



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **«Karakterisering av antibiotikaresistens bakterier ( ESBL og Karbapenemaseproduserende) ved molekylærbiologiske og fysiologiske undersøkelser isolert fra vann»**

"Characterization of antibiotic resistance bacteria (ESBL and carbapenemase producing) in molecular biological and physiological studies isolated from water"

Rūta Valeckiene

Mastergrad i Matvitenskap



## FORORD

Denne masteroppgaven utgjør 60 studiepoeng, og er skrevet som en avslutning på en fireårig studie i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Masteroppgaven ble begynt i september 2016 og avsluttet i mai 2020.

Det har vært veldig spennende og lærerikt arbeidet med antibiotika resistens i vannmiljø. Dette oppgave har skapt for meg utrolig mye kunnskap som jeg delt med alle rundt meg og vekt stor interesse videre i live mitt.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder professor Bjørn-Arne Lindstedt for god hjelp underveis i prosjektet. Takk for muligheten jeg fikk til å jobbe med en spennende oppgave, takk for tilbakemeldinger og stor entusiasme.

Tusen takk til stipendiat Misti Dawn Finton og overingeniær Ahmed Abdelghani for god hjelp og veiledning på laboratoriet, og hyggelige samtaler på laboratoriet. Takk for et hyggelig samarbeid!

Til slutt jeg vil si kjempestor takk for all moralsk støtte, tilbakemeldinger, oppmuntrende og gode ord til medstudent Sissel Solberg.

Sist, men ikke minst, en stor mange takk til familien min som har holdt ut med den langt tider som jeg måtte bruke på fire års studier. Det hadde ikke klart meg uten dere alle sammen!

Ås, juni 2020

Rūta Valeckiene

## SAMMENDRAG

**Bakgrunn:** Verdens helseorganisasjon (WHO) kaller antibiotika resistens en av de største truslene for vår framtidige helse. Hvis antibiotika klarer ikke å virke lenge på infeksjoner, kan vi mennesker i verste fall risikere en fremtid uten effektive antimikrobielle medisiner som gjør oss friske.

**Hensikten:** Hovedmål med den oppgaven å detektere av betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) i bakterier isolert fra akvatiske miljøer ved bruk av fenotypiske og genotypiske metode. Eventuelle positive resultater av antibiotika resistens bakterier skulle bidra til økt kunnskap om bakteries opprinnelse og hvordan den sprer seg i vannmiljøet.

**Metodene:** Fem vannprøver var hentet fra Årungen i høstsemesteret 2018 og tre vannprøver fra NMBU Niagarabekken i vintersemester 2018. Alle prøvene var dyrket på selektive kromogene medier for detektering av ESBL og CRE (Brilliance<sup>TM</sup> ESBL og Brilliance<sup>TM</sup> CRE Agar). Genotypiske metoder inkluderer amplifisering og separering av DNA med henholdsvis PCR (multipleks og singelpleks) og agarosegelelektroforese. Ifølge resultater var gjort videre Sangersekvensering (16S rRNA og resistengener) og helgenomsekvensering (MinION/ARMA). Det var benyttet molekylære metoder for å bekrefte eller avkrefte fenotypiske positive resultater, samtidig var undersøkt hvilken gen og bakterier som var i prøvene.

**Resultatene:** Det ble funnet bekreftet funn av antibiotikaresistensgener i vannprøvene fra Årungen og Niagara fra NMBU. Aktuelle AR prøver ble undersøkt med Sanger sekvensering, MinION, ARMA, MiSeq og Disk Diffusjonstest, og det ble bekreftet funn av resistente gener. Særlig interessant var at det ble funnet et nytt patogent gen som finnes ingen ikke ga 100% identiske proteiner i databasen, men resultatet under viste at det proteinet som lignet mest, og det proteinet som finnes i en Klasse-A beta-laktamase fra en *Paraburkholderia* stamme som heter DHOM06. Det ble bekreftet resistens i *Pseudomonas fluorescens* og *S. maltophilia*.

**Konklusjon:** Det konkluderes med at ble funnet antibiotikaresiste bakterier i vannmiljøet, og det vekker stor bekymring at det ble funnet et nytt patogent gen som ikke finnes databasen, men som ligner mest på i en Klasse-A beta-laktamase fra en *Paraburkholderia* stamme som heter DHOM06. Det er grunnlag for å forske videre på denne patogene bakterie, da vi ikke har noe kunnskap om den.

## ABSTRACT

**Background:** The World Health Organization (WHO) calls antibiotic resistance one of the biggest threats to our future health. If antibiotics fail to last long on infections, we humans can at worst risk a future without effective antimicrobial drugs that makes us healthy.

**Purpose:** The main objective was the task of detecting extended spectrum beta-lactamases (ESBL and carbapenemases) in bacteria isolated from aquatic environments using phenotypic and genotypic methods. Any positive results of antibiotic resistance bacteria should contribute to increased knowledge about the origin of bacteria and how it spreads in the aquatic environment.

**The methods:** Five water samples were taken from Årungen in the fall semester 2018 and three water samples from the NMBU Niagara Basin in winter semester 2018. All the samples were grown on selective chromatography media for detection of ESBL and CRE (Brilliance™ ESBL and Brilliance™ CRE Agar). Genotypic methods include amplification and separation of DNA by PCR (multiplex and single plex, respectively) and agarose gel electrophoresis. According to results, further sequencing was done (16S rRNA and resistance genes) and whole-genome sequencing (MinION / ARMA). Molecular methods were used to confirm or reject phenotypic positive results, while at the same time the gene and bacteria in the samples were examined.

**Results:** It was found and confirmed antibiotic resistance genes in the water samples from Årungen and Niagara from NMBU. Current AR samples were examined with Sanger sequencing, MinION, ARMA, MiSeq and Disk Diffusion tests which were confirmed for the detection of resistant genes. In particular, new pathogenic genes such as fine-tuning 100% identical proteins were found in the database, but the result below shows that the protein most closely resembled the protein found in a Class-A beta-lactamase from a *Paraburkholderia* strain called DHOM06. Resistance *Pseudomonas fluorescense* and *S. maltophilia* were confirmed.

**Conclusion:** It is concluded that antibiotic resistance was found in the aquatic environment and it is of great concern that a new pathogen gene was found that is not in the database but most similar to a Class-A beta-lactamase from a *Paraburkholderia* strain called DHOM06. It is necessary to further investigate the pathogenic bacterium because of our lack of knowledge.

## **FORKORTELSER**

<b>AmpC</b>	<b>Ampicillinase C</b>
<b>ARMA</b>	<b>Antimicrobial Resistance Mapping Application</b>
<b>AR</b>	<b>Antibiotikaresistens</b>
<b>ARG</b>	<b>Antibiotikaresistente gen</b>
<b>AST</b>	<b>Antimikrobiell sensitivitets test</b>
<b>bla</b>	<b><math>\beta</math> -laktamasegen</b>
<b>bp</b>	<b>Basepar</b>
<b>CMY</b>	<b>AmpC navngitt etter hvilket antibiotikum det utviser resistens mot cefoxitin</b>
<b>CRE</b>	<b>Karbapenemresistente bakterier fra <i>Enterobacteriaceae</i> familien</b>
<b>CTX-M</b>	<b>Cefotaksimase</b>
<b>ECDC</b>	<b>European Centre of Disease Prevention and Control</b>
<b>EMA</b>	<b>The European Medicines Agency</b>
<b>ESBL</b>	<b><math>\beta</math> -laktamaser med utvidet spektrum</b>
<b>ESVAC</b>	<b>European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption</b>
<b>EUCATS</b>	<b>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</b>
<b>FHI</b>	<b>Folkehelseinstituttet</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoksyribonukleinsyre</b>
<b>dNTP</b>	<b>Deoksynukleotid</b>
<b>HGT</b>	<b>Horisontal genoverføring</b>
<b>KPC</b>	<b>Klebsiella pneumoniae-karbapenemaser</b>

<b>MDR</b>	<b>Multidrug resistente</b>
<b>MGE</b>	<b>Mobile gen elementer</b>
<b>NORM-VET</b>	<b>NORM Veterinærinstituttet</b>
<b>NDM</b>	<b>New Delhi metallo-<math>\beta</math>-laktamase</b>
<b>OXA</b>	<b>Oxacillinace</b>
<b>PBP</b>	<b>Penicillin bindende proteiner</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsyre</b>
<b>rRNA</b>	<b>Ribosomal ribonukleinsyre</b>
<b>SHV</b>	<b>Sulhydryl-variabel <math>\beta</math>-laktamase</b>
<b>TEM</b>	<b>Temoineira betalaktamase</b>
<b>WHO</b>	<b>Worlds Health Organization</b>

## Innholdsfortegnelse

INNLEDNING .....	10
1. ANTIBIOTIKA .....	13
1.1 Historie .....	13
1.2 Typer av antibiotika .....	14
1.1.1 Beta-laktamer ( $\beta$ -laktamer).....	15
1.1.2 Sulfomider .....	16
1.1.3 Tetrasykliner .....	16
2.ANTIBIOTIKARESISTENS.....	17
2.1 Naturlig og ervervet resistens .....	19
2.2 Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistens. ....	19
2.3 Ulike mekanismer for genoverføring av genetiske elementer.....	24
2.4 Mobile genetiske elementer (MGE) .....	25
2.5 Antibiotika spredning globalt .....	27
3. METODISK TEORI .....	29
3.1 ESBL og CRE .....	29
3.2 Oppdyrking av selektive skåler.....	30
3.3 Genomisk DNA ekstrahering .....	31
3.4 Kvalifisering og kvalitetskontroll med Qubit 2.0 <sup>®</sup> og NanoDrop <sup>™</sup> .....	31
3.5 PCR «Polymerase Chain Reaction».....	31
3.5.1 16S rRNA.....	32
3.6 Gel- Agarose elektroforese.....	33
3.7 Sekvensering.....	33
3.8 MinION- nanopore sekvensering .....	35
3.9 Disk diffusjon/ Antimikrobiell sensitivitets test (AST) .....	37
4.MATERIALER OG METODER.....	38
4.1 Flytskjema fra henting av vannprøver til kvalitetsbestemmelse av DNA.....	38
4.2 Vannprøver innsamling .....	38
4.3 Oppdyrking av selektive skåler .....	41
4.3.1 ESBL og CRE .....	41
4.3.2 Oppdyrking av selektive skåler.....	41
4.3.3 Bakteriers nedfrysing – langtidsoppbevaring.....	42
4.4 Genomisk DNA ekstrahering .....	42
4.5 Kvalitetsbestemmelse og kvantifisering av DNA med Quabit og NanoD .....	42
4.6 Flytskjema for DNA undersøkelsen .....	43
4.7 PCR.....	43



4.7.1 16S rRNA PCR .....	44
4.7.2 Singleplex og multiplex.....	45
4.8 Agarose-gel elektroforese .....	48
4.9 Rensing av PCR produkt og 16S rRNA PCR .....	49
4.10 MinION- nanopore sekvensering.....	50
4.11 Disk diffusjon/ Antimikrobiell sensitivitets test (AST) .....	50
5. RESULTATER .....	52
5.1 Fenotypisk analyse av antibiotika resistente prøver av selektive skåler.....	52
5.2 Genomisk DNA ekstrahering .....	57
5.3 Kvantifisering og kvalitetsbestemmelse av DNA med Quabit og NanoDrop .....	57
5.4 Gel-Agarose kjøring av multi- og singleplex PCR.....	58
5.5 16S rRNA sekvensering.....	60
5.6 Helgenomsekvensresultater med MiSeq .....	61
5.7 ARMA resultater for antibiotikaresistens gener .....	64
5.8 Helgenomsekvenseringsresultater med MinION og MiSeq .....	65
5.9 Resultater av Disk diffujonstesting.....	67
6 DISKUSJON.....	69
6.1 Fenotypiske deteksjoner av resistenspåvisning.....	69
6.2 PCR og sekvensering.....	70
6.3 Sammenligning av 16S rRNA-resultatene.....	71
6.4 Antibiotikaresistens bekreftelse med MinION/ARMA/MiSeq .....	73
6.5 Antibiotika sensitivitetstesting.....	74
7 KONKLUSJON .....	75
8 KILDEHENVISNING .....	77
9 VEDLEGG.....	83
Vedlegg 1 .....	83
BLAST resultater fra 16S rRNA fra høst prøver.....	83
Vedlegg 2 .....	88
Vannprøver fra høst 2018 .....	88
Vedlegg 3 .....	94
Vannprøver fra vinter 2018.....	94
Vedlegg 4.....	99
Bilder av Disk diffusjons resultater.....	99
Vedlegg 5 .....	103
Resultater av annoterte genom ved ResFinder av vinterprøver prøve 2og 3 og fra høst prøve 16..	103
Vedlegg 6.....	104

Resultater fra helgenomsekvensering med Illumina MiSeq. .... 104

## INNLEDNING

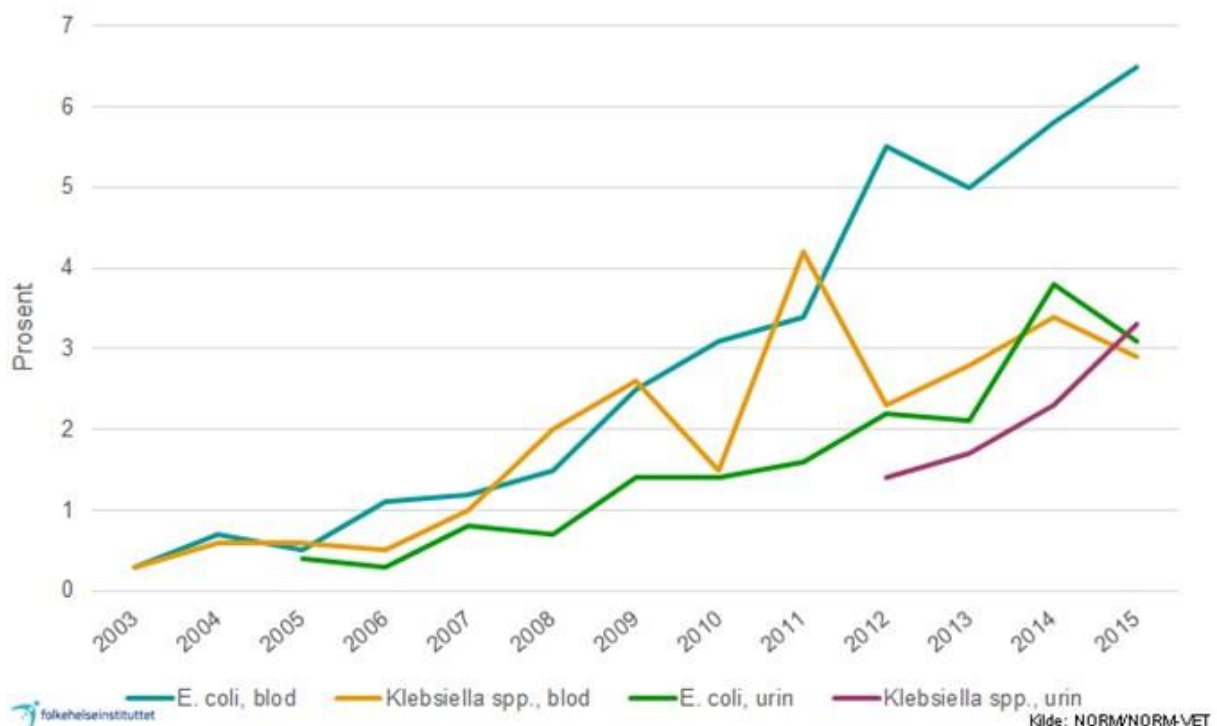
Bakteriene har utviklet seg over en periode på over 3,5 milliarder år og tilpasset seg de mest ekstreme livsbetingelser og dominerer i alle økosystemer. Det er beregnet at det finnes  $10^{32}$  bakterier på jorden og mennesket bærer ca. like mange bakterier som egne celler (PLoS Biol. 2016 Aug; 14(8): e1002533.) Bakterienes tilpasningsdyktighet er basert på flere forhold. De reproduserer seg raskt og mange bakteriearter har evnen til å dele seg hvert 20 – 30 minutt og kan i løpet av kort tid danne store mengder datterceller (Legeforen 2008; 128:2741–5).

Hensikten med den oppgaven var å detektere betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) i bakterier isolert fra vann miljøer ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder. Eventuelle positive resultater av antibiotikaresistente bakterier vil kunne bidra til økt kunnskap om bakterienes opprinnelse og hvordan de sprer seg i vannmiljøet.

Allerede i 1928 oppdaget Alexander Fleming det første genuine antibiotikum – penicillin. Det var som et eventyr i kampen mot infeksjonssykdommene som krevde de fleste menneskelig. Oppdagelsen av antibiotika er trolig en av medisins største suksesshistorier. Resistensutviklingen skjer nå i et raskere tempo enn antibiotikautviklingen, og da står vi ovenfor den største helsetrusselen i verden (Helse- og omsorgsdepartementet, 2015). I årene som fulgte ble stadig flere antibiotika oppdaget og modifisert. Kort tid etter at antibiotika først var tatt i bruk man hadde mer oppmerksom på problemet med resistensutvikling, og det var bakterietyper som tidligere kunne behandles effektivt med et antibiotikum som plutselig kunne motstå effekten. Det finnes bakterier som fra naturens side er utstyrt med resistens mot utvalgte antibiotika, men hovedproblemet er den store mengden bakterier med ervervet resistens. Det at resistensutvikling er stadig økende, mens utviklingen av nye antibiotika har sakkert av, gjør at resistensutvikling nå anerkjennes på et globalt plan som en trussel for bekjempelsen av livstruende infeksjoner (Kruse H, "Antimicrobial Resistance – Epidemiological Aspects", 1994, s.9 – 29). Hvis trusselen ikke tas alvorlig vil verden gå tilbake til de såkalte «dark ages», hvor selv den minste infeksjon eller operasjon kan bli dødelig (Davies & Davies, 2010).

Det finnes totalt seks antibiotikaresistente patogene mikroorganismer som betraktes som særlig helsefarlige: vankomycinresistente enterokokker (VRE), meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Aspergillus*-arter, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) og ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* (Slama 2008). De siste to nevnte er Gram-negative bakterier som i økende grad har utviklet antibiotikaresistens (Slama 2008). Grunnen er at disse bakteriene har en tendens å utvikle resistens mot flere typer antibiotika

(«multidrug» resistens, MDR) (ECDC/EMEA, 2009; Helse- og omsorgsdepartementet, 2015; Holmes et al., 2015; Iredell et al., 2016). Vi ser nå en rask fremvekst av antibiotikaresistente bakterier i verden (WHO, 2018), og dette vil kunne true de helsemessige forhold oppnådd gjennom bruken av antibiotika, spesielt gjelder dette spredning av multiresistente bakterier, hvor behandlings alternativer vil bli veldig begrenset. Ifølge WHO minst 700 000 mennesker dør hvert år som følge av sykdom som er motstandsdyktig mot medisiner. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC, slår fast at det i flere europeiske land fortsatt er en høy forekomst av antibiotikaresistente bakterier (EARS, 2018).

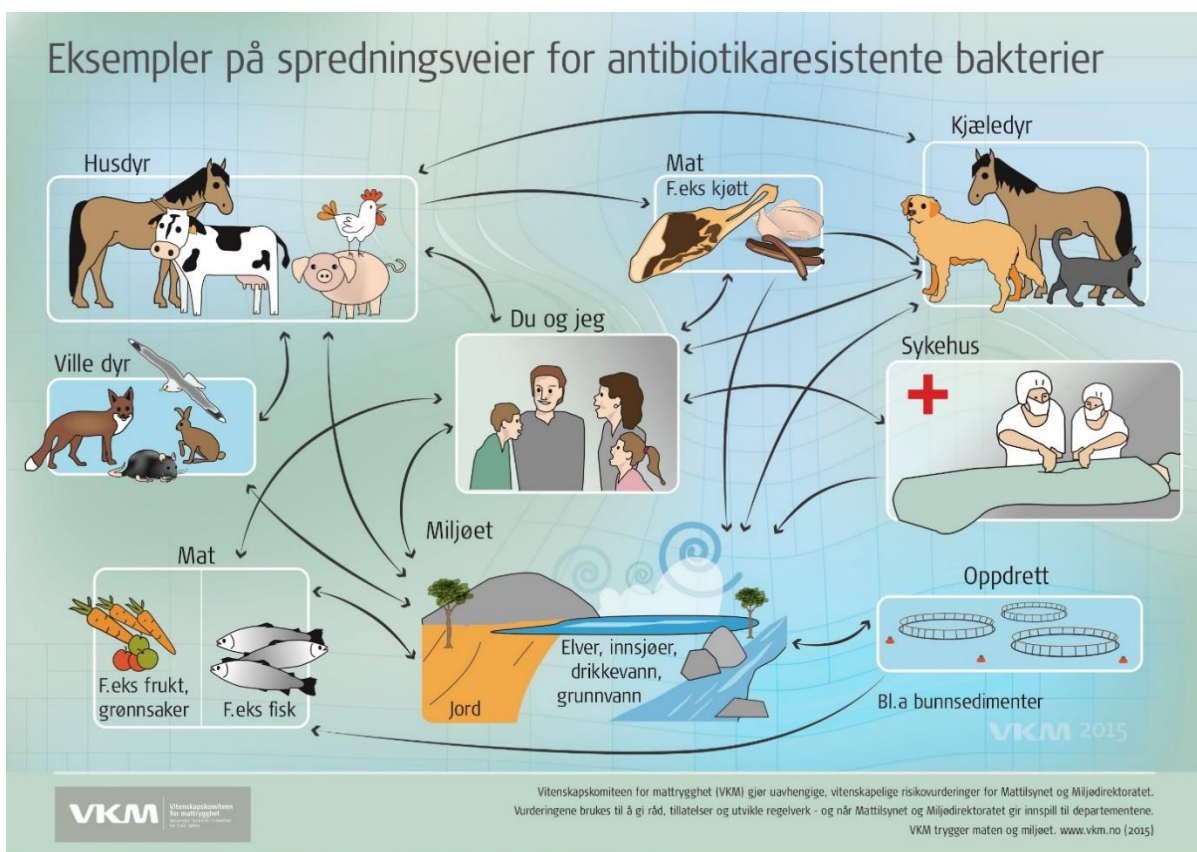


Figur 1: Andel ESBL-positive *E. coli* og *Klebsiella spp* i blod og urin (NORM/NORM-VET, 2016). Kilde: NORM/NORM-VET. (<https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/#utfordringer>)

En infeksjon som har oppstått på grunn av antibiotikaresistente bakterier er veldig utfordrende eller helt umulig å behandle, og kan gi alvorlige konsekvenser, i verste fall død (Folkehelseinstituttet, 2012).» Antibiotikaresistens er årsaken til 33 000 dødsfall hvert år i Europa» (Folkehelseinstituttet, 2018). Det er bakterier som produserer betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL) og blitt en stor global utfordring i dag (Folkehelseinstituttet, 2017). Et eksempel på en slik bakterie er multiresistente (MR) patogene *Escherichia coli* fra familien *Enterobacteriaceae* (Shaikh et al., 2015). Den kan bli forårsaket av infeksjoner på sykehus eller i samfunnet. ESBL kan hydrolysere og inaktivere betalaktamer, som penicilliner, cefalosporiner, og noen karbapenemer (Bush & Bradford, 2016; Statens legemiddelverk, 2012).

Betalaktamer er den mest brukte antibiotikagruppen på verdensbasis per i dag. Gener som koder for ESBL er ofte plassert sammen med resistensgener som koder for andre antibiotika. De sitter ofte på mobile genetiske elementer og kan ofte føre til motstandsdyktighet mot andre antibiotika, såkalt koseleksjon, og gi grunnlag for resistensspredning. Vann er en spesielt utsatt miljønisje, fordi antibiotika kan kontinuerlig komme i kontakt med ulike vannkilder (Waseem et al., 2017).

Når det gjelder utvikling og spredning av antibiotikaresistens, det er veldig viktig å se på det totale økosystemet i verden. I dag vi har fortsatt begrenset kunnskap om hvordan utvikling av resistens påvirkes av miljøet. Tidligere resultater av resistensutvikling var det antatt at primært gikk fra et menneskeskapt miljø til et naturlig miljø. Nyere studier av forskning viser imidlertid, at et naturlig miljø også kan bidra til resistensutvikling (National strategi mot ab res. 2010-2015). Flere resistensgener assosiert med humane sykdommer har sin opprinnelse i miljøet (Waseem, H. et al.2017).Figur 2 nedenfor viser veiene som er involvert i spredningen av resistens i miljøet.



Figur 2. Koblinger mellom ulike kilder for resistens. ( <https://www.antibiotika.no/om-resistens/> )

Når det gjelder resultater i Norge, viser det at strategiene mot antibiotikaresistens har vært vellykkede, både i husdyrholdet og i helsevesenet de siste årene. Når det gjelder antibiotika hos mennesker, er den totale antibiotika-bruken kontinuerlig redusert siden 2012. Bruken har gått ned med 24 prosent siden 2012. Også i 2018 fortsatte reduksjonen med 3 prosent sammenliknet med 2017 (Folkehelseinstitutt, 2019).

## 1. ANTIBIOTIKA

### 1.1 Historie

Antibiotika er et antimikrobielt middel som dreper eller inhiberer vekst av bakterier. Som legemiddel brukes antibiotika til behandling og forebygging av sykdom og smitte fra patogene bakterier (Kong et al. 2010).

Antibiotikaens historie begynner med forsker Alexander Fleming (1881-1955), en skotsk lege og biolog som jobbet ved et sykehus i London. Fleming var kjent som en fremragende forsker og jobbet med kroppens immunforsvar (Lönn-Stensrud, 2016). Forskeren var svært opptatt av å finne ut vaksinere mot sykdommer. Under første verdenskrig jobbet Fleming på forskjellige sykehus gjennom hele krigen, og dette hadde stor innflytelse på Flemings fremtidige forskning.

I 1928 kom Flemming tilbake til laboratoriet etter en ferie, og fant flere forurensede petriskåler. Skåler med bakterietypen *Staphylococci*, som han studerte, var blitt forurenset av muggsopp. Bakteriene vokste ikke i nærheten av denne uønskede gjesten. Fleming antok at mugg frigjør et stoff som hemmer bakterievekst. Senere vil medisinen bli kalt penicillin, etter muggsoppen *Penicillium notatum*. Slik begynte antibiotika-historien helt tilfeldig. Fleming sa til og med om denne overraskelsen: 28. september i 1928 hadde jeg egentlig ingen planer om å gjøre et medisinsk gjennombrudd etter å ha oppdaget det første antibiotikumet. Men det var det jeg gjorde. "Men penicillinrensing viste seg å være en vanskelig oppgave, og etter flere mislykkede forsøk, stoppet Fleming testene i 1940 (Aminov RI (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbio.* 1:134.: 10.3389/fmicb.2010.00134).

Men i 1941 ble penicillin for første gang benyttet i terapi med god effekt. Tre år senere oppdaget to amerikanske forskerne, Albert Schatz og Selman Waksman, antibiotikumet streptomycin fra bakterien *Streptomyces griseus*. Streptomycinet interfererer med proteinsyntesen i både Gram-negative og Gram-positive bakterier. Waksman definerte i 1942 antibiotika som «et stoff produsert av mikroorganismer som selv i lave konsentrasjoner dreper

eller hemmer vekst av andre mikroorganismer". Oppdagelsen av streptomycin var svært viktig på grunn av at det viste seg å være det første antibiotikumet som hadde god effekt på tuberkulose (Madsen, E.L. 2008). Samtidig som man lette etter nye antibiotikum, startet også utviklingen av nye, syntetisk fremstilte stoffer, såkalt kjemoterapeutika. De nye syntetiske stoffene hadde samme egenskap som antibiotika. I dag inkluderer definisjonen av antibiotika også antimikrobielle stoffer som industrien fremstiller hel- eller halvsyntetisk, og de klassifiseres etter bruk, ikke etter deres opprinnelse (Yazdankhan, S. et al 2013).

Etter antibiotikaens oppdagelse ble den kalt «det medisinske mirakelet», fordi det reddet tusenvis menneskets liv. Alvorlige sykdommer som lungebetennelse, tuberkulose, urinveisinfeksjoner, sepsis og hjernehinnebetennelse ble til infeksjoner det ikke lenger var grunn til å være bekymret for. Det var et revolusjonerende fremskritt innen human medisin som var tatt i bruk over 70 år siden. Uten effektive metoder for å hemme bakterielle infeksjoner ville mye av dagens behandling være svært risikabelt, og kunne skapt høy dødelighet som følge av bakterieinfeksjoner.

## 1.2 Typer av antibiotika

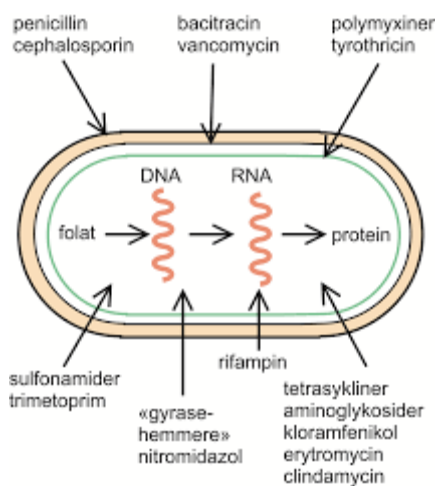
Siden penicillin ble oppdaget, har det blitt funnet flere ulike varianter av antibiotika. Utviklingen har imidlertid stagnert de siste 30-40 årene (Folkehelseinstituttet, 2016; Livermore et al., 2011; Ventola, 2015). Etter oppdagelsen av penicillin ble det utviklet andre typer antibiotikum som amoxicillin, ampisipil og benzylpenicillin som virker mot andre mikrober i behandling av ulike infeksjoner.

Antibiotika klassifiseres etter hvordan de virker på bakterien, og etter kjemisk struktur, for eksempel hvordan penicillin virker på bakteries cellevegg. Det er mange typer av antibiotikum, og disse kategoriseres som bakteriside eller bakteriostatiske agents, avhengighet av virkemåte. Bakteriside antibiotikum dreper bakteriene, og disse typene angriper vanligvis viktige cellestrukturer og aktiverer for eksempel biosyntesen av cellevegg eller DNA. Bakteriostatiske antibiotika hindrer vekst og reproduksjon av bakteriene uten at bakteriene drepes. Disse interfererer vanligvis med protein-syntesen i cellen, og på denne måten hemmes spredning av bakterieceller (Doyle, M.P. 2013).

Antibiotika har flere angrepspunkter på og i bakterier, og det kan gjennomføres på fem ulike måter: Inhibering av celleveggs oppbygning, forstyrrelse av funksjonen til cellemembranen, inhibering av proteinsyntesen, inhibering av produksjonen av nukleinsyrer (DNA og RNA) og

hemming av folsyreproduksjonen (Tronsmo, 2016). Inhibering skjer når deler av celleveggen oppbygning hemmes til peptidoglykansyntesen, og påvirker oppbyggingen av celleveggen. Dette fører til ødeleggelse av cellemembranen og celledød. Eksempel på antibiotika som hemmer syntese av celleveggen er betalaktamer, bacitracin og vancomycin. Translasjonen hemmes når antibiotika binder seg til ribosomer og ikke produserer proteiner, for eksempel enzymer. Antibiotika som inhiberer proteinsyntesen kan for eksempel være erytromyciner, kloramfenikol og tetrasykliner. Inhibering av nukleinsyresyntesen (transkripsjon og replikasjon) gjennomføres ved kinoloner og rifampin. Videre kan cellemembranens funksjon ved peptidantibiotikum og endrer membranpermeabiliteten. Denne funksjonen kan skje ved metabolismeveier som kan blokkere hemming av folsyreproduksjonen.

Figur 3 nedenfor viser oversikt av de ulike typer av antibiotikum.



Figur 3. Oversikt over ulike typer av antibiotikum på bakterier.

(<https://sml.snl.no/antibiotika>)

### 1.1.1 Beta-laktamer ( $\beta$ -laktamer)

Beta-laktam antibiotika er fellesbetegnelsen på den største og viktigste gruppe av antibiotika (<https://www.tannegetidende.no/i/2002/1/dntt-18045>). Beta-laktamer er et bredt spekter av antibiotika, hvorav den første som ble oppdaget var penicillin, som Alexander Fleming identifiserte i 1928. Alle  $\beta$ -laktam-antibiotika inneholder en  $\beta$ -laktam ring i strukturen (Holten & Onusko, 2000).  $\beta$ -laktam antibiotika av den største gruppe antimikrobielle midler som inkluderer penicillin, cefalosporin, cefamycin, monobaktam og karbapenem-antibiotika (Kong et al. 2010). Derfor er økt resistens mot  $\beta$ -laktam antibiotika er et stort problem i dag. De



fungerer ved å forstyrre syntesen av peptidoglykan, det er en viktig komponent i bakteriecellevegg, og brukes mest mot gram-positive og aerobe bakterier. Mer bredspektret  $\beta$ -laktamer som ampicillin og amoksisillin ble utviklet på 60- og 70- tallet (Yazdankhan, S. et al 2013).  $\beta$ -laktamer hemmer vekst og ødelegger følsomme bakterier ved å angripe deres cellevegg. Celleveggen til bakterier er bygd opp av peptidoglykan ved hjelp av penicilin-bindende proteiner (PBP) (Rawat & Nair 2010). Hemming påvirkes slik at celleveggen blir svak, og til slutt lyses cellene (Kapoor et al., 2017). Bakterier er ulike og har derfor ulikt PBP, og dette forklarer de ulike  $\beta$ -laktamers antibakterielle spektrum (Kohanski et al. 2010).

Karbapeneme-gruppen inneholder virkestoffet karbapenem i tillegg til  $\beta$ -laktamringen. Dette gjør denne gruppen ekstra stabile mot  $\beta$ -laktamaser, enzymene som bryter ned  $\beta$ -laktamer (Doyle, M.P. 2013).  $\beta$ -laktamene deles inn i fire klasser: cefalosporiner penicilliner, monobaktamer og karbapenemer. Disse klassene deles videre inn i ulike undergrupper basert på deres antimikrobielle aktivitet (Doyle, M.P. 2013).

#### 1.1.2 Sulfonamider

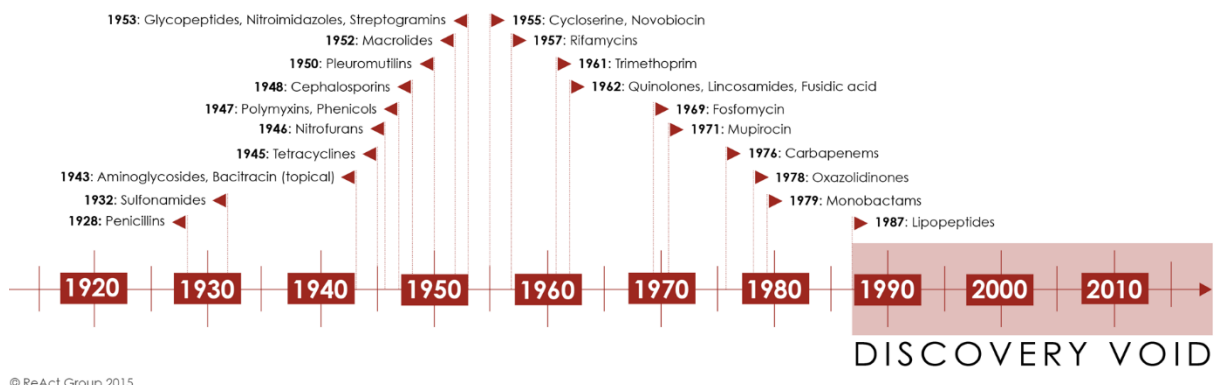
Sulfonamidene er beskrevet som det første moderne antibiotiske middel som ble mye benyttet på 30-tallet med stor suksess. I motsetning til andre antibiotika, påvirker det ikke bare bakterier, men også sopp og protozoer (spesielt toxoplasma). Disse antibiotikum type inneholder en svovelholdig organisk forbindelse (sulfonamid-gruppe), og virker ved å hemme bakterienes folsyresyntese som er en nødvendig faktor i dannelsen av bakterienes nukleinsyrer. Urosulfan (for urinveisinfeksjoner), sulfazin, sulfapyridazin, sulfadene. Ftalazol (for gastrointestinale infeksjoner). Disse stoffene brukes til å behandle ukompliserte infeksjoner. En kombinasjon av sulfonylurinstoffer - sulfametoksazol - trimetoprim (ellers kalt bactrim, biseptol) brukes til behandling av luftveis- og urinveisinfeksjoner (Snl.no)

#### 1.1.3 Tetrasykliner

Tetrasykliner er en bredspektret antibiotika-gruppe som virker bakteriehemmende ved å hemme bakteriens proteinsyntese (Snl.no). Bredspektret antibiotikum kalles det når det virker på flere ulike typer av bakterier. Antibiotika tilhørende denne gruppen kan angripe både aerobe og anaerobe og Gram-negative og Gram-positive bakterier. I denne gruppa finnes blant annet oxazolidinoner. Denne gruppen hemmer proteinsyntesen i bakterier ved å binde seg til

bakterienes ribosomer. Denne type antibiotikum er aktive mot både Gram-positive og Gram-negative bakterier, og lave kostnader ved produksjon gjør at tetrasykliner fortsatt benyttes i betydelig grad, spesielt i utviklingsland (Yazdankhan, S. et al 2013).

Antibiotikumens gullalder regnes fra slutten av 30-tallet og frem til midten på 60-tallet, og etter 1987 har det ikke blitt utviklet antibiotikum med nye virkningsmekanismer. Mesteparten av antibiotika som brukes per i dag tilhører ulike grupper som ble oppdaget før 70-tallet (Yazdankhan, S. et al 2013). Figur 4 nedenfor viser utviklingen av ulike typer antibiotikum gjennom perioden.



© ReAct Group 2015

Figur4: Tidslinje av utviklingen av ulike typer antibiotikum

(<https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/how-did-we-end-up-here/few-antibiotics-under-development/> ).

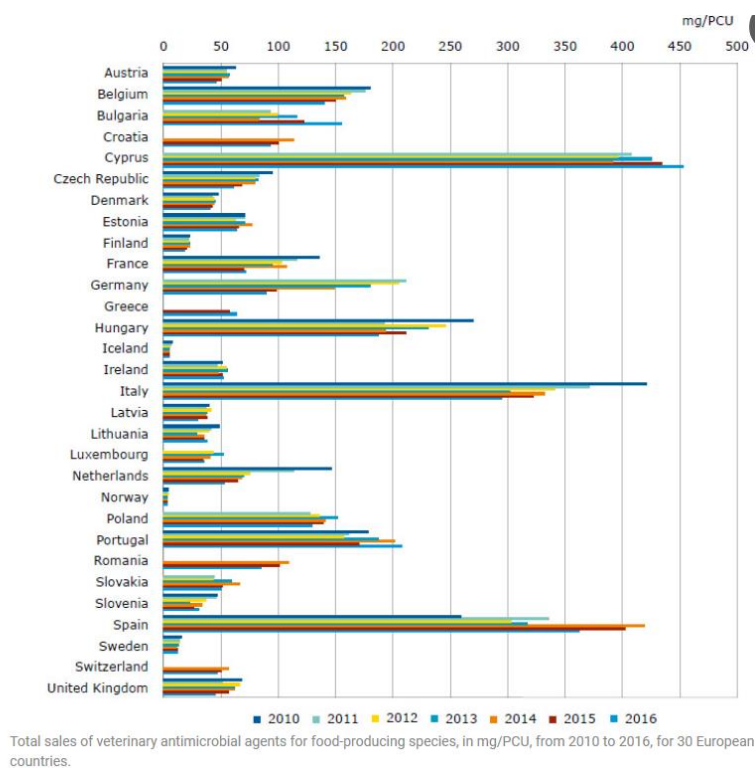
## 2.ANTIBIOTIKARESISTENS

Oppdagelsen av antibiotika er et mirakel som uten tvil har hatt stor betydning for å forbedre folkehelse og levealder. Det har reddet millioner liv i løpet av de siste 70 årene (Lönn-Stensrud, 2016), men nå vi begynner å kjenne på konsekvenser av feil forbruk av antibiotika. Bakterier endrer seg, slik at antibiotikum mister sin effekt for å drepe eller hemme bakterier og resulterer i resistens (Folkehelseinstituttet, 2018). Dette vil si at bakterier kan formere seg og leve videre, selv om de er utsatt for antibiotika, og slike bakteriene kalles antibiotikaresistente (AR). Verdens helseorganisasjon (WHO) har definert at AR er en av de største globale helseutfordringer. Denne konsekvensen advarte Fleming oss allerede om i sin Nobelpristale 11 desember 1945. Det kan være vanskelig å forstå at AR ikke er en sykdom, vi blir syke av bakterier, og når bakterier gjør oss syke i tillegg er resistente, gjør dette det veldig vanskelig, og noen ganger også helt umulig å behandle dem. Det er ikke bakterier vi skal være redde for,

men overbruk og feil dosering av antibiotika, som gjør bakterier resistente mot antibiotika. Det viktigste er at antibiotika kun skal brukes når det er helt nødvendig (Lönn-Stensrud, 2016).

Det mest skremmende skjedde da antibiotika gikk over fra å bli benyttet i terapeutisk behandling, profylaktisk sykdomsbekjempelse, til å bli benyttet for å promotere rask vekst av dyr ved storskala dyreproduksjon (Madsen, E. 2008). Forskning analyser viser direkte korrelasjon mellom bruken av antibiotika og fremvekst av bakterier som er resistente mot disse midlene (Chantziaras, I. et al 2014).

Figur nummer 5 nedenfor viser salg av veterinær forbruk av antibiotika til matproduserende land i Europa i følge rapport av ESVAC i 2018.



**Figur5: oversikt viser over salget av veterinær antibiotika til matproduserende dyr i Europa i 2016** ([https://www.pig333.com/latest\\_swine\\_news/esvac-2016-sales-of-antibiotics-for-use-in-food-producing-animals-dro\\_14219/](https://www.pig333.com/latest_swine_news/esvac-2016-sales-of-antibiotics-for-use-in-food-producing-animals-dro_14219/) )

Særlig viktig er det at antibiotikamengden skal gis riktig, men samtidig er det også viktig at dosen ikke er for lav, slik at antibiotikaen ikke blir effektiv. Dette gjøres ved å definere minste inhibitoriske konsentrasjonen – MIC. Dette er den laveste konsentrasjonen (gitt i mg/L) av et antibakterielt middel som trengs for å hemme bakteriell vekst (Iredell, J. et al. 2015). MIC brukes for å regne hvor mye antibiotika som skal gis. MIC-verdier for ulike stoffer er fastsatt av European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) og brukes som standard i europeiske land (Leclercq, R. et al. 2013).

## 2.1 Naturlig og ervervet resistens

Resistensutvikling er ikke et overaskende fenomen siden bakterier klarer å tilpasse seg og bli motstandsdyktig mot antibiotika. Når det gjelder antibiotikaresistens, skiller man mellom naturlig og ervervet resistens (Lönn-Stensrud, 2016). Ved naturlig resistens har bakterien en naturlig medfødt resistens ved at den mangler struktur eller egenskaper som kan angripes. Denne resistensen kan ikke overføres mellom bakterier, men går i arv, og kalles for vertikal genoverføring. Ervervet resistens kalles det når bakterien har motstandsdyktighet fra annen bakterie eller gjennom mutasjon som har gitt forandring i arvestoffet, såkalt horisontal genoverføring -HGT (Doyle, M.P. 2013).

Bakterier som har blitt behandlet med antibiotika vil erverve samme overlevelsesmekanisme mot det aktuelle antibiotikum, og slik vil antibiotika virke som et seleksjonsmiddel. Det finnes ulike måter bakterier som kan oppnå resistente mot andre typer antibiotikum. Resistensen bakterier kan kategoriseres ved genetiske og strukturelle endringer, eller temporære metabolske endringer.

## 2.2 Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistens.

Det finnes flere mekanismer for antibiotikaresistensutvikling, og de ulike mekanismene deles inn i fire grupper. Den første gruppen er endring eller erstatning av det aktive stoffets målsete. Mekanismen i den andre gruppen er redusert opptak av antibiotikumet. Den tredje gruppen har aktive efflux-pumper, og fjerde gruppen er mekanismene enzymatisk degradering av det aktive stoffet i antibiotikumet.

Bakterier kan kombinerer to eller flere resistensmekanismer. Endringen i antibiotikumets målmolekyl medfører at antibiotikumet ikke lenger kan binde seg til sete, og hemmer dermed effekten. Årsaken til modifisering og endringen av målsete kan skjer ved mutasjon av bakteriens genom eller av opptak av nye gener (Spratt, B.G. et al. 1999). Modifikasjoner kan ha effekt når en interaksjon mellom antibiotikum og målmolekyl er relativt spesifikk. Modifikasjoner kan det skjer når en mutasjon i PBP (Penicilinbindende proteiner) er årsaken til for eksempel en redusert affinitet til  $\beta$ -laktamer. Redusert opptak av antibiotikum kan skje hos noen Gram-negative bakterier hvor cellenes yttermembran inneholder hydrofile porer kalt poriner (Iredell et al. 2016). Bakterier som har beskyttelsesmekanismer, kan regulere mengde poriner og bruke dette som beskyttelse mot antibiotika. Denne mekanismen brukes for å hindre antibiotika, som for eksempel  $\beta$ -laktam antibiotika. For bakterier som lever i utfordrende miljø som for eksempel tilstedeværelse av toksiner og varierende osmotisk trykk, fører dette til tap av poriner og permeabiliteten blir derfor lavere enn for bakterier som bor i et stabil miljø (Iredell et al. 2016).

Efflux-pumper foreligger som proteiner i cellemembranen, og sørger for transport av forbindelser ut av cellen. Disse pumpene gjenkjenner kjemisk og strukturelt ikke relaterte forbindelser, og bakterier kan samtidig oppnå resistens mot forskjellige antimikrobielle forbindelser. Dette er blitt betegnet som multiresistens (MDR), og er et økende problem hos både Gram-negative og Gram-positive bakterier. På grunn av forskjellen i membranstrukturen i Gram-positive og Gram-negative bakterier, gjør dette at effluks-systemene har ulik oppbygning (Webber, M.A: et al. 2003). Slike resistenspumper kan gi passende resistensrespons under forskjellige miljøforhold, og derfor spiller dette systemet for aktiv utpumping av antibiotikum en veldig viktig rolle ved ervervet multiresistens. Pumpesystemene som er kapable til å transportere antibiotika ut av celler er ofte koblet sammen med andre resistensmekanismer (Fernandez, L. et al. 2012). Det kan være at uspesifikke pumper har økt betydning for resistensmekanisme, men spesielt gjelder dette i kliniske miljø. Det kan være at ulike typer antibiotika blir fremstilt for å overvinne spesifikke resistensmekanismer (Heir, E. et al. 2001).

Antibiotika kan bli inaktivert ved enzymatisk degradering som enten bryter ned eller modifiserer antibiotikum, og på denne måten oppnår bakterien det viktigste våpenet i kampen mot antibiotika (AR). Dette fører videre til at enzymatisk degradering finner sted hos bakterier som produserer hydrolytiske enzymer som for eksempel betalaktamaser. I dag er det identifisert rundt tusen betalaktamaser (Munita & Arias, 2016). Graden av resistens avhenger av både mengde enzym som dannes og substratspesifisitet. Det nevnes kun aktuelle enzymer i denne oppgaven.

Betalaktamaser er fellesbetegnelse på enzymer som er produsert av bakterier som kan gi multiresistent mot betalaktamer, og disse deles i fire viktig grupper som: penicilliner, kefamyciner, kefalosporiner og karbapenemer (Trude, H. et.,2002). Betalaktamaseaktivitet var første gang nevnt i 1940 av Abraham og Chain i Nature: "An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin". Det ble beskrevet at bakterieekstrakter fra *Escherichia coli* (*E. coli*) kunne inaktivere aktiviteten til penicillin, og at *E. coli* er har naturlig iboende betalaktamase (Trude,H. et.,2002)).

Betalaktamasene gir antibiotikaresistens ved å bryte ned antibiotika-strukturen. Dette gjøres ved å hydrolysere betalaktamringen. De utgjør en stor gruppe av enzymer som produseres både i Gram-positive og Gram-negative bakterier. Betalaktamaser kategoriseres etter virkningsmekanismen og av den strukturell oppbygning til enzymene. Betalaktamaser kan

være både smalspektrede eller bredspektrede. Betalaktamasene som er bredspektret mot betalaktamantibiotika kalles for ESBL

(<https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>)

ESBL er forkortelse for ”Extended Spectrum BetaLactamase” – enzymer som bryter ned betalaktam-antibiotika (pencilliner, cefalosporinmonobactamer og karbapenemer),( [fhi.no](http://fhi.no)). Deklassifiseres i ulike grupper, og i denne oppgaven blir ESBL’ene klassifisert etter Giske metoden (Giske, C. et al. 2009). ESBL deles i tre hovedgrupper: ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> and ESBL<sub>CARBA</sub> (Giske et al. 2009). ESBL-gruppen består av forskjellige varianter av betalaktamaser, og de har forskjellige virkemotoder mot betalaktamantibiotika.

ESBL<sub>A</sub> er mest kjent ved at de hydrolyserer penicilliner og cefalosporin. De hemmes av betalaktamaseinhibitorer som klavulansyre (Giske et al. 2009). ESBL<sub>A</sub> ble første gang nevnt på 80-tallet, og skyldes hyppig bruk i medisinsk behandling, og at enzymene var tilpasningsdyktige (Gniadkowski, 2008). De fleste av de smalspektrede betalaktamasene var mutanter, som for eksempel TEM-1, TEM-2 og SHV-1. Disse kunne bryte ned cefalosporin tillegg til penicillin. I 1982 ble det i Tyskland funnet det første ESBL<sub>A</sub> enzym som kunne hydrolysere cefalosporinene, dette var SHV-2. Dette er en stor gruppe hvor vi finner flere enzymer som CTX-M, TEM og SHV.

I 1965 ble betalaktamaser for første gang beskrevet. En betalaktamase ble isolert fra en gresk pasient, og derfor ble den oppkalt etter ham TEM-1 (fra Temoniera). I dag finnes det beskrevet over 900 ESBL varianter, og over 200 TEM varianter. CTX-M er den største gruppen av ESBL, og det første enzymet ble isolert i 1989 i München. Denne type enzym hydrolyserer cefotaxime, og fikk derfor navnet CTX-M (Iredell, J. et al. 2015). Det finnes over 123 CTX-M varianter (Canton, R. et al. 2012). Disse er delt i fem grupper basert på aminosyrehomologi, som CTX-M gruppe 1, 2, 8, 9 og 25 (Shaikh et al. 2015). CTX-M er en viktig gruppe som består av enzymer som har ulik aminosyresammensetning og forskjellig hydrolytisk aktivitet (Cantón et al. 2012). Denne undergruppa hadde stor suksess med tanke på ervervet antibiotikaresistens, som igjen hadde påvirkning på spredningen av bakterier globalt. CTX-M er den mest utbredte ESBL-varianten per i dag (Rawat & Nair 2010).

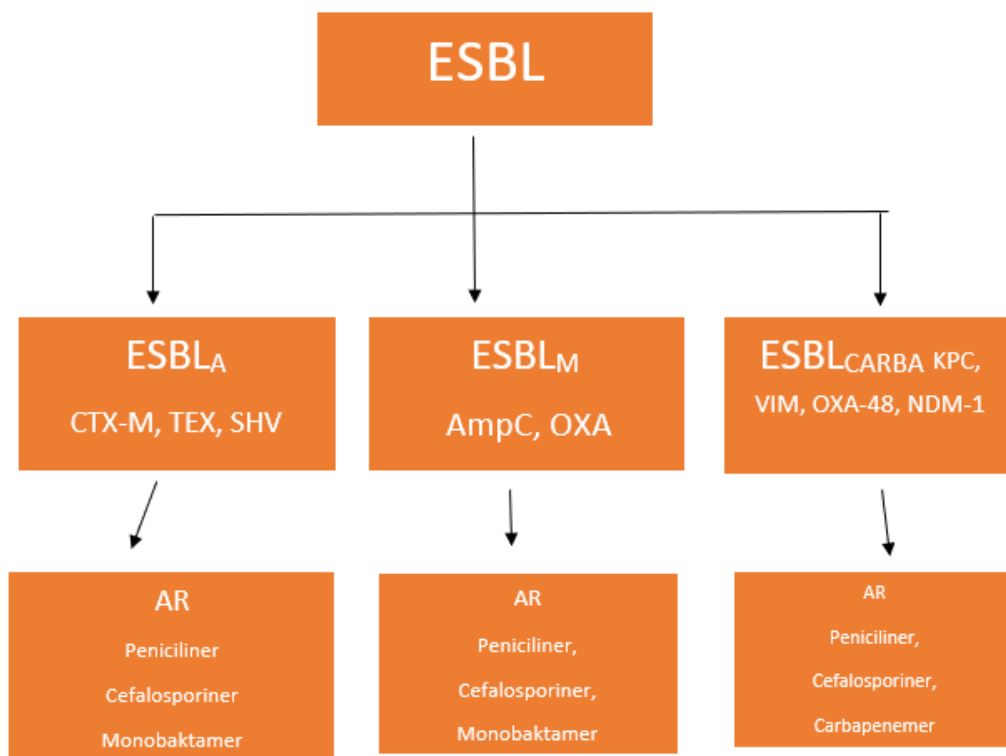
I ESBL<sub>M</sub> klassen (M for miscellaneous) finnes plasmid-mediert AmpC og OXA-ESBL. Denne gruppen deles i ESBL<sub>C</sub> med AmpC, og ESBL<sub>D</sub> med OXA-ESBL. Enzymer -OXA som tilhører ESBL<sub>M</sub> er sjeldne, mens AmpC-betalaktamaser er naturlig iboende i kromosomet hos mange

ulike bakteriesorter, som for eksempel *E.coli*, *Enterobacter* spp (Tidskr. Nor. Legeforen. 2008:128:2741-2745). ESBL<sub>M</sub> ble første gang kjent i 1989 ved identifisering av CMY-betalaktamasen i et *K. pneumoniae*-isolat i Sør-Korea.

Det er identifisert ni ulike familier av plasmidmedierte AmpC-betalaktamaser hos *Enterobacteriace* (CMY, FOX, MIR, MOX, DHA, LAT, BIL, ACT og ACC) og i hver familie kan det være flere varianter. Plasmidmedierte AmpC-betalaktamasene er nært beslektet med AmpC-betalaktamasene. CMY er den plasmidmedierte AmpC-betalaktamasen som har størst global spredning. ESBL<sub>M</sub>-betalaktamaser er aktive mot penicilliner og er utvidet-spektrum cefalosporinaser, med økt aktivitet mot cefalosporiner. ESBL<sub>M</sub>-betalaktamaser har lav aktivitet mot monobaktamer og bryter ikke ned karbapenemer ((Trude, H. et.,2002).

ESBL<sub>CARBA</sub> gruppen inneholder bakterier som er resistente mot alle betalaktamantibiotika, inkludert penicillin, cefalosporin og karbapenemer. Gener som koder for disse enzymene finnes ofte på mobile genetiske elementer som plasmider og transposoner, og overføres derfor enkelt til andre bakterier. Karbapenemasene er forbundet med resistensgener mot andre viktige antibiotikum, og infeksjoner forårsaket av Karbapenem-Resistente *Enterobacteriaceae* (CRE) har blitt en global utfordring (Codjoe, F. et al 2018). ESBL<sub>CARBA</sub> klassen deles i tre undergrupper: ESBL<sub>CARBA-A</sub>, ESBL<sub>CARBA-B</sub> og ESBL<sub>CARBA-D</sub>. Forekomsten og spredning av karbapenemaser er et stort, globalt helseproblem, og gjør at bakterier er veldig resistente (Codjoe, F. et al 2018). ESBL bakterier er også ofte resistente mot flere antibiotikaklasser, slik som fluorokinoloner og aminoglykosider. Gram-negative bakterier også kan være resistente mot polymyxiner som kolistin. For ESBL<sub>CARBA</sub> bakterier som i tillegg er resistente mot kolistin, er konsekvensene at det er få eller ikke noe antibiotikum som kan virker mot disse bakteriene.

Figur 6 nedenfor viser en forenklet oversikt over de ulike ESBL-klassene, og med de ulike antibiotikum gruppene de er resistente mot, antibiotikaresistente (AR).

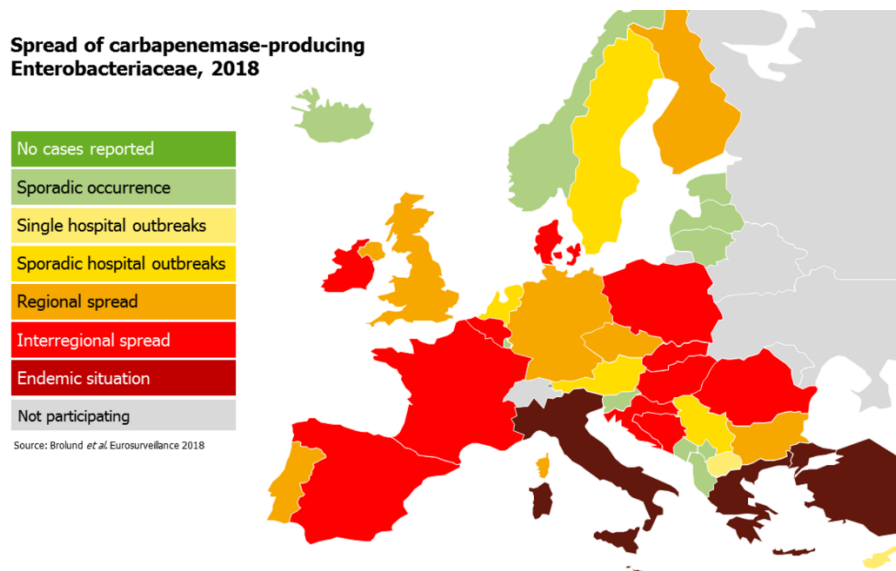


**Figur6: Oversikt over de ulike ESBL gruppene og AR-resistens til hver av gruppene (Giske et al.2009).**

Karbapenemaser som metallo-betalaktamaser (MBL) og *Klebsiella pneumoniae* carbapenemaser (KPC) er de mest bredspektrede betalaktamasene. Karbapenemasene deles i to undergrupper; metallo- $\beta$ -laktamaser og serinkarbapenemaser. Til serinkarbapenemaser hører ikke-metalloenzymene KPC (som inhiberes av borsyre) og OXA-48. Til metallo- $\beta$ -laktamasene hører NDM-1, VIM og IMP som inhiberes av EDTA (MacGowan & Macnaughton, 2017). Det har blitt en stor utfordring med karbapenemaser som finnes sammen med andre antibiotika-resistensenzymmer, for eksempel aminoglykosidmodifiserende enzymer, som gjør vanskelig å behandle pasienter bakterielle infeksjoner (MacGowan & Macnaughton, 2017). Det har vist seg at karbapenemasene har en tendens til å utvikle multi-drug-resistance (MDR) i hurtig tempo (Ventola, 2015). Et eksempel på spredningen er New Delhi-metallo-betalaktamase (NDM-1) i *E. coli* (Shaikh et al., 2015). NDM-1 ble første gang registrert hos en svensk pasient i 2008 som var innlagt på et sykehus i India (Nordmann et al., 2011), og siden 2010 har NDM-1 i *E. coli* og *K. pneumoniae* blitt registrert i store deler av verden (Munita & Arias, 2016). Dette viser at NDM-1 har blitt ekstra farlig, og ofte finnes sammen med andre ARG, og må derfor behandles med kolistin, tigesyklin eller fosfomycin (Nordmann et al., 2012). NDM-1 har spredt seg ekstremt raskt, og er påvist i Pakistan, Storbritannia og Australia. Dette gitt grunn for stor bekymring (Bajaj et al. 2016).



CRE bakterier hører til familien *Enterobacteriaceae* og har antibiotika mekanismer som bryte ned karbapenem, men CPO er bakterier fra *Enterobacteriaceae* og inkluderer andre familier, og disse produserer enzymer som kan bryte ned karbapenem antibiotika (BCCDS, 2014). CPE bakterier finnes også i *Enterobacteriaceae* familien og produserer karbapenemaser (Folkehelseinstituttet, 2012). De siste årene har man blitt mer bekymret for spredning av karbapenemaser på grunn av økt resistens, og konsekvenser verdenssamfunnet da vil stå ovenfor. Norge har et overvåkingsprogram kalt MSIS, og hit meldes infeksjonstilfeller som ESBL<sub>KARBA</sub> og gjennom dette systemet forventes utviklingen av antibiotikaresistens å reduseres (Astrup et al., 2014). Situasjonen utenfor Norge er mye verre. Figur 7 nedenfor viser karbapenemase-resistens i Europa i 2018.



**Figur7:Oversikt over karbapenemase-resistens i Europa i 2018.(Kilde: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-work/disease-and-laboratory-networks/EURGen-net>)**

### 2.3 Ulike mekanismer for genoverføring av genetiske elementer.

Horisontal genoverføring (HGT) skjer ved overføring av genmateriale fra en organisme til en annen, og HGT skjer ved tre mekanismer: konjugasjon, transduksjon og transformasjon (Kyndt T, Quispe D et al.,2015). Bakterienes evne til å spre sin egen deoksyribonukleinsyre (DNA) er en av årsakene til at de dominerer i flere økosystemer (Sykes, 2010).

#### **Konjugasjon**

Konjugasjon betyr for «å feste sammen» to bakterier som ligger nær hverandre og overfører genetiske materiale med hverandre (Kyndt T, Quispe D et al.,2015). Dette skjer når små stykker

av plasmider eller kromosomer overføres via en konjugasjonsbro. Den ene bakterie blir DNA-donor og den andre blir mottaker, DNA-akseptor. Bakterier kan danne sex-pili som kan føre til at bakterier fester seg til hverandre (Kyndt T, Quispe D et al.,2015). Det er mulig at konjugasjon kan føre spredning av resistens mellom et vidt spekter av arter og bakterieslekter (Wellington et al., 2013).

### **Transduksjon**

Transduksjon er når genoverføring fra en bakterie til andre bakterie skjer via en bakteriofag. Bakteriofag kan overføre genetisk materiale fra den bakterien hvor fag var produsert til den andre bakterien, som bli infisert av fagen. Bakteriofager kan ta med seg deler av bakteriens kromosom over i den bakterien som har blitt infisert, og overføre disse genene til bakterien (Kyndt T, Quispe D et al.,2015).

### **Transformasjon**

Den tredje mekanismer for HGT er transformasjon, og skjer ved opptak av fritt kromosomalt DNA fra omgivelsene, som kan være fra en organisme til en annen. Transformasjon av bakterieceller skjer ved at de absorberer og inkorporerer det genetiske materiale fritt fra andre bakterier, enten som DNA-fragment eller som plasmid-DNA (Kyndt T, Quispe D et 2015).

Den viktigste mekanisme av alle de tre former for horisontal genoverføring med hensyn på spredning av antibiotikaresistens, er konjugasjon (Norman, A. et al 2009). Dette skyldes at transformasjon krever homologi mellom DNA i donor og resipient, og samtidig brytes fritt DNA raskt ned i miljøet. Transformasjon kan finne sted mellom bakterier som kan være nært beslektet. Bakteriofager som er involvert ved transduksjon, krever høy vertsspesifisitet, og som konsekvens er dette med på å hindre resistensspredning i miljøet. Konjugasjon regnes derfor som den viktigste mekanisme for spredning i og med at DNA kan overføres til et bredt spekter av bakteriearter, og antibiotikaresistente gener kan bli plassert på konjugative genetiske elementer (Norman, A. et al 2009).

## **2.4 Mobile genetiske elementer (MGE)**

Mobile genetiske elementer, MGE, deles i følge av MacGowan og Macnaughton (2017) i to hovedgrupper. I den første gruppe finnes plasmider, og til den andre gruppen hører transposoner og integroner. Den viktigste forskjellen er at plasmider forflytte seg fra en celle til annen, mens

hos transposoner og integroner forflytter de genetiske elementene seg fra et genetisk område til et annet inni samme celle. MGE inneholder resistensgener, men de inneholder ikke egenskaper som er essensielle for cellens livssyklus, dette fordi disse komponentene lett kan mistes (Wellington et al., 2013).

### **Plasmider**

Plasmider er små, sirkulære, dobbeltrådede, superkveilede DNA-molekyler som finnes i cellens cytoplasma. Plasmider defineres som ekstrakromosomale genetiske elementer som kan replikeres uavhengig av bakteriens kromosom (Bennett, P.M. 2008). Antallet plasmider i en celle kan variere fra mellom 1 og 30. Plasmider inneholder ofte gener som koder for resistens mot antibiotika. (Harvey & Ferrier, 2011). Hovedprinsippet til plasmider er i naturen å involvere i konjugasjon, som er mekanisme for horisontal genoverføring, HGT. Selv om plasmider er til stede i bakterier, er de ikke nødvendige for overlevelse av bakterier under normale forhold. Plasmid kan inneholder resistensgener (r-plasmid), og flere plasmider har mer enn ett resistensgen (Thougaard et al., 2009). Enkelte plasmider kan kun overføres til en bestemt celle, mens andre plasmider kan overføres til flere celletyper (Wellington et al., 2013).

### **Transposoner**

Transposoner er en stykke av DNA som kan forflytte seg fra ett sted til annen på genomet. Denne forflytningen kalles for transposisjon. Transposoner har repeterende DNA sekvenser på hver ende av segmentet for å gjøre forflytningen enklere. I tillegg inneholder transposoner et gen for enzymet transposase, og dette enzymet katalyserer prosessen (Hill, K.L. et al 2001). Transposisjon skjer på to ulike måter. Den ene måten er når transposoner forflytter seg etter «cut-and- paste» prinsippet (Madigan et al., 2015). Den andre måten er når transposoner replikeres på stedet, og det settes en kopi rett inn på genomet. Dette kalles for replikative transposoner (Willey, J.M. et al 2009). På bakgrunn av at transposoner har evnen til å hoppe fra kromosomalt DNA til plasmidets DNA og tilbake, har transposoner derfor ofte en sentral rolle i utviklingen av «multi drug resistanse»-MDR. Transposoner kan føre til mutasjon som igjen kan forårsake utvikling av resistens (Sykes, 2010). Transposoner overføres gjennom konjugasjon, transformasjon eller transduksjon.

### **Integroner**

Integroner er mobile genetiske elementer som kan overføres med plasmider og transposoner. Det mest utbredte integronet er klasse 1 integron som består av to konserverte segmenter; 5'-

og 3' konservert segment, og mellom dem et variabelt område der såkalte genkassetter er lokalisert. Genkassetter er gener som integroner kan uttrykke. Det konservative 5' segmentet ovenfor for det variable området inneholder et integrasegen, *intI*, som er vist å katalysere setespesifikk rekombinasjon (Recchia 1995;). Genkassetene er små mobile strukturer på rundt 250-1500 basepar. De inneholder ofte gener for antibiotikaresistens. Mange ulike genkassetter er blitt beskrevet (Sune, 2001). Det kan settes flere genkassetter inn i et integron, og det er funnet integroner med opptil ni antibiotikaresistente gener i vannmiljøer (Zhang et al., 2009). I og med at flere genkassetter kan innpasses i integron, er dette særlig viktige med hensyn på spredning av resistensgener. Integroner er vidt utbredt og særlig spesielt i Gram-negative bakterier (Stalder, T. et al 2012).

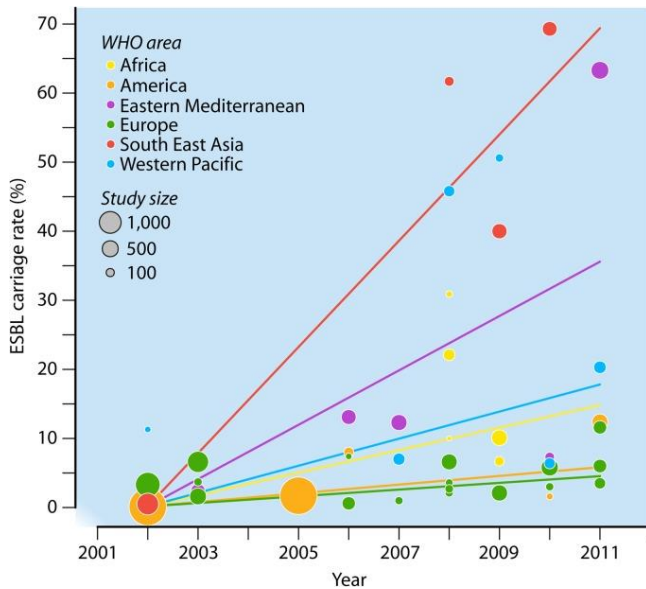
## 2.5 Antibiotika spredning globalt

Antibiotikaresistens (AR) er et svært alvorlig problem både i Norge og i resten av verden. Som vi vet, finnes bakterier overalt i miljøet. Både i vann, jordsmonn, planter, matvarer, hos dyr og hos mennesker. Drikkevann og matvarer kan lett forurenses av bakterier som igjen kan etableres i tarmflora hos mennesker eller dyr. AR er et naturlig fenomen hos bakterier og finnes i ulike grader i alle økologiske nisjene. I de siste årene har det skjedd en stor økning i forekomst av AR-mikrober i nær sagt alle miljøet. Feilaktig bruk av antibiotika er en av de viktigste årsakene til denne utviklingen. Bakterier transporteres med dyr, planter, mennesker og varer. Dette inkluderer også resistente bakterie av ulike varianter, og dette bidrar til spredning av antibiotikaresistens. Den største, og en av de viktigste bakteriereservoar i denne sammenheng, finnes i tarmen hos mennesker og dyr. Eksempelvis vil det per gram avføring fra mennesker og dyr være mer enn 1000 milliarder bakterier (*Escherichia coli* og *Klebsiella*), bakterier det regnes som er hyppige bærere av gener som kan påvirke bakterier til å bli resistente mot ulike typer antibiotika.

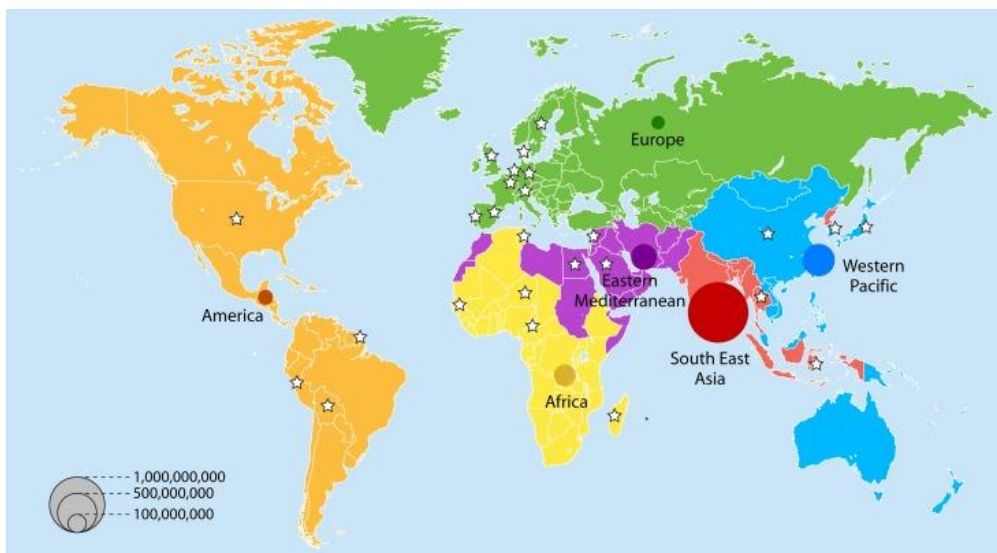
Ifølge Folkehelseinstituttet har vi i Norge foreløpig en gunstig situasjon når det gjelder antibiotikaresistens, men forskning viser at problemene med antibiotikaresistens ofte er knyttet til viktige bakteriearter som penicillinresistens hos *Streptococcus pneumoniae*, meticillinresistens hos gule stafylokokker (MRSA), resistens mot bredspektrede betalaktamer (ESBL), aminoglykosider og fluorokinoloner hos *Enterobacteriaceae*.

De siste årene utviklingen av antibiotikaresistens blitt bekymringsfull hos enterobakterier, dette ifølge en publisert oversiktsartikkel i 2013 (Woerther et al., 2013). Denne artikkelen viser at det i enkelte studier i Asia finnes ESBL positive *E. coli* i tarmflora hos 30-70% av personene

som ble undersøkt. Ifølge artikkelen, er det tilsvarende tallet i Europa på mellom 5 og 10%. For personer som har besøkt Midtøsten eller sørøst i Asia, finner man ofte at 30-50% er friske bærere ved hjemkomst (Jorgensen et al., 2014; Ostholm-Balkhed et al., 2013; Tham et al., 2013). Figur 8 nedenfor viser oversikt over utviklingen av ESBL-positive *E. coli* i 6 WHO regioner fra 2002 til 2011.



**Figur 8:** Oversikt over prosentvis utvikling av ESBL-positive *E. coli* i 6 WHO-regioner fra 2002 til 2011 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811232/>).

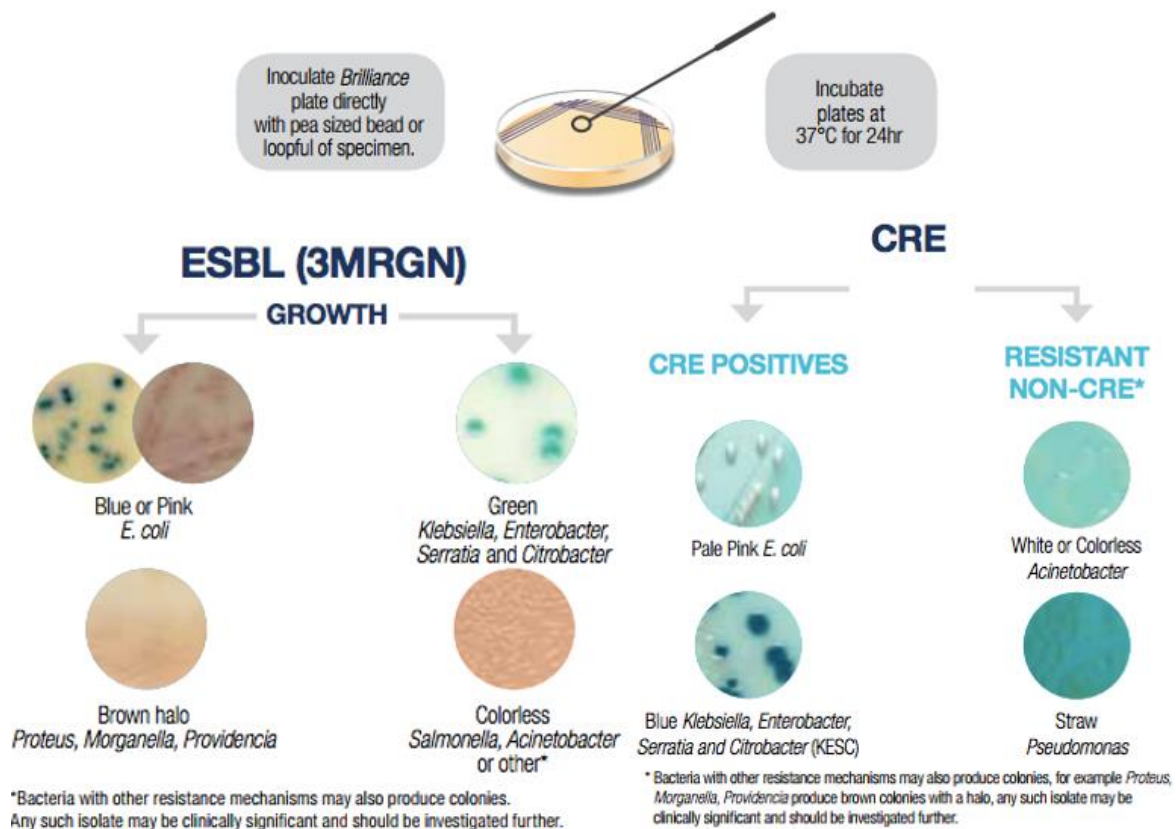


**Figur9:** Oversikt over hvor mange ESBL bærere i verdens-samfunnet i 2010 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811232/>).

### 3. METODISK TEORI

#### 3.1 ESBL og CRE

De innhentede vannprøvene fra høst 2018 og vinter 2018 ble benyttet for å detektere om det fantes ESBL- eller CRE-fenotypisk antibiotikaresistente bakterier. Screening for ESBL-produserende og Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* ble undersøkt ved å benytte selektive og kromogene medier. Brilliance™ ESBL inneholder cefpodxime som blokkerer de fleste non-ESBL *Enterobacteriaceae* og hindrer vekst av AmpC og andre ESBL organismer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Brilliance™ CRE inneholder ertapenem, meropenem, imipenem og doripenem (Thermo Fisher Scientific). I disse medier er det tilsatt antibiotika for seleksjon, samt et kromogent stoff for artsidentifikasjon. I denne oppgaven ble det benyttet agarskåler med Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE Agar og såkalt «bi-plater» (Thermo Scientific Inc.) Oppvekst av bakteriekulturer på skålene ble sammenlignet og bedømt etter protokollen «Quick and easy ESBL and CRE screening» (Thermo Fisher Scientific Inc.) Resultatene ble registrert basert på avlesning av skålene mot denne protokollen. Ved å tolke resultatene ifølge protokollen, vil for eksempel på ESBL skålene *E. coli* utrykke glukuronidase og galaktosidase og det dannes blå kolonier. Rosa kolonier blir resultatet av negative galaktosidase *E. coli* og bakterier fra KESC gruppen ville gi grønne kolonier (Thermo Fisher Scientist). På CRE skålene vil for eksempel *E. coli* danne lyserosa kolonier, mens bakterier fra KESC vil danne blå kolonier (Thermo Fisher Science). Lysebrune kolonier med ring kan indikere vekst av *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, eller av *Proteus spp.*, men rose og hvite kolonier kan være *Salmonella spp.*, eller *Acinetobacter spp.* (Thermo Fisher Scientisc). Resultatene av bi-plater prøver ble bestemt etter fargescreening av Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE Agar og oversikt gitt i figur 10.



**Figur 10: oversikt over fargescreening av ESBL/CRE bi-platene.**

### 3.2 Oppdyrking av selektive skåler

Prøver blir overført til agarskåler og inkuberes i inkubatorskap ved 37°C i ett døgn. Dersom noen av bi-platene ikke får bakterievekst, så kan disse inkuberes i ett døgn til eller lengre, dette i følge protokollen. Dersom det blir gjort funn av enkelte kolonier som vokser opp på skålene, så strykes disse ut på nytt, og positive resultater dyrkes opp i flytende Brain Heart Infusion (BHI) medium. Dette er viktig for å oppdage antibiotikaresistente bakterier. Eventuelt kolonier som vokser på skåler etter andre gangs utstrykning overføres til reagensrør som inneholder BHI medium, og disse prøvene inkuberes i 48 timer ved 37°C, dette etter produsentens protokoll. Eventuelt god vekst av bakteriekultur vises ved at mediet blir blakket. Da vil geomisk DNA kunne isoleres fra disse prøvene og undersøkes videre for analyser for eventuelt funn av resistensgener hos disse kolonier.

### 3.3 Genomisk DNA ekstrahering

Genomisk DNA ekstrahering gjøres i denne oppgaven ved bruk av GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). Bakteriece llene frigjør DNA ved bruk av kjemisk lysering. Lysisbufferen inneholder detergenten sodium dodecyl sulphate (SDS) og lysozym. SDS bidrar til at cellemembranene løses opp, og lysozym brukes da det er effektivt for lysering av bakterienes cellevegg - peptidoglykan. Proteinase K ble tilsatt for å bryte ned mulige nukleaser.

### 3.4 Kvalifisering og kvalitetskontroll med Qubit 2.0® og NanoDrop™

Qubit 2.0® analysen og NanoDrop™ Fluorometer (Thermo Fischer Scientific) benyttes for å undersøke DNA renhet og konsentrasjon før det gjøres sekvensering på MinION. Qubit® fluorometer brukes for å bestemme konsentrasjonen av prøven, mens NanoDrop™ Fluorometer benyttes for å bestemme prøvens renhet. UV målingene fokuserer på nukleotidenes evne for å absorbere lys i UV delen av lysspekteret. Maksimum absorpsjon verdi for DNA er ved 260 nm. Stor mengden av lys viser mere mengde av DNA i prøven. For å oppnå gode sekvenseringsresultater bør konsentrasjonen ligge mellom 20-80 ng/ml i bakterieprøver (Thermo Fischer Scientific).

DNA renheten bestemmes av absorbasjonsrate som er mellom 260 nm og 280 nm (A260/A280). God resultatene indikeres av prøven mellom 1,8 -2 (Thermo Fischer Scientific) verdier som betraktes at DNA er rent. Lavere verdier viser at proteiner eller andre kontaminanter er til stede som absorbering var nok sterk med rundt 280 nm. Verdier basert på 260 og 230 nm viser renhet til nukleinsyre.

### 3.5 PCR «Polymerase Chain Reaction»

PCR står for «Polymerase Chain Reaction» og er metode for å oppformere en bestemt DNA-sekvens som for eksempel et gen. PCR gjennomføres i tre trinn som denaturering (ca.95°C), hybridisering (ca. 40-70°C) og elongering (ca.72°C) (Nils O.,Sjøberg, 2013). Generelt til PCR trengs reaksjonsblanding bestående av: templat DNA, to primere, DNA polymerase (taq-enzym) og byggesteinene dNTP (N=A, T, G, C). DNA-polymerase benytter enzymet taq-polymerase som er varmestabil og tåler å bli varmet til 95°C flere ganger. Dette enzymet har blitt isolert fra den termofile bakterien *Thermos aquaticus*. Taq-polymerasen starter DNA-syntesen der hvor først primerne binder seg på, og det blir syntetiseres en komplementær tråd til hver av de to opprinnelige DNA trådene etter at disse har blitt denatureert.

I første steget tilsettes og blandes alle ingrediensene før blandingen varmes opp innen 95°C. DNA-sekvens produsering skjer ved å repetere de tre trinnene av denaturering, hybridisering



og polymerisering. I det første trinnet som er denatureringsfasen blir templat-DNA varmet opp til 95°C, og da vil hydrogenbindingene mellom DNA-dobbel-heliksene brytes ned og gå fra hverandre og blir to enkeltrådede av DNA (ss DNA). I andre trinn senkes temperaturen til 55-60°C, PCR-løsningen kjøles nå ned til en temperatur hvor primerne kan binde seg til de komplementære baserekkefølgene på de to enkeltrådede DNA. Rett etter økes temperaturen opp til 72°C som regnes som den optimale temperaturen for DNA-polymerasen. DNA-polymerasen starter å danne dobbeltrådet DNA fra primeren med nukleotidene som byggesteiner.

Tag polymerasen bruker primeren som startpunkt, og derfor er primerne avgjørende for hvilket delen av genomet som oppkonsentreres. Taq polymerase avheng av  $Mg^{2+}$ -ioner og det er derfor viktigst er å tilpasse konsentrasjon av disse ionene til hver enkelt PCR-reaksjon (Nils O., Sjøberg, 2013). Det er viktig at mengden av DNA blir fordoblet i første fasen, og den syklusen skal gjentas til ønsket antall sekvenser blir amplifisert. Det er avgjørende å rense PCR-produkter hvis de skal sekvenseres på grunn av at det kan være overskudd av primere, noe som vil forstyrre sekvenseringen (McPherson & Møller, 2000).

I denne masteroppgaven skal det benyttes flere ulike primere. Det skal brukes såkalt singleplex- og multiplex-PCR. PCR-analyser med kun ett primerpar (Forward og Reverse) kalles for en singleplex-PCR. Når det blandes flere primerpar med ulike størrelser av basepar kalles dette multiplex-PCR. Ved å benytte en mix av forskjellige primere-par det blir testet for eventuelt tilstedeværelse av flere målgen i den samme PCR-analysen. Dersom prøven gir positive bånd ved multiplex-PCR analyse, blir det kjørt singleplex-PCR for å bekrefte disse prøvene.

I PCR-blandingen brukes det et overskudd av primere, og derfor er det viktig at dette fjernes, ellers vil dette ødelegge for sekvenseringen. Til rensinga av PCR produkt brukes kolonner som inneholder et silika-materiale. Dette vil binde dobbeltrådet DNA, mens enkeltrådet DNA (primere) vil bli vasket igjennom kolonnen. Etter at PCR-produktet har blitt rensed, vil det kjøres en agarose gelelektroforese av det rensede produktet. Hensikten med denne rensingen er å sjekke at primerene er fjernet.

### 3.5.1 16S rRNA

rRNA står for ribosomalt RNA og er med å bygge opp ribosomene hvor proteinsyntesen foregår (Nils O., Sjøberg 2013). rRNA består av tre fragmenter, og disse er oppkalt etter størrelsen, som for eksempel hos eukaryote kalles 5S, 16S og 23S (Svedbergs enheter). rRNA har en viktig

funksjon og sekvensene til rRNA har derfor blitt konserverte. Fragmentert 16S rRNA er et stort molekyl med ca. 1,5 kbp som inneholder sekvensvariasjoner, og disse kan brukes for å skille de ulike prokaryote fra hverandre. Derfor brukes 16S rRNA til arts- og slekts-bestemmelse, og til evolusjonsstudier. Primer bindes til de konserverte områder, for slik å forsterke variable områder. DNA sekvensene til 16S rRNA blir ofte brukt for å identifisere mange arter og slekter, og derfor skal dette fragmentet brukes for identifisering av eventuelt positive bakterier i denne oppgaven også.

### 3.6 Gel- Agarose elektroforese

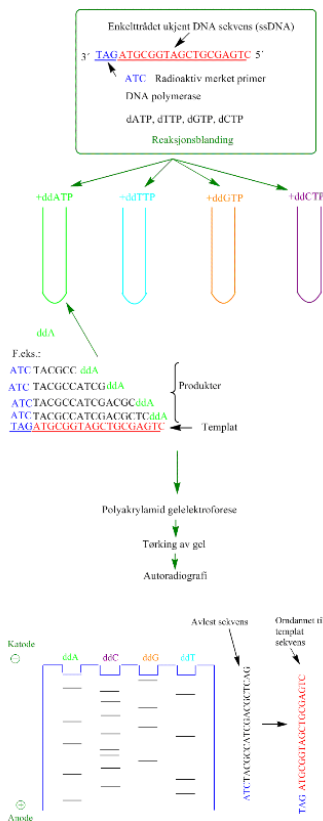
DNA-molekyler separeres bruk av elektroforese. DNA er negativt ladet og vandrer mot den positive polen. Det er to typer av gel-materiale som er vanlig å bruke til DNA separasjon, og i denne oppgaven skal agarosegel benyttes. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger, og løses opp ved oppvarming før det dannes gel ved nedkjøling. Agarosegelen kan benyttes i lav konsentrasjon for å separere store DNA fragmenter og omvendt. Gelens nettverket hindrer bevegelsen til det store DNA-molekylet, og derfor vandrer disse sakte og kortest (N.O., Sjøberg, 2013). For å finne størrelsen til DNA-fragmentene, brukes en type markør som kalles DNA-stige (ladder), og disse kjøpes ferdig. For å se DNA-båndene i gelen, tilsettes et fluoriserende stoff som binder seg til DNA. Ved UV-lys vil tilstedeværelsen av DNA da bli synlig for øyet. Etidiumbromid (EtBr), som er et fluorescerende stoff, ble mye benyttet tidligere, men EtBr er kreftfremkallende, og må derfor behandles veldig forsiktig (N.O., Sjøberg, 2013). Det er utviklet ultrasensitive fluorescerende stoffer, «GelRed™» eller «GelGreen™» som kan binder seg sterkt til DNA. Disse er mye mer følsomme og kan detekteres mye raskere enn EtBr. (N.O., Sjøberg, 2013). Konsentrasjonen av agarose i gelen avhengier av størrelsen på DNA-fragmentene som skal separeres, men det er vanlig å bruke mellom 0,8-3,0 % agarose. Prøvene som skal analyseres på gelen tilsettes en «Agarose Loading Dye, 6X», dette gjøre det lettere å fylle brønnen i agarosegelen, og det benyttes for å følge migrasjonen under elektroforesen. For eksempel når det kjøres en 1% agarosegel vil loading dyen gi lyseblå farge som indikerer migrasjon ned til 4000 bp, indigo 600 bp og magenta 150 bp.

Når DNA fragmentene er separert etter ønsket størrelse, skjæres DNA-fragmentene ut av gelen og DNA isoleres fra gelen.

### 3.7 Sekvensering

Sekvensering utføres for å bestemmes baserekkefølgen i et DNA -molekyl, og det finnes to klassiske metoder for sekvensering (N.O., Sjøberg, 2013). Begge to metodene ble utviklet i 1977 av Maxam/ Gilbert og Sanger. I den første metoden brytes DNA-molekylet ned i små

biter, og i den andre metoden lages det små biter av nytt DNA. I begge metodene undersøkes disse små bitene etterpå med gel elektroforese. I denne oppgaven skal Sangers dideoksey-metode brukes på grunn av at den er mest brukt og lettest å forstå (N.O., Sjøberg, 2013). I Sanger-metoden utføres DNA-syntese i reagensrør, og har derfor visse likhetstrekk med PCR. I Sanger-metoden brukes enkeltrådet DNA som templat for DNA syntese. Reaksjonsblandingen må inneholde DNA-polymerase, primer og de nødvendige byggesteinene for DNA syntese (dNTP). Det vil syntetiseres DNA som er komplementær til den ukjente DNA som skal sekvenseres. Det første trinn i Sanger-sekvenseringen er nærmest som en PCR-prosess hvor DNA amplifiseres, men det er en forskjell fra den vanlige PCR-amplifiseringen ved at det tilsettes fire fluoriserende dideoksynukleotider (ddATP, ddGTP, ddTTP og ddCTP) som mangler 3'-OH- gruppe, men har vanlig 5'-trifosfat, og det kan derfor ikke dannes binding mellom de nye nukleotider. Polymerasen merker ikke forskjell mellom dNTP og ddNTP, og bruker begge komponentene til elongeringsprosessen. Når en ddNTP settes inn, stoppes elongeringsprosessen fordi -OH gruppen i 3'enden mangler. PCR-produktet inneholder korte og lange DNA-fragmenter, alt etter hvor ddNTP settes inn. Etter amplifiseringen er det viktig at overskudd av primere og ddNTP blir fjernet, ellers vil dette gi forstyrrelsen ved avlesning av starten på sekvensen. Etter dette renses produktet med etanol, EDTA og NaOAc. Rensing er viktig slik at sekvensene kan leses helt inntil primeren. Etter sekvensering og rensing blir prøven kjørt på sekvensator, hvor de blir separert ved hjelp av kapillær elektroforese. Ved å bruke gel-elektroforese og en laserdetektor, blir DNA-båndene synliggjort. Det viktig å merke seg at den nylagde DNA er merket. Det nederste båndene og DNA fragment som har vandret lengst er det minste av DNA molekylene. Dette vil si at DNA-syntesen stoppet ved første base etter primeren, og slik kan DNA- basesekvensene fremstilles grafisk (N.O., Sjøberg, 2013). Figur 11 nedenfor viser Sangers metode av DNA sekvensering.



**Figur 11. Sangermetoden av DNA sekvensering.**

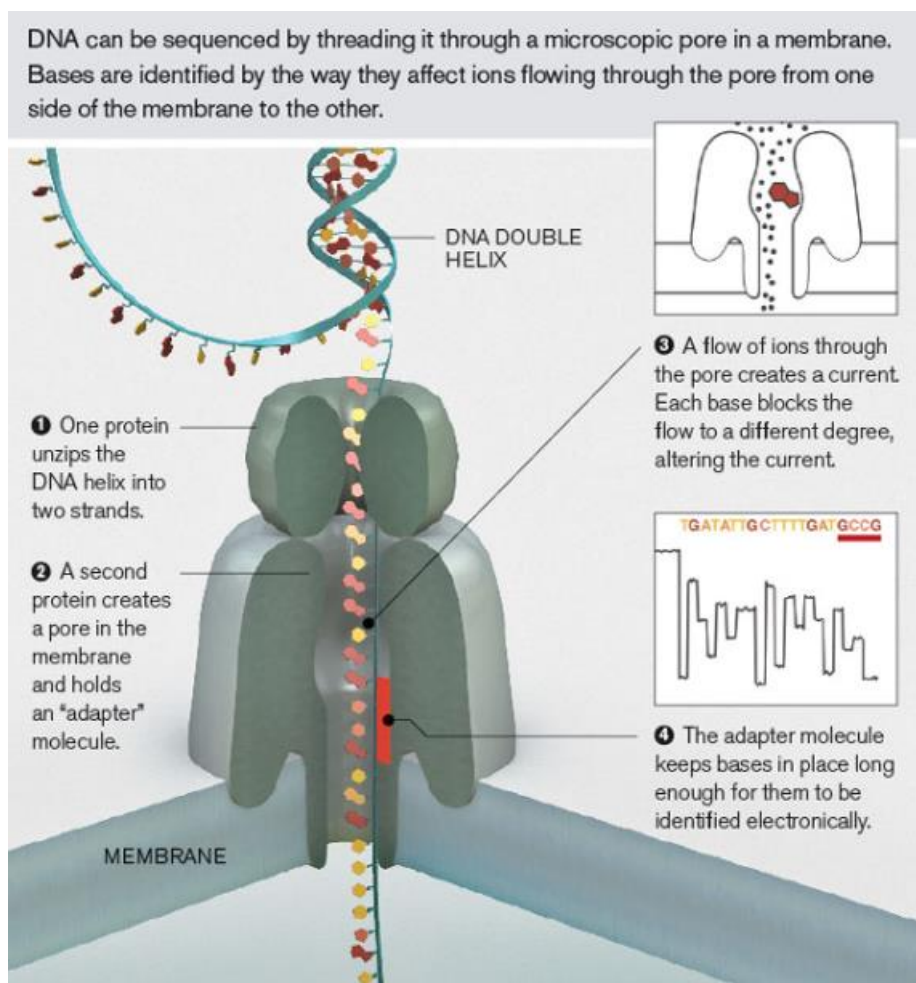
Kilde: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sekvensering.html>

I denne oppgaven ble sekvenseringsdata behandlet i BioEdit programmet. Det er et program som brukes til å finne overlappende områder, og som lager sammenstillinger av sekvensene. Sekvensene redigeres ved å fjerne dårlig sekvenser, og redigerte sekvensene kopieres deretter til Word tekstprogram, hvor sekvensene skal kjøres videre i et BLAST program. BLAST er en database som inneholder mange kjente nukleotid-sekvenser, og blir hjelpemiddelet som skal brukes i denne oppgaven for å identifisere ukjente bakterier fra vannprøver, og eventuelt positive antibiotikaresistens-gener også.

### 3.8 MinION- nanopore sekvensering

DNA-sekvensering ved bruk av nanoporer, såkalt nanoporesekvensering, er en av de mest revolusjonerende DNA-sekvenseringsteknologiene for å gi type nukleotidbaser i et DNA-molekyl. Denne type DNA-sekvensering var en kostbar metode som bare ble brukt av laboratorie-eksperter frem til nå. Nå kan analyser av DNA testes med MinION sekvensering som består av en enhet som er ikke større og dyrere enn en mobiltelefon. Ved

nanoporeteteknologi blir en DNA-tråd lest gjennom en proteinpore. Dette indusererspenningsforskjeller som kan avleses av en sensor, og dette signalet danner bakgrunnen for å lese nukleotid-sekvensene. DNA-trådene deles i to og leses av gjennom proteinporen. Data blir tilgjengelig umiddelbart ettersom DNA blir lest og kan begynne og analyseres, med en gang. Denne prosessen inneholder ikke noen kjemikalier eller gjenkjennelses-teknologi som blir brukt. Derfor er MinION liten og bærbar, og kan brukes av alle bedrifter hvor dette trengs. ( <https://www.nmbu.no/fakultet/vet/aktuelt/node/34553> ). Figur 12 nedenfor viser fremstilling av nanoporesekvensering.



**Figur 12. Det oversikt over apparat som benytter biologiske (protein) nanoporer.**

Kilde:

<http://www2.technologyreview.com/news/427677/nanopore-sequencing/>

Dataprogrammene «WIMP» og «Antimicrobial Resistance Mapping Application» (ARMA) er vanlige å bruke for å behandle resultatene fra MinIO analyser. Først vil WIMP- programmet klassifisere den ukjente prøven slik at den ender i den riktige taksonomiske gruppen. Deretter benyttes ARMA for å detektere ARG (Schmidt et al., 2016).

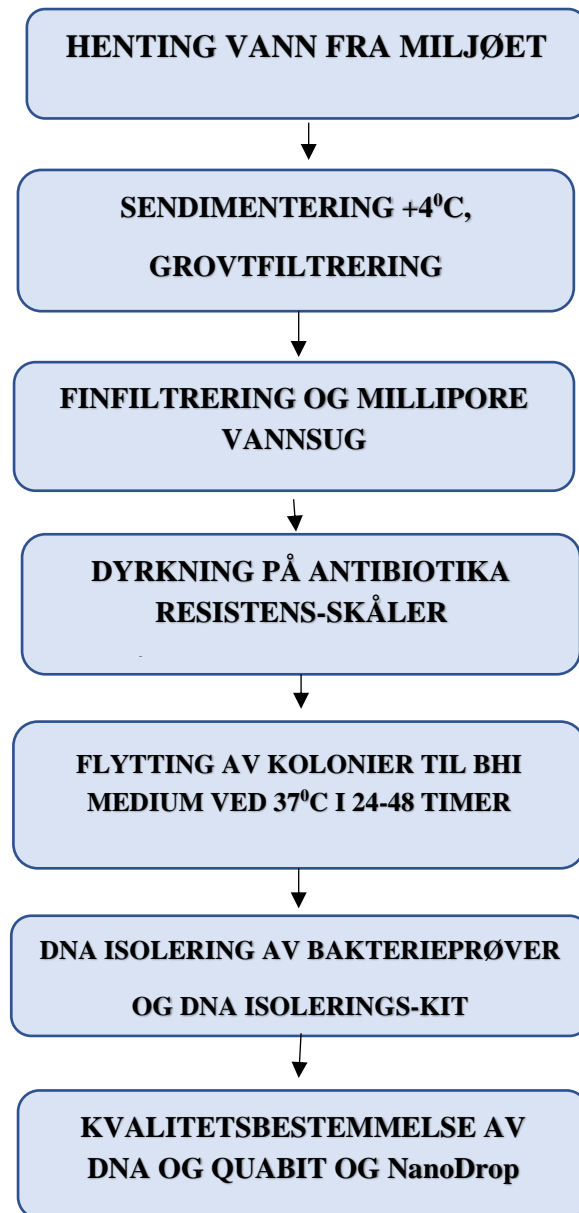
### 3.9 Disk diffusjon/ Antimikrobiell sensitivitets test (AST)

Disk diffusjonstest er enkel og praktisk og har vært godt standardisert for å teste bakteries følsomhet mot antibiotika. Fordelen med denne metoden er at testen er enkel, og den krever ikke noe spesielt utstyr og lett tolkes. Det er den minst kostbare av alle mottakelighetsmetodene (James H. Jorgensen, 2009). Den metoden som skal brukes i denne oppgaven ble utviklet av «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST) (Matuschek et al., 2013). Disk diffusjonsmetoden gjøres på en test strip med en oppgitt mengde av antibiotika som skal overføres til en Muller-Hinton pertris agar petriskålene med en gitt bakterieprøve. Petriskålene skal inkuberes i 16-20 timer ved  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  etter leverandørens anbefaling (Chaitanya et al., 2014). Hvis bakterien er motstandsdyktig mot et gitt antibiotikum, vil ikke veksten av bakteriene bli påvirket, men hvis bakterien er følsom for antibiotika, vil veksten bli det (Matuschek et al., 2013). En viktig ting er å se inhiberingssonene rundt platen, og den nedre delen av hemmingssonen indikerer mengden antibiotika som kreves for å produsere en bakteriostatisk effekt. Denne verdien må sjekkes mot MIC-konsentrasjonspunktets kliniske konsentrasjonsverdier (EUCAST, 2009). Resultatene er avhenge av dosen på disken og hvis dosen blir høyere enn resistensverdiene, så det betyr at bakteriestammen er resistent mot det antibiotikumet som ble gitt (James H. Jorgensen, 2009).

## 4.MATERIALER OG METODER

### 4.1 Flytskjema fra henting av vannprøver til kvalitetsbestemmelse av DNA.

Figur 12 nedenfor viser prosessen fra prøvetaking i miljøet, til ferdig renset og kvalitetsbestemmelse av DNA fra prøvene.



**Figur 12: Flytskjema fra vannprøve-henting til kvantifisert DNA.**

### 4.2 Vannprøver innsamling

Innsamling av vannprøver som skulle analyseres ble samlet i september 2018, og i desember 2019. Høsten 2018 ble det samlet inn 3 vannprøver fra Årungen, i nærheten av Syverudbekkens utløp, samt 2 prøver fra Syverudbekken, se figur 14 nedenfor.



**Figur 14: Bilde fra området i Årungen hvor 5 vannprøver ble hentet høsten 2018.**

Årungen er et vann i Årungen-vassdraget i Viken fylke, og det har flere mindre tilløp, blant annet fra Ås tettsted i sør, hvor vannprøvene ble samlet inn. Vannet ligger 34 meter over havet, og har et areal på 1,2 kvadratkilometer. Vannet har dårlig vannkvalitet, dette fordi det påvirkes mye av tilsig fra landbruket omkring. Dette gir høy risiko for oppblomstring av giftige blågrønnalger, og på grunn av dette skulle det undersøkes mer konkret for å se om det også kunne finnes antibiotika-resistente bakterier i vannet.

I desember 2018 ble det samlet 3 vannprøver fra område på Niagara-bekken i NMBU-parken. Det vises i figur 15 nedenfor.





**Figur 15** Kart over Niagara for uttak av vannprøvene 1,2 og 3.

Niagara-bekken er navnet på bekken som renner gjennom to mindre dammer på vestsiden av Andedammen inne på NMUB-området. Det ble samlet vannprøven fra de tre dammene (Figur 15) for å lete etter eventuell tilstedeværelse av antibiotikaresistente bakterier.

Samtlige vannprøver ble samlet inn på sterile 500 ml Scott Duran glassflasker. Glassflaskene fra Årungen ble nummerert med tallene 1-5 ut ifra hvilket område disse prøvene ble hentet. Vannprøvene fra NMBU Niagara ble merket på samme måte. Glassflaskene ble merket med tallene 1-3. Vannprøvene ble samlet på forskjellige årstiden og fra forskjellige steder. Vannprøvene fra 2018 høst ble oppbevart i et kjølerom på NMBU laboratoriet i 7 dager på grunn av mye partikler i vannprøver. Dette ble gjort for sedimentering av partikler før videre bearbeiding. Vannprøvene fra desember 2018 var klar for analyse i januar 2019. De fem vannprøvene fra høsten 2018 stod i kjølerom i 7 døgn for å sedimentere. Etter 7 dager ble de hentet frem igjen, og alle de største partiklene hadde da sunket ned til bunnen av vannflaskene. Prøve 4 og 5 hadde mye mer sedimenterte partikler enn de prøvene 1,2 og 3 hadde. De tre prøvene som ble samlet inn våren 2019 inneholdt mye partikler. De var litt grumsete og uklare, med mange små vannløpere. Analysen ble satt i gang med filtrering av vannet ved å benytte et grovt papirfilter. Filter-type Whatman™ Ashless/Black ribbon 589/1 (GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, USA) ble satt i begerglass på 300 ml eller 500 ml. For alle vannprøvene ble det filtrert rundt 200 ml. Prøvene ble overført til trakt som med nevnte filter-type, og prøvene ble filtrert ved gravitasjon. Det ble gjort i stand ett slikt oppsett for hver av vannprøvene. Av dette grovfiltrerte vannet, ble 100 ml finfiltrert ved å benytte et Millipore-

filtreringsoppsats på vannsug. Dette ble gjort med samtlige prøver. Til denne finfiltreringen ble det brukt en type filter kalt EZ-Pak® Membrane Filters (Millipore S.A., France) med 22 µm porestørrelse. Etter filtrering ble alle filtrene overført til agarskåler med antibiotika-resistent medium. To ulike skåler med antibiotika-resistent medium ble benyttet. Det ene mediumet benyttet var Brilliance™ESBL, og det andre var Brilliance™CRE Agar (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Under hele prosessen ble det jobbet sterilt. Agar-skålene som inneholde filtrene, ble overført til Patogen-laboratoriet, hvor de ble inkubert ved 37°C i 24-48 timer.

### 4.3 Oppdyrking av selektive skåler

#### 4.3.1 ESBL og CRE

Vannprøvene ble analysert for å undersøke hvorvidt de inneholdt ESBL og CRE antibiotika resistente bakterier. Det ble brukt bi-plater av BrillianceESBL™ og BrillianceCRE™ Agar (Thermo Scientific Inc.). 50 µl fra hver av de grovfiltrerte vannprøvene ble strøket over mediet ved hjelp av en podenål i romtemperatur. Fem prøver fra høsten 2018 ble strøket ut på bi-plater som til sammen ble 10 prøver, og 6 prøver fra vinter 2018. Etter at vannprøvene hadde tørket på media, ble skålene flyttet til inkubatorskap ved 37 °C, hvor de ble inkubert i 24 timer. Etter 24 timer ble det plukket aktuelle kolonier fra skåler med vekst av fenotypiske resistens. Disse koloniene ble strøket ut igjen på nytt. Fra høsten 2018 var det bra vekst på bi-platene, og etter 2 utstrykninger ble det vekst på 2 av ESBL skåler, og 5 på CRE skåler. På vannprøvene fra vinter 2018 var det på bi-platene god vekst, og etter 2 gangers utstrykning det ble 5 ESBL og 3 CRE skåler som viste fenotypisk resistens.

#### 4.3.2 Oppdyrking av selektive skåler

Det ble brukt podenål til overføring av kolonier fra bi-platene til reagensrør som inneholdt 10 ml Brain Heart Infusion (BHI) medium. Det ble brukt ferdig laget BHI medium som har stått i romtemperatur før kolonier av bakterier ble overført. Det ble dyrket 10 prøver fra høsten 2018 og seks prøver fra vinter 2019 i BHI medium. BHI medieprøvene var inkubert ved 37 °C i 48 timer. Det viste god vekst av bakteriekulturene fra høst vannprøvene på medium, det ble vekst på 2 ESBL og 5 CRE skåler, og resultatene viste god vekst også i 2CRE og 3 ESBL bi-plater. Så disse prøvene både fra høst og vinter ble geonomisk isolert for videre analyser og forskning hvilken disse har resistensgener.

#### 4.3.3 Bakteriers nedfrysing – langtidsoppbevaring

500 µl bakteriekultur som var blitt dyrket opp i BHI-medium ved 37°C i 24 timer, ble overført til 2 ml kryorør (Nunc™ CryoTubes™, Thermo Scientific). Videre ble 500 µl med 60 % glyserol tilsatt hver av prøvene. Alle disse bakterie-prøvene ble nedfrosset ved -80°C for langtidsoppbevaring.

#### 4.4 Genomisk DNA ekstrahering

Etter oppdyrking i BHI-medium, ble genomisk DNA fra kulturene analysert. Isolering av genomisk DNA fra kulturene ble gjort hjelp av ekstrahering ved å benytte t GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich). Protokollen fra produsenten ble fulgt, og 1,5 ml bakteriekultur fra hvert rør med BHI medium med vekst ble overført til egne eppendorfrør for høsting av cellene. Det ble gjort et unntak fra protokollen på siste steg. Genomisk DNA ble eluert ved å bruke elueringsbuffer SequalPrep™ fra Invitrogen (ThermoFisher). Årsaken til dette var at den bufferen ikke inneholdt EDTA, noe som ville ha negativ påvirkning på prøvene ved sekvensering. Det vises oversikt av ekstraherte prøvene i tabell 11 resultater.

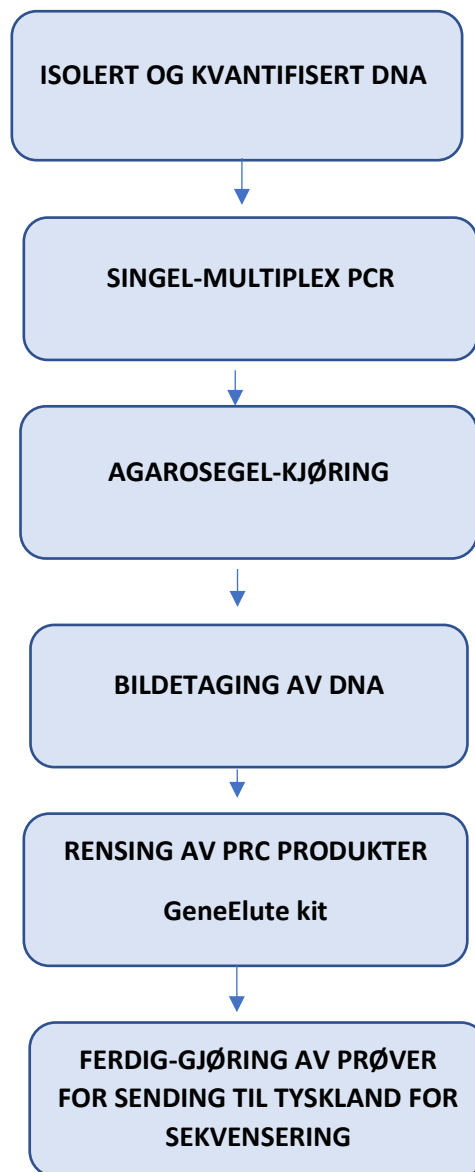
#### 4.5 Kvalitetsbestemmelse og kvantifisering av DNA med Qubit og NanoD

Et Qubit®2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) og et Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) analyse kit (Thermo Fisher Scientific) ble benyttet for å måle DNA-konsentrasjonen av de isolerte prøvene. Oppsettet av analysene ble gjort i henhold til prosedyrene fra produsenten, og preparerte prøver skulle testes med et fluorometer. Det ble blandet Broad Range Qubit dsDNA buffer med 2 µl prøvemateriale, og 198 µl buffer. Et Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) analyse kit (Thermo Fisher Scientific) ble blandet for å lage standardkurver. Det ble blandet 10 µl standard og 190 µl buffer. Det ble laget to standarder som ble brukt for å lage standardkurven som prøvene skulle avleses mot. Både standardene og prøvene ble vortexet ved romtemperatur i to minutter før avlesing. For å oppnå gode sekvenseringsresultater bør DNA-konsentrasjonen av prøven ligge mellom 20 – 80 ng.

DNA-kvalitetsbestemmelse ble målt ved å benytte et NanoDrop Acid 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). En dråpe av prøvene som skulle analyseres ble applisert på spektrofotometerets prøvesokkel, og resultatene ble lest ved å bruke NanoDrop 2000 Software (Thermo Fischer Scientific).

#### 4.6 Flytskjema for DNA undersøkelsen

Figur 16 nedenfor viser flytskjema fra ferdig isolert DNA til forsendelse til : EUROFINS GATC Biotech, Konstanz, Tyskland.or sekvensering.



**Figur 16:** Oversikt over gangen fra isolerte DNA-prøver til forsendelse til Tyskland for sekvensering.

#### 4.7 PCR

I denne masteroppgaven var det brukt en annealing-temperatur på 62<sup>0</sup>C på ESBL-primere og for CRE -primere var brukt annealing-temperatur på 60<sup>0</sup>C. ESBL og CRE protokollene som ble fulgt var gitt av masteroppgave-veileder Bjørn-Arne Lindstedt. Vannprøver med bakterievekst ble testet ved PCR-kjøring, både med singelplex-PCR og multiplex-PCR. Fra høsten 2018 ble

det ekstrahert DNA fra 7 prøver (n=7), og fra vinter 2018 ble det ekstrahert DNA fra 5 prøver (n=5), og resultatene av hvilken prøver ble analysert er gitt i tabellen 11 i resultater.

#### 4.7.1 16S rRNA PCR

Til PCR amplifisering av 16S rRNA ble det brukt et «iProof™ High-Fidelity DNA polymerase» kit (Bio-rad Laboratories) og dNTP kit (Thermo Scientific). Denne analysen ble fulgt som oppgitt i protokollen fra produsenten. Reagenser og konsentrasjoner for 16S rRNA amplifisering vises i tabell 1 nedenfor.

**Tabell 1: oversikt over reagenser brukt ved 16S rRNA.**

Reagent	Initial conc.	Final conc.	Volum, µl (1 reaction)
Iproof HF buffer	5x	1x	8
dNTPS	10 mM	200 µM	0.8
Forward1 primer	5 µM	0.25 µM	2
Reverse primer	5 µM	0.25 µM	2
PCR grade H <sub>2</sub> O		Total 40 µl	24.8
Iproof DNA polymerase	2U/µl	0.02 U/µl	0.4
Template DNA	5 – 100 ng/µl	7.5-150 NG	2
Final conc.		TOT	40microliter

Det ble brukt et PCR-program for 16S rRNA amplifisering som vises i tabell 2 nedenfor.

**Tabell 2: Oversikt over PCR-programmet for 16S rRNA amplifisering.**

Sykler	Temperatur, °C	Tid, min	PCR trinn
1	98	00:30	Start denaturering
3 trinn syklus			
	98	00:10	Denaturering
35 sykluser	55	00:30	Primer annealing
	72	00:45	Primer ekstensjon
1	72	10:00	Slutt ekstensjon
	4	Hold	Nedkjøling/Lagring

Tabell 3 nedenfor vises informasjon om primersammensetningen som kodet for 16S rRNA benyttet for å preparere DNAet til 16S rRNA PCR. Basert på resultater av agarose gelelektroforese ble 16S rRNA rensset og sendt til sekvensering i Tyskland.

**Tabell 3: Oversikt over primerpar, primersekvens, målgen og antall basepar benyttet til 16S rRNA genet.**

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

For resultatbehandling av 16S rRNA PCR-produktene som kom fra Tyskland for å se potensielle 16S rRNA genene og på denne måten kunne identifisere bakterieprøvene, ble det brukt et redigeringsprogram som heter Bioedit® (Ibis Biosciences, USA). I dette programmet redigeres og undersøkes de ulike sekvenstrådene. I denne oppgaven ble det brukt «Forward og Revers» sekvensene i søkefeltet i BLAST-programmet. Potensielle resultater bli helgenom-sekvensert med en MinION og resultatene vil være mer sikre enn Sanger-sekvenseringsresultatene.

#### 4.7.2 Singleplex og multiplex

Det ble brukt to ulike primer-multiplexer: CAR1 og CAR2 for hovedsakelig carbapenemasedeteksjon. Det var brukt ferdig blandet stock-løsningen av primere (Thermo Fisher Scientific) og konsentrasjon på de var 2 µM i hver mastermiks. Til ESBL ble det brukt fire ulike primerblandinger: M1, M2, M3 og M4. Primerblanding M4 er en positiv kontroll. Det var også her brukt ferdig blandet stock-løsninger av primere (Thermo Fisher Scientific). Informasjon om primersammensetning vises i tabell 4 og tabell 5 nedenfor. Multiplex primermixen var laget av stipendiat Misti Dawn Finton, som fulgte produsentens protokoll. Singelplex-primere var levert av Thermo Fischer Scientific.

**Tabell 4. Oversikt over de ulike ESBL -primer-mixen.**

Primerpar	Primersekvenser (5'-3')	Målgen	Basepar	Referanser
<b>ESBL M1</b>				
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>blaOXA-48</i>	281	Dalenne et al. (2010)
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAA			Dalenne et al. (2010)
MultiCTXMGp2-F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>blaCTX-M (gr. 2)</i>	404	Dalenne et al. (2010)
MultiCTXMGp2-R	CGATATCGTTGGTGGTCCAT			Dalenne et al. (2010)
MultiTSOO-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>blaOXA</i>	564	Dalenne et al. (2010)
MultiTSOO-R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG			Dalenne et al. (2010)
MultiTSOS-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>blaSHV</i>	713	Dalenne et al. (2010)
MultiTSOS-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC			Dalenne et al. (2010)

<b>ESBL M2</b>				
MultiCTXMGp9-F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>blaCTX-M (gr. 9)</i>	561	Dallenne et al. (2010)
MultiCTXMGp9-R	TGATTCTCGCCGCTGAAG			Dallenne et al. (2010)
MultiCTXMGp1-F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>blaCTX-M (gr. 1)</i>	688	Dallenne et al. (2010)
MultiCTXMGp1-R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT			Dallenne et al. (2010)
MultiSOT-F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>blaTEM</i>	800	Dallenne et al. (2010)
MultiSOT-R	CGTTCATCCATAGTTGCCCTGAC			Dallenne et al. (2010)
<b>ESBL M3</b>				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>blaNDM</i>	157	Lindstedt (u.å.a)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT			Lindstedt (u.å.a)
VIM-F	ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT	<i>blaVIM</i>	564	Lindstedt (u.å.a)
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT			Lindstedt (u.å.a)
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>blaKPC</i>	460	Lindstedt (u.å.a)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			Lindstedt (u.å.a)
<b>ESBL M4</b>				
rpoB-F	CAGGTCGTCACACGGTAACAAG	<i>RpoB</i>	512	Arabestani et al. (2014)
rpoB-R	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC	<i>16S rRNA</i>		Arabestani et al. (2014)
16S-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	<i>16S rRNA</i>	1505	Generic
16S-R	GGTTACCTTGTTACGACTT			Generic

**Tabell 5. Oversikt over de ulike Carbapenemase Multiplexene.**

<b>Primerpar</b>	<b>Primersekvenser (5'-3')</b>	<b>Målgen</b>	<b>Basepar (bp)</b>	<b>Referanse</b>
<b>CAR1</b>				
CMY2-F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	<i>blaCMY-2</i>	188	Lindstedt (u.å.-d)
CMY2-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACG			Lindstedt (u.å.-d)
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>blaOXA-48</i>	281	Dallenne et al. (2010)
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAA			Dallenne et al. (2010)
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	<i>blaIMP</i>	393	Lindstedt (u.å.-e)
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT			Lindstedt (u.å.-e)
MultiTSOO-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>blaVIM</i>	564	Dallenne et al. (2010)
MultiTSOO-R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG			Dallenne et al. (2010)
<b>CAR2</b>				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>blaNDM</i>	157	Lindstedt (u.å.-a)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT			Lindstedt (u.å.-a)
SFC1-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	<i>blaSFC-1</i>	268	Lindstedt (u.å.-f)
SFC1-R	CACTGTACTGCAGAGTGCCA			Lindstedt (u.å.-f)
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>blaKPC</i>	460	Lindstedt (u.å.-c)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			Lindstedt (u.å.-c)

I tillegg til disse primerne, ble det brukt et QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN®, Tyskland) for å amplifisere prøvene.

Dette kitet inneholder en mastermix som består av template-DNA, Rnase-fritt vann, primer mix og Q-solution. Kitet måtte oppbevares i fryser ved  $-20^{\circ}\text{C}$ , og ifølge protokollen skulle alle komponentene tines på is før bruk. Hver prøve ble blandet med PCR-mix som vist i tabell 6 nedenfor.

**Tabell 6: Reagenser som ble benyttet ved PCR kjøring.**

Reagenser	Volum ( $\mu\text{l}$ ) i 1 reaksjon	Slutt konsentrasjon
2 x Quiagen Multiplex PCR Mastermix	12,5 $\mu\text{l}$	1x
Primermiks (2 $\mu\text{M}$ av hver primer)	2,5 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
RNase -fritt H <sub>2</sub> O	9 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$
DNA (overføres i steg 4)	1 $\mu\text{g}$	$\leq 1$ $\mu\text{g}$ DNA/reaksjon
<b>Totalt volum i hvert PCR-rør</b>	25 $\mu\text{l}$	

Det ble overført 24  $\mu\text{l}$  reaksjonsblanding til PCR-strips, og deretter ble det tilsatt 1  $\mu\text{l}$  DNA prøve, et totalt prøvevolum på 25  $\mu\text{l}$ , slik som beskrevet i protokollen. Under prøveprepareringen ble reagenser og prøver holdt på is. Prøvene ble amplifisert i en «Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler» (Thermo Fisher Scientific). Til multiplex PCR med carbapenemase primere ble program «Master ESBL» benyttet (Tabell 7), mens til multiplex PCR med ESBL primere ble programmet «Master ESBL 2» benyttet (Tabell 8).

**Tabell 7: Oversikt over PCR-programmet «Master ESBL».**

Sykler	Temperatur, $^{\circ}\text{C}$	Tid, min	PCR trinn
1	95	15:00	Taq DNA polymerase aktivering
	94	00:30	Denaturering
35 sykluser	60	1:30	Primer annealing
	72	1:30	Primer ekstensjon
1	72	10:00	Ekstensjon
	4	Hold	Lagring og nedkjøling



**Tabell 8: Oversikt over PCR- programmet «Master ESBL2»**

Sykler	Temperatur, °C	Tid, min	PCR trinn
1	95	15:00	Taq DNA polymerase aktivering
	94	00:30	Denaturering
35 sykluser	62	1:30	Primer annealing
	72	1:30	Primer ekstensjon
1	72	10:00	Ekstensjon
	4	Hold	Lagring og nedkjøling

#### 4.8 Agarose-gel elektroforese

Det ble brukt en 1% agarosegel for å visualisere resultatene av prøvene som var amplifisert med CAR- og ESBL-multiplexer, samt 16S rRNA. Agarosegelen ble laget med å blande 0,5 gram LE Agarose-pulver fra SaeKem® (Lonza Rockland, ME, USA) med 50 ml 1 X TAE buffer. Dette ble blandet i en Erlenmeyer-kolbe, og ble varmet i mikrobølgeovn ved full effekt i ca. 1 minutt. Etter at løsningen var nedkjølt, ble det tilsatt 2,5 µl SYBER Safe DNA gel-stain fra Invitrogen. Dette ble blandet uten store bevegelser for å hindre dannelse av masse små bobler i gelen, noe som igjen kunne påvirke prøvenes vandring i gelen. Blandingen ble overført til elektroforesekar fra Biorad. En brønn-kam som inneholdt 8 brønner ble plassert i elektroforese-karet, og gel-blandingen ble helt forsiktig over. Det ble ventet noen minutter, slik at gel-blandingen stivnet, og kunne brukes for videre analysen av CAR- og ESBL-prøvene. Brønnkammer finnes med ulikt antall brønner, og man kan få plass til 16 prøver på en brønnkam. Prøvene ble blandet med loadigbuffer (Amresco®, Solon, Ohio, USA) og vann før applisering på gel. Loadingbuffer inneholder glyserol og fargestoff. Glyserol for at DNA-prøvene skal synke ned i brønnene, og fargestoff som gjør det lettere å se hvilke brønner som prøver har blitt applisert ned i. Bufferen har tre ulike fargestoffer som migrerer avheng av hvilken slags prøvene vi har. Lyseblå migrerer til 4000 bp, indigo fargen migrerer til 600 bp, mens magenta-fargestoffet migrerer til 10 baser i en 1% agarosegel. Derfor blir det enklere å visualisere DNA migrering ved kjøring av gelelektroforesen. Til sammen ble totalt 10 µl prøveblanding applisert i hver brønn på agarosegelen. Det ble applisert 10 µl stige i en brønn per rad. Reagenser som ble benyttet ved applisering på agarosegelen vises i tabell 9 nedenfor.

**Tabell 9. Oversikt over reagenser og mengde som ble brukt ved applisering på agarosegel.**

Reagenser	Mengde
H <sub>2</sub> O	6 µl
6x loadingbuffer	2 µl
DNA	3 µl

I denne analysen brukes en ladder som «størrelsesmarkør» på gelen for å finne ut om vi har fått riktig produkt fra PCR. Det ble brukt Quick-Load® 100 bp DNA ladder (fra New England Biolabs® Inc, Ipswich, England). Gelen ble kjørt ved 80 V i omtrent en time for ESBL- og CAR-multiplex PCR prøvene. Elektroforese-kjøring ble gjort på en «Bio-Rad Powerbank 300» (Bio-Rad Laboratories).

Etter endt elektroforese, ble det tatt bilder av gelene i UV-lys ved å bruke en maskin som heter «Gel Doc™ XR–maskin» (Bio-rad Laboratories). Bildene som ble tatt av gelene ble lagret ved å bruke programmet «Gel Doc™ XR i Quantity One software» (Bio-rad Laboratories). I tillegg, ble det også tatt bilder av gelene med programmet «Invert display» som et hjelpe middel til for å identifisere prøveresultatene. Båndene på gelen sammenlignes med størrelsen på laddereren og størrelsen på hvilken primer som ble brukt, og til slutt får man da resultater på om det hvorvidt det er resistensgener i disse PCR-prøvene. For prøver som var mistenkelig positive, ble det kjørt singelplex PCR program for å bekrefte om resultatet var positivt.

#### 4.9 Rensing av PCR produkt og 16S rRNA PCR

PCR prøvene ble rensset med et GenElute™ PCR Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich®, og protokollen fra produsent ble fulgt. For å kvantifisere PCR produktene ble Qubit brukt. Før alle prøvene ble sendt til Tyskland (Firmaet EUROFINS GATC Biotech) skulle de klargjøres etter oppgitte spesifikasjoner gitt av produsenten. Det ble brukt autoklaverte eppendorfrør på 1,5 ml, og hvert rør med prøve fikk festet en strekkode for merking av prøven. Hvert rør inneholdt en som bestod av 5 µl DNA/ RNA med en konsentrasjon på ca. 20-80 ng/µl, samt 5 µl primerløsning med en konsentrasjon på 5 µM.

For sekvensering av 16S rRNA sendes en Forward1 og en Reverse1 primer. For singelplex PCR primere brukes kun Forward primere, og det er grunnen til at i singleplex sekvensene er korte (800 bp). På grunn av dette blir det kun binding mellom Forward eller Reverse primere. 16S rRNA inneholder 1500bp, og derfor kreves det binding av begge primere.

#### 4.10 MinION- nanopore sekvensering

Det ble kartlagt hvilke bakteriestammer som hadde gener som kodet for ESBL i prøve 3 og CRE-2 fra vinter 2018, og derfor ble det brukt helgenomsekvensering med MinION (Oxford NANOPORE™ Technologies, Oxford, Storbritannia) ved hjelp av nanoporesekvensering. På grunn av lang tid ble det ikke gjort med prøve 16 fra høst 2018. For å klargjøre bakterie-DNA for helgenomsekvensering, ble det brukt et «Rapid Barcode Kit» (Oxford NANOPORE™ Technologies). Et WIMP/ARMA (Oxford NANOPORE Technologies) ble brukt for å stadfeste de ukjente bakterieprøvenes taksonomiske gruppe og ARG i «real-time». Alle analysene ble fulgt opp i henhold til protokollen fra produsenten, og hele analysen ble utført av stipendiat Misti Dawn Finton.

#### 4.11 Disk diffusjon/ Antimikrobiell sensitivitets test (AST)

For å dokumentere hvilken av prøvene som inneholdt kliniske resistens, ble det brukt 13 vanligste antibiotikum (se tabell 10) og antimikrobiell sensitivitetstesting (AST) analyse ble utført. Til analysen ble det benyttet antimikrobielle strips («M.I.C. Evaluators™» (Thermo Fisher Scientific Inc.), «MIC Test Strip for Antibiotika Susceptibility Testing» (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia) og prøven ble utført i henhold til Matuschek (2013). Nedfossede bakterieisolater av prøvene ESBL-3 og CRE-2 ble sådd ut på ferdigstøpte petriskåler med M-H agar (Thermo Fisher Scientific). Denne agaren inneholder  $\beta$ -NAD og 5 % saueblod for å bakterier til å vokse. Etter utsåing på skålene, ble de ble inkubert ved 37°C i ett døgn. Etter ferdig inkuberingsstid ble det plukket kolonier fra skålene, og disse ble inokulert i sterilt saltvann. Saltvannet ble sjekket opp mot en McFarland Standard 5.0 (Pro-Lab Diagnostics Inc., Bromborough, Storbritannia), før prøvene ble strøket ut på nye M-H agarskåler ved å benytte sterile bomullspinner. De klare stripsene ble lagt på toppen av M-H agar ved å bruke en pinsett, og skålene ble inkubert ved 37°C i ett døgn. Skålene ble inkubert lengre enn det som var oppgitt i protokollen. Resultatene av inhiberingsverdien til ESBL-3 og CRE-2 ble sammenlignet med de kliniske resistente (R>) MIC brytningspunktverdiene for Enterobacterales, EUCAST (2009).

Tabell 10. Oversikt over ulike kliniske resistens EUCAST (2009).

Antibiotika klasser	Antibiotika
Aminopenicillin	Ampicillin (3. generasjon)
	Amoksisillin med klavulansyre
Cefalosporin	Cefotaksim (3. generasjon)
	Cefepim (4. generasjon)
Fluorokinoloner	Ciprofloxacin

<b>Aminoglykosid</b>	Amikacin
	Gentamicin
	Streptomycin
<b>Karbapenem</b>	Imipenem
	Meropenem
<b>Makrolid</b>	Erytromycin
<b>Polymyxin</b>	Kolistin
<b>Sulfonamider og trimetoprim</b>	Trimetoprim


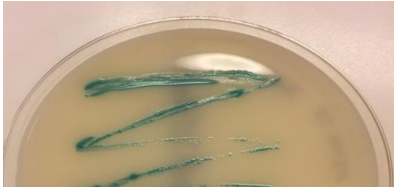

## 5. RESULTATER





### 5.1 Fenotypisk analyse av antibiotika resistente prøver av selektive skåler





I denne masteroppgaven ble 8 ulike innsamlete vannprøver fra to forskjellige miljøer strøket ut på skåler med 2 ulike antibiotika-resistente selektive medier (ESBL og CRE). Det ble gjort finfiltrering av hver av disse 8 prøvene, og hver av filtrerne ble overført til ulike skåler med antibiotika-resistente selektive medier. Vannprøver fra høsten 2018 gav totalt 27 skåler med vekst, og etter andre runde med utstrykning var det vekst på 7 skåler. Vannprøver fra vinter 2018 gav totalt 15 skåler, og etter andre runde med utstrykning ble det til slutt 5 skåler med vekst.

I tabell 11 nedenfor vises oversikt over de ulike prøvene som ble isolert fra ulike steder, type medium, farge på koloni, bilder av skålene og bakterietyper.


Tabell 11. Oversikt over ulike prøver med isolerte DNA fra bakteriekulturer.

Prøve	Type medium	Farge på koloni	Bilde av skålen med AR vekst	Bakterietype	Uttakssted	16S rRNA resultat fra BLAST («forward» og «revers» i samme søk)	MinION resultater
<b>Høst 2018</b>							
1	ESBL	Beige		<i>Proteus,</i> <i>Morganella</i> <i>eller</i> <i>Providencia</i>	R1 (Årungen)	<i>Pseudonomas spp.</i>	lav mengde DNA til stede
3	ESBL	Blå/Grønn		<i>E.Coli</i>  <i>Klebsiella,</i> <i>Enterobakter,</i> <i>Serratia eller</i> <i>Citrobakter</i>	R4(Årungen)	<i>Serratia spp.</i>	lav mengde DNA til stede
9	CRE	Ulike «blå-nyanser» «lyse-brun?»		<i>Klebsiella,</i> <i>Enterobakter,</i> <i>Serratia eller</i> <i>Citrobakter.</i> <i>Pseudonomas?</i>	R1(Årungen)	<i>Herbaspirillum spp.</i>	lav mengde DNA til stede

13	CRE	Grønn/Blå		<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobakter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobakter</i>	R4 (Årungen)	<i>Chitinophaga spp.</i>	lav mengde DNA til stede
14	CRE	Grøn/Green		<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobakter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobakter</i>	R4 (Årungen)	<i>Pseudonomas spp.</i>	lav mengde DNA til stede
16	CRE	Lys beige og lite vokset		<i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>	R5(Årungen)	<i>Burkholderia spp.</i>	lav mengde DNA til stede
17	CRE	Grønn		<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobakter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobakter</i>	R5(Årungen)	<i>Caullobacter spp.</i>	lav mengde DNA til stede

Vinter 2018							
1	CRE	Blå		<i>Klebsiella,</i> <i>Enterobakter,</i> <i>Serratia</i> eller <i>Citrobakter</i>	R1(Niagara NMBU)	<i>Caulobacter spp.</i>	lav mengde DNA til stede
2	CRE	Beige		<i>Proteus,</i> <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>	R1(Niagara NMBU)	no results til put in BLAST	<i>S.maltophilia</i>
3	ESBL	Brunn		<i>Proteus,</i> <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>	R2(Niagara NMBU)	no results til put in BLAST	<i>P.fluorescens</i>
4	ESBL	Beige		<i>Proteus,</i> <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>	R2(Niagara NMBU)	no results til put in BLAST	lav mengde DNA til stede



5	ESBL	Blå med prikker		<i>E.coli</i>	R1(Niagara NMBU)	no results til put in BLAST	lav mengde DNA til stede
---	------	-----------------	--	---------------	------------------	-----------------------------	--------------------------

Alle disse prøvene har vokst på ESBL og CRE skåler som ble identifisert ved å benytte «Quick and Easy ESBL and CRE screening» (Thermo Fisher Scientific). Det ble valgt single kolonier som var forskjellige fra hverandre og disse ble strøket på ulike agarskåler og inkubert ved 37<sup>0</sup>C. Det ble utført et andre og tredje stryk på kolonier med vekst, slik at vi visste at vi hadde et isolat fra en type bakterier. Årsaken til at vi utførte 3 stryk var at vi på den måten var sikre på at bakteriene kunne overleve på antibiotikumet i som er i agarskålen, for hvis de fortsatte å vokse etter å ha blitt isolert så mange ganger, er det en sjanse for at disse bakteriene produserer beta-laktamase-enzymet som gir mulighet for resistens.

## 5.2 Genomisk DNA ekstrahering

Det ble totalt isolert 12 bakteriekulturer fra bakterieskålene. Agarskåler med forskjellige medier ble inkubert i 48 timer ved 37<sup>0</sup>C, og seinere ble disse prøvene dyrket med BHI medium. Alle agarskåler hadde god vekst bortsett prøve 16 CRE fra vann-innsamlingen høsten 2018. Den prøven 16 CRE ble isolert av genomisk DNA sammen med alle prøvene med bra vekst. Det ble utført ekstrahering av genomisk DNA fra alle 12 prøver med bakteriekulturer og resultater av konsentrasjon og renhet vises i tabellen 12 nedenfor.

## 5.3 Kvantifisering og kvalitetsbestemmelse av DNA med Quabit og NanoDrop

I tabellen 12 nedenfor vises oversikt over isolerte bakteriekulturer, kvantifisering og kvalitetsbestemmelse. Prøvene har tatt fra vannansamling fra Høst 2018 og Vinter 2018.

**Tabell 12. Vises oversikt av konsentrasjon og renhet av DNA isolerte prøver.**

Prøve	Type medium	DNA kons. (ng/ $\mu$ l)	Renhet 260/280	260/230
1 *	ESBL	34,5	2,05	1,74
3 *	ESBL	39,5	2,05	1,57
9 *	CRE	33,6	2,08	1,31
13 *	CRE	28,2	2,24	1,32
14 *	CRE	75,5	2,06	1,78
16 *	CRE	18,7	2,67	1,42
17 *	CRE	16,4	2,52	0,95
1 * *	CRE	11,2	1,65	0,91
2* *	CRE	150	1,77	1,30
3* *	ESBL	29,2	1,74	1,20

<b>4* *</b>	<b>ESBL</b>	<b>49,2</b>	<b>1,70</b>	<b>1,20</b>
<b>5* *</b>	<b>ESBL</b>	<b>94,6</b>	<b>1,92</b>	<b>1,92</b>
* vannprøver isolert fra høst 2018				
**vannprøver isolert fra vinter 2018				

DNA prøvene fra høst 18 og vinter 18 ble kvantifisert med både Qubit 2.0 og Nanodrop. Det ble ganske forskjellige prøveresultater av DNA-konsentrasjonen, og for å oppnå effektive resultater burde DNA konsentrasjonen ligge mellom 20-80 ng/μ. Analysen med Qubit viste hvor høy DNA konsentrasjon som faktisk var i prøvene. Dette var viktig, for når vi sekvenserer DNA med Nanopore MinION må man vite hvor mye DNA som er i prøver. Nanodrop målingene viser renhetsnivået av prøvene. Forholdet med 260/280 benyttes for å vurdere renheten til DNAet i prøvene. For eksempel forhold mellom 'ren' DNA av god kvalitet bør være nær 1,8 og prøvene fra Høst 2018 var rundt 2.05, noe som fremdeles er bra. Prøvene fra Vinter 2018 hadde generelt lavere verdier på renhet. Forholdet mellom 260/230 brukes som et sekundært mål på nukleinsyrenes renhet, og de ble forventet verdiene er vanligvis mellom 2,0-2,2. Prøvene fra både fra Høst 2018 og Vinter 2018 ble lavere enn det, noe som kan indikere forekomst av forurensninger. Men det er nok bra, fordi det er miljøprøver slik at de sannsynligvis ikke vil være perfekte i renhet.

#### 5.4 Gel-Agarose kjøring av multi- og singleplex PCR.

Ekstrahert DNA fra samtlige av de 12 isolatene (Høst 2018 n=7, og Vinter 2018 n=5) ble kjørt på PCR med et ESBL- og CAR-multiplex. Multiplex kalles som vi husker fordi det er en blanding av flere forskjellige primere som retter seg mot flere forskjellige virulensområder samtidig. Årsaken til at det først kjøres med multiplexer er fordi det kutter ned kostnadene for reagensene som brukes, og det er mindre tidkrevende enn å bruke målrettet enkeltprimere for et enkelt virulensområde som kalles singleplex. Prøvene ble testet for ulike ESBL- multiplex (M1-M4) med til 12 målgen og ble testet også for 2 carbapenemase -multiplex (CAR1 og CAR2) med til sammen 7 målgen for antibiotikaresistens. Alle PCR- resultatene ble testet visuelt med å bruke agarose gelelektroforese. Positive prøver ble sjekket på nytt ved å kjøre singleplex PCR med aktuell enkeltprimer (singleplex) som er spesifikk for det området som vistes som positiv i multiplexen. Til sammen ble tatt 22 bilder av Gel-Agarose som fra høst 2018 n=14 og fra Vinter 2018 n = 8. Tabellene 13 og 14 nedenfor viser resultater over de ulike PCR-kjøringene ble utført. Negativt tegn (-) indikerer negativt resultat av bånd og positivt tegn

(+) indikerer positivt resultat av bånd. Resultater fra PCR-prosessen ble vurdert som vellykket selv om noe av DNA-båndene var litt svake

**Tabell 13. Resultatene fra ESBL-multiplex PCR på isolerte DNA vannprøver fra Høst 2018 høst/Vinter 2018 som ble testet for antibiotikasresistens-gener. Bånd med + indikerer positivt svaret av bånd.**

Prøve	M1 Mastermix				M2 Mastermix			M3 Mastermix			M4 Mastermix (Kontroll)	
	OXA-48	CTX-M (Gr.2)	OXA	SHV	CTX-M (Gr.9)	CTX-M (Gr.1)	TEM	NDM	VIM	KPC	RpoB	16S
1*	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
9*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2**	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4**	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5**	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Vannprøver isolert fra Høst 2018 \*\*Vannprøver isolert fra Vinter 2018

**Tabell 14. Resultatene fra CAR-multiplex PCR på isolerte DNA vannprøver fra Høst 2018 /Vinter 2018 som ble testet for antibiotikasresistens-gener. Bånd med + indikerer positivt svaret av bånd.**

Prøve	Car-1 Mastermix				Car-2 Mastermix		
	CMY-2	OXA-48	IMP	VIM	NDM	SFC1	KPC
1*	-	-	-	-	-	-	-
3*	-	-	-	-	-	-	-
9*	-	-	-	-	-	-	-
13*	-	-	-	-	-	-	-
14*	-	-	-	-	-	-	+
16*	-	-	-	-	-	-	-
17*	-	-	-	-	-	-	-
1**	-	-	-	-	-	-	-
2**	-	-	-	-	-	-	+
3**	-	-	-	-	-	+	-
4**	-	-	-	-	-	+	-
5**	-	-	-	-	+	-	-

\*Vannprøver isolert fra Høst 2018 \*\*Vannprøver isolert fra Vinter 2018

### 5.5 16S rRNA sekvensering

Fra de innsamlede vannprøvene ble det sendt 12 rendyrkede kolonier fra Høst 2018 (n=7) og Vinter 2018 (n=5) for identifisering ved å bruke 16S rRNA sekvensering. Når ble kjørt agarosegelen på høst 2018 vannprøver virket positive bånd av prøver 1,14 og 17. Etter amplifisering med 16S rRNA genet, var det positive bånd for prøve 1 og 14. For vannprøvene fra Vinter 2018 hadde prøve 2 og 5 positive bånd. Sanger sekvensering av vannprøvene fra Høst 2018 gav gode sekvenser som ble identifisert ved kjøring i BLAST. Særlig ble det funnet en interessant bakterie med interessante gensekvenser i prøve 16, se figur 17 og 18 nedenfor.

Prøve 16 fra høst visste ny bla\_2 genet som ble BLASTet mot proteinbasen til NCBI. Det var ingen 100% identiske proteiner i databasen, men resultater under viser det proteinet som lignet mest, og det er en klasse- A beta-laktamase fra en Paraburkholderia stamme som heter DHOM06. Den beta-laktamase er derfor ny, fordi det finnes ikke i proteinbasen enda. Spennende og viktig med ny oppdagelse av resistente gen.

Vannprøvene fra Vinter 2018 hadde dårlig sekvensresultater, og disse prøvene ble videre testet ved å bruke ARMA og Disk diffujonstesting for å finne aktuelle resistente gener.

**Tabell 15. Det vises resultater av prøver ble sendt til 16 S rRNA identifisering og sekvensering.**

Prøver	Primer	Resultater
1*	16 S rRNA	<i>Pseudonomas spp.</i>
3*	16 S Rrna	<i>Seratia,</i>
9*	16 S rRNA	<i>Herbaspirillum</i>
13*	16 S rRNA	<i>Chitinophaga</i>
14*	16 S rRNA	<i>Pseudonomas spp.</i>
16*	16 S rRNA	<i>Burkholderia</i>
17*	16 S rRNA	<i>Camlobacter</i>
1-5 **	16 S rRNA	Ingen resultater lav mengde DNA til stede

\* vannprøver isolert fra høst 2018  
\*\*vannprøver isolert fra vinter 2018

## 5.6 Helgenomsekvensresultater med MiSeq

Resultatene av Illumina MiSeq sekvenseringsresultater på prøver R2 og R16 vises i figur 17 og 18 nedenfor. Disse resultater viser at ble funnet følgende betalaktamase-gener R16:bla\_1 (klasse-A betalaktamase), en CTX-M som ligner betalaktamase. Itilegg også funnet resistengener som koder for copper resistente proteiner CopD,CopCM, arsenisk resistensprotein ArsH, arsenatreduktase (glutaredoksin) protein arsC, multidrugstransportør- underenhet MdtC, kromatresistensprotein (locus GWC77\_25220) og glyoksalase / bleomycinresistens / dioxygenase (locus GWC77\_25275).Viktigste resultater fra helgenomsekvensering med Illumina MiSeq som ble søkt etter resistensgener i annotert sekvens vises i vedlegg 6 av prøver 2,3 og 16.

**Figur17: Resultater av sekvensering utført på prøve 16 fra Høst 2018.**

**Alignment of two novel class-A  $\beta$ -lactamases from strain NMBU\_R16 (bla\_1 and bla\_2) with closest matches.**

bla\_1) Query = NMBU\_R16\_locus\_tag="GWC77\_08380"

Sbjct = class A beta-lactamase [Burkholderia sp. AD24], Sequence ID: WP\_134964008.1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
354 bits(908)	5e-119	Compositional matrix adjust.	189/314(60%)	228/314(72%)	10/314(3%)
Query 1	MQRPQFIGTVASGLIAGLVTVPCAAAPAAADAKSTAPAGDCSPH-ELARS--IEARLAAIET	57	+ RR+ F S + IAG+ + A K+ ++AG+ +P ELA++ I SLA IE		
Sbjct 2	ITRRKFTGAMLVSTIAGVAV---GSVGAFORTASKAGHAAFGLELAKAAAIRQLAQTEA	56			
Query 58	RVAGRLGVSI LDTSGFAAGHRENERFFMNCSTFFKALAAAALVLRVDRQLDOLSRIVFSR	117	GRLVSEI+DT SG AG R +ERFFMNCSTFK LAA AVL EVDK +DL+SR+VFS+		
Sbjct 59	ESGGRLGVSI VDTSSGLNAGLRVDERFFMNCSTFFKVLAAAGAVLTVDRQAQEDLARRVVSQ	118			
Query 118	EDLVVPSFETGKHA----GGTGMTLSELCEAAVILSDNTAGNLLLSIGGPAGLTAFARH	173	DLVP SF T +H G GM+++ELC+AA+TILSDNTA NLLLA+ GGFA LTAFAE		
Sbjct 119	EDLVVPSFATSRHTRERTGDAGMSIAELCKAAITLSDNTAANLLLATFGGPAALTAFAED	178			
Query 174	LGDTVTRLRDHEPTLNEALFGDFPRDITTFPAMRATLRLLLGNRLSPNSRDRWLAWLEAN	233	LGD +TRLR EPTLNEA+FGDFPRDITTF AM LR L+LG LS +SR + LAWL AN		
Sbjct 179	LGDTITRLDRIEPTLNEAIFGDFPRDITTFNAMLGNLRELVLGHEHLSSSSRAQLLAWLVAN	238			
Query 234	QTGGERIRAGLFTQWRVGGDKTGTGERTANDIAIVWPPGRGPIIVTAYLTATTAAAAGSN	293	*TGG R+RA LP W VGDKIGIG* GIANDIAI+WPPGRGP**V YLI I AA* N		
Sbjct 239	ETGGARLRALPQQWVGWGDKTGTGDHGTANDIAILLWPPGRGPVLVAVYLTGTNGDAARCN	298			
Query 294	AAIAEVGRLAASIV 307		AA+AEVG L V		
Sbjct 299	AAIAEVGALVVQSV 312				

bla\_2) Query = NMBU\_R16\_locus\_tag="GWC77\_24470"

Sbjct = class A beta-lactamase [Paraburkholderia sp. DHOM06], Sequence ID:

WP\_115533798.1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
304 bits(1011)	2e-125	Compositional matrix adjust.	180/258(73%)	220/258(85%)	0/258(0%)
Query 44	LANIEAESGGRLGFFAVDTGSGRTLAYRADERFLMCSTFKGILAAQIFARVDRGEERLDR	103	LA+IE GGRLG FAVDTGSGRTL++RADERFLMCSTFKGILAAQI AR D G+ERLDR		
Sbjct 33	LADIEERRHGGRLGVFAVDTGSGRTLSHRADERFLMCSTFKGILAAQILARTDSGQERLDR	92			
Query 104	QIAYTKDLIFTSFVVTQANVARGAMSIDDL CRAILLESINTAAVLLMRSAAGPEALTAFV	163	+ YT+ DLIFTSFVT+AN+RGAMS++ LC+AILEESINTAA+LLMRSAAGP ALT F+		
Sbjct 93	LVHYTKNDLIFTSFVTKANLSRGAMSVEALCQAILEESINTAAILLMRSAAGPAALTRFI	152			
Query 164	RRLGDTVTRSDRYEPQNSYSGLLDTTSPRAIVTLAKTLLLNALTAESPARLERGMINC	223	R LGDTVTRSDRYEP +N YSG+LDTTSPRAIVT+A++LLLG+ L+ +SR RLERGMI C		
Sbjct 153	RGLGDTVTRSDRYEPDSNRYSGLVDTTSPRAIVTVARSLLLDVLSPKSRTRLERGMIC	212			
Query 224	KPGRSRIRAVLPQSWSCADRFGT SVGGETINDYALVRPIGRHPLIVAAYDAPSLAMAERE	283	+PG +RIRAVLP W DRPGTSV ETINDYALVRP GR PL+VA Y DAP ++M +RE		
Sbjct 213	RPLNRIIRAVLPAGWQAGDRFGT SVSEETINDYALVRPGRAPLVAAYCDAPGVSMDDRE	272			
Query 284	SVLRKAGEAFTQNAMEVA 301		+VLR+AG+ F QWA VA		
Sbjct 273	AVLREAGKVEVQWAASVA 290				

Figur 18. Resultatene av MiSeq sekvensering som ble utført på prøve 16 bla\_1 og bla\_2 Høst 2018.

**R16: bla\_1 og bla\_2:**

**bla\_1 (klasse-A betalaktamase), en CTX-M lignende betalaktamase:**

```

CDS      complement(68773..69699)      /gene="bla_1"      /locus_tag=
"GWC77_08380"      /inference="COORDINATES: similar to
AA      sequence:RefSeq:WP_011313683.1"      /note="Derived by
automated computational analysis using      gene prediction method: Protein
Homology."      /codon_start=1      /transl_table=11      /product="c
lass A beta-
lactamase"      /protein_id="PRJNA559807:GWC77_08380"      /translation=
"MQRRQFIGTVASGLIAGLVTVPGAARAADAKSTARAGDDSPNEL      ARSIEARLAAIETRVA
GRLGVSILDTDSGFAAGHRENERFPMCSTFKALAAAVALERV      DRQLDDLRRIVFSREDLV
PYPETGKHAGGTGMTLSELCEAAVTLSDNTAGNLLAS      IGGPAGLTAFAHRLGDTVTRLD
RNEPTLNEALPGDPRDTTSPAAMRATLRTLLGNRL      SPNSRDRWLAWLEANQTGGERIRA
GLPTGWRVGDKTGTGERGTANDIAIVWPPGRGPI      IVTAYLTATTAQAQRNAALAEVGR
AASIVG"

```

**bla\_2 (klasse-A betalaktamase), en KPC lignende betalaktamase:**

```

gene      13393..14298
      /gene="bla"
      /locus_tag="GWC77_24470"
CDS      13393..14298
      /gene="bla"
      /locus_tag="GWC77_24470"
      /inference="COORDINATES: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_020071381.1"
      /note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Protein Homology."
      /codon_start=1
      /transl_table=11
      /product="class A beta-lactamase"
      /protein_id="PRJNA559807:GWC77_24470"
      /translation="MKRRTFKAALSAAIGTSASRVLGAVGANPSCEPAGTCVKRRRL
ANIEAESGGRLGFFAVDTGSGRTLAYRADERFLMCSTFKGILAAQIFARVDRGEERLD
RQIAYTQKDLIFTSPVTQANVARGAMSIDDLCAILEESDNTAAVLLMRSAGGPEALT
AFVRRLGDTVTRSDRYEPQTNSYSGLDTSPPRAIVTLAKTLLGNALTAESRARLER
GMINCKPGRSRIRAVLPQSWSCADRPGTSVGGGETNDYALVRPIGRHPLIVAAYDAPS
LAMAERESVLRKAGEAFTQWAMEVA"

```

Resultatene av prøven R2 MiSeq viser funnet Beta-laktamase-gener som er L1 og L2 og vises i figur 19. Samtidig ble funnet resistensgener som koder for - arsenatreduktase (glutaredoksin) protein arsC, arsen resistensprotein ArsH, MerC familie kvikksølv, resistensprotein (locus

GWC78\_00350)kvikksølvresistenssystem periplasmisk bindingsprotein merP, kvikksølvresistens co-regulator MerD, kobberresistenssystem multikopperoksidase (locus GWC78\_04085), glyoksal bleomycinresistens / extradiol dioxygenase-familieprotein (locus GWC78\_06335), kobberresistensprotein B og HdeD-familie syre-resistent protein (locus GWC78\_21715).

**Figur 19. Resultatene av MiSeq sekvensering som ble utført på prøve R 2 L1 og L2 Vinter 2018**

**Beta-lactamase L1:**

```

CDS      305043..305915      /gene="blaL1"      /locus_tag="GWC78_05
090"      /inference="COORDINATES: similar to
AA      sequence:RefSeq:WP_032966056.1"      /note="Derived by
automated computational analysis using      gene prediction method: Protein
Homology."      /codon_start=1      /transl_table=11      /product="L
1 family subclass B3 metallo-beta-
lactamase"      /protein_id="PRJNA559807:GWC78_05090"      /translation=
"MRFTLLAFALAVALPAVHASAAEAPLQRLRAYTVDASWLQPMAP      LQVADHTWQIGTED
LTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLKRGVAPQDLRLIL      LSHAHADHAGPVAEL
KRRRTGAHVAANAETA VLLARGGSNDLHFGDGITYPPASADRII      MDGEVVTGGIAFTAHF
MPGHTPGSTAWTWTDRDGKPVRIAYADSLAPGYQLKGNP      RYPRLIEDYKRSFATVRAL
PCDLLLTPHPGASNWNYYAAGSKASAEALTCNAYADAAEK      KFDAQLARETAGTR"

```

**Beta-lactamase L2:**

```

CDS      19211..20122      /gene="blaL2"      /locus_tag="GWC78_1662
5"      /inference="COORDINATES: similar to
AA      sequence:RefSeq:WP_005410766.1"      /note="Derived by
automated computational analysis using      gene prediction method: Protein
Homology."      /codon_start=1      /transl_table=11      /product="L
2 family class A beta-
lactamase"      /protein_id="PRJNA559807:GWC78_16625"      /translation=
"MLARRRFLQFSAAAVASSLALPLLARAAGKATANAPTDAAITAA      SDFAALEKACAGRLGV
TLLDTASRRRIGHRQDERFPMCSTFKSMLAATVLSQAERMPA      LLDRRVPVGEADLLSHAP
VTRRHAGKDMTVRDLCRATIITSDNTAANLLFGVVGPPA      VTAFLRASGDTVSRSDRLEPE
LNSFAKGDPRDTPAAMAATLQRVVLGEVLQPASRQ      QLADWLIDNETGDA CLRAGLGK
RWRVGDKTGSNGEDARNDIAVLWPVAGGAPVWLTAY      LQAGAISYEQRASVLAQVGRIA
DRLIG"

```



## 5.7 ARMA resultater for antibiotikaresistens gener

ARMA resultater for antibiotikaresistens gener som ble fant *S. maltophilia* og *Pseudomonas fluorescens* som inneholdt ARG som vises i tabellen 16 og 17 nedenfor. Det ble funnet resistensgener i genomet som alaS, amrB, APH(3')-IIc, arnA, gyrB, L1 beta-lactamase, mdtE, mexB (D, F, K, N, Q, Y, W), msbA, patA, patE, parC, parE, nfsA, smeA (B, C, D, E, F, R, S), phoP, phoQ og Tric. Itilegg resultater som ble funnet av de annoterte genomene som for eksempel ResFinder vises i vedlegg 5.

**Tabell 16.** Det vises oversikt over ARMA-resultater fra antibiotikaresistens.

Gen	Antibiotikaresistens
<b><i>S. maltophilia</i> – Prøve 2 Vinte</b>	
alaS	aminocoumarin resistance
amrB	aminoglycoside resistance
APH(3')-IIc	aminoglycoside resistance
arnA	polymyxin resistance
gyrB	fluoroquinolone resistance
L1 beta-lactamase	
mdtE	erythromycin resistance
mexB	
mexD	
mexF	
mexK	efflux pump - chloramphenicol resistance
mexN	
mexQ	
mexY	
msbA	efflux pump - ciprofloxacin resistance
oqxB	fluoroquinolone resistance
parE	resistance to fluoroquinolones
patA	resistance to fluoroquinolones
smeA	efflux pump - aminoglycoside resistance
smeB	
smeC	
smeD	
smeE	
smeF	
smeR	
smeS	

Tabell 17. Det vises oversikt over antibiotikaresistens gener

Gen	Antibiotikaresistens
<b><i>Pseudomonas fluorescens</i> – Prøve 3 Vinter</b>	
alaS	aminocoumarin resistance
armB	aminoglycoside resistance
arnA	polymyxin resistance
bacA	bacitracin resistance
emrB	fluoroquinolone resistance
gyrA	fluoroquinolone resistance
gyrB	
mexB	
mexI	
mexD	
mexE	
mexF	trimethoprim resistance
mexN	
mexW	
nfsA	nitrofuratoin resistance gene
ompH	triclosan resistance
parC	fluoroquinolone resistance
parE	fluoroquinolone resistance
phoP	polymyxin resistance
phoQ	
TriC	triclosan resistance

### 5.8 Helgenomsekvenseringsresultater med MinION og MiSeq

I tabell 18 og 19 vises de viktigste resultatene fra helgenomsekvenseringen. Alle prøvene 2, 3 og 16 har i tillegg blitt sekvensert ved Oslo Sequencing Centre på Illumina MiSeq som skulle bekrefte virulensgener og ARG og vises vedlegg 6. De viktigste resultatene inneholdt virulensgener som alaS, amrB, APH (3')-llc, ceoB, **L1 beta-lactamase** **L2 betalaktamase**, macB, mexBDKFNQ, oqxB, Glpt, mdtB, mexBDEFIKNYW, mfd, oomph, OPRmn, oqxB, ampC, PhoPO, Tric. Det også inneholdt antibiotika resistensmekanismer som effekspumper “multidrug”, *Burkholderia cepacia* efflux pump, metallo- $\beta$ -lactamase med et bredt substratspekter inkludert karbapenemercarbapenems L1 og L2, aminocoumarin resistens, *Pseudomonas aeruginosa* Efflux pump og triclosan-specific efflux pump.

Tabell 18. I tabellen er gitt oversikt over resultater fra helgenomsekvensering som ble fant i prøve 2 fra Vinter 2018.

<b>Vinter 2018 prøve 2</b>	
<b>MinION –<i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	
<b>Gen</b>	<b>Resistensmekanismer</b>
alaS	Aminocoumarin Resistens - aminocoumarin er en klasse av antibiotika som virker ved å hemme DNA-gyrase
amrB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> efflux pump
APH(3')-IIC	Aminoglycoside resistens
ceoB	<i>Burkholderia cepacia</i> efflux pump
<b>L1 beta-lactamase</b> <b>L2 betalaktamase</b>	metallo-β-lactamase med et bredt substratspekter inkludert karbapenemercarbapenems ,L1 og L2.
macB	Efflux pump of <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
mexBDKFNQ	Efflux pump of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
oqxB	<i>E. coli</i> efflux pump
smeABCDEFRS	Efflux pump

Tabell 19. I tabellen er gitt oversikt over hvilken antibiotika resistente gene var fant i prøve 2 fra Vinter 2018.



<b>Vinter 2018 prøve 3</b>	
<b>MinION <i>Pseudomonas fluorescens</i></b>	
<b>Gen</b>	<b>Resistensmekanismer</b>
alaS	aminocoumarin resistance
APH(3')-IIC	aminoglycoside resistance
amrB	efflux pump
Glpt	<i>E. coli</i> – bekrefter resistens fosfomycin
mdtB	multidrug efflux pump
mexBDEFIKNYW	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Efflux pump
mfd	Bekrefter resistens mot vertsstoffets nitrogen respons
ompH	Antibiotika resistens relatert protein
oprMN	Efflux pump
oqxB	<i>E. coli</i> efflux pump
ampC	Extended-Spectrum Cephalosporinase
PhoPQ	Resistens mot det polykationiske antibiotiske polymyxin B og uttrykk for det ytre membranprotein OprH i det opportunistiske patogenet <i>Pseudomonas aeruginosa</i> involverer begge to-komponenten PhoP-PhoQ
TriC	tricolosan-specific efflux pump

## 5.9 Resultater av Disk diffusjonstesting

Det ble utført følsomtesting og var ikke EUCAST-bruddpunkter for mange av antibiotikaene, og dette kan være fordi de ennå ikke har hatt tid til å evaluere det antimikrobielle middelet. En stor ting å merke seg er at *S. maltophilia* stammen har beta-laktamasene L1 og L2 og et høyt nivå av ervervet resistens. Prøve 3 fra vinter ble testet positivt for *Pseudomonas fluorescens* og høst 2018 prøve 16 (R16) stammen *Burkholderia spp.*, som dessverre ikke vokste effektivt nok til å utføre følsomhetstesting, og at det var så lav mengde DNA til stede at sekvensering ikke ga tilstrekkelige resultater.

Disk diffusjonstesting resultater vises i tabell 21 gjennomsnittsverdiene av inhiberingssonene til Vinter 2018 prøver 2 og 3. I tabellen vises oversikt over hvilken antibiotika var resistente mot Vinter 2018 prøve 2 og 3.

**Tabell 20. Disk diffusjon av 13 antibiotika med to gjentak av vinter 2018 prøver 2 og 3.**

Antibiotikaklasser	Antibiotikum	Klinisk brytningspunkt for MIC (mg/l) EUCAST	Prøve 3-vinter 2018 <i>Pseudomonas sp</i> Vokset: ESBL agarskåler 	Prøve 3- vinter 2018 Vokset: Cre agarskåler 
Aminopenicillin <sup>1</sup> -β-laktam -Angriper celleveggsyntesen	<b>Ampicillin</b> 3. generasjon	<i>Pseudomonas</i> : No breakpoint, susceptibility testing not recommended <i>Stenotrophomonas</i> :	>256 mg/L	>256 mg/L
	<b>Amokisicillin med klavulansyre</b> Aminopenicillins tilsettes klavulansyre om bakterien viser tegn på resistens*	<i>Pseudomonas</i> : : Ingen bruddpunkt, sensitivitetstesting anbefales ikke	>256 mg/L	>256 mg/L
Cefalosporiner <sup>2</sup> -β-laktam -Angriper PBP				
	<b>Cefotaksim</b> 3.generasjon	<i>Pseudomonas</i> : : Ingen bruddpunkt, sensitivitetstesting anbefales ikke	Runde 1: 64 mg/L Runde 2: more than 256 mg/L Gjennomsnitt: 160 mg/L	Begge runder: mer enn 256 mg/L
	<b>Cefepim</b> 4. generasjon	<i>Pseudomonas</i> : 8 mg/L <i>Stenotrophomonas</i>	Runde 1: 3 mg/L Runde 2: 2 mg/L Gjennomsnitt: 2.5 mg/L	Begge runder: mer enn 32 mg/L
Fluorokinoloner <sup>2</sup> Inhiberer DNA-syntesen				
	Ciprofloxacin	<i>Pseudomonas</i> : 0.5 mg/L	Begge runder: 0.6 mg/L	Begge runder: 0.5 mg/L
Aminoglykosid <sup>2</sup> Bryter ned 30S subunit				
	<b>Gentamicin</b> Første valgs antibiotika	<i>Pseudomonas</i> : 4 mg/L	Første runde: 0.12 mg/L Andre runde: 0.3 mg/L Average: 0.75 mg/L	Første runde: 16 mg/L Andre runde: 8 mg/L Gjennomsnitt: 12 mg/L
	<b>Amikacin</b> Andre valg om bakterien er resistent mot gentamicin	<i>Pseudomonas</i> : 16 mg/L	Begge runder: 0.03 mg/L	Begge runder: 8 mg/L
	<b>Streptomycin</b> Sistevalg - Fremveksten av resistente organismer har begrenset bruken av streptomycin til noen spesifikke forhold	64 mg/L	Første runde: 1.5 mg/L Andre runde: 0.38 mg/L Gjennomsnitt: 0.94 mg/L	Begge runder : mer enn 64 mg/L
Karbapenem <sup>3</sup> -β-laktam -Angriper cellevegg syntese				
	<b>Imipenem</b>	<i>Pseudomonas</i> : 4 mg/L	Første runde: 0.5 mg/L Andre runder: 1 mg/L Gjennomsnitt: 0.75 mg/L	Begge runder: mere enn 32 mg/L

	<b>Meropenem</b>	<i>Pseudomonas</i> : 8 mg/L (ECOFF=0.125 mg/L)	Første runde: 0.3 mg/L	Første runde: mere enn 32 mg/L
<b>Makrolid2</b> -Bryter ned 50S subunit				
	<b>Erytromycin<sup>4</sup></b> Sannsynligvis på grunn av alle de 4 belastningens besittelse av <b>mphA</b> or <b>mrX</b> .	<i>Pseudomonas</i> : Ingen bruddpunkt, sensitivitetstesting anbefales ikke	Begge runder: 16 mg/L	Første runde: 16 mg/L Andre runde: 8 mg/L Average: 12 mg/L
<b>Polymyxin<sup>4</sup></b> -Angriper cellemembranen				
	<b>Kolistin</b>	>2 mg/L	Begge runder: ikke vokset	Begge runder: 8 mg/L
<b>Sulfonamider og trimetoprim<sup>2</sup></b> -Inhiberer folsyresyntesen				
	<b>Trimetoprim</b>	<i>Pseudomonas</i> : Ingen bruddpunkt, sensitivitetstesting anbefales ikke	Begge runder: mer enn 32 mg/L	Begge runder: mere enn 32 mg/L

<sup>1</sup>National Institutes of Health (2016a) <sup>2</sup>Kapoor et al. (2017) <sup>3</sup>Codjoe and Donkor (2017) <sup>4</sup>Velkov et al. (2013) \*National Institutes of Health (2016b). **Rød skrift**=klinisk resistent ifølge (EUCAST, 2009). **Blå skrift**=verdien var høyere enn ECOFF-verdien (EUCAST, u.å.).

\**Stenotrophomonas maltophilia*: Trimethoprim-sulfamethoxazole er det eneste middelet som EUCAST-brytepunktene for øyeblikket er tilgjengelige for.

\**Pseudomonas fluorescens*: EUCAST har ikke bestemt bruddpunkter for AM, AMC, CTX, S, E, TM.

## 6 DISKUSJON

### 6.1 Fenotypiske deteksjoner av resistenspåvisning

I denne masteroppgaven ble det undersøkt for resistenspåvisning ved å bruke selektive, kromogene mediene for å detektere mulige ESBL og CRE antibiotikaresistente bakterier. Vi vet at den hurtigste metoden for å detektere Gram-negative bakterier som tilhører familien *Enterobacteriaceae* er ved å bruke kliniske prøver som Brilliance<sup>TM</sup>ESBL og Brilliance<sup>TM</sup>CRE agar-skåler, dette for å redusere spredningen av EBSL og optimalisere behandlingsprosessen (Thermo Fisher Scientific Inc., 2010; Thermo Fisher Scientific Inc., u.å.). Til denne analysen ble det innsamlet vannprøver fra Årungen høst 2018, og fra et område på NMBU kalt Niagara på vinter 2018. Vannprøver fra høsten 2018 gav totalt 27 skåler med vekst, og etter andre runde med utstrykning var det vekst på 7 skåler. Vannprøver fra vinter 2018 gav totalt 15 skåler, og etter andre runde med utstrykning ble det til slutt 5 skåler med vekst. Av alle disse prøvene ble det valgt å teste videre prøvene som vokste på «Oxoid Brilliance<sup>TM</sup> ESBL» skålene med fem positive resultater (høst-2 og vinter-3) og sju positive resultater (høst 3 og vinter-2) på «Oxoid Brilliance<sup>TM</sup> ESBL» skålene. Alle disse skålene hadde god vekst unntatt høst prøve 16 som hadde lite vekst, men det ble valgt å analysere videre. Positive resultater på «Oxoid Brilliance<sup>TM</sup> ESBL» skålene viste at det fantes Gram-negative bakterier fra *Enterobacteriaceae* familien som hadde resistens mot 3. generasjon cefalosporiner fra vannprøvene ble hentet på områdene. Agarskålene med positive resultater på «Oxoid Brilliance<sup>TM</sup> CRE» viste resistens mot alle betalaktaman-antibiotika (Fhi.no). Gram-negative bakterier som tilhører familien *Enterobacteriaceae* ansees for å være en av største truslene mot den globale helsen på grunn av deres evne til å bryte ned  $\beta$ -laktamer (Davies & Davies, 2010). Bakterier som hadde positive resultater av ESBL indikert et epidemisk nivå i flere land (Bajaj et al., 2016). Spredning av ESBL<sub>CARBA</sub> bakterier gjør ifølge Folkehelseinstituttet disse bakterier svært resistente (<https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>). Derfor er disse bakterier bekymringsfulle på grunn av at de ofte er knyttet til MDR og redusert behandling (Codjoe & Donkor, 2017).

DNA kvalitet på isolert DNA bør være nær 1,8 og prøvene fra Høst 2018 var rundt 2.05, noe som fremdeles er bra. Prøvene fra Vinter 2018 hadde generelt lavere verdier på renhet. Forholdet mellom 260/230 brukes som et sekundært mål på nukleinsyrenes renhet, og de forventede verdiene er vanligvis mellom 2,0-2,2. Prøvene fra både fra Høst 2018 og Vinter 2018 ble lavere enn det, noe som kan indikere forekomst av forurensninger fra karbohydrater,

fenoler og andre komponenter. Så lavere renhet og konsentrasjon kan påvirke resultater av for eksempel Sanger-sekvenseringen som det måtte bruke mer tid og ressurser for å teste på nytt.

Dyrkningsmetoden gir ikke noe spesifikt svar om hvilken antibiotikaresistens bakteriene som vokst akkurat på de selektive mediene benytter (Gazin et.al., 2012), på grunn av det kun er bakterienes egenskaper uttrykkes (Lindstedt,2018). For å bekrefte AR resultater av agarskålene må DNA dyrkes opp ved hjelp av BHI medium, isoleres og testes videre med PCR singleplex-multiplex, og Sanger sekvensering. Disse metode brukes for å bekrefte hvilken bakteriestamme som finnes i de innsamlet vannprøver fra Follo-kommunen, og hvilken type antibiotikaresistens-mekanisme de har. Bakterier med ESBL-enzymmer i kombinasjon med de utallige resistensmekanismene har ført til større vansker med å oppnå god resultater ved fenotypisk deteksjon fordi det kan raskt vokse frem feil type bakterier (Huang et al., 2010).

## 6.2 PCR og sekvensering

Alle PCR- resultatene ble testet visuelt med å bruke agarose gelelektroforese. Positive prøver ble sjekket på nytt ved å kjøre singleplex PCR med aktuell enkeltprimer (singleplex) som er spesifikk for det området som vist positiv i multiplexen. Til sammen ble det tatt 22 bilder av Gel-Agarose som høst 2018 n=14 og fra Vinter 2018 n = 8. Til carbapenemase PCR ble det brukt annealingtemperatur som ble endret fra 62<sup>0</sup>C til 60<sup>0</sup>C, og antall sykluser ble redusert fra 40 til 30. For ESBL PCR ble antall sykluser satt ned fra 35 til 28. Disse endringene gir bedre optimalisering av metoden, med tydeligere og mer spesifikke bånd ved PCR kjøring. Resultater fra PCR-prosessen ble det vurdert som vellykket selv om noe av DNA-båndene var litt svake.

Vannprøvene både fra høst 2018 og vinter som ble isolert fra ESBL- skålene var positive for mastermix 1,2 og 3. For vinter 2018 fikk prøve 4 og 5 positive bånd for OXA-48, CTX-M og OXA i mastermix 1. Både høst 2018 prøve 1 og vinter 2018 prøve 2 fikk positive bånd for CTX-M og TEM i mastermix 1. I mastermix 2 ble det positive bånd for høst 2018 prøve 1 og prøve 3, hvor begge hadde bånd for RpoB. Det ble kjørt multiplexer for carbapenem Car1 og Car2 og det ble positive bånd for høst 2018 prøve 14 som var positiv for KPC, og for vinter 2018 ble prøvene 2, 3, 4, 5 og 8 positive (KPC, SFC1 og NDM).

Ingen av de positive PCR-reaksjonene for betalaktamaser ble bekreftet med Sanger-sekvensering. Vinter 2018 prøve 2 og 3 ble likevel helgenomsekvensert og testet for AR ved bruk av 13 test stripes (disk diffusjonstester).

Bakterienes identitet ble kartlagt ved å sende prøvene til sekvensering av 16S rRNA gen. Alle høst 2018 prøvene ble identifisert, men dessverre ble det ingen resultater av vinter 2018 prøvene, fordi det var for lav mengde DNA til stede. Årsaken til dette kan være for lav konsentrasjon og renhet av DNAet, som igjen påvirket resultatet av sekvenseringen. Basert på sekvenserings-resultater fra høst 2018 ble prøvene identifisert som følger: *Pseudomonas spp.* av prøven 1, *Serratia* av prøven 3, *Herbaspirillum* av 9, *Chitinophaga* av 13, *Pseudomonas spp.* av 14, *Burkholderia* av 16 og *Camlobacter* av prøven 17.

For å bekrefte hvilke bakterier som vokste på de selektive, kromogene skålene ble resultatene fra fargescreeningen ESBL og CRE sammenlignet med sekvenseringsresultatene. Sekvensering av 16S rRNA genet brukes ved fylogenetiske studier fordi genet er godt konservert og tilstrekkelig langt til at det inneholder nok informasjon til å klassifisere ukjente bakterieprøver ned til slekts- og/eller artsnivå (Kolbert & Persing, 1999). Det kan være usikkerhet ved 16S rRNA resultatene på grunn av at mange arter kan inneholde svært like identiske sekvenser. Derfor kan det være vanskelig å skille arter fra hverandre, og særlig hvis det ikke er nok DNA i prøvene, eller at databasen ikke inneholder sekvensene som trengs for å identifisere den ukjente bakterien (Janda & Abbott, 2007).

### 6.3 Sammenligning av 16S rRNA-resultatene

Sammenligning av 16S rRNA-resultatene med fargescreeningen ble fulgt etter protokollen fra Thermo Fischer Scientific Inc. (2014). Det var kun Sanger-sekvenseringsresultatene fra skål 3 høst prøven som stemte med protokollen eller resten av prøvene ble forskjellige bakterier typer. Årsaken til dette kunne være mistolking av fargescreeningen, vekst av andre bakterier enn Enterobacteriaceae og andre ARG enn  $\beta$ -laktamaser (Gazin et al., 2012) som kunne føre til avviken. Dessuten Sanger-sekvenseringen visste mer konkrete resultater enn fargescreeningen på grunn av at GenBanken til BLAST bestod av mere tydelige sekvenser enn fra de kromogene skålene, og BLAST resultatene ville derfor omfavne flere taksonomiske grupper. Samtidig kunne være avvik på hva slags bakterier fantes i vannmiljøer enn i kliniske miljøene (Steinbakk et al., 2014).

Det kunne være feiltolkning av farger på skålene som for eksempel skålene 13,14 og 17. Skålene 13,14 og 17 ble tolket at inneholdt same bakteretyper: *Klebsiella*, *Enterobakter*, *Serratia* eller *Citrobakter* fordi farger på kolonier var grønne/blå. Alle tre skålene viste forskjellige AR bakterier som *Chitinophaga spp.*, *Pseudomonas spp.*, og *Caullobacter spp.* Det er viktig å nevne *Pseudomonas* bakterier som finnes i jord- og vannmiljøet, naturen og som best trives i fuktige omgivelser. *Pseudomonas spp.* tilhører familien *Pseudomonadacea* og er



en Gram-negativ bakterie, psykrotrof og ikke-fermentativ bakterie. *Pseudomonas* spp., finnes i fuktighet og der vil den kunne formere seg. Den finnes i liten grad ellers i den normale flora hos mennesker, men tilførsel fra omgivelsene skjer jevnlig. Den er i stand til å formere seg i bortimot rent vann (<https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon---veileder-for/>). *Pseudomonas* kan produsere flere typer pigmenter som kan være typisk for andre bakterier, som for eksempel stammer av arten *P. aeruginosa* kan syntetisere et blå/grønt pigment (El-Fouly et al. 2015). *Pseudomonas*-arter er mest kjent for å ha flere iboende og ervervede resistensgener assosiert med mobilbare genelementer, samt å utveksle disse med andre familier av Gram-negative bakterier som *Enterobacteriaceae* (Kittinger, C. et al 2016). *Pseudomonas* er derfor kjent som utgangspunkt for spredning av resistensgener, som for eksempel karbapenemase, og spesielt *P. aeruginosa* har derfor blitt en global helsetrusel (Microbiol Spectr. 2018 Jun;6(3). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017), (Clin Microbiol Rev. 2020 May 13;33(3): e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19). Et viktig resultat av sekvensering var resultatet av skål 3 fra høst 2018 prøver. Denne hadde ved bruk av 16S rRNA med stor sikkerhet bekreftet at sekvensen tilhørte *Serratia* spp. *Serratia* er en slekt av Gram-negative, fakultativt anaerobe, stavformede bakterier fra familien *Yersiniaceae* og tilhører KESC-gruppen som ifølge teorien skulle være grønne kolonier (Gazin et al., 2012; Huang et al., 2010) og slik som det stemte med detekteringen. Ulike stammer av *Serratia* okkuperer miljø som jord, vann, planter, insekter og andre (Ashish K., et al 2013). *Serratia marcescens* anses som en av de mest utbredte artene blant humanpatogene bakterier (Stock et al., 2003).

Høst 2018 skål 16 med lys beige farge hadde lite vekst på agarskålene. 16S rRNA analyser bekreftet med stor sikkerhet at sekvensen tilhørte *Burkholderia* spp.. *Burkholderia*-artene danner en monofyletisk gruppe innenfor *Burkholderiales* rekkefølgen av *Betaproteobacteria*. Det er for tiden 48 gyldige navngitte arter som kan skilles fra nærliggende slekter (dvs. *Paraburkholderia*) (Woods, 2006). *Burkholderia* refererer til en gruppe tilnærmet ervervede Gram-negative, aerobe, stavformede bakterier som er bevegelige ved hjelp av en eller flere polare flageller, med unntak av *Burkholderia mallei*. Pigmenterte stammer av arten kan deles inn i to typer på grunnlag av pigmentering: noen er gule på glukose gjærekstrakt pepton-agar og andre har forskjellige nyanser av brun, rød, fiolett og lilla (Morris og Roberts, 1959). Medlemmer som tilhører denne slekten produserer ikke kjeder og er i stand til å bruke poly-beta-hydroksybutyrat (PHB) for vekst. Slekten inkluderer både dyre- og plantepatogener, samt noen miljømessige viktige arter. Spesielt er *B. xenovorans* (tidligere kalt *Pseudomonas cepacia*

deretter *B. cepacia* og *B. fungorum*) er kjent for å være katalase-positiv (påvirker pasienter med kronisk granulomatøs sykdom) og har evne til å nedbryte klororganiske sprøytemidler og polyklorerte bifenyler (PCB). Den bevarte RNA-strukturen Anti-hemB RNA-motiv finnes i alle kjente bakterier i denne slekten (Woods, 2006). På grunn av deres antibiotikaresistens og den høye dødeligheten fra tilhørende sykdommer, anses *B. mallei* og *B. pseudomallei* å være potensielle biologiske krigføringsmidler mot husdyr og mennesker.

#### 6.4 Antibiotikaresistens bekreftelse med MinION/ARMA/MiSeq

Videre ble gjort detektering med MinION, ARMA/WIMP og MiSeq som bekreftet at vinter prøver 2, 3 og høst prøve 16 hadde virulensgener og ARG som ble antatt. ARMA ble kjørt etter sekvensering ved MinION og resultatene kommer fra rådata «reads». Det ble registrert noen forskjeller mellom de uttrykte genene fra WIMP/ARMA-resultatene og når sekvensene ble 'assembled' til contigs, men essensen av de viktigste resistensgenene ble likt. Ifølge vedlegg 6 ble det funnet følgende resistensgener i de annoterte sekvensene fra prøve 2: *aph (3')-IIc*, Beta-lactam resistance *blaL1*. ResFinder finner ikke *blaL2*, men genet finnes i annotert sekvens (/locus\_tag="GWC78\_16625") og ble funnet i søk med NCBI resistance reference database. I prøve 3 ble det funnet *blaPAO* og dette er det samme genet som *ampC* fra annotert sekvens (/locus\_tag="RUTA3\_04862") som koder for Beta-lactam resistens. Prøve 16 hadde ble ingen resultater fra CGE ResFinder, og den fant ikke de to nye betalaktamasegenene.

Resultatene av Illumina MiSeq sekvenseringsresultater av prøven 16 viser at ble funnet følgende betalaktamase-gener R16: *bla\_1* og *bla\_2* (klasse-A betalaktamaser), en CTX-M-lignende og en KPC-lignende betalaktamase respektivt. I tillegg ble det også funnet resistensgener som koder for kobberresistensproteiner CopD,CopCM, arsenresistensprotein ArsH, effluks, arsenatreduktase (glutaredoksin) protein arsC, multidrugtransportør-underenhet MdtC, kromatresistensprotein (locus GWC77\_25220) og glyoksalase / bleomycinresistens / dioxygenase (locus GWC77\_25275). Prøve 2 MiSeq visste funn av Beta-laktamase-gener L1 og L2 og vises i figur 19 og vedlegg 6. Samtidig ble funnet resistensgener som koder for -arsenatreduktase (glutaredoksin) protein arsC, arsen resistensprotein ArsH, MerC familie kvikksølv, resistensprotein (locus GWC78\_00350) kvikksølvresistenssystem periplasmisk bindingsprotein merP, kvikksølvresistens co-regulator MerD, kobberresistenssystem multikopperoksidase (lokus GWC78\_04085), glyoksal bleomycinresistens / extradiol dioxygenase-familieprotein (locus GWC78\_06335), kobberresistensprotein B og HdeD-familie syre-resistent protein (locus GWC78\_21715). Prøve 3 ble funnet resistente gener som

multidrugs resistens protein («NMBU:RUTA3\_OO2I6», MdtB(A,G,C,E,L), Stp, Bmr3, NorM, bMRa, Emrk, MexB, MexF, BepE(f,c), MepB), OxB18, SugE, ampC i beta-laktamaser i annotert sekvens, kobberresistens, arsenresistens, arsenresistens, fenazinresistens som vises i vedlegg 6. Fenazinene er en klasse bakterieproduserte antibiotika med økt oppmerksomhet de siste årene. De består av en gruppe på over 100 forbindelser isolert fra naturlige kilder og består av flere tusen derivater som er blitt syntetisert ved kjemiske metoder.

### 6.5 Antibiotika sensitivitetstesting

Etter utført antibiotika sensitivitetstesting, ble det bekreftet at vinter 2018 prøve 2 var en resistent *Stenotrophomonas maltophilia*. Dette er en ny patogen, og stammen var resistent nesten mot alle antibiotika i testen, med unntak av Amikasin. Motstanden skyldes sannsynligvis iboende motstand, og ikke ervervet resistens. Dette ble i tillegg bekreftet ved Sanger-sekvensering, MinION, ARMA og MiSeq. *Stenotrophomonas maltophilia* er en fremvoksende, multidrug resistent, globalt opportunistisk patogen. Den økende forekomsten av nosokomiale og ervervede *S. maltophilia*-infeksjoner er av spesiell bekymring for immunkompromitterte individer, da dette bakterielle patogenet er assosiert med et betydelig forhold mellom dødelighet og tilfeller. *S. maltophilia* er en miljøbakterie som finnes i vandige naturtyper, inkludert plantehizosfærer, dyr, matvarer og vannkilder. Infeksjoner av *S. maltophilia* kan forekomme i en rekke organer og vev; organismen er ofte funnet i luftveisinfeksjoner. Denne gjennomgangen oppsummerer gjeldende litteratur og presenterer *S. maltophilia* som en organisme med forskjellige molekylære mekanismer som brukes for kolonisering og infeksjon (NCBI).

Vinter 2018 prøve 3 hadde bekreftet antibiotikaresistens bakterie *Pseudomonas fluorescens*, og det samme resultatet viste både Sanger-sekvensering, MinION, ARMA og MiSeq. Høst 2018 prøve 16 ble dessverre ikke testet for antibiotikaresistens-bakterie *Burkholderia spp. fordi at* veksten ble dårlig, men Sanger-sekvensering og MiSeq viste resistensgen, særlig viktig var funn av to klasse-A betalaktamaser *bla\_1* (CTX-M-lignende) og *bla\_2* (KPC-lignende).

Den translerte aminosyresekvensen til *bla\_2* genot ble pBLASTet mot proteindatabasen til NCBI. Det fantes ingen 100% identiske proteiner i databasen, men resultatet under viste det proteinet som lignet mest, og det proteinet er en Klasse-A beta-laktamase fra en *Paraburkholderia*-stamme som heter DHOM06.

## 7 KONKLUSJON

Hensikten med denne masteroppgaven var å se nærmere på den globale spredningen av multiresistente bakterier som er en stor trussel for menneskers helse. Årsaken med dette prosjektet var derfor å undersøke i miljøet etter antibiotikaresistente bakterier, dette fordi det ikke er gjort mange studier på antibiotikaresistens i miljøet. Miljøet er en viktig vei for å forårsake en infeksjon hos mennesker, og miljøet bidrar til økningen i antibiotikaresistens.

Kort oppsummert etter bruk av selektive medier, genotypiske analyser som PCR, Sanger sekvensering, MinION, ARMA, Disk Diffusjonstesting og MiSeq, ble det i vannprøvene påvist tilstedeværelse av ESBL og ESBL<sub>KARBA</sub> produserende bakterier. Multipleks-PCR kjøring viste antatt positive bånd for KPC, OXA-48, OXA, CTM-X, SFC1, NDM og VIM, uten at dette kunne bekreftes med sekvensering av PCR-produktene

Prøve 3 vinter 2018 var en *Pseudomonas fluorescens* som inneholder en rekke virulensgener. *P. fluorescens* er en Gram-negativ stav-bakterie og tilhører klassen Gamma *Proteobacteria*. Stammen finnes i familien *Pseudomonadaceae* og er en ikke-patogen saprofytt som finnes naturlig i jord og vannmiljø i omgivelsene. De kan finnes også på overflaten til planter. Stammen av *P. fluorescens* produserer et løselig, grønnlig fluorescerende pigment, derav navnet. *P. fluorescens* er en allsidig bakterie som kan degradere ulike miljøgifter (NCBI).

Prøve 2 Vinter 2018 ble bekreftet å være en multiresistent *S. maltophilia* som var bærer av Beta-lactamasegenene *blaL1* og *blaL2*. Stammen var resistent mot nesten all antibiotika i disk diffusjonstesting, med unntak av Amikasin. Motstanden skyldes sannsynligvis iboende motstand, og ikke ervervet resistens.

Prøve 16 høst 2018 denne prøven var et meget interessante på grunn av at det ble funnet to nye klasse-A betalaktamaser *bla\_1* og *bla\_2*. Ingen av disse betalaktamasene var identiske med tidligere deponeringer i proteindatabasene, og representerer derfor nye eller ikke-publiserte betalaktamaser. *Paraburkholderia* tilhører til *Burkholderia*-artene og danner en monofyletisk gruppe innenfor *Burkholderiales* rekkefølgen av *Betaproteobacteria*. Det er for tiden 48 gyldig navngitte arter som kan skilles fra nærliggende slekter (dvs. *Paraburkholderia*) (Woods, 2006). På grunn av deres antibiotikaresistens og den høye dødeligheten fra tilhørende sykdommer, anses *Burkholderia*-artene å være potensielle biologiske krigføringsmidler mot husdyr og mennesker.

Funnene i denne masteroppgaven antyder at forskning i vannmiljøet er veldig viktig på grunn av at dette bidrar til infeksjon hos mennesker og til en mulig spredning av antibiotikaresistens. Samtidig er det skremmende at det i Norge, som har en meget gunstig situasjon når det gjelder antibiotika-bruk, finnes antibiotikaresistente bakterier i ytre miljø som mange benyttes til rekreasjon for både dyr og mennesker.

## 8 KILDEHENVISNING

Aminov RI (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbio.* 1:134.: 10.3389/fmicb.2010.00134).

Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *J Infect Dev Ctries.* 2014 Apr 15;8(4):461-8. doi: 10.3855/jidc.3856.

Astrup, E., Elstrøm, P., Eriksen, H.-M., Kacelnik, O. & Litleskare, I. (2014). Antibiotikaresistens. In Folkehelse rapporten - Helsetilstanden i Norge. Oslo: Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/> (Lest: 20.01.2020).

Bajaj, P. et al.: Escherichia coli  $\beta$ -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology.* 2016; 7: 417. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00417>

BCCDC. (2014). Carbapenemase-producing organisms (CPO) fact sheet Tilgjengelig fra: [http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational%20Materials/Epid/Other/CPOBacteriaInBC\\_factsheet\\_feb7\\_2014.pdf](http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational%20Materials/Epid/Other/CPOBacteriaInBC_factsheet_feb7_2014.pdf) (Lest 11.02.2020)

Bennett, P.M.: Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 2008. 153 Suppl 1: p. S347-57.

Bioingenioren.no Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/> (Lest: 10.02.2020).

El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. M. M., El-Bialya, H. A. & Omaraa, A. M. A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8 (1): 36-48. doi: 10.1016/j.jrras.2014.10.007.

Canton, R. et al.: CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front. Microbiol.*, 02 April 2012 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>

Chantziaras, I. et al.: Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2014 Mar;69(3):827-34.

*Clin Microbiol Rev.* 2020 May 13;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.

Codjoe, F. et al: Carbapenem Resistance: A Review. *Med. Sci.* 2018, 6, 1; doi:10.3390/medsci6010001

Codjoe, F. S. & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, 6 (1): 1-28. doi: 10.3390/medsci6010001.

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

Davies, J. et al. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* September 2010 vol. 74 no. 3 417-433.

<http://mmlbr.asm.org/content/74/3/417.full.pdf&a=bi&pagenumber=1&w=100>

Doyle, M.P.: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th Ed. ASM Press, 2013

ECDC/EARS-Net surveillance data. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Nov.2019.

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>

ECDC/EMA. (2009). The bacterial challenge: time to react a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Technical report. Stockholm: ECDC. Tilgjengelig fra: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) (Lest: 21.02.2020).

EARS-Net surveillance data. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>

Fernandez, L. et al.: Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct; 25(4): 661–681. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/pdf/brjexppathol00255-0037.pdf>

Fleming, A. (1929). On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10 (3): 226-236. Tilgjengelig fra:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/pdf/brjexppathol00255-0037.pdf> (Lest: 15.02.2020).

Folkehelseinstituttet, FHI. <https://www.fhi.no/>

Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H. & Malhotra-Kumar, S. (2012). Current trends in culturebased and molecular detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (4): 1140–1146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318521/>

Granum, P.E.: Matforgiftning. Smitte gjennom mat og vann. Cappelen Damm AS, 2015.

Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1): 11-32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x

Harvey, R. A. & Ferrier, D. (2011). Lippincotts illustrated reviews: biochemistry. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Heir, E., et al.: Kan desinfeksjonsmidler bidra til bakteriell antibiotikaresistens? *Tidsskr Nor Legeforen* 2001; 121: 3201-6.

Helse- og omsorgsdepartementet. (2015). Nasjonal strategi mot antibiotikaresistens 2015–2020. Oslo: Helse- og omsorgsdepartementet. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/nasjonal-strategi-mot-antibiotikaresistens-2015-2020/id2424598/> (Lest:16.03.2020)

Hill, K.L. et al.: Gene Rearrangement in Eukaryotic Organisms. *Encyclopedia of Genetics*, 2001

Holten, K. B. & Onusko, E. M. (2000). Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American Family Physician Journal*, 62 (3): 611-20.

Huang, T.-D., Bogaerts, P., Berhin, C., Guisset, A. & Glupczynski, Y. (2010). Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6): 2091-2096. doi: 10.1128/JCM.02342-09.

Iredell, J. et al.: Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 2015;351:h6420 doi: 10.1136/bmj.h6420

James H. Jorgensen(2009) Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Tilgjengelig fra:

[file:///C:/Users/mvtam/AppData/Local/Temp/Temp1\\_Uten\\_navn\\_-\\_Melding.zip/Mic%20strip%20test.pdf](file:///C:/Users/mvtam/AppData/Local/Temp/Temp1_Uten_navn_-_Melding.zip/Mic%20strip%20test.pdf) (Lest: 16.03.20)

Folkehelseinstituttet. (2014). Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2014/2014-antibiotikaresistens.pdf> (Lest:16.03.2020)

Forebygging og kontroll av spredning av multiresistente gramnegative stavbakterier og ESBL-holdige bakterier i helseinstitusjoner. Folkehelseinstituttet. [www.fhi.no](http://www.fhi.no)

Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33 (3): 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP\_349\_15.

Khanna, Ashish; Khanna, Menka; Aggarwal, Aruna (February 2013). "Serratia Marcescens- A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients". <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592283/>

Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A. H., Kirschner, A., et al. (2016). Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Frontiers in Microbiology*, 7 (586).

Kolbert, C. P. & Persing, D. H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens *Current Opinion in Microbiology*, 2 (3): 299-305. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80052-6.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, 8 (6): 423-435. doi: 10.1038/nrmicro2333.

Kruse H, Antimicrobial Resistance – Epidemiological Aspects, 1994, s.9 – 29.

Kyndt T, Quispe D, Zhai H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G & Kreuze JF: *The genome of cultivated sweet potato contains Agrobacterium T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop*. *PNAS* May 5, 2015. 112 (18) 5844-5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419685112>

Leclercq, R., et al., EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, 2013. 19(2): p. 141-60

Lindstedt, B. (2019). Personlig kommunikasjon med hovedveileder og professor Bjørn-Arne Lindstedt ved NMBU. Ås (Høst 2019).



Livermore, D. M., on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug, D., Development, Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J., et al. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (9): 1941-1944. doi: 10.1093/jac/dkr262.

Madsen, Eugene L.; *Environmental microbiology. From genomes to biogeochemistry.* Blackwell Publishing, 2008.

MacGowan, A. & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45 (10): 622-628. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.07.006.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015). *Brock biology of microorganisms.* Harlow: Pearson Education

Matuschek, E., Brown, D. F. J. & G., K. (2013). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (4): O255–O266. doi: 10.1111/1469-0691.12373.

Morris, M. B. and J. B. Roberts. 1959. A group of pseudomonads able to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Nature (Lond.)* 183: 1538–1539. Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.

*Microbiol Spectr.* 2018 Jun;6(3). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017. Norman, A. et al.: Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2009 Aug 12; 364(1527): 2275–2289. doi: 10.1098/rstb.2009.0037

NCBI. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans Stock. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187640/>

Normann, P. et al.: Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. 2011 Oct; 17(10): 1791–1798. <https://dx.doi.org/10.3201%2F1710.110655>

NORM/NORM-VET, 2016

[PLoS Biol.](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533) 2016 Aug; 14(8): e1002533. Tilgjengelig: 2016 Aug 19. doi: [10.1371/journal.pbio.1002533](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533)

Rawat, D. & Nair, D. (2010). Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2 (3): 263-74. doi: 10.4103/0974-777x.68531.

Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 1995; 141 ( Pt 12): 3015-3027

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (1): 90-101. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002.

Slama, T. G. (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, 12 (Suppl 4): 7.

Spratt, B.G. et al.: Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. 1999 Apr 29; 354(1384): 701–710 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1692550/#>

Steinbakk, M., Sunde, M. M., Urdahl, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B.-T., Bonhorst, J. Ø., Nielsen, K. M., Lindbæk, M. & Bjørnholt, J. V. (2014). Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Rapport fra tverrsektoriell ekspertgruppe. Folkehelseinstituttet: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2014/2014-antibiotikaresistens.pdfOslo>.

Store Norske Leksikon, <http://www.Snl.no>

Stalder, T. et al.: Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in microbiology*, 2012; 3: 119.

Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Gröger, T. & Wiedemann, B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities of strains of ‘unusual’ *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (4): 865-885.

Sundsford A, Simonsen GS, Haldorsen B, Lundblad EW, Samuelsen Ø. Bredspektrede betalaktamaser hos gramnegative bakterier. *Tidskr. Nor. Legeforen.* 2008;128:2741-2745.

Sunde M. Antibiotic resistance in bacterial normal flora. Studies involving epidermal staphylococcal species and intestinal *Escherichia coli*. Doctor Medicinæ Veterinariæ. Institutt for farmakologi, mikrobiologi og næringsmiddelhygiene: Norges veterinærhøgskole; 2001.

Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (9): 1842-1852. doi: 10.1093/jac/dkq217.

Trude, H. et al.: Antibakteriell resistens med vekt på betalaktamaser. Tilgjengelig fra: <https://www.tannlegetidende.no/i/2002/1/dntt-18045> (Lest:21.02.2020)

Thougaard, H., Varlund, V. & Madsen, R. M. (2009). *Mikrobiologi*. 3 ed. København: Nyt Teknisk Forlag.

Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats *Pharmacy and Therapeutics*, 40 (4): 277-283

Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D. & Hashsham., S. A. (2017). Antimicrobial resistance in the environment. *Water Environment Research*, 89 (10): 921-941. doi: 10.2175/106143017X15023776270179.

Webber, M.A. et al.: The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 51, Issue 1, 1 January 2003, Pages 9–11, <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>

Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., JohnsonRollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., Otten, W., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet*, 13 (2): 155-165. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2012). *Prescott's principles of microbiology*, international edition, 10th ed., 2009. New York, USA: McGraw-Hill.

WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Woerther, P., et al.: Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811232/#B5> (Lest:11.02.2020)

Woods DE, Sokol PA (2006). "The genus *Burkholderia*". In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.). *The Prokaryotes—A Handbook on the Biology of Bacteria*.

[https://archive.org/details/The\\_Prokaryotes\\_Vol.\\_1\\_Symbiotic\\_Associations\\_Biotechnology\\_Applied\\_Microbiology](https://archive.org/details/The_Prokaryotes_Vol._1_Symbiotic_Associations_Biotechnology_Applied_Microbiology)

Yazdankhah, S. et al.: Historien om antibiotika. Tidsskr. Nor. Legeforen. 2013; 133: 2502-7.

Zhang, X.-X., Zhang, T. & Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. Applied Microbiology and Biotechnology, 82 (3): 397-414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z.

## 9 VEDLEGG

### Vedlegg 1

BLAST resultater fra 16S rRNA fra høst prøver

>67JH86\_61145016\_61145016

ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATAC  
GTTAGTGTGTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGG  
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTAAAGCCCC  
GGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGCTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGG

>67JH87\_61145023\_61145023

ACTAAGCTACTATCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTC  
ACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT  
ACGATCGGTTTTGTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGT  
AGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTT  
AGAGTGCCACCATGACGTGCTGGTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTC  
ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAG  
TTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCGTCATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC  
TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTCCGCACTGGTGTTCCTC  
CTATATCTACGCATTCACCGCTACACAGGAAATCCACCACCTTACCATACTCTAGCTTGTGAGTTTTGAAT  
GCAGTTCACAGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAATTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCCAGTAA  
TTCCGATTAACGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGT  
AACGTCAAAACACTAACGTATTAGGTTAATGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGAACC

>67JH88\_61145030\_61145030

AAGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCGATGGAGGGGG  
ATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACAC  
CATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAAGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGT  
CTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT  
TCAGCGAGGAGGAAGGGTTCGGTGTTAATAGCACCGTTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC  
AGGCGGTTTGTAAAGTCATATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGA  
GTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA

>67JH89\_61145047\_61145047

CTACTATCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTA  
GCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACA  
TACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGTTCGCTTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTA  
CTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCC

CACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACG  
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGG  
ATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCG  
TCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCGAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCA  
CGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC  
CCCACGCTTTTCGACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTA  
CGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCTTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCC  
AAGTTAAGCTCGGGGATTTACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTA  
ACGCTTGACCCCTCCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAAT  
GAACGGTGCTATTAACACCGAACCTTCCTCCTCGTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACAC  
GCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGACCG  
G

>67JH90\_61145054\_61145054

AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTGAGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGGGTAGAATTC  
CACGTGTAGCACTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGC

>67JH91\_61145061\_61145061

GCCCACTTCTGGTAAAACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGC  
GACATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAATTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAT  
ACACTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGTTGGCGGCCCTCTGTATGTACCATTGTATGACGTGTGAAGCCC  
TACCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCATTAGAGT  
GCCCTTTCGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT  
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGATGGTTCTTTTCGAGCACTCCCAAATCTCTTCGGGATTCCATCCATG  
TCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCA  
ATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCCGTA CTCCCGAGGCGGTCTACTTCACGCGTTAGCTGCGTTACCAAGTCA  
ATTAAGACCCGACA ACTAGTAGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCAC  
GCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGTATCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTCCACATATCTACGCA  
TTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCTCTGACACACTCTAGCCGTGACGTCTCAAATGCAATTCAGGT  
TGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTTACACAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGC  
TTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTCAGGTACCGTCATTAGTA  
ATAGTTATTCGCTACTACCGTTTTCTCCCTGACAAAAGAG

>67JH92\_61145078\_61145078

GAGAGTAGCAACTGCGGTGGCGACCGGCAAACGGGTGCGGAACACGTACGCAACCTTCCTTCAAGCGGGGA  
ATAGCCAGAGAAATTTGGATTAATACCCCATAGGAATGTAGTCTCGCATGAGACAGCATTAAAGATTTATCA  
CTTGAAGATGGGCGTGCCTGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGCCGACGATCAGTA ACTG  
GCGTGAGAGCGCGACCGTACACGGGCACTGAGACACGGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGA

ATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGGAGGATGAATGCCCTCTGGGTTGTAACTT  
CTTTTATCTGGGACGAAACACTTCTTATCTAAGGAGCTTGACGGTACCAGATGAATAAGCACCGGCTAACTCCG  
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCGGATTCACTGGGTTTAAAGGGTGCCTAGGCG  
GATGTGTAAGTCTGTGGTAAAATCTCTGAGCTTAACTCAGAACTGCCGTGGATACTATATGTCTTGAATGTTG  
TGGAGGTTAGCGGAATATGTCATGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATGACATAGAACACCGATTGCGAAGGCA  
GCTGGCTACACAATATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
CACGCCCTAAACGATGGATACTCGACATTTGCGATATATTGTAAGTGTCTGAGCGAAAGCATTAAAGTATCCCAC  
CTGGGAAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGTCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
GTTTAATTCAATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGCTAGAATGCAGTCTGACCGTGGATGAAAGTTCACTTT  
GTTAGCAATACACAGAATTGTAAGGTGCTGCATGGCCTGTCTCACCTCC

>67JH93\_61145085\_61145085

CACGGGTCCCCCGGCTTTCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGTCCGGGAACGTATTCACCGTATCATT  
GCTGATATACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGAGATAGAG  
TTTTTGAGATTAGCAGCATGTTACCATGTAGCAGCCCTTGTCTCTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGGC  
ATAAAGGCCATGATGACTTGACATCATCCCTCCTTCCTCGCGTCTTACGACGGCAGTTTCACTAGAGTTCCAC  
CTTGACGTGCTGGCAACTAGTGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACGGCACGAGC  
TGACGACAGCCATGCAGCACCTTACAATCTGTGATTGCTACAAAGTGAACTTTCATCCACGGTCAGACTGCAT  
TCTAGCCCAGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGACCCCCGTCA  
ATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTTCCCAGGTGGGATACTTAATGCTTTGCTCAGACACTTACAAT  
ATATCGCAAATGTCGAGTATCCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGC  
TTTCTGTCCTCAGCGTCAATAGTTGTGTAGCCAGCTGCCTTCGCAATCGGTGTTCTATGTCATATCTAAGCATT  
CACCGCTACATGACATATTCCGCTAACCTCCACAACATTCAAGACATATAGTATCCACGGCAGTTTCTGAGTTAA  
GCTCAGAGATTTACCACAGACTTACATATCCGCCTACGCACCCTTTAAACCCAGTGAATCCGGATAACGCTTG  
CACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCATCTGGTACCGTCAAGCTCCTTA  
GATAAGAAGTGTTCGTCCCAGATAAAAGAAGTTTACAACCCAGAGGGCATTATCCTCCACGCGGCATGGCT  
GGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCGGGCCCGTGTC

>67JH94\_61145092\_61145092

AACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA  
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAG  
CAATCGTTAATACCCGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGAAGGGTGAAGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTATTAAAGTCC  
GTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCAGTGAATGTGGTAGAG

>67JH95\_61145108\_61145108

CTGCTACCTGCTTCTGGTGAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACAGTATT  
CACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGG

ACTGAGATTAGGTTTCTGGGATTGGCTCACCTCGCGGGATTGCAGCCCTCTGTCCTAACCAATTGTAGTACGTG  
TGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCGGTCTC  
CTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT  
CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTACGGTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGA  
AAGTTCCGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGT  
GCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGC  
TTCGATACTGCGTGCCAAGTTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA  
TCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTCAATGTTGGTCCAGGTAGCCGCCTTCGCCACGGATGTTCC  
TCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCAGGAATTCGCTACCCTCTACCACATTCTAGTGACCCAGTATCC  
ACTGCAATTCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAACGGACTTAAATCACCACTACGCACGCTTACGCCCCAG  
TAATTCGAGTAACGCTTGCACCTTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTCTTTG  
GGTACCGTCAGAACAACCGGGTATTAACCGATTGCTTTTCTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCC  
TTCTCACCCAC

>67JH96\_61145115\_61145115

GACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG

>67JH97\_61145122\_61145122

TCGACTAGCCACTTCTGGTAAAACCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATT  
CACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGGA  
CTACGATCGGTTTTCTGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTTCCGACCATTGTATGACGTGT  
GAAGCCCTACCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCC  
TTAGAGTGCTCTTGCCTAGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC  
ACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCGACGGTCTCTTTGAGCACGACCACCTCTCAGCGGCCTTCC  
GTCCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTC  
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTAC  
TAAGGAAATGAATCCCCAACAAGTGTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGC  
TCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGCCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTCCACATCT  
CTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGCCATACTCTAGCCTGCCAGTACCAATGCAGTT  
CCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCGGTCTTAGCAAACCGCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGA  
TTAACGCTCGACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTATTCTTCCGGTACCGTC  
ATCCACCACCGT

>67JH98\_61145139\_61145139

ACGGGGCTAGCATTGCTCGGAATTAAGGGGAGCGTAGGCGGACTGTTTATTCG

>67JH99\_61145146\_61145146

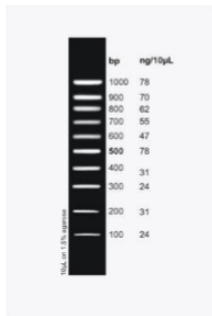
GTCAGCGCCTTCGGGTAAAGCCAACCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA  
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAATTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAATCCGAAGT  
AGACGACTTTTAGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGATTGCAGCCCTCTGTAGTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAG

CCCACCCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGGATTA ACTCCGGCAGTACGATTAG  
AGTGCCAGCCAAACCTGATGGCAACTAATCGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC  
GACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCCAGTCCCCGAAGGGAAAGCCACATCTCTGTGGCGG  
TCCGGGCATGTCAAAGGTGGTAAGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC  
GTCACCGACATGCATGCATGCCGACA ACTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG  
TTTGCTCCCCACGCTTCGAGCCTCAGCGTCAGTAACGGACCAGTATGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGA  
ATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAGTTCCACATACCTCTTCCGTA CTCAAGACTGCCAGTATCAAAGGC  
AATCCAAGGTTGAGCCCTGGGCTTTCACCTCTGACTAAACAGTCCGCCTACGCTCCCTTTACGCCAGTAATTC  
CGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGGTAC  
CGTCATTATCGTCCCCGGTGAAAGAATTTACAATCCTAAGACCTTCATCATT CAGGCGGCATGGCTGCGTCAG  
GCTTCGCCCATGCGCAGAATTCCCCACTGCTGCCTCCCCTAGGA



## Vedlegg 2

Vannprøver fra høst 2018

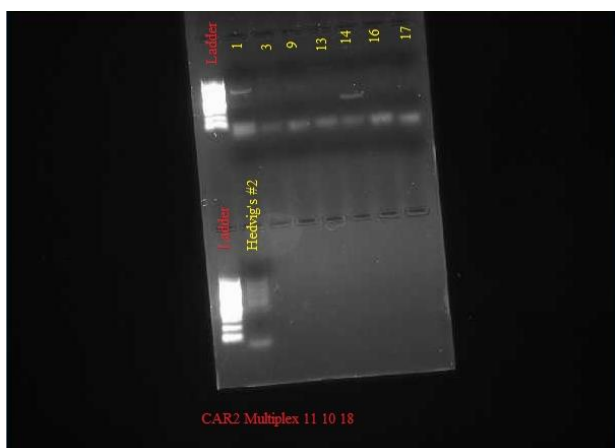


Figur A.1 Bilde av 100 bp ladder som ble brukt som størrelsemarkør

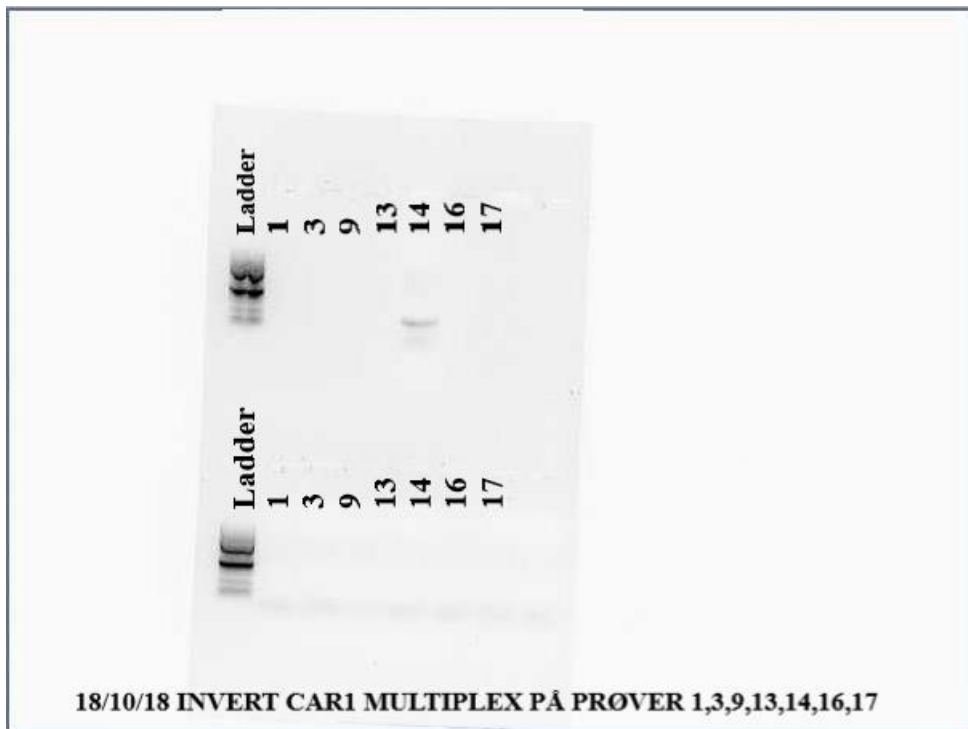
### CAR primere



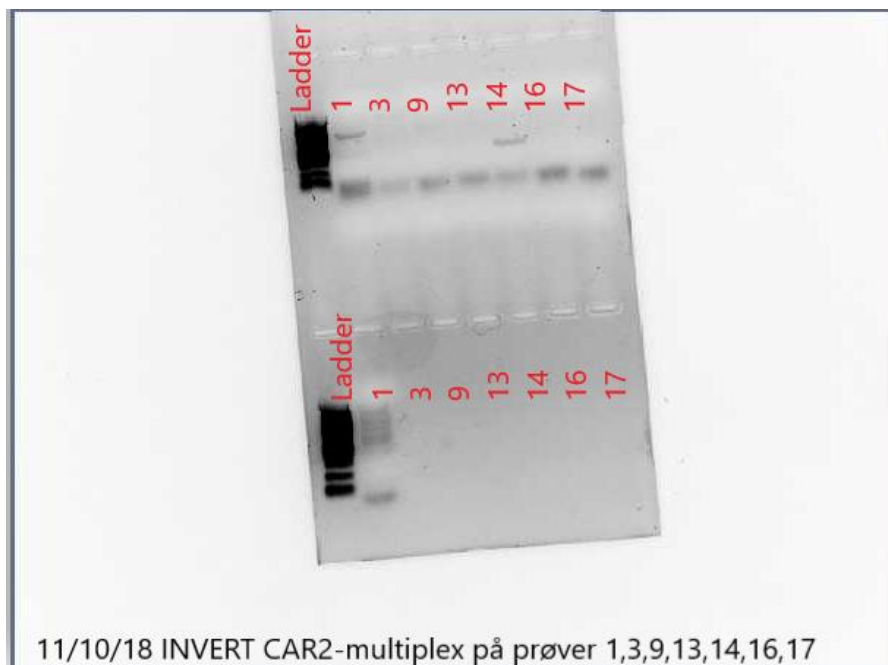
Figur A.2: Gelbilde av Multiplex PCR med CAR1 og CAR2 primere fra høst vannprøver 2018. Brønn Hedviger positiv kontroll..



Figur A.3: Gelbilde av Multiplex PCR med CAR 2 primere fra høst vannprøver 2018

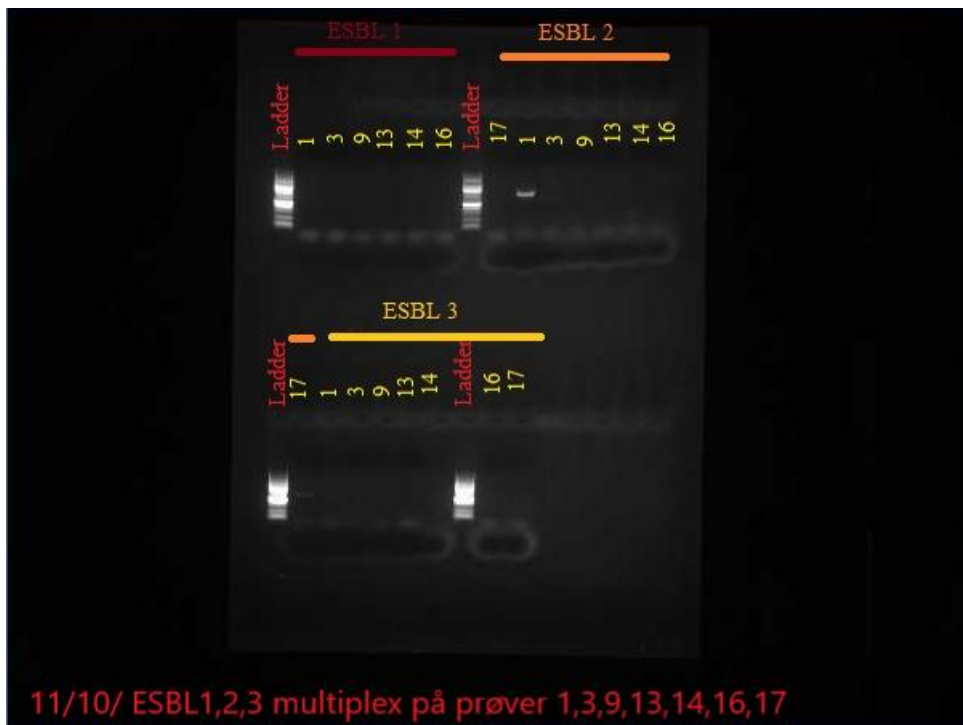


Figur A.4: Invert gelbilde av CAR1 multiplex PCR på vannprøver fra høst 2018



Figur A.5: Invert gelbilde av CAR2 multiplex PCR på vannprøver fra høst 2018 Positive prøve 1 og 14 settes opp på ny gel for konfirmasjon av bånd.

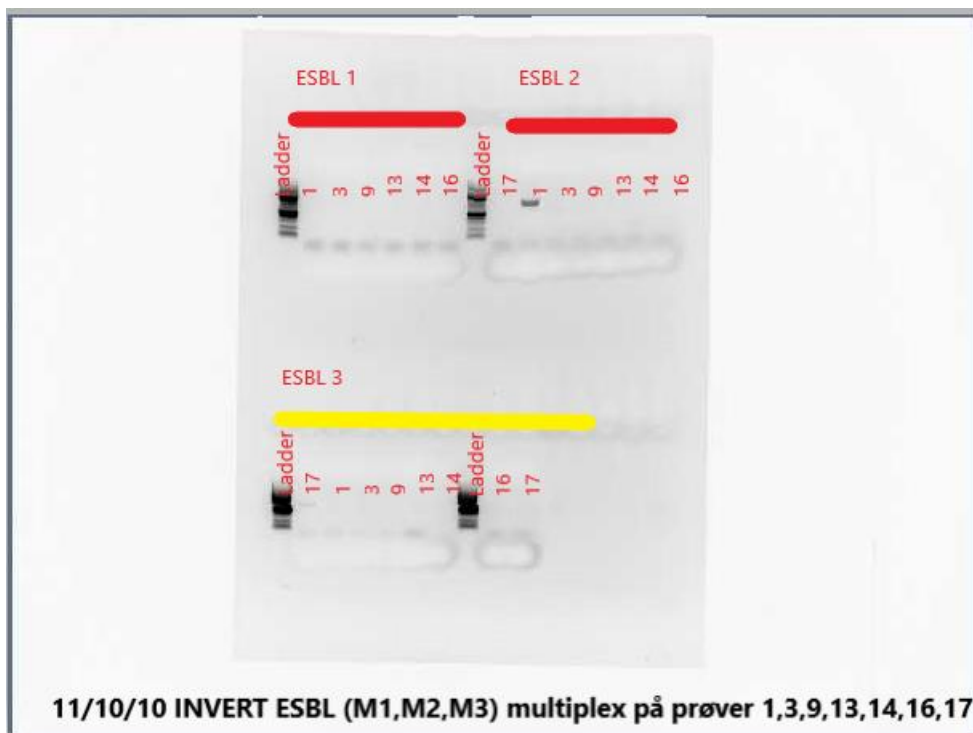
### ESBL primere



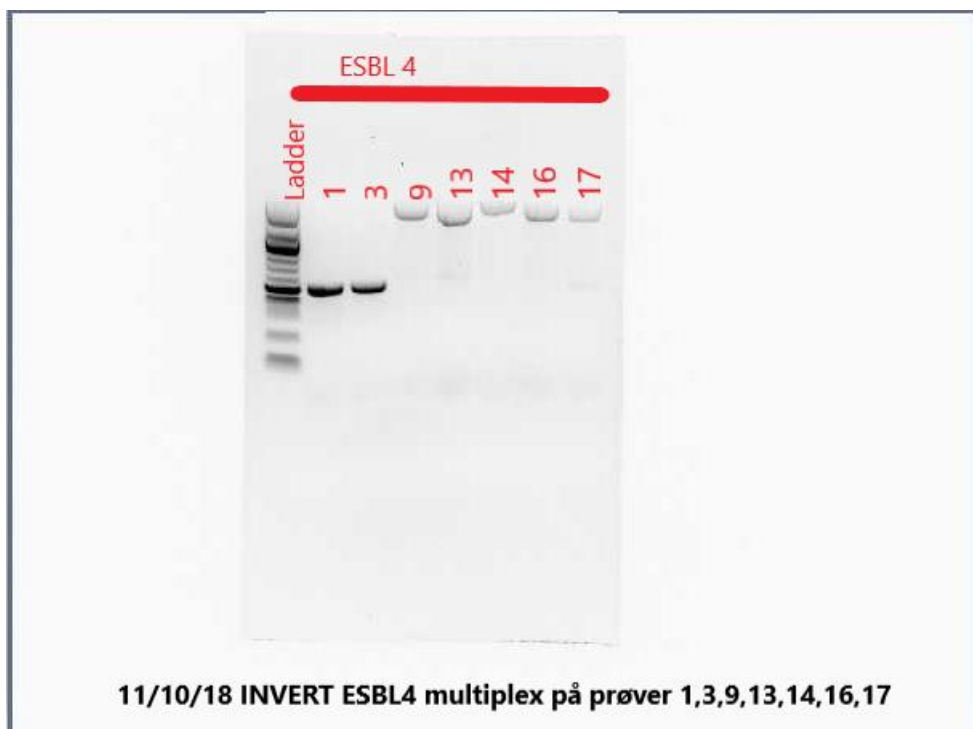
Figur A.6 Gelbilde med tre ESBL ( M2,M2,M3) multiplexer på vannprøver fra høst 2018. Positive prøve 1 og 17 settes opp på ny gel for konfirmasjon av bånd.



Figur A.7 Gelbilde med en ESBL (M4 ) multiplex på vannprøver fra høst 2018. Positive brønn 1 og 3 settes opp på ny gel for konfirmasjon av bånd.



Figur A.8 Invert gelbilde av tre ESBL(M1,M2,M3) multiplex PCR på vannprøver fra høst 2018 .Positive prøve 1 og 17 settes opp på ny gel for konfirmasjon av bånd.



Figur A.9 Invert gelbilde av en ESBL(M4) multiplex PCR på vannprøver fra høst 2018.Det alle resultater viser har positive resultater, men settes opp på ny gel for konfirmasjon av bånd.

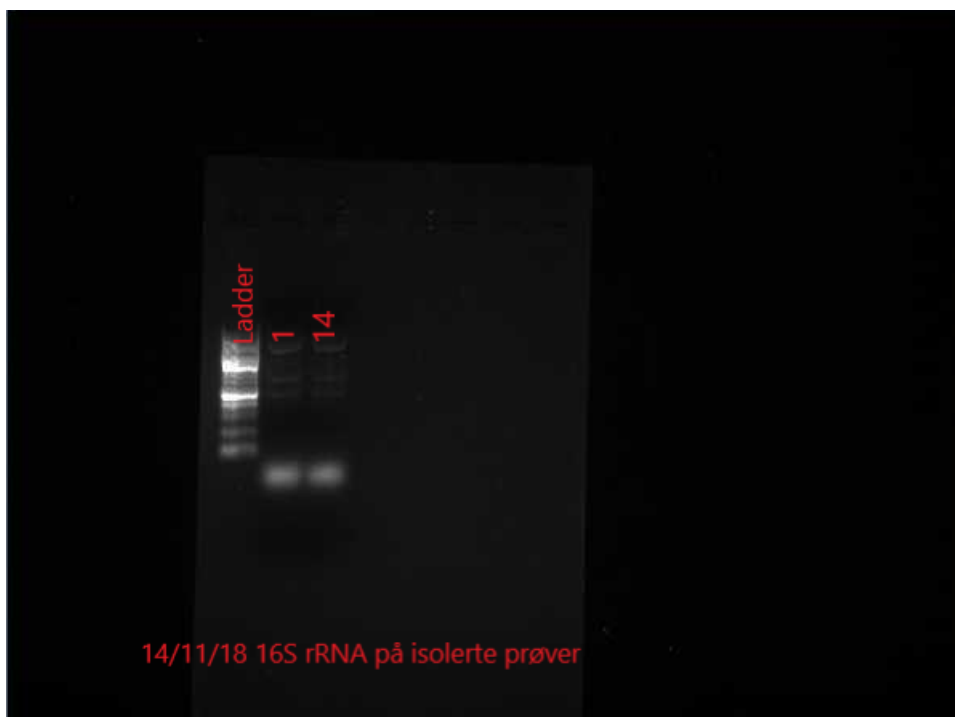


Figur A.10 Gelbilde av ESBL2 og CAR2 singlepex på brønn 1 og 14

Positive bånd er ESBL2 brønn 1 og 14 usikker.

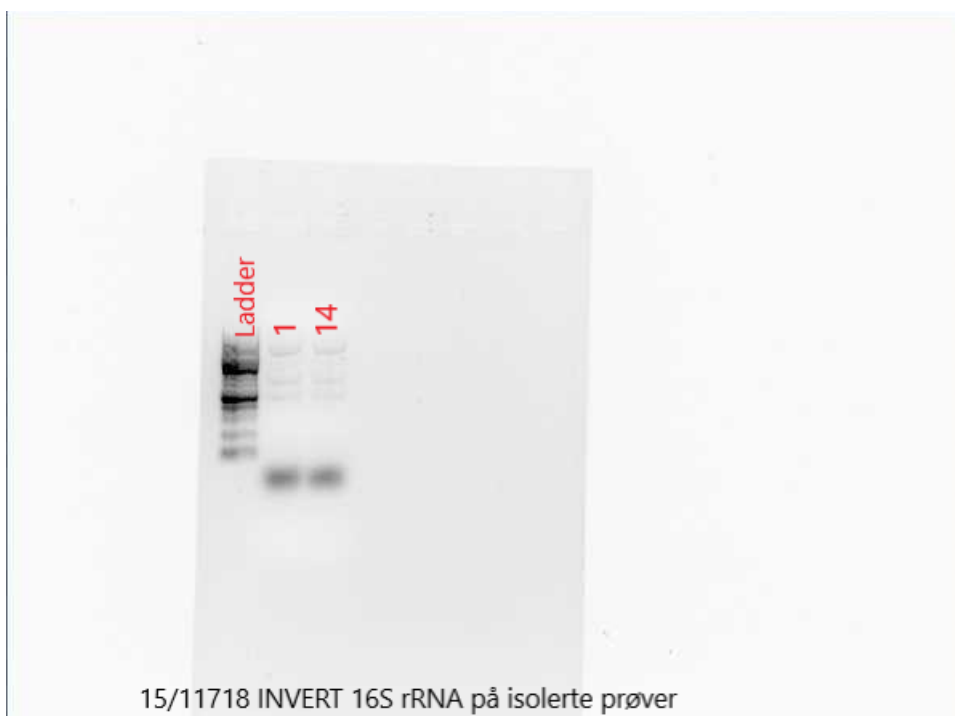


Figur A.11 Invert gelbilde av ESBL2 og CAR2 singlepex på positive brønn 1 for CTX-M (Gr.1) – 688bp.



Figur A.12 Gelbilde av 16S rRNA PCR på vannprøver 1 og 14.

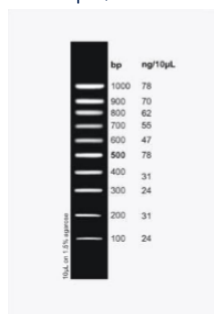
Positive brønn 1 og 14 og kan være positive.



Figur A.13 Invert gelbilde av 16S rRNA på positive prøver.

### Vedlegg 3

Vannprøver fra vinter 2018



Figur A.1 Bilde av 100 bp ladder som ble brukt som størrelsemarkør

### CAR primere



Figur B.1 Gelbilde av multiplex CAR2 på vannprøver fra vinter 2018.

Bånd kan være positive og settes opp på ny gel for konfirmasjon.



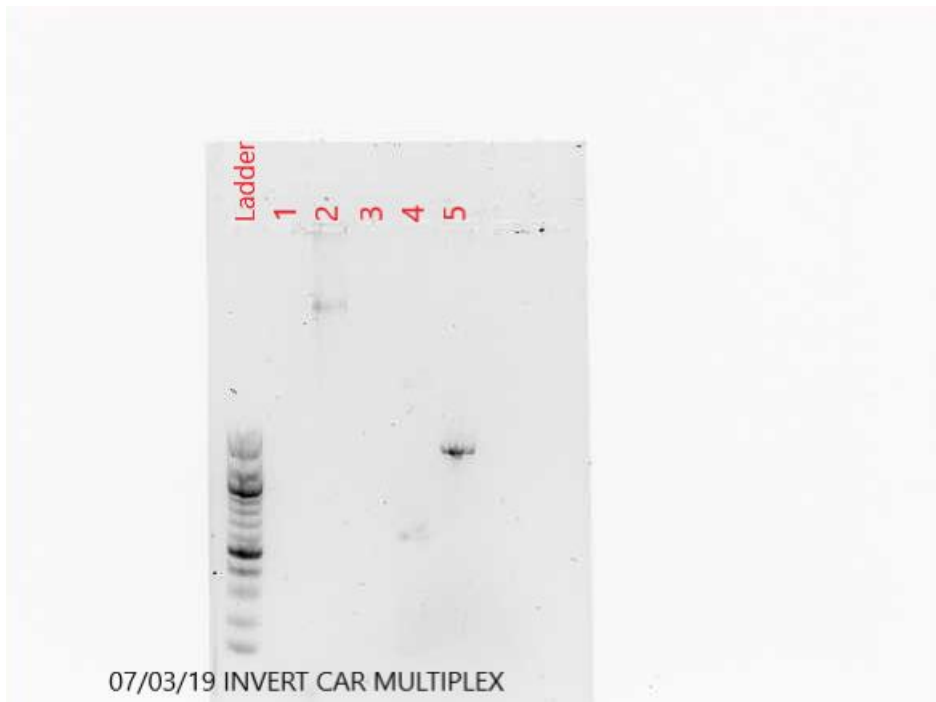
Figur B.2 Invert gelbilde av multiplex CAR2 på vannprøver fra vinter 2018.

Bånd kan være positive prøvene settes opp på ny gel for konfirmasjon



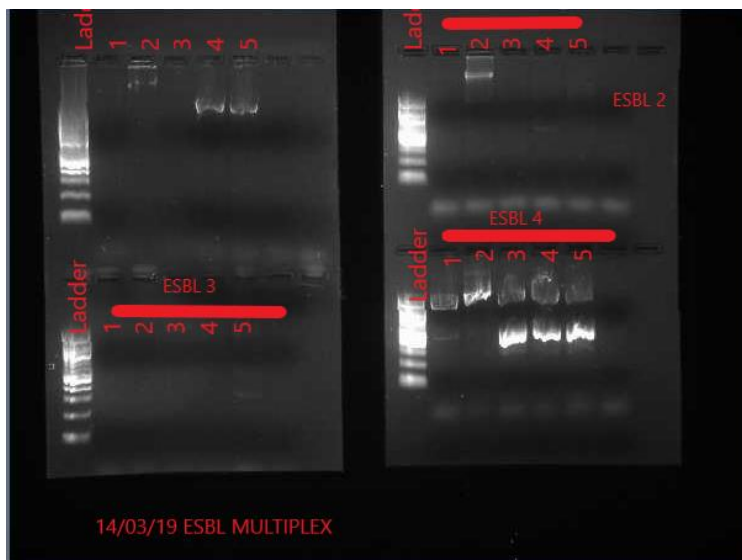
Figur B.3 Gelbilde av multiplex CAR 1 og kan være positive 1 bånd, men den er utenfor aktuelt område. Primere størrelser på 188,281,393 og 564 basepar (blir CMY2-F, OXA48-F, IMP-F)



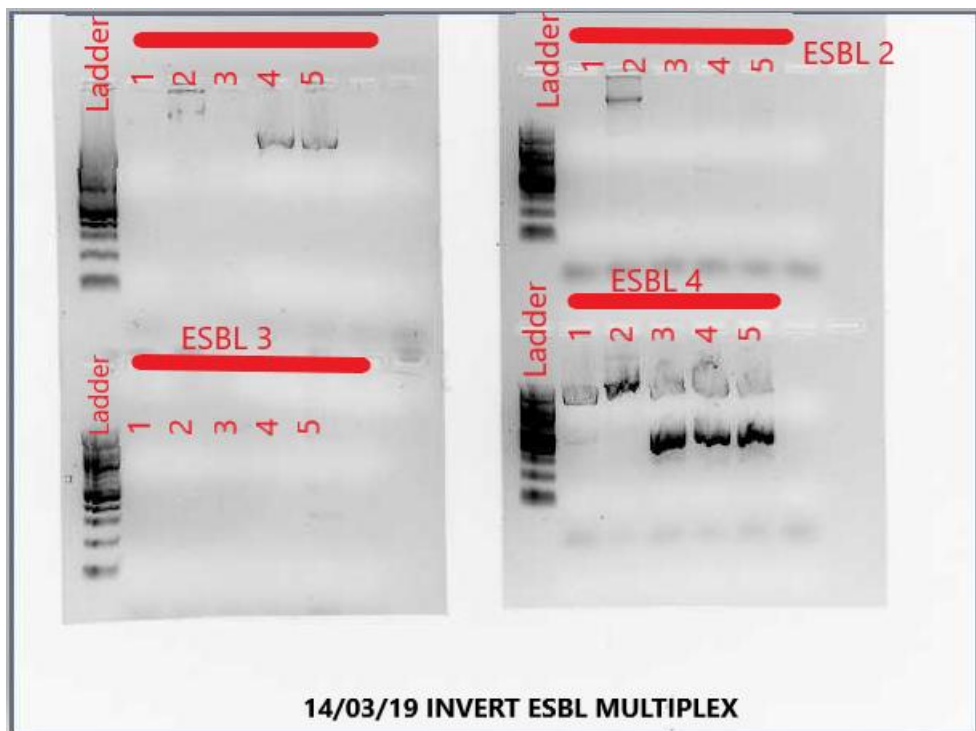


Figur B.4 Invert gelbilde av multiplex CAR på vannprøver fra vinter 2018. Positiv brønn 5.

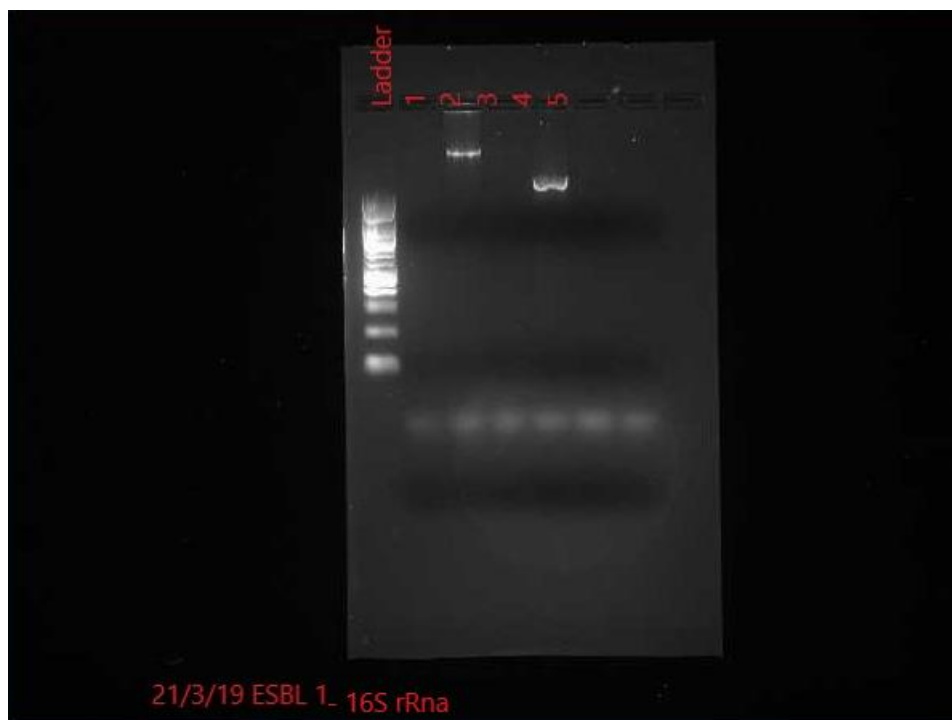
#### ESBL PRIMERE



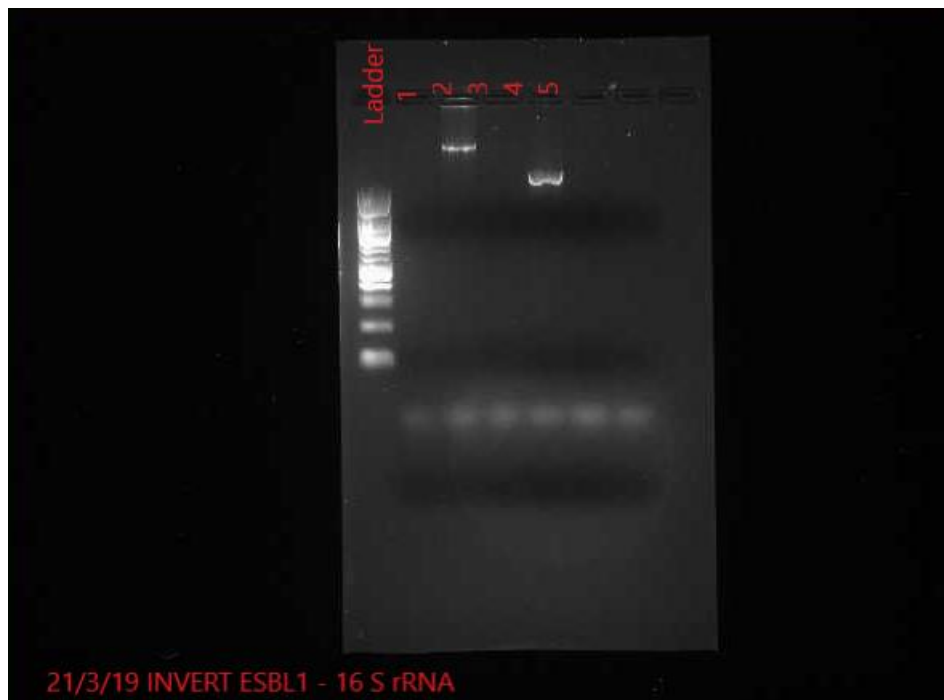
Figur B.5 Gelbilde av Multiplex PCR med fire ESBL multiplexer på vannprøver fra vinter 2018. ESBL primermix M1 har primere størrelse på 281 bp, 404 bp, 564 bp, og 713 bp på brønn 4 og 5. ESBL4 ble testet for om PCR kjøring fungerer.



Figur B.6 Invert gelbilde av fire ESBL multiplex.







Figur B.7 Gelbilde av ESBL 1/ 16S rRNA og to positive bånd. Men også disse ligge utenfor aktuelt område, større enn 1000 bp, mens den største primeren i den mixen er på 713 bp .



Figur B.8 Invert gelbilde av 16S rRNA og positive 2 bånd, men også disse utenfor aktuelt område. Det virker positive resultater av brønn 2 og 5.

Vedlegg 4

Bilder av Disk diffusjons resultater

	<b>Ruta Sample 3 Barcode 8 Winter 2018 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Round 1</b>	<b>Ruta Sample 2 Winter 2018 Round 1</b>
<b>Ampicillin</b>	 <p>Round 1: <b>more than 256 mg/L</b></p>	 <p><b>No in.</b></p>
<b>Gentamicin</b>	 <p>Round 1: 0.12 mg/L</p>	 <p><b>16</b></p>

**Streptomycin**



Round 1: 1.5 mg/L



48

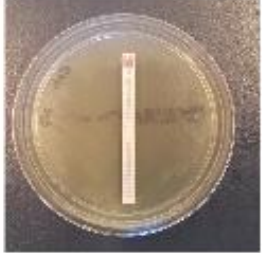





**Cefotaxime**









Round 1: 32 mg/L



No in.

<p><b>Colisitin</b></p>	 <p>Round 1: 0.5 mg/L</p>	 <p>Round 2: 12</p>
<p><b>Ciprofloxacin</b></p>	 <p>First round: 0.6 mg/L</p>	 <p>0.5</p>
<p><b>Erythromycin</b></p>	 <p>First round: more than 256 mg/L</p>	 <p>16</p>

<p><b>Amoxicillin with clavulanic acid</b></p>		
	<p>First round: <b>more than 256 mg/L</b></p>	<p><b>No In.</b></p>
<p><b>cefepime</b></p>		
	<p>First round: 3 mg/L</p>	<p><b>32</b></p>
<p><b>Amikacin</b></p>		
	<p>Round 1: 0.03 mg/L</p>	<p><b>8</b></p>

## Vedlegg 5

Resultater av annoterte genom ved ResFinder av vinterprøver prøve 2 og 3 og fra høst prøve 16.

### Prøve 2:

Aminoglycoside						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
aph(3)-IIC	97.54	813 / 813	contig00003 len=312505 cov=35.3 cor=0 origname=NODE_3_length_312505_cov_35.338555 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20190827	5051..5863	Aminoglycoside resistance	AM743169
Beta-lactam						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
bla11*	89.84	797 / 870	contig00003 len=312505 cov=35.3 cor=0 origname=NODE_3_length_312505_cov_35.338555 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20190827	305103..305897	Beta-lactam resistance	EF126059

\*ResFinder finner ikke bla2, men genet finnes i annotert sekvens (/locus\_tag="GWC78\_16625") og ble funnet i søk med NCBI resistance reference database.

Figur 1: oversikt av vinter prøven 2 ved ResFinder.

### Prøve 3:

Beta-lactam						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
blaPAO*	70.98	927 / 1194	contig00026 len=83795 cov=41.3 cor=0 origname=NODE_26_length_83795_cov_41.289310 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20190829	42013..42916	Beta-lactam resistance	FJ666073

\*Dette er ampC fra annotert sekvens (/locus\_tag="RUTA3\_04862").

Figur 2: oversikt av vinter prøven 3 ved ResFinder.

### Prøve 16:

Ingen resultater fra CGE ResFinder, den finner ikke de to nye betalaktamasegenene.

Figur

3: oversikt av høst prøven 16 ved ResFinder.



## Vedlegg 6

Resultater fra helgenomsekvensering med Illumina MiSeq.

### Prøve 2 – Søk etter resistensgener i annotert sekvens.

#### Kvikksølvresistens:

/product="MerC family mercury resistance protein"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_00350"

/product="mercury resistance system periplasmic binding protein MerP"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_03920"

/product="mercury resistance co-regulator MerD"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_03930"

Referanse:

[Front Microbiol.](#) 2012; 3: 349.

Published online 2012 Oct 8. Prepublished online 2012 Aug 27.

doi: [10.3389/fmicb.2012.00349](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00349)

#### Kobberresistens/metallresistens:

/product="copper resistance system multicopper oxidase"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_04085"

/product="copper resistance protein B"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_16780"

/product="CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_04015"

/product="Co<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> efflux protein ApaG"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_08735"

/product="CDF family Co(II)/Ni(II) efflux transporter  
DmeF"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_20535"

Referanse:

[Cell Biol Toxicol](#). 2013; 29(6): 397–405.

Published online 2013 Sep 27. doi: [10.1007/s10565-013-9262-1](https://doi.org/10.1007/s10565-013-9262-1)

#### **Arsenresistens:**

/product="arsenate reductase (glutaredoxin)" ArsC

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_02540"

product="arsenical resistance protein ArsH"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_18305"

/product="ACR3 family arsenite efflux transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_18290"

Referanse:

[Biomed J](#). 2016 Feb; 39(1): 5–13.

Published online 2016 Apr 1. doi: [10.1016/j.bj.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.08.003)

#### **Bleomycinresistens:**

/product="glyoxalase/bleomycin resistance/extradiol  
dioxygenase family protein"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_06335"

#### **Syreresistens:**

/product="HdeD family acid-resistance protein"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_21715"

#### **Effluks:**

/product="multidrug efflux ABC transporter SmrA"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_00250"

«Kloning og ekspresjon av *smrA* i *Escherichia coli* ga økt resistens mot strukturelt ubeslektede forbindelser, inkludert fluorokinoloner, tetracyklin, doxorubicin og flere fargestoffer. Videre reduserte uttrykket av *smrA* i *E. coli* både norfloxacinopptaket og norfloxacinutskillelsen.»

- PMID: **19643774**
- DOI: [10.1093/jac/dkp271](https://doi.org/10.1093/jac/dkp271)

/product="MATE family efflux transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_00650"

/product="efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_02305"

/product="multidrug efflux RND transporter permease subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_02310"

/product="QacE family quaternary ammonium compound efflux SMR transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_03205"

/product="quaternary ammonium compound efflux SMR transporter SugE"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_09710"

/product="MacB family efflux pump subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_04970"

Referanse: [Front Microbiol.](#) 2018; 9: 950.

Published online 2018 May 28. doi: [10.3389/fmicb.2018.00950](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00950)

/product="DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_10010"

/product="MexH family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_11735"

/product="multidrug efflux MFS transporter permease subunit EmrB"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_15440"

/product="multidrug efflux MFS transporter periplasmic adaptor subunit EmrA"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_15445"

/product="multidrug efflux transporter outer membrane subunit EmrC"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_15450"

/product="multidrug efflux system transcriptional regulator EmrR"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_15455"

/product="fluoride efflux transporter CrcB"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_17560"

/product="Bcr/CflA family efflux MFS transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_18875"

/product="multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit SmeA"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_20800"

/product="multidrug efflux RND transporter permease subunit SmeB"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_20805"

/product="multidrug efflux transporter outer membrane subunit SmeC"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_20810"

/product="efflux transporter SmeDEF transcriptional repressor SmeT"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_21565"

/product="multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit SmeD"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_21570"

/product="multidrug efflux RND transporter permease subunit SmeE"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_21575"

/product="multidrug efflux RND transporter outer membrane subunit SmeF"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_21580"

### **Prøve 16 – Søk etter resistensgener i annotert sekvens.**

#### **Arsenresistens:**

/product="arsenical resistance protein ArsH"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_05020"

/product="arsenate reductase (glutaredoxin)" ArsC

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_21880"

/product="ACR3 family arsenite efflux transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_25265"

#### **Kobberresistens/metallresistens:**

/product="copper resistance protein CopD"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_05040"

/product="copper resistance protein CopC"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_11620"

/product="chromate resistance protein"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_25220"

/product="chromate efflux transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_20335"

/product="Co<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> efflux protein ApaG"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_23955"

#### **Effluks:**

/product="multidrug transporter subunit MdtC"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_24030"

/product="efflux transporter outer membrane subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_00305"

/product="DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_01650"

/product="Bcr/CflA family efflux MFS transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_01865"

/product="QacE family quaternary ammonium compound efflux SMR transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_06650"

/product="EmrA/EmrK family multidrug efflux transporter periplasmic adaptor subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_07015"

/product="MacB family efflux pump subunit"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_08950"

/product="MATE family efflux transporter"

/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_12360"

/product="MdtB/MuxB family multidrug efflux RND transporter permease subunit"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_18925"

/product="MdtA/MuxA family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_18930"

/product="fluoride efflux transporter CrcB"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_19345"

/product="multidrug transporter subunit MdtC"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_24030"

#### **Bleomycinresistens:**

/product="glyoxalase/bleomycin resistance/dioxygenase family protein"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC77\_25275"

#### **Prøve 3 – Søk etter resistensgener i annotert sekvens.**

##### **Effluks:**

/product="Multidrug resistance protein MdtK"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_00216"

/product="Multidrug resistance protein MdtB"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_00774"

/product="Multidrug resistance protein MdtA"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_00775"

/product="Multidrug resistance protein MdtG"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01505"

/product="Multidrug resistance protein  
MdtC"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01846"

/product="Putative multidrug resistance  
protein MdtD"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01860"  
/product="Multidrug resistance  
protein MdtH"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02393"

/product="Multidrug resistance protein  
MdtE"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02788"

/product="Multidrug resistance protein MdtL"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03105"

/product="Multidrug resistance protein Stp"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_00859"

/product="Multidrug resistance protein 3"  
Bmr3

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01176"

/product="Multidrug resistance protein  
NorM"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01211"

/product="Multidrug resistance ABC transporter  
ATP-binding/permease protein BmrA"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01321"

/product="Multidrug resistance protein D"  
EmrD

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01708"



/product="putative multidrug resistance protein EmrK"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02143"

/product="putative multidrug resistance protein EmrY"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02695"

/product="Multidrug resistance protein MexB"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01821"

/product="Multidrug resistance protein MexA"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01822"

/product="Efflux pump membrane transporter BepE"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_00807"

/product="Efflux pump periplasmic linker BepF"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02635"

/product="Outer membrane efflux protein BepC"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02875"

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

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01082"

/product="Multidrug/solvent efflux pump outer membrane protein MepC"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02128"

/product="multidrug efflux RND transporter  
permease subunit OqxB18"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02636"

/product="Quaternary ammonium  
compound-resistance protein SugE"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03102"

#### **Kobberresistens/metallresistens:**

/product="Copper resistance protein C" PcoC

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02137"

/product="Nickel and cobalt resistance  
protein CnrA"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02679"

/product="Cobalt-zinc-cadmium resistance  
protein CzcA"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02790"

/product="Ferrous-iron efflux pump FieF"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_04044"

/product="Magnesium and cobalt efflux  
protein CorC"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_04060"

#### **Arsenresistens:**

/product="Arsenic resistance transcriptional  
regulator ArsR2"  
/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03338"

/product="Arsenical pump membrane  
protein" ArsB

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03339"

/product="Arsenate reductase" ArsC

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03340"

#### **Fenazinresistens:**

/product="Phenazine antibiotic resistance  
protein EhpR"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_01581"

Fenazinene er en klasse bakterieproduserte antibiotika med økt oppmerksomhet de siste årene. De består av en gruppe på over 100 forbindelser isolert fra naturlige kilder og består av flere tusen derivater som er blitt syntetisert ved kjemiske metoder.

[BMC Struct Biol.](#) 2011; 11: 33.

Published online 2011 Aug 17. doi: [10.1186/1472-6807-11-33](https://doi.org/10.1186/1472-6807-11-33)

/product="Multiple antibiotic resistance  
protein MarR"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02073"

Reference: [Front Mol Biosci.](#) 2018; 5: 57.

Published online 2018 Jun 19. doi: [10.3389/fmolb.2018.00057](https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00057)

#### **Bicyclomycinresistens:**

/product="Bicyclomycin resistance protein"  
Bcr

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_02452"

#### **Hydroperoksidresistens:**

/product="Organic hydroperoxide resistance  
transcriptional regulator" ohr

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03224"

/product="Organic hydroperoxide resistance  
protein OhrB"

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_03240"

#### **Fosmidomycinresistens:**

/product="Fosmidomycin resistance protein"  
Fsr

/protein\_id="NMBU:RUTA3\_04850"

## Prøve 2, Beta-laktamaser i annotert sekvens:

gene 305043..305915  
/gene="blaL1"  
/locus\_tag="GWC78\_05090"  
CDS 305043..305915  
/gene="blaL1"  
/locus\_tag="GWC78\_05090"  
/inference="COORDINATES: similar to AA  
sequence:RefSeq:WP\_032966056.1"  
/note="Derived by automated computational analysis using  
gene prediction method: Protein Homology."  
/codon\_start=1  
/transl\_table=11  
/product="L1 family subclass B3 metallo-beta-lactamase"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_05090"  
/translation="MRFTLLAFALAVALPAVHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAP  
LQVADHTWQIGTEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLIL  
LSHAHADHAGPVAELKRRTGAHVAANAETA VLLARGGSNDLHFGDGITYPPASADRII  
MDGEVTVGGIAFTAHFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLAPGYQLKGNP  
RYPRLIEDYKRSFATVRALPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSKASAEALTCNAYADAAEK  
KFDAQLARETAGTR"

gene 19211..20122  
/gene="blaL2"  
/locus\_tag="GWC78\_16625"  
CDS 19211..20122  
/gene="blaL2"  
/locus\_tag="GWC78\_16625"  
/inference="COORDINATES: similar to AA  
sequence:RefSeq:WP\_005410766.1"  
/note="Derived by automated computational analysis using  
gene prediction method: Protein Homology."  
/codon\_start=1  
/transl\_table=11  
/product="L2 family class A beta-lactamase"  
/protein\_id="PRJNA559807:GWC78\_16625"

```
/translation="MLARRRFLQFSAAVASSLALPLLARAAGKATANAPTDAAITAA
SDFAALEKACAGRLGVTLTASGRRIGHRQDERFPMCSTFKSMLAATVLSQAERMPA
LLDRRVPVGEADLLSHAPVTRRHAGKDMTVRDLCRATIITSDNTAANLLFGVVGPPA
VTAFLRASGDTVSRSDRLEPELNSFAKGDPRDTPAAMAATLQRVVLGEVLQPASRQ
QLADWLIDNETGDACLRAGLGKRWRVGDKTGSNGEDARNDIAVLWPVAGGAPWVLTAY
LQAGAISYEQRASVLAQVGRIADRLIG"
```

#### Prøve 16, Beta-laktamaser i annotert sekvens:

##### bla\_1.

```
gene      complement(68773..69699)
          /gene="bla"
          /locus_tag="GWC77_08380"
CDS       complement(68773..69699)
          /gene="bla"
          /locus_tag="GWC77_08380"
          /inference="COORDINATES: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_011313683.1"
          /note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Protein Homology."
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="class A beta-lactamase"
          /protein_id="PRJNA559807:GWC77_08380"
          /translation="MQRRQFIGTVASGLIAGLVTVPGAARAADAKSTARAGDDSPNEL
ARSIEARLAAIETRVAGRLGVSILDTSFGAAGHRENERFPMCSTFKALAAAVALERV
DRQLDDLSRRIVFSREDLVPYPETGKHAGGTGMTLSELCEAAVTLSDNTAGNLLLAS
IGGPAGLTAFARHLGDTVTRLDRNEPTLNEALPGDPRDTPAAMRATLRTLLGNRL
SPNSRDRWLAWLEANQTGGERIRAGLPTGWRVGDKTGTGERGTANDIAIVWPPGRGPI
IVTAYLTATTAQNAALAEVGRLAASIVG"
```

##### bla\_2.

```
gene      13393..14298
          /gene="bla"
          /locus_tag="GWC77_24470"
CDS       13393..14298
          /gene="bla"
          /locus_tag="GWC77_24470"
          /inference="COORDINATES: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_020071381.1"
          /note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Protein Homology."
```

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="class A beta-lactamase"
/protein_id="PRJNA559807:GWC77_24470"

/translation="MKRRTFKAALSAAIGTSASRVLGAVGANPSCEPAGTCVKRRRL
ANIEAESGGRLGFFAVDTGSGRTLAYRADERFLMCSTFKGILAAQIFARVDRGEERLD
RQIAYTQKDLIFTSPVTQANVARGAMSIDDL CRAILEESDNTAAVLLMRSAGGPEALT
AFVRRLGDTVTRSDRYEPQTNSYSGLDTSPPRAIVTLAKLLLGNALTAESRARLER
GMINCKPGRSRIRAVLPQSWSCADRPGTSVGGGETNDYALVRPIGRHPLIVAAYDAPS
LAMAERESVLRKAGEAFTQWAMEVA"

```

**Prøve 3, Beta-laktamaser i annotert sekvens:**

```

CDS      41788..42930
         /gene="ampC"
         /locus_tag="RUTA3_04862"
         /EC_number="3.5.2.6"
         /inference="ab initio prediction:Prodigal:2.6"
         /inference="similar to AA sequence:UniProtKB:P85302"
         /codon_start=1
         /transl_table=11
         /product="Beta-lactamase"
         /protein_id="NMBU:RUTA3_04862"
         /translation="MRHSVRSALSSLLSAGHCLADSDLRPVVNASVEPLMQQGIGIT
GLSVAVIHKGQVQYFNYGLASRDTRQPVTENTLFEVGSVSKTFAATLGGYAQATGKLLK
LTDPAAQHLPTLKGSALEISLLQLATYTAGGLPLQFPQAADNADNMLSYFQHWTPAY
APGTQRLYSNPSIGLFGYLAARSLGQPYHVAMEQTLLPKLGLKNTYVNVDPDEQKPRYA
QGYDKQDKPVRVSPGALDSEAYGIKTTARDLAHYVIANMHPQTLEQPLQQAIAHSG
YYQVDGMTQALGWEYYPYPIALQALIDGNSTPMAMQPHAVGWFATPHAQPANVLYNKT
GSTGGFGAYVAYVPAQDKGVVILANRNYPNAERVKVAHAILSALAP"

```



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway