LPS)-laget, som ikke er et egentlig toksin, men er svært giftig, mens eksotoksiner er «ekte» toksiner som bakterien skiller ut (Cavaillon, 2018). Dette er kun noen eksempler på faktorer som kan skade vev, celler, organeller eller annet. Et ganske standard eksempel på en virulensfaktor som forårsaker skade vil være hemolyse, som ødelegger blodceller. Det er flere forskjellige toksiner som kan forårsake hemolyse, blant annet hemolysiner, og det finnes også forskjellige typer hemolyse. Hemolysetyperne deles gjerne inn i tre grupper, alfa-hemolyse, beta-hemolyse og gamma-hemolyse, men sistnevnte er noe misvisende da dette er navnet på fravær av hemolyse på blodskål (Buxton, 2005). Alfa-hemolyse og beta-hemolyse synes godt når bakterien dyrkes på næringsmedium med blod. Som illustrert i figur 7 nedenfor, vil

alfahemolytiske kulturer vokse frem med en grønn sone i blodet rundt seg, mens betahemolytiske kulturer vil få en klar, gul sone, og gamma-«hemolysen» gir ingen slike soner.



Figur 7 illustrerer forskjellen på alfa-, beta- og gamma-hemolyse

Den grønne fargen oppstår fordi bakterien produserer hydrogenperoksid, eller et toksin med samme effekt, som oksiderer hemoglobin til methemoglobin (Barnard & Stinson, 1996). Den gule sonen i betahemolyse oppstår som følge av en fullstendig hemolyse av blodcellene. Selv om «gamma-hemolyse» benyttes til å betegne fravær av hemolyse på blodskål, så finnes det noe som heter «gamma-hemolysin», som er et toksin *S. aureus* produserer for å angripe vertens leukocytter, men dette vil ikke gi noen karakteristisk hemolysesone på en blodskål (Spaan et al., 2014). Det finnes også et pore-dannende toksin som heter delta-hemolysin, som induserer frigjøringen av tryptase og laktat dehydrogenase fra mastceller som i forhøyede konsentrasjoner kan forårsake vevsskade. Toksinene har i tillegg evnen til å angripe en rekke immunceller, som monocytter eller makrofager, som vil hjelpe bakterien å unngå vertens immunsystem (Hodille et al., 2016). Slike toksiner kan skilles ut fra spesialiserte sekresjonssystemer, som i seg selv kan regnes som en virulensfaktor (Thomas et al., 2014).

Sekresjonssystemer er en viktig del i mange prosesser en bakterie gjennomfører under en infeksjon, mye fordi de skiller ut toksiner, enten til miljøet rundt seg, eller direkte inn i cellene til organismen den har infisert, men sekresjonssystemene bidrar med mer enn å utskille toksiner. Andre sekreerte proteiner kan for eksempel fremme adhesjon til eukaryote celler,

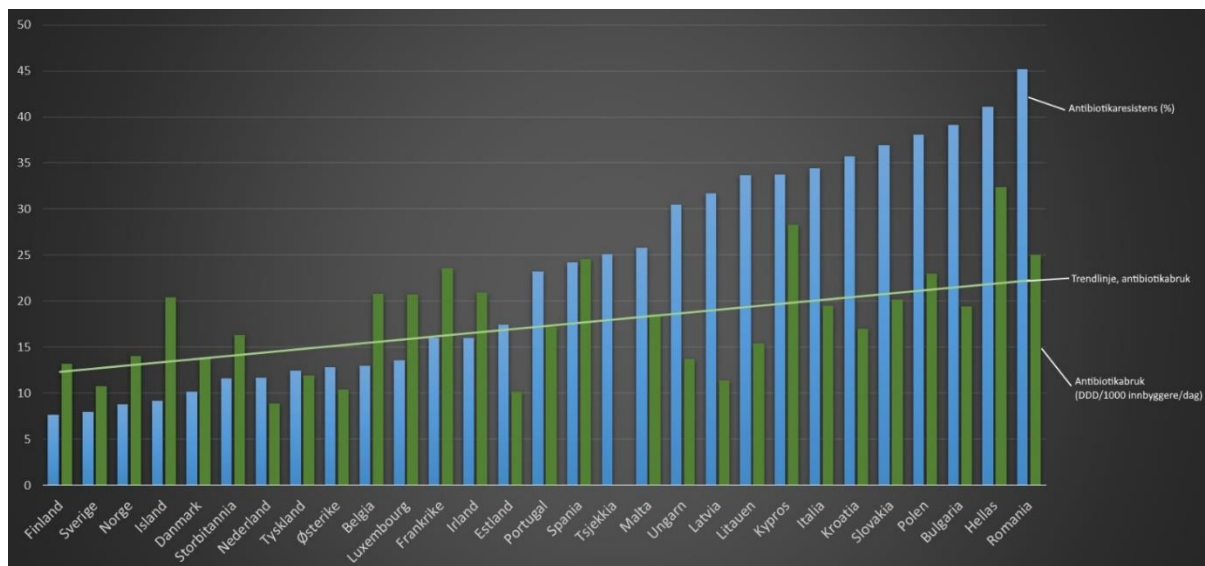
eller hjelpe bakterien å få tilgang på ressurser i spesielle nisjer, for eksempel ved å bryte ned store molekyler til mindre molekyler som bakteriecellen kan ta opp (Green & Mecsas, 2016).

Disse faktorene og flere er å finne i mange forskjellige bakterier, som for eksempel de tidligere nevnte multiresistente bakteriene, og kombinasjonen av multiresistens og høy virulens i en bakterie kan få fatale konsekvenser ved en infeksjon.

1.5 Antibiotika-forbruk og spredning av resistens

Utviklingen og spredningen av antibiotikaresistens er i dag et godt kjent problem, som det ikke er mulig å unngå. Bakterier utvikler seg og evolusjon eksisterer, akkurat det er det ingen som kommer seg rundt. Likevel kan man se en tydelig korrelasjon mellom forekomsten av resistens og antibiotika-forbruk i forskjellige land, så hvordan utvikling og spredning arter seg vil være avhengig av hvor stort forbruket er (Merlin, 2020).

Figur 8 viser antibiotikaresistens sammenlignet med antibiotika-bruk for landene i Europa. Alle dataene er hentet fra European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) (ECDC, 2018b; ECDC, 2018c) og satt sammen for å illustrere sammenhengen mellom forbruk og resistens. Dette er ikke et fullstendig bilde, da ikke all informasjon var tilgjengelig, og ikke alt av data var mulig å sammenstille, men det viser en trend. ECDC har oppgitt forbrukstall i definerte døgndoser (DDD) per 1000 innbygger, mens resistenstallene er basert på andel resistente prøver per type bakterie og antibiotika. I figur 8 vises gjennomsnittlig resistensprosent per land, på tvers av bakteriearter og type antibiotika. Det totale forbruket er i virkeligheten noe høyere for alle land, da tallene til ECDC er fra «outpatient treatment centers», altså allmennleger og i noen grad lokale klinikker, og ikke fra sykehus. Disse tallene eksisterer, men var ikke like lett å sammenstille, dessuten ser det ut til at DDD per 1000 innbygger er ganske likt fra land til land, og vil ikke påvirke trenden som vises i figur 8: land med høyere antibiotika-forbruk har høyere andel resistente bakterier.



Figur 8 viser antibiotikaresistens og antibiotika-bruk per land i Europa (2018). Tsjekkia rapporterte ikke forbruket i 2018.
Graf: Oda Mamen

For datasettet som helhet er korrelasjonen mellom bruk og resistensprosent for 2018 = 0,438. Basert på tilsvarende tall fra tidligere år er det for 2016 = 0,373 og for 2017 = 0,449. Siden det er mange faktorer som påvirke dette (antall prøver som er testet, hvilke bakterier som ble testet det aktuelle året per land o.l.) er det forventet at korrelasjonen svinger noe. Korrelasjonskoeffisientene indikerer likevel en sammenheng mellom antibiotika-bruk og resistens.

Det finnes ingen datasett som gjør det mulig å sammenstille dette direkte med USA, fordi det ikke finnes åpne datasett som inneholder definerte døgndoser. Datasettene som er tilgjengelige viser antall resepter per 1000 innbyggere per år, men sier ingenting om hvor store doser / lange antibiotikakurer som utskrives per resept. Det som likevel er tydelig er at USA utskriver mye antibiotika, på landsbasis er gjennomsnittet 820 antibiotika-resepter per 1000 innbyggere per år (CDC, 2020a), altså er det i gjennomsnitt under to av ti amerikanere som ikke får antibiotika hvert år. Syv stater skrev ut mer enn 1000 resepter per 1000 innbygger, som betyr at samtlige innbyggere i staten i gjennomsnitt fikk én antibiotika-resept i 2017 (CDC, 2017). Dataene tar ikke hensyn til at den samme pasienten kan få mange antibiotika-resepter etter hverandre, men indikerer likevel et høyt antibiotika-forbruk. Alle dataene er «outpatient treatment», altså allmennleger og klinikker, sånn som EU-dataene. Det inkluderer klinikker tilknyttet sykehus, men ikke antibiotika-bruk for pasienter innlagt til behandling på sykehuset. Totalt ble det utskrevet 268 millioner antibiotika-resepter i 2017, og Centers for Disease Control (CDC) estimerer at minst 30 % er helt unødvendige. Hvis man

inkluderer feil medisinbruk, inkludert feil antibiotikavalg, feildosering eller feil lengde på antibiotikakuren øker tallet «feil-resept» til 50 %. Blant reseptene som var unødvendige er resepter mot sykdommer hvor antibiotika ikke har noen effekt (som resepter skrevet ut for «the common cold», forkjølelse som er forårsaket av virus) eller hvor antibiotika er unødvendig (plager vi i Norge ikke ville gitt antibiotika mot, som milde ørebetennelser som går over av seg selv ganske fort) (CDC, 2020b).

Basert på data fra CDC National Antimicrobial Resistance Monitoring System (CDC NARMS) har USA resistensrater tilsvarende toppsjiktet i Europa, mellom 41 og 44 % resistens i gjennomsnitt (på tvers av bakteriearter og type antibiotika). Datasettet viser resistens i prøver tatt fra mennesker som en del av USAs nasjonale antibiotikaresistens-screening (CDC NARMS, 2020).

Det er altså liten tvil om at det skrives ut svært mye antibiotika, men nå er det også slik at antibiotika-forbruk ikke kun er forbeholdt mennesker. I mange år har antibiotika blitt benyttet for å behandle eller forebygge sykdom hos dyr. Mange steder har det lenge vært vanlig å tilsette antibiotika i fôret til dyrene, for å unngå sykdom og dermed økonomiske tap. Det har vist seg at dette øker forekomsten av antibiotikaresistente bakterier, og at denne resistensen kan overføres til mennesker som er i kontakt med eller konsumerer disse dyrene. Dyrene kan også ha avføring kontaminert med resistente bakterier, som vil bidra til å spre resistente bakterier i naturen, gjennom jord, planter, vann, og alt dyrenes avføring kan komme i kontakt med (Reygaert, 2018).

Dette er bekymringsverdig da det i 2016 ble klart at 80 % av all antibiotika i verden ble brukt i dyrefôr: kun 20% av antibiotika-forbruket i verden gikk med til faktisk syke mennesker og dyr, mens resten brukes i dyrefôr. I 2016 ble det klart at det i Kina brukes hele 15400 tonn med antibiotika hvert eneste år, og 8190 tonn i USA (Olsvik, 2016). I Norge ble det brukt 50,5 tonn antibiotika til mennesker, 5,9 tonn til husdyr og 0,2 tonn til fiskeoppdrett i 2016 (Folkehelseinstituttet, 2017). I 1998 forbød EU bruk av antibiotika hos dyr som ikke var syke, for å bremse den ekstreme resistensutviklingen dette medfører. Likevel ble det fortsatt benyttet mye antibiotika i Europa. Tyskland, for eksempel, benyttet 150 mg pr kilo produsert dyrekjøtt, mens Italia benyttet over 300 mg. Norge derimot lå mye bedre an, med ca. 3,5 mg per kilo produsert kjøtt av gris og kveg (Olsvik, 2016).

Konsekvensene av å ikke redusere forbruket av antibiotika kan være fatale, når alvorlige bakterielle infeksjoner ikke kan behandles. Dette gjelder ikke nødvendigvis kun bakterielle

infeksjoner heller: Italia er som vist i figur 8 høyt opp på listen over både forekomst av resistente bakterier, og antibiotika-forbruk, og er per i dag (03.04.2020) hardest rammet av Coronaviruset som oppstod i Wuhan i desember 2019. USA har tatt igjen Italia ved antall smittetilfeller, men Italia har til nå den aller høyeste dødeligheten, langt høyere enn andre land, inkludert opprinnelseslandet Kina. Det har blitt diskutert om den høye dødeligheten kan skyldes resistente bakterier, og at det ikke faktisk er viruset som hovedsakelig dreper, men sekundære infeksjoner av resistente patogene bakterier som får fotfeste grunnet pasientenes svekkede immunforsvar (Fjeld, 2020). Fra før er det allerede blitt rapportert av CDC i 2019 at mer enn 2,8 millioner antibiotikaresistente infeksjoner oppstår i USA hvert år, og at mer enn 35000 mennesker dør som følge av dette (CDC, 2019). I 2018 rapporterte ECDC at det i Europa dør 33000 mennesker av antibiotikaresistente infeksjoner (ECDC, 2018a).

Problemene med overdreven bruk av antibiotika stopper heller ikke ved forbrukeren, da resistensen kan spre seg videre. Den vil først og fremst spre seg i pasienten, der gener kan deles mellom forskjellige bakterier i det samme samfunnet. Disse bakteriene vil hos dyr gjerne slippes løs rett ut i naturen, mens fra mennesker reiser de gjennom avløpsrenseanlegg før de havner i resipienten, som en elv eller direkte i havet og kan spres videre derfra. Man kan kanskje tenke at dette er et mindre problem hos mennesker, på grunn av renseanleggene, men avløpsrenseanleggene fokuserer på fjerning av fosfor og nitrogen, og ikke av bakterier. Faktisk er det ingen prosesser i renseanlegget som er designet for å drepe bakterier, og forekomsten av antibiotikaresistente bakterier er høyere i utløpsvannet fra renseanlegg enn i overflatevannet fra andre kilder (Bouki et al., 2013; Rizzo et al., 2013), fordi ingen tiltak er iverksatt for å fjerne dem. For å bekrefte at dette er vanlig praksis også i Norge, ble prosessingeniørene innenfor vann og avløp Joakim Faxå og Kristian Enevold Henriksen fra EnviDan AS kontaktet. EnviDan leverer blant annet ingeniørtjenester med fokus på bærekraftige vann- og avløpsløsninger, og Faxå og Henriksen har bekreftet at det i Norge i dag normalt ikke gjøres noe for å redusere mengden bakterier som følger avløpsvannet ut i resipienten. Noen unntak kan være bakteriologisk følsomme resipienter, som for eksempel lakseoppdrettsområder, hvor det kan være aktuelt å for eksempel benytte UV-stråling, men ellers er dette ikke i fokus i norske renseanlegg. Vann vil fungere som en effektiv spreder av alt som lever i det, fordi det bærer dem med seg hvor enn det ender opp. Bakteriene vil dermed kunne spre seg til flere områder, og bli påført eller tatt opp i flere organismer, både planter og dyr, og dyr som spiser planter, og dyr som spiser dyr. Spredningsnettverket vil kunne bli svært komplekst.

I tillegg til at avløpsvann naturlig inneholder mange bakterier, tilsettes det også nitrifiserende bakterier for å fjerne nitrogen fra avløpsvannet (Wagner et al., 1996), og disse kan også utvikle resistens, for eksempel ved å dele gener med de bakteriene som finnes naturlig i dette vannet. Undersøkelser har bekreftet at det finnes klinisk relevante resistens-gener i plasmidene hos bakterier fra renseanlegg, som gir redusert sensitivitet mot mange forskjellige typer antibiotika, som blant annet aminoglycosider, betalaktamer, fluoroquinoloner, rifampiner og tetrasykliner, og i tillegg er det funnet flere gener for efflukspumper som kan gi resistens (Szczepanowski et al., 2009). De mobile elementene kan altså ganske lett bidra til spredning av resistens i avløpsvann, men det er i tillegg viktig å tenke over at slammet som står igjen etter at vannet er sluppet ut i resipienten, også vil være fullt av bakterier. Disse kan bre seg videre i miljøet ved menneskelig hjelp, da slammet i mange tilfeller brukes som gjødsel i jordbruket (Nedland, 2008), hvor bakteriene derfra kan spre seg til planter, dyr og mennesker, og resistensen kan spres med dem. Heldigvis gjøres det hygieniske tiltak på slammet før det kan benyttes som gjødsel. Gjødselvareforskriften sier at slam som skal benyttes på jord-arealer skal hygieniseres: slammet utsettes for høy temperatur, og eventuelt høy pH for å uskadeliggjøre bakterier, virus og parasittegg (Nedland, 2008), så mange av mikroorganismene som lever her vil dø før de spres til jordbruket. Det er også klart at mange bakterier som mennesker og dyr inntar med maten vil elimineres så snart de treffer alle systemene kroppen har utviklet for å drepe fremmede organismer, som for eksempel magesyren. Men mange patogener, som blant annet noen *E.coli*, har utviklet mekanismer for å overleve magesyren, slik at de kan nå tarmen og der forårsake sykdom (Smith, 2003). Altså kan det være resistente bakterier som overlever gjennom hele fordøyelsessystemet, og spres videre med ekskresjonen, og gjerne da etter de har delt genene sine med andre bakterier i kroppen, som også vil fortsette å dele gener og skilles ut og spres videre. Bakteriene trenger heller ikke å være patogener for å være et problem, kommensale bakterier kan dele gener like lett som patogener bakterier, og tarmen er et perfekt miljø for horisontal genoverføring (Huddleston, 2014). Selv gener fra ufarlige bakterier kan altså risikere å havne hos en patogen bakterie. Det er også viktig å huske på at bakterier kan ta opp løse gener, så selv om det resistente patogenet ikke selv overlever, er det fortsatt mulig at genene deres kan brukes videre.

1.6 Tiltak mot antibiotikaresistens

Selv om utviklingen av resistens i Norge ikke er like ekstrem som i mange andre land, er det fortsatt viktig å bidra til å begrense spredningen. Regjeringen publiserte «Nasjonal strategi mot antibiotikaresistens» i 2015, hvor hovedmålene for Norge var å redusere antibiotikaforbruket, bruke det riktig, øke kunnskap om utvikling og spredning av resistens, og å «være en pådriver i internasjonalt, normativt arbeid for å styrke tilgang, ansvarlig bruk og utvikling av nye antibiotika, vaksiner og bedre diagnostiske hjelpemidler» (Folkehelseinstituttet, 2017).

Å redusere spredningen av resistente bakterier i miljøet kan være et viktig steg i riktig retning for å bremse utviklingen av resistens. Det kunne blant annet ha hjulpet å for eksempel endre rutine i renseanlegg, da disse i dag fungerer som inkubatorer og effektive spredere av resistente bakterier. Det måles ikke rutinemessig nivåer av hverken antibiotika, antibiotikaresistente bakterier eller resistensgener i vannsektoren i dag (Omsted, 2019). Avløpsrensing i dag fjerner som nevnt kun nitrogen og fosfor for å unngå eutrofiering i resipienten, men det gjøres ingen tiltak mot bakterier, annet enn på slammet, hvor det utføres tiltak for å drepe så mye som mulig av mikroorganismene som lever der før det benyttes som gjødsel (Nedland, 2008). Prosessen med selve vannet kan innebære en filtrering, men filtrerer da kun slam og fragmenter, ingenting på størrelse med en bakterie. I vannverk, derimot, krever drikkevannsforskriften sterilisering av drikkevannet, så om tilsvarende tiltak kunne utføres på avløpsrenseanlegg ville dette trolig hjulpet på spredningen.

Om man bruker mindre antibiotika, er det uansett mindre resistens som kan spres, så det å redusere forbruket regnes likevel som det viktigste tiltaket for å unngå å legge selektivt press på bakterier. Spesielt resepter fra allmennleger bør reduseres, da det er disse som må skrive ut mest antibiotika, både i USA og Europa (CDC, 2020b; ECDC, 2018b). Incentivene for dette er ofte økonomiske. I mange land får legene betalt per pasient, som gjør det lettere for en lege å skrive ut unødvendige resepter for å spare tid ved å ikke diskutere med pasienten, og for å unngå at pasientene skal bytte til en lege som er villig til å skrive ut det de ønsker (WHO, 2011). Det er klart det ikke vil være lett å snu helt om på hvordan et helt helsevesen er bygget opp, men det er et problem som bør anerkjennes. Kanskje venterommene på legekontorer hadde vært et nyttig sted å spre informasjon om resistens, da dette er et sted man uansett gjerne venter lenge, uten mye annet å ta seg til. Med tilgang på klar og tydelig informasjon om hvorfor legen ofte vil velge å ikke skrive ut antibiotika, kan det kanskje redusere diskusjonstiden hos legen. Det er ikke godt å si hvor god effekt det ville hatt, men det er et tiltak som er raskt, enkelt og ganske billig å gjennomføre. Det er uansett et bra tiltak å spre

informasjon der man kan, slik at flere er klar over hvor alvorlig situasjonen faktisk er, og hva man selv kan gjøre for å bidra, som å bruke medisinene man får utskrevet riktig. Mange velger å selv bestemme når og hvor lenge de skal ta medisinen de har fått, på tross av hva legen har sagt, og noen velger å dele rest-medisin med andre. Nesten 90 % av menneskelig antibiotika-forbruk skjer utenfor sykehus (Folkehelseinstituttet, 2017), så det er svært viktig at disse pasientene er klar over hvilket ansvar de har.

Der man er nødt til å skrive ut antibiotika vil det også hjelpe å bruke smalspektret antibiotika fremfor bredspektret, der det er mulig, da resistens vil bli et mindre problem dersom det er mulig å være mer målrettet mot bakteriene som forårsaksårsaker infeksjonene, fremfor å forsøke å utrydde alt som finnes av prokaryoter. Det er dessuten bedre for individets helse om mest mulig av de kommensale bakteriene overlever (Helsedirektoratet, 2018). Det er også viktig å påpeke at når det sies at antibiotika-forbruket skal ned, så gjelder ikke dette kun hos mennesker, men også hos dyr. Som tidligere beskrevet, ligger en stor del av byrden på antibiotika-forbruk hos dyr. Dette er ikke et like stort problem i Norge som i flere andre land, men det nå er det en gang slik at mennesker kan spre resistens, og i en globalisert verden vil resistens kunne spres på tvers av landegrenser, så det er viktig at alle land er med på reduksjonstiltakene.

Forsvarlig håndtering av antibiotika-avfall og produkter med antibiotika-rester er også kritisk, både hos bedrifter og privatpersoner. Det kan gjelde for eksempel medisiner med utløpt holdbarhet, medier benyttet på lab som er tilsatt antibiotika, eller melk fra kyr som har blitt behandlet med antibiotika, hvor rester av medisinen fortsatt er å finne i melken. Dersom slikt avfall destrueres fremfor å deponeres, vil man forhindre spredning av resistens til naturen. Man må også ta forhåndsregler når man jobber med resistente, eller potensielt resistente bakterier, som har blitt gjort i denne oppgaven. Alt arbeid med potensielt resistente bakterier ble utført på en patogen-lab som er spesielt designet for å forhindre spredning av mikroorganismer ut av laben.

I tillegg til å begrense bruken av antibiotika, er det viktig å prøve å begrense behovet for det. Det kan for eksempel oppnås ved å utforske alternative behandlingsmetoder, som kan redusere behovet for antibiotika, som for eksempel fagterapi, hvor bakteriofager benyttes til å eliminere bakterien (Romero-Calle et al., 2019). Det er lite sannsynlig at vi noen gang finner en faktisk «magic bullet», slik man først trodde antibiotika var, som kan ta knekken på alt og er den store redningen på alle infeksjoner, men jo flere alternativer det er tilgjengelig, jo mindre antibiotika trengs det. Uansett om man kan finne gode alternativer til antibiotika eller

ikke, er det alltid et behov for å redusere smittespredning gjennom gode smittevernsrutiner på sykehus, samt gode smittevernsrutiner i befolkningen generelt, da mindre sykdom vil medføre lavere behov for antibiotika. Vaksinasjoner er et viktig ledd i å forhindre smitte, det trenger ikke heller å være vaksiner mot bakterielle infeksjoner. Selv vaksiner mot virus vil være effektivt, da mange pådrar seg bakterielle infeksjoner etter at de har blitt smittet av et virus, som følge av et stresset immunsystem (Smith & Huber, 2018). Dessuten vil færre virus-smittede mennesker bety færre pasienter på sykehus, som også er bra for begrensning av smittespredning, og færre mennesker vil få resept på antibiotika mot virusinfeksjoner fordi de feildiagnostiseres. Dette gjelder ikke kun mennesker, men også dyr: i 2015 ble det fastslått at antibiotika-forbruket i norsk lakseoppdrett har blitt redusert fra 775 mg pr kilo laks i 1987 til kun 0,18 mg pr kilo, ved hjelp av gode oppdrettsvilkår og vaksiner, som er en veldig god utvikling (Olsvik, 2016).

Selv om Norge allerede har redusert antibiotika-bruken jobbes det fortsatt aktivt med å redusere bruken ytterligere. Dette er blant annet et ledd i prosjektet JurFrisk. Kyr kan som andre dyr og mennesker få infeksjoner. Det man ofte er bekymret for hos kyr er mastitt, en infeksjon i juret som kan være svært smertefullt for dyret og som dessuten vil påvirke melkeproduksjonen (Falentin et al., 2016; NMBU, 2020). Juret har den siste tiden vist seg å ha sin egen mikrobiotika, som kan ha en viktig rolle i infeksjoner, på samme måte som tarmfloraen hos mennesker og dyr (NMBU, 2020), selv om dette temaet er noe som fortsatt krever ytterligere forskning (Taponen et al., 2019). Antibiotikakurer vil kunne forstyrre den normale floraen i tarmen, og kan medføre uheldig dysbiotisk tarmflora som kan igjen medføre andre sykdommer (Zhang & Chen, 2019). Det gir mening at dette er tilsvarende med mastitt-behandling også: antibiotika kurerer mastitt, men det omorganiserer også sammensetningen av jur-floraen, som kan forårsake nye problemer i juret eller andre deler av kroppen. Et større problem vil være om de sykdomsfremkallende bakteriene er resistente, ikke bare vil floraen forstyrres, men man vil i tillegg ha problemer med å få sykdommen under kontroll. Både for kuens helse, og for den totale reduksjonen av antibiotika-bruk, søker JurFrisk å undersøke og sammenlikne jur-mikrobiotaen hos friske og syke kyr (NMBU, 2020).

Denne oppgaven er utført i samarbeid med JurFrisk, hvor tradisjonelle dyrkningsmetoder og moderne molekylærbiologiske metoder benyttes for å bidra til å kartlegge forekomsten av antibiotikaresistente bakterier i melken hos kyr som ikke har fått antibiotika.

1.7 Metodeteori

Nedenfor følger beskrivelser og utfyllende forklaringer av teorien bak de forskjellige metodene som er benyttet i denne oppgaven. Beskrivelse av fremgangsmåter, utstyr, volum og så videre, samt informasjon om produsenter er inkludert i seksjon 2 «Materialer og metoder».

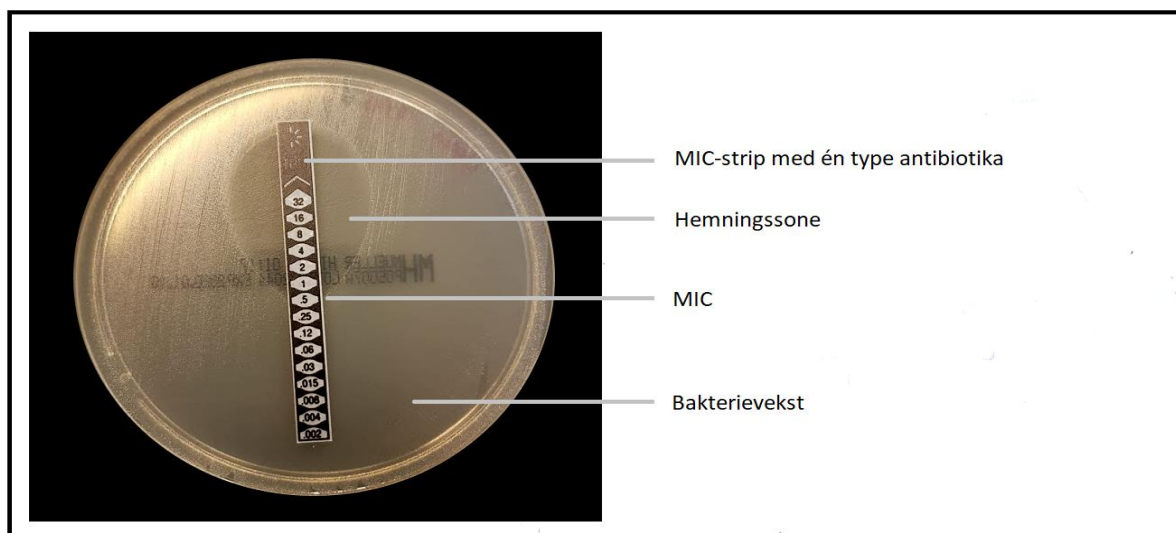
Dyrkningsbaserte metoder

Tradisjonelle dyrkningsmetoder har lenge vært gullstandarden for identifisering og antimikrobiell sensitivitetstesting av bakterier, og er fortsatt en viktig del i disse prosessene, selv med så mange moderne metoder som har dukket opp (Laupland & Valiquette, 2013). Et vanlig sted å starte er med et generelt rikt medium, som ikke er designet for å hemme vekst hos noen bakterier, som for eksempel skåler med blodagar, som vil tillate vekst hos flest mulige bakterier i en prøve. Blodagar vil også vise hemolyse hos bakterier, som er viktig informasjon når det gjelder sykdom og virulens. Første steg i å finne resistens hos bakterier er gjerne dyrking på et medie med tilsatt antibiotika for å se om de kan vokse i et slikt miljø. Dette er en veldig enkel metode, som gir ganske raske resultater og er relativt billig. Når man henter prøver rett fra miljøet, for eksempel fra melk, som blir gjort i denne oppgaven, kan prøvene påføres direkte på antibiotikaskål for å se hva som vokser der. Men det vil ikke si noe om hemolyse, og det er aldri negativt å ha en kontroll som bekrefter at bakteriene er levedyktige når antibiotika ikke er introdusert, så det er ofte ønskelig å benytte blodskåler i tillegg til antibiotikaskåler. Når bakterier er isolert fra miljøprøver, er det normalt ønskelig å ta vare på disse bakteriene over tid, og dette oppnår man ved å lage og fryse glyserolstocks, som er en blanding av bakteriekultur og glyserol, som beskytter bakteriene ved frysning. Det er spesielt nyttig å bruke blodskåler til å vekke isolater fra glyserolstocks da man med disse kan påvise hemolyse i tillegg til at man bekrefter levedyktighet. Selv om bakterier vokser på antibiotikaskåler så betyr ikke nødvendigvis dette at de er resistente mot stoffet i mediet. De kan for eksempel ha dannet en beskyttende biofilm (Sharma et al., 2019), eller ha vokst i miljørester, som for eksempel blod eller melk, som kan gjøre at de overlever en liten stund, fordi de ikke kommer i direkte kontakt med antibiotika. Alternativt kan det også være mulig at noen bakterier overlever på en overflate av døde bakterier, fordi det ble påført for store mengder bakteriekultur på antibiotikamediet. Slikt kan løses ved å overføre en liten del av kulturen til en ny skål, hvor det påføres svært tynt for å unngå at bakterier beskyttes av andre døde bakterier rundt seg, eller av miljørester. Samtidig er det heller ikke slik at en bakterie ikke er resistent mot antibiotika dersom det ikke er vekst, det kan være den vokser tregt, og

selv hvis den ikke vokser i det hele tatt, kan den godt være resistent, bare ikke mot det som var tilsatt det spesifikke mediet.

MIC-testing

MIC står for «Minimum inhibitory concentration», altså den laveste konsentrasjonen som skal til for å hemme vekst av en mikroorganisme (Andrews, 2001). MIC-verdien kan altså si noe om hvor resistent en bakteriestamme er, og det kan si noe om den vil overleve det som regnes som en trygg terapeutisk dose på mennesker eller dyr. Å benytte antibiotikamedier vil fortelle at en bakterie har en eller annen form for resistensmekanisme, men det sier ikke så mye om hvor resistent den er. Det finnes flere forskjellige måter man kan utføre en MIC-test, men en enkel og vanlig variant er MIC-strips. Metoden går ut på å plukke resistente bakterier fra en antibiotikaskål og overføre til og inkubere dem i et generelt medium som ikke er tilsatt antibiotika eller noe annet som er designet for å selektere for enkelte bakterier. Bakteriene løses i en væske, som er tilsatt salt for å unngå osmotiske problemer, som også er romtemperert for å ikke gi dem kuldesjokk når de kommer rett fra varmeskap. Når en passende mengde bakteriekultur er blandet ut i løsningen, smøres en del av dette jevnt utover en ny skål med et generelt medium uten antibiotika, og ønsket MIC-strips plasseres på skålen. Det er en konsentrasjonsgradient av antibiotika langs stripsen, hvor konsentrasjonene er markert tydelig. Når skålene dyrkes frem i varmeskap, vil bakteriene dekke skålen med vekst der konsentrasjonen er lav nok til at de klarer å vokse, men det vil oppstå en klar sone rundt stripsen der konsentrasjonen er så høy at den hemmer vekst. Der denne sonen stopper leses verdien på stripsen av, som vist i figur 9.



Figur 9 viser hvordan MIC-strips ser ut og leses av. Foto: Oda Mamen

I noen tilfeller vil man få et ganske tydelig inntrykk av hvor resistent eller sensitiv stammen er, om skålen for eksempel er fullstendig dekket av vekst eller veksten er fullstendig hemmet. Men normalt sier ikke resultatene så mye før man undersøker verdiene hos European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Her er det to verdier man ønsker å undersøke: «The epidemiological cut-off value» (ECOFF) og «clinical breakpoint». ECOFF skiller bakterier uten ervervet resistens (villtype) fra bakterier med ervervet resistens mot antibiotika-typen man tester med (EUCAST, 2020). Clinical breakpoint sier om stammen er klinisk resistent eller ikke. Klinisk resistens sier noe om hvor sannsynlig det er at behandling med antibiotika vil mislykkes (MacGowan, 2008). ECOFF er mest interessant for å studere utviklingen og spredningen av resistens, mens clinical breakpoint er mer interessant for behandling.

MIC er også nyttig for å bekrefte om et gen funnet med PCR eller sekvensering (som omtales senere) faktisk er aktivt.

Ekstrahering av DNA

For å utføre tester på DNA må det først hentes ut av bakteriene og renses. Ekstrahering av DNA, samt RNA og proteiner, er en hjørnestein i molekylærbiologien og er et kritisk steg i mange prosesser, som PCR og sekvensering. Dette var tidligere svært tidkrevende og upraktisk, men i dag finnes det mange forskjellige raske og enkle metoder man kan benytte, som løsningsbaserte eller kolonnebaserte protokoller. Hvilken metode man ønsker å benytte kan variere. For eksempel er det en stor forskjell på Gram-positive og Gram-negative bakterier, da Gram-positive har en tykkere cellevegg som kan være vanskelig å lysere for å tilgang til DNA, så man må ofte bruke kraftige metoder. Disse kan være for kraftige for de Gram-negative, det kan derfor være lurt å Gram-farge prøvene før man velger metode, om man ikke allerede vet hvilken bakterie man jobber med. Metoder med mekanisk lysing av cellene kan også være røft på DNA, så hvis man ønsker lange DNA-fragmenter kan man kanskje heller velge en metode med kjemisk lysing for mer intakt DNA.

Kvantifisering av DNA

Når DNA er ekstrahert må konsentrasjonen måles for å se om ekstraheringen var vellykket. Det er gjerne to forskjellige metoder man ønsker å benytte, NanoDrop, og Qubit. NanoDrop brukes hovedsakelig for å måle renheten av prøven. NanoDrop måler absorbansen til molekylene i prøven ved en gitt bølgelengde. DNA (ssDNA og dsDNA) og RNA absorberer UV-lys ved 260 nm, mens proteiner absorberer UV-lys ved 280 nm. Ved måling med

NanoDrop vil man få ut to viktige verdier for renhet, 260/280-ratioen og 260/230-ratioen, som er et sekundært mål på renhet. En 260/280-ratio på ca. 1,8 regnes for å være rent når man måler DNA. Hvis den er mye lavere kan det indikere tilstedeværelsen av noe som absorberer 280 nm godt, som for eksempel proteiner eller fenoler. En 260/230-ratio på 2,0-2,2 regnes som rent, og mye lavere verdier kan bety at det er andre kontaminanter til stede (Thermo Scientific, 2020b). NanoDrop måler også konsentrasjon, men dette er ikke svært nøyaktig, og brukes derfor mest for å måle renhet. Man kan velge å benytte denne konsentrasjonen som en pekepinn på om man har for mye eller for lite DNA til å for eksempel kjøre PCR, men det brukes hovedsakelig for å undersøke renhet. Dersom nøyaktige konsentrasjoner er nødvendig, benyttes et Qubit fluorometer, som kvantifiserer DNA (eller proteiner, eller RNA) ved hjelp av fluoriserende fargestoffer som binder til molekylene som måles (Invitrogen, 2010).

PCR

PCR står for “Polymerase Chain Reaction”, og ble oppfunnet, slik det er kjent i dag, av Kary Mullis i 1985 (Hollister et al., 2015), men den første beskrivelsen av prinsippet var det nordmannen Kjell Kleppe som produserte i 1971 (Kaunitz, 2015). PCR utnytter den biologiske DNA-replikasjonsprosessen for å produsere mengder av kopier av et ønsket gen. Hvilket gen som kopieres avhenger av hvilke primere man bruker. PCR krever templat-DNA, primere, nukleotider og DNA-polymerase. Polymerasen som benyttes er en *Taq*-polymerase, et varmestabilt enzym isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*, denne vil tåle de høye temperaturene som er nødvendig i en PCR (Garibyan & Avashia, 2013; Hollister et al., 2015). De nøyaktige temperaturene vil variere fra PCR til PCR, men generelt består hver PCR av tre steg: Denaturering, Annealing og Ekstensjon. Denaturering skjer når temperaturen øker, som får DNA-heliksen til å denaturere, slik at de tilsatte primerene kan binde. Annealing innebærer at primerene binder til DNA når temperaturen senkes noe, og ekstensjon betegner den faktiske replikasjonen av DNA, hvor to nye semikonservative DNA-tråder dannes ved addering av nye nukleotider, utført av polymerasen, når temperaturen økes igjen. Dette er én syklus, som gjentas flere ganger for å lage flere kopier av DNA, dette vil skje eksponentielt, da én tråd blir til to, to blir til fire og så videre (Lorenz, 2012). Denne metoden kan også utnyttes for å undersøke tilstedeværelsen av et gen, ved å se om de tilsatte primerene kopierer opp noe eller ikke. Tilstedeværelsen av et amplifisert gen undersøkes ved å kjøre PCR-produktet gjennom en gelelektroforese, hvor de negativt ladde DNA-fragmentene trekkes mot en katode, gjennom en gel det er satt strøm på. Store fragmenter vil bevege seg langsomt gjennom gelen, mens mindre fragmenter vil bevege seg raskere, og slik vil fragmentene

separeres på størrelse. Forskjellige størrelser kan, ved å benytte riktig fargestoff, synligjøres på gelen under UV-lys som distinkte bånd (Lee et al., 2012). Om man på samme gel tilsetter en «ladder», en blanding av DNA-fragmenter med kjent, stigende størrelse, kan man sammenlikne størrelsen på båndet, og se om man har et bånd med størrelsen til genet man ønsket å amplifisere.

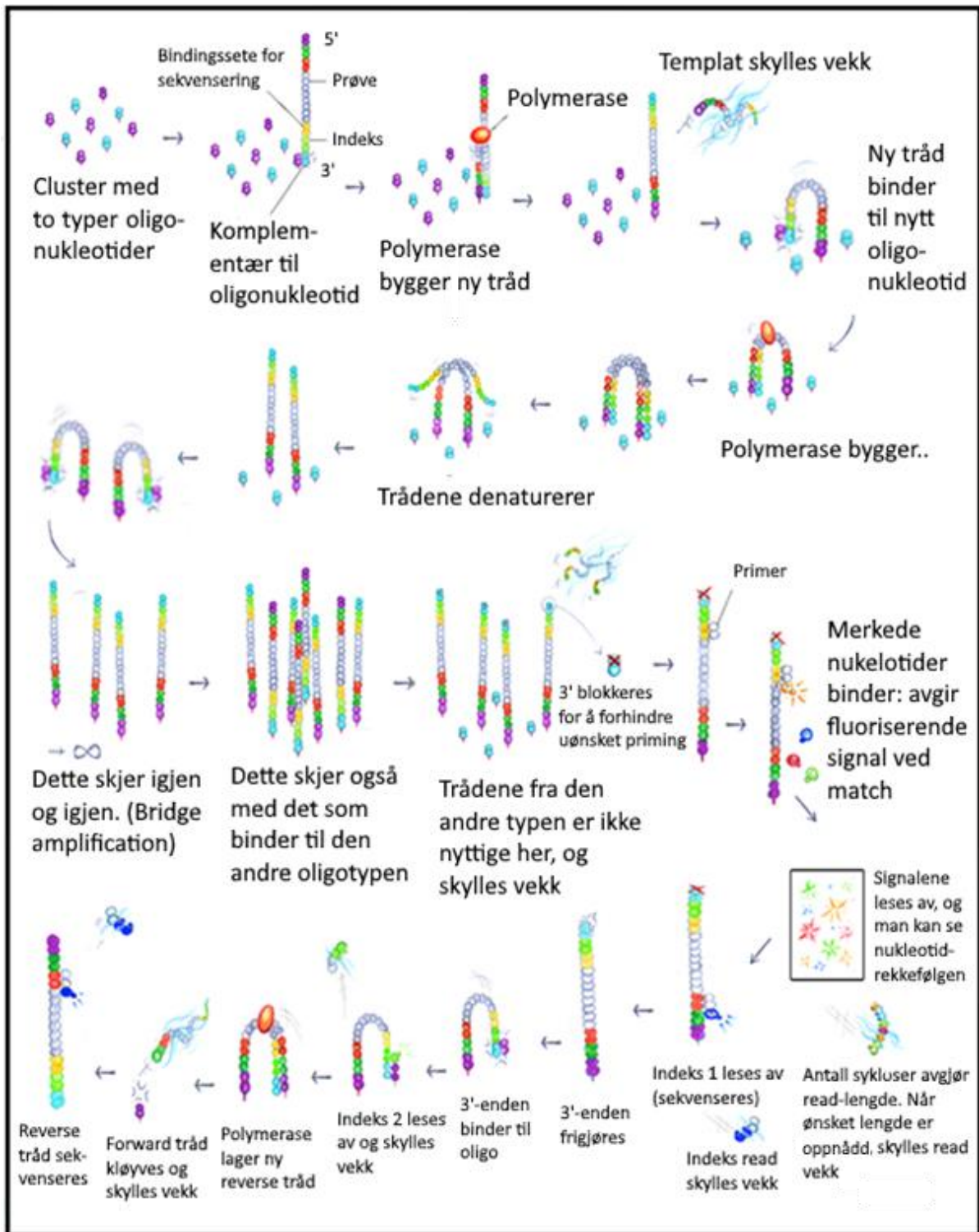
Flere varianter av PCR har dukket opp med årene, blant annet multipleks PCR, som tillater amplifisering av flere forskjellige gener i én og samme kjøring. Kvantitativ PCR (qPCR) er en annen relativt ny utvikling, også kjent som «real time PCR», som gjør det mulig å overvåke amplifiseringen av DNA underveis i reaksjonen (Hollister et al., 2015). Det finnes flere qPCR-varianter, men felles for alle er at de benytter fluorescens til å måle DNA. Én vanlig variant er å benytte et fluoriserende fargestoff, som for eksempel SYBRgreen eller EvaGreen, som vil fluorisere sterkt når det binder til dsDNA. Denne fluoriseringen måles av qPCR-maskinen, og vil gi informasjon om hvor mye DNA som amplifiseres (Hollister et al., 2015). Som ved vanlig PCR skjer dette i flere sykluser. Man kan beregne mengden opprinnelig DNA basert på hvor mange sykluser prøven må gjennom før fluorescensen er målbar, altså før man når en såkalt «cycle threshold»-verdi (CT-verdi) (Hollister et al., 2015). Denne metoden kan også benyttes til å undersøke tilstedeværelsen av et gen, hvis man tilsetter primere for ønsket gen, og ser om amplifiseringen skjer eller ikke. Hvis det aldri registreres noe signal gjennom en hel kjøring, så er genet trolig ikke til stede. Dette vil man se direkte på en graf som produseres under kjøringen, og det er dermed ikke et behov for å bruke gel etterpå.

Sekvensering

Å dyrke bakterier på antibiotikamedie er en rask og effektiv måte å si om en stamme er resistent eller ikke, MIC-testing forteller hvor resistent den er, og PCR-varianter kan teste for tilstedeværelsen av resistensgener man mistenker er å finne hos en bakterie. Men om man vil ha det fulle og hele bildet, må hele genomet til bakteriene sekvenseres. Sekvensering har blitt lettere, raskere og billigere de siste årene, og mange forskjellige teknikker har oppstått. To varianter som i dag benyttes for helgenomsekvensering er Illumina-sekvensering, som MiSeq, og Nanopore-sekvensering som MinION.

Ved Illumina-sekvensering, en andre-generasjonssekvensering, illustrert i figur 10, behandles alle prøvene med adaptore, som inneholder sekvenser som primere binder til, en indeks som identifiserer prøven, samt en sekvens som er komplementær til små oligonukleotid-sekvenser som sitter på Illumina-brettet prøven påføres. Illumina-brettet har mange rader, dekket med to

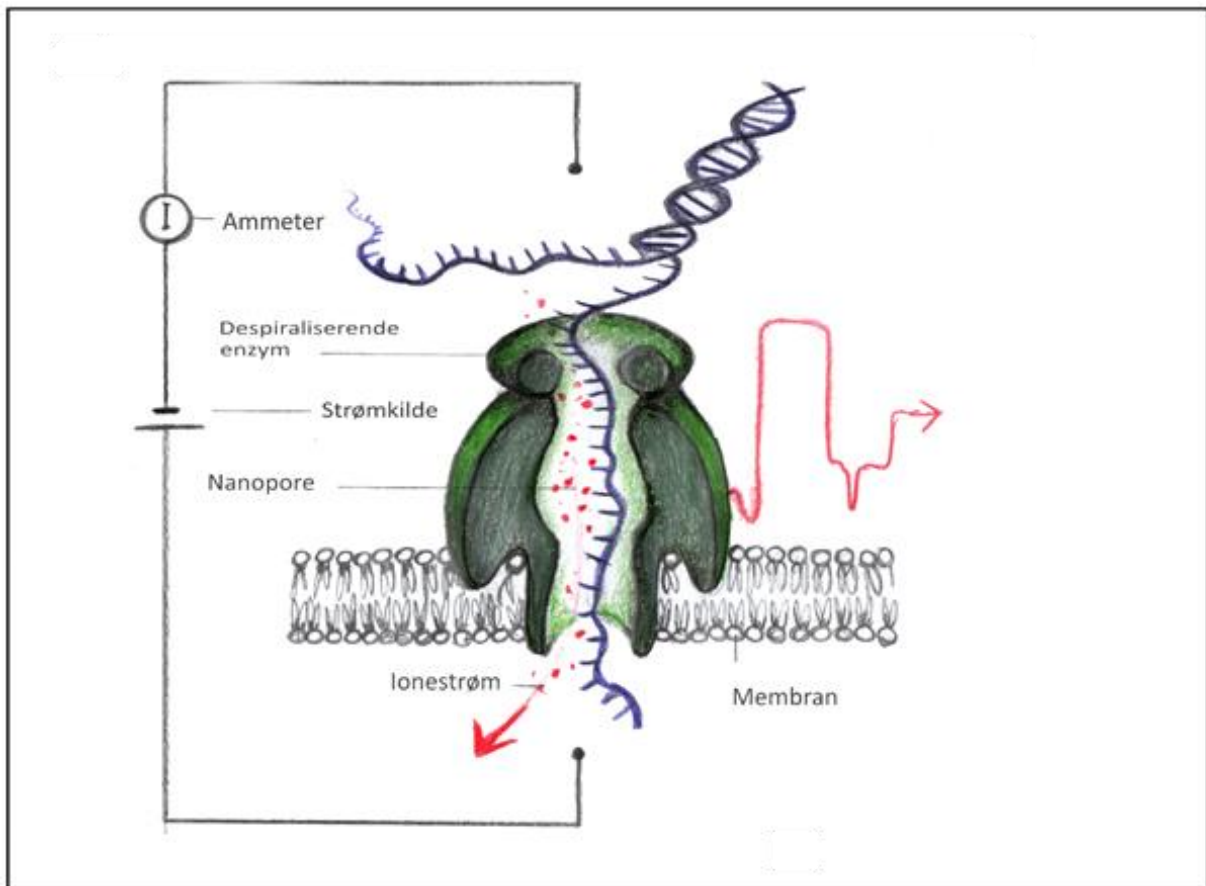
typer korte oligonukleotid-sekvenser, én type som er komplementær til 5'-enden av prøven, og én type som er komplementær til 3'-enden. Når en prøve binder til oligonukleotiden vil polymerase bygge en ny tråd med prøven som templat, og templatet vil skylles vekk. Den nye tråden vil bøye seg og binde til et nytt oligonukleotid og danne en slags bro, som polymerase vil bruke som templat. Templatet og den nye tråden denaturerer, og begge de trådene bøyer seg på nytt og binder til oligonukleotid, og prosessen gjentas, slik at to tråder blir til 4, 4 blir til 8, og så videre. Prosessen kalles «bridge amplification». Dette vil skje med begge typer oligonukleotider, men i første omgang så er det kun den ene typen som er relevant, så de andre kløyves og skylles vekk, og deretter blokkeres 3'-enden på prøvene, for å forhindre uønsket primerbinding. Primere binder til primerbindings-sekvensen i adapteret og sekvenseringen begynner. Merkede nukleotider forsøker å binde, men binder ikke permanent før det er riktig komplementært nukleotid som binder. Når riktig nukleotid binder, avgir det merkede nukleotidet et fluoriserende signal, som er unikt for nettopp dette nukleotidet. Signalene registreres av maskinen. Antall sykluser avgjør lengden på den syntetiserte tråden (read), som skylles vekk når lengden er oppnådd. Etter dette binder en primer til indeks 1 og sekvenserer denne, før indeks read skylles vekk. Nå fjernes blokkeringen på 3'-enden, slik at tråden kan bøye seg og binde til oligonukleotid. Indeks 2 sekvenseres, og skylles vekk, og polymerase lager reverse tråd med forward tråd som templat, og templatet kløyves og skylles vekk. Reverse tråd kan nå sekvenseres ved at primer binder til adapteret og merkede nukleotider binder, på samme måte som forrige runde (Illumina Inc, 2020).



Figur 10 viser hvordan Illumina-sekvensering foregår, informasjonen er hentet fra Illuminas video (Illumina Inc, 2020). Illustrasjon: Oda Mamen

Nanopore-sekvensering er en form for tredjegerasjonssekvensering. Oxford Nanopore Technologies sin «MinION sequencer» ble pre-lansert i 2014, og den generelle teknikken er vist i figur 11. Nanopore er navnet på et protein som sitter i en membran som er elektrisk resistent. DNA-prøven som påføres har en adapter-sekvens, og er festet til et motorprotein.

Motorproteinet mater DNA-et gjennom nanoporen. En ionestrøm sendes også gjennom poren ved at det settes strøm på tvers av membranen. Når et nukleotid passerer skaper dette en unik forstyrrelse i strømmen, som kan måles og registreres for å identifisere nukleotidet. I motsetning til Illumina, hvor det er en begrenset read-lengde, vil input-DNA med Nanopore leses av fullstendig og dermed gi lengre reads, så lenge en skånsom DNA-ekstraksjonsmetode er benyttet (Leggett & Clark, 2017).



Figur 11 illustrerer hvordan Nanopore-sekvensering foregår. Informasjonen er hentet fra Nanopore sin video (Oxford Nanopore Technologies, 2020a). Illustrasjon: Oda Mamen

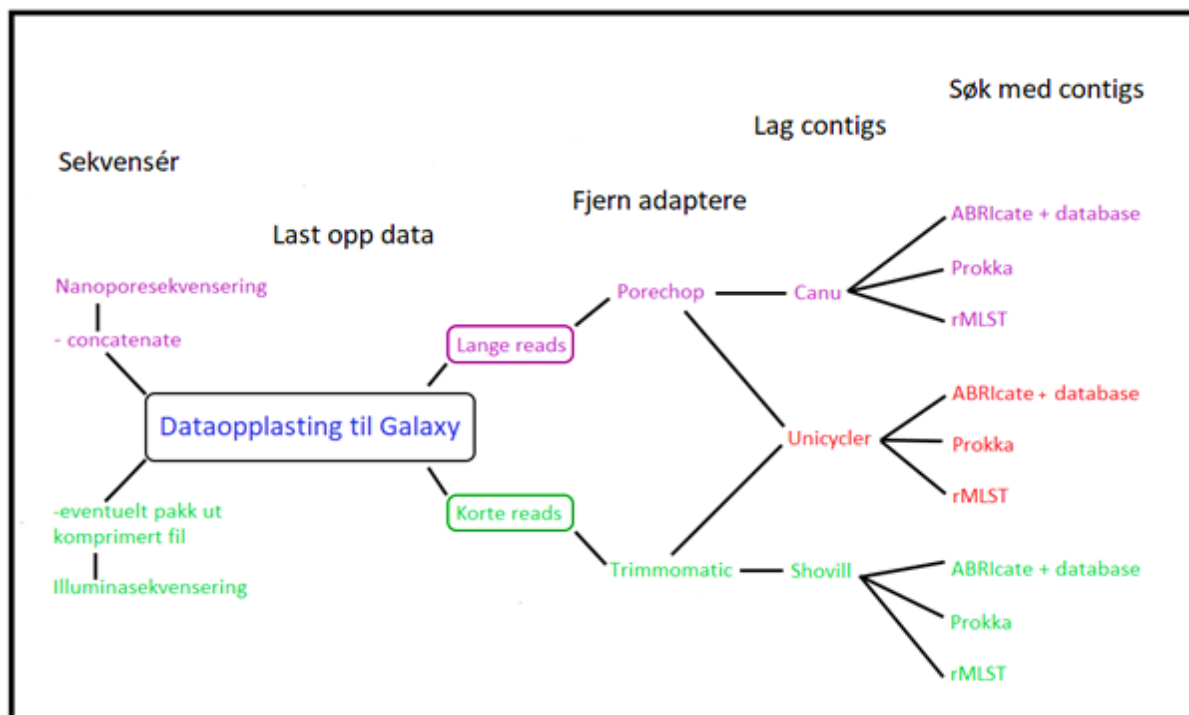
Etter sekvenseringen er ferdig, vil apparatet gå gjennom noe som heter «base calling», som betyr at de elektriske signalene oversettes til sekvenser (Oxford nanopore Technologies, 2020b).

Behandling av data

Illumina-sekvenseringen genererer millioner av korte reads, som etterpå sammenstilles for å lage lengre sekvenser, kalt contigs. Prosessen med å lage contigs kalles assembly. Sekvensene rekonstrueres, litt som et puslespill. Dette kan skje enten ved hjelp av et referansegenom, eller via *de novo* assembly, uten en referanse (Jünemann et al., 2013).

Fordelen med Nanopore er at det assembles contigs av svært lange reads, og dette gir muligheten til å finne større gener som Illumina kanskje ikke hadde funnet, og det gjør *de novo* assembly enklere (Oxford Nanopore Technologies, 2018). DNA leses dessuten direkte av, i motsetning til hos Illumina hvor det er kopier av DNA som sekvenseres, så dette kan bidra til å redusere feil. Ulempen er at det begrenser hvilke ekstraheringsmetoder man kan benytte, da mange metoder vil slå i stykker store deler av DNA, og kortere DNA-fragmenter vil også bety kortere reads. Nanopore krever også høyere konsentrasjoner av DNA enn Illumina som benytter amplification (Leggett & Clark, 2017). Den største ulempen med Nanopore er at selv om assembly-kvaliteten blir bedre, og man risikerer færre feil når sekvenseringen skjer direkte, så har Nanopore fortsatt en høyere feil-rate enn Illumina (Leggett & Clark, 2017), derfor er det ofte lurt å benytte begge metoder. Nanopore er dessuten veldig nytt, og det er naturlig at det dermed oppstår flere tekniske problemer i programmer som behandler slik sekvens-data, da det ofte tar tid å kode inn nye tilpasninger.

Avhengig om man har Illumina-data eller Nanopore-data, eller begge deler, er det litt forskjellige fremgangsmåter man må benytte når rådataene fra sekvenseringen skal behandles. Felles for alle er at de kan utføres i Galaxy (Afgan et al., 2016), en plattform som sammenkobler forskjellige programmer for behandling av data som genererer både korte og lange reads. Behandling av Nanopore- og/eller Illumina-data er illustrert i figur 12:



Figur 12: Flytskjema for behandling av sekvenseringsdata. Illustrasjon: Oda Mamen

Figur 12 viser prosessen en prøve kan gå gjennom fra sekvensering til søk etter spesifikke gener i databaser. Som vist i figuren må lange og korte reads gjennom forskjellige programmer, men programmene har mye den samme funksjonen.

Nanopore-data (lange reads) må først kjedes sammen (concatenate), dette kan gjøres enten i Galaxy, eller ved å benytte `cat`-kommandoen fra UNIX via Cygwin64. Illumina-data som ikke er komprimert kan lastes direkte opp i plattformen. Porechop (Wick, 2017) er et program for å fjerne adaptere fra lange reads. Hvis et read har et adapter i midten, tolkes dette som en chimera (en "kimære", en sekvens som består av to DNA-sekvenser som ikke hører sammen), og kløyves i to. Med korte reads fjernes adaptersekvenser med programmet Trimmomatic (Bolger et al., 2014; Heusden et al., 2020). Når adapterne er fjernet assembles contigs, og med lange reads benyttes programmet Canu (Berlin et al., 2015; Chin et al., 2013; Chin et al., 2016; Myers, 2000; Sergey Koren et al., 2017), som gjennomfører tre forskjellige operasjoner på Porechop-data: korreksjon, trimming og assembly. Korreksjon øker nøyaktigheten av baser i reads, mens trimming klipper reads til en passende lengde og fjerner tvilsomme regioner, som for eksempel gjenværende adaptere, og assembly produserer contigs av Porechop input. Med korte reads produseres contigs med programmet Shovill (Seemann, 2017). Dersom man har både korte og lange reads, kan man bruke Unicycler (Wick et al., 2016): Unicycler er et program som bruker forward og reverse reads fra Trimmomatic (korte reads) sammen med Porechop-data (lange reads) for å produsere hybrid assembly. Når man har contigs fra Canu, Shovill eller Unicycler, kan disse benyttes i ABRicate (Seemann, 2016), et program for å kjøre massesøk med flere contigs i databaser, som Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock et al., 2020), NCBI sin Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (NCBI, 2020), og Virulence Factors Database (VFDB) (Chen et al., 2005). Contigs kan også benyttes for artsbestemmelse, for eksempel med «Ribosomal multilocus sequence typing» (rMLST), en metode som indekserer variasjonen i de 53 genene som koder for proteinsubenheterne de bakterielle ribosomene består av (*rps*-genene) (Jolley et al., 2012). Contigs kan også brukes i et program som heter Prokka (Cuccuru et al., 2014; Seemann, 2014), som annoterer gendata. Helgenom-annotering er en prosess som identifiserer funksjoner i sett med DNA-sekvenser, og merker dem med nyttig informasjon. Ved å laste ned «.gbk»-filene, som inneholder alle gener og proteiner oppdaget av Prokka, kan man søke etter spesifikke gener. I motsetning til mange andre søkemotorer vil Prokka oversette «Open reading frames» (ORFs) til aminosyresekvenser, og benytte disse til å søke i databaser etter en signatur-match, hvor andre søkemotorer benytter nukleinsyrer direkte.

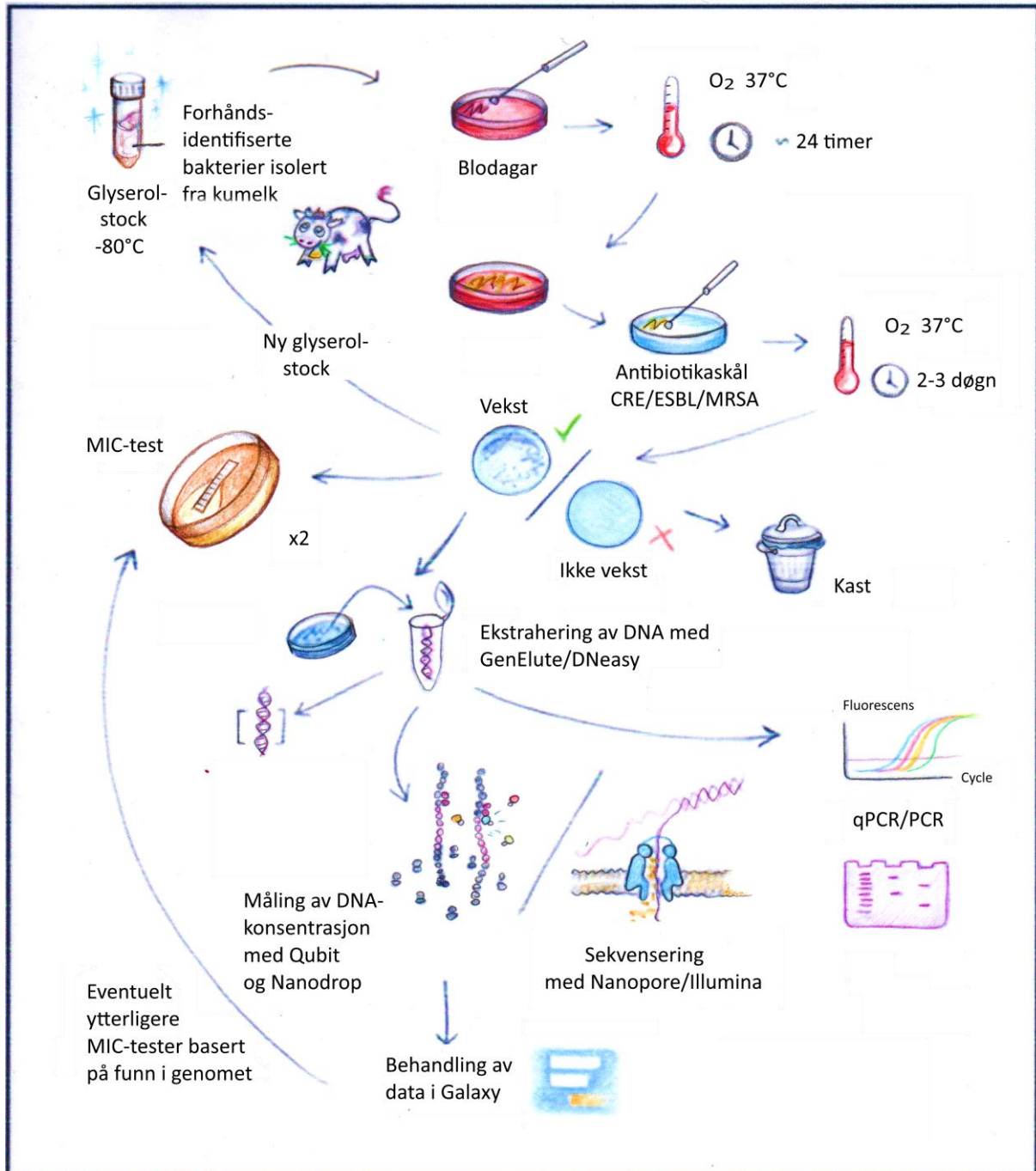
Det er viktig å huske på at bare fordi sekvenseringen finner et gen som kan gi resistens mot en type antibiotika, så betyr ikke det at den nødvendigvis er resistent, da ikke alle gener er aktive. Derfor bør passende MIC-tester utføres for å bekrefte resistens.

2. Materialer og metoder

Arbeidet i denne oppgaven er delt i tre hoveddeler. Arbeid med isolerte bakterier fra melk fra friske kyr, arbeid med isolerte bakterier fra melk fra kyr med mastitt, og arbeid med melkeprøver fra friske kyr.

2.1 Flytskjemaer for oppgaven

Arbeid med bakterier isolert fra melk fra friske kyr

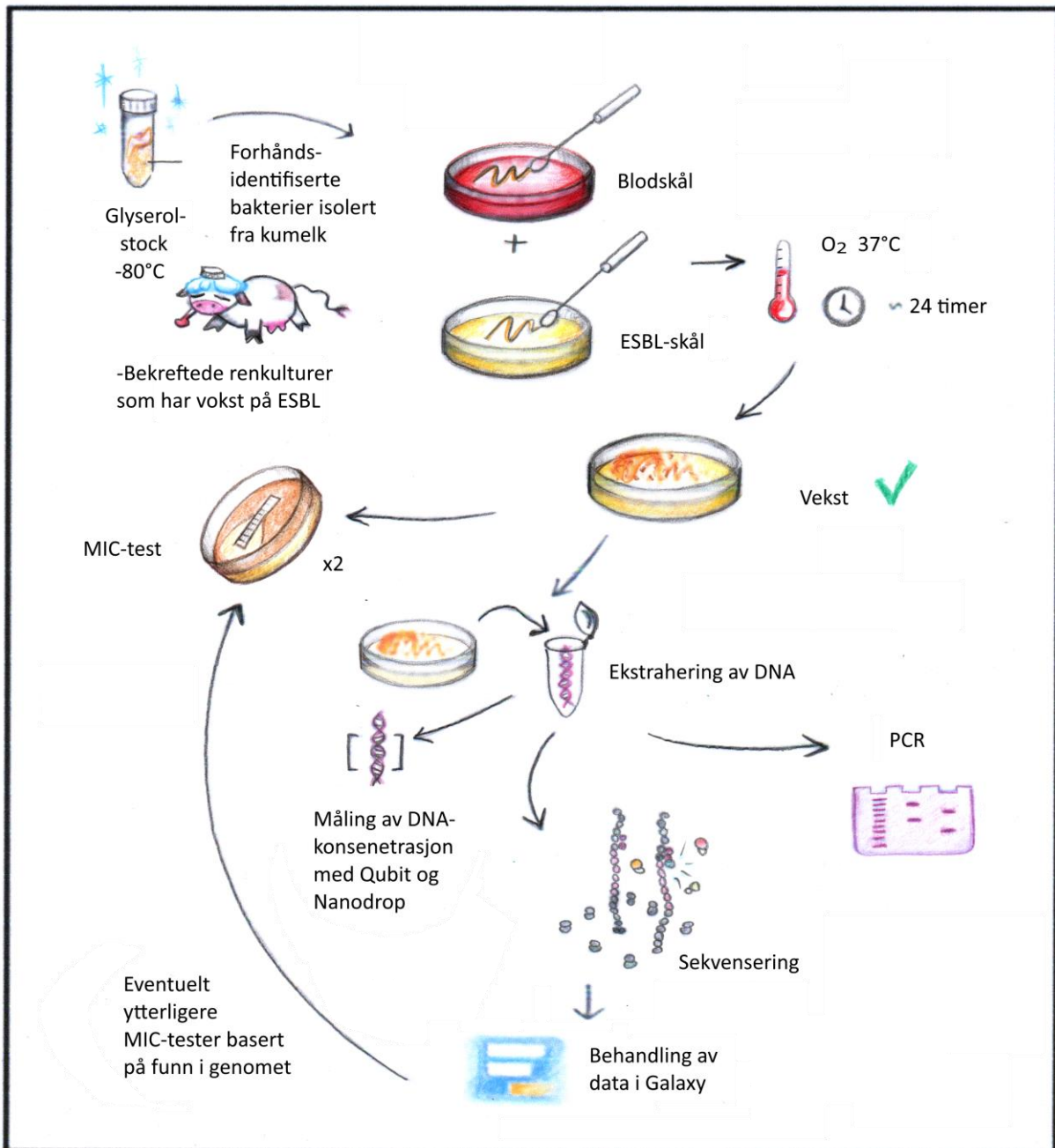


Figur 13 illustrerer arbeidet med bakterier isolert fra melk hentet fra friske kyr. Illustrasjon: Oda Mamen

Figur 13 er en forenklet fremstilling av hvordan alle bakterieprøver fra friske kyr ble behandlet i denne oppgaven. Bakteriene var på forhånd isolert, identifisert og fryst i glyserolstocks. Disse ble sådd ut på blodagar og inkubert aerobt ved 37°C i ca. ett døgn. Kolonier ble deretter plukket fra blodskålene og flyttet til antibiotikaskåler og inkubert aerobt ved 37° i 1-3 døgn. Kolonier ble i tillegg plukket fra antibiotikaskålene med vekst og flyttet til

nye antibiotikaskåler for å bekrefte resistens, men dette er ikke inkludert i flytskjemaet. De resistente bakteriene ble lagret i nye glyserolstocks. Fra de positive antibiotikaskålene ble bakteriene brukt til MIC-testing, og det ble ekstrahert DNA for PCR og sekvensering. Behandling av data fra sekvenseringen ble gjort i Galaxy Australia (Afgan et al., 2016).

Arbeid med bakterier isolert fra melk fra syke kyr

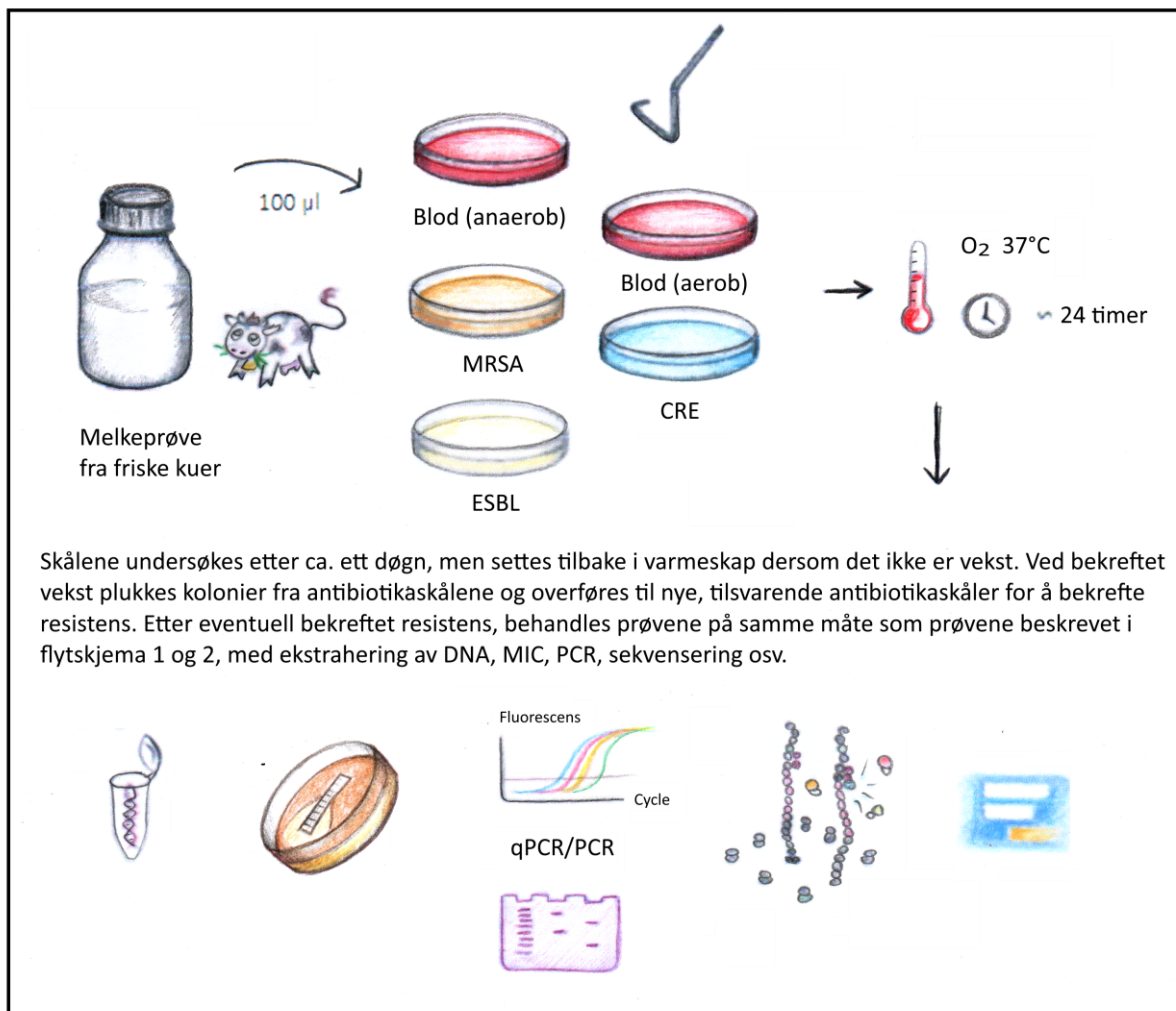


Figur 14 illustrerer arbeidet med bakterier isolert fra melk hentet fra syke kyr. Illustrasjon: Oda Mamen

Figur 14 er en forenklet fremstilling av hvordan alle bakterieprøver fra kyr med mastitt ble behandlet i denne oppgaven. Bakteriene var på forhånd isolert, identifisert og fryst i glyserolstocks, i tillegg til at de allerede hadde bekreftet vekst på antibiotikaskåler. Disse ble

sådd ut på blodagar og inkubert aerobt ved 37°C i ca. et døgn, samt på antibiotikaskål aerobt ved 37°C i ca. et døgn for å bekrefte resistensen. Det ble ikke laget nye glyserolstocks fra disse, da eksisterende glyserolstocks allerede var renkulturer plukket fra antibiotikaskåler. Disse bakteriene ble brukt til MIC-testing, og det ble ekstrahert DNA for PCR og sekvensering. Behandling av data fra sekvenseringen ble gjort i Galaxy Australia (Afgan et al., 2016).

Arbeid med melk hentet fra friske kyr



Figur 15 illustrerer arbeidet med melk hentet fra friske kyr. Illustrasjon: Oda Mamen

Figur 15 er en forenklet fremstilling av hvordan alle melkeprøver fra friske kyr ble eller skulle bli behandlet i denne oppgaven. Melkeprøvene ble sådd ut på antibiotikaskåler og blodskåler og inkubert aerobt ved 37°C i ca. et døgn, eventuelt lenger for å bekrefte/avkrefte vekst. Et ekstra sett med blodskåler ble også inkubert anaerobt. Positive prøver skulle også til nye antibiotikaskåler for å bekrefte resistens. Positive bakterier ville blitt brukt til MIC-testing, og det ville blitt ekstrahert DNA for PCR og sekvensering. Det ville også blitt laget

glyserolstocks fra positive renkulturer, og antall resistente bakterier i melken ville blitt beregnet. Coronapandemien satte en begrensning på dette.

2.2 Prøvene

Alle prøvene er hentet fra Norsk rødt fe (NRF) på Ås gård (NMBU) og Kalnes gård (Kalnes videregående skole). I de to første delene av oppgaven ble det jobbet med allerede isolerte bakterier fra melk, både fra friske og syke kyr, mens i den tredje delen ble det jobbet direkte med melkeprøver fra friske kyr. Felles for alle prøvene er at ingen av kyrne, syke eller friske, noen gang har fått antibiotika.

F-bakterier

Bakteriene isolert fra melk hentet fra friske kyr vil for enkelhets skyld heretter forkortes til F-bakterier. Forhåndsarbeidet med disse bakteriene, henting av melkeprøver, isolering av bakterier, identifisering av bakterier og produksjon av glyserolstocks ble utført av seniorforsker Roger Meisal. Metoden som ble benyttet for å hente ut melkeprøvene er inkludert i vedlegg 1. Bakteriene ble identifisert med «matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry» (MaldiTOF) (Clark et al., 2013). KuID og hvilke gårder de forskjellige prøvene kom fra ble notert, men informasjon om dette er ikke tilgjengelig på grunn av Coronaviruspandemien, så det er ikke mulighet for å oppgi denne informasjonen i oppgaven. Roger Meisal har forklart navngivningen av prøvene: Prøve nummer 1, 2, 3 og 4 kommer fra samme ku, 5, 6, 7, 8 fra neste ku, og så videre. Navnet inkluderer også informasjon om medie og vekstbetingelser ved inkubasjon. Bakterieisolater er merket med prøvenummer og isolatnummer i tillegg til type agar benyttet. For eksempel vil bakterieisolater fra prøve nummer 73 være:

- B73-1, B73-2, B73-3 (Blodagar i CO₂-inkubator)
- BO73-1, BO73-2 (Blodagar inkubert med tilgang på oksygen fra luften)
- MA73-1, MA73-2 (Melkeagar, Meisal sin egen komposisjon, CO₂ inkubator)
- MRS73-1 (MRS-medie, CO₂-inkubator)
- M73-1, M73-2, M73-3, M73-4 (M17-medie, CO₂-inkubator)

Dette arbeidet ble utført før denne oppgaven startet, så nøyaktig hvilke materialer som ble benyttet er kun dokumentert av Meisal. Av informasjonen tilgjengelig per dags dato, er det kjent at blodskålene var ferdiglagde og kommersielt tilgjengelige, mens MRS, M17 og MA

var laget på laben etter en spesifikk oppskrift. Informasjon om produsent og oppskrift var dessverre ikke lett tilgjengelig under Coronapandemien, og er derfor ikke inkludert i denne oppgaven.

Prøver med F-bakterier ble hentet fra fryseren i fire runder, bestemt ut ifra informasjon funnet om hvor vanlig det er at de forårsaker sykdom, og/eller hvor vanlig det er at de utvikler resistens.

Runde 1:

Tabell 1 viser alle prøvene med F-bakterier til runde 1, samt forkortet navn.

Prøve	Bakterie	Nytt, forenklet navn: Prøvenummer (rundenummer)
BO2-1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1(1)
BO149-3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2(1)
M107-1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3(1)
B192-2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4(1)
BO154-1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5(1)
BO168-1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6(1)
MA201-1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7(1)
BO169-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	8(1)
BO169-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	9(1)
BO172-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	10(1)
BO172-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	11(1)
BO201-1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	12(1)
BO33-1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	13(1)
B169-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	14(1)
B172-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	15(1)
B271-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	16(1)
B284-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	17(1)
B172-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	18(1)
M172-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	19(1)
B422-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	20(1)
B237-3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	21(1)

Staphylococcus aureus kan som tidligere nevnt gi sykdom i mange former, som blant annet hudinfeksjoner, urinveisinfeksjoner, tarminfeksjoner, lungebetennelse, endokarditt, toksisk sjokk-syndrom, meningitt og mastitt (Nair et al., 2014). *S. aureus* forekommer hyppig hos kyr i Norge, og er kjent for å forårsake både kroniske og kraftige infeksjoner i juret. Bakterien kan finnes på huden, i spenekanalende, i sår eller diverse slimhinner, men kronisk infiserte jurkjertler regnes som den viktigste smitekilden. Bakterien kan også isoleres fra tilsynelatende friske kjertler. Noen stammer av denne bakterien produserer også enterotoksiner som kan forårsake matforgiftning hos mennesker. Over 90 % av *S. aureus* isolert fra mastitt hos ku i Norge er følsomme for penicillin (Whist, 2020).

Streptococcus dysgalactiae er kan være opphavet til flere alvorlige sykdommer som bakteriemi, lungebetennelse, endokarditt og toksisk sjokk-syndrom hos mennesker, og kan også forårsake sykdom hos noen dyr (Preziuso et al., 2010), blant annet er de en vanlig årsak til mastitt hos kyr (Lundberg et al., 2016). I Norge er 10–20 % av akutte kliniske mastitter forårsaket av denne bakterien. Bakterien er smittsom, og finnes ofte i hud, sår, spenekanaler og infiserte jurkjertler, men er også å finne i miljøet (Whist, 2020).

Staphylococcus haemolyticus er veldig utbredt i sykehusmiljøer, og har tydelige tendenser til å utvikle resistens mot mange forskjellige typer antibiotika. Bakterien kan forårsake mange typer sykdommer, som meningitt, bakteriemi og hudinfeksjoner (Barros et al., 2012).

S. haemolyticus er en naturlig del av bakteriefloraen på menneskehud, som regnes som en viktig smittekilde til kyr, hvor bakterien kan leve både på jurhud og i fjøsmiljøet generelt. Bakterien finnes ofte i prøver fra subkliniske mastitter eller milde kliniske mastitter. Omtrent 50 % av disse bakteriene som forårsaker mastitt er følsomme for penicillin (Whist, 2020).

Runde 2:

Tabell 2 viser alle prøvene med F-bakterier til runde 2, samt forkortet navn.

Prøve	Bakterie	Nytt, forenklet navn: Prøvenummer (rundenummer)
BO1-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1(2)
BO5-3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2(2)
BO8-5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3(2)
BO16-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4(2)
BO57-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5(2)
BO58-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6(2)
BO65-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7(2)
BO66-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8(2)
BO68-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9(2)
BO69-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10(2)
BO70-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11(2)
M16-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12(2)
B28-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13(2)
B60-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14(2)
B76-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15(2)
B78-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16(2)
B79-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17(2)
B81-3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18(2)
B83-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19(2)
B84-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20(2)

Staphylococcus epidermidis er også en naturlig komponent i bakteriefloraen på menneskehud, og som med *S. haemolyticus* regnes dette som hovedkilden til jurinfeksjoner med denne bakterien. Bakterien kan smitte videre til andre kyr. En annen likhet med *S. haemolyticus* at bakterien normalt forårsaker subklinisk eller mild klinisk mastitt, og ca. 50 % av disse mastitt-bakteriene er følsomme for penicillin (Whist, 2020).

Runde 3:

Tabell 3 viser alle prøvene med *F*-bakterier til runde 3, samt forkortet navn.

Prøve	Bakterie	Nytt, forenklet navn: Prøvenummer (rundenummer)
M13-1	<i>Streptococcus uberis</i>	1(3)
B49-1	<i>Streptococcus uberis</i>	2(3)
B99-2	<i>Streptococcus parauberis</i>	3(3)
B111-2	<i>Streptococcus parauberis</i>	4(3)
B249-1	<i>Streptococcus uberis</i>	5(3)
B367-2	<i>Streptococcus parauberis</i>	6(3)
M249-2	<i>Streptococcus uberis</i>	7(3)
M282-1	<i>Streptococcus uberis</i>	8(3)
M284-1	<i>Streptococcus uberis</i>	9(3)
M69-2	<i>Streptococcus parauberis</i>	10(3)
M49-1	<i>Streptococcus uberis</i>	11(3)
M229-1	<i>Streptococcus parauberis</i>	12(3)
M227-3	<i>Streptococcus parauberis</i>	13(3)
M385-2	<i>Streptococcus uberis</i>	14(3)
BO13-2	<i>Streptococcus uberis</i>	15(3)
BO49-2	<i>Streptococcus uberis</i>	16(3)
BO94-1	<i>Streptococcus uberis</i>	17(3)
BO284-4	<i>Streptococcus uberis</i>	18(3)
BO282-1	<i>Streptococcus uberis</i>	19(3)
MA375-1	<i>Streptococcus parauberis</i>	20(3)

Streptococcus uberis er i Norge klassifisert som en miljøbakterie, som ofte isoleres fra gjødsel og kroppsoverflaten hos kyr. Bakterien kan i noen tilfeller overføres mellom kyr på lik linje med de smittsomme mastittbakteriene (Whist, 2020).

Streptococcus parauberis er et patogen som de siste årene har blitt kjent for å forårsake sykdom hos fisk, men er generelt kjent for å kunne forårsake mastitt hos ku. Det har blitt kjent at disse bakteriene ofte er resistente mot antibiotika, som gjør behandling utfordrende (Lee et al., 2018). *S. paruberis* og *S. uberis* deler mange av de samme egenskapene, men *S. paruberis* er mindre utbredt og har mindre betydning enn *S. uberis*. Bakterien er som regel følsom for penicillin. (Whist, 2020)

Runde 4:

Tabell 4 viser alle prøvene med F-bakterier til runde 4, samt forkortet navn.

Prøve	Bakterie	Nytt, forenklet navn: Prøvenummer (rundenummer)
B149-2	<i>Streptococcus canis</i>	1(4)
B376-3	<i>Escherichia coli</i>	2(4)
B215-4	<i>Streptococcus canis</i>	3(4)
M269-1	<i>Streptococcus canis</i>	4(4)
M213-2	<i>Streptococcus canis</i>	5(4)
M201-1	<i>Streptococcus canis</i>	6(4)
M2-2	<i>Streptococcus canis</i>	7(4)
M421-1	<i>Streptococcus canis</i>	8(4)
M434-2	<i>Escherichia coli</i>	9(4)
BO37-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	10(4)
BO85-4	<i>Enterococcus faecalis</i>	11(4)
BO434-3	<i>Escherichia coli</i>	12(4)
BO421-1	<i>Streptococcus canis</i>	13(4)
BO422-2	<i>Streptococcus canis</i>	14(4)
BO273-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	15(4)
BO274-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	16(4)
B201-1	<i>Streptococcus canis</i>	17(4)
MA215-2	<i>Streptococcus canis</i>	18(4)
MA376-1	<i>Escherichia coli</i>	19(4)
MA434-1	<i>Escherichia coli</i>	20(4)

Streptococcus canis er en zoonotisk bakterie som hovedsakelig overføres fra kjæledyr til mennesker. Bakterien kan blant annet forårsake bakteriemi via dyrebitt, som forverres av bakteriens evne til å unngå fagocytose. *S. canis* overføres først og fremst fra dyr som hunder og katter til mennesker gjennom for eksempel bitt, og smitter vanligvis immunkompromitterte, men ikke immunkompetente verter. Denne arten har også blitt isolert fra en rekke andre dyr, inkludert kyr, rotter, mink, mus, kaniner og rev (Taniyama et al., 2017). Bakterien kan isoleres fra øvre luftveier, sår og mastitt hos kjæledyr som hund og katt, men også mennesker. Kjæledyr som oppholder seg i fjøset er viktige kilder til utbrudd med denne typen bakterier. Det er sjelden at bakterien isoleres ved mastitt hos ku, men den kan likevel være årsaken til alvorlig klinisk mastitt når en infeksjon først oppstår, og dessuten kan bakterien smitte videre til andre kyr (Whist, 2020).

Escherichia coli er en viktig årsak til akutt klinisk mastitt, men kan også forårsake subklinsike infeksjoner. Bakterien er en tarmbakterie og finnes dermed alltid i gjødsel, og spres med dette, og regnes som en typisk miljøbakterie, som fra miljøet lett overføres til spenen. Ved akutte og kraftige jurinfeksjoner kan bakterien forårsake dødsfall, på grunn av giftstoffer som overføres til blodet. Alle *E.coli*-bakteriene som forårsaker disse infeksjonene er resistente mot penicillin (Whist, 2020).

Enterococcus faecalis utgjør en stor andel av den normale tarmfloraen hos pattedyr, som de siste årene har fått stor betydning som en sykehusbakterie, spesielt forbundet med immunsvekkede individer. Hos dyr kan den forårsake blant annet mastitt hos ku, da bakterien ofte er å finne i fjøsmiljøer og på jur- og spenehud hos kyrne. Bakterien forårsaker relativt sjelden jurinfeksjoner som krever spesiell behandling, og denne bakterien kan lett forurense speneprøver ved testing, som kan gi et falskt inntrykk av rollen den spiller ved infeksjoner (Whist, 2020).

S-bakterier

Bakteriene isolert fra melk hentet fra syke kyr med mastitt, vil for enkelhets skyld heretter forkortes til S-bakterier. Forhåndsarbeidet med disse bakteriene, henting av melkeprøver, isolering av bakterier, identifikasjon av bakterier og produksjon av glyserolstocks ble utført av labtekniker Alberto Bombelli. Metoden som ble benyttet for å hente ut melkeprøvene var den samme som den benyttet av Roger Meisal. Bakteriene ble identifisert ved å sekvensere 16S rRNA med Illumina MiSeq. KuID for de forskjellige prøvene ble notert, men informasjon om dette er ikke tilgjengelig på grunn av Coronaviruspandemien, så det ble ikke mulighet for å oppgi denne informasjonen i denne oppgaven.

Tabell 5 viser alle S-bakterier som ble testet. ESBL forteller hvilke antibiotikaskåler bakterien vokste på, M står for "mastitt", tallet er prøvenummer, mens bokstaven markerer isolatnummer.

Prøve	Bakterie
ESBL_M34_a	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M34_b	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M35_a	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M36_a	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M36_b	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M36_c	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M39_a	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M39_b	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M39_c	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M40_a	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M40_b	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
ESBL_M40_c	<i>Pseudomonas oleovorans</i>

Disse bakteriene ble valgt ut basert på deres evne til å vokse på ESBL-skåler. At alle er av samme art var tilfeldig.

Enkelte arter av *Pseudomonas* har lenge vært kjent for å være opportunistiske patogener. Miljøbakterien *Pseudomonas oleovorans* ble identifisert i 1941 og ble lenge sett på som en ikke-patogen *Pseudomonas*, men Gautam et al. (2015) har beskrevet et tilfelle hvor en 11 år gammel jente i India som var innlagt på sykehus utviklet blodforgiftning forårsaket av *P. oleovorans*, hvor stammen viste seg å være resistent mot tetracyclin, levofloxacin,

ciprofloxacin og cotrimoxazol. Artikkelen forteller også om et spedbarn som utviklet meningitt på grunn av denne bakterien. I begge disse tilfellene var barna allerede på sykehus, og hadde fra før urelaterete sykdommer. *Pseudomonas* sp. er svært sjeldent en årsak til mastitt i Norge (Whist, 2020).

Melkeprøver

Melkeprøvene fra friske kyr ble hentet av Alberto Bombelli, med den samme metoden som ble benyttet med de friske kyrne. Denne runden bestod av 40 speneprøver, som fikk navnene JF461-JF500. Det ble gjennomført to runder til, med totalt 80 nye speneprøver, men da av en annen masterstudent, Stina Cathrin Nautnes. Det har ikke vært mulig å få tak i mer informasjon om kyrne på grunn av Coronavirusutbruddet.

2.3 Dyrkningsbaserte metoder

Alle prøver ble før eller samtidig med antibiotikaskåler, sådd ut på blodagar-skåler, ferdigstøpt fra produsenten, «Thermo Scientific™ *Blood Agar (TSA with Sheep Blood)*» (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA), og inkubert ved 37°C i 1-3 døgn. Bakteriene ble enten overført fra blodskål til, eller sådd direkte ut på, én eller flere av følgende antibiotikaskåler, ferdigstøpte fra produsenten:

Brilliance™ ESB� Agar (Thermo Scientific Inc): et kromogent medie for deteksjon av ESB�-produserende organismer. Disse skålene ble benyttet til alle prøvene i denne oppgaven.

Brilliance™ CRE Agar (Thermo Scientific Inc): et kromogent medie for identifisering av carbapenem-resistente *E. coli* og *Klebsiella*-, *Enterobacter*-, *Serratia*- og *Citrobacter*- (KESC) gruppen. Disse skålene ble benyttet til alle F-bakterier, og til alle melkeprøvene.

MRSA *Select*™ II Agar Plates (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA., USA): et selektivt og differensielt kromogent medie som benyttes til isolering og identifisering av meticillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA-skåler ble benyttet på alle stafylokokker i denne oppgaven, samt til alle melkeprøvene. De ble ikke brukt på bakterier hvor det ikke var forventet vekst, som hos streptokokkene, da det var knapt med disse skålene.

Alle disse skålene er i utgangspunktet selektive medier designet for å identifisere spesielle typer bakterier basert på hvilken farge koloniene får når de vokser frem på skål. Da alle bakterier som har vokst på antibiotikaskåler i denne oppgaven allerede var identifisert, og ID ble dobbeltsjekket ved sekvensering, er ikke dette relevant her.

Alle antibiotikaskåler ble satt i aerobt varmeskap på 37°C og stod i minimum 18 timer, før de ble sjekket. Hvis det ikke var vekst, eller det var tvil, ble skålene inkubert ytterligere. Dersom det oppstod noe som lignet vekst, hvor den påførte kulturen endret farge, men ikke vekst ved ytterligere inkubasjon, ble den fargede kulturen dratt inn mot midten av skålen med en plastpodøse for å se om enkeltkolonier ville oppstå i podøsesporene.

For antibiotikaskåler med vekst, ble bakterier sådd om til en ny antibiotikaskål, for å bekrefte resistens. Det ble laget nye glyserolstocks av de positive F-bakteriene, for lagring. Dette ble produsert ved å først lage flytende overnatkultur med bakteriestammen i 5 ml Brain Heart Infusion-agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (BHI, som lages ved å blande 37 g buljong med 1 liter sterilt vann, som varmes til mediet er løst og blandet, og autoklaveres til slutt), og la dette stå over natt ved 37°C. Det flytende kulturen ble dagen etter vortexet for å oppnå homogen blanding, og 500 µl av kulturen ble blandet med 500 µl 30% glyserol i kryogennrør som ble satt i fryser med temperatur på -80°C.

2.4 MIC-testing

Enkelte bakterier ble MIC-testet basert på hvilken antibiotikaskål de vokste på, mens andre ble testet basert på resultater funnet ved sekvensering. Andre strips skulle også benyttes, men grunnet Coronaviruspandemien var det ikke mulig å bestille ytterligere strips, eller få tilgang til laben for å utføre testene. Stripsene som ble benyttet var M.I.C.Evaluator™-strips (Oxoid, Thermo scientific inc), ETEST®-strips (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankrike) og Liofilchem gradient strips (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia) og det ble brukt følgende varianter:

- Ciprofloxacin
- Imipenem
- Meropenem
- Cefotaksim
- Cefepim
- Streptomycin
- Tetracyclin
- Trimetoprim

Bakteriene som skulle testes ble først dyrket på Mueller-Hinton (MH)-agar (Thermo Scientific Inc) ved 37°C i ett døgn. Dette er agar som ikke inneholder antibiotika og som ikke skal virke selekterende. Bakteriene som vokste her ble plukket med sterile bomullspinner og

overført til romtemperert saltløsning (8.5% NaCl: 8.5 g NaCl, 1 l destillert vann, blandet, fordelt i rør, autoklavert). Det ble blandet inn nok av kulturen til at NaCl-røret hadde samme turbiditet som et McFarland 0,5 standard-rør (Pro-Lab Diagnostics, Birkenhead, England). Deler av kulturene fra rørene ble hentet opp med nye sterile bomullspinner, hvor væsken klemtes av i røret før det ble fordelt jevnt utover en ny MH-skål, hvor en MIC-strip ble plassert midt i skålen. Skålene ble satt i varmeskap på 37°C i ett døgn før MIC-verdien ble lest av.

2.5 Ekstrahering av DNA

Det ble ekstrahert DNA fra alle bakterier som hadde bekreftet vekst på antibiotikaskåler. Runde 1 av F-bakterier fikk ekstrahert DNA med både GenElute™ (Sigma-Aldrich) og DNeasy® (Qiagen, Hilden, Tyskland), mens de resterende bakteriene kun ble ekstrahert med GenElute (uten EDTA).

DNeasy ble utført etter standard protokoll QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen), med noen avvik:

Bakteriekolonier ble tatt direkte fra skål og løst i 1000 µl Ringers og sentrifugert ved 10000 x g i 2 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble kastet og pelleten ble resuspendert i 300 µl powerbead solution (Qiagen). Dette ble varmebehandlet ved 80°C i 12 minutter for å drepe bakteriene, da disse måtte tas ut av patogenlaben for videre prosessering. Protokollen ble fulgt nøyaktig fra og med trinn 3.

GenElute ble utført etter standard protokoll «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit Protocol» (Sigma-Aldrich), for Gram-positive og Gram-negative bakterier (overnatt-kultur ble laget med inokulert 5 ml BHI-buljong, samme oppskrift som beskrevet tidligere), med noen avvik: Eluerings-bufferen ble ikke benyttet, fordi den inneholder «Ethylene Diamine Tetra Acetic acid» (EDTA), som kan skape problemer med PCR. I stedet ble det brukt «sequence-prep normalization buffer» fra «Invitrogen SequalPrep™ Normalization Plate (96) Kit» (Thermo Scientific Inc). I tillegg ble det benyttet 25 µl Elution Solution (Sigma-Aldrich) i stedet for 200, og dette fikk stå i 5 minutter ved romtemperatur før det ble sentrifugert i 2 minutter ved 6500 x g. Dette ble gjort to ganger.

2.6 Kvantifisering av DNA

Spektrofotometeret NanoDrop 2000 med programvaren NanoDrop 2000/2000c fra Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific Inc) ble benyttet for å (grovt) estimere DNA-

konsentrasjon av ekstrahert DNA, samt renheten til DNA. Elueringsbufferene fra kitene ble benyttet som 0-prøver. Det ble benyttet 2 µl fra hver prøve. For sikrere konsentrasjonsmål av DNA ble fluorometeret Qubit® 2.0 fra Thermo Fisher Scientific (Life technologies, Thermo Scientific Inc) benyttet, med Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Life technologies, Thermo Scientific Inc). Working solution ble laget med 1 x n µl (n=antall prøver, pluss litt ekstra for å kompensere for eventuelle små pipetteringsfeil) Qubit® dsDNA BR (broad range) reagent (Life technologies, Thermo Scientific Inc) og 199 x n µl Qubit dsDNA BR buffer (Life technologies, Thermo Scientific Inc). Standardløsningene ble laget ved å kombinere Qubit® dsDNA BR Standard 1 (Life technologies, Thermo Scientific Inc) og Qubit® dsDNA BR Standard 2 (Life technologies, Thermo Scientific Inc) med 190 µl working solution. Etter standardene var godkjent av maskinen ble 2 µl av hver prøve blandet med 190 µl working solution og DNA-konsentrasjon ble målt med fluorometeret.

2.7 PCR

PCR og/eller qPCR ble benyttet på bakterieisolatene, med tre forskjellige multiplekser avhengig av om de vokste på CRE-, ESBL- eller MRSA-skåler. CRE-bakterier ble sjekket med CAR-multipleks, ESBL-bakterier med ESBL-multipleks og MRSA-bakterier med MRSA-multipleks. Dette ble benyttet for å undersøke mulig tilstedeværelse av gener som kan gi en bakterie muligheten til å vokse på ett av de tre antibiotikamediene benyttet i denne oppgaven. PCR ble kjørt i en SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Scientific Inc) og qPCR ble kjørt i LightCycler 480 II (Roche, Basel, Sveits). Det ble diskutert om det skulle benyttes PCR eller qPCR til denne oppgaven. Vanlig PCR er noe som hadde blitt benyttet tidligere og som det var sikkert at ville fungere, men det var ønskelig å teste om qPCR kunne benyttes til samme formål, derfor ble alle prøver fra runde 1 testet med qPCR. Siden det kun var en test ble dette gjort samme dag som prøvene ble sådd ut på ESBL-skåler, altså før det var bekreftet vekst på noen av disse. Med senere prøver ble det kun kjørt PCR/qPCR etter at det var bekreftet vekst på antibiotika-skåler, og ikke før. Koloniene ble plukket fra blodskåler og ekstrahert DNA ble qPCR-testet med ESBL2-primere, da det var en positiv kontroll tilgjengelig for ESBL2. qPCR fungerte til formålet, men det ble også benyttet vanlig PCR, noe på grunn av tilgang til utstyr, og noe for å få en større bredde i oppgaven.

Kittet benyttet for PCR var «QUIAGEN multiplex PCR kit» (Qiagen), og ved qPCR ble også EvaGreen®-farge (Biotium, Fremont, CA, USA), benyttet. Reaksjonene ble utført i henhold til protokollen i kitet, men med variasjoner i volum og PCR-program, som er oppgitt i tabellene nedenfor, sammen med primerene benyttet.

ESBL-multipleks qPCR: benyttet på alle F-bakterier fra runde 1.

ESBL2-reaksjonsoppsett:

Tabell 6: Reaksjonsoppsett ESBL2

Komponent	Volum for én prøve (µl)
2x Qiagen Multiplex PCR mastermix	12,5
Primer	2,5
Sterilt vann	7,75
EvaGreen	1,25
DNA	1
Totalt	25

Det ble benyttet to negative kontroller (vann), samt en positiv kontroll med *bla_{CTX-M}*-genet.

ESBL1-reaksjonsoppsett:

Tabell 7: Reaksjonsoppsett ESBL1

Komponent	Volum for én prøve (µl)
2x Qiagen Multiplex PCR mastermix	10
Primer	2
Sterilt vann	6
EvaGreen	1
DNA	1
Totalt	20

Det ble benyttet to negative kontroller (vann), samt kontrollen med *bla_{CTX-M}*-genet, som ESBL1 ikke har primer for, for å bekrefte at det ikke ga utslag. Ingen positiv kontroll for ESBL1 var tilgjengelig, og det ble heller ikke bestilt av økonomiske årsaker.

ESBL1-2-primere:

Tabell 8 viser primerene benyttet for ESBL-multipleks qPCR. Målgenene er alle betalaktamaser (Dallenne et al., 2010).

Primere ESBL1	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla_{OXA-48}</i>	281
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
MultiCTXMGp2_F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla_{CTX-M}</i> (gr. 2)	404
MultiCTXMGp2_R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT		
MultiTSOO_F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla_{OXA}</i>	564
MultiTSOO_R	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG		
MultiTSOS_F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla_{SHV}</i>	713
MultiTSOS_R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
Primere ESBL2	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
MultiCTXMGp9_F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla_{CTX-M}</i> (gr. 9)	561
MultiCTXMGp9_R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCTXMGp1_F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla_{CTX-M}</i> (gr. 1)	688
MultiCTXMGp1_R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiTSOT_F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla_{TEM}</i>	800
MultiTSOT_R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		

Oppsett for qPCR:

Tabell 9: Oppsett for ESBL-qPCR

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	95	15:00
2 Denaturering	94	0:30
3 Annealing	60	1:30
4 Ekstensjon	72	1:30
5 Trinn 2-4 30x syklus		
6	72	10:00
7	4	∞

PCR-produkt ikke kjørt på gel, da qPCR-maskinen vil fortelle om produktet var til stede, så en slipper å bruke tid og ressurser på å kjøre gel-elektroforese.

MRSA-multipleks qPCR: Benyttet på bakterier med bekreftet vekst på MRSA-skåler.

MRSA-reaksjonsoppsett:

Tabell 10: Reaksjonsoppsett MRSA

Komponent	Volum for én prøve (µl)
2x Qiagen Multiplex PCR master mix	10
10x primer mix *	0,4
Sterilt vann	7,6
EvaGreen	1
DNA	1
Totalt	20

Det ble benyttet to negative kontroller (vann), samt en positiv kontroll som hadde *mecA*-genet og *mecC*-genet. *Primer mix i MRSA-multipleks qPCR må lages på forhånd: 10 µl av hvert primersett, F og R, (totalt 60 µl) og 40 µl vann til et totalvolum på 100 µl.

MRSA-primere:

Tabell 11 viser primerene benyttet for MRSA-multipleks qPCR (DTU Food, 2020). *mec*-genene er alternative penicillin-bindende proteiner som gjør peptidoglykansyntese mulig på tross av betalaktamer. *spa*-genet søkes for å indikere at prøven er en *S. aureus*.

Primere MRSA	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
spa-1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	<i>spa</i>	180-600
spa-1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT		
<i>mecA</i> P4	TCCAGATTACAACTTCACCAGG	<i>mecA</i>	162
<i>mecA</i> P7	CCACTTCATATCTTGTAAACG		
<i>mecALGA251</i> MultiFP	GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC	<i>mecC</i>	138
<i>mecALGA251</i> MultiRP	GAAGATCTTTCCGTTTTTCAGC		

Oppsett for qPCR:

Tabell 12: Oppsett for MRSA-qPCR

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	94	5:00
2 Denaturering	94	0:30
3 Annealing	59	1:00
4 Ekstensjon	72	1:00
5 Trinn 2-4 30x syklus		
6	72	10:00
7	4	∞

PCR-produkt ikke kjørt på gel, da qPCR-maskinen vil fortelle om produktet var til stede.

CAR-multipleks PCR: Benyttet på bakterier som har vokst frem på CRE-skåler

CAR-reaksjonsoppsett:

Tabell 13: Reaksjonsoppsett CAR1-2

Komponent	Volum for én prøve (µl)
2x Qiagen Multiplex PCR master mix	12,5
10x primer mix	2,5
Sterilt vann	9
DNA	1
Totalt	25

Det ble ikke benyttet negativ kontroll da dette ble vurdert som unødvendig bruk av ressurser, og ingen positiv kontroll da dette ikke var tilgjengelig, og det ble ikke bestilt en kontroll av økonomiske årsaker.

CAR-primere:

Tabell 14 viser primerene benyttet for CAR-multipleks qPCR (Dallenne et al., 2010). Målgenene er alle betalaktamaser.

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

Oppsett for CAR-PCR:

Tabell 15: Oppsett for CAR-PCR

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	95	15:00
2 Denaturering	94	0:30
3 Annealing	60	1:30
4 Ekstensjon	72	1:30
5 Trinn 2-4 30x syklus		
6	72	10:00
7	4	∞

ESBL-multipleks PCR: Benyttet på bakterier som har vokst frem på ESBL-skåler

ESBL-Reaksjonsoppsett:

Tabell 16: Reaksjonsoppsett ESBL1-4

Komponent	Volum for én prøve (µl)
2x Qiagen Multiplex PCR master mix	12,5
10x primer mix	2,5
Sterilt vann	9
DNA	1
Totalt	25

Benyttet ingen negativ kontroll da dette ble vurdert som unødvendig bruk av ressurser.

Benyttet ingen positiv kontroll da dette ikke var tilgjengelig på dette tidspunktet, og det ble ikke bestilt en ny kontroll av økonomiske årsaker.

ESBL-primere:

Tabell 17 viser primerene benyttet for ESBL-multipleks PCR (Dallenne et al., 2010). Alle målgenene er betalaktamaser, med unntak av rpoB og 16S rRNA som er housekeeping-gener.

Primere ESBL1	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> _{OXA-48}	281
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
MultiCTXMgp2_F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 2)	404
MultiCTXMgp2_R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT		
MultiTSOO_F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla</i> _{OXA}	564
MultiTSOO_R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
MultiTSOS_F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla</i> _{SHV}	713
MultiTSOS_R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
Primere ESBL2	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
MultiCTXMgp9_F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 9)	561
MultiCTXMgp9_R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCTXMgp1_F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 1)	688
MultiCTXMgp1_R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiTSOT_F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla</i> _{TEM}	800
MultiTSOT_R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
Primere ESBL3	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
NMD_F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> _{NDM}	157
NMD_R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
VIM_F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla</i> _{VIM}	564
VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> _{KPC}	460
KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		
Primere ESBL4	Primersekvens (5' → 3')	Mål-gen	Størrelse (bp)
rpoB_F	CAGGTCTCACACGGTAACAAG	<i>rpoB</i>	512
rpoB-seq-R	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC		
16S-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S rRNA	1505
16S-R	GYTACCTTGTTAGCACTT		

Oppsett for ESBL-PCR:

Tabell 18 Oppsett for ESBL-PCR

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	95	15:00
2 Denaturering	94	0:30
3 Annealing	62	1:30
4 Ekstensjon	72	1:30
5 Trinn 2-4 28x syklus		
6	72	10:00
7	4	∞

For hver PCR ble det til slutt utført en gel-elektroforese på de ferdige PCR-produktene. Gel-elektroforese ble utført på 1% agarosegel laget på 2 g agarosepulver (SeaKem® LE Agarose, Lonza Rockland, USA), 200 ml forhåndslandet Tris-acetat-EDTA (TAE-)-buffer (Bio-Rad Laboratories Inc) og 10 µl Gelred (Biotium). Agar og buffer ble blandet sammen, varmet opp og kjølt ned igjen før Gelred ble tilsatt. Væsken ble helt i en form med en brønnkam. Den stivnede gelen ble lagt over i elektroforesekar, hvor TAE-bufferen ble helt over som kjørebuffer. 3 µl av DNA-prøvene ble blandet med 3 µl agarose gel loading dye (Qiagen) og 4 µl sterilt vann. 6 µl Quick-load 100 bp DNA ladder (New England BioLabs Inc, Ipswich, USA) ble plassert i brønn 1, og prøver i de neste fem brønnene, og ny ladder ble plassert i brønn 7, foran de fem neste prøvene. 10 µl av de klargjorte prøvene ble tilsatt hver brønn. Elektroforesen ble kjørt i «BIO-RAD PowerPac 300» (Bio-Rad Laboratories Inc) ved 80 V i ca. 1,5 time. Den ferdige gelen ble fotografert under UV-lys, med en Gel Doc XR-maskin (Bio-Rad Laboratories Inc). Det ble ikke utført singelpleks på noen av prøvene basert på resultatene. Se resultater.

2.8 Sekvensering

Alle resistente F-bakterier og et utvalg S-bakterier ble valgt ut for sekvensering med MiSeq. Enkelte F-bakterier ble også sekvensert med MinION. Davide Porcellato utførte library prep til MiSeq, og selve sekvenseringen. Det ble benyttet en metode kalt Nextera XT fra Illumina for library prep og DNA ble sekvensert med et V3 300 X2 bp sequencing kit i en MiSeq platform, produsentens instruksjoner ble fulgt (Illumina Inc, San Diego, CA., USA). Misti Dawn Finton utførte library prep med SQK158 RBK004 Rapid Barcoding Kit og påførte prøven i MinION SpotON R9.4.1 flow cell i en MinION MK1 sequencer. Dette ble kjørt i henhold til protokollen (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, England).

2.9 Behandling av data

Nanopore-data (lange reads) behandles på følgende måte:

- 1) Filene med data ble concatenated (kjedet sammen) med cat-kommandoen i UNIX ved å benytte Cygwin64.
- 2) Dataene ble lastet opp til Galaxy Australia, usegalaxy.org.au (Afgan et al., 2016).
- 3) Porechop (Wick, 2017) ble brukt på disse dataene for å fjerne adaptore.

4) Canu (Berlin et al., 2015; Chin et al., 2013; Chin et al., 2016; Myers, 2000; Sergey Koren et al., 2017) ble forsøkt kjørt for å produsere contigs med Porechop-data som input. *

5) ABRicate (Seemann, 2016), skulle ha blitt kjørt for å finne resistensgener og virulensgener i databasene Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock et al., 2020), NCBI sin Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (NCBI, 2020) og Virulence Factors Database (VFDB) (Chen et al., 2005).

6) Contigs hadde blitt brukt i Prokka (Cuccuru et al., 2014; Seemann, 2014), for å annotere genom.

7) Contigs kunne også ha blitt brukt for artsbestemmelse, med «Ribosomal multilocus sequence typing» (rMLST) (Jolley et al., 2012) for å bekrefte bakterie-identitet.

*Canu og de påfølgende stegene ble aldri gjennomført, da Canu konsekvent krasjet ved alle forsøk hos alle prøver.

Illumina-data (korte reads) ble behandlet på følgende måte:

1) Dataene ble lastet direkte opp til Galaxy Australia, usegalaxy.org.au (Afgan et al., 2016).

2) Trimmomatic (Bolger et al., 2014; Heusden et al., 2020) ble brukt for å fjerne adaptersekvenser fra opplastede MiSeq-reads.

3) Shovill (Seemann, 2017) ble brukt for assembly til contigs, med Trimmomatic-filer som input.

4) ABRicate (Seemann, 2016), ble kjørt for å finne resistensgener og virulensgener i databasene Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock et al., 2020), NCBI sin Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (NCBI, 2020), og Virulence Factors Database (VFDB) (Chen et al., 2005).

5) Contigs ble brukt i Prokka (Cuccuru et al., 2014; Seemann, 2014), for å annotere genom.

6) Contigs ble også brukt til rMLST (Jolley et al., 2012) for å bekrefte identitet.

Nanopore-data (lange reads) og Illumina-data (korte reads) ble behandlet på følgende måte:

1) Contigs fra lange og korte reads ble produsert som beskrevet over.

2) Unicycler (Wick et al., 2016) ble kjørt for hybrid assembly med forward og reverse reads fra Trimmomatic-data og Porechop-data.

3) ABRicate (Seemann, 2016), ble kjørt for å finne resistensgener og virulensgener i databasene Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock et al., 2020), NCBI sin Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (NCBI, 2020), og Virulence Factors Database (VFDB) (Chen et al., 2005), som ikke ble funnet med contigs fra Shovill (Seemann, 2017)

Annotering og artsbestemmelse med hybrid-contigs fungerer på samme måte som vanlige contigs og kan utføres, men dette ble ikke gjort her, da det allerede var gjennomført på MiSeq-contigs.

3. Resultater

3.1 Resultater for dyrkning av F-bakterier

Alle bakterier hentet fra glyserolstocks ble sådd ut på blodagar og inkubert aerobt ved 37°C i 1-2 døgn, avhengig av hvor raskt koloniene vokste frem. Fra blodagar ble kolonier flyttet til antibiotikaskåler, og inkubert aerobt på nytt ved 37°C, i 1-3 døgn, og noen skåler stod lenger, for å bekrefte eller avkrefte vekst. Kolonier som vokste frem på antibiotikaskåler ble overført til nye antibiotikaskåler og inkubert på nytt, alle bakterier som ble overført til nye antibiotikaskåler viste vekst. Før det ble gjort videre arbeid med disse bakteriene, ble det plukket ut kolonier til nye glyserolstocks. Nye glyserolstocks ble lagret ved -80°C og er tilgjengelig for videre undersøkelser. Resultatene fra dyrkingen vises i tabell 19- 22:

Runde 1








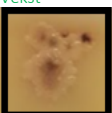
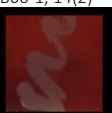






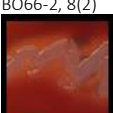

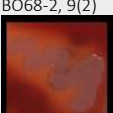



Tabell 19 viser hvilke bakterieisolater som vokste på antibiotikaskåler i runde 1, og hvordan de så ut på blodskål. Hemolyse er notert, vurderingen er tatt ved å studere skålene, og ikke fotografiene. Enkelte bilder har mini-bilder inkludert i hjørnet, der det opprinnelige bildet ikke godt nok viste både koloniene og hemolysen. Mini-bildene er enten fra den andre siden av skålen, eller fra ny blodskål. X = ikke vekst.

Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	MRSA	CRE	Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	MRSA	CRE
BO2-1, 1(1) 	<i>S. dysgalactiae</i> (β)	X	Streptokokk, ikke testet	X	BO201-1, 12(1) 	<i>S. dysgalactiae</i> (β)	X	Streptokokk, ikke testet	X
BO149-3, 2(1) 	<i>S. dysgalactiae</i> (β)	X	Streptokokk, ikke testet	X	BO33-1, 13(1) 	<i>S. haemolyticus</i> (β)	X	Vekst	X
M107-1, 3(1) 	<i>S. haemolyticus</i> (v)	X	X	X	B169-1, 14(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X
B192-2, 4(1) 	<i>S. haemolyticus</i> (β)	X	Vekst	X	B172-1, 15(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	Vekst	X
BO154-1, 5(1) 	<i>S. haemolyticus</i> (β)	X	Vekst	X	B271-1, 16(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X
BO168-1, 6(1) 	<i>S. haemolyticus</i> (β)	X	Vekst	X	B284-1, 17(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X
MA201-1,7(1) 	<i>S. dysgalactiae</i> (v)	X	X	X	B172-2, 18(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X
BO169-1, 8(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X	M172-1,19(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X
BO169-2, 9(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X	B422-1, 20(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X
BO172-1, 10(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X	B237-3 21(1) 	<i>S. dysgalactiae</i> (β/ γ) Muligens ikke renkultur.	X	Streptokokk, ikke testet	X
BO172-2, 11(1) 	<i>S. aureus</i> (β)	X	X	X					

Tabell 19 viser at alle bakteriene i runde 1 vokste på blodagar, ingen vokste på CRE-skåler, eller ESBL-skåler, men prøve 4(1), 5(1), 6(1), 13(1) og 15(1) vokste på MRSA-skåler på første utstrykning, og da de ble sådd om til nye skåler (ikke avbildet). Fargede kulturer med tvilsom vekst ble dratt inn mot midten av skålen med en plast-podøse for å se om det ble vekst i podøse-sporet, dette skjedde med 15(1), men ikke hos de andre.

Runde 2


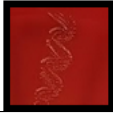



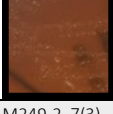
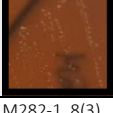
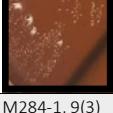





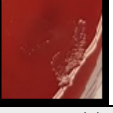





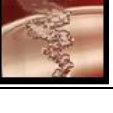
Tabell 20 viser hvilke prøver som vokste på antibiotikaskåler i runde 2, og hvordan de så ut på blodskål. Hemolyse er notert, vurderingen er tatt ved å studere skålene, og ikke fotografier. X = ikke vekst.

Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	MRSA	CRE	Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	MRSA	CRE
BO1-1, 1(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	BO70-1, 11(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO5-3, 2(2) 	<i>S. epidermidis</i> (v)	X	X	X	M16-1, 12(2) 	<i>S. epidermidis</i> (v)	X	X	X
BO8-5, 3(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B28-2, 13(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO16-1, 4(2) 	<i>S. epidermidis</i> (v)	X	Vekst 	X	B60-1, 14(2) 	<i>S. epidermidis</i> (v)	X	X	X
BO57-1, 5(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B76-1, 15(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO58-1, 6(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B78-2, 16(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO65-1, 7(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B79-1, 17(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO66-2, 8(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B81-3, 18(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO68-2, 9(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B83-1, 19(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X
BO69-1, 10(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X	B84-2, 20(2) 	<i>S. epidermidis</i> (β)	X	X	X

Tabell 20 viser at alle bakteriene i runde 2 vokste på blodagar, men ingen på CRE-, eller ESBL-skåler. 4(2) vokste på MRSA-skåler, på første og andre utstrykning. Da deler av kolonien ble plukket og flyttet til ny antibiotika-skål, kom veksten etter kun én dag. Fargede kulturer ble dratt inn mot midten av skålen med podøse, men ingen kolonier oppstod.

Runde 3

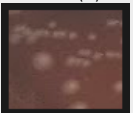
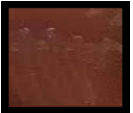


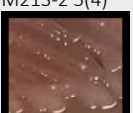
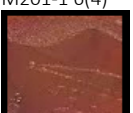



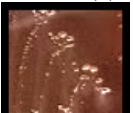

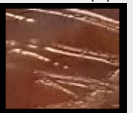

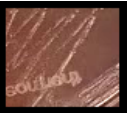

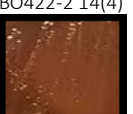
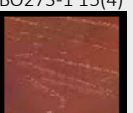
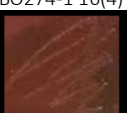
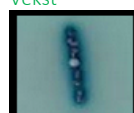
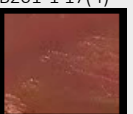
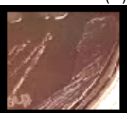

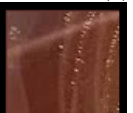
Tabell 21 viser hvilke prøver som vokste, og hvordan de så ut på blodskål. Hemolyse er notert, vurderingen er tatt ved å studere skålene, og ikke fotografier. X = ikke vekst.

Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	CRE
M13-1, 1(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
B49-1, 2(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
B99-2, 3(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X
B111-2, 4(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X
B249-1, 5(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
B367-2, 6(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X
M249-2, 7(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
M282-1, 8(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
M284-1, 9(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
M69-2, 10(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X
Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	CRE
M49-1, 11(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
M229-1, 12(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X
M227-3, 13(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X
M385-2, 14(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
BO13-2, 15(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
BO49-2, 16(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
BO94-1, 17(3) 	<i>S. uberis</i> (β)	X	X
BO284-4, 18(3) 	<i>S. uberis</i> (β)	X	X
BO282-1, 19(3) 	<i>S. uberis</i> (v)	X	X
MA375-1, 20(3) 	<i>S. parauberis</i> (v)	X	X

Tabell 21 viser at alle bakteriene i runde 3 vokste på blodagar, men ingen vokste på CRE-skåler, eller ESBL-skåler. Det ble vurdert som lite sannsynlig at streptokokker ville vokse på MRSA-skåler, de få skålene som var tilgjengelige ble derfor ikke brukt til dette.

Runde 4

Tabell 22 viser hvilke prøver som vokste på antibiotikaskåler i runde 4, og hvordan de så ut på blodskål. X = ikke vekst.

Prøve på blodskål	Bakterie (+Hemolyse)	ESBL	CRE
B149-2 1(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
B376-3 2(4) 	<i>E. coli</i> (v)	X	X
B215-4 3(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
M269-1 4(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
M213-2 5(4) 	<i>Strep canis</i> (v)	X	X
M201-1 6(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
M2-2 7(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
M421-1 8(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
M434-2 9(4) 	<i>E. coli</i> (v)	X	X
BO37-1 10(4) 	<i>E. faecalis</i> (v)	X	Vekst 
BO85-4 11(4) 	<i>E. faecalis</i> (v)	X	Vekst 
BO434-3 12(4) 	<i>E. coli</i> (v)	X	X
BO421-1 13(4) 	<i>Strep canis</i> (v)	X	X
BO422-2 14(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
BO273-1 15(4) 	<i>E. faecalis</i> (v)	X	X
BO274-1 16(4) 	<i>E. faecalis</i> (v)	X	Vekst 
B201-1 17(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
MA215-2 18(4) 	<i>S. canis</i> (v)	X	X
MA376-1 19(4) 	<i>E. coli</i> (v)	X	X
MA434-1 20(4) 	<i>E. coli</i> (v)	X	X

Tabell 22 viser at alle bakteriene i runde 4 vokste på blodagar, men ingen vokste på ESBL-skåler. Det ble her, som i runde 3, vurdert som lite sannsynlig at bakteriene ville vokse på MRSA-skåler, og dette ble derfor ikke testet. Det var vekst på tre CRE-skåler, dette var prøve 10(4), 11(4) og 16(4), hvor koloniene oppstod etter at den fargede kulturen hadde blitt trukket inn mot midten, slik som hadde blitt gjort med alle skåler med mulig, men usikker vekst tidligere. Tydelige enkeltkolonier oppstod i utstrykningen, og alle tre vokste raskt på nye CRE-skåler da de ble overført. 10(4) og 11(4) måtte trekkes litt i med podøse før veksten ble tydelig på skål nummer to, men 16(4) vokste mye bedre uten «hjelp».

Fotografier av de positive antibiotikaskålene, samt et eksempel på en negativ antibiotikaskål er inkludert i vedlegg 5.

3.2 MIC-resultater for F-bakterier


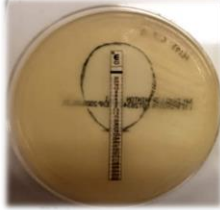

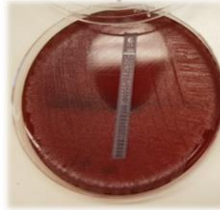
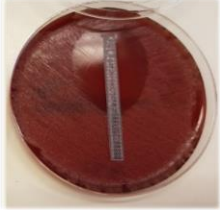


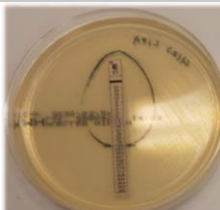
Det ble utført en rekke MIC-tester på bakteriene fra melken fra friske kyr. Noen F-bakterier ble testet på bakgrunn av hvilke antibiotikaskåler de vokste på, og andre basert på hva som ble funnet ved sekvensering. Flere tester burde ha blitt utført, men grunnet utbrudd av Coronavirus var dette ikke mulig å gjennomføre. Verdiene er vurdert opp mot EUCAST sine tabeller som ble oppdatert i januar 2020, selv om flere verdier ble lest av i 2019. Tabell 23-28 viser de samlede MIC-resultatene for alle testede F-bakterier.

Enkelte skåler vises med en svart ring rundt stripsen, her har inhiberingssonen blitt markert med tusj på baksiden av skålen, for å tydeliggjøre hvor bakteriene sluttet å vokse, da dette ikke kom tydelig frem på fotografier. Det må også nevnes at alle MIC-verdier er lest av direkte på skålen, disse vurderingene er ikke tatt fra fotografier inkludert i tabellene, da dette er ville vært mye vanskeligere å avgjøre.

Som beskrevet i seksjon 1.7 «Metodeteori», benyttes ECOFF og clinical breakpoint henholdsvis for å avgjøre om stammen skiller seg fra villtypen, og om den er klinisk resistent og dermed vil være problematisk å behandle.

Ciprofloxacin (CI): CI-strips ble brukt på *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* og *S. aureus* som hadde vokst på MRSA-skåler. I følge EUCAST, er disse bakteriene klinisk resistente mot ciprofloxacin ved MIC > 1 ng/μl og ECOFF er 1 ng/μl.

Tabell 23 viser ciprofloxacin MIC-resultatene for F-bakterier som vokste på MRSA-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
4(1)	1,25		
<p><i>S. haemolyticus:</i> Klinisk resistent mot ciprofloxacin, ECOFF oversteget. Det kommer ikke tydelig frem av bildene, da MIC-verdiene ikke har stor avstand på stripsen, men verdiene ble nøye lest av.</p>			
5(1)	0,19		
<p><i>S. haemolyticus:</i> Ikke klinisk resistent mot ciprofloxacin, ECOFF ikke oversteget</p>			
6(1)	0,19		
<p><i>S. haemolyticus:</i> Ikke klinisk resistent mot ciprofloxacin, ECOFF ikke oversteget</p>			
13(1)	0,125		
<p><i>S. haemolyticus:</i> Ikke klinisk resistent mot ciprofloxacin, ECOFF ikke oversteget. Nb, test utført på blodskål, da 13(1) ikke tålte MH-agar.</p>			
15(1)	0,25		
<p><i>S. aureus:</i> Ikke klinisk resistent mot ciprofloxacin, ECOFF ikke oversteget.</p>			
4(2)	0,125		
<p><i>S. epidermidis:</i> Ikke klinisk resistent mot ciprofloxacin, ECOFF ikke oversteget.</p>			



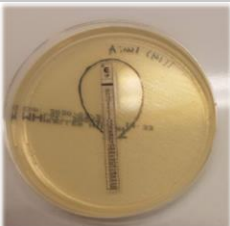

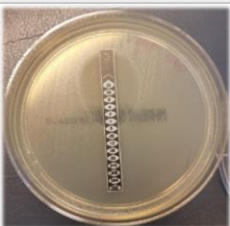
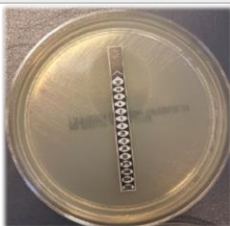
Meropenem (MP): MP-strips ble brukt på *E. faecalis* som hadde vokst på CRE-skåler. I følge EUCAST finnes det ikke clinical breakpoint for *Enterococcus* spp testet med meropenem, men ECOFF er 8 ng/μl.

Tabell 24 viser meropenem MIC-resultatene for F-bakterier som vokste på CRE-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
10(4)	1,25		
<i>E. faecalis</i> : Vokser ganske godt rundt meropenem-stripsen, men klinisk resistens kan ikke bestemmes uten gitt breakpoint. ECOFF ikke oversteget			
11(4)	1,25		
<i>E. faecalis</i> : Vokser ganske godt rundt meropenem-stripsen, men klinisk resistens kan ikke bestemmes uten gitt breakpoint. ECOFF ikke oversteget			
16(4)	1,5		
<i>E. faecalis</i> : Vokser godt rundt meropenem-stripsen, bedre enn 10(4) og 11(4), men klinisk resistens kan ikke bestemmes uten gitt breakpoint. ECOFF ikke oversteget			

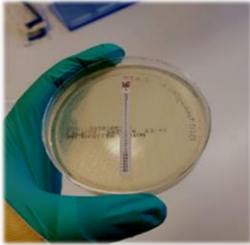
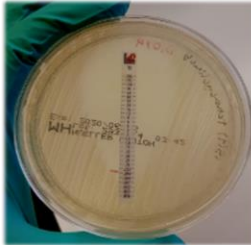

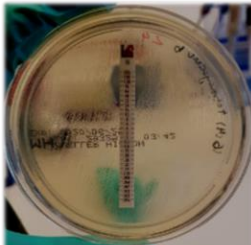
Imipenem (IPM): IPM-strips ble brukt på *E. faecalis* som hadde vokst på CRE-skåler. I følge EUCAST er *Enterococcus* spp klinisk resistent mot imipenem ved MIC > 4 ng/μl, og ECOFF er 4 ng/μl.

Tabell 25 viser imipenem MIC-resultatene for F-bakterier som vokste på CRE-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
10(4)	0,38		
<i>E. faecalis:</i> Ikke klinisk resistent mot imipenem, ECOFF ikke oversteget.			
11(4)	0,27		
<i>E. faecalis:</i> Ikke klinisk resistent mot imipenem, ECOFF ikke oversteget.			
16(4)	1,5		
<i>E. faecalis:</i> Ikke klinisk resistent mot imipenem, ECOFF ikke oversteget. (Nb, denne testen ble utført tidligere enn de to andre, og har derfor et annet stripsen-merke.)			

Tetracyclin (TE): TE-trips ble benyttet på *S. aureus* og *E. faecalis* som hadde vokst frem på henholdsvis MRSA-skåler og CRE-skåler. I følge EUCAST er *S. aureus* klinisk resistent mot Tetracyclin ved MIC > 2 ng/μl, og ECOFF er 1 ng/μl. Det finnes ikke clinical breakpoint for *Enterococcus* spp testet med tetracyclin, men ECOFF er 4 ng/μl.

Tabell 26 viser tetracyclin MIC-resultatene for F-bakterier som vokste på MRSA-skåler og CRE-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
15(1)	0.094		
<i>S. aureus:</i> Ikke klinisk resistent mot tetracyclin, ECOFF ikke oversteget.			
16(4)	24		
<i>E. faecalis:</i> Vokser veldig godt rundt tetracyclin-stripsen, men klinisk resistens kan ikke bestemmes uten gitt breakpoint. ECOFF oversteget.			

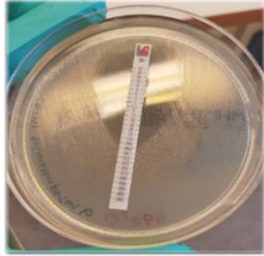
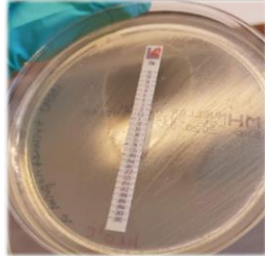
Streptomycin (S): S-strips ble benyttet på *E. faecalis* som hadde vokst frem på CRE-skåler. I følge EUCAST er *Enterococcus* spp klinisk resistent mot streptomycin ved MIC > 512 ng/μl og ECOFF er 512 ng/μl.

Tabell 27 viser streptomycin MIC-resultatene for F-bakterier som vokste på CRE-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
16(4)	≥ 1024		
<i>E. faecalis:</i> Klinisk resistent mot streptomycin, ECOFF oversteget.			

Trimetoprim (TM): TM-strips ble benyttet på *E. faecalis* som hadde vokst frem på CRE-skåler. I følge EUCAST finnes det ikke clinical breakpoint for *Enterococcus* spp testet med trimetoprim. Når det gjelder ECOFF er ikke denne bakterien oppført på trimetoprim-listen.

Tabell 28 viser trimetoprim MIC-resultatene for F-bakterier som vokste på CRE-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 1
16(4)	0,079		
<i>E. faecalis</i> : Ikke mulig å si noe om klinisk resistens eller ECOFF når det ikke er oppført i EUCAST. Stammen viste heller ingen ekstreme resultater i den ene eller andre enden av skalaen.			

Tabell 23-28 viser at det i all hovedsak ikke forekom verdier som oversteg clinical breakpoint eller ECOFF-verdiene gitt for bakterie og antibiotika, med unntak av prøve 4(1) for ciprofloxacin, som oversteg clinical breakpoint og ECOFF, og 16(4) som oversteg clinical breakpoint og ECOFF for streptomycin, og ECOFF for tetracyclin.

3.3 Ekstrahert DNA fra F-bakterier

Fra runde 1-4 ble DNA ekstrahert fra alle F-bakterier som hadde vokst på antibiotika-medier. Fra runde 1 ble DNA først ekstrahert med DNeasy og målt med NanoDrop, og deretter ble DNA ekstrahert med GenElute i tillegg og målt med både NanoDrop og Qubit. Fra runde 2-4 ble DNA kun ekstrahert med GenElute og målt med Qubit.

Tabell 29 viser DNA-konsentrasjon ([C] ved NanoDrop) og renhet (260/280, 260/230) til DNA fra F-bakterier, ekstrahert med GenElute og DNeasy, målt med NanoDrop og Qubit. Målinger som ikke ble utført er markert med en strek.

Prøve	NanoDrop (ng/μl) GenElute	NanoDrop (ng/μl) DNeasy	Qubit (ng/μl) GenElute
4(1): <i>S. haemolyticus</i>	[C]: 128,7 260/280: 1,88 260/230: 2,20	[C]: 31,6 260/280: 1,89 260/230: 2,09	76,1
5(1): <i>S. haemolyticus</i>	[C]: 138,5 260/280: 1,78 260/230: 1,46	[C]: 12,1 260/280: 1,86 260/230: 1,81	31,5
6(1): <i>S. haemolyticus</i>	[C]: 105,7 260/280: 1,75 260/230: 1,51	[C]: 7,8 260/280: 2,15 260/230: 1,38	59,5
13(1): <i>S. haemolyticus</i>	[C]: 96,1 260/280: 1,79 260/230: 1,60	[C]: 18,1 260/280: 2,00 260/230: 1,72	14,2
15(1): <i>S. aureus</i>	[C]: 104,0 260/280: 1,82 260/230: 1,76	[C]: 31,0 260/280: 1,91 260/230: 2,24	269
4(2): <i>S. epidermidis</i>	[C]: 59,7 260/280: 1,68 260/230: 1,38	-	177
10(4): <i>E. faecalis</i>	[C]: 129,0 260/280: 1,86 260/230: 2,7	-	110
11(4) <i>E. faecalis</i>	[C]: 162,9 260/280: 1,91 260/230: 2,31	-	88,7
16(4): <i>E. faecalis</i>	[C]: 114,7 260/280: 1,83 260/230: 2,79	-	112

DNA ekstrahert med DNeasy ble ikke brukt til mer enn ESBL qPCR og DNA-konsentrasjonen ble derfor aldri målt med Qubit i tillegg. Dette DNA-et er fryst, og kunne ha blitt målt for en komplett liste, men etter Coronautbruddet var det ikke lenger mulig å få tilgang til dette.

3.4 PCR-resultater for bakterier for F-bakterier

ESBL-multipleks qPCR

Fra runde 1, altså prøve 1(1)-21(1), ble alle prøvene undersøkt med en ESBL-multipleks qPCR med primerene ESBL1-2. Alle prøvene og de negative kontrollene ga negativt resultat. Det eneste positive resultatet var den positive ESBL2-kontrollen.

MRSA-multipleks qPCR:

Alle F-bakterier som vokste på MRSA-skåler, fra alle runder, det vil si vil si prøve 4(1), 5(1), 6(1), 13(1), 15(1) og 4(2) ble undersøkt med en MRSA-multipleks qPCR med primere for *mecA/mecC* og *spa*. 15(1) og 4(2) ble undersøkt av Alberto Bombelli. Den positive kontrollen med *mecA/mecC* -gener var positiv, men alle prøvene, samt de negative kontrollene, var negative.

Nb! Det henvises ikke til bilder av de negative qPCR-resultatene, hverken for ESBL eller MRSA, da det ikke er mulig å få tak i grafene som er lagret på maskinen på NMBU, på grunn av Coronavirus-utbruddet.

CAR-multipleks PCR:

Alle F-bakterier som vokste på CRE-skåler, altså 10(4), 11(4) og 16(4) ble undersøkt med en CAR-multipleks PCR, med primerene CAR1-2. Det ble ikke benyttet en negativ kontroll, og en positiv kontroll var ikke tilgjengelig. Ingen av prøvene ga positivt utslag. Gel-bildet er inkludert i vedlegg 2.

3.5 Sekvenserte F-bakterier

Prøve 4(1), 6(1), 15(1), 4(2) og 11(4) ble først sekvensert med MinION, men det var ikke mulig å få behandlet disse dataene i Galaxy, da Canu krasjet gjentatte ganger uten hjelpsom feilmelding. Senere ble alle F-bakterier som hadde vokst på antibiotikaskåler sekvensert med MiSeq, også de som var sekvensert med MinION. Prøve 4(1), 6(1) og 4(2) ble også vellykket kjørt gjennom Unicycler, men dette fungerte ikke med de andre. Hos prøve 6(1) fikk Unicycler assemblert et komplett sirkulært genom samt komplette sirkulære plasmider. Genfunnene er inkludert i tabell 30:

Tabell 30 viser alle resistensgener og virulensgener som ble funnet hos MiSeq- og MinION-sekvenserte F-bakterier, fra CARD, NCBI og VFDB, samt en kontroll av ID

Sekvensert prøve/ MaldiTOF-ID	Resistensgener	Virulensgener	ID fra sekvensert DNA (rMLST)
4(1) <i>S. haemolyticus</i>	<i>arlR, mgrA, norA</i>	<i>clpP, lip</i>	<i>S. haemolyticus</i> (100%)
5(1) <i>S. haemolyticus</i>	For lite data til å produsere contigs		
6(1) <i>S. haemolyticus</i>	<i>mgrA</i>	Ingen treff	<i>S. haemolyticus</i> (100%)
13(1) <i>S. haemolyticus</i>	<i>arlR, mgrA, norA</i>	<i>clpP, lip, sdrD</i>	<i>S. haemolyticus</i> (100%)
15(1) <i>S. aureus</i>	<i>arlR, arlS, dha-1, fosB, fosB-Saur, LmrS, mepA, mepR, mgrA, norA, tet38</i>	<i>adsA, aur, cap8A, cap8B, cap8C, cap8D, cap8E, cap8F, cap8G, cap8H, cap8I, cap8J, cap8K, cap8L, cap8M, cap8N, cap8O, cap8P, clfA, clfB, clpP, coa, ebp, esaA, esaB, esaC, esaD, esaE, esaF, esaG, esaH, esaI, esaJ, esaK, esaL, esaM, esaN, esaO, esaP, esaQ, esaR, esaS, esaT, esaU, esaV, esaW, esaX, esaY, esaZ, hly/hla, hysA, icaA, icaB, icaC, icaD, icaE, icaF, icaG, icaH, icaI, icaJ, icaK, icaL, icaM, icaN, icaO, icaP, icaQ, icaR, icaS, icaT, icaU, icaV, icaW, icaX, icaY, icaZ, isdA, isdB, isdC, isdD, isdE, isdF, isdG, lip, lukF-PV, map, sbi, sdrC, sdrD, spa, srtB, sspA, sspB, sspC, vWbp</i>	<i>S. aureus</i> (100%)
4(2) <i>S. epidermidis</i>	<i>arlR, dfrC, fosB-251804940, mgrA, norA</i>	<i>clfA, clfB, hld, lip, sdrC</i>	<i>S. epidermidis</i> (100%)
10(4) <i>E. faecalis</i>	<i>dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i>	<i>ace, bopD, bsh, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, prgB/asc10, sprE, srtC</i>	<i>E. faecalis</i> (100%)
11(4) <i>E. faecalis</i>	<i>ant(6)-Ia, dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i>	<i>ace, bopD, bsh, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, ef3023, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, sprE, srtC</i>	<i>E. faecalis</i> (100%)
16(4) <i>E. faecalis</i>	<i>ant(6)-Ia, dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, spw, tetM</i>	<i>ace, bopD, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, ef3023, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, sprE, srtC</i>	<i>E. faecalis</i> (100%)

Alle genene i tabell 30 ble funnet med contigs produsert med Shovill på MiSeq-data, med unntak av *hld* (markert med stjerne) hos 15(1), som ble funnet med contigs produsert med Unicycler på MiSeq-data kombinert med MinION-data. Mange resistensgener og virulensgener ble funnet hos alle de undersøkte bakteriene, og identitet ble bekreftet. For forklaring av genene, se seksjon 4.1 i diskusjon.

Prokka ble også benyttet, men siden dette gir en del usikre og enkelte hypotetiske svar, har ikke alle blitt undersøkt like nøye, og blir ikke inkludert sammen med treffene i CARD, NCBI og VFDB. Alle sekvenserte F-prøver og S-prøver har blitt undersøkt i Prokka, med søkeord som «resistance», «beta-lactamase», «transporter» og lignende. Alle relevante treff er inkludert i vedlegg 4, men ikke alle genene har blitt diskutert i denne oppgaven, da enkelte gir resistens mot substanser som ikke benyttes som medisin, eller fordi opphavet av genet var tvilsomt, eller lignende årsaker. Vedlegg 4 viser også hvilke gener som ble funnet i hvilke databaser. Prokka har i denne oppgaven blitt benyttet mer som en støtte-funksjon, for å hjelpe å forklare for eksempel hvorfor enkelte like prøver har fått forskjellige resultater på antibiotikaskål, eller for å se etter mer utfyllende resultater hos prøver med få gener, som for

eksempel prøve 6(1). De relevante genene funnet med Prokka hos sekvenserte F-bakterier er inkludert i tabell 31, sammen med Prokkas beskrivelse av genet:

Tabell 31 viser et utvalg av gener hos F-bakterier, funnet med Prokka. Gener med identisk eller nær identisk beskrivelse er gruppert sammen.

Prøve	Beskrivelse hentet fra Prokka	Interessant gen-funn i Prokka
4(1)	Multidrug resistance protein: MFS family	<i>mdtL</i>
4(1)	Teicoplanin resistance associated membrane	<i>tcaA</i>
4(1)	TetR family transcriptional regulator	<i>tetR</i>
6(1)	Bacitracin resistance protein, undecaprenyl	<i>bacA</i>
6(1)	MFS family major facilitator transporter	<i>bcr, emrA, narK, proP, tcaB, norA, mdtG</i>
6(1)	ABC transporter	<i>ccmA, pstS, phnC, phnD, potA, vraD, vraE</i>
6(1)	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
6(1)	Oxacillin resistance-related FmtC protein	<i>fmtC</i>
6(1)	MATE family multi-antimicrobial extrusion	<i>mepA, mepB</i>
6(1)	RND superfamily resistance-nodulation-cell	<i>secF</i>
6(1)	Multidrug resistance efflux pump SepA	<i>sepA</i>
6(1)	Teicoplanin resistance associated membrane	<i>tcaA, tcaR</i>
6(1)	TetR family transcriptional regulator	<i>tetR</i>
13(1)	Oxacillin resistance-related FmtC protein	<i>fmtC</i>
13(1)	MFS family major facilitator transporter	<i>proP</i>
15(1)	Bacitracin resistance protein, undecaprenyl	<i>bacA</i>
15(1)	MFS family major facilitator transporter	<i>bcr, emrA, narK, proP, sbnD, tcaB, norA</i>
15(1)	ABC transporter	<i>ccmA, fepD, isdD, isdE, phnC, phnD, potA, pstS, vraD, vraE, znuC</i>
15(1)	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
15(1)	Virulence protein	<i>esaC, esxB</i>
15(1)	Oxacillin resistance-related FmtC protein	<i>fmtC</i>
15(1)	Fosfomycin resistance protein FosB	<i>fosB</i>
15(1)	DMT superfamily drug/metabolite transporter	<i>glcU, rarD, rbsU</i>
15(1)	MATE family multi-antimicrobial extrusion	<i>mepA, mepB</i>
15(1)	RND superfamily resistance-nodulation-cell	<i>secF</i>
15(1)	Multidrug resistance efflux pump SepA	<i>sepA</i>
15(1)	Teicoplanin resistance associated membrane	<i>tcaA, tcaR</i>
15(1)	TetR family transcriptional regulator	<i>tetR</i>
4(2)	Bacitracin resistance protein, undecaprenyl	<i>bacA</i>
4(2)	MFS family major facilitator transporter	<i>bcr, emrA, narK, norA, tcaB</i>
4(2)	ABC transporter	<i>ccmA, phnC, phnD, potA, pstS, trkG, vraD, vraE, znuC</i>
4(2)	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
4(2)	Oxacillin resistance-related FmtC protein	<i>fmtC</i>
4(2)	DMT superfamily drug/metabolite transporter	<i>glcU, rarD, rbsU</i>
4(2)	RND superfamily resistance-nodulation-cell	<i>secF</i>
10(4)	ABC transporter	<i>adcC, artM, ecsA, ecsB, glnQ, mdxG, metN1-2, msmK, oppD, oppF, opuCD, pstA, pstB1-2, pstC, yadG, yadH, yclP, ykpA, ytcP, yteP</i>
10(4)	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
10(4)	Multidrug resistance protein: MFS family	<i>mdtL</i>
10(4)	Multidrug resistance protein: MATE family	<i>mepA</i>
10(4)	Tetracycline resistance ribosomal protection	<i>tet(M)</i>
11(4)	ABC transporter	<i>natA</i>
16(4)	ABC transporter	<i>yadG, yadH</i>

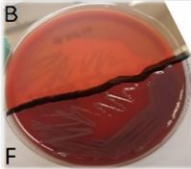

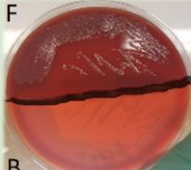

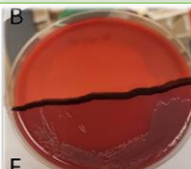

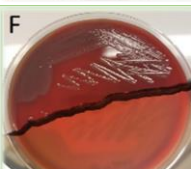



Tabell 31 viser alle interessante gener funnet med Prokka, i all hovedsak efflukspumper. Det er fokusert på gener som kan gi resistens mot antibiotika, samt gener som antyder virulens, men det var også gener som gir resistens mot for eksempel metaller som ikke benyttes som medisin.

3.6 Resultater for dyrkning av S-bakterier

Alle 12 S-bakterier vokste i løpet av et døgn på 37°C på blodskåler og på ESBL-skåler, som vist i tabell 32.

Tabell 32 viser hvordan S-bakteriene så ut på blodskåler og ESBL-skåler. Blodskålene vises fra forsiden og baksiden, markert henholdsvis med F og B.

Prøve	Bakterie	Blodskål	ESBL
ESBL_M34_a Stammen er tilsynelatende alfa-hemolytisk, basert på den svake grønnfargen som synes på undersiden av blodskålen.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M34_a, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M34_a, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.
ESBL_M34_b Det var ingen synlig grønnfarge på oversiden eller undersiden av skålen som tyder på hemolyse.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M34_b, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M34_b, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.
ESBL_M35_a Det var ingen synlig grønnfarge på oversiden eller undersiden av skålen som tyder på hemolyse.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M35_a, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M35_a, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.
ESBL_M36_a Stammen er tilsynelatende alfa-hemolytisk, basert på den svake grønnfargen som synes på undersiden av blodskålen.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M36_a, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M36_a, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.
ESBL_M36_b Stammen er tilsynelatende alfa-hemolytisk, basert på den svake grønnfargen som synes på undersiden av blodskålen.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M36_b, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M36_b, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.
ESBL_M36_c Det var ingen synlig grønnfarge på oversiden eller undersiden av skålen som tyder på hemolyse.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M36_c, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M36_c, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.
ESBL_M39_a Det var ingen synlig grønnfarge på oversiden eller undersiden av skålen som tyder på hemolyse.	<i>P. oleovorans</i>	Blodskål for ESBL_M39_a, forsiden (F) og baksiden (B). Forsiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på undersiden. Baksiden viser en rød væske med en mørk, tykk lag på oversiden.	ESBL-skål for ESBL_M39_a, viser en gullfarget væske med en mørk, tykk lag på undersiden.

Prøve	Bakterie	Blodskål	ESBL
ESBL_M39_b Stammen er tilsynelatende alfa-hemolytisk, basert på den svake grønnfargen som synes på undersiden av blodskålen.	<i>P. oleovorans</i>		
ESBL_M39_c Det var ingen synlig grønnfarge på oversiden eller undersiden av skålen som tyder på hemolyse.	<i>P. oleovorans</i>		
ESBL_M40_a Det var ingen synlig grønnfarge på oversiden eller undersiden av skålen som tyder på hemolyse.	<i>P. oleovorans</i>		
ESBL_M40_b Stammen er tilsynelatende alfa-hemolytisk, basert på den svake grønnfargen som synes på undersiden av blodskålen.	<i>P. oleovorans</i>		
ESBL_M40_c Stammen er tilsynelatende alfa-hemolytisk, basert på den svake grønnfargen som synes på undersiden av blodskålen.	<i>P. oleovorans</i>		

Tabell 32 viser vekst av S-bakterier. På blodskålene er det tatt bilder fra forsiden (F), og fra baksiden (B) for å best mulig vise hemolysen. Den er ikke like synlig på alle skåler, men den endelige vurderingen av hemolysen ble tatt ved å studere skålene, og ikke bildene.

Resultatene bekreftet at alle S-bakteriene hentet fra glyserolstocks var levedyktige og kunne vokse på ESBL-skåler, og dermed kunne brukes i videre undersøkelser.

Opprinnelige glyserolstocks var laget ved å plukke kolonier fra ESBL-skåler, dette var altså bekreftede resistente renkulturer, og dermed ble det ikke laget nye stocks av disse bakteriene.

3.7 MIC-resultater for S-bakterier

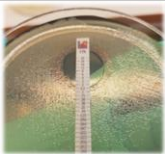
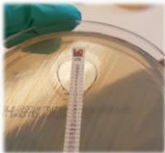


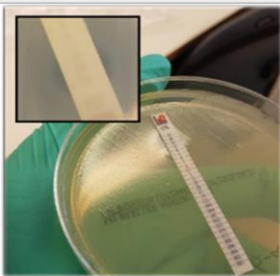
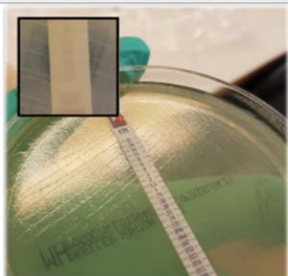
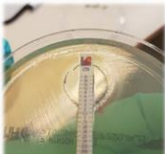

Som med F-bakterier, ble det utført en rekke MIC-tester på bakteriene fra melken til syke kyr, noen bakterier ble testet på bakgrunn av hvilke antibiotikaskåler de vokste på, og andre basert på hva som ble funnet ved sekvensering. Her også ble flere tester planlagt, men grunnet

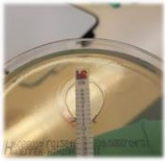

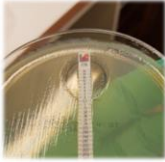


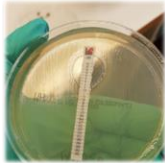
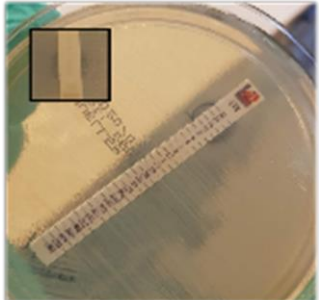
utbrudd av Coronavirus var dette ikke mulig å gjennomføre. Tabell 33-35 viser de samlede MIC-resultatene for alle testede S-bakterier:

(Nb, enkelte skåler vises her også med en svart ring rundt stripsen, som var for å tydeligere markere inhiberingssonen, denne er noen steder ikke satt helt riktig, etter en vurdering av hvordan denne veksten skulle leses av. Det er også noen røde streker som ble satt ved en ny vurdering, dette kan se noe forvirrende ut, og verdiene er oppgitt basert på endelig vurdering tatt ved øyemål, så det anbefales å se bort ifra disse strekene)

Cefotaksim (CTX): CTX-strips ble brukt på *P. oleovorans* som hadde vokst på ESBL-skåler. I følge EUCAST, finnes det ikke noe clinical breakpoint for *Pseudomonas* spp testet med cefotaksim, og ECOFF er kun oppgitt for *Pseudomonas aeruginosa*, som 32 ng/μl.


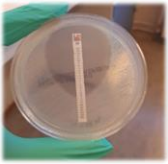
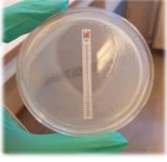

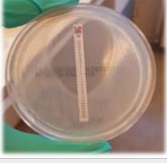




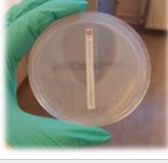



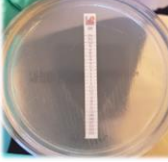
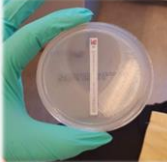
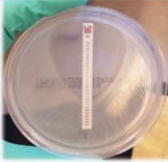
Tabell 33 viser cefotaksim MIC-resultatene for S-bakterier som vokste på ESBL-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.



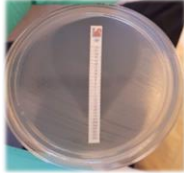
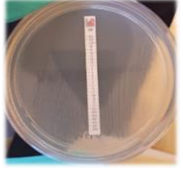
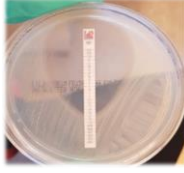
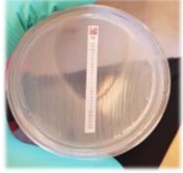
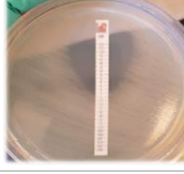
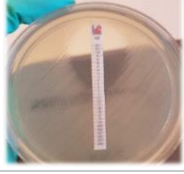
Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
ESBL_M34_a <i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.	2		
ESBL_M34_b <i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.	2		
ESBL_M35_a <i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.	2		
ESBL_M36_a <i>P. oleovorans</i> Skålen var nesten helt dekket av vekst, med en ekstremt liten inhiberingssone. Breakpoint er ikke oppgitt, men denne veksten skiller seg mye fra de andre prøvene. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.	14		
ESBL_M36_b <i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.	2,5		

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
ESBL_M36_c	3,5		
<i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M39_a	2,5		
<i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M39_b	2,5		
<i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M39_c	2		
<i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M40_a	1,5		
<i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M40_b	3,5		
<i>P. oleovorans</i> Clinical breakpoint ikke oppgitt, ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M40_c	12		
<i>P. oleovorans</i> Skålen var nesten helt dekket av vekst, med en ekstremt liten inhiberingszone. Breakpoint er ikke oppgitt, men denne veksten skiller seg mye fra de andre prøvene. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			

Cefepim (FEP): FEP-strips ble brukt på *P. oleovorans* som hadde vokst på ESBL-skåler. I følge EUCAST er clinical breakpoint for *Pseudomonas* spp testet med cefepim MIC > 8 ng/μl. ECOFF er kun oppgitt for *Pseudomonas aeruginosa* og er der 8 ng/μl.

Tabell 34 viser cefepim MIC-resultatene for *S*-bakterier som vokste på ESBL-skåler. Resultatet er beregnet gjennomsnitt av to paralleller.





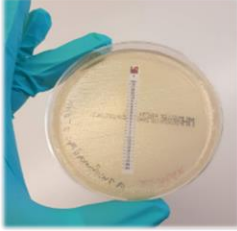
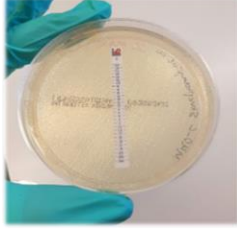
Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
ESBL_M34_a	0,38		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M34_b	0,38		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M35_a	0,38		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M36_a	4		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim, men høyere enn de fleste prøvene i denne runden. ECOFF for <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M36_b	0,38		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M36_c	0,50		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M39_a	0,16		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M39_b	0,38		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
ESBL_M39_c	0,25		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M40_a	0,19		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M40_b	0,38		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			
ESBL_M40_c	3		
<i>P. oleovorans</i> Ikke klinisk resistent mot cefepim, men høyere enn de fleste prøvene i denne runden. ECOFF for <i>P. aeruginosa</i> er ikke oversteget.			

Streptomycin (S): S-strips ble benyttet på *P. oleovorans* som hadde vokst på ESBL-skåler. I listene til EUCAST er streptomycin ikke listet opp under *Pseudomonas* spp og det er derfor ikke oppgitt clinical breakpoint her. *Pseudomonas* spp er heller ikke å finne under streptomycin, ECOFF er dermed heller ikke oppgitt.

Tabell 35 viser streptomycin MIC-resultatene for S-bakterier som vokste på CRE-skåler.

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
ESBL_M36_a	≥ 1024		
<i>P. oleovorans</i> Skålen var fullstendig dekket av vekst.			
ESBL_M36_c	8		
<i>P. oleovorans</i> Middels vekst, ingen ekstreme resultater.			

Prøve	MIC-snitt (ng/μl)	Parallell 1	Parallell 2
ESBL_M40_a	4		
<i>P. oleovorans</i> Det var svak og treg vekst hos stammen. Det var tydelig hvor inhiberingen startet, men det kommer ikke frem på bilder. Det var middels vekst.			
ESBL_M40_b	6		
<i>P. oleovorans</i> Middels vekst, ingen ekstreme resultater.			
ESBL_M40_c	≥ 1024		
<i>P. oleovorans</i> Skålen var fullstendig dekket av vekst.			

Tabell 33-35 viser få ekstreme resultater. Det er ikke mulig å fastslå noe sikkert der clinical breakpoint og ECOFF ikke er gitt, men det er tydelig at to av prøvene skiller seg ut, nemlig ESBL_M36_a og ESBL_M40_c. Disse to dekket nesten hele skålen med vekst rundt cefotaksim-stripsen, og viste større grad av resistens enn de andre prøvene testet med cefepim, selv om de ikke var klinisk resistente. Begge prøvene dekket skålene fullstendig med vekst rundt streptomycin-stripsene, som er et ekstremt resultat selv om EUCAST ikke har oppgitt informasjon om hva som tilsier klinisk resistens og avvik fra villtypen her.

3.8 Ekstrahert DNA fra S-bakterier

Alle 12 utvalgte prøver med S-bakterier fikk ekstrahert DNA med GenElute, og DNA-konsentrasjon ble målt med NanoDrop. Prøvene som ble sendt til sekvensering ble også målt med Qubit. Ekstrahert DNA er plassert i fryseren, så det kunne vært mulig å måle resten av prøvene med Qubit for en komplett liste, men det er ikke mulig å få tilgang til prøvene på grunn av Coronaviruspandemien. Det oppstod også en feil med NanoDrop-målingen av ESBL_M39_a, denne er derfor blank. Denne prøven ble ikke brukt videre og ble derfor ikke

målt eller ekstrahert på nytt, og det ble etter hvert heller ikke mulig da laben ble stengt.

Konsentrasjonene som ble målt er oppgitt i tabell 36.

Tabell 36 viser DNA-konsentrasjonen til DNA fra S-bakterier, ekstrahert med GenElute, målt med NanoDrop og Qubit. Målinger som ikke ble utført er markert med en strek. [C]= konsentrasjon ved NanoDrop, 260/230 og 260/280 = renhet.

Prøve	NanoDrop (ng/μl)	Qubit (ng/μl)
ESBL_M34_a, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 844,0 260/280: 1,92 260/230: 2,20	-
ESBL_M34_b, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 923,1 260/280: 1,94 260/230: 2,18	-
ESBL_M35_a, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 954,6 260/280: 1,92 260/230: 2,16	-
ESBL_M36_a, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 694,9 260/280: 1,90 260/230: 2,16	376
ESBL_M36_b, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 719,2 260/280: 1,91 260/230: 2,16	-
ESBL_M36_c, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 742,5 260/280: 1,95 260/230: 2,19	840
ESBL_M39_a, <i>P. oleovorans</i>	-	-
ESBL_M39_b, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 808,8 260/280: 1,93 260/230: 2,17	-
ESBL_M39_c, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 761,5 260/280: 1,91 260/230: 2,15	-
ESBL_M40_a, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 959,9 260/280: 1,91 260/230: 2,05	414
ESBL_M40_b, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 1206,8 260/280: 1,92 260/230: 2,14	620
ESBL_M40_c, <i>P. oleovorans</i>	[C]: 826,4 260/280: 1,89 260/230: 2,07	580

3.9 PCR-resultater for S-bakterier

ESBL-multipleks PCR:

Alle S-bakterier i denne oppgaven hadde bekreftet vekst på ESBL-skåler og ble derfor sjekket med ESBL-multipleks PCR med primerene ESBL1-4. Det var ikke lenger tilgang på en positiv kontroll og her ble det, som med CAR, vurdert som unødvendig med negativ kontroll. Etter å ha kjørt gelelektroforese på PCR-produktene viste det seg at det ikke var noen positive resultater. Gel-bildet er inkludert i vedlegg 2.

3.10 Sekvenserte S-bakterier

Etter helgenomsekvensering med MiSeq, og behandling av dataene i Galaxy, ble det gjort mange funn av både resistensgener og virulensgener hos S-bakteriene. Disse funnene er vist i tabell 37:

Tabell 37 viser alle virulensgener og resistensgener funnet ved MiSeq-sekvensering, fra CARD, NCBI og VFDB, + en ekstra sjekk av ID med rMLST. Bakterie-arten oppgitt var den med best score (%).

Prøve (16S-ID)	Resistensgener	Virulensgener	Beste ID fra sekvensert DNA (rMLST)
ESBL_M36_a <i>P.oleovorans</i>	<i>aac(6')-Ib7</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> (<i>strA</i>), <i>aph(6)-Ic</i> (<i>strB</i>), <i>cpxR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>mexB</i> , <i>opmH</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> »	<i>alg8</i> , <i>algA</i> , <i>algB</i> , <i>algC</i> , <i>algD</i> , <i>algE</i> , <i>algF</i> , <i>algG</i> , <i>algI</i> , <i>algL</i> , <i>algP/algR3</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>clpV1</i> , <i>dotU1</i> , <i>fha1</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flhA</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliO</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>hcp1</i> , <i>hsiB1/vipA</i> , <i>hsiC1/vipB</i> , <i>hsiF1</i> , <i>hsiG1</i> , <i>hsiI1</i> , <i>icmF1/tssM1</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>motY</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pill</i> , <i>pilI</i> , <i>pilM</i> , <i>pilN</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>ppkA</i> , <i>tagR</i> , <i>tsr</i> , <i>vgrG1a</i> , <i>waaA</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waaP</i> , <i>xcpA/pilD</i> , <i>xcpQ</i> , <i>xcpR</i> , <i>xcpS</i> , <i>xcpT</i> , <i>xcpV</i>	<i>P. oleovorans</i> (32%)
ESBL_M36_c <i>P.oleovorans</i>	<i>cpxR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>mexB</i> , <i>opmH</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>opxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> »	<i>algC</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgK</i> , <i>flgN</i> , <i>flhA</i> , <i>flhF</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>mtrD</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilE</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pill</i> , <i>pilI</i> , <i>pilM</i> , <i>pilO</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>pscP</i> , <i>waaA</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waaP</i> , <i>xcpA/pilD</i>	<i>P. oleovorans</i> (85%)
ESBL_M40_a <i>P.oleovorans</i>	<i>cpxR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexK</i> , <i>mexB</i> , <i>opmH</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>opxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> »	<i>algC</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgK</i> , <i>flgN</i> , <i>flhA</i> , <i>flhF</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>mtrD</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilA</i> , <i>pilB</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pill</i> , <i>pilI</i> , <i>pilM</i> , <i>pilO</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>waaA</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waaP</i> , <i>xcpA/pilD</i>	<i>P. oleovorans</i> (84%)
ESBL_M40_b <i>P.oleovorans</i>	<i>cpxR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>mexB</i> , <i>opmB</i> , <i>opmH</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>opxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> »	<i>algC</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgK</i> , <i>flgN</i> , <i>flhA</i> , <i>flhF</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>mtrD</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilE</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pill</i> , <i>pilI</i> , <i>pilM</i> , <i>pilO</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>pscP</i> , <i>tsr</i> , <i>waaA</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waaP</i> , <i>xcpA/pilD</i>	<i>P. oleovorans</i> (85%)
ESBL_M40_c <i>P.oleovorans</i>	<i>aac(6')-Ib7</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> (<i>strA</i>), <i>aph(6)-Ic</i> (<i>strB</i>), <i>cpxR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>mexB</i> , <i>opmH</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>opxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> »	<i>alg8</i> , <i>algA</i> , <i>algB</i> , <i>algC</i> , <i>algD</i> , <i>algE</i> , <i>algF</i> , <i>algG</i> , <i>algI</i> , <i>algL</i> , <i>algP/algR3</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>clpV1</i> , <i>dotU1</i> , <i>fha1</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flhA</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliO</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>hcp1</i> , <i>hsiB1/vipA</i> , <i>hsiC1/vipB</i> , <i>hsiF1</i> , <i>hsiG1</i> , <i>hsiI1</i> , <i>icmF1/tssM1</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>motY</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pill</i> , <i>pilI</i> , <i>pilM</i> , <i>pilN</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>ppkA</i> , <i>pvdH</i> , <i>tagR</i> , <i>tsr</i> , <i>vgrG1a</i> , <i>waaA</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waaP</i> , <i>xcpA/pilD</i> , <i>xcpQ</i> , <i>xcpR</i> , <i>xcpS</i> , <i>xcpT</i> , <i>xcpV</i>	<i>P. oleovorans</i> (32%)

Alle genene i tabell 37 ble funnet med contigs produsert med Shovill på MiSeq-data. Mange resistensgener og virulensgener ble funnet hos alle de undersøkte bakteriene, og identitet ble undersøkt. Som vist var enkelte prøver ikke 100% bestemt en *P. oleovorans*, men ingen andre potensielle treff var høyere enn 32%, og alle andre alternativer var fortsatt en type

Pseudomonas. Alle rMLST-resultatene er inkludert i vedlegg 3. For forklaring av genene i tabell 37, se seksjon 4.2 i diskusjon. I tillegg til å benytte NCBI, CARD og VFDB, ble Prokka benyttet for å finne ytterligere gener av interesse hos *S*-bakteriene. Mulige gener funnet med Prokka vises i tabell 38:

Tabell 38 viser et utvalg av gener hos *S*-bakterier, funnet med Prokka. Gener med identisk eller nær identisk beskrivelse er gruppert sammen.

Prøve	Beskrivelse hentet fra Prokka	Interessant gen-funn i Prokka
ESBL_M36_a	Multidrug efflux pump subunit	<i>acrA, acrB</i>
ESBL_M36_a	Beta-lactamase	<i>ampC</i>
ESBL_M36_a	ABC transporter	<i>artJ, InrL, uup, ydcV, yejB, yejE, yhdY, yojl, ytrE</i>
ESBL_M36_a	MFS family major facilitator transporter	<i>Bcr, emrA, emrB, mdtH</i>
ESBL_M36_a	Efflux pump membrane transporter/ periplasmic linker	<i>bepD, bepE</i>
ESBL_M36_a	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
ESBL_M36_a	Multidrug resistance protein: RND family	<i>mdtA, mdtB, mdtC, mexA, mexB, oqxB32, oqxB7</i>
ESBL_M36_a	Multidrug resistance protein: MATE family	<i>mdtK</i>
ESBL_M36_a	Virulence transcriptional regulatory protein	<i>phoP</i>
ESBL_M36_c	ABC transporter	<i>artI, artJ, bmrA, InrL, uup, ydcV, yejB, yejE, yhdY, ytrE</i>
ESBL_M36_c	MFS family major facilitator transporter	<i>bcr</i>
ESBL_M36_c	Efflux pump membrane transporter/ periplasmic linker	<i>bepE, bepF</i>
ESBL_M36_c	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
ESBL_M36_c	Colistin resistance protein	<i>emrB</i>
ESBL_M36_c	Multidrug resistance protein: RND family	<i>mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mexA, mexB, oqxB7</i>
ESBL_M36_c	Multidrug resistance protein: MATE family	<i>mdtK</i>
ESBL_M36_c	Virulence transcriptional regulatory protein	<i>phoP</i>
ESBL_M40_a	Multidrug resistance protein: RND family	<i>mdtB</i>
ESBL_M40_a	Tetracycline resistance protein TetO	<i>tetO</i>
ESBL_M40_a	ABC transporter	<i>ydcU, ydcV, yhdY</i>
ESBL_M40_b	Multidrug resistance protein: RND family	<i>mdtA</i>
ESBL_M40_c	Multidrug efflux pump subunit	<i>acrA, acrB</i>
ESBL_M40_c	Beta-lactamase	<i>ampC</i>
ESBL_M40_c	ABC transporter	<i>artJ, InrL, uup, yaaA, ydcV, yejB, yejE, yhdY, yojl, ytrE</i>
ESBL_M40_c	MFS family major facilitator transporter	<i>bcr, emrA, emrB, mdtH</i>
ESBL_M40_c	Efflux pump periplasmic linker / membrane transporter	<i>bepD, bepE, bepF</i>
ESBL_M40_c	Conserved virulence factor B	<i>cvfB</i>
ESBL_M40_c	Multidrug resistance protein: RND family	<i>mdtA, mdtB, mdtC, mexA, mexB, oqxB32, oqxB7</i>
ESBL_M40_c	Multidrug resistance protein: MATE family	<i>mdtK</i>
ESBL_M40_c	Virulence transcriptional regulatory protein	<i>phoP</i>

Tabell 38 viser alle interessante gener fra *S*-bakterier funnet med Prokka, i all hovedsak efflukspumper, slik som med *F*-bakterier. Det er her også fokusert på gener som kan gi resistens mot antibiotika, samt gener som antyder virulens, men det var også gener som gir resistens mot for eksempel metaller som ikke benyttes som medisin. Se vedlegg 4 for fullstendig liste over mulig relevante Prokka-funn.

3.11 Resultater for melkeprøver

Melkeprøver ble inokulert på blodskåler, CRE-skåler, MRSA-skåler og ESBL-skåler, blodskålene ble inkubert anaerobt og aerobt, og antibiotikaskålene aerobt, alt ved 37°C. Alle 40 prøver, JF461-JF500, vokste anaerobt og/eller aerobt på blodskål, men det var ingen vekst på noen av CRE-, ESBL-, eller MRSA-skålene. Alberto Bombelli utførte to ekstra slike runder med masterstudent Stina Cathrin Nautnes, men det var ingen positive resultater på de neste rundene. Nautnes bekreftet disse resultatene, totalt ble 120 speneprøver testet, uten noen positive resultater på noen antibiotikaskåler.

3.12 Oppsummering av alle sekvenserte prøver

Etter å ha testet 81 F-prøver fra glyserolstocks, 12 S-prøver fra ESBL, og 40 melkeprøver (alternativt 120, dersom Nautnes sine resultater også inkluderes) på tre forskjellige antibiotikaskåler, satt det igjen 14 positive (resistente på antibiotikaskål) prøver som ble sekvensert. Alle tester utført på disse og alle resultater er oppsummert i tabell 39 og 40. Tabellene viser kun F-bakterier og S-bakterier, da ingen melkeprøver var positive.

Tabell 39 viser hvordan alle resistente F-bakterier har blitt behandlet, samt resultatene fra alle undersøkelsene som ble utført på disse prøvene. [C]= NanoDrop-konsentrasjon, 260/280 og 260/230 = renhet.

Prøve	Vekst	MIC x2 (ng/µl)	NanoDrop (ng/µl) -Qubit (ng/µl)	Multipleks PCR	Ekstrahert ↓ sekvensert	Gener funnet ved helgenomsekvensering og CARD, NCBI og VFDB	Gener funnet med Prokka
4(1): B192-2 <i>S. haemolyticus</i>	MRSA (2x) Blod (β)	CIP: 1,25	[C]: 128,7 260/280:1,88 260/230: 2,20 -Q: 76,1	qPCR, MRSA- multipleks: Negativ qPCR, ESBL1-4- multipleks: Negativ	GenElute G+ med Lysostaphin ↓ MinION MiSeq	Resistensgener: <i>arlR, mgrA, norA</i> Virulensgener: <i>clpP, lip</i>	<i>mdtL, tcaA, tetR</i>
5(1): BO154-1 <i>S. haemolyticus</i>	MRSA (2x) Blod (β)	CIP: 0,19	[C]: 138,5 260/280::1,78 260/230:1,46 - Q: 31,5	qPCR, MRSA- multipleks: Negativ qPCR, ESBL1-4- multipleks: Negativ	GenElute G+ med Lysostaphin ↓ MiSeq	For lite MiSeq-data, ikke mulig å sekvensere på nytt på grunn av Coronavirus.	-
6(1): BO168-1 <i>S. haemolyticus</i>	MRSA (2x) Blod (β)	CIP: 0,19	[C]: 105,7 260/280::1,75 260/230:1,51 - Q: 59,5	qPCR, MRSA- multipleks: Negativ qPCR, ESBL1-4- multipleks: Negativ	GenElute G+ med Lysostaphin ↓ MinION MiSeq	Ingen treff	<i>bacA, bcr, narK, proP, tcaB, norA, ccmA, pstS, phnC, phnD, potA, vraD, vraE, cvfB, emrA, mdtG, fmcC, mepA, mepB, secF, sepA, tcaA, tcaR, telA, tetR,</i>
13(1): BO33-1 <i>S. haemolyticus</i>	MRSA (2x) Blod (β)	CIP: 0,125	[C]: 96,1 260/280::1,79 260/230:1,60 - Q: 14,2	qPCR, MRSA- multipleks: Negativ qPCR, ESBL1-4- multipleks: Negativ	GenElute G+ med Lysostaphin ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>arlR, mgrA, norA</i> Virulensgener: <i>clpP, lip, sdrD</i>	<i>fmcC, proP</i>
15(1): B172-1 <i>S. aureus</i>	MRSA (2x) Blod (β)	CIP: 0,25 TE: 0,09	[C]: 104,0 260/280::1,82 30: 1,76 - Q: 269	qPCR, MRSA- multipleks: Negativ qPCR, ESBL1-4- multipleks: Negativ	GenElute G+ med Lysostaphin ↓ MinION MiSeq	Resistensgener: <i>arlR, arlS, dha-1, fosB, fosB-Saur, LmrS, mepA, mepR, mgrA, norA, tet38</i> Virulensgener: <i>adsA, aur, cap8A, cap8B, cap8C, cap8D, cap8E, cap8F, cap8G, cap8H, cap8I, cap8J, cap8K, cap8L, cap8M, cap8N, cap8O, cap8P, clfA, clfB, clpP, coa, ebp, esaA, esaB, esaC, esaD, esaE, esaF, esaG, esaH, esaI, esaJ, esaK, esaL, esaM, esaN, esaO, esaP, esaQ, esaR, esaS, esaT, esaU, esaV, esaW, esaX, esaY, esaZ, esaAA, esaAB, esaAC, esaAD, esaAE, esaAF, esaAG, esaAH, esaAI, esaAJ, esaAK, esaAL, esaAM, esaAN, esaAO, esaAP, esaAQ, esaAR, esaAS, esaAT, esaAU, esaAV, esaAW, esaAX, esaAY, esaAZ, esaBA, esaBB, esaBC, esaBD, esaBE, esaBF, esaBG, esaBH, esaBI, esaBJ, esaBK, esaBL, esaBM, esaBN, esaBO, esaBP, esaBQ, esaBR, esaBS, esaBT, esaBU, esaBV, esaBW, esaBX, esaBY, esaBZ, esaCA, esaCB, esaCC, esaCD, esaCE, esaCF, esaCG, esaCH, esaCI, esaCJ, esaCK, esaCL, esaCM, esaCN, esaCO, esaCP, esaCQ, esaCR, esaCS, esaCT, esaCU, esaCV, esaCW, esaCX, esaCY, esaCZ, esaDA, esaDB, esaDC, esaDD, esaDE, esaDF, esaDG, esaDH, esaDI, esaDJ, esaDK, esaDL, esaDM, esaDN, esaDO, esaDP, esaDQ, esaDR, esaDS, esaDT, esaDU, esaDV, esaDW, esaDX, esaDY, esaDZ, esaEA, esaEB, esaEC, esaED, esaEE, esaEF, esaEG, esaEH, esaEI, esaEJ, esaEK, esaEL, esaEM, esaEN, esaEO, esaEP, esaEQ, esaER, esaES, esaET, esaEU, esaEV, esaEW, esaEX, esaEY, esaEZ, esaFA, esaFB, esaFC, esaFD, esaFE, esaFF, esaFG, esaFH, esaFI, esaFJ, esaFK, esaFL, esaFM, esaFN, esaFO, esaFP, esaFQ, esaFR, esaFS, esaFT, esaFU, esaFV, esaFW, esaFX, esaFY, esaFZ, esaGA, esaGB, esaGC, esaGD, esaGE, esaGF, esaGH, esaGI, esaGJ, esaGK, esaGL, esaGM, esaGN, esaGO, esaGP, esaGQ, esaGR, esaGS, esaGT, esaGU, esaGV, esaGW, esaGX, esaGY, esaGZ, esaHA, esaHB, esaHC, esaHD, esaHE, esaHF, esaHG, esaHH, esaHI, esaHJ, esaHK, esaHL, esaHM, esaHN, esaHO, esaHP, esaHQ, esaHR, esaHS, esaHT, esaHU, esaHV, esaHW, esaHX, esaHY, esaHZ, esaIA, esaIB, esaIC, esaID, esaIE, esaIF, esaIG, esaIH, esaII, esaIJ, esaIK, esaIL, esaIM, esaIN, esaIO, esaIP, esaIQ, esaIR, esaIS, esaIT, esaIU, esaIV, esaIW, esaIX, esaIY, esaIZ, esaJA, esaJB, esaJC, esaJD, esaJE, esaJF, esaJG, esaJH, esaJI, esaJJ, esaJK, esaJL, esaJM, esaJN, esaJO, esaJP, esaJQ, esaJR, esaJS, esaJT, esaJU, esaJV, esaJW, esaJX, esaJY, esaJZ, esaKA, esaKB, esaKC, esaKD, esaKE, esaKF, esaKG, esaKH, esaKI, esaKJ, esaKK, esaKL, esaKM, esaKN, esaKO, esaKP, esaKQ, esaKR, esaKS, esaKT, esaKU, esaKV, esaKW, esaKX, esaKY, esaKZ, esaLA, esaLB, esaLC, esaLD, esaLE, esaLF, esaLG, esaLH, esaLI, esaLJ, esaLK, esaLM, esaLN, esaLO, esaLP, esaLQ, esaLR, esaLS, esaLT, esaLU, esaLV, esaLW, esaLX, esaLY, esaLZ, esaMA, esaMB, esaMC, esaMD, esaME, esaMF, esaMG, esaMH, esaMI, esaMJ, esaMK, esaML, esaMN, esaMO, esaMP, esaMQ, esaMR, esaMS, esaMT, esaMU, esaMV, esaMW, esaMX, esaMY, esaMZ, esaNA, esaNB, esaNC, esaND, esaNE, esaNF, esaNG, esaNH, esaNI, esaNJ, esaNK, esaNL, esaNO, esaNP, esaNQ, esaNR, esaNS, esaNT, esaNU, esaNV, esaNW, esaNX, esaNY, esaNZ, esaOA, esaOB, esaOC, esaOD, esaOE, esaOF, esaOG, esaOH, esaOI, esaOJ, esaOK, esaOL, esaOM, esaON, esaOO, esaOP, esaOQ, esaOR, esaOS, esaOT, esaOU, esaOV, esaOW, esaOX, esaOY, esaOZ, esaPA, esaPB, esaPC, esaPD, esaPE, esaPF, esaPG, esaPH, esaPI, esaPJ, esaPK, esaPL, esaPM, esaPN, esaPO, esaPP, esaPQ, esaPR, esaPS, esaPT, esaPU, esaPV, esaPW, esaPX, esaPY, esaPZ, esaQA, esaQB, esaQC, esaQD, esaQE, esaQF, esaQG, esaQH, esaQI, esaQJ, esaQK, esaQL, esaQM, esaQN, esaQO, esaQP, esaQQ, esaQR, esaQS, esaQT, esaQU, esaQV, esaQW, esaQX, esaQY, esaQZ, esaRA, esaRB, esaRC, esaRD, esaRE, esaRF, esaRG, esaRH, esaRI, esaRJ, esaRK, esaRL, esaRM, esaRN, esaRO, esaRP, esaRQ, esaRR, esaRS, esaRT, esaRU, esaRV, esaRW, esaRX, esaRY, esaRZ, esaSA, esaSB, esaSC, esaSD, esaSE, esaSF, esaSG, esaSH, esaSI, esaSJ, esaSK, esaSL, esaSM, esaSN, esaSO, esaSP, esaSQ, esaSR, esaSS, esaST, esaSU, esaSV, esaSW, esaSX, esaSY, esaSZ, esaTA, esaTB, esaTC, esaTD, esaTE, esaTF, esaTG, esaTH, esaTI, esaTJ, esaTK, esaTL, esaTM, esaTN, esaTO, esaTP, esaTQ, esaTR, esaTS, esaTT, esaTU, esaTV, esaTW, esaTX, esaTY, esaTZ, esaUA, esaUB, esaUC, esaUD, esaUE, esaUF, esaUG, esaUH, esaUI, esaUJ, esaUK, esaUL, esaUM, esaUN, esaUO, esaUP, esaUQ, esaUR, esaUS, esaUT, esaUU, esaUV, esaUW, esaUX, esaUY, esaUZ, esaVA, esaVB, esaVC, esaVD, esaVE, esaVF, esaVG, esaVH, esaVI, esaVJ, esaVK, esaVL, esaVM, esaVN, esaVO, esaVP, esaVQ, esaVR, esaVS, esaVT, esaVU, esaVV, esaVW, esaVX, esaVY, esaVZ, esaWA, esaWB, esaWC, esaWD, esaWE, esaWF, esaWG, esaWH, esaWI, esaWJ, esaWK, esaWL, esaWM, esaWN, esaWO, esaWP, esaWQ, esaWR, esaWS, esaWT, esaWU, esaWV, esaWW, esaWX, esaWY, esaWZ, esaXA, esaXB, esaXC, esaXD, esaXE, esaXF, esaXG, esaXH, esaXI, esaXJ, esaXK, esaXL, esaXM, esaXN, esaXO, esaXP, esaXQ, esaXR, esaXS, esaXT, esaXU, esaXV, esaXW, esaXX, esaXY, esaXZ, esaYA, esaYB, esaYC, esaYD, esaYE, esaYF, esaYG, esaYH, esaYI, esaYJ, esaYK, esaYL, esaYM, esaYN, esaYO, esaYP, esaYQ, esaYR, esaYS, esaYT, esaYU, esaYV, esaYW, esaYX, esaYY, esaYZ, esaZA, esaZB, esaZC, esaZD, esaZE, esaZF, esaZG, esaZH, esaZI, esaZJ, esaZK, esaZL, esaZM, esaZN, esaZO, esaZP, esaZQ, esaZR, esaZS, esaZT, esaZU, esaZV, esaZW, esaZX, esaZY, esaZZ</i>	<i>bacA, bcr, narK, proP, sbnD, tcaB, norA, ccmA, fepD, isdD, isdE, phnC, phnD, potA, pstS, vraD, vraE, znuC, cvfB, emrA, esaC, esaD, esaE, esaF, esaG, esaH, esaI, esaJ, esaK, esaL, esaM, esaN, esaO, esaP, esaQ, esaR, esaS, esaT, esaU, esaV, esaW, esaX, esaY, esaZ, esaAA, esaAB, esaAC, esaAD, esaAE, esaAF, esaAG, esaAH, esaAI, esaAJ, esaAK, esaAL, esaAM, esaAN, esaAO, esaAP, esaAQ, esaAR, esaAS, esaAT, esaAU, esaAV, esaAW, esaAX, esaAY, esaAZ, esaBA, esaBB, esaBC, esaBD, esaBE, esaBF, esaBG, esaBH, esaBI, esaBJ, esaBK, esaBL, esaBM, esaBN, esaBO, esaBP, esaBQ, esaBR, esaBS, esaBT, esaBU, esaBV, esaBW, esaBX, esaBY, esaBZ, esaCA, esaCB, esaCC, esaCD, esaCE, esaCF, esaCG, esaCH, esaCI, esaCJ, esaCK, esaCL, esaCM, esaCN, esaCO, esaCP, esaCQ, esaCR, esaCS, esaCT, esaCU, esaCV, esaCW, esaCX, esaCY, esaCZ, esaDA, esaDB, esaDC, esaDD, esaDE, esaDF, esaDG, esaDH, esaDI, esaDJ, esaDK, esaDL, esaDM, esaDN, esaDO, esaDP, esaDQ, esaDR, esaDS, esaDT, esaDU, esaDV, esaDW, esaDX, esaDY, esaDZ, esaEA, esaEB, esaEC, esaED, esaEE, esaEF, esaEG, esaEH, esaEI, esaEJ, esaEK, esaEL, esaEM, esaEN, esaEO, esaEP, esaEQ, esaER, esaES, esaET, esaEU, esaEV, esaEW, esaEX, esaEY, esaEZ, esaFA, esaFB, esaFC, esaFD, esaFE, esaFF, esaFG, esaFH, esaFI, esaFJ, esaFK, esaFL, esaFM, esaFN, esaFO, esaFP, esaFQ, esaFR, esaFS, esaFT, esaFU, esaFV, esaFW, esaFX, esaFY, esaFZ, esaGA, esaGB, esaGC, esaGD, esaGE, esaGF, esaGH, esaGI, esaGJ, esaGK, esaGL, esaGM, esaGN, esaGO, esaGP, esaGQ, esaGR, esaGS, esaGT, esaGU, esaGV, esaGW, esaGX, esaGY, esaGZ, esaHA, esaHB, esaHC, esaHD, esaHE, esaHF, esaHG, esaHH, esaHI, esaHJ, esaHK, esaHL, esaHM, esaHN, esaHO, esaHP, esaHQ, esaHR, esaHS, esaHT, esaHU, esaHV, esaHW, esaHX, esaHY, esaHZ, esaIA, esaIB, esaIC, esaID, esaIE, esaIF, esaIG, esaIH, esaII, esaIJ, esaIK, esaIL, esaIM, esaIN, esaIO, esaIP, esaIQ, esaIR, esaIS, esaIT, esaIU, esaIV, esaIW, esaIX, esaIY, esaIZ, esaJA, esaJB, esaJC, esaJD, esaJE, esaJF, esaJG, esaJH, esaJI, esaJJ, esaJK, esaJL, esaJM, esaJN, esaJO, esaJP, esaJQ, esaJR, esaJS, esaJT, esaJU, esaJV, esaJW, esaJX, esaJY, esaJZ, esaKA, esaKB, esaKC, esaKD, esaKE, esaKF, esaKG, esaKH, esaKI, esaKJ, esaKK, esaKL, esaKM, esaKN, esaKO, esaKP, esaKQ, esaKR, esaKS, esaKT, esaKU, esaKV, esaKW, esaKX, esaKY, esaKZ, esaLA, esaLB, esaLC, esaLD, esaLE, esaLF, esaLG, esaLH, esaLI, esaLJ, esaLK, esaLM, esaLN, esaLO, esaLP, esaLQ, esaLR, esaLS, esaLT, esaLU, esaLV, esaLW, esaLX, esaLY, esaLZ, esaMA, esaMB, esaMC, esaMD, esaME, esaMF, esaMG, esaMH, esaMI, esaMJ, esaMK, esaML, esaMN, esaMO, esaMP, esaMQ, esaMR, esaMS, esaMT, esaMU, esaMV, esaMW, esaMX, esaMY, esaMZ, esaNA, esaNB, esaNC, esaND, esaNE, esaNF, esaNG, esaNH, esaNI, esaNJ, esaNK, esaNL, esaNO, esaNP, esaNQ, esaNR, esaNS, esaNT, esaNU, esaNV, esaNW, esaNX, esaNY, esaNZ, esaOA, esaOB, esaOC, esaOD, esaOE, esaOF, esaOG, esaOH, esaOI, esaOJ, esaOK, esaOL, esaOM, esaON, esaOO, esaOP, esaOQ, esaOR, esaOS, esaOT, esaOU, esaOV, esaOW, esaOX, esaOY, esaOZ, esaPA, esaPB, esaPC, esaPD, esaPE, esaPF, esaPG, esaPH, esaPI, esaPJ, esaPK, esaPL, esaPM, esaPN, esaPO, esaPP, esaPQ, esaPR, esaPS, esaPT, esaPU, esaPV, esaPW, esaPX, esaPY, esaPZ, esaQA, esaQB, esaQC, esaQD, esaQE, esaQF, esaQG, esaQH, esaQI, esaQJ, esaQK, esaQL, esaQM, esaQN, esaQO, esaQP, esaQQ, esaQR, esaQS, esaQT, esaQU, esaQV, esaQW, esaQX, esaQY, esaQZ, esaRA, esaRB, esaRC, esaRD, esaRE, esaRF, esaRG, esaRH, esaRI, esaRJ, esaRK, esaRL, esaRM, esaRN, esaRO, esaRP, esaRQ, esaRR, esaRS, esaRT, esaRU, esaRV, esaRW, esaRX, esaRY, esaRZ, esaSA, esaSB, esaSC, esaSD, esaSE, esaSF, esaSG, esaSH, esaSI, esaSJ, esaSK, esaSL, esaSM, esaSN, esaSO, esaSP, esaSQ, esaSR, esaSS, esaST, esaSU, esaSV, esaSW, esaSX, esaSY, esaSZ, esaTA, esaTB, esaTC, esaTD, esaTE, esaTF, esaTG, esaTH, esaTI, esaTJ, esaTK, esaTL, esaTM, esaTN, esaTO, esaTP, esaTQ, esaTR, esaTS, esaTT, esaTU, esaTV, esaTW, esaTX, esaTY, esaTZ, esaUA, esaUB, esaUC, esaUD, esaUE, esaUF, esaUG, esaUH, esaUI, esaUJ, esaUK, esaUL, esaUM, esaUN, esaUO, esaUP, esaUQ, esaUR, esaUS, esaUT, esaUU, esaUV, esaUW, esaUX, esaUY, esaUZ, esaVA, esaVB, esaVC, esaVD, esaVE, esaVF, esaVG, esaVH, esaVI, esaVJ, esaVK, esaVL, esaVM, esaVN, esaVO, esaVP, esaVQ, esaVR, esaVS, esaVT, esaVU, esaVV, esaVW, esaVX, esaVY, esaVZ, esaWA, esaWB, esaWC, esaWD, esaWE, esaWF, esaWG, esaWH, esaWI, esaWJ, esaWK, esaWL, esaWM, esaWN, esaWO, esaWP, esaWQ, esaWR, esaWS, esaWT, esaWU, esaWV, esaWW, esaWX, esaWY, esaWZ, esaXA, esaXB, esaXC, esaXD, esaXE, esaXF, esaXG, esaXH, esaXI, esaXJ, esaXK, esaXL, esaXM, esaXN, esaXO, esaXP, esaXQ, esaXR, esaXS, esaXT, esaXU, esaXV, esaXW, esaXX, esaXY, esaXZ, esaYA, esaYB, esaYC, esaYD, esaYE, esaYF, esaYG, esaYH, esaYI, esaYJ, esaYK, esaYL, esaYM, esaYN, esaYO, esaYP, esaYQ, esaYR, esaYS, esaYT, esaYU, esaYV, esaYW, esaYX, esaYY, esaYZ, esaZA, esaZB, esaZC, esaZD, esaZE, esaZF, esaZG, esaZH, esaZI, esaZJ, esaZK, esaZL, esaZM, esaZN, esaZO, esaZP, esaZQ, esaZR, esaZS, esaZT, esaZU, esaZV, esaZW, esaZX, esaZY, esaZZ</i>
4(2): BO16-1 <i>S. epidermidis</i>	MRSA (2x) Blod (γ)	CIP: 0,125	[C]: 59,7 260/280: 1,68 260/230: 1,38 - Q: 177	qPCR, MRSA- multipleks: Negativ	GenElute G+ med Lysostaphin ↓ MinION MiSeq	Resistensgener: <i>arlR, dfrC, fosB-251804940, mgrA, norA</i> Virulensgener: <i>clfA, clfB, hld, lip, sdrC</i>	<i>bacA, bcr, narK, norA, tcaB, ccmA, phnC, phnD, potA, pstS, trkG, vraD, vraE, znuC, cvfB, emrA, fmcC, glcU, rarD, rbsU, secF,</i>
10(4): BO37-1 <i>E. faecalis</i>	CRE (2x) Blod (γ)	IPM: 0,38 MP: 1,25	[C]: 129,0 260/280: 1,86 260/230: 2,7 - Q: 110	PCR, CAR1-2- multipleks: Negativ	GenElute G+ ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i> Virulensgener: <i>ace, bopD, bsh, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, prgB/asc10, sprE, srtC</i>	<i>adcC, artM, ecsA, ecsB, glnQ, mdxG, metN1-2, msmK, oppD, oppF, puCD, pstA, pstB1-2, pstC, yadG, yadH, yclP, ykpA, ytcP, yteP, cvfB, mdtL, mepA, tet(M)</i>
11(4): BO85-4 <i>E. faecalis</i>	CRE (2x) Blod (γ)	IPM: 0,27 MP: 1,25	[C]: 162,9 260/280::1,91 260/230: 2,31 - Q: 88,7	PCR, CAR1-2- multipleks: Negativ	GenElute G+ ↓ MinION MiSeq	Resistensgener: <i>ant(6)-Ia, dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i> Virulensgener: <i>ace, bopD, bsh, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, ef3023, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, sprE, srtC</i>	<i>natA</i>
16(4): BO274-1 <i>E. faecalis</i>	CRE (2x) Blod (γ)	IPM: 0,5 MP: 1,5 TE: 24 S: ≥ 1024 TM: 0,079	[C]: 114,7 260/280:1,83 260/230: 2,79 - Q: 112	PCR, CAR1-2- multipleks: Negativ	GenElute G+ ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>ant(6)-Ia, dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, ant(9)-Ia (spw), tetM</i> Virulensgener: <i>ace, bopD, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, ef3023, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, sprE, srtC</i>	<i>yadG, yadH</i>

Tabell 40 viser hvordan resistente S-bakterier har blitt behandlet, samt resultatene fra alle undersøkelsene som ble utført på disse prøvene. [C]= NanoDrop-konsentrasjon, 260/280 og 260/230 = renhet.

Prøve ↓ Vekst	MIC x2 (ng/μl)	NanoDrop (ng/μl) - Qubit (ng/μl)	Multipleks PCR	Ekstrahert ↓ sekvensert	Gener funnet ved helgenomsekvensering og CARD, NCBI og VFDB	Gener funnet med Prokka
ESBL_M36_a <i>P. oleovorans</i> ↓ ESBL (2x) Blod (a)	CTX: 14 FEP: 4 S: ≥ 1024	[C]: 694,9 260/280: 1,90 260/230: 2,16 - Q: 376	PCR, ESBL 1-4- multipleks: Negativ	GenElute G- ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>aac(6')-lb7</i> , <i>aph(3'')-lb (strA)</i> , <i>aph(6)-ld (strB)</i> , <i>cpXR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>muxB</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> » Virulensgener: <i>alg8</i> , <i>algA</i> , <i>algB</i> , <i>algC</i> , <i>algD</i> , <i>algE</i> , <i>algF</i> , <i>algG</i> , <i>algI</i> , <i>algL</i> , <i>algP/algR3</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>clpV1</i> , <i>dotU1</i> , <i>fha1</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flhA</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliO</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>hcp1</i> , <i>hsiB1/vipA</i> , <i>hsiC1/vipB</i> , <i>hsiF1</i> , <i>hsiG1</i> , <i>hsiJ1</i> , <i>icmF1/tssM1</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>motY</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pilI</i> , <i>pilJ</i> , <i>pilM</i> , <i>pilN</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>ppkA</i> , <i>tagR</i> , <i>tsr</i> , <i>vgrG1a</i> , <i>waaA</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waap</i> , <i>xcpA/pilD</i> , <i>xcpQ</i> , <i>xcpR</i> , <i>xcpS</i> , <i>xcpT</i> , <i>xcpV</i>	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>ampC</i> , <i>artI</i> , <i>uup</i> , <i>ycdV</i> , <i>yejB</i> , <i>yejE</i> , <i>yhdY</i> , <i>yojI</i> , <i>ytrE</i> , <i>bcr</i> , <i>bepD</i> , <i>bepE</i> , <i>cvfB</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>InrL</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtH</i> , <i>mdtK</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>nepI</i> , <i>oqxB32</i> , <i>oqxB7</i> , <i>phoP</i> , <i>yaaA</i>
ESBL_M36_c <i>P. oleovorans</i> ↓ ESBL (2x) Blod (y)	CTX: 3,5 FEP: 0,50 S: 8	[C]: 742,5 260/280: 1,95 260/230: 2,19 - Q: 840	PCR, ESBL 1-4- multipleks: Negativ	GenElute G- ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>cpXR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>muxB</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>oqxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> » Virulensgener: <i>algC</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgK</i> , <i>flgN</i> , <i>flhA</i> , <i>flhF</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>mtrD</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilE</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pilI</i> , <i>pilJ</i> , <i>pilM</i> , <i>pilO</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>pscP</i> , <i>waaA</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waap</i> , <i>xcpA/pilD</i>	<i>artI</i> , <i>artJ</i> , <i>bmrA</i> , <i>uup</i> , <i>ycdV</i> , <i>yejB</i> , <i>yejE</i> , <i>yhdY</i> , <i>ytrE</i> , <i>bcr</i> , <i>bepE</i> , <i>bepF</i> , <i>cvfB</i> , <i>emrB</i> , <i>InrL</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtE</i> , <i>mdtK</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>oqxB7</i> , <i>phoP</i> , <i>yaaA</i>
ESBL_M40_a <i>P. oleovorans</i> ↓ ESBL (2x) Blod (y)	CTX: 1,5 FEP: 0,19 S: 4	[C]: 959,9 260/280: 1,91 260/230: 2,05 - Q: 414	PCR, ESBL 1-4- multipleks: Negativ	GenElute G- ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>cpXR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexK</i> , <i>muxB</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>oqxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> » Virulensgener: <i>algC</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgK</i> , <i>flgN</i> , <i>flhA</i> , <i>flhF</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>mtrD</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilA</i> , <i>pilB</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pilI</i> , <i>pilJ</i> , <i>pilM</i> , <i>pilO</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>waaA</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waap</i> , <i>xcpA/pilD</i>	<i>mdtB</i> , <i>tetO</i> , <i>ycdU</i> , <i>ycdV</i> , <i>yhdY</i>
ESBL_M40_b <i>P. oleovorans</i> ↓ ESBL (2x) Blod (a)	CTX: 3,5 FEP: 0,38 S: 6	[C]: 1206,8 260/280: 1,92 260/230: 2,14 - Q: 620	PCR, ESBL 1-4- multipleks: Negativ	GenElute G- ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>cpXR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>muxB</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>oqxB10</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> » Virulensgener: <i>algC</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgK</i> , <i>flgN</i> , <i>flhA</i> , <i>flhF</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>mtrD</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilE</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pilI</i> , <i>pilJ</i> , <i>pilM</i> , <i>pilO</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>pscP</i> , <i>tsr</i> , <i>waaA</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waap</i> , <i>xcpA/pilD</i>	<i>mdtA</i>
ESBL_M40_c <i>P. oleovorans</i> ↓ ESBL (2x) Blod (a)	CTX: 12 FEP: 3 S: ≥ 1024	[C]: 826,4 260/280: 1,89 260/230 :2,07 - Q: 580	PCR, ESBL 1-4- multipleks: Negativ	GenElute G- ↓ MiSeq	Resistensgener: <i>aac(6')-lb7</i> , <i>aph(3'')-lb (strA)</i> , <i>aph(6)-ld (strB)</i> , <i>cpXR</i> , <i>emrE</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexE</i> , <i>mexF</i> , <i>mexJ</i> , <i>mexK</i> , <i>muxB</i> , <i>oprM</i> , <i>oprN</i> , <i>pmpM</i> , « <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> » Virulensgener: <i>alg8</i> , <i>algA</i> , <i>algB</i> , <i>algC</i> , <i>algD</i> , <i>algE</i> , <i>algF</i> , <i>algG</i> , <i>algI</i> , <i>algL</i> , <i>algP/algR3</i> , <i>algR</i> , <i>algU</i> , <i>algW</i> , <i>algZ</i> , <i>chpA</i> , <i>chpB</i> , <i>clpV1</i> , <i>dotU1</i> , <i>fha1</i> , <i>fimV</i> , <i>fleN</i> , <i>fleQ</i> , <i>fleR</i> , <i>fleS</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flhA</i> , <i>fliA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliI</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliK</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliO</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>hcp1</i> , <i>hsiB1/vipA</i> , <i>hsiC1/vipB</i> , <i>hsiF1</i> , <i>hsiG1</i> , <i>hsiJ1</i> , <i>icmF1/tssM1</i> , <i>motA</i> , <i>motB</i> , <i>motC</i> , <i>motD</i> , <i>motY</i> , <i>mucD</i> , <i>mucP</i> , <i>pilB</i> , <i>pilG</i> , <i>pilH</i> , <i>pilI</i> , <i>pilJ</i> , <i>pilM</i> , <i>pilN</i> , <i>pilR</i> , <i>pilT</i> , <i>pilU</i> , <i>ppkA</i> , <i>pvdH</i> , <i>tagR</i> , <i>tsr</i> , <i>vgrG1a</i> , <i>waaA</i> , <i>waaF</i> , <i>waaG</i> , <i>waap</i> , <i>xcpA/pilD</i> , <i>xcpQ</i> , <i>xcpR</i> , <i>xcpS</i> , <i>xcpT</i> , <i>xcpV</i>	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>ampC</i> , <i>artI</i> , <i>uup</i> , <i>yaaA</i> , <i>ycdV</i> , <i>yejB</i> , <i>yejE</i> , <i>yhdY</i> , <i>yojI</i> , <i>ytrE</i> , <i>bcr</i> , <i>bepD</i> , <i>bepE</i> , <i>bepF</i> , <i>cvfB</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i> , <i>InrL</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtH</i> , <i>mdtK</i> , <i>mexA</i> , <i>mexB</i> , <i>oqxB32</i> , <i>oqxB7</i> , <i>phoP</i>

4. Diskusjon

Selv om de fleste stammene i denne oppgaven ikke kunne vokse på antibiotikaskåler, var det noen som klarte det, og enkelte av disse hadde også andre svært interessante resultater. De viktigste og største resultatene kommer av sekvenseringen, hvor det ble funnet en mengde gener. En lang oppramsing av gener vil ikke nødvendigvis umiddelbart gi så mye informasjon om hva det betyr for bakteriene, så nedenfor følger en forklaring av alle genene som har blitt identifisert og inkludert i denne oppgaven, før prøvene kan diskuteres helhetlig.

4.1 Forklaring av resistensgener

Alle bakteriene som ble sekvensert hadde flere forskjellige resistensgener. Basert på kun tilstedeværelsen av et gen, er det ikke mulig å si noe om hvor resistent en bakterie er, men man kan se hva den potensielt er resistent mot. I tabell 41 er alle resistensgenene som ble funnet med CARD og/eller NCBI oppgitt og forklart, i alfabetisk rekkefølge:

Tabell 41 forteller hvilke resistensgener som ble funnet hos hvilke bakteriearter, og hva disse genene gir resistens mot, samt hvilken resistensmekanisme det er. Informasjonen blir oppgitt når man benytter ABRicate (Seemann, 2016). Ytterligere informasjon er funnet ved å søke opp genet direkte på nettsidene til CARD. All informasjon utenom dette er oppgitt med kilde.

Gen (Funnet i bakterie)	Info om genprodukt gitt av CARD og/eller NCBI	Info om resistens fra genene, gitt av CARD og/eller NCBI	
<i>aac(6)-Ib7</i> (<i>P. oleovorans</i>)	AAC(6)-Ib7: aminoglycosid acetyltransferase hos <i>Enterobacter cloacae</i> og <i>Citrobacter freundii</i> , kodet fra plasmider. Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	aminoglycosid	
<i>ant(6)-Ia</i> (<i>E. faecalis</i>)	ANT(6)-Ia: aminoglycosid nukleotidyltransferase kodet fra plasmider og kromosomer hos <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus suis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> og <i>Streptococcus mitis</i> . Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	aminoglycosid (streptomycin)	
<i>ant(9)-Ia/spw</i> (<i>E. faecalis</i>)	ANT(9)-Ia, også kjent som Spw: aminoglycosid nukleotidyltransferase, kodet fra plasmider og transposoner hos <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus sciuri</i> og <i>E. faecalis</i> Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	aminoglycosid	
<i>aph(3'')-Ib</i> (/ <i>strA/orfH</i>) (<i>P. oleovorans</i>)	APH(3'')-Ib: aminoglycosid fosfotransferase kodet av plasmider, transposoner, integrative konjugative elementer og kromosomer hos <i>Enterobacteriaceae</i> og <i>Pseudomonas</i> spp. Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	aminoglycosid (streptomycin)	
<i>aph(6)-Id</i> (/ <i>strB/orfI</i>) (<i>P. oleovorans</i>)	APH(6)-Id: aminoglycosid fosfotransferase kodet av plasmider, integrative konjugative elementer og kromosomale genomiske øyer hos <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> spp. <i>E. coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Providencia alcalifaciens</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Pasteurella multocida</i> og <i>Aeromonas bestiarum</i> . Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	aminoglycosid (streptomycin)	
<i>arlR</i> (<i>S. haemolyticus</i>) (<i>S. aureus</i>) (<i>S. epidermidis</i>)	ArlR er en responsregulator som binder til <i>norA</i> -promotoren for å aktivere uttrykk av genet. ArlR må først fosforyleres av ArlS. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MFS	fosfomycin phenicol glycylcyclin fluoroquinolon cefalosporin tetracyclin akridinfargestoff oxazolidinon rhodamin peptide nitroimidazol	rifamycin nucleoside penam macrolid antibakterielle frie fettsyrer bicyclomycin diaminopyrimidin benzalkoniumklorid lincosamid isoniazid

Gen (Funnet i bakterie)	Info om genprodukt gitt av CARD og/eller NCBI	Info om resistens fra genene, gitt av CARD og/eller NCBI	
<i>arlS</i> (<i>S. aureus</i>)	ArlS er en histidinkinase som fosforilerer ArlR. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MFS	antibakterielle frie fettsyrer bicyclomycin diaminopyrimidin benzalkoniumklorid isoniazid lincosamid Nitroimidazol rifamycin nucleoside penam macrolid	rhodamin peptide fosfomycin phenicol glycylcyclin fluoroquinolon cefalosporin tetracyclin oxazolidinon akridinfargestoff
<i>Pseudomonas_aeruginosa</i> <i>a_CpxR</i> (<i>P. oleovorans</i>)	CpxR er direkte involvert i aktiveringen av uttrykkelsen av RND efflukspumpen MexAB-OprM i <i>P. aeruginosa</i> . CpcR er nødvendig for å forsterke uttrykkelsen av MexAB-OprM og resistens i fravær av repressoren MexR. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	sulfonamid antibakterielle frie fettsyrer diaminopyrimidin penem macrolid penam cefamycin peptide aminocoumarin carbapenem	aminoglycosid cefalosporin fluoroquinolon akridinfargestoff tetracyclin triclosan glycylcyclin monobactam phenicol
<i>dfrC</i> (<i>S. epidermidis</i>)	<i>dfrC</i> : dihydrofolat-reduktase kodet fra kromosomet, funnet i <i>S. aureus</i> (trimetoprim-resistent dihydrofolate-reduktase DfrC) Resistensmekanisme: Bytte ut angrepspunkt.	diaminopyrimidin (trimetoprim)	
<i>dfrE</i> (<i>E. faecalis</i>)	<i>dfrE</i> : dihydrofolat-reduktase kodet fra kromosomet, funnet i <i>E. faecalis</i> . (trimetoprim-resistent dihydrofolate-reduktase DfrE) Resistensmekanisme: Bytte ut angrepspunkt.	diaminopyrimidin (trimetoprim)	
<i>dha-1</i> (<i>S. aureus</i>)	DHA-1 er ifølge CARD en klasse C beta-laktamase funnet i <i>Morganella morganii</i> og <i>Salmonella enterica</i> , som inaktiverer antibiotika, men dette er trolig en feil i CARD. Genet koder for en MFS transporter som gir resistens mot kloramfenikol, og ikke en betalaktamase (NCBI, 2017).	cefamycin og cefalosporin ifølge CARD, men kloramfenikol ifølge NCBI (NCBI, 2017).	
<i>efrA</i> (<i>E. faecalis</i>)	<i>efrA</i> er en del av EfrAB effluks-pumpen og både <i>efrA</i> og <i>efrB</i> er nødvendig for resistens. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, ABC	peptide penam fluoroquinolon macrolid cefalosporin	akridinfargestoff tetracyclin nitroimidazol pleuromutilin rifamycin
<i>efrB</i> (<i>E. faecalis</i>)	<i>efrB</i> er en del av EfrAB effluks-pumpen og både <i>efrA</i> og <i>efrB</i> er nødvendig for resistens. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, ABC	akridinfargestoff tetracyclin fluoroquinolon penam macrolid	cefalosporin nitroimidazol pleuromutilin rifamycin peptide
<i>emeA</i> (<i>E. faecalis</i>)	Genet koder for en multi(drug)-efflukspumpe hos <i>E. faecalis</i> . Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MATE	fluoroquinolon akridinfargestoff tetracyclin glycylcyclin	
<i>Pseudomonas_aeruginosa</i> <i>a_emrE</i> (<i>P. oleovorans</i>)	EmrE er en liten multi(drug)-transporter som fungerer som en homodimer, som kobler effluksen hos små polyaromatiske kationer fra cellen med import av protoner ned en elektrokjemisk gradient. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, SMR	phenicol aminoglycosid macrolid tetracyclin aminocoumarin	
<i>fosB</i> (<i>S. aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis fosB</i> -genet koder for et fosfomycin-resistens-protein Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	fosfomycin	
<i>fosB-251804940</i> (<i>S. epidermidis</i>)	FosB bruker bacillithiol eller L-cysteine for å åpne epoksid-ringen i fosfomycin. Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	fosfomycin	
<i>fosB-Saur</i> (<i>S. aureus</i>)	FosB1/FosB3, Fosfomycin-resistens-bacillithiol-transferase. Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika	fosfomycin	

Gen (Funnet i bakterie)	Info om genprodukt gitt av CARD og/eller NCBI	Info om resistens fra genene, gitt av CARD og/eller NCBI	
<i>lsaA</i> (<i>E. faecalis</i>)	Lsa er en del av et efflukssystem hos <i>E. faecalis</i> . Resistensmekanisme: Efflukspumpe, ABC	lincosamid streptogramin phenicol pleuromutilin tetracyclin oxazolidinon macrolid	
<i>lmrS</i> (<i>S. aureus</i>)	LmrS ("lincomycin resistance protein of <i>Staphylococcus aureus</i> ") er en multi(drug)-efflukspumpe. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MFS	nucleoside rifamycin nitroimidazol macrolid penam diaminopyrimidin bicyclomycin antibakterielle frie fettsyrer isoniazid lincosamid benzalkoniumklorid	glycylcyclin phenicol fosfomycin akridinfargestoff oxazolidinon tetracyclin cefalosporin fluoroquinolon aminoglycosid peptide rhodamin
<i>mepA</i> (<i>S. aureus</i>)	MepA er et efflukt-protein som reguleres av MepR. Hos <i>S. aureus</i> har proteinet gjort bakterien multiresistent. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MATE	glycylcyclin akridinfargestoff tetracyclin fluoroquinolon	
<i>mepR</i> (<i>S. aureus</i>)	MepR er en oppstrøms repressor av MepA. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MATE	glycylcyclin akridinfargestoff tetracyclin fluoroquinolon	
<i>mexA</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et efflukt-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	macrolid penam antibakterielle frie fettsyrer penem diaminopyrimidin sulfonamid monobactam phenicol cefalosporin fluoroquinolon	akridinfargestoff peptide aminocoumarin glycylcyclin triclosan tetracyclin carbapenem aminoglycosid cefamycin
<i>mexB</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et efflukt-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	triclosan tetracyclin glycylcyclin cefamycin carbapenem aminoglycosid macrolid penam sulfonamid antibakterielle frie fettsyrer	penem diaminopyrimidin cephalosporin fluoroquinolon akridinfargestoff monobactam phenicol peptide aminocoumarin
<i>mexD</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et efflukt-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	penam macrolid diaminopyrimidin antibakterielle frie fettsyrer phenicol glycylcyclin monobactam akridinfargestoff	triclosan tetracyclin fluoroquinolon cefalosporin aminoglycosid carbapenem aminocoumarin
<i>mexE</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et efflukt-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	aminocoumarin carbapenem diaminopyrimidin aminoglycosid antibakterielle frie fettsyrer triclosan tetracyclin	akridinfargestoff macrolid fluoroquinolon penam monobactam glycylcyclin phenicol

Gen (Funnet i bakterie)	Info om genprodukt gitt av CARD og/eller NCBI	Info om resistens fra genene, gitt av CARD og/eller NCBI	
<i>mexF</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	penam fluoroquinolon macrolid akridinfargestoff tetracyclin triclosan phenicol	glycylcyclin monobactam aminocoumarin antibakterielle frie fettsyrer aminoglycosid diaminopyrimidin carbapenem
<i>mexJ</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	aminocoumarin diaminopyrimidin carbapenem aminoglycosid antibakterielle frie fettsyrer akridinfargestoff triclosan	tetracyclin macrolid fluoroquinolon penam glycylcyclin monobactam phenicol
<i>mexK</i> (<i>P. oleovorans</i>)	En del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	aminocoumarin antibakterielle frie fettsyrer aminoglycosid diaminopyrimidin carbapenem penam fluoroquinolon	macrolid akridinfargestoff triclosan tetracyclin phenicol glycylcyclin monobactam
<i>mgrA</i> (<i>S. haemolyticus</i>) (<i>S. aureus</i>) (<i>S. epidermidis</i>)	MgrA, også kjent som NorR, er en regulator for <i>norA</i> (positiv regulator), <i>norB</i> (direkte repressor) og <i>tet38</i> (indirekte repressor). Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MFS	antibakterielle frie fettsyrer bicyclomycin diaminopyrimidin isoniazid lincosamid benzalkoniumklorid rifamycin pleuromutilin Nitroimidazol nucleoside macrolid	penam rhodamin peptide fosfomycin glycylcyclin phenicol cefalosporin fluoroquinolone tetracyclin akridinfargestoff oxazolidinon
<i>muxB</i> (<i>P. oleovorans</i>)	MuxB er en del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	antibakterielle frie fettsyrer carbapenem diaminopyrimidin aminoglycosid aminocoumarin monobactam glycylcyclin	phenicol macrolid fluoroquinolon penam tetracyclin triclosan akridinfargestoff
<i>norA</i> (<i>S. haemolyticus</i>) (<i>S. aureus</i>) (<i>S. epidermidis</i>)	NorA er en multi(drug)-pumpe hos <i>S. aureus</i> som gir resistens mot fluoroquinoloner og andre strukturelt urelaterte stoffer. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MFS	macrolid penam nucleoside rifamycin Nitroimidazol isoniazid lincosamid benzalkoniumklorid diaminopyrimidin bicyclomycin antibakterielle frie fettsyrer	akridinfargestoff oxazolidinon tetracyclin cefalosporin fluoroquinolon glycylcyclin phenicol Fosfomycin peptide rhodamin
<i>opmB</i> (<i>P. oleovorans</i>)	OpmB er en del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	akridinfargestoff triclosan tetracyclin fluoroquinolon penam macrolid phenicol	glycylcyclin monobactam aminocoumarin aminoglycosid diaminopyrimidin carbapenem antibakterielle frie fettsyrer

Gen (Funnet i bakterie)	Info om genprodukt gitt av CARD og/eller NCBI	Info om resistens fra genene, gitt av CARD og/eller NCBI	
<i>opmH</i> (<i>P. oleovorans</i>)	OpmH er et effluks-protein i yttermembranen for triclosan-spesifikk pumping. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	carbapenem diaminopyrimidin aminoglycosid antibakterielle frie fettsyrer aminocoumarin monobactam glycylcyclin	phenicol tetracyclin triclosan akridinfargestoff macrolide penam fluoroquinolon
<i>oprM</i> (<i>P. oleovorans</i>)	OprM er en del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	phenicol monobactam fluoroquinolon cefalosporin akridinfargestoff aminocoumarin peptide penam macrolid antibakterielle frie fettsyrer	penem diaminopyrimidin sulfonamid glycylcyclin triclosan tetracyclin aminoglycosid carbapenem cefamycin
<i>oprN</i> (<i>P. oleovorans</i>)	OprN er en del av et effluks-kompleks. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	carbapenem diaminopyrimidin aminoglycosid antibakterielle frie fettsyrer aminocoumarin monobactam glycylcyclin	phenicol tetracyclin triclosan akridinfargestoff macrolid fluoroquinolon penam
<i>oqxB10</i> (<i>P. oleovorans</i>)	OqxB10 er en subenhet av en multi(drug)-efflukspumpe. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, RND	phenicol fluoroquinolon	
<i>pmpM</i> (<i>P. oleovorans</i>)	PmpM er en multi(drug)-efflukspumpe. Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MATE	aminoglycosid glycylcyclin fluoroquinolon benzalkoniumklorid tetracyclin akridinfargestoff	
« <i>Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin</i> » (<i>P. oleovorans</i>)	Bifidobacterium er antibiotikaresistent probiotika som administreres for å opprettholde en nyttig bakteriepopulasjon i tarmen. Horisontal genoverføring kan derimot gi resistens til patogener. Mutert <i>rpoB</i> -gen gir resistens mot rifamycin. Resistensmekanisme: Modifisert angrepspunkt	rifamycin	
<i>tet38</i> (<i>S. aureus</i>)	Tet38 er en tetracyclin-effluks-pumpe funnet hos <i>S. aureus</i> . Resistensmekanisme: Efflukspumpe, MFS	benzalkoniumklorid isoniazid lincosamid diaminopyrimidin antibakterielle frie fettsyrer bicyclomycin penam macrolid nucleoside nitroimidazol rifamycin	peptide rhodamin tetracyclin oxazolidinon akridinfargestoff fluoroquinolon cefalosporin phenicol glycylcyclin fosfomycin
<i>tetM</i> (<i>E. faecalis</i>)	TetM er et «Ribosomal protection protein» (RPP), som beskytter mot tetracyclin. Resistensmekanisme: Beskytte angrepspunktet	tetracyclin	

Stoffene oppgitt i tabell 41 er alle gitt av CARD og/eller NCBI, og ved å søke opp de forskjellige stoffene i nettsidene til CARD, kan man også finne informasjon om de forskjellige stoffene. All informasjon om stoffene nedenfor er gitt av CARD, med mindre annet er oppgitt.

Akridinfargestoff:

Akridinfargestoff er celle-permeable basiske molekyler som settes inn i DNA, og dermed kan forstyrre DNA-replikasjonen.

Aminocoumarin:

Aminocoumarin-antibiotika binder DNA-gyrase subenhet B for å forhindre ATP-avhengig DNA-superkveiling.

Aminoglycosid (streptomycin):

Aminoglycosider er en gruppe med antibiotika som er mest effektiv mot Gram-negative bakterier. Aminoglycosider fungerer ved å binde til 30S (noen 50S) og inhibere translokasjonen av peptidyl-tRNA fra A-setet til P-setet samt forårsake feillesning av mRNA, som gjør at bakterien ikke kan syntetisere proteiner som er kritiske for vekst. Streptomycin er et aminoglycosid.

Antibakterielle frie fettsyrer:

Frie fettsyrer har mange forskjellige biologiske aktiviteter, blant annet evnen til å drepe eller hemme vekst hos bakterier. Hovedangrepspunktet for disse fettsyrene er cellemembranen, hvor de forstyrrer elektrontransportkjeden og oksidativ fosforylering. De kan også ha andre effekter, som å hemme næringsopptak eller direkte lysere bakterieceller.

Benzalkoniumklorid:

Benzalkoniumklorid er et kationisk overflateaktivt middel, et organisk salt kjent som en kvartær ammoniumforbindelse. Kvartære ammoniumforbindelser er hovedsakelig effektive mot Gram-positive bakterier, og benyttes til desinfeksjon og rensing av sår (Norsk legemiddelhåndbok, 2016).

Bicyclomycin:

Dette stoffet dreper bakterier ved å inhibere Rho-transkripsjons-termineringsfaktoren, som forhindrer RNA-syntese.

Carbapenem:

Carbapenemer er en type betalaktam-antibiotika med et bredt spekter av antibakteriell aktivitet, med en struktur som gjør dem svært resistente mot betalaktamaser. Carbapenemer dreper bakterier ved å inhibere syntesen av peptidoglykan.

Cefalosporin:

Cefalosporiner er en type betalaktam-antibiotika, som inneholder betalaktam-ringen, kombinert med en dihydrothiazolidin-ring. Som carbapenemer hindrer de peptidoglykan-syntese.

Cefamycin:

Cefamyciner er en gruppe med betalaktam-antibiotika, som ligner cefalosporiner, som også dreper bakterier ved å hindre peptidoglykan-syntese.

Diaminopyrimidin:

Diaminopyrimidiner er en klasse med organiske forbindelser som inhiberer dihydrofolat reduktase, et enzym som er kritisk for DNA-syntese.

Diaminopyrimidin (trimetoprim):

Trimetoprim er en syntetisk 5-(3,4,5-trimethoxybenzyl) pyrimidin-inhibitor av dihydrofolat-reduktase.

Fluoroquinolon:

Fluoroquinoloner er en familie med syntetisk bredspektret antibiotika. Disse stoffene påvirker DNA-gyrase som forstyrrer DNA-replikasjon, skader DNA og forårsaker celledød.

Fosfomycin:

Fosfomycin er bredspektret antibiotika som angriper celleveggen hos Gram-positive og Gram-negative bakterier.

Glycylcyclin:

Glycylcycliner er en ny type med antibiotika avledet fra tetracyclin. Disse tetracyclin-analogene er spesielt designet for å unngå resistensmekanismer utviklet mot tetracyclin.

Foreløpig er det kun tige cyclin som er tatt i bruk klinisk, og dette virker ved å inhibere aktiviteten hos 30S-subenheten i ribosomene, som forhindrer binding av aminoacyl-tRNA.

Isoniazid:

Isoniazid er en organisk forbindelse som brukes ved tuberkulose. Isoniazid hemmer mykolsyresyntese, som forhindrer cellevegg-syntese hos mycobakterier. Resistens mot dette stoffet kan også utvikles ved triclosan-eksponering. Hvis tuberkelbakterien utsettes for sub-letale doser av triclosan, kan den bli resistent mot isoniazid, selv uten at den blir resistent mot triclosan (kryss-resistens) (Mattilsynet, 2013).

Kloramfenikol:

Kloramfenikol er et bakteriostatisk stoff, opprinnelig hentet fra *Streptomyces venezuelae*, men produseres i dag syntetisk. Det fungerer ved å binde til 50S og inhibere peptidyl transferase-aktiviteten i ribosomet.

Lincosamid:

Lincosamider er en klasse antibiotika som binder til 50S-subenheten til ribosomer. Denne interaksjonen forhindrer elongering av peptidkjedene ved å hemme transpeptidase-reaksjonen, noe som ligner funksjonen til macrolider.

Macrolid:

Macrolider er en gruppe legemidler (typisk antibiotika) med en stor makrosyklisk laktonring som binder til 50S-subenheten til ribosomer og hindrer syntesen av viktige proteiner.

Monobactam:

Monobactamer er en klasse av betalaktam-antibiotika med et bredt spekter av antibakteriell aktivitet, og med en struktur som gjør dem svært resistente mot betalaktamaser.

Monobactamer dreper bakterier ved å forhindre peptidoglycan-syntese.

Nitroimidazol:

Nitroimidazol er en gruppe med legemidler som brukes mot protozoer og bakterier.

Nitroimidazol virker ved å oksidere DNA, dette forårsaker trådbrudd og celledød.

Nucleoside:

Nukleosid-antibiotika er laget av modifiserte nukleosider og nukleotider som gir en rekke forskjellige antibakterielle effekter. Denne legemiddelklassen inkluderer aminonucleoside-antibiotika, som inneholder en amino-gruppe. Nukleosid-antibiotika består typisk av naturlige nukleosider kombinert med komplekse strukturer som aminosyrer eller fettsyrer, som gir antibakterielle egenskaper. Nukleosid-antibiotika angriper hovedsakelig celleveggsyntesen hos bakterier (Thomson & Lamont, 2019).

Oxazolidinon:

Oxazolidinoner er en klasse med syntetisk antibiotika som inhiberer proteinsyntesen ved å binde til 50S subenheten til ribosomer. Linezolid er det eneste medlemmet av denne klassen som benyttes klinisk i dag.

Penam:

Penamer, ofte bare omtalt som penicilliner, er en gruppe med antibiotika hentet fra *Penicillium*-sopp. Alle penicilliner er betalaktamer som virker ved å forhindre celleveggsyntese, men mye resistens er utviklet mot dette, da penicillin var den første typen antibiotika som ble tatt i bruk.

Penem:

Penemer er en klasse av betalaktam-antibiotika med et bredt spekter av antibakteriell aktivitet, med en struktur som gjør dem svært resistente mot betalaktamaser. Alle penemer er syntetisk fremstilt og forhindrer peptidoglykansyntese. Strukturelt ligner de carbapenemer, men har svovel i stedet for karbon i molekylet.

Peptide:

Peptid-antibiotika har et bredt spekter av antibakterielle mekanismer, som varierer basert på aminosyrene som bygger opp stoffet, men generelt virker de ved å forstyrre cellemembranen. Underklasser av peptid-antibiotika kan i tillegg ha kjeder med for eksempel lipider, som er tilfelle hos lipopeptid-antibiotika.

Phenicol:

Phenicol er et bredspektrert bakteriostatisk antibiotika som påvirker proteinsyntesen ved å blokkere elongering av peptidkjeden.

Pleuromutilin:

Pleuromutiliner er naturlige stoffer produsert av sopp, som forhindrer translasjon av RNA ved å binde til P-setet i 50S-subenheten til ribosomet.

Rhodamin:

Rhodamin er et fargestoff som trenger gjennom cellemembranen hos de Gram-negative bakteriene *E. coli* og *P. aeruginosa*.

Rifamycin:

Rifamycin-antibiotika er en gruppe bredspektrede ansamycin-antibiotika som inhiberer bakteriens RNA-polymerease.

Streptogramin:

Streptogramin-antibiotika er naturlige produkter som produseres av forskjellige medlemmer av *Streptomyces*-slekten. Dette stoffet binder til P-setet i 50S-subenheten til ribosomene og inhiberer protein-syntese.

Sulfonamid:

Sulfonamid er bredspektret, syntetisk antibiotika som inneholder en sulfonamid-gruppe. Sulfonamider inhiberer dihydropteroat-syntase, som katalyserer omdannelse av p-aminobenzosyre til dihydropteroinsyre, som en del av tetrahydrofolsyre-biosynteseveien. Tetrahydrofolsyre er essensielt for folat-syntese, som er en forløper til mange nukleotider og aminosyrer. Mange sulfamider tas sammen med trimetoprim, som inhiberer dihydrofolat-reduktase og også vil forstyrre tetrahydrofolsyre-biosynteseveien.

Tetracyclin:

Tetracyclin er et bredspektret polyketid-antibiotikum produsert av mange medlemmer av *Streptomyces*-slekten. Stoffet inhiberer 30S-subenheten i ribosomet.

Triclosan:

Triclosan inhiberer syntese av fettsyrer ved å blokkere FabI, et enoyl-bære-protein. Isoniazid er en organisk forbindelse som brukes ved tuberkulose. Som nevnt kan noen bakterier bli resistente mot isoniazid dersom den utsettes for sub-letale doser av triclosan. Triclosan er godkjent som et konserveringsmiddel i kosmetikk, og kan tilsettes blant annet tannkrem og

deodorant, som da kan gi resistensproblemer ikke bare mot triclosan, men også andre typer antibiotika gjennom kryssresistens (Mattilsynet, 2013).

Disse stoffene ble det funnet potensiell resistens mot i NCBI og CARD. Det ble også utført et Prokka-søk, som også hovedsakelig fant efflukspumper som tidligere har blitt beskrevet (ABC, MFS, MATE og RND, men tilsynelatende ingen SMR), men det ble også funnet unike resistens-gener som vises i tabell 42.

Tabell 42 viser unike resistensgener funnet med Prokka

Funnet hos prøve	Beskrivelse hentet fra Prokka	Gen + informasjon om genet
6(1), 15(1), 4(2)	Bacitracin resistance protein, undecaprenyl	<i>bacA</i> : BacA resirkulerer undecaroenyl-poryfosfat i cellevegg-syntesen, som gir resistens mot bacitracin. Resistensmekanisme: Endret angrepspunkt (CARD, 2020a).
ESBL_M36_a, ESBL_M40_c	Beta-lactamase	<i>AmpC</i> : AmpC er en type betalaktamase som ofte isoleres fra utvidet-spektrum-cefalosporin-resistente Gram-negative bakterier. Resistensmekanisme: Inaktivering av antibiotika (CARD, 2020b).
6(1)	Multidrug resistance efflux pump SepA	<i>sepA</i> : SepA er en multi(drug)-effluks-pumpe som kan gi resistens mot antiseptiske midler, akriflavin (som akridinfargestoff), og etidiumbromid, en interkalerende agent. Pumpen ligner på de fra SMR-familien, men mangler tre konserverte motiver i proteinene til denne familien, så det er foreslått at denne pumpen kan tilhøre en helt ny familie av multi(drug)-efflukspumper (Truong-Bolduc et al., 2005). Resistensmekanisme: Efflukspumpe
6(1), 13(1), 15(1), 4(2)	Oxacillin resistance-related FmtC protein	<i>fmtC</i> : Lysyl-fosfatidylglyserol (LPG) er et membran-lipid funnet hos mange Gram-positive bakterie (Sohlenkamp et al., 2007) Lysyl-fosfatidylglyserol-syntase FmtC, også kjent som MprF, gir, i tillegg til hva navnet tilsier, resistens mot daptomycin. Resistensmekanisme: Endret angrepspunkt (Friedman et al., 2006).
4(1), 6(1), 15(1)	Teicoplanin resistance associated membrane	<i>tcaA</i> , <i>tcaR</i> : disse genene er involvert i teicoplanin-sensitivitet. Inaktivering av <i>tcaRAB</i> -operonet medfører teicoplanin-resistens (UniProt, 2020). Resistensmekanisme: Endret angrepspunkt.
ESBL_M40_a	Tetracycline resistance protein TetO	<i>tetO</i> : TetO er et RPP, som beskytter ribosomene, og er assosiert med konjugative plasmider. Resistensmekanisme: Beskytte angrepspunkt (CARD, 2020e).

Tabell 42 viser mulig resistens mot tre nye typer antibiotika som ikke kom frem av CARD-/NCBI-søket, nemlig bacitracin, daptomycin og teicoplanin som alle er peptid-/glycopeptid-antibiotika. Ellers er det ett nytt gen som kan gi resistens mot tetracyclin, nemlig *tetO*, som det også ble funnet mye resistens mot i CARD og NCBI. Ellers er det mange effluks-gener som ikke er inkludert i tabell 43, da de alle tilhører pumpe-familier beskrevet tidligere. Mange av disse pumpene er også forbundet med tetracyclin-resistens. Blant annet ble det funnet et

gen som koder for TetR, en repressor funnet hos 4(1), 6(1) og 15(1), som er involvert i tetracyclin-resistens ved uttrykkelsen av genet *tetA*, som koder for en MFS-effluks-pumpe (CARD, 2020d; Ramos et al., 2005).

4.2 Forklaring av virulensgener

Alle sekvenserte bakterier hadde mange forskjellige virulensgener. Det ble funnet mange flere virulensgener enn resistensgener, men mange gener var forbundet med den samme funksjonen, som for eksempel *alg*-genene, som alle samarbeider om alginat-produksjon. For oversiktens skyld er mange av disse genene omtalt sammen, og alle virulensgenene har blitt sortert på hva slags virulens-effekt de gir. Flere gener kan gi flere virulens-effekter, men grovt sett kan virulensgenene sorteres i følgende kategorier:

Flagell

Tabell 43 viser virulensgener forbundet med bakteriens flagell. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor).	Funnet hos bakterie
<i>tsr</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Genet koder for "methyl-accepting chemotaxis protein I", som overfører reseptorsignaler fra bindeproteiner til flagellen (Chen et al., 2005; Kondoh et al., 1979).	<i>P. oleovorans</i>
<i>fleN</i> <i>fleQ</i> <i>fleR</i> <i>fleS</i> <i>flgB-I</i> <i>flgK</i> <i>flgN</i> <i>flhA</i> <i>flhF</i> <i>fliA</i> <i>fliC</i> <i>fliE-G</i> <i>fliI-K</i> <i>fliM-R</i> <i>motA-D</i> <i>motY</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Alle <i>fle</i> -genene, <i>flg</i> -genene, <i>flh</i> -genene, <i>fli</i> -genene og <i>mot</i> -genene er forbundet med bakteriens flagell (Chen et al., 2005; Kilmury & Burrows, 2018; Minamino et al., 2000; Okabe et al., 2002).	<i>P. oleovorans</i>

Pili

Tabell 44 viser virulensgener forbundet med bakteriens pili. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>chpA-B</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Chp</i> -genene er involvert i signaliseringsapparatet som styrer uttrykkelsen av mange virulensgener, som blant annet Type 4 pili (Chen et al., 2005; Whitchurch et al., 2004).	<i>P. oleovorans</i>
<i>ebpA-C</i>	<i>E. faecalis</i>	Ebp-pili er viktige for adherans til vertscellens ekstracellulære matriksproteiner, som fibrinogen og collagen, de spiller også en viktig rolle i biofilmbildning (Chen et al., 2005). Denne typen pili er assosiert med infeksjons endokarditt (Montealegre et al., 2015).	<i>E. faecalis</i>

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>srtC</i>	<i>E. faecalis</i>	Genet koder for et sortase-protein, som er nødvendig for dannelsen av Ebp-pili og biofilmdannelse (Kemp et al., 2007).	<i>E. faecalis</i>
<i>pilA-D</i> <i>pilF-J</i> <i>pilM-O</i> <i>pilR</i> <i>pilT</i> <i>pilU</i> <i>xcpA/pilD</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pil</i> -genene er alle pilus-relaterte gener, spesifikt type 4 pili. De hjelper bakterien å feste seg til vertsceller, men ikke til mucin, som forårsaker en ryknings-bevegelse som tillater bakterien å forflytte seg over celleoverflaten. Genene er viktige for biofilmdannelse (Chen et al., 2005). <i>pilD</i> -genet er også kjent som <i>xcpA</i> , som er involvert i både proteinsekresjon og i dannelsen av type 4 pili (de Groot et al., 1994).	<i>P. oleovorans</i>
<i>pilE</i> :	<i>Neisseria meningitidis</i>	Dette genet koder også for Type 4 pili, men opprinnelsen til genet er ifølge VFDB <i>N. meningitidis</i> og ikke <i>P. aeruginosa</i> , som de andre genene beskrevet her (Chen et al., 2005). Det finnes også et gen med opprinnelse i <i>P. aeruginosa</i> med samme navn i VFDB, men det var ikke dette som kom ut av databasen da contigs ble lastet opp.	<i>P. oleovorans</i>
<i>fimV</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Type 4 pili (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>

Biofilm

Tabell 45 viser virulensgener forbundet med bakteriens biofilmdannelse. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>alg8</i> <i>algA-G</i> <i>algI</i> <i>algL</i> <i>algP/algR3</i> <i>algR</i> <i>algU</i> <i>algW</i> <i>algZ</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Alle <i>alg</i> -genene er involvert i alginat-produksjon (Chen et al., 2005; Oglesby et al., 2008; Rappuoli et al., 2013; Schaechter, 2009). Alginat er med på, men ikke kritisk for, dannelsen av biofilm. Alginatproduksjon øker kvaliteten på biofilmdannelsen, og gir bakterien noen fordeler, som økt resistens mot skadelige stoffer som antibiotika. Det hjelper også bakterien å feste seg til menneskeceller, samt å beskytte bakterien mot lymfocytter, fagocytter, antistoffer og andre forsvar hos verten (Stapper et al., 2004).	<i>P. oleovorans</i>
<i>mucD</i> <i>mucP</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>mucD</i> og <i>mucP</i> er også involvert i alginat-produksjon (Chen et al., 2005). <i>P. aeruginosa</i> -stammer som forårsaker kroniske luftveisinfeksjoner hos pasienter med cystisk fibrose (CF) har normalt en veldig mucoid fenotype, som indikerer produksjon av alginat. <i>algT</i> -operonet består av <i>algT-mucA-mucB-mucC-mucD</i> (Wood & Ohman, 2006).	<i>P. oleovorans</i>
<i>bopD</i>	<i>E. faecalis</i>	Den antatte sukker-bindende transkripsjonsregulatoren <i>bopD</i> er nødvendig for dannelsen av biofilm (Chen et al., 2005; Creti et al., 2006).	<i>E. faecalis</i>
<i>icaA-D</i> <i>icaR</i>	<i>S. aureus</i>	En av de ekstracellulære polymeriske substansene i biofilmen hos <i>S. aureus</i> er «polysaccharide intercellular adhesin (PIA)». PIA er en poly- β (1-6)- <i>N</i> -acetylglucosamine (PNAG). Syntesen av dette styres av <i>icaADBC</i> -locuset. Den negative regulatoren "intercellular adhesin locus regulator" (<i>icaR</i>) styrer uttrykkelsen av <i>ica</i> -locuset (Arciola et al., 2015).	<i>S. aureus</i>
<i>ppkA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>ppkA</i> koder for "serine/threonine protein kinase PpkA" (Chen et al., 2005). Muterte stammer som mangler <i>ppkA</i> har betydelig redusert biofilmdannelse, samt lavere pyocyanin-produksjon og lavere toleranse for oksidativt og osmotisk stress, i tillegg til ineffektiv invadering av vertsceller, og generelt en redusert virulens (Pan et al., 2017).	<i>P. oleovorans</i>
<i>sprE</i>	<i>E. faecalis</i>	Genet kodet for en serin-proteinase fra V8-familien, som er involvert i biofilmdannelse (Chen et al., 2005).	<i>E. faecalis</i>
<i>esp</i>	<i>E. faecalis</i>	«Extracellular surface protein» er en virulensfaktor som bidrar til biofilmdannelse og resistens mot stressfaktorer fra miljøet. <i>esp</i> er ofte å finne i bakterieprøver fra urinveisinfeksjoner, som tyder på at biofilmegenskapene til bakterien er viktig for denne typen infeksjoner. Det har også blitt funnet en sterk korrelasjon mellom tilstedeværelsen av dette genet og antibiotikaresistens (Kafil & Mobarez, 2015).	<i>E. faecalis</i>

Adhesjon og kolonisering

Tabell 46 viser virulensgener forbundet med bakteriens adhesjon og kolonisering. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>fnbA-B</i>	<i>S. aureus</i>	«Fibronectin-binding proteins». Fibronektin er et protein som sitter utenpå celler og binder dem til ekstracellulær matriks. <i>S. aureus</i> koder for mange proteiner som virker som virulensfaktorer, som fører til flere typer sykdommer, blant annet mastitt hos kyr. Blant disse faktorene er <i>spA</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbA</i> og <i>fnbB</i> viktige for at <i>S. aureus</i> skal kunne adhere til og invadere vertsceller, samt unngå vertens immunforsvar (Stutz et al., 2011).	<i>S. aureus</i>
<i>map</i>	<i>S. aureus</i>	De ekstracellulære proteinene «Map» har høy affinitet for diverse proteiner i den ekstracellulære matriksen, blant annet fibronektin, fibrinogen og beinsialoprotein, som fremmer bakteriens adhesjon (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i>
<i>sdrC-D</i>	<i>S. aureus</i>	Genene koder for «Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein» (Chen et al., 2005). Proteinene binder til avflakede epitelceller, dette bidrar muligens til kolonisering i nesen (Foster et al., 2014).	<i>S. aureus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. epidermidis</i>
<i>fss1-2</i>	<i>E. faecalis</i>	Fss-proteinene binder til fibrinogen, et stoff som normalt finnes løst i blod, men som også kan inkorporeres i ekstracellulær matriks (Sillanpää et al., 2009).	<i>E. faecalis</i>
<i>clfA-B</i>	<i>S. aureus</i>	«Clumping factors» ClfA og ClfB binder begge til fibrinogen, men på forskjellige steder (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>
<i>ace</i>	<i>E. faecalis</i>	Genet koder for «collagen adhesin protein» (Chen et al., 2005), som er et protein som binder til kollagen.	<i>E. faecalis</i>
<i>efaA</i>	<i>E. faecalis</i>	Genet koder for «endocarditis specific antigen» (Chen et al., 2005). Dette er involvert i bakteriens adhesjon til biotiske og abiotiske overflater (Stępień-Pyśniak et al., 2019).	<i>E. faecalis</i>
<i>coa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>coa</i> koder for «staphylocoagulase precursor». Koagulasen er polypeptider som binder til og aktiverer prothrombin, som medfører at fibrinogen konverteres til fibrin og fremmer klumping av plasma eller blod (McAdow et al., 2012).	<i>S. aureus</i>
<i>ebp</i>	<i>S. aureus</i>	<i>ebp</i> koder for «elastin binding protein» (Nowrouzian et al., 2019). Ebp hjelper bakterien med kolonisering (Abdul et al., 2019).	<i>S. aureus</i>
<i>srtB</i>	<i>S. aureus</i>	Gram-positive patogene bakterier har proteiner på overflaten av cellen som er viktige i infeksjoner. Hos <i>S. aureus</i> er disse overflateproteinene festet til celleveggen med to sortase-enzymene, SrtA og SrtB, som gjenkjenner spesifikke sorteringssignaler (Jonsson et al., 2003). Sortaser kan være viktige virulensfaktorer da de blant annet holder overflateproteiner som tillater adhesjon til verstvev, invadering av vertsceller, unnvikelse og undertrykkelse av immunresponsen (Spirig et al., 2011).	<i>S. aureus</i>

Skade på strukturer

Tabell 47 viser virulensgener forbundet med bakteriens evne til å forårsake skade på forskjellige strukturer. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>sspA-C</i>	<i>S. aureus</i>	<i>ssp</i> -genene er involvert i produksjonen av proteaser som er viktige for næringsopptak. Man har i tillegg sett at proteaser kan kløyve spesifikke proteiner hos verten. For eksempel vil SspB degradere kollagen, menneskelig fibronektin og fibrinogen (Lehman et al., 2019).	<i>S. aureus</i>
<i>gelE</i>	<i>E. faecalis</i>	Gelatinase er kjent for sin rolle i dannelsen av biofilm, men ser også ut til å bidra til virulens ved å degradere mange av vertens substrater, som kollagen, fibrinogen, fibrin og komplementkomponentene C3 og C3a (Thurlow et al., 2010).	<i>E. faecalis</i>
<i>fsrA-C</i>	<i>E. faecalis</i>	FsrABDC-signal-transduksjons-systemet er en stor virulensregulator i <i>E. faecalis</i> . Disse proteinene er nødvendige for at blant annet <i>gelE</i> -genet skal uttrykkes, og er viktig i sammenheng med biofilm og endokarditt (Del Papa & Perego, 2011).	<i>E. faecalis</i>
<i>clpP</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>clpP</i> koder for «ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit», som er en serin-protease involvert i proteolyse og er nødvendig for vekst under stressforhold (Chen et al., 2005).	<i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. haemolyticus</i>
<i>geh</i>	<i>S. aureus</i>	<i>geh</i> koder for en glyserol-ester-hydrolase, altså en lipase (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i>
<i>lip</i>	<i>S. aureus</i>	<i>lip</i> koder for en «triacylglyserol lipase precursor» (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. epidermidis</i>

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>isdA-G</i>	<i>S. aureus</i>	<i>isd</i> -genene koder for produkter som stjeler jern fra hem (Skaar & Schneewind, 2004).	<i>S. aureus</i>
<i>pvdH</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>pvdH</i> -genet er ansvarlig for syntese av en pyoverdin, som er en jernklatrende forbindelse. Bakterien stjeler jern fra mitokondriene til vertscellen, og mitokondriene ødelegges av denne prosessen (Kang et al., 2018).	<i>P. oleovorans</i>
<i>lukF-PV</i>	<i>S. aureus</i>	Panton-Valentine leukocidin (PVL) er toksiner som danner porer i membranen hos vertens forsvarsceller ved en synergistisk mekanisme mellom de to sekresjonsproteinene, LukS-PV (gen ikke funnet i sekvenseringen) og LukF-PV (Melles et al., 2006). Det har flere ganger blitt beskrevet en sammenheng mellom PVL toksiner og nekrotiske lesjoner i hud og slimhinner (Mesrati et al., 2010).	<i>S. aureus</i>
<i>hlgA-C</i>	<i>S. aureus</i>	<i>hlg</i> -genene involvert i produksjonen av gamma-hemolysin, som har en rolle som minner om PVL. PVL og gamma-haemolysin (Hlg) er medlemmer av same toksin-familie ("the synergohymenotropic toxin family"). Her også er det beskrevet en sammenheng mellom PVL toksiner og nekrotiske lesjoner i hud og slimhinner (Mesrati et al., 2010).	<i>S. aureus</i>
<i>hld</i>	<i>S. aureus</i>	<i>hld</i> koder for delta-hemolysin: over 90% av pasienter med atopisk dermatitt (en kronisk betennelsessykdom i huden) er positive for <i>S. aureus</i> . Ved atopisk dermatitt er delta-toksinet en stor virulensfaktor, som forårsaker kutane betennelser via degranulasjon i mastceller (Baldry et al., 2018).	<i>S. epidermidis</i>
<i>hly/hla</i>	<i>S. aureus</i>	<i>hly/hla</i> koder for "Alpha-Hemolysin precursor". <i>S. aureus</i> produserer α -hemolysin, denne produksjonen er knyttet til sykdommens alvorlighetsgrad (Hong et al., 2014).	<i>S. aureus</i>
<i>hly</i>	<i>S. aureus</i>	<i>hly</i> koder for beta-hemolysin, som lyserer erythrocytter (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i>
<i>waaA</i> <i>waaC</i> <i>waaF-G</i> <i>waaP</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>waa</i> -genene er involvert i dannelsen av lipopolysakkarider (LPS, endotoksin) (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>

Motstandsdyktighet/immununnvikelse

Tabell 48 viser virulensgener forbundet med bakteriens motstandsdyktighet eller evne til immununnvikelse. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>Bsh</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>bsh</i> koder for «bile salt hydrolase», som gir resistens mot galle og gallesalter (Chen et al., 2005).	<i>E. faecalis</i>
<i>mtrD</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>mtrD</i> koder for "multiple transferable resistance system protein MtrD" mtr- (multiple transferable resistance) systemet fra <i>Neisseria gonorrhoeae</i> gir bakterier resistens mot mange hydrofobe midler, inkluder enkelte antibiotika, fettsyrer og vaskemidler (CARD, 2020c).	<i>P. oleovorans</i>
<i>vWbp</i>	<i>S. aureus</i>	<i>vWbp</i> koder for "secreted von Willebrand factor-binding protein precursor". Dette er en koagulase som tillater bakterien å spre seg som tromboemboliske lesjoner og unngå opsonofagocytose av immunceller (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i>
<i>sbi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>sbi</i> koder for "IgG-binding protein SBI". Immune evasion by interacting with IgG (Gonzalez et al., 2015).	<i>S. aureus</i>
<i>spa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>spa</i> koder for "Immunoglobulin G binding protein A precursor". Proteiner binder til Fc-domenet på IgG og unngår opsonofagocytose (VFDB).	<i>S. aureus</i>
<i>adsA</i>	<i>S. aureus</i>	Adenosin-syntase (AdsA) produserer ekstracellulær adenosin for å unngå vertens immunsystem (Thammavongsa et al., 2011).	<i>S. aureus</i>
<i>cap8A-P</i>	<i>S. aureus</i>	Alle <i>cap8</i> -genene er involvert i kapsel-dannelse (O'Riordan & Lee, 2004), som hjelper bakterien å unngå vertens immunsystem (Nanra et al., 2013).	<i>S. aureus</i>
<i>cpsA-B</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>cps</i> -genene er involvert i kapseldannelse, som hjelper bakterien å unngå vertens immunsystem (Chen et al., 2005).	<i>E. faecalis</i>

Spredning

Tabell 49 viser virulensgener forbundet med bakteriens evne til spredning. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>ef0818</i> <i>ef3023</i>	<i>E. faecalis</i>	Genene koder for hyaluronidaser (Nallapareddy et al., 2005), enzymer som gjør det lettere for bakterien å spre seg i vev ved å kløvyne hyaluronan, en viktig del av den ekstracellulære matriksen i bindevev (Li et al., 2000).	<i>E. faecalis</i>
<i>aur</i>	<i>S. aureus</i>	<i>aur</i> koder for «zinc metalloproteinase aureolysin», som hjelper bakterien å løsrive seg fra kolonier, og dermed øke spredningen (Chen et al., 2005).	<i>S. aureus</i>
<i>hysA</i>	<i>S. aureus</i>	<i>hysA</i> koder for en "hyaluronate lyase precursor". Hyaluronate lyase er det samme som hyaluronidase (Sigma-Aldrich, 2020), som gjør det lettere for bakterien å spre seg i vev ved å kløvyne hyaluronan (Li et al., 2000).	<i>S. aureus</i>

Sekretjonssystem

Tabell 50 viser virulensgener forbundet med bakteriens sekretjonssystem. Chen et al. (2005) er oppgitt som kilde der informasjonen er gitt av VFDB.

Gen	Opprinnelse	Gen forbundet med (virulensfaktor)	Funnet hos bakterie
<i>xcpQ-T</i> <i>xcpV</i> <i>xcpA/pilD</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>xcp</i> -genene er forbundet med «Type 2 secretion system» (T2SS) : Xcp-systemet er viktig for utskillelsen av mange forskjellige proteiner, som for eksempel fosfolipase, lipase og eksotoksin A (Senf et al., 2008). <i>pilD</i> -genet er også kjent som <i>xcpA</i> , som er involvert i både proteinssekresjon og i dannelsen av type 4 pili (de Groot et al., 1994).	<i>P. oleovorans</i>
<i>pscP</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>pscP</i> er forbundet med «Type 3 secretion system» (T3SS): En hul molekylær «nål», som overfører toksiner til vertscellens cytosol (Galle et al., 2012).	<i>P. oleovorans</i>
<i>prgB/asc10</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>prgB/asc10</i> er forbundet med «Type 4 secretion system» (T4SS): Viktig i forbindelse med horisontal genoverføring. Disse bakteriene er avhengige av overflateadhesiner for genoverføring, PrgB er et slikt adhesin. Dette tillater horisontal genoverføring, samt robust biofilmdannelse (Schmitt et al., 2018).	<i>E. faecalis</i>
<i>icmF1/tssM1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>icmF1/tssM1</i> er forbundet med «Type 6 secretion system» (T6SS) (Chen et al., 2005). T6SS benyttes til transport av proteiner inn i mål-celler, både eukaryote og prokaryote (Cascales & Cambillau, 2012). Systemet kan blant annet benyttes til å levere dødelige effektorer til målcellen (Alteri & Mobley, 2016).	<i>P. oleovorans</i>
<i>tagR</i>	<i>P. aeruginosa</i>	TagR fremmer PpkA-katalysert T6SS-aktivering (Hsu et al., 2009).	<i>P. oleovorans</i>
<i>hsiB1/vipA</i> <i>hsiC1/vipB</i> <i>hsiF1</i> <i>hsiG1</i> <i>hsiJ1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Alle <i>hsi</i> -genene er involvert i T6SS (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>
<i>clpV1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>clpV1</i> er forbundet med T6SS (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>
<i>dotU1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>dotU1</i> er forbundet med T6SS (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>
<i>fha1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>fha1</i> er forbundet med T6SS (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>
<i>hcp1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>hcp1</i> er forbundet med T6SS (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>
<i>vgrG1a</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>vgrG1a</i> er forbundet med T6SS (Chen et al., 2005).	<i>P. oleovorans</i>
<i>esaA-C</i> <i>essA-C</i> <i>esxA-B</i>	<i>S. aureus</i>	Genene er forbundet med «Type 7 secretion system» (T7SS), som spiller en viktig rolle for bakteriens overlevelse og infeksjonens vedvarelse. Viktig for bakteriens konkurransedyktighet (Chen et al., 2005). T7SS er også kjent som «ESAT-6 secretion system» (ESS) (Tchoupa et al., 2019). <i>Ess</i> -locuset er en cluster med åtte gener: <i>esxAB</i> , <i>essABC</i> , <i>esaABC</i> (Burts et al., 2008).	<i>S. aureus</i>

VFDB ga altså mange treff på virulensfaktorer, og det er tydelig at disse forskjellige bakteriene kan gjøre mye skade, om de skulle få muligheten til det. Ellers ble Prokka også benyttet, men det var få treff som samsvarte med «virulence»-søket, så ytterligere undersøkelser må eventuelt være mer spesifikke. Det som ble funnet var *esaC* og *esxB* hos

15(1), men dette var allerede identifisert gjennom VFDB, og er beskrevet i tabell 50. *phoP* hos ESBL_M36_a, ESBL_M36_c og ESBL_M40_c er ifølge VFDB nødvendig for å registrere mangel på Mg^{2+} , og kontrollerer uttrykkelsen av gener som styrer overflatemodellering og tilpasning til intracellulær vekst, men genet ser ut til å stamme fra *Mycobacterium tuberculosis*, så opphavet er noe tvilsomt. Det siste treffet var *cvfB*, CvfB er et konserverte regulatorisk protein som er viktig for virulensen hos *S. aureus*. *cvfB* er nødvendig for transkripsjon av *hla*-genet, som koder for alfa-hemolysin (Matsumoto et al., 2010). Hvorfor genet ble identifisert hos ESBL_M36_a, ESBL_M36_c og ESBL_M40_c i tillegg er ukjent.

4.3 Diskusjon av F- og S-bakterier

Prøve 4(1) er en betahemolytisk *S. haemolyticus*-stamme som vokser på MRSA-skåler. MRSA og ESBL1-2-multipleks qPCR var negativ, så den har ikke genene *mecA/mecC* eller *spa* eller betalaktamase-genene som ESBL1-2 screener for. Stammen er derimot klinisk resistent mot ciprofloxacin (fluoroquinolon), med MIC på 1,25 ng/μl, og verdien overstiger ECOFF, som indikerer en ervervet form for resistens. Resistensgenene funnet var *arlR*, *mgrA*, *norA*, som betyr at den har en pumpemekanisme (NorA, regulert av blant annet ArlR og MgrA) som beskytter den mot flere typer antibiotika, blant annet fluoroquinoloner, cefalosporiner og tetracyclin. NorA er en kromosomalt kodet multi(drug)-efflukspumpe fra MFS-familien, som viser noe genetisk diversitet, med tre alleler som varierer med opptil 10% i nukleotidsekvensene (Costa et al., 2013). Pumpen kan fjerne mange forskjellige skadelige stoffer fra bakteriecellen, selv strukturelt ulike komponenter. *norA* har et basalt uttrykksnivå som generelt gjør bakterien mindre sensitiv for antimikrobielle stoffer, men økt resistens mot flere stoffer er assosiert med økt uttrykkelse av *norA*. Denne økningen kan oppstå gjennom en mutasjon i promoter-regionen, eller gjennom regulatoriske proteiner (Costa et al., 2013). *norA* ble funnet hos alle de undersøkte stafylokokkene, men prøve 4(1) var den eneste som var klinisk resistent og som kunne skilles fra villtypen. Gener fra bakteriens kromosom er sjelden utsatt for horisontal genoverføring, sammenliknet med gener som sitter i plasmider, men det gir mening at bakterien kan skille seg fra villtypen dersom riktig mutasjon i kromosomet oppstår, slik at pumpen blir mer effektiv. For eksempel om det uttrykkes flere kopier av genet, eller om mRNA får økt stabilitet eller levetid. Gjennom Prokka-søket kan det virke som om stammen skiller seg fra de andre isolatene av *S. haemolyticus* fordi den har genet *mdtL*, så det kan også hende at dette bidrar til at den er mer resistent enn de andre, men det er ikke mulig å si sikkert uten videre undersøkelser.

I tillegg til å være resistent er stammen også noe virulent: selv om det ikke ble funnet noen gener for hemolyse, var den åpenbart beta-hemolytisk, da koloniene viste en tydelig gul gjennomsiktig sone på blodskålene, som ikke er særdeles overraskende, gitt bakteriens navn. Det er fullt mulig at en bakterie har gener som koder for hemolysin selv om det ikke har blitt identifisert for den spesifikke prøven, dersom genet ikke ble sekvensert, eller det bare ikke var noen treff på genet i noen av databasene eller annoteringsprogrammet som ble benyttet. Virulensgenene som ble funnet var *clpP*, og *lip*. *clpP* har ifølge VFDB opprinnelse i *L. monocytogenes*, men genet for denne proteasen er vidt spredt blant prokaryoter og eukaryoter (Moreno-Cinos et al., 2019), og den ble funnet hos flere av bakteriene i denne oppgaven, så det trenger ikke være noe unaturlig med dette. I tillegg til proteolyse har stammen også evnen til lipolyse fra virulensgenet *lip*, som koder for en «triacylglycerol lipase precursor». Genene ble funnet fra kun MiSeq-data. Unicycler ble senere benyttet, men det ble ikke oppdaget noen andre gener enn det som allerede var funnet.

Prøve 5(1) er en betahemolytisk *S. haemolyticus*-stamme som vokser på MRSA-skåler. MRSA- og ESBL1-2-multipleks qPCR var negativ. Den er ikke klinisk resistent mot ciprofloxacin, og ECOFF er ikke oversteget. Det er ikke mulig å si noe om hvilke resistensgener og virulensgener den har da MiSeq-sekvenseringen ga for lite data til contigs. Prøven ble heller ikke valgt ut for sekvensering med MinION, så selv hvis Canu hadde fungert, så var det ikke noe data å jobbe med for denne prøven.

Prøve 6(1) er en betahemolytisk *S. haemolyticus*-stamme som vokser på MRSA-skåler. MRSA- og ESBL1-2-multipleks qPCR var negativ. Denne stammen vokste raskere og kraftigere enn de andre isolatene av *S. haemolyticus*, og var derfor den første som ble valgt ut til sekvensering, hvor det ble oppdaget at den hadde *norA*-genet. Dette var bakgrunnen for MIC-testingen med ciprofloxacin, hvor denne, og alle andre stammer som hadde vokst på MRSA-skåler ble testet. MIC-testen viste at denne stammen, på tross av at den har det samme NorA-kodende genet som 4(1), ikke er klinisk resistent, og at den ikke skiller seg fra villtypen, slik som 4(1). Det var i utgangspunktet forventet at denne stammen skulle være mer resistent enn de andre, siden den hadde mye større og tydeligere kolonier enn de andre som hadde vokst like lenge på samme medie. Prøve 6(1) fikk ikke andre treff enn *mgrA* ved søk i CARD og NCBI, men *norA*-genet ble identifisert med Prokka, sammen med en annen pumpe, som ikke ble funnet hos de andre isolatene av *S. haemolyticus*, nemlig *sepA*. Denne unike (for *S. haemolyticus* i denne oppgaven) pumpen kan være grunnen til at den hadde kraftigere vekst på MRSA-skålene enn det de andre isolatene hadde. Eller det kan ha noe å gjøre med de andre

genene som ble oppdaget med Prokka, nemlig *bacA*, *bcr*, *emrA*, *narK*, *tcaB* og *mdtG*, som alle er efflukspumper som kan hjelpe bakterien å kvitte seg med skadelige stoffer. Produsenten av MRSA-skålene ønsker ikke å oppgi hva slags antibiotika som er tilsatt, så det kan være at pumpene gir en høyere grad av resistens mot noe ukjent som befinner seg i skålen. De gir i hvert fall ikke noen høy grad av resistens mot ciprofloxacin, da MIC-verdien for dette stoffet var ganske lav. Hvis det hadde vært mulig å utføre MIC-tester med andre strips, så hadde det kanskje vært mulig å si noe mer om de ekstra pumpene gjorde stammen mer standhaftig enn de andre, men det er også fullt mulig at stammen har raskere vekst grunnet noe urelatert til antibiotikaresistens. Denne stammen hadde ifølge Prokka også *fntC*-genet som er forbundet med oxacillin- og daptomycin-resistens, dette mangler hos 4(1), men ble funnet hos alle andre stafylokokker. Disse vokste ikke raskere enn 6(1), så det er liten grunn til å tro at det spesifikt er dette genet som lot 6(1) trives på MRSA-skålen.

Prøve 13(1) er en betahemolytisk *S. haemolyticus*-stamme som vokser på MRSA-skåler. MRSA- og ESBL1-2-multipleks qPCR var negativ og MIC-testen viste at den ikke var klinisk resistent mot ciprofloxacin og at ECOFF ikke var oversteget. Det må kommenteres igjen at denne stammen, av ukjent årsak, ikke vokser på MH-agar, så MIC-testen ble utført på blodskål, som kan ha påvirket resultatet. Prøven ble kun sekvensert med MiSeq, og det ble funnet de samme genene som hos prøve 4(1), men i tillegg ett ekstra virulensgen: *sdrD*. Dette genet koder for et Ser-Asp-rikt fibrinogenbindende bein-sialoproteinbindende protein, et protein som binder til avflakede epitelceller, som dermed kan gi bakteriene evnen til økt kolonisering. Dette er altså bakterier som kan gi problemer om de får muligheten til det, men om man kan stole på MIC-testen utført på blodskål så bør en eventuell infeksjon være enkel å behandle med ciprofloxacin, i motsetning til prøve 4(1).

Tilsynelatende er alle tre stammer av *S. haemolyticus* relativt like, så forhåpentligvis var det ikke et stort tap at det var for lite data fra prøve 5(1), *S. haemolyticus*. På den annen side identifiserte Prokka mange flere gener hos 6(1) enn hos 4(1) og 13(1), så det er ikke helt utenkelig at 5(1) har noen veldig spennende gener som ikke kan diskuteres her. Samtidig kan det også tenkes at 4(1) og 13(1) har like mange spennende gener som 6(1), som ikke ble funnet i sekvenseringen, da det kun var 6(1) som fikk assemblyet et komplett sirkulært genom og komplette sirkulære plasmider.

Prøve 15(1) er en betahemolytisk *S. aureus*-stamme som vokser på MRSA-skåler. MRSA- og ESBL1-2-multipleks qPCR var negativ. Resistens hos denne stammen ble oppdaget sent, da kolonier ikke vokste frem før den påførte, fargede prøven ble dratt inn mot midten av skålen med en plastpodøse, og inkubert videre. Det samme skjedde da den ble overført til ny skål, veksten var tvilsom der den var påført, det var kun endret farge, men ingen tydelige kolonier, så det var ikke lett å se om det faktisk var vekst. Men igjen, på ny skål, så oppstod det raskt store, tydelige kolonier én dag etter at prøven var trukket i med podøse. Se vedlegg 5 for bilder av veksten. Denne prøven, sammen med prøve 4(2), ble testet med MRSA-multipleks qPCR av Alberto Bombelli. Ut ifra informasjonen som ble gitt, så var denne prøven fullstendig negativ, men i sekvenseringen ble *spa*-genet oppdaget. Det gir mening at denne stammen har dette genet, da man ser etter det for å kunne indikere tilstedeværelsen av en *S. aureus*, så det hadde vært forventet å finne det med MRSA-multipleks. Det er vanskelig å kommentere hva årsaken til det negative qPCR-resultatet kan være når noen andre har utført testen, og mer informasjon om kjøringen er foreløpig ikke tilgjengelig. Det er mulig at den oppdagede gen-sekvensen ikke ligner nok på den spesifikke sekvensen som primerene oppdager. Prøve 15(1) ble også testet med ciprofloxacin-strips, som de andre bakteriene som vokste på MRSA-medie, men den var ikke klinisk resistent, og ECOFF var ikke oversteget. Den ble også MIC-testet med tetracyclin-strips etter de første funnene i sekvenseringen, men MIC var kun 0,094 ng/μl, og dette er ikke nok til å overstige ECOFF eller indikere klinisk resistens mot stoffet. Stammen har altså genene til å være resistent mot i hvert fall to typer antibiotika, men det er tilsynelatende ikke en ervervet resistens, og det er ikke klinisk relevant. Dette viser et viktig poeng: bare fordi en bakterie har et resistensgen, så betyr ikke det nødvendigvis at genet er aktivt, eller «aktivt nok», til å faktisk gjøre bakterien resistent. Men det var ganske mange gener som ble funnet hos denne bakterien, med MiSeq- og MinION-data, i hvert fall sammenliknet med de andre stafylokokkene. Resistensgenene var *arlR*, *arlS*, *dha-1*, *fosB*, *fosB-Saur*, *lmrS*, *mepA*, *mepR*, *mgrA*, *norA* og *tet38*. Tet38 er en tetracyclin effluks-pumpe fra MFS-familien, som kan gi resistens mot tetracyclin, men tilsynelatende ikke i veldig stor grad hos akkurat denne prøven, som MIC-testen viste. Prokka identifiserte også flere pumper som kan hjelpe bakterie-stammen å beskytte seg mot dette stoffet, og et gen som spesifikt er forbundet med tetracyclin-resistens, nemlig repressor-genet *tetR*, så det er flere ting som antyder at den er tetracyclin-resistent, uten at den faktisk overstiger noen relevante verdier. Stammen har også genene for NorA-pumpen, og *arl*- og *mgr*-genene som er med på å regulere pumpen, men som ciprofloxacin-MIC-testen viste, så er ikke pumpen ekstremt effektiv for å fjerne ciprofloxacin. Stammen har mange gener som

muligens kan gi resistens mot flere typer antibiotika, men det ikke ble tid til å bestille strips for disse, eller til å teste, på grunn av Corona-utbruddet. For eksempel er DHA-1 en MFS-pumpe som kan gi resistens mot Kloramfenikol, *fos*-genene kan inaktivere fosfomycin, og MepA er et effluks-protein fra MATE-familien som reguleres av MepR og kan gi glycylicyclin-, akridinfarge-, tetracyclin- og fluoroquinolon- resistens. Det Prokka-identifiserte genet *fmiC* kan gi dessuten gi resistens mot oxacillin eller daptomycin. Stammen er kun testet med to typer strips, så det er vanskelig å si noe bestemt om resistens mot andre typer antibiotika, men det er verdt å legge merke til at den ikke klarte å vokse på ESBL-skåler eller CRE-skåler, og den slet også med å spre seg på MRSA-skålene uten at den ble dratt inn mot midten av en plastpodøse, så det er ikke så mye som tyder på at det er en ekstremt resistent stamme. På den annen side så vokste den veldig godt hver gang kulturen ble trukket i med podøse. Dette ble gjort flere ganger, fordi resultatet virket merkelig, men det var det samme hver gang: den første «veksten», så bare ut som en falsk positiv, hvor det som var påført av kultur bare endret farge, det var ingen kolonier. Men ved å trekke i kulturen med en podøse, oppstod det raskt tydelige kolonier i podøsesporet, men det var fortsatt ingen kolonier der kulturen opprinnelig ble avsatt. Det virket mulig at den opprinnelige kulturen ikke var en renkultur, og at de faktisk resistente bakteriene slet med å konkurrere med en annen type bakterie som det var flere av i den avsatte kulturen, som muligens overlevde ved å leve beskyttet i døde bakterier rundt seg. Hadde dette vært tilfelle, så hadde det gitt mening at de fikk muligheten til å danne store kolonier etter at de ble trukket ut fra den avsatte kulturen, men disse nye koloniene ble plukket og overført til nye skåler, og det samme skjedde gjentatte ganger. Det er ikke godt å si hvorfor bakteriene vokser godt i midten av skålene, men tilsynelatende ikke i det hele tatt i kanten av skålen. Det kunne ha blitt testet å påføre kulturen direkte midt på en skål, for å se om det var noen forskjell på hvor den ble påført, men det virker usannsynlig at det skal ha noe å si, og det var uansett tomt for skåler da dette ble vurdert. Det hadde vært interessant å finne ut hvorfor 15(1) utviser dette vekstmønsteret, og det hadde vært morsomt å finne ut hva det er som gjør at 13(1) ikke tåler MH-agar, men det falt litt utenfor fokuset for denne oppgaven.

15(1)-prøven hadde også flere virulensgener: *adsA*, *aur*, *cap8A*, *cap8B*, *cap8C*, *cap8D*, *cap8E*, *cap8F*, *cap8G*, *cap8H*, *cap8I*, *cap8J*, *cap8K*, *cap8L*, *cap8M*, *cap8N*, *cap8O*, *cap8P*, *clfA*, *clfB*, *clpP*, *coa*, *ebp*, *esaA*, *esaB*, *esaC*, *essA*, *essB*, *essC*, *esxA*, *esxB*, *fnbA*, *fnbB*, *geh*, *hly*, *hld* (funnet med Unicycler) *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *hly/hla*, *hysA*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *isdA*, *isdB*, *isdC*, *isdD*, *isdE*, *isdF*, *isdG*, *lip*, *lukF-PV*, *map*, *sbi*, *sdrC*, *sdrD*, *spa*, *srtB*, *sspA*,

sspB, *sspC* og *vWbp*. Disse genene gir stammen et bredt spekter av virulensfaktorer, som for eksempel immununnvikelse takket være *AdsA*, som produserer ekstracellulært adenosin for å unngå vertens immunsystem, eller *cap*-genene som er involvert i kapseldannelse som også beskytter bakterien mot immunforsvaret, eller *spa* og *vWbp*, som hjelper bakterien å unngå opsonofagocytose. Flere av genene, som *esa*-genene, koder for sekresjonssystem, og *ica*-genene er involvert i biofilmdannelse. Stammen har gener som stjeler jern fra hem, gener som gir lipolyse og proteolyse, gener som bidrar til spredning og adhesjon og kolonidannelse, samt flere gener som koder for forskjellige toksiner. Blant annet har den genene for alfa-hemolysin (*hly/hla*), beta-hemolysin (*hlyB*), gamma-lysin (*hlyG*) og delta-lysin (*hlyD*). Alle genene er beskrevet hver for seg i virulensstabellene (tabell 43-50), men jevnt over kan man si at stammen har virulensgener fra alle virulens-kategoriene, med unntak av flagell- og pili-gener. Bakteriene kan adhere, kolonisere, danne biofilm, unngå immunsystemet, spre seg effektivt og forårsake skader på forskjellige strukturer, så det er betryggende at den tilsynelatende ikke er svært resistent mot antibiotika. Den er ikke testet for alt den kan testes med, men den er i det minste sensitiv for ciprofloxacin og tetracyclin.

4(2) er en *S. epidermidis*-stamme som ikke viste noen antydning til hemolyse, og vokste på MRSA-skål. MRSA-multiplex qPCR var negativ. Denne vokste noe tregere enn de andre stafylokokkene, og ble først merket som negativ, men kolonier vokste frem mens det ble undersøkt hvordan antibiotikaskåler skulle kastes. Det er denne veksten det er bilde av i tabell 20. Da deler av dette ble overført til ny antibiotikaskål, kom veksten veldig raskt. Det er mulig at dette skyldes indusering av resistensmekanismer, som for eksempel efflukspumper, som sekvenseringen viser at den har. Resistensgenene funnet var *arlR*, *dfrC*, *fosB-251804940*, *mgrA* og *norA*. *NorA* (med regulerende *arlR* og *mgrA*) er allerede kommentert hos de andre stafylokokkene, og kan godt være grunnen til at bakteriene vokste frem på MRSA-skålene. Stammen har også et *fos*-gen, som 15(1), men det ble ikke anledning til å MIC-teste dette. Unikt for denne prøven var *dfrC*-genet, som koder for en dihydrofolat-reduktase som kan gi resistens mot angrep fra trimetoprim. De fleste resistensmekanismene funnet hos prøvene i denne oppgaven kom fra efflukspumper eller inaktivering av antibiotika, prøve 4(2) var et ett av unntakene, med en resistensmekanisme som bytter ut angrepspunktet. Dessverre ble ikke dette genet oppdaget før Corona-begrensningene, så det var ikke mulig å få utført en MIC-test med trimetoprim heller. Det ble altså kun testet med ciprofloxacin, men som alle de andre stafylokokkene, med unntak av 4(1), var den ikke spesielt resistent mot dette. Av virulensgener så hadde stammen ingenting unikt i forhold til de andre stafylokokkene, det ble

funnet *clfA*, *clfB*, *hld*, *lip* og *sdrC*, som betyr at den har klumpefaktorene ClfA og ClfB, som begge binder til fibrinogen og kan forårsake klumping av blodplasma. *hld*-genet koder for delta-hemolysin, og kan forårsake vevsskade ved å frigjøre tryptase og laktat dehydrogenase fra mastceller, og toksinene kan angripe diverse immunceller for å unngå vertens immunsystem. *lip* og *sdrC* kan som nevnt forårsake henholdsvis lipolyse og økt kolonisering.

Denne prøven ble sekvensert med både MinION og MiSeq, men hverken Canu eller Unicycler var mulig å gjennomføre på denne prøven, da programmene krasjet gjentatte ganger. Galaxy ble ganske tidlig høyt belastet av alle som jobbet med COVID-19, som kan ha medført at tjenesten ofte var ustabil. Det er mulig flere gener hadde blitt oppdaget dersom Unicycler hadde fungert. Det er også mulig at den er klinisk resistent mot fosfomycin, oxacillin, daptomycin eller trimetoprim, og at den skiller seg fra villtypen, men det er ikke mulig å si noe om dette med informasjonen som er tilgjengelig.

Alle stafylokokkene, 4(1), 6(1), 13(1), 15(1) og 4(2) har NorA-pumpen, men ikke alle er like resistente. Det kan være flere grunner til dette, som for eksempel forskjellige varianter av pumpen, mutasjoner eller forskjellig grad av indusering. Multi(drug)-effluks-pumper er ofte en mekanisme for indusert resistens (Reygaert, 2018), så dette er også en god grunn til å begrense bruk av antibiotika. Det er også mulig at det ikke er noe spesielt med NorA-pumpen til den klinisk resistente 4(1) i det hele tatt, men at det heller er *mdtL*-genet som hjelper til med ciprofloxacin-pumpingen, siden ingen andre stafylokokker hadde dette genet, men det er ikke mulig å si sikkert uten videre undersøkelser. Dette genet er ifølge CARD foreløpig kun et antatt multiresistensprotein, så det er usikkert om det faktisk har noe med ciprofloxacin-resistens å gjøre (Chen et al., 2005).

Det er i hvert fall bekreftet én klinisk resistent stafylokokk, som skiller seg fra villtypen. Det samme gjelder én av enterokokkene. Enterokokker kan lett kan forurense speneprøver ved testing, (Whist, 2020), men disse opportunistiske bakteriene har også vist seg å kunne være en årsak til mastitt (Róžańska et al., 2019):

Prøve 10(4) er en *E. faecalis*-stamme uten synlig hemolyse, som vokser på CRE-skåler. Siden det var vekst på disse antibiotikaskålene, ble de testet med imipenem- og meropenem-strips, men MIC-verdiene er for lave for ECOFF og klinisk resistens. Flere tester ble ikke utført grunnet Coronapandemien. CAR1-2-multipleks PCR var negativ, så den har ingen av målgene til CAR-primerene, men sekvensering med MiSeq, og søk i NCBI og CARD fant følgende resistensgener: *dfrE*, *efrA*, *efrB*, *emeA*, *lsaA* og *tetM*. DfrE er, som DfrC, en

dihydrofolat-reduktase som er resistent mot trimetoprim, fordi angrepspunktet er byttet ut. EfrAB effluks-pumpen fra ABC-familien kan gi resistens mot blant annet tetracyclin, fluoroquinolon, cefalosporin, og rifamycin. EmeA er en multi(drug)-efflukspumpe fra MATE-familien som kan gi resistens mot flere typer antibiotika. Lsa er en del av et effluks-system forbundet med ABC-familien. TetM er et ribosom-beskyttelses-protein, hvor mekanismen ikke er å pumpe stoffer ut av cellen, men å beskytte ribosomet mot tetracyclin som kommer inn i cellen. Hadde dette blitt oppdaget i tide, så hadde en MIC-test med tetracyclin blitt utført, da den har forutsetningene for å være resistent mot dette, men foreløpig er det ikke annet å si enn at den kanskje er resistent.

Virulensgenene hos stammen var som følger: *ace*, *bopD*, *bsh*, *clpP*, *cpsA*, *cpsB*, *ebpA*, *ebpB*, *ebpC*, *ef0818*, *efaA*, *esp*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *fsr1*, *fsr2*, *gelE*, *prgB/asc10*, *sprE* og *srtC*, som gir bakteriene adhesjon, biofilmdannelse, resistens mot galle, proteolyse, kapseldannelse, pili, økt spredning, fibrinogen-binding og sekresjonssystem. *bsh*-genet («galle-resistens») er i VFDB markert med opphav i *L. monocytogenes*, men BSH-proteiner har blitt identifisert hos mange forskjellige bakterier, inkludert *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacteroides* og *Clostridium* spp (Song et al., 2019), så dette trenger ikke å være en feil.

11(4) er en *E. faecalis*-stamme uten synlig hemolyse, som vokser på CRE-skåler. MIC-verdiene for meropenem og imipenem er for lave for ECOFF og klinisk resistens, flere tester ble ikke utført grunnet Coronautbruddet. CAR1-2-multipleks PCR var negativ. Prøven ble sekvensert med MiSeq og MinION, men Unicycler fungerte ikke, så genene funnet var kun fra MiSeq. Resistensgenene var de samme som hos prøve 10(4), pluss ett ekstra gen, *ant(6)-Ia*. ANT(6)-Ia er en aminoglycosid nukleotidyltransferase kodet fra både plasmider og kromosomer hos flere forskjellige bakterier. Resistensmekanismen er inaktivering av aminoglycosider, som streptomycin. At genet kan sitte på plasmider gjør at det lettere kan spres til andre bakterier. 11(4) har nesten de samme virulensgenene som 10(4). Forskjellen er at den har det ekstra genet *ef3023*, og mangler sekresjonssystem-genet *prgB/asc10*. *ef3023* har samme funksjon som *ef0818*, det er en hyaluronidase, et enzym som gjør det lettere for bakterien å spre seg i vev ved å kløyve hyaluronan, en viktig del av den ekstracellulære matriksen i bindevev. Denne stammen er potensielt resistent mot tetracyclin og/eller streptomycin, men dette har ikke blitt sjekket i praksis.

16(4) er en *E. faecalis*-stamme uten synlig hemolyse, som vokser på CRE-skåler. MIC-verdiene for meropenem og imipenem er for lave for ECOFF og klinisk resistens, flere tester ble ikke utført grunnet Coronapandemien. CAR1-2-multipleks PCR var negativ. Denne

stammen har akkurat de samme resistens- og virulens-genene som prøve 11(4), i tillegg til resistensgenet *spw*, også kjent som *ant(9)-Ia*, som sitter på plasmider og transposoner. Spw/ANT(9)-Ia er en aminoglycosid nukleotidyltransferase som kan medføre inaktivering av aminoglycosider, på samme måte som ANT(6)-Ia. Før Corona-tiltakene ble genene som kan gi resistens mot streptomycin, trimetoprim og tetracyclin oppdaget, så her ble MIC-tester utført. Med streptomycin var MIC-snippet ≥ 1024 ng/ μ l, som betyr at det var vekst over hele skålen, og ingen tegn til hemning. Denne prøven er klinisk resistent mot streptomycin, og verdien overstiger ECOFF, som antyder at dette er en ervervet resistens. Den har to forskjellige gener som gir de samme resistensmekanismene mot det samme antibiotikumet, så det er ikke kjent om det er ANT(6)-Ia, ANT(9)-Ia, eller en kombinasjon av disse som gjør enterokokken så ekstremt resistent mot streptomycin. Det er også slik at polare molekyler har problemer med å penetrere celleveggen til enterokokker, som gir bakterien en viss grad av naturlig resistens mot aminoglycosider (Reygaert, 2018), så dette kan også ha en innvirkning. Det er synd at 11(4), som kun hadde *ant(6)-Ia* og ikke *ant(9)-Ia*, ikke ble testet med streptomycin, siden dette kunne gitt et hint om hvilket gen som ga den kraftige resistensen. Hvis 10(4) også hadde blitt testet, ville det gitt en indikasjon på hvor resistente bakteriene er uten noen av transferasene. Alle tre enterokokkene hadde også potensialet til trimetoprim-resistens, takket være *dfrE*-genet, men kun 16(4) ble testet, og som vist i resultater, så var MIC-verdien ganske lav. EUCAST har ingen ECOFF for denne stammen med trimetoprim, eller noen breakpoint-verdi for klinisk resistens, men det ble testet likevel for å se om det var noen ekstreme resultater. Med en MIC på 0,079 ng/ μ l er stammen ganske sensitiv, da hemningssonen slutter omtrent midt på stripsen, så det er ikke så mye å diskutere i dette tilfellet. Tetracyclin-resultatene er mer spennende: *tetM*-genet ble funnet hos alle enterokokkene, og 16(4), som ble testet med tetracyclin-strips, har tilsynelatende ervervet resistensen, da ECOFF er oversteget med en MIC-verdi på 24 ng/ μ l. Breakpoint for klinisk resistens for dette er ikke oppgitt hos EUCAST, men resultatet er likevel interessant. Det er ikke sikkert om disse enterokokkene faktisk var til stede i melken eller om de stammer fra en forurensing fra spenen, men de er uansett til stede i miljøet og kan føre til smitte, infeksjoner og bidra til å spre resistens i miljøet.

S-prøvene, alle identifisert som *P. oleovorans*-stammer, som hadde vekst på ESBL-skåler, og ikke viste fullstendig hemolyse på blodskåler, ble kun sekvensert med MiSeq. Ikke alle de 12 prøvene ble sekvensert, av økonomiske årsaker, men alle ble MIC-testet med cefotaksim og cefepim (tredje- og fjerde- generasjons cefalosporiner) før sekvenseringen. Disse tallene

avgjorde hvilke det var mest spennende å jobbe videre med. ESBL_M36_a, ESBL_M36_c, ESBL_M40_a, ESBL_M40_b og ESBL_M40_c ble screenet for betalaktamaser med ESBL1-4-multipleks PCR, men var negative for alle målgener. Prøve ESBL_M36_c, ESBL_M40_a og ESBL_M40_b hadde manglende eller tvilsomme bånd på 16S, (se vedlegg 3 for gel-bilde), hvis dette var på grunn av for mye DNA, så kan det bety at andre gener ikke synes og dermed gir en falsk negativ. På den annen side ble alle disse prøvene helgenomsekvensert, og disse betalaktamase-genene ble ikke funnet i sekvenseringen, så trolig kan man stole på PCR-resultatene. De resterende prøvene skulle også gjennom samme PCR senere, da de også hadde vokst på ESBL-medie, men dette ble det ikke tid til før Coronatiltakene ble satt i gang. Prøvene ble testet med cefotaksim først, og veileder ønsket at alle prøver som hadde MIC på eller over 2 ng/μl også skulle testes med cefepim. Alle 12 prøvene fikk MIC-verdier på 2 ng/μl eller høyere, bortsett fra én eneste prøve (ESBL_M40_a) så alle ble testet med begge typer strips, også den som var for lav, siden det kun var én som var under 2 ng/μl. Her, som med F-prøvene, er det mange typer antibiotika det gjerne skulle ha vært MIC-testet med, men det ble ikke mulighet til det på grunn av pandemien.

ESBL_M36_a hadde MIC-verdi for cefotaksim på 14 ng/μl og 4 ng/μl for cefepim. Det ble funnet følgende resistensgener: *aac(6')-Ib7*, *aph(3'')-Ib (strA)*, *aph(6)-Id (strB)*, *cpxR*, *emrE*, *mexA*, *mexB*, *mexD*, *mexE*, *mexF*, *mexJ*, *mexK*, *muxB*, *opmH*, *oprM*, *oprN*, *pmpM*, og «*Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin*». AAC(6')-Ib7, APH(3'')-Ib (StrA), og APH(6)-Id (StrB) er alle aminoglycosid transferaser som kan kodes fra mobile genelementer, og gi resistens mot aminoglycosider som streptomycin ved å inaktivere stoffet. Dette ble oppdaget og testet tidlig, og prøven hadde en MIC-verdi på ≥ 1024 ng/μl, altså på eller forbi maks-verdien, som er ekstremt. Ellers har den resistensgener som koder for flere forskjellige pumper: *cpxR*, *mex*-genene, *muxB*, *opmH*, og *opr*-genene koder for effluxpumper i RND-familien, *emrE* hører til SMR-familien, og *pmpM* til MATE-familien. Til sammen gir de et bredt spekter av mulig resistens, inkludert mot carbapenem, diaminopyrimidin, aminoglycosid, antibakterielle frie fettsyrer, tetracyclin, marolid og fluoroquinolon. *rpoB*-varianten denne stammen har vil også kunne gi resistens mot rifamycin, da den har fått modifisert angrepspunktet til denne antibiotikaen.

Stammen hadde også følgende virulensgener: *alg8*, *algA*, *algB*, *algC*, *algD*, *algE*, *algF*, *algG*, *algI*, *algL*, *algP/algR3*, *algR*, *algU*, *algW*, *algZ*, *chpA*, *chpB*, *clpV1*, *dotU1*, *fha1*, *fimV*, *fleN*, *fleQ*, *fleR*, *fleS*, *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flhA*, *fliA*, *fliC*, *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliI*, *fliJ*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *hcp1*, *hsiB1/vipA*, *hsiC1/vipB*, *hsiF1*, *hsiG1*, *hsiJ1*,

icmF1/tssM1, motA, motB, motC, motD, motY, mucD, mucP, pilB, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilR, pilT, pilU, ppkA, tagR, tsr, vgrG1a, waaA, waaF, waaG, waaP, xcpA/pilD, xcpQ, xcpR, xcpS, xcpT og *xcpV*.

Alle disse genene er beskrevet hver for seg i virulenstabellene (tabell 43-50), men generelt kan det sies at stammen har gener som gjør den virulent på en rekke forskjellige områder. Stammen har gener for effektiv biofilmdannelse, pili, flageller, sekresjonssystem og LPS-endotoksin. *tsr*, som også ble funnet hos tre andre *P. oleovorans*, koder for et metyl-aksepterende kjemotaksi-protein, som overfører reseptorsignaler fra bindeproteiner til flagellen. VFDB oppgir *B. pseudomallei* som opprinnelse, men ved flere søk på dette genet ser det ut til å være forbundet med *E. coli*, og uansett er det tilsynelatende ikke noe som normalt hører hjemme hos *P. oleovorans*. Prosent coverage for dette genet lå mellom 5 og 7, så det er et ganske usikkert funn i databasen. Dette genet er heller ikke identifisert med Prokka, så mye tyder på at dette er en feil.

ESBL_M36_c hadde MIC-verdi for cefotaksim på 3,5 ng/μl og 0,50 ng/μl for cefepim, altså ikke like resistent som **ESBL_M36_a**. Stammen hadde ikke helt de samme resistensgenene heller, det ble funnet følgende: *cpxR, emrE, mexA, mexB, mexE, mexF, mexJ, mexK, muxB, opmH, oprM, oprN, oqxB10, pmpM*, «*Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin*». Det som skiller seg mest fra forrige stamme er mangelen på *aac*- og *aph*-gener, og tilstedeværelsen av *oqxB10*, som koder for en subenhet av OxqB, en efflukspumpe i RND-familien, som kan gi resistens mot phenicol og fluoroquinolon. Ellers er det gener for efflukspumper, slik som **ESBL_M36_a**, blant annet kan genet *cpxR* gi resistens mot aminoglycosider. **ESBL_M36_c** ble også MIC-testet med streptomycin, men her var MIC kun 8 ng/μl. Dette er ca. midt på stripsen og særlig sammenliknet med **ESBL_M36_a**, hvor det var null hemning, så er det ikke et spesielt ekstremt resultat. Den store forskjellen er transferasene, som er til stede hos den veldig resistente **ESBL_M36_a**, men mangler hos den mindre resistente **ESBL_M36_c**. Ikke bare ser det ut til at disse transferase-genene gir en kraftig økning i resistens, men de er også gjerne kodet fra plasmider, transposoner og integrative konjugative elementer, som betyr at denne kraftige resistensen lett kan deles med andre bakterier.

Hva virulensgener angår, så har stammen litt færre, men stort sett de samme genene som **ESBL_M36_a**: *algC, algR, algU, algW, algZ, chpA, chpB, fimV, fleN, fleQ, fleR, fleS, flgB, flgC, flgD, flgF, flgG, flgH, flgI, flgK, flgN, flhA, flhF, fliA, fliC, fliE, fliF, fliG, fliI, fliK, fliM, fliN, fliP, fliQ, fliR, motA, motB, motC, motD, mtrD, mucD, mucP, pilB, pilE, pilG, pilH, pilI,*

pilJ, *pilM*, *pilO*, *pilR*, *pilT*, *pilU*, *pscP*, *waaA*, *waaC*, *waaF*, *waaG*, *waaP* og *xcpA/pilD*. Legg merke til at det her er ett nytt gen: *mtrD*. MtrD er multi(drug)-transporter i MtrCDE-effluks kompleksset i RND-familien. Det hadde gitt mening å plassere dette med resistensgenene, men siden dette var et treff fra ABRicate + VFDB, så inkluderes genet her. «Multiple transferable resistance» (mtr)-systemet fra *Neisseria gonorrhoeae* gir bakterier resistens mot mange hydrofobe midler, som enkelte typer antibiotika, fettsyrer og vaskemidler. VFDB oppgir *Neisseria meningitidis* som opprinnelse, men stort sett omtales genet i forbindelse med *N. gonorrhoeae*. Uansett er det noe merkelig at dette genet dukker opp hos *P.oleovorans*, da multi(drug)-efflukspumper er kodet fra kromosomet, som gjør horisontal genoverføring mindre sannsynlig (Alvarez-Ortega et al., 2013). Forklaringen kan kanskje ligge i homologien i RND-familien, *mexB*- og *mtrD*-genene er ganske like (> 70% likhet) (Pidcock, 2006), og at genet har blitt tolket feil. Det gir mer mening å finne et *mex*-gen hos *P.oleovorans* enn et *mtr*-gen. Sekvenseringen ga kun 6,34 % coverage, i hver prøve den ble funnet, som ikke er til å stole på, og genet er heller ikke å finne i Prokka-filen, så det er fullt mulig at VFDB har funnet en feilaktig match. Virulensmekanismene vil uansett være ganske like, stammen har gener for effektiv biofilmdannelse, pili, flageller, sekresjonssystem og LPS-endotoksin.

ESBL_M40_a hadde MIC-verdi for cefotaksim på 1,5 ng/µl og 0,19 ng/µl for cefepim. Dette var de laveste verdiene blant S-prøvene. De to andre M40-prøvene hadde høyere MIC-verdier, men alle M40-prøvene hadde ifølge Alberto Bombelli opphav i samme koloni, og ble derfor antatt å være like bakterier. Siden det var så stor forskjell i MIC-verdi på disse bakteriene, ble den lite resistente ESBL_M40_a også sekvensert, for å sammenlikne stammene.

Resistensgenene hos denne stammen var: *cpxR*, *emrE*, *mexA*, *mexB*, *mexE*, *mexF*, *mexK*, *muxB*, *opmH*, *oprM*, *oprN*, *oqxB10*, *pmpM* og «*Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin*». Virulensgenene var: *algC*, *algR*, *algU*, *algW*, *algZ*, *chpA*, *chpB*, *fimV*, *fleN*, *fleQ*, *fleR*, *fleS*, *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgK*, *flgN*, *flhA*, *flhF*, *fliA*, *fliC*, *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliI*, *fliK*, *fliM*, *fliN*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *motA*, *motB*, *motC*, *motD*, *mtrD*, *mucD*, *mucP*, *pilA*, *pilB*, *pilG*, *pilH*, *pill*, *pilJ*, *pilM*, *pilO*, *pilR*, *pilT*, *pilU*, *waaA*, *waaC*, *waaF*, *waaG*, *waaP* og *xcpA/pilD*. Dette gjør stammen ganske lik som ESBL_M36_c, den har ingen nye typer gener eller mekanismer. Den var heller ikke spesielt resistent mot streptomycin, med en MIC på 4 ng/µl. Veksten på MH-skålen var også ekstremt svak, men det kan skyldes feil på laben, som at for få bakterier ble tilsatt NaCl-løsningen, eller at det ikke ble blandet godt nok. Eller det kan rett og slett være at denne stammen ikke tåler MH så

godt, det er jo allerede sett at prøve 13(1) ble fullstendig hemmet av dette mediet, så det er ikke utenkelig at ESBL_M40_a ikke trives på det heller. Dette har trolig ikke påvirket MIC-resultatet i noen relevant grad, da det hemningssonen var tydelig, veksten utenfor var bare veldig svak. Denne stammen burde også ha blitt testet med tetracyclin, siden Prokka identifiserte *tetO*-genet hos denne bakterien, som koder for et beskyttelsesprotein, men som med mye annet i denne oppgaven, ble det ikke anledning til ytterligere tester etter Coronatiltakene. Dette genet er plasmidkodet så det er interessant uansett om det er MIC-testet eller ikke, men det er synd å ikke ha tall på det.

ESBL_M40_b hadde MIC-verdi for cefotaksim på 3,5 ng/μl og 0,38 ng/μl for cefepim. Resistensgenene funnet hos denne stammen var: *cpxR*, *emrE*, *mexA*, *mexB*, *mexE*, *mexF*, *mexJ*, *mexK*, *muxB*, *opmB*, *opmH*, *oprM*, *oprN*, *oqxB10*, *pmpM* og «*Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin*». Virulensgenene funnet var: *algC*, *algR*, *algU*, *algW*, *algZ*, *chpA*, *chpB*, *fimV*, *fleN*, *fleQ*, *fleR*, *fleS*, *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgK*, *flgN*, *flhA*, *flhF*, *fliA*, *fliC*, *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliI*, *fliK*, *fliM*, *fliN*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *motA*, *motB*, *motC*, *motD*, *mtrD*, *mucD*, *mucP*, *pilB*, *pilE*, *pilG*, *pilH*, *pilI*, *pilJ*, *pilM*, *pilO*, *pilR*, *pilT*, *pilU*, *pscP*, *tsr*, *waaA*, *waaC*, *waaF*, *waaG*, *waaP* og *xcpA/pilDalgC*. Det er ingen nye gener hos denne stammen, den ligner de lite resistente ESBL_M36_c og ESBL_M40_a, og hadde også en tilsvarende middels MIC-verdi for streptomycin, med 6 ng/μl.

ESBL_M40_c hadde MIC-verdi for cefotaksim på 12 ng/μl og 3 ng/μl for cefepim. Resistens-genene funnet er akkurat de samme som ble funnet hos den veldig resistente ESBL_M36_a, som også hadde høye MIC-verdier på cefotaksim og cefepim. MIC-testen for streptomycin var hos denne også ekstrem, med MIC på ≥ 1024 . Det er grunn til å tro at *aac(6')-Ib7*, *aph(3'')-Ib (strA)* og *aph(6)-Id (strB)* (som koder for transferaser, og kan kodes fra mobile genelementer), som kun ble funnet hos både ESBL_M36_a og ESBL_M40_c, er mye av grunnen til at disse to stammene fullstendig dekket skålene med vekst. Stammene som manglet disse genene, men ellers var veldig like, fikk middels MIC-verdier, hverken veldig høye eller veldig lave. Virulensgenene er også akkurat de samme som den resistente ESBL_M36_a, med unntak av ett ekstra gen som ble funnet her: *pvdH*. *pvdH*-genet er ansvarlig for syntese av en pyoverdine, som er en jernkelaterende forbindelse. Bakteriene stjeler jern fra mitokondriene til vertscellen, og mitokondriene ødelegges av denne prosessen. Totalt sett har denne stammen altså resistensgener som kan spres lettere enn andre, som også tilsynelatende er svært effektive, og den har virulensfaktorer for effektiv biofilmdannelse, pili,

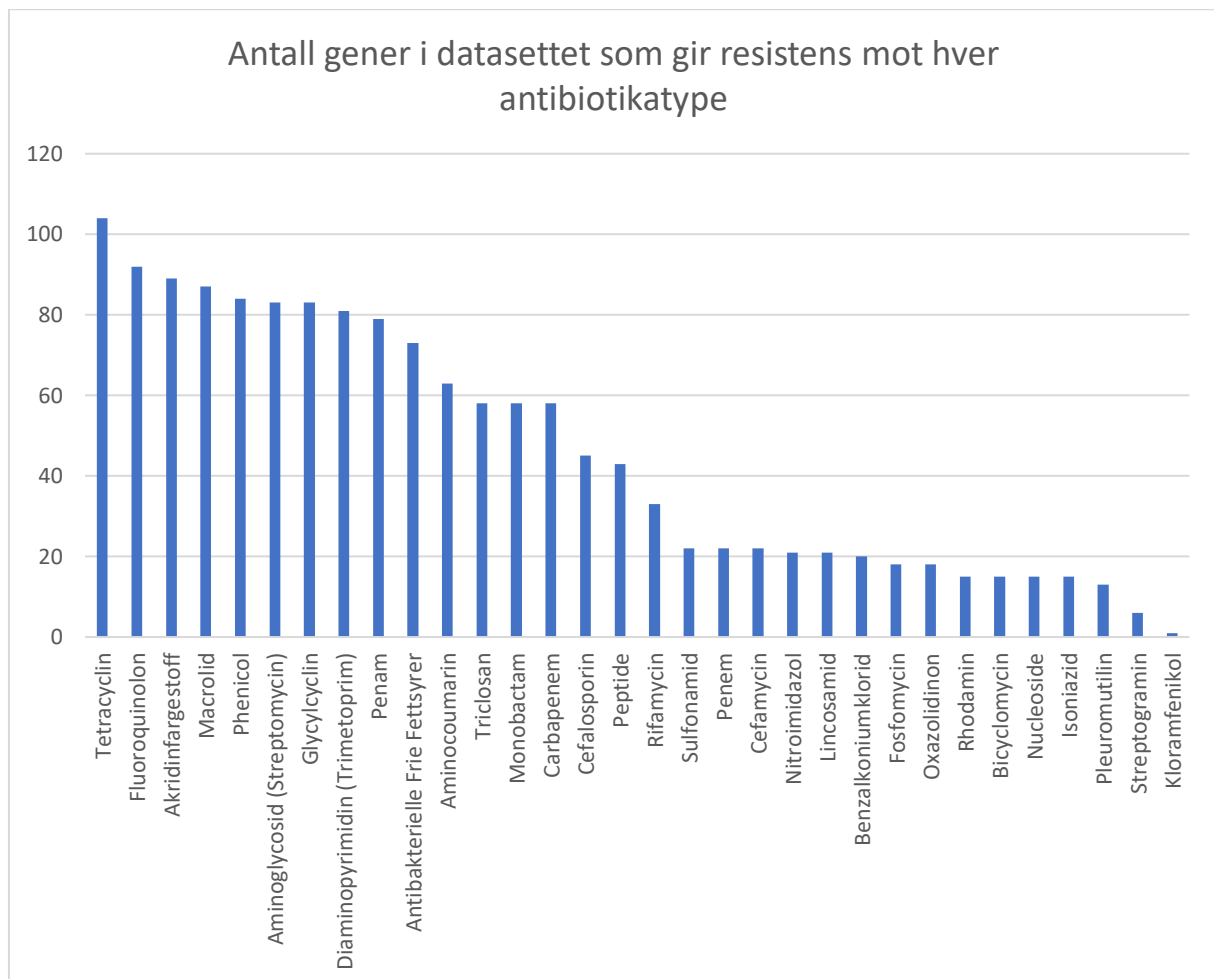
flageller, sekresjonssystem og LPS-endotoksin, i tillegg til at den kan skade mitokondriene. Det er ikke kjent om det er akkurat denne bakterien som har gjort kuen den kom fra syk, sannsynligvis er det ikke det, da dette er en opportunist som ikke er mest kjent for å forårsake sykdom. Den er heller ikke en vanlig årsak til mastitt (Whist, 2020). Den vil nok likevel kunne gjøre stor skade om den underliggende årsaken til sykdommen gir den et godt fotfeste, men det mest bekymringsverdige er bakteriens potensiale for å spre resistensgener.

Siden ESBL_M36_a og ESBL_M40_c er så ekstremt resistente i forhold til de andre pseudomonadene, kan det tyde på den opprinnelige M36-kolonien og den opprinnelige M40-kolonien ikke var renkulturer. Det er heller ikke sikkert at alle disse bakteriene er av samme art likevel, siden ESBL_M36_a og ESBL_M40_c var så veldig forskjellige fra de andre S-stammene. Basert på rMLST-resultatene vist i tabell 36 og i vedlegg 3, så er det like sannsynlig at de to resistente stammene er *Pseudomonas alcaliphila* eller *Pseudomonas indoloxydans* som at de er *P. oleovorans*. Det var også disse to stammene hvor det var mest tvil om art. Samtidig, så lenge det er snakk om mobile gener, er det fullt mulig at alle er av samme art, men disse to bakteriene har fått tilført ekstra gener som de andre mangler. Det er også verdt å legge merke til at både ESBL_M36_a og ESBL_M40_c hadde *ampC*-genet, ifølge Prokka, så de har begge genet for en betalaktamase, som også skiller dem fra de andre S-bakteriene.

Om alle prøvene hadde blitt sekvensert med MiSeq og MinION, og Galaxy hadde håndtert alt av long reads-data, så hadde det muligens blitt funnet flere gener. Nanopore er fortsatt en ung metode, så det kan hende det vil ta litt tid før Galaxy kan håndtere disse dataene like enkelt som data fra Illumina. Av de tre prøvene hvor begge typer data var tilgjengelig og Unycicler fungerte, var det kun ett eneste nytt gen som ble funnet. Forhåpentligvis er det ikke ekstremt mye informasjon som har gått tapt. Det ble generelt funnet mange flere og helt forskjellige gener hos S-bakteriene enn F-bakteriene, men alle S-bakteriene skal være den samme arten. Det er vanskelig å si om det ville vært tilsvarende om noen av S-bakteriene var en annen type bakterie. På grunn av Coronaviruset er det ikke mulig å undersøke hvilke av de forskjellige S-bakteriene som kommer fra den samme kua. Det er heller ingen pseudomonader blant F-bakteriene, så det er vanskelig å si om det er noe annet enn art som påvirker antallet og hvilke gener som ble funnet. Hos F-bakteriene er det helt sikkert at de ikke er fra samme ku, da dette er markert i de opprinnelige prøvenavnene. Hos F-bakteriene er den samme arten ganske lik mellom forskjellige kuer, men det er uansett snakk om ganske få prøver, så det er ikke

nødvendigvis så veldig pålitelig informasjon. Sannsynligvis er det for få S-prøver til at det ville vært spesielt nyttig informasjon uansett.

Det er ikke undersøkt nok prøver til at det er nyttig å si noe om resistensfrekvenser heller, og bakteriene kommer ikke fra noe tilfeldig utvalg, så det er lite relevant statistikk å jobbe med her. Det som derimot er mulig, er å se hvilke typer antibiotika de sekvenserte bakteriene kan være resistente mot. Det er flere forskjellige gener som kan gi resistens mot samme type stoff, og det er også flere enkeltgener som kan gi resistens mot flere forskjellige typer stoff. Hvilke stoffer det var mest resistens mot hos både F-prøver og S-prøver er vist i figur 16:



Figur 16 viser hvor mange gener funnet med NCBI og CARD hos de sekvenserte bakteriene som gir resistens mot forskjellige typer antibiotika. Antibiotika på x-aksen og antall gener som gir resistens mot antibiotikumet på y-aksen.

Figur 16 viser mot hvilken type stoff det var funnet mest (potensiell) resistens i databasene CARD og NCBI, på tvers av bakteriene, basert på hvor mange gener det ble funnet som kan gi resistens mot stoffet. Siden Prokka-dataene ikke er hentet fra samme sted, og det derfra kun er hentet et utvalg av det som så mest relevant og interessant ut, er dette ikke inkludert i grafen. Det er ikke mulig å si noe om andelen resistente bakterier i melk, da prøvene er hentet

fra glyserolstocks, og ikke fra et kjent volum med melkeprøve. Det er for så vidt mulig å si noe om hvor stor andel av F-prøvene som var resistente, som er 9 av 81, men dette blir misvisende da prøvene ble valgt ut basert på hvor sannsynlig det var at resistens ville bli oppdaget. Fra S-prøvene gir det enda mindre mening, da disse ble valgt ut fordi de allerede var bekreftet resistente, så 12 av 12 var resistente der. Med et lite, og ikke-tilfeldig utvalg blir kvantitative resultater lite relevante, så det er nødvendig å fokusere mest på de kvalitative resultatene.

Ut ifra figur 16, er det mest resistens mot tetracyclin og fluoroquinolon og lite mot blant annet pleuromutilin og streptogramin. Kloramfenikol-resistens er det også lite av, da kun 15(1) hadde mulig resistens mot dette, gitt av *dha-1*-genet, som ikke ble funnet hos noen andre stammer, og resistensen blir ikke gitt av andre identifiserte gener.

Tetracyclin er et bakteriostatisk stoff som hemmer veksten til bakterien når det forhindrer translasjon ved å stanse binding av aminoacyl tRNA til ribosomet. Tetracyclin ble oppdaget på 1940-tallet og har blitt hyppig brukt mot Gram-positive og Gram-negative bakterier for å bekjempe infeksjoner, i tillegg til at det har blitt preventivt tilsatt dyrefôr. Resistens er som kjent kraftig korrelert med hyppig bruk av antibiotika, og den første tetracyclin-resistente bakterien, en *Shigella dysenteriae*, ble isolert allerede i 1953. Siden da har resistensen bare økt, og øker fortsatt, hos både patogene, opportunistiske og kommensale bakterier.

Tetracyclin-resistens oppstår ofte takket være nye ervervede gener, som gir effluks-egenskaper, eller muligheten til å beskytte ribosomene mot antibiotikumet. Dette er gener som ofte sitter på plasmider eller i transposoner (Chopra & Roberts, 2001). I sekvenseringen ble det funnet mange forskjellige efflukspumper som gir bakterien evnen til å kvitte seg med tetracyclin, samt et gen som koder for beskyttelsesproteinet TetM, som spesifikt beskytter ribosomet mot dette stoffet. Efflukspumper er gjerne noe bakterien har uavhengig av klinisk bruk av antibiotika, og tetracyclin er et stoff som produseres av andre mikroorganismer, så det gir mening at det skal være en del naturlig resistens på plass allerede, men det er all grunn til å tro at økt forbruk av tetracyclin vil drive frem kraftigere og mer spredt resistens mot stoffet. Gener som gir resistens mot tetracyclin ble funnet hos alle artene som ble testet, både F-bakterier og S-bakterier. Det ble også funnet mye av dette med Prokka, som stemmer bra med trenden vist i figur 16.

Quinoloner ble først oppdaget på 1960-tallet, men i løpet av 1970- og 1980-tallet ble fluoroquinolonene utviklet, som har et mye bredere spekter. Denne typen antibiotika har blitt

mye brukt, og resistens har, som hos mange andre effektive midler, blitt et problem. Resistens mot dette stoffet oppstår gjerne på grunn av mutasjoner som endrer binde-setene i DNA gyrase (Pham et al., 2019), og det var mange forskjellige isolater som hadde resistensgener for dette stoffet, som med tetracyclin, minst én representant fra hver art undersøkt. Siden fluoroquinolon er et syntetisk stoff, som ikke har vært i bruk like lenge som for eksempel tetracyclin, så var det litt uventet å finne så mye potensiell fluoroquinolon-resistens. Samtidig er det verdt å legge merke til at det kun er funnet effluks-resistens mot dette stoffet hos disse prøvene, og ingen muterte gyrase-gener, så det kan være en stor grad av «tilfeldig» resistens her, hvor bakteriene allerede har et effluks-system på plass for å beskytte seg mot eksisterende trusler, og er heldige nok til å kunne kvitte seg med andre syntetiske stoffer også. Å finne spesialisert resistens mot tetracyclin hos bakterier fra melken til kyr som aldri har fått antibiotika gir mer mening enn å finne spesialisert resistens mot fluoroquinoloner, da tetracyclin produseres naturlig av mikroorganismer, mens fluoroquinoloner er syntetisk fremstilt. Efflukspumpene som gir resistens mot dette stoffet pumper ikke spesifikt fluoroquinoloner, så bakteriene med resistensgener mot dette stoffet er altså kanskje ikke direkte resistente. Og igjen så er det viktig å huske på at resistensgener ikke nødvendigvis gir en høy grad av resistens: seks bakterier som hadde genene for efflukspumper som kan kvitte cellen med fluoroquinoloner ble MIC-testet med ciprofloxacin-strips, og det var kun prøve 4(1) som viste en relevant grad av resistens mot stoffet. Denne resistensen kan godt komme av en tilfeldig utvikling, eller ha blitt fremtvunget hos tidligere generasjoner som har blitt utsatt for antibiotika, men om det har skjedd, eller hva slags antibiotika det eventuelt var, er det ikke mulig å si noe om. Det som kan sies er at klinisk, ervervet resistens mot et syntetisk stoff tilsynelatende kan finnes hos bakterier fra floraen til kyr som selv aldri har inntatt det syntetiske stoffet. Selv om de fleste bakteriene med efflukspumper som kan fjerne fluoroquinoloner likevel er ganske sensitive, er det alltid en risiko for små endringer som kan gjøre pumpene mer effektive, som er langt mer sannsynlig om bakterien skulle være utsatt for varig antibiotika-eksponering, så det er verdt å tenke på at genene er der, selv om de ikke er en særlig trussel på dette tidspunktet.

Streptogramin-antibiotika, som det var lite resistens mot, ble oppdaget for over 50 år siden, men ble ikke før etter 2000-tallet for tatt i bruk som legemiddel, så det gir mening at det ikke er like mye resistens mot dette stoffet som mange andre som har blitt brukt lenge og hyppig. Stoffet angriper 50S og hindrer translasjon i cellen, og resistensutvikling kan skje på mange måter, både gjennom modifisering av angrepspunktet, effluks og enzymatisk modifisering av

stoffet (Johnston et al., 2002). I sekvenseringen av prøvene ble det kun funnet ett gen som gir resistens mot dette stoffet, nemlig *isaA*-genet, funnet hos *E. faecalis*, som gir effluksmuligheter.

Denne pumpen kan også gi resistens mot pleuromutilin, et stoff oppdaget på 1950-tallet (Paukner & Riedl, 2017) som også binder til 50S for å forhindre translasjon. EfrAB-pumpen og NorA-pumpen kan også pumpe ut dette stoffet, så potensiell resistens mot pleuromutilin ble funnet hos både *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* og *S. aureus*. Det var imidlertid liten grad av resistens mot stoffet, sammenliknet med de andre funnene. Stoffet brukes til veterinærmedisin, og resistens mot dette har generelt vært lite vanlig (Paukner & Riedl, 2017), så det gir mening at det ikke ble funnet en høy grad av resistens i de testede isolatene.

Kloramfenikol ble i 1947, og virker ved å binde til 50S og inhibere peptidyl transferase-aktiviteten i ribosomet. På 1950-tallet ble det brukt ganske hyppig mot flere tilstander, fra akne til bakteriell meningitt. Stoffet ble mindre populært i løpet av 1960-tallet, da uhendige bivirkninger ble oppdaget, blant annet dødelig aplastisk anemi, og er fortsatt lite brukt i dag (Wiest et al., 2012). Som beskrevet i seksjon 1.1 i innledningen er det normalt trygt å administrere stoffer som angriper prokaryote ribosomer, men her er det altså et godt eksempel på at det ikke alltid er tilfelle. Denne oppgaven har kun én stamme med ett gen for kloramfenikol-resistens, og generelt ganske få prøver, så det er urimelig å påstå at dette faktisk reflekterer virkeligheten. Likevel gir det absolutt mening at det skal være lite resistens mot stoffet når forbruket har vært så lavt de siste 60 årene. Det ville ikke ha vært forventet å finne mer resistens mot dette.

Det som det derimot var forventet å finne mer resistens mot, var betalaktam-antibiotika. Betalaktamer er i dag den mest brukte klassen av antibiotika, og var i tillegg den første varianten som noen gang ble tatt i bruk i medisin, da penicillin er en betalaktam (Bush & Bradford, 2016). Så det hadde ikke vært overraskende om det var en overvekt av betalaktam-resistens hos de undersøkte bakteriene. Det ble for så vidt funnet potensiell resistens mot flere betalaktamer, både penam (mest), carbapenem, monobactam, cefalosporin, cephamycin, og penem (minst), men all den resistensen skyldes lite spesifikke pumper. Et unntak virket å være hos prøve 15(1), *S. aureus*, hvor *dha-1*-genet ble funnet, som først ble identifisert som en betalaktamase som kan gi resistens mot cefamycin og cefalosporin, men ved nærmere undersøkelser viste det seg at dette genet slettes ikke koder for en betalaktamase. Isteden koder

det for en MFS-transporter, så ingen betalaktamaser ble faktisk identifisert via CARD eller NCBI. Det ble derimot funnet ved søk i Prokka-filen: prøve ESBL_M36_a og ESBL_M40_c har tilsynelatende et gen som koder for en betalaktamase, nemlig *ampC*-genet. Disse bakteriene vokste på ESBL-skåler, så det er kanskje ikke veldig overraskende at de produserer betalaktamase. Samtidig ble ikke funnet noen betalaktamaser hos de andre ESBL-prøvene, så det er ikke en selvfølge at dette identifiseres hos bakterier som kan vokse på slikt medium. Jevnt over var det på ingen måte noen overvekt av betalaktamaser hos noen av bakteriene, som det egentlig var forventet å finne mer av, men igjen så var dette et ganske snevert utvalg, så det er godt mulig det hadde blitt funnet flere betalaktamaser med et større utvalg av prøver. Uansett om det er betalaktamaser som gjør bakterien resistent, eller om det er pumper, så er en resistent bakterie fortsatt resistent, og det vil være like utfordrende å behandle en eventuell infeksjon. Selv om gener utviklet spesifikt mot spesielle typer antibiotika kanskje er mer spennende å studere, vil pumper uansett kunne gi resistens. Dessuten kan effluxpumper virke synergistisk med andre resistensmekanismer, og er dermed viktige å ta hensyn til (Li et al., 2015).

Det var en klar overvekt av resistens forårsaket av effluxpumper, hvor medlemmer fra alle de fem hoved-familiene var representert. Selv om det er kjent at enkelte gener for Gram-positive pumper kan overføres via plasmider, er effluxpumper jevnt over kjent som kromosomalt kodede gener som gir naturlig resistens, så overvekten av resistens hos disse prøvene er naturlig (Reygaert, 2018). Dette er kanskje et litt «kjedelig» resultat, litt avhengig av hvem man spør. Om man studerer utviklingen og spredningen av resistens, så vil «gamle», naturlige resistensgener kanskje ikke være så spennende, men når det gjelder behandling av sykdom, så er resistens resistens, uavhengig av hva slags mekanisme som gir denne resistensen. Dessuten, som antydnet med NorA-pumpen hos prøve 4(1), kan en naturlig forekommende resistens bli kraftigere. Basert på informasjonen i denne oppgaven er det grunn til å tro at økt bruk av antibiotika kan medføre økt effekt av naturlig resistens, da dette legger kraftig selektivt press på bakteriene, så dette er fortsatt nyttige funn. Mutasjoner som gir resistens hos en bakterie er å anse som ervervet resistens. 4(1) er muligens en NorA-mutant, mens andre stammer har gener med kjente mutasjoner, som for eksempel stammene med mutert *rpoB*- eller *dfr*, som vil modifisere angrepspunktet til antibiotika. Naturlig resistens er fortsatt interessant, særlig når dette kan forsterkes, men det er som oftest ervervet resistens som er i fokus når man studerer resistensutvikling. Spesielt dersom egenskapen kan deles mellom bakterier.

ESBL_M36_a, ESBL_M40_c, 11(4) og 16(4) (*P. oleovorans* og *E. faecalis*) hadde slike gener. Disse koder for AAC(6')-Ib7, ANT(6)-Ia, APH(3'')-Ib (StrA), APH(6)-Id (StrB) og ANT(9)-Ia som alle gir resistens ved å inaktivere streptomycin, og som lett kan spres mellom bakterier i nær kontakt, og videre med de nylig transformerte bakteriene. Prokka-funnet TetO som beskytter mot tetracyclin er som nevnt også kjent for å kunne spres via plasmider.

Hvor kommer disse genene fra? Bakterier har lenge hatt behov for å beskytte seg mot skadelige stoffer, så naturligvis har mye resistens oppstått uavhengig av antibiotika som legemiddel, som for eksempel flere typer efflukspumper. Mutasjoner i pumpe-gener kan gjøre dem mer effektive, og dette kan ha blitt drevet frem av antibiotika-bruk. Prøve 4(1), for eksempel, kan godt være en stamme som har vært i kontakt med antibiotika tidligere, før den havnet i kuen som prøven ble hentet fra. Bakterier sprer seg lett i miljøet, og den kan komme fra nesten hvor som helst. Bakteriegenere spres naturligvis også sammen med bakteriene, og i tilfeller hvor genene er lett overførbare, som for eksempel om de sitter i plasmider, vil gener kunne spre seg til flere bakterier og til flere arter som et stadig forgrenende spredningsnett.

Det var flere av prøvene som ikke viste en høy grad av resistens mot antibiotikaene de ble MIC-testet med, men det er viktig å være tydelig på at de kan være resistente mot stoffer det ikke har blitt testet med. Det er nyttig å vite at bakterien er resistent, selv mot kun én type antibiotika, om man snakker om behandling av infeksjoner, fordi da kan den behandles med noe annet. Men så lenge resistens eksisterer, så kan det potensielt spres, så om en bakterie kun er resistent mot én eneste ting, så må man også vurdere om denne resistensen kan spre seg til en annen bakterie som er resistent mot mange andre typer antibiotika allerede. Denne vil man da ikke nødvendigvis kunne behandle.

Dessuten vet man ikke hvordan en eventuell sykdom ville ha artet seg dersom noen skulle bli smittet med disse bakteriene. Stammene i denne oppgaven hadde flere virulensgener i tillegg til resistensgenene, og en antibiotika-sensitiv bakterie kan ha virulensfaktorer som for det første kan gjøre skade før infeksjonen kureres, og for det andre som kan beskytte bakterien. Antibiotika virker i samarbeid med kroppens immunsystem, det er ikke meningen at antibiotika helt alene skal håndtere en infeksjon (Ankomah & Levin, 2014), så selv om bakterien er noe sensitiv for en type antibiotika, kan effektiv immununnvikelse likevel gjøre bakterien problematisk. Biofilm er for eksempel en virulensfaktor, men kan hjelpe bakterien å overleve antibiotika, og mange virulensgener sloss direkte mot vertens immunsystem, for eksempel ved å skade immunceller. Dette kan gjøre bakterien mer alvorlig i en infeksjon, selv om den i utgangspunktet er ganske sensitiv for medisiner, og det kan sørge for at en

bakteriestamme vil overleve lenge nok med tilstedeværelse av antibiotika til at de kan utvikle en høyere grad av resistens. At bakterien er sensitiv *in vitro*, trenger da ikke nødvendigvis å bety at den er like lett å behandle *in vivo*.

Det må også nevnes at i tillegg til manglende MIC-tester, så er det også mulig at noen av prøvene var resistente mot noe de ikke ble dyrket med. CRE-, ESBL-, og MRSA-skåler har et bredt spekter av antibiotika, men det er ikke umulig at noen av de negative prøvene kunne ha vokst på en annen type skål, med en annen type antibiotika, om det hadde vært tilgjengelig. Det finnes mye antibiotika, og ikke alle disse typene er inkludert i de tre mediene benyttet i denne oppgaven. Det er heller ikke umulig at noen av bakteriene som ikke vokste på skål hadde veldig spennende virulensgener, men dette finner man ikke ut med mindre man helgenomsekvenserer alle mulige prøver og det er ikke økonomisk forsvarlig. Men selv om enkelte interessante gener kanskje har sluppet unna deteksjon, spesielt fra noe manglende data fra sekvenseringen, så ble det funnet ganske mange interessante resistens- og virulens-gener.

4.4 Melkeprøvene

Denne delen skulle i utgangspunktet være hoveddelen av denne oppgaven, fordi her skulle det være mulig å beregne andel resistente bakterier, si noe nyttig om hvilke resistente arter som ble funnet, hvilke det var flest av, og lignende, men som beskrevet i resultatene ble det ikke funnet noen resistente bakterier her. Det er for så vidt bra, fordi det er tross alt ikke ønskelig å finne resistens i melk, men det gjør statistikken for denne oppgaven svært enkel og lite diskuterbar. Som forklart i seksjon 3.11 i resultater var det ingen positive resultater i hverken den første runden, eller i de to ytterligere rundene utført av Stina Cathrin Nautnes. Det ble diskutert om det skulle testes med lavere konsentrasjoner av antibiotika, eller om andre alternative løsninger skulle prøves, men siden melkeprøvene ikke kunne hentes så tidlig i oppgaveforløpet som det var planlagt, var det knapt med tid igjen. Det var usikkert om det hadde blitt tid til å utføre alle testene som har blitt utført på F- og S-bakterier på eventuelle resistente bakterier som vokste frem fra melkeprøvene, men da pandemien var et faktum ble valget tatt av seg selv: det hadde ikke vært mulig, selv om det hadde vært tid nok.

4.5 Videre forskning/forslag til endringer i oppgaven

Den beste endringen i denne oppgaven ville trolig ha vært å ikke skrive den i løpet av en pandemi. Dersom laben ikke hadde blitt stengt på grunn av Coronautbruddet, burde det ha vært utført flere MIC-tester og prøve 5(1) burde ha vært sekvensert på nytt, da det var for lite data å jobbe med. De resterende S-bakteriene burde ha blitt undersøkt med PCR, og alle prøvene burde dessuten ha vært sekvensert med både MiSeq og MinION (forutsatt at det hadde vært mulig å få Unicycler til å fungere hver gang).

Melkeprøvene burde ha vært hentet mye tidligere i oppgaveforløpet, slik at flere tester kunne ha blitt utført, og det er nok et problem at det kun er 100 µl som tas ut fra hver flaske, det er godt mulig at enkelte bakterier slipper unna deteksjon på denne måten. Hadde dette vært vann, ville det vært mye enklere, fordi da kunne hele prøven ha blitt trukket gjennom et filter for å fange opp bakterier fra hele prøveflasken. Melk er for tyktflytende til at dette hadde vært mulig, i hvert fall med det utstyret som var tilgjengelig. Det hadde også vært fint om mer av informasjon om kyrne hadde vært tilgjengelig, i det minste hvilke kyr som var fra hvilken gård, men igjen så hadde dette trolig vært mer relevant om det var snakk om et større utvalg. Hadde det vært kjent på forhånd at melkeprøvene skulle komme frem så sent som de gjorde, og at de ikke skulle gi ett eneste positivt resultat, ville det trolig blitt hentet opp flere isolater fra fryseren, da større utvalg alltid er bedre. Dette er ting som ville ha gjort oppgaven mer komplett, men som det ikke var mulig å gjøre noe med.

Ellers er det et par ting som kunne ha utvidet oppgaven, som det kunne ha vært interessant å se på, som kanskje kan gjøres i andre oppgaver. For eksempel hadde det vært spennende å se om den samme arten var betydelig forskjellig hos syke og friske kyr: å se om det var noen pseudomonader blant de utestede, fryste isolatene fra melk fra friske kyr, eller noen stafylokokker eller enterokokker blant de fra melk fra syke kyr.

Samtidig kunne det ha vært nyttig å ikke kun se på bakterier fra friske og ubehandlede, syke kyr, men også kyr som faktisk har fått antibiotika, for å se om de samme bakterieartene har en annen sammensetning av gener hos kyr som har vært gjennom en antibiotikakur.

Sammensetningen av bakterier i melken er selvfølgelig også spennende og viktig, og studier av hvordan bakterier og gener sprer seg med vann og dyr, men det er trolig et litt for bredt fokus for kun én oppgave. Det kunne også ha vært et poeng å sekvensere en bakterie som ikke viste resistens mot noe som helst, for å sammenlikne genene hos resistente og sensitive bakterier.

Noe som ville vært svært interessant hadde vært å sammenlikne resistensbakterier hos kyr som oppholder seg nedstrøms for et renseanlegg, fremfor de som ikke er i nærheten av slikt, for å se i hvor stor grad kyrne plukker opp resistens fra anlegget. I tillegg kunne man ha samlet prøver direkte fra renseanlegget, og sammenliknet dette med prøvene fra kyrne, og eventuelt også med prøver fra slam, for å se hva som eventuelt slipper unna hygieniseringstiltakene.

5. Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke tilstedeværelsen av antibiotikaresistente bakterier fra melk fra kyr som aldri har fått antibiotika, og se hva de eventuelt er resistente mot, og hva slags resistensmekanismer som gir denne resistensen. Etter dyrking av isolerte bakterier på antibiotikaskåler, PCR for screening av resistensgener, MIC-testing og helgenomsekvensering, kan det først konkluderes med at ja, det finnes antibiotikaresistente bakterier i melken hos kyr som aldri har fått antibiotika. I tillegg er det vist at disse har resistens/potensiell resistens mot mange typer antibiotika, som tetracyclin, fluoroquinoloner, rifampiner og betalaktamer. Dette betyr at det ble funnet forsvarsmekanismer mot alle de fire typiske angrepspunktene til antibiotika, nemlig proteinsyntesen, DNA-syntesen, RNA-syntesen og cellevegg-syntesen. Flere av bakteriene hadde også gener som kan gi resistens mot peptid-antibiotika, som generelt virker ved å forstyrre cellemembranen, så selv om dette angrepspunktet ikke har vært i fokus, er det verdt å nevne at det ble funnet beskyttelsesmekanismer for dette også. Resistensmekanismene som ble oppdaget var både beskyttelse av angrepspunktet, inaktivering av antibiotika, modifisert angrepspunkt og i all hovedsak efflukspumper. Mye av dette var naturlig resistens, men MIC-testene viste enkelte tilfeller hvor ECOFF var oversteget, som antyder en ervervet egenskap. Enkelte av genene som ble funnet er også kjent for å kodes fra mobile genelementer, som kan bidra til økt spredning av resistens. Nedenfor følger en oppsummering av de viktigste resultatene:

Prøve 4(1), *S. haemolyticus*:

- Klinisk resistent mot ciprofloxacin
- ECOFF oversteget for ciprofloxacin

Prøve 11(4), *E. faecalis*:

- MGE: *ant(6)-Ia*

Prøve 16(4), *E. faecalis*:

- Klinisk resistent mot streptomycin
- ECOFF oversteget for streptomycin
- MGE: *ant(6)-Ia* og *ant(9)-Ia (spw)*
- ECOFF oversteget for tetracyclin

Prøve ESBL_M36_a, *P. oleovorans*:

- Selv om clinical breakpoint ikke er oppgitt, dekket bakteriene nesten hele skålen med vekst ved MIC-testing med cefotaksim-strips
- Selv om clinical breakpoint og ECOFF ikke er oppgitt, dekket bakteriene nesten hele skålen med vekst ved MIC-testing med streptomycin-strips
- MGE: *aac(6')-Ib7*, *aph(3'')-Ib (strA)* og *aph(6)-Id (strB)*

Prøve ESBL_M40_a, *P. oleovorans*:

- MGE: *tetO*

Prøve ESBL_M40_c, *P. oleovorans*:

- Selv om clinical breakpoint ikke er oppgitt, dekker bakteriene nesten hele skålen med vekst ved MIC-testing med cefotaksim-strips
- Selv om clinical breakpoint og ECOFF ikke er oppgitt, dekker bakteriene nesten hele skålen med vekst ved MIC-testing med streptomycin-strips
- MGE: *aac(6')-Ib7*, *aph(3'')-Ib (strA)* og *aph(6)-Id (strB)*

Det ble også funnet flere virulensgener hos alle de resistente bakteriene, som kan bidra til en kraftigere infeksjon, og i noen tilfeller kanskje også økt resistens. Å begrense bruken av antibiotika hos kyr bør hjelpe med å bremse utviklingen av resistens. Likevel kan man se at ubehandlede kyr kan være bærere av bakterier med klinisk relevante, ervervede resistensgener, som kan spres videre i miljøet. Dette bør det tas hensyn til ved videre overvåkning og kartlegging av utvikling og spredning av antibiotikaresistens, da det kan være et ledd i å avdekke hvordan resistente mikrober kommer inn i matkjeden.

6. Litteraturliste

- Abdul, S., Atiyah, A., Degaimand, Z., Al-Yassari, S., Abady, N. & Abdul-Azeez, S. (2019). The frequency of *ebpS* and *V8* genes in *Staphylococcus aureus* isolates from different sources in Thiqr province-Iraq. *Plant Archives*, 19: 1868-1871.
- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., et al. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44 (W1): W3-W10. doi: 10.1093/nar/gkw343.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A. & Liu, S. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48 (D1): D517-D525.
- Alifano, P., Palumbo, C., Pasanisi, D. & Talà, A. (2015). Rifampicin-resistance, *rpoB* polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *Journal of biotechnology*, 202: 60-77.
- Alteri, C. J. & Mobley, H. L. T. (2016). The Versatile Type VI Secretion System. *Microbiology spectrum*, 4 (2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0026-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0026-2015.
- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J. & Martinez, J. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Frontiers in Microbiology*, 4 (7). doi: 10.3389/fmicb.2013.00007.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48 (1): 5-16.
- Ankomah, P. & Levin, B. R. (2014). Exploring the collaboration between antibiotics and the immune response in the treatment of acute, self-limiting infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (23): 8331-8. doi: 10.1073/pnas.1400352111.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaoli, S. & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5: 7-7. doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- Baldry, M., Nakamura, Y., Nakagawa, S., Frees, D., Matsue, H., Núñez, G. & Ingmer, H. (2018). Application of an *agr*-Specific Antivirulence Compound as Therapy for *Staphylococcus aureus*-Induced Inflammatory Skin Disease. *The Journal of infectious diseases*, 218 (6): 1009-1013. doi: 10.1093/infdis/jiy259.
- Balloux, F. & van Dorp, L. (2017). Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? *BMC biology*, 15 (1): 91-91. doi: 10.1186/s12915-017-0433-z.
- Barnard, J. P. & Stinson, M. W. (1996). The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infection and immunity*, 64 (9): 3853-3857.
- Barros, E. M., Ceotto, H., Bastos, M. C. F., Dos Santos, K. R. N. & Giambiagi-Demarval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of clinical microbiology*, 50 (1): 166-168. doi: 10.1128/JCM.05563-11.
- Bentsen Skaflem, H. (2018). *Detektering av betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) i bakterier isolert fra akvatiske miljøer ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder. Masteroppgave: Norwegian University of Life Sciences, Ås.*
- Berlin, K., Koren, S., Chin, C.-S., Drake, J. P., Landolin, J. M. & Phillippy, A. M. (2015). Assembling large genomes with single-molecule sequencing and locality-sensitive hashing. *Nature Biotechnology*, 33 (6): 623-630. doi: 10.1038/nbt.3238.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G. & Brun, Y. V. (2015). Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiology spectrum*, 3 (4): 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13 (1): 42-51.

- 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. doi: 10.3390/microorganisms4010014.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 (15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91: 1-9.
- Brolund, A. (2014). Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infection ecology & epidemiology*, 4: 10.3402/iee.v4.24555. doi: 10.3402/iee.v4.24555.
- Brown, S. A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19 (1): 1-14. doi: 10.1111/j.1365-2885.1996.tb00001.x.
- Burts, M. L., DeDent, A. C. & Missiakas, D. M. (2008). EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 69 (3): 736-746. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06324.x.
- Bush, K. & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6 (8): a025247. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Buxton, R. (2005). Blood agar plates and hemolysis protocols. *American Society for Microbiology*.
- Böttger, E. C., Springer, B., Prammananan, T., Kidan, Y. & Sander, P. (2001). Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO reports*, 2 (4): 318-323. doi: 10.1093/embo-reports/kve062.
- CARD. (2020a). *bacA*. Tilgjengelig fra: <https://card.mcmaster.ca/ontology/39420> (lest 09.05.2020).
- CARD. (2020b). *class C beta-lactamase*. Tilgjengelig fra: <https://card.mcmaster.ca/ontology/36215> (lest 09.05.2020).
- CARD. (2020c). *MtrCDE*. Tilgjengelig fra: <https://card.mcmaster.ca/ontology/36508> (lest 27.04.2020).
- CARD. (2020d). *tet(A)*. Tilgjengelig fra: <https://card.mcmaster.ca/ontology/36304> (lest 09.05.2020).
- CARD. (2020e). *tetO*. Tilgjengelig fra: <https://card.mcmaster.ca/ontology/36329> (lest 09.05.2020).
- Cascales, E. & Cambillau, C. (2012). Structural biology of type VI secretion systems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367 (1592): 1102-1111. doi: 10.1098/rstb.2011.0209.
- Cavaillon, J. M. (2018). Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon*, 149: 45-53. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.016.
- CDC. (2017). *Outpatient Antibiotic Prescriptions — United States, 2017*. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/pdfs/Annual-Report-2017-H.pdf> (lest 06.04.2020).
- CDC. (2019). *2019 AR Threats Report*. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html> (lest 04.04.2020).
- CDC. (2020a). *Antibiotic Resistance & Patient Safety Portal*. Tilgjengelig fra: <https://arpsp.cdc.gov/profile/antibiotic-use/217> (lest 06.04.2020).
- CDC. (2020b). *Measuring Outpatient Antibiotic Prescribing*. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/programs-measurement/measuring-antibiotic-prescribing.html> (lest 06.04.2020).
- CDC NARMS. (2020). Tilgjengelig fra: <https://wwwn.cdc.gov/narmsnow/> (lest 06.04.2020).
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y. & Jin, Q. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 33 (Database issue): D325-D328. doi: 10.1093/nar/gki008.
- Chin, C.-S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E. E., et al. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*, 10 (6): 563-569. doi: 10.1038/nmeth.2474.
- Chin, C.-S., Peluso, P., Sedlazeck, F. J., Nattestad, M., Concepcion, G. T., Clum, A., Dunn, C., O'Malley, R., Figueroa-Balderas, R., Morales-Cruz, A., et al. (2016). Phased diploid genome assembly

- with single-molecule real-time sequencing. *Nature Methods*, 13 (12): 1050-1054. doi: 10.1038/nmeth.4035.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 65 (2): 232-260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. & Wolk, D. M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26 (3): 547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
- Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H. & Taylor, D. E. (2003). Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (12): 3675-3681. doi: 10.1128/aac.47.12.3675-3681.2003.
- Coque, T. M., Singh, K. V., Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (1999). Characterization of dihydrofolate reductase genes from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (1): 141-147.
- Costa, S. S., Viveiros, M., Amaral, L. & Couto, I. (2013). Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *The open microbiology journal*, 7: 59-71. doi: 10.2174/1874285801307010059.
- Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L. & Huebner, J. (2006). Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC microbiology*, 6: 60-60. doi: 10.1186/1471-2180-6-60.
- Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G. & Fotia, G. (2014). Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics*, 30 (13): 1928-1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btu135.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (3): 490-495. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- Daubin, V. & Szöllösi, G. J. (2016). Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8 (4): a018036-a018036. doi: 10.1101/cshperspect.a018036.
- de Groot, A., Heijnen, I., de Cock, H., Filloux, A. & Tommassen, J. (1994). Characterization of type IV pilus genes in plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Journal of bacteriology*, 176 (3): 642-650. doi: 10.1128/jb.176.3.642-650.1994.
- Del Papa, M. F. & Perego, M. (2011). *Enterococcus faecalis* virulence regulator FsrA binding to target promoters. *Journal of bacteriology*, 193 (7): 1527-1532. doi: 10.1128/JB.01522-10.
- Desai, M. M. & Fisher, D. S. (2007). Beneficial mutation selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics*, 176 (3): 1759-1798. doi: 10.1534/genetics.106.067678.
- DTU Food. (2020). Protocol for PCR amplification of *mecA*, *mecC* (MECALGA251), *spa* and *pvl*
Tilgjengelig fra: https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf (lest 24.04.2020).
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L. & Zhu, G. (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of basic microbiology*, 53 (1): 1-8.
- ECDC. (2018a). 33000 people die every year due to infections with antibiotic-resistant bacteria. Tilgjengelig fra: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/33000-people-die-every-year-due-to-infections-antibiotic-resistant-bacteria> (lest 04.04.2020).
- ECDC. (2018b). Rates by country. Tilgjengelig fra: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/rates-country> (lest 05.04.2020).
- ECDC. (2018c). Surveillance atlas of infectious diseases. Tilgjengelig fra: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4> (lest 05.04.2020).
- EUCAST. (2020). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Tilgjengelig fra: <https://mic.eucast.org/Eucast2/> (lest 05.04.2020).

- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D. S., Lassalas, J., Lambertson, P., Aubry, J. M., Marnet, P. G., Le Loir, Y. & Even, S. (2016). Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. *Front Microbiol*, 7: 480. doi: 10.3389/fmicb.2016.00480.
- Fjeld, I. E. (2020). *Korona-dødeligheten i Italia kan skyldes resistente bakterier*. Tilgjengelig fra: <https://www.nrk.no/urix/korona-dodeligheten-i-italia-kan-skyldes-resistente-bakterier-1.14959498> (lest 03.04.2020).
- Folkehelseinstituttet. (2017). *Antibioitkaresistens*. Tiltak for forebygging av antibiotikaresistens. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/#tiltak-for-forebygging-av-antibiotikaresistens> (lest 03.04.2020).
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews. Microbiology*, 12 (1): 49-62. doi: 10.1038/nrmicro3161.
- Friedman, L., Alder, J. D. & Silverman, J. A. (2006). Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (6): 2137-2145. doi: 10.1128/AAC.00039-06.
- Galle, M., Carpentier, I. & Beyaert, R. (2012). Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protein & peptide science*, 13 (8): 831-842. doi: 10.2174/138920312804871210.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133 (3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Gaustad, P. (2001). Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier. *Tidsskrift for Den norske legeförening*, 121 (26): 3090-3100.
- Gautam, L., Kaur, R., Kumar, S., Bansal, A., Gautam, V., Singh, M. & Ray, P. (2015). *Pseudomonas oleovorans* sepsis in a child: the first reported case in India. *Japanese journal of infectious diseases: JJID*. 2014.174.
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23 (5): 849-853. doi: 10.3201/eid2305.161556.
- Gonzalez, C. D., Ledo, C., Gai, C., Garofalo, A. & Gómez, M. I. (2015). The Sbi protein contributes to *Staphylococcus aureus* inflammatory response during systemic infection. *PLoS one*, 10 (6).
- Granum, P. E. (2015). *Staphylococcus aureus*. I: Rørvik, L. M. & Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning*, s. 197-207. Oslo: Cappelen Damm.
- Green, E. R. & Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology spectrum*, 4 (1): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
- Gupta, R., Malik, A., Rizvi, M. & Ahmed, S. M. (2016). Incidence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas* Spp. in ICU Patients with Special Reference to ESBL, AMPC, MBL and Biofilm Production. *Journal of global infectious diseases*, 8 (1): 25-31. doi: 10.4103/0974-777X.176142.
- Helsedirektoratet. (2018). *Rasjonell antibiotikabruk*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/antibiotika-i-sykehus/rasjonell-antibiotikabruk> (lest 19.05.2020).
- Heta, S. & Robo, I. (2018). The Side Effects of the Most Commonly Used Group of Antibiotics in Periodontal Treatments. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 6 (1): 6. doi: 10.3390/medsci6010006.
- Heusden, P. v., Beek, M. v. d., Scholtalbers, J., Girardot, C. & Bernt, M. (2020). Galaxy tool for trimmomatic. *Bioinformatics Core Facility at the University of Manchester*
- Hodille, E., Cuerq, C., Badiou, C., Bienvenu, F., Steghens, J.-P., Cartier, R., Bes, M., Tristan, A., Plesa, A., Le, V. T. M., et al. (2016). Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6 (180). doi: 10.3389/fcimb.2016.00180.
- Hollister, E. B., Brooks, J. P. & Gentry, T. J. (2015). Nucleic acid-based methods of analysis. I: Pepper, I. L., Gerba, C. P. & Gentry, T. J. (red.) *Environmental microbiology third edition*, s. 271-303: Academic press.

- Hong, S.-W., Choi, E.-B., Min, T.-K., Kim, J.-H., Kim, M.-H., Jeon, S. G., Lee, B.-J., Gho, Y. S., Jee, Y.-K., Pyun, B.-Y., et al. (2014). An important role of α -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*. *PloS one*, 9 (7): e100499-e100499. doi: 10.1371/journal.pone.0100499.
- Hsu, F., Schwarz, S. & Mougous, J. D. (2009). TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 72 (5): 1111-1125. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06701.x.
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7: 167-176. doi: 10.2147/IDR.S48820.
- Illumina Inc. (2020). *Introduction to SBS Technology*. Tilgjengelig fra: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html> (lest 05.04.2020).
- Invitrogen. (2010). *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp32866.pdf> (lest 05.04.2020).
- Johnston, N. J., Mukhtar, T. A. & Wright, G. D. (2002). Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Current drug targets*, 3 (4): 335-344.
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalarathna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., Cody, A. J., et al. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, 158 (4): 1005-1015. doi: 10.1099/mic.0.055459-0.
- Jonsson, M., Mazmanian, S. K., Schneewind, O., Bremell, T. & Tarkowski, A. (2003). The role of *Staphylococcus aureus* sortase A and sortase B in murine arthritis. *Microbes and infection*, 5 (9): 775-780.
- Jünemann, S., Sedlazeck, F. J., Prior, K., Albersmeier, A., John, U., Kalinowski, J., Mellmann, A., Goesmann, A., von Haeseler, A., Stoye, J., et al. (2013). Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nature Biotechnology*, 31 (4): 294-296. doi: 10.1038/nbt.2522.
- Kafil, H. S. & Mobarez, A. M. (2015). Spread of Enterococcal Surface Protein in Antibiotic Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from Urinary Tract Infections. *The open microbiology journal*, 9: 14-17. doi: 10.2174/1874285801509010014.
- Kang, D., Kirienko, D. R., Webster, P., Fisher, A. L. & Kirienko, N. V. (2018). Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence*, 9 (1): 804-817. doi: 10.1080/21505594.2018.1449508.
- Kaunitz, J. D. (2015). The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Digestive diseases and sciences*, 60 (8): 2230-2231. doi: 10.1007/s10620-015-3747-0.
- Kaur, D. C. & Chate, S. S. (2015). Study of Antibiotic Resistance Pattern in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* with Special Reference to Newer Antibiotic. *Journal of global infectious diseases*, 7 (2): 78-84. doi: 10.4103/0974-777X.157245.
- Kemp, K. D., Singh, K. V., Nallapareddy, S. R. & Murray, B. E. (2007). Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *bps (srtC)*, to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infection and immunity*, 75 (11): 5399-5404. doi: 10.1128/IAI.00663-07.
- Kilmury, S. L. N. & Burrows, L. L. (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both Twitching and Swimming Motilities. *mBio*, 9 (4): e01310-18. doi: 10.1128/mBio.01310-18.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 423. doi: 10.1038/nrmicro2333.
- Kondoh, H., Ball, C. B. & Adler, J. (1979). Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (1): 260-264. doi: 10.1073/pnas.76.1.260.

- Laupland, K. B. & Valiquette, L. (2013). The changing culture of the microbiology laboratory. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 24 (3): 125-128. doi: 10.1155/2013/101630.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* (62). doi: 10.3791/3923.
- Lee, Y., Nguyen, T. L., Kim, A., Kim, N., Roh, H. J., Han, H.-J., Jung, S.-H., Cho, M.-Y., Kang, H. Y. & Kim, D.-H. (2018). Complete Genome Sequence of Multiple-Antibiotic-Resistant *Streptococcus parauberis* Strain SPOF3K, Isolated from Diseased Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Genome announcements*, 6 (17): e00248-18. doi: 10.1128/genomeA.00248-18.
- Leggett, R. M. & Clark, M. D. (2017). A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of Experimental Botany*, 68 (20): 5419-5429. doi: 10.1093/jxb/erx289.
- Lehman, M. K., Nuxoll, A. S., Yamada, K. J., Kielian, T., Carson, S. D. & Fey, P. D. (2019). Protease-mediated growth of *Staphylococcus aureus* on host proteins is *opp3* dependent. *mBio*, 10 (2): e02553-18. doi: 10.1128/mBio.02553-18.
- Lerminiaux, N. A. & Cameron, A. D. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology*, 65 (1): 34-44.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45 (4): 999-1007.
- Li, S., Kelly, S. J., Lamani, E., Ferraroni, M. & Jedrzejewski, M. J. (2000). Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *The EMBO journal*, 19 (6): 1228-1240. doi: 10.1093/emboj/19.6.1228.
- Li, X.-Z., Plésiat, P. & Nikaido, H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (2): 337. doi: 10.1128/CMR.00117-14.
- Lillebakk, M. G. (2017). *Screening etter antibiotikaresistente bakterier i jordprøver og identifisering av mecC MRSA. Masteroppgave*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE* (63): e3998-e3998. doi: 10.3791/3998.
- Lundberg, Å., Nyman, A. K., Aspán, A., Börjesson, S., Unnerstad, H. E. & Waller, K. P. (2016). Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. *Journal of Dairy Science*, 99 (3): 2102-2117. doi: 10.3168/jds.2015-9487.
- MacGowan, A. P. (2008). *Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy*. Tilgjengelig fra: https://academic.oup.com/jac/article/62/suppl_2/ii105/691078 (lest 05.04.2020).
- Marshall, W. F. & Blair, J. E. (1999). *The cephalosporins*. Mayo Clinic Proceedings: Elsevier.
- Matsumoto, Y., Xu, Q., Miyazaki, S., Kaito, C., Farr, C. L., Axelrod, H. L., Chiu, H.-J., Klock, H. E., Knuth, M. W., Miller, M. D., et al. (2010). Structure of a virulence regulatory factor CvfB reveals a novel winged helix RNA binding module. *Structure (London, England : 1993)*, 18 (4): 537-547. doi: 10.1016/j.str.2010.02.007.
- Mattilsynet. (2013). *Triclosan*. Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/kosmetikk/stoffer_i_kosmetikk/triclosan/ (lest 07.05.2020).
- McAdow, M., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of innate immunity*, 4 (2): 141-148. doi: 10.1159/000333447.
- McGuinness, W. A., Malachowa, N. & DeLeo, F. R. (2017). Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*, 90 (2): 269-281.
- Melles, D. C., van Leeuwen, W. B., Boelens, H. A. M., Peeters, J. K., Verbrugh, H. A. & van Belkum, A. (2006). Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, 12 (7): 1174-1175. doi: 10.3201/eid1207.050865.

- Merlin, C. (2020). Reducing the Consumption of Antibiotics: Would That Be Enough to Slow Down the Dissemination of Resistances in the Downstream Environment? *Frontiers in Microbiology*, 11: 33.
- Mesrati, I., Saidani, M., Ennigrou, S., Zouari, B. & Redjeb, S. B. (2010). Clinical isolates of Pantone–Valentine leucocidin- and γ -haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. *Journal of Hospital Infection*, 75 (4): 265-268.
- Minamino, T., Yamaguchi, S. & Macnab, R. M. (2000). Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Journal of bacteriology*, 182 (11): 3029-3036. doi: 10.1128/jb.182.11.3029-3036.2000.
- Montealegre, M. C., La Rosa, S. L., Roh, J. H., Harvey, B. R. & Murray, B. E. (2015). The *Enterococcus faecalis* EbpA Pilus Protein: Attenuation of Expression, Biofilm Formation, and Adherence to Fibrinogen Start with the Rare Initiation Codon ATT. *mBio*, 6 (3): e00467. doi: 10.1128/mBio.00467-15.
- Moreno-Cinos, C., Goossens, K., Salado, I. G., Van Der Veken, P., De Winter, H. & Augustyns, K. (2019). ClpP Protease, a Promising Antimicrobial Target. *International journal of molecular sciences*, 20 (9): 2232. doi: 10.3390/ijms20092232.
- Munita, J. M., Arias, C. A. & Murray, B. E. (2012). Enterococcal endocarditis: can we win the war? *Current infectious disease reports*, 14 (4): 339-349.
- Myers, E. W. (2000). A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. *Science*, 287(5461): 2196-2204. doi: 10.1126/science.287.5461.2196.
- Nair, N., Biswas, R., Götz, F. & Biswas, L. (2014). Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infection and immunity*, 82 (6): 2162-2169. doi: 10.1128/IAI.00059-14.
- Nallapareddy, S. R., Wenxiang, H., Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (2005). Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *Journal of bacteriology*, 187 (16): 5709-5718.
- Nanra, J. S., Buitrago, S. M., Crawford, S., Ng, J., Fink, P. S., Hawkins, J., Scully, I. L., McNeil, L. K., Aste-Amézaga, J. M., Cooper, D., et al. (2013). Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9 (3): 480-487. doi: 10.4161/hv.23223.
- NCBI. (2017). *Chloramphenicol resistance protein DHA1 [Staphylococcus aureus O46]*. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AUG74744.1> (lest 06.05.2020).
- NCBI. (2020). *Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database*. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/313047?fbclid=IwAR2G-3WzCagic5qlsfWuauUZMMuJ2NoJUmgTAavhmlONepbVvVSAUv9C0w> (lest 24.04.2020).
- Nedland, K. T. (2008). *Faktaark 6. Smittestoffer (for mennesker og dyr) i avløps slam*. Tilgjengelig fra: https://www.norskvann.no/images/giertrude/Faktaark6_slam.pdf (lest 07.05.2020).
- Newsom, S. W. B. (2004). MRSA--past, present, future. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97 (11): 509-510. doi: 10.1258/jrsm.97.11.509.
- NMBU. (2020). *The udder microbiota in dairy cows: importance for animal health and welfare, mastitis and milk quality (JurFrisk)* Tilgjengelig fra: <https://www.nmbu.no/en/projects/node/39769> (lest 04.04.2020).
- Norsk legemiddelhandbok. (2016). *Kvartære ammoniumforbindelser*. Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelhandboka.no/L1.9.2.6/Kvart%C3%A6re_ammoniumforbindelser (lest 19.05.2020).
- Nowrouzian, F. L., Ljung, A., Nilsson, S., Hesselmar, B., Adlerberth, I. & Wold, A. E. (2019). Neonatal gut colonization by *Staphylococcus aureus* strains with certain adhesins and superantigens is negatively associated with subsequent development of atopic eczema. *British Journal of Dermatology*, 180 (6): 1481-1488. doi: 10.1111/bjd.17451.
- O'Riordan, K. & Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews*, 17 (1): 218-234. doi: 10.1128/cmr.17.1.218-234.2004.

- Oglesby, L. L., Jain, S. & Ohman, D. E. (2008). Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology (Reading, England)*, 154 (Pt 6): 1605-1615. doi: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
- Okabe, M., Yakushi, T., Kojima, M. & Homma, M. (2002). MotX and MotY, specific components of the sodium-driven flagellar motor, colocalize to the outer membrane in *Vibrio alginolyticus*. *Molecular Microbiology*, 46 (1): 125-134. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03142.x.
- Olsvik, Ø. (2016). *Forskeren forteller: Fremtiden vil fordømme oss for antibiotika i matproduksjonen*. Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/mat-og-helse-bakterier-dyresykdommer/forskeren-forteller-fremtiden-vil-fordomme-oss-for-antibiotika-i-matproduksjonen/379773> (lest 04.04.2020).
- Omsted, G. (2019). *Resistente bakterier slippes daglig ut i vannet via kloakken*. Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/helse-medisin-og-helse-miljo/resistente-bakterier-slippes-daglig-ut-i-vannet-via-kloakken/1311059> (lest 19.05.2020).
- Oxford Nanopore Technologies. (2018). *De novo assembly of prokaryotic and large eukaryotic genomes with long nanopore reads* Tilgjengelig fra: <https://nanoporetech.com/resource-centre/de-novo-assembly-prokaryotic-and-large-eukaryotic-genomes> (lest 19.05.2020).
- Oxford Nanopore Technologies. (2020a). *How does nanopore DNA/RNA sequencing work?* Tilgjengelig fra: <https://nanoporetech.com/how-it-works> (lest 05.04.2020).
- Oxford nanopore Technologies. (2020b). *Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing*. Tilgjengelig fra: <https://nanoporetech.com/resource-centre/performance-neural-network-basecalling-tools-oxford-nanopore-sequencing> (lest 05.04.2020).
- Pan, J., Zha, Z., Zhang, P., Chen, R., Ye, C. & Ye, T. (2017). Serine/threonine protein kinase PpkA contributes to the adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 113: 5-10.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (11): 4943-4960.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31 (4): e00088-17. doi: 10.1128/cmr.00088-17.
- Paukner, S. & Riedl, R. (2017). Pleuromutilins: Potent Drugs for Resistant Bugs-Mode of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7 (1): a027110. doi: 10.1101/cshperspect.a027110.
- Pham, T. D. M., Ziora, Z. M. & Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 10 (10): 1719-1739. doi: 10.1039/c9md00120d.
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 19 (2): 382-402. doi: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006.
- Prezioso, S., Laus, F., Tejada, A. R., Valente, C. & Cuteri, V. (2010). Detection of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in equine nasopharyngeal swabs by PCR. *Journal of veterinary science*, 11 (1): 67-72. doi: 10.4142/jvs.2010.11.1.67.
- Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20 (3): 440-458. doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R. & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69 (2): 326-356. doi: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.
- Rappuoli, R., Scarlato, V. & Arico, B. (2013). *Signal Transduction and Bacterial Virulence*: Springer Berlin Heidelberg.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4 (3): 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M., Michael, I. & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the total environment*, 447: 345-360.
- Romero-Calle, D., Guimarães Benevides, R., Góes-Neto, A. & Billington, C. (2019). Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8 (3): 138. doi: 10.3390/antibiotics8030138.
- Rózańska, H., Lewtak-Piłat, A., Kubajka, M. & Weiner, M. (2019). Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and their Antimicrobial Resistance. *Journal of veterinary research*, 63 (1): 93-97. doi: 10.2478/jvetres-2019-0014.
- Schaechter, M. (2009). *Encyclopedia of Microbiology*: Elsevier Science.
- Schmitt, A., Jiang, K., Camacho, M. I., Jonna, V. R., Hofer, A., Westerlund, F., Christie, P. J. & Berntsson, R. P. A. (2018). PrgB promotes aggregation, biofilm formation, and conjugation through DNA binding and compaction. *Molecular microbiology*, 109 (3): 291-305. doi: 10.1111/mmi.13980.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30 (14): 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Seemann, T. (2016). *ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes*. Tilgjengelig fra: <https://github.com/tseemann/abricate> (lest 24.04.2020).
- Seemann, T. (2017). *Shovill: Faster SPAdes assembly of Illumina reads*. Tilgjengelig fra: <https://github.com/tseemann/shovill> (lest 24.04.2020).
- Senf, F., Tommassen, J. & Koster, M. (2008). Polar secretion of proteins via the Xcp type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 154 (10): 3025-3032. doi: 10.1099/mic.0.2008/018069-0.
- Sergey Koren, Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H. & Phillippy, A. M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 27 (5): 722-736. doi: 10.1101/gr.215087.116.
- Sharma, D., Misba, L. & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8: 76-76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3.
- Sigma-Aldrich. (2020). *Hyaluronidase (Hyaluronate Lyase)*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=111682438> (lest 27.04.2020).
- Sillanpää, J., Nallapareddy, S. R., Houston, J., Ganesh, V. K., Bourgogne, A., Singh, K. V., Murray, B. E. & Höök, M. (2009). A family of fibrinogen-binding MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology (Reading, England)*, 155 (Pt 7): 2390-2400. doi: 10.1099/mic.0.027821-0.
- Skaar, E. P. & Schneewind, O. (2004). Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes and infection*, 6 (4): 390-397.
- Smith, A. M. & Huber, V. C. (2018). The Unexpected Impact of Vaccines on Secondary Bacterial Infections Following Influenza. *Viral immunology*, 31 (2): 159-173. doi: 10.1089/vim.2017.0138.
- Smith, J. L. (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of food protection*, 66 (7): 1292-1303.
- Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K. A., Guan, Z., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., Raetz, C. R. H. & Geiger, O. (2007). The Lipid Lysyl-Phosphatidylglycerol Is Present in Membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and Confers Increased Resistance to Polymyxin B Under Acidic Growth Conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20 (11): 1421-1430. doi: 10.1094/mpmi-20-11-1421.
- Song, Z., Cai, Y., Lao, X., Wang, X., Lin, X., Cui, Y., Kalavagunta, P. K., Liao, J., Jin, L., Shang, J., et al. (2019). Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome*, 7 (1): 9. doi: 10.1186/s40168-019-0628-3.

- Spaan, A. N., Vrieling, M., Wallet, P., Badiou, C., Reyes-Robles, T., Ohneck, E. A., Benito, Y., de Haas, C. J. C., Day, C. J., Jennings, M. P., et al. (2014). The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature communications*, 5: 5438-5438. doi: 10.1038/ncomms6438.
- Spirig, T., Weiner, E. M. & Clubb, R. T. (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*, 82 (5): 1044-1059. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x.
- Stapper, A. P., Narasimhan, G., Ohman, D. E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Høiby, N. & Mathee, K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (7): 679-690. doi: 10.1099/jmm.0.45539-0.
- Stępień-Pyśniak, D., Hauschild, T., Kosikowska, U., Dec, M. & Urban-Chmiel, R. (2019). Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. *Scientific Reports*, 9 (1): 11204. doi: 10.1038/s41598-019-47602-w.
- Stutz, K., Stephan, R. & Tasara, T. (2011). SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 49 (2): 638-646. doi: 10.1128/JCM.01148-10.
- Støle, M. (2017). *Screening av miljøprøver for bredspektrede β -laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser*. Masteroppgave: Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Suojala, L., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – an evidence-based approach. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36 (6): 521-531. doi: 10.1111/jvp.12057.
- Swartz, T. & Petersson-Wolfe, C. S. (2016). *Pseudomonas* spp.: A Practical Summary for Controlling Mastitis.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.-H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A. & Schlüter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*, 155 (7): 2306-2319. doi: 10.1099/mic.0.028233-0.
- Taniyama, D., Abe, Y., Sakai, T., Kikuchi, T. & Takahashi, T. (2017). Human case of bacteremia caused by *Streptococcus canis* sequence type 9 harboring the *scm* gene. *IDCases*, 7: 48-52. doi: 10.1016/j.idcr.2017.01.002.
- Taponen, S., McGuinness, D., Hiitiö, H., Simojoki, H., Zadoks, R. & Pyörälä, S. (2019). Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. *Veterinary Research*, 50 (1): 44. doi: 10.1186/s13567-019-0662-y.
- Tchoupa, A. K., Jones, R. A., Kuroki, A., Alam, M. T., Perrier, S., Chen, Y. & Unnikrishnan, M. (2019). The type VII secretion system protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial host fatty acids. *bioRxiv*: 572172.
- Thammavongsa, V., Schneewind, O. & Missiakas, D. M. (2011). Enzymatic properties of *Staphylococcus aureus* adenosine synthase (AdsA). *BMC biochemistry*, 12: 56-56. doi: 10.1186/1471-2091-12-56.
- Thermo Scientific. (2020a). *Brilliance CRE AGAR*. Tilgjengelig fra: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1226&c=UK&lang=EN (lest 22.03.2020).
- Thermo Scientific. (2020b). *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios* Tilgjengelig fra: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> (lest 05.04.2020).
- Thomas, S., Holland, I. B. & Schmitt, L. (2014). The type 1 secretion pathway—the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843 (8): 1629-1641.
- Thomson, J. M. & Lamont, I. L. (2019). Nucleoside Analogues as Antibacterial Agents. *Frontiers in microbiology*, 10: 952-952. doi: 10.3389/fmicb.2019.00952.

- Thurlow, L. R., Thomas, V. C., Narayanan, S., Olson, S., Fleming, S. D. & Hancock, L. E. (2010). Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity*, 78 (11): 4936-4943. doi: 10.1128/IAI.01118-09.
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*: Universitetsforlaget.
- Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J. & Hooper, D. C. (2005). MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 187 (7): 2395-2405. doi: 10.1128/JB.187.7.2395-2405.2005.
- UniProt. (2020). UniProtKB - A6QJJ8 (TCAR_STAAE). Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/A6QJJ8> (lest 09.05.2020).
- van Duin, D. & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious disease clinics of North America*, 30 (2): 377-390. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.004.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40 (4): 277-283.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J. & Amann, R. (1996). *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*, 34 (1-2): 237-244.
- Whist, A. C. (2020). *Oversikt over mastittbakterier*. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/fagprat/helse/oversikt-over-mastittbakterier> (lest 08.04.2020).
- Whitchurch, C. B., Leech, A. J., Young, M. D., Kennedy, D., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., Semmler, A. B. T., Mellick, A. S., Martin, P. R., Alm, R. A., et al. (2004). Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 52 (3): 873-893. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04026.x.
- WHO. (2011). Bulletin of the World Health Organization Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/bulletin/volumes/89/1/11-030111/en/> (lest 06.04.2020).
- Wick, R. (2017). *Porechop*. Tilgjengelig fra: <https://github.com/rrwick/Porechop> (lest 24.04.2020).
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. (2016). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. doi: 10.1101/096412.
- Wiest, D. B., Cochran, J. B. & Tecklenburg, F. W. (2012). Chloramphenicol toxicity revisited: a 12-year-old patient with a brain abscess. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG*, 17 (2): 182-188. doi: 10.5863/1551-6776-17.2.182.
- Willey, J. M., Sherwood, L. & Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's microbiology (international edition)*. 9th utg. New York, NY: McGraw-Hill.
- Wood, L. F. & Ohman, D. E. (2006). Independent regulation of MucD, an HtrA-like protease in *Pseudomonas aeruginosa*, and the role of its proteolytic motif in alginate gene regulation. *Journal of bacteriology*, 188 (8): 3134-3137. doi: 10.1128/JB.188.8.3134-3137.2006.
- Zhang, S. & Chen, D.-C. (2019). Facing a new challenge: the adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity. *Chinese medical journal*, 132 (10): 1135.
- Zinner, S. H. & Mayer, K. H. (2015). 33 - Sulfonamides and Trimethoprim. I: Bennett, J. E., Dolin, R. & Blaser, M. J. (red.) *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, s. 410-418.e2. Philadelphia.

Vedlegg

Vedlegg 1

Informasjon om henting av melkeprøver, fra seniorforsker Roger Meisal, gjengitt i sin helhet:
«National Mastitis Council Procedures for Collecting Milk Samples:

Proper collection of milk samples is of paramount importance for identification of mastitis pathogens. Aseptic technique is an absolute necessity when collecting milk samples to prevent contamination by organisms found on the cows' skin, udder, and teats; hands of the sampler; and in the barn environment. Contaminated samples result in misdiagnosis, increased work and expense, confusion, and frustration. Contamination can be avoided by following the procedures described below.

Materials for Sampling

- Sterile vials or tubes
- 70% alcohol (ethyl or isopropyl)
- Cotton balls or gauze pledgets soaked in 70% alcohol, or commercially prepared, individually packaged alcohol swabs
- Cooler with ice or freezer packs for storing samples
- Racks for holding sample tubes or vials while sampling cows, and for cooler storage
- Disinfectant for cleaning teats (effective germicidal products used for premilking teat disinfection are recommended)
- Paper towels or individual cloth towels
- Means of identifying samples: permanent ink pen (with ink that is stable in both water and alcohol) or typed labels

Sampling Technique

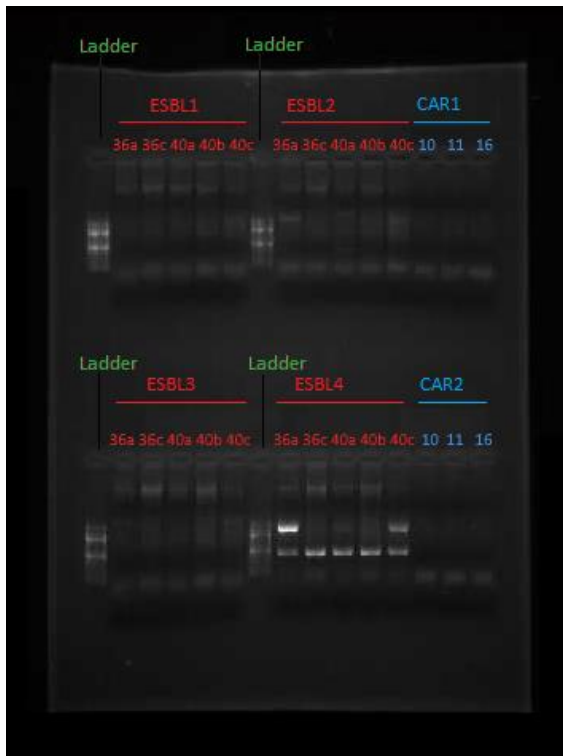
- Label tubes prior to sampling (date, farm, cow, quarter).
- Brush loose dirt, bedding, and hair from the udder and teats. Thoroughly wash and dry grossly dirty teats and udders before proceeding with sample collection. Udders should be washed as a last resort.

- Discard several streams of milk from the teat (strict foremilk) and observe milk and mammary quarters for signs of clinical mastitis. Record all observations of clinical signs.
- Dip all quarters in an effective premilking teat disinfectant and allow at least 30 seconds contact time.
- Dry teats thoroughly with an individual towel.
- Beginning with teats on the far side of the udder, scrub teat ends vigorously (10 to 15 seconds) with cotton balls or gauze pledgets moist (not dripping wet) with 70% alcohol. Teat ends should be scrubbed until no more dirt appears on the swab or is visible on the teat end. A single cotton ball or alcohol swab should not be used on more than one teat. Take care not to touch clean teat ends. Avoid clean teats coming into contact with dirty tail switches, feet, and legs. In herds where cows are not cooperative, begin by scrubbing the nearest teat until clean, obtain the sample, and move to the next teat
- Begin sample collection from the closest teat and move to teats on the far side of the udder. Remove the cap from the tube or vial but do not set the cap down or touch the inner surface of the cap. Always keep the open end of the cap facing downward. Maintain the tube or vial at approximately a 45 degree angle while taking the sample. Do not allow the lip of the sample tube to touch the teat end. Collect one to three streams of milk and immediately replace and tightly secure the cap. Do not overfill tubes, especially if samples are to be frozen.
- To collect a composite sample (milk from all four quarters in the same tube), begin sample collection with the nearest teats and progress to the teats on the far side of the udder. One to 2 ml of milk should be collected from each quarter of the udder.
- When samples are taken at the end of milking or between milkings, teats should be dipped in an effective germicidal teat disinfectant following sample collection.
- Store samples immediately on ice or in some form of refrigeration. Samples to be cultured at a later date (more than 48 hours) should be frozen immediately.

Source: Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. [NMC publication, 2004]

- Forskjellene var at det ble brukt jod spray og ikke dipp. I tillegg ble kyrne melket til de var nesten tomme før desinfeksjon og prøvetaking. Håndmelking rett i 50 ml rør.»

Vedlegg 2



Figur 17 viser alle prøver som ble testet med PCR multipleks, med en 100 bp ladder

Ladderen vist i figur 17 er ikke spesielt bra, men dette var tilfelle for alle geler som ble kjørt med denne ladderen. Den er kanskje tint og fryst for mange ganger, så alt som synes er 400 og 800 bp. Det vises også at 16S ikke er synlig hos i hvert fall prøve 36c eller 40b. Dette kan skyldes for mye DNA, da disse hadde de høyeste verdiene i Qubit-målingene. 40a er også ekstremt svak for 16S, men denne hadde en Qubit-verdi mellom 36a og 40c, altså de to prøvene som hadde tydelige bånd, så det er neppe DNA-konsentrasjonen som er problemet her. Muligens var det en pipetteringsfeil. Det er også tydelig at det er enkelte andre svake bånd på gelen, men alle disse er åpenbart større enn 16S, siden de ligger så langt bak på gelen. 16S var det største av det som ble testet, så alt som havner bak dette vil være større, og ikke av interesse.

Vedlegg 3

Tabell 51 viser rMLST-resultatene for alle sekvenserte prøver

Prøve	Rank	Taxon	Support
ESBL_M36_c	SPECIES	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	85 %
ESBL_M36_c	SPECIES	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	9 %
ESBL_M36_c	SPECIES	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i>	4 %
ESBL_M40_a	SPECIES	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	84 %
ESBL_M40_a	SPECIES	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	4 %
ESBL_M40_b	SPECIES	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	85 %
ESBL_M40_b	SPECIES	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	9 %
ESBL_M40_b	SPECIES	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i>	4 %
ESBL_M40_c	SPECIES	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	32 %
ESBL_M40_c	SPECIES	<i>Pseudomonas indoloxydans</i>	32 %
ESBL_M40_c	SPECIES	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	32 %
ESBL_M36_a	SPECIES	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	32 %
ESBL_M36_a	SPECIES	<i>Pseudomonas indoloxydans</i>	32 %
ESBL_M36_a	SPECIES	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	32 %
16(4)	SPECIES	<i>Enterococcus faecalis</i>	100 %
15(1)	SPECIES	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 %
13(1)	SPECIES	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	100 %
11(4)	SPECIES	<i>Enterococcus faecalis</i>	100 %
10(4)	SPECIES	<i>Enterococcus faecalis</i>	100 %
4(2)	SPECIES	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100 %
4(1)	SPECIES	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	100 %

Prøve 6(1) (*S.haemolyticus* (100%)) er ikke inkludert i tabell 51, da dataene fra denne sekvenseringen ble tilgjengelig senere.

Vedlegg 4

Tabell 52 viser alle gener som har blitt funnet i denne oppgaven, og hvor de ble funnet, sortert på prøve

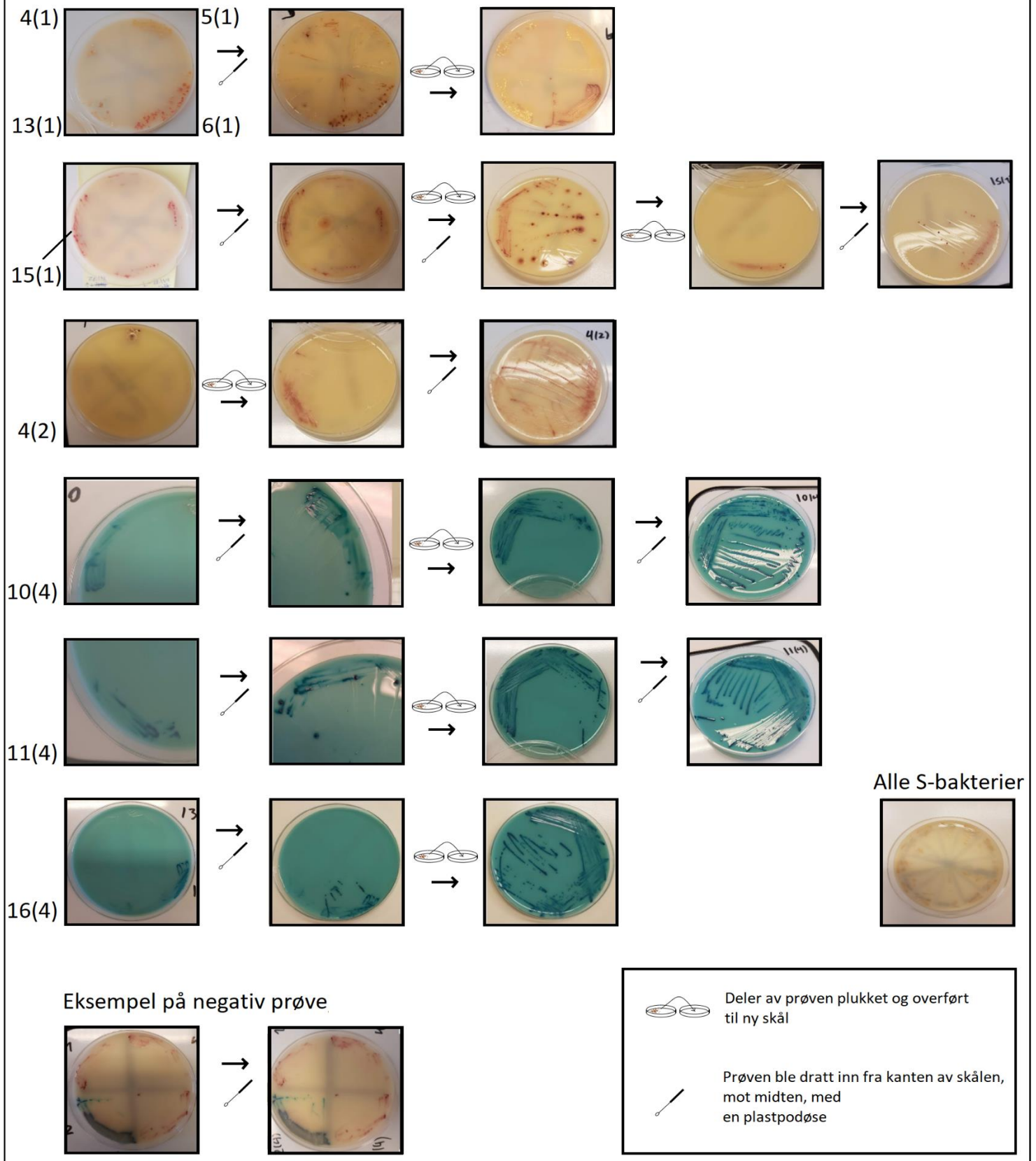
Prøve	Funnet i CARD	Funnet i NCBI	Funnet med Prokka	Funnet i VFDB
10(4)	<i>dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i>	<i>dfrE, lsaA, tetM</i>	<i>adcC, artM, azlC, cvfB, ecsA, ecsB, glnQ, mdtL, mdxG, mepA, metN1, metN2, msmK, oppD, oppF, opuCD, pstA, pstB1, pstB2, pstC, tet(M), tmrB, yadG, yadH, yclP, ykpA, ytcP, yteP, yufO, yycJ</i>	<i>ace, bopD, bsh, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, prgB/asc10, sprE, srtC</i>
11(4)	<i>dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i>	<i>aadE, dfrE, lsaA, tetM</i>	<i>natA, yesO</i>	<i>ace, bopD, bsh, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, ef3023, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, sprE, srtC</i>
13(1)	<i>arlR, mgrA, norA</i>		<i>arsR, crcB, fmtC, proP</i>	<i>clpP, lip, sdrD</i>
15(1)	<i>arlR, arlS, dha-1, fosB, lmrS, mepA, mepR, mgrA, norA, tet38</i>	<i>fosB-Saur, tet38</i>	<i>arsR, bacA, bcr, ccmA, crcB, cvfB, emrA, esaC, esxB, fepD, fmtC, FosB, glcU, isdD, isdE, mepA, mepB, narK, norA, nupC, nupC2, ohr, phnC, phnD, potA, proP, pstS, rarD, rbsU, rho, sbnD, secF, sepA, tcaA, tcaB, tcaR, telA, tetR, vraD, vraE, ybhr, yycJ, znuC</i>	<i>adsA, aur, cap8A, cap8B, cap8C, cap8D, cap8E, cap8F, cap8G, cap8H, cap8I, cap8J, cap8K, cap8L, cap8M, cap8N, cap8O, cap8P, clfA, clfB, clpP, coa, ebp, esaA, esaB, esaC, esaD, essA, essB, essC, esxA, esxB, fnbA, fnbB, geh, hlb, hld, hlgA, hlgB, hlgC, hly/hla, hysA, icaA, icaB, icaC, icaD, icaR, isdA, isdB, isdC, isdD, isdE, isdF, isdG, lip, lukF-PV, map, sbi, sdrC, sdrD, spa, srtB, sspA, sspB, sspC, vWbp</i>
16(4)	<i>ant(6)-la, dfrE, efrA, efrB, emeA, lsaA, tetM</i>	<i>ant(6)-la, dfrE, lsaA, spw, tetM</i>	<i>acr3, arsA, arsD, yadG, yadH</i>	<i>ace, bopD, clpP, cpsA, cpsB, ebpA, ebpB, ebpC, ef0818, ef3023, efaA, esp, fsrA, fsrB, fsrC, fss1, fss2, gelE, sprE, srtC</i>
4(1)	<i>arlR, mgrA, norA</i>		<i>mdtL, tcaA, tetR</i>	<i>clpP, lip</i>
4(2)	<i>arlR, dfrC, mgrA, norA</i>	<i>dfrC, fosB-251804940</i>	<i>arsA, arsD, arsR, bacA, bcr, cadD, ccmA, crcB, cvfB, emrA, fmtC, glcU, narK, norA, nupC, nupC2, ohr, phnC, phnD, potA, pstS, rarD, rbsU, rho, secF, tcaB, telA, trkG, vraD, vraE, yycJ, znuC</i>	<i>clfA, clfB, hld, lip, sdrC</i>

Prøve	Funnet i CARD	Funnet i NCBI	Funnet med Prokka	Funnet i VFDB
6(1)			<i>arsR, bacA, bcr, ccmA, crcB, cvfB, emrA, fmtC, glcU, mdtG, mepA, mepB, narK, norA, nupC, nupC2, ohr, phnC, phnD, potA, proP, pstS, qacA, rarD, rho, secF, sepA, tcaA, tcaB, tcaR, telA, tetR, vraD, vraE, yycJ, znuC</i>	
ESBL_ M36_a	<i>aac(6')-Ib7, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, cpxR, emrE, mexA, mexB, mexD, mexE, mexF, mexJ, mexK, MuxB, opmH, oprM, oprN, pmpM, rpoB</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>aaeA, aaeB, acr3, acrA, acrB, ampC, arsB, arsR1, arsR2, artI, artJ, bcr, bepD, bepE, bepF, ble, copA, copB, cvfB, czcA, czcC, emrA, emrB, fsr, glnM, lnrL, mdtA, mdtB, mdtC, mdtH, mdtK, mexA, mexB, nepl, ohrB, ohrR, oqxB32, oqxB7, phnD1, phoP, uup, yaaA, yadG, ybiT, ycaD, ydcV, yejB, yejE, yejF, yhdW, yhdY, yheS, yojl, ytrE</i>	<i>alg8, algA, algB, algC, algD, algE, algF, algG, algI, algL, algP/algR3, algR, algU, algW, algZ, chpA, chpB, clpV1, dotU1, fha1, fimV, fleN, fleQ, fleR, fleS, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flhA, fliA, fliC, fliE, fliF, fliG, fliI, fliJ, fliM, fliN, fliO, fliP, fliQ, fliR, hcp1, hsiB1/vipA, hsiC1/vipB, hsiF1, hsiG1, hsiJ1, icmF1/tssM1, motA, motB, motC, motD, motY, mucD, mucP, pilB, pilG, pilH, pill, pilJ, pilM, pilN, pilR, pilT, pilU, ppkA, tagR, tsr, vgrG1a, waaA, waaF, waaG, waaP, xcpA/pilD, xcpQ, xcpR, xcpS, xcpT, xcpV</i>
ESBL_ M36_b	<i>cpxR, emrE, mexA, mexB, mexE, mexF, mexJ, mexK, muxB, opmH, oprM, oprN, pmpM, rpoB</i>	<i>oqxB10</i>	<i>aaeA, aaeB, acr3, arsA, artI, artJ, bcr, bepE, bepF, bmrA, copA, copB, cvfB, czcA, czcB, czcC, emrB, lnrL, mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mdtK, MexA, MexB, ohrB, ohrR, oqxB7, phnD1, phoP, uup, yaaA, yadG, ybiT, ycaD, ydcV, yejB, yejE, yejF, yhdW, yhdY, yheS, yknY, ytrE</i>	<i>algC, algR, algU, algW, algZ, chpA, chpB, fimV, fleN, fleQ, fleR, fleS, flgB, flgC, flgD, flgF, flgG, flgH, flgI, flgK, flgN, flhA, flhF, fliA, fliC, fliE, fliF, fliG, fliI, fliK, fliM, fliN, fliP, fliQ, fliR, motA, motB, motC, motD, mtrD, mucD, mucP, pilB, pilE, pilG, pilH, pill, pilJ, pilM, pilO, pilR, pilT, pilU, pscP, waaA, waaC, waaF, waaG, waaP, xcpA/pilD</i>
ESBL_ M40_a	<i>cpxR, emrE, mexA, mexB, mexE, mexF, mexK, muxB, opmH, oprM, oprN, pmpM, rpoB</i>	<i>oqxB10</i>	<i>arsA, copA, czcA, czcB, czcC, mdtB, tetO, ydcU, ydcV, yhdW, yhdY</i>	<i>algC, algR, algU, algW, algZ, chpA, chpB, fimV, fleN, fleQ, fleR, fleS, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flgK, flgN, flhA, flhF, fliA, fliC, fliE, fliF, fliG, fliI, fliK, fliM, fliN, fliP, fliQ, fliR, motA, motB, motC, motD, mtrD, mucD, mucP, pilA, pilB, pilG, pilH, pill, pilJ, pilM, pilO, pilR, pilT, pilU, waaA, waaC, waaF, waaG, waaP, xcpA/pilD</i>

Prøve	Funnet i CARD	Funnet i NCBI	Funnet med Prokka	Funnet i VFDB
ESBL_ M40_b	<i>cpxR, emrE, mexA, mexB, mexE, mexF, mexJ, mexK, muxB, opmB, opmH, oprM, oprN, pmpM, rpoB</i>	<i>oqxB10</i>	<i>mdtA</i>	<i>algC, algR, algU, algW, algZ, chpA, chpB, fimV, fleN, fleQ, fleR, fleS, flgB, flgC, flgD, flgF, flgG, flgH, flgI, flgK, flgN, flhA, flhF, fliA, fliC, fliE, fliF, fliG, fliI, fliK, fliM, fliN, fliP, fliQ, fliR, motA, motB, motC, motD, mtrD, mucD, mucP, pilB, pilE, pilG, pilH, pill, pilJ, pilM, pilO, pilR, pilT, pilU, pscP, tsr, waaA, waaC, waaF, waaG, waaP, xcpA/pilD</i>
ESBL_ M40_c	<i>aac(6')-Ib7, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, cpxR, emrE, mexA, mexB, mexD, mexE, mexF, mexJ, mexK, MuxB, opmH, oprM, pmpM, rpoB</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>aaeA, aaeB, acr3, acrA, acrB, ampC, arsB, arsR1, artI, artJ, bcr, bepD, bepE, bepF, ble, copA, copB, cvfB, czcA, czcC, emrA, emrB, fsr, glnM, lnrL, mdtA, mdtB, mdtC, mdtH, mdtK, mexA, mexB, ohrR, oqxB32, oqxB7, phnD1, phoP, uup, yaaA, yadG, ybiT, ycaD, ydcV, yejB, yejE, yejF, yhdW, yhdY, yheS, yojI, ytrE</i>	<i>alg8, algA, algB, algC, algD, algE, algF, algG, algI, algL, algP/algR3, algR, algU, algW, algZ, chpA, chpB, clpV1, dotU1, fha1, fimV, fleN, fleQ, fleR, fleS, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flhA, fliA, fliC, fliE, fliF, flgI, fliJ, fliM, fliN, fliO, fliP, fliQ, fliR, hcp1, hsiB1/vipA, hsiC1/vipB, hsiF1, hsiG1, hsiJ1, icmF1/tssM1, motA, motB, motC, motD, motY, mucD, mucP, pilB, pilG, pilH, pill, pilJ, pilM, pilN, pilR, pilT, pilU, ppkA, pvdH, tagR, tsr, vgrG1a, waaA, waaF, waaG, waaP, xcpA/pilD, xcpQ, xcpR, xcpS, xcpT, xcpV</i>

Tabell 52 inkluderer flere gener fra Prokka som ikke har blitt omtalt i oppgaven, basert på at det var lite informasjon om genet, eller at det ga resistens mot noe som ikke kan benyttes som medisin, for eksempel enkelte metaller, eller annet som har gjort genene mindre interessante å bruke tid og plass på i denne oppgaven.

Positive F-bakterier på MRSA og CRE



Figur 18 viser hvordan F-prøvene så ut på antibiotikaskåler, før og etter podøse-stryking, samt omsådde prøver. Et bilde av alle S-bakterier på én ESBL-skål er også inkludert, samt et eksempel på en prøve hvor stammen ikke viste ny vekst etter stryking, altså var den negativ. De blå skålene er CRE-skåler, S-bakteriene vokser på en ESBL-skål, mens resten av de gule skålene er MRSA-skåler.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway