



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Multiresistens i bakterieisolater hentet fra akvatiske miljø

- Identifisering av β -laktamaser med utvidet spektrum og karbapenamaser ved bruk av genotypiske og fenotypiske metoder**

Multidrug resistance in bacterial isolates retrieved from aquatic environments

- Identification of extended spectrum β -lactamases and carbapenamases by using genotypic and phenotypical methods

Guro Lervik Arntsen

Bioteknologi

FORORD

Denne oppgaven på 60 studiepoeng ble utført som et avsluttende arbeid av en mastergrad i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Masteroppgaven hadde oppstart i august 2020 og avsluttet i juni 2021. Dette har vært en svært lærerik og spennende periode, hvor jeg har lært mye om antibiotikaresistens og hvordan det er spredd i miljøet rundt. Denne perioden har også bydd på utfordringer, noe jeg tar lærdom fra både faglig og personlig.

Jeg ønsker først å gi en stor takk til min veileder, Professor Bjørn-Arne Lindstedt, som har vært til god hjelp hele veien. Han har svart på både store og små spørsmål, satt av tid til gode forklaringer og gitt tilbakemeldinger underveis, både til praktisk og skriftlig arbeid. I tillegg vil jeg takke Zhian Salehian, som var til stor hjelp høsten 2020, for å alltid være til stede og hjelpe med en god oppstart av oppgaven. Jeg ønsker også å takke May Helene Aalberg som har gjort hver dag på labben enda bedre, med gode samtaler og et stort smil. En takk vil jeg også rette til Kayleigh Sharon Robson Moe, som felles masterstudent det siste halvåret av masteren har ført til en ekstra hyggelig avslutning på labben.

Videre ønsker jeg å takke alle nære og gode venner som har heiet meg frem under arbeidet med denne oppgaven. Tak for alle luftturer, oppmuntrende lapper og sjokolader, alle meldinger og støttende kommentarer som har fått lange dager på lesesalen til å bli mye bedre.

Studenttiden min har vært fylt med engasjement. Alle de seks årene på NMBU ville vært langt fra det samme uten måneder, år og minner for livet som jeg har fått som engasjert under UKA i Ås. Tusen takk til gjengen i Serveringsblokka 2018 for eventyrlige minner, arrangementsblokka 2020 for å virkelig gi meg troen på meg selv. Ikke minst, tusen takk til UKEstyret 2020 for å være en alle tiders gjeng.

Tiden i Ås hadde heller ikke vært den samme uten Collegium Alfa, disse jentene har bygget meg opp fra dag en og vist meg hva som er nøkkelen til suksess. Tusen takk for at dette er en gjeng man alltid kan komme tilbake til.

Til slutt vil jeg si tusen takk til mine foreldre, Marit Lervik og Roger Arntsen som alltid er der for meg og har støttet meg gjennom hele studiet og spesialet masterperioden.

Sammendrag

Ikke lenge etter at antibiotika ble funnet og begynte å bli brukt som medisin, kom antibiotikaresistens (AR). Helt siden den gang har det vært en kamp mot organismer som videreutvikler resistens og forskere som hele tiden prøver å finne nye former for antibiotika. Gjennom årene har bakterier utviklet resistente for flere av de originale antibiotikaene, og har da utviklet utvidet spektrum β -laktamaser (ESBL) som er til stor bekymring.

Tidligere har fokuset kun vært på klinisk oppdagelse av antibiotikaresistens, og hvordan resistensen sprer seg humant. De siste årene har miljøets rolle innen AR kommet frem i lyset og man ser nå etter resistens som finnes naturlig i miljøet og resistens som erverves. Flere bakterier har vist seg å mutere fra villtypene og har dermed gått fra å være mottakelige for antibiotika til å bli resistente. Formålet med denne masteroppgaven er å undersøke tilstedeværelsen av ESBL- og karbapenamaseproduserende bakterier i akvatiske miljø, i tillegg til å se på resistensgenene til disse.

Totalt 10 vannprøver har blitt samlet inn fra Ås, Drøbak og Ski fra forskjellige vann. Det har blitt hentet prøver fra både sjø, tjern, bekk og dam. Vannet ble filtrert og spredd på selektivt kromogene medier for deteksjon av ESBL og karbapenamaser. Fra alle bakterieisolater ble det sendt 16S rRNA til Sanger-sekvensering for indemnisering. For å detektere ESBL-enzymmer ble det benyttet multiplex PCR-produkter som ble kjørt på en gelelektroforese. Et utvalg av prøver basert på fenotype, identifisering og multiplex-resultater ble sent til helgenomsekvensering med Illumina MiSeq for å se etter resistensgener. I tillegg ble det også sett på virulensgener. Det ble også utført antimikrobiell sensitivitetstesting av bakterieisolatene for å se resistensen mot 5-10 ulike antibiotika. Fra 16S rRNA Sanger-sekvensering ble bakteriene identifisert som *Bordetella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* og *Rahnella*. Et sjette isolat *Escherichia coli* ST1193 ble senere hentet inn og tatt med i studien.

Flere av prøvene var «multidrug»- resistente (MDR), og hadde opp til flere resistens- og virulensgener. Noen av observasjonene har det blitt gjort funn av tidligere, men lite er dokumentert om funn av *Y. enterocolitica* med karbapenemresistens. Flere av isolatene inneholdt *ampC*-genet som er å finne både kromosomalt og på plasmider. Genet CTX-M ble funnet hos *E. coli* og fra *Rahnella* ble det gjort funn av et RAHN-gen nært beslektet til CTX-M. Studien konkluderer med at det er tilstedeværelse av MDR organismer med produksjon av ESBL i både Andedammen og Smilehullet i Ås.

Abstract

Not long after the discovery of antibiotics and its usage in medicine, antibiotic resistance (AR) appeared. It has since been a fight against organisms that further develops resistance, and scientist are attempting to discover new forms of antibiotics continuously. Bacteria have developed resistance against several of the original antibiotics through the years and have developed Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL), which is of great concern.

Previously, the focus has been on clinical discovery of antibiotic resistance and how resistance spreads humanely. The environmental role within AR has in the last years been shed light on, and the focus is now on resistance appearing naturally in the environment and acquired resistance. Several bacteria have been shown to mutate from their wild types and have therefore gone from being susceptible to antibiotics to become resistant. The aim of this thesis is to investigate the presence of ESBL- and carbapenamase-producing bacteria in aquatic environments, and to investigate their genes for resistance.

In total 10 water samples have been collected from Ås, Drøbak and Ski from different water sources. Samples have been collected from the sea, ponds, streams, and dams. The water was filtered and spread on selective kromogene mediums for detection of ESBL and carbapenamases. From all bacterial isolates, 16S rRNA was sent to Sanger sequencing for identification. To detect ESBL-enzymes multiplex PCR was performed, and products were run on gel electrophoresis. Samples were selected based on their phenotype, identification, and multiplex results, and were sequenced using Whole Genome Sequencing by Illumina Miseq to detect genes for resistance. Additionally, genes for virulence were analyzed. Moreover, antimicrobial sensitivity tests of the bacterial isolates were performed to identify the resistance against 5-10 different antibiotics. From 16S rRNA Sanger sequencing were the bacteria *Bordetella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* and *Rahnella* identified. A sixth isolate of *Escherichia coli* ST1193 were added later on in the study.

Several of the samples were “multidrug”-resistant (MDR) and possessed several resistances- and virulence genes. Some of the observations in this study have been observed in previous studies, but there is little documentation of findings of *Y. enterocolitica* with karbapenemresistance. Several isolates contained the *ampC*-gene which can be found both on chromosomes and in plasmids. The gene CTX-M were found in *E. coli* and in *Rahnella* there was a discovery of a RAHN-gene closely related to CTX-M. The results concludes that there

is a presence of MDR organisms with production of ESBL in both Andedammen and in Smilehullet in Ås.

FORKORTELSER

AR	Antibiotikaresistens
bla	Betalaktamasegen
BHI	«Brain heart infusion»
CARD	«The Comprehensive Antibiotic Resistance Database»
CPE	Karbapenamase- produserende Enterobacteriaceae
CRE	Karbapenemresistente bakterier fra Enterobacteriaceae familien
CTX-M	Cefotakimase
EARSS	Det europeiske overvåkningssystemet for antibiotikaresistens
ESBL	Betalaktamaser med utvidet spektrum (ekstendert-spektrum betalaktamaser)
EUCAST	«European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing»
DNA	Deoksyribonukleinsyre
MDR	«Multidrug resistance»
MH	Mueller-Hinton
MFS	«Major facilitator superfamily»
MIC	«Minimum bacterial concentration»
NCBI	«National Center for Biotechnology Information Search database»
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NORM	Norges overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
PCR	«Polymerase chain reaction»
rMLST	«Ribosomal Multilocus Sequence Typing»
RNA	Ribonukleinsyre
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
TEM	Temoineira betalaktamase
UPEC	Uropathogenic Escherichia coli
VFDB	«The virulence factor database»

1. INNLEDNING	1
2. BAKGRUNN	2
2.1 ANTIBIOTIKA.....	2
2.1.1 ANTIBIOTIKAS BAKGRUNN.....	2
2.1.2 <i>Betalaktamer</i>	2
2.1.2.1 Penicillin.....	3
2.1.2.2 Kefalosporiner	3
2.1.2.3 Karbapenem.....	4
2.1.2.4 Fluorokinoloner	5
2.2 ANTIBIOTIKARESISTENS.....	5
2.2.1 <i>Naturlig og ervervet resistens</i>	6
2.2.2 <i>Horisontal genoverføring</i>	6
2.2.2.1 Transformasjon.....	7
2.2.2.2 Konjugasjon.....	7
2.2.2.3 Transduksjon	7
2.2.3 <i>Multiresistens</i>	7
2.2.4 <i>Betalaktamaser</i>	8
2.2.4.1 Utvidet spektrum β -laktamaser (ESBL).....	9
2.2.4.2 AmpC \square -laktamaser	9
2.2.4.3 Karbapenamase- produserende Enterobacteriaceae	9
2.2.4.4 SHV.....	10
2.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i> ST1193.....	10
2.4 <i>ENTEROBACTER</i>	11
2.5 <i>PSEUDOMONAS</i>	11
2.5.1 <i>Pseudomonas composti</i>	12
2.5.2 <i>Pseudomonas putida</i>	12
2.6 <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i>	12
2.7 <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	13
2.8 <i>RAHNELLA</i>	13
2.9 METODISK TEORI.....	14
2.9.1 <i>Screening med selektive kromogene skåler</i>	14
2.9.2 <i>Polymerase kjedereaksjon (PCR)</i>	14
2.9.3 <i>Multiplex PCR</i>	16
2.9.4 <i>Sanger-sekvensering</i>	16
2.9.5 <i>Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq sekvensering</i>	17
2.9.6 <i>Nanopore-sekvensering</i>	17
2.9.7 <i>Antibiotika sensitivitetstest</i>	18
3. MATERIALER OG METODER	19
3.1 PRØVETAKNING FRA MILJØ	19
3.2 FILTRERING OG RENSING AV VANNPRØVER	21
3.3 EKSTRAKSJON AV DNA	22
3.3.1 <i>Kvantifisering og renhetsbestemmelse av ekstrahert DNA</i>	22
3.4 SANGER-SEKVENSERING AV 16S RRNA	23
3.4.1 <i>PCR-amplifisering av 16S rRNA</i>	23
3.4.2 <i>Agarosegelelektroforese</i>	24
3.4.3 <i>Rensing av ferdig PCR-produkt og klargjøring til Sanger-sekvensering</i>	25
3.4.4 <i>Dataanalyse av sekvenseringsresultater</i>	25
3.5 DETEKSJON AV RESISTENSGENER	25
3.5.1 <i>Multipleks PCR med ESBL- primerkmiks</i>	25
3.5.2 <i>Helgenomsekvensering ved bruk av Illumina MiSeq</i>	28
3.5.3 <i>Analyse av MiSeq- resultater i Galaxy</i>	28
3.5.4 <i>Nanopore sekvensering</i>	28

3.6 SENSITIVITET MOT ANTIBIOTIKA	29
4. RESULTATER.....	30
4.1 FENOTYPISK DETEKSJON OG 16S rRNA.....	30
4.2 RENHETSMÅLING OG KVANTIFISERING.....	33
4.3 GENOTYPISK DETEKSJON AV RESISTENSGENER.....	34
4.3.1 Påvisning av gener ved gelelektroforese.....	34
4.3.2 Illumina MiSeq- sekvensering	35
4.3.2.1 Funn av resistensgener	35
4.3.2.2 Funn av virulensgener	42
4.4 SENSITIVITETSTEST MOT ANTIBIOTIKA.....	42
5. DISKUSJON.....	44
5.1 FENOTYPISK DETEKSJON.....	44
5.2 SANGER-SEKVENSERING	44
5.2.1 Resultater fra Sanger-sekvensering sammenliknet med fenotypisk deteksjon.....	45
5.3 HELGENOMSEKVENSERING	47
5.4 RESISTENSGENER	47
5.4.1 β - laktamasegener	47
5.4.2 AmpC.....	49
5.4.3 CTX-M.....	49
5.4.4 Multiresistente efflukspumper	50
5.5 MULTIPLEX PCR	51
5.6 ANTIBIOTIKASENSITIVITET	51
5.6.1 <i>Pseudomonas</i>	51
5.6.2 <i>Stenotropomonas</i>	52
5.6.3 <i>Yersinia</i>	52
5.6.5 <i>Rahnella</i>	53
5.6.6 <i>E. coli</i>	53
5.7 TANKER RUNDT ANTIBIOTIKA RESISTENS	53
6. KONKLUSJON.....	56
7. REFERANSER.....	57

<i>Vedlegg A</i>	<i>i</i>
<i>Vedlegg B</i>	<i>iv</i>
<i>Vedlegg C</i>	<i>viii</i>
<i>Vedlegg D</i>	<i>xxxvii</i>
<i>Vedlegg E</i>	<i>xxxviii</i>

1. Innledning

Antibiotika har siden sin oppdagelse blitt benyttet til store medisinske milepæler. Det har gjort det mulig med organdonasjon og gjort behandlingen av kreftpasienter lettere for å nevne noe, dette ved hjelp av små molekyler som blir produsert av mikroorganismer (Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011a; Munita & Arias, 2016). Frem til nå har antibiotika vist seg å være den mest kostnadseffektive og livreddende medisinen som har ført til lengere liv (Machowska & Stalsby Lundborg, 2018).

Det har imidlertid vist seg at bruken av antibiotika har økt antibiotikaresistensen kraftig. Med en stor vekst av fremtredende antibiotikaresistente organismer er forskere i en konstant kamp mot klokken med videre utvikling av nye medisiner for å bekjempe resistente mikroorganismer. Problemet har blitt så stort at det nå er sett på som en av verdens største trusler av Verdens helseorganisasjon (Machowska & Stalsby Lundborg, 2018).

Antibiotika produseres naturlig og miljøet og er et vanlig funn i mange jordmikrober, som bruker dette til å beskytte seg mot nærmiljøet. Etter at den kliniske antibiotikabruken har økt, har resistensen også økt hos bakterier som er å finne i miljøet. Irrasjonell bruk både ved overforbruk og feilmedisinering fører til at antibiotika kastes eller skylles ned, og dermed havner ute i miljøet. I tillegg brukes or eksempel avføring fra dyr til gjødsel i jordbruk og veterinær medisin kan dermed spre seg ut i miljøet på denne måten (Kummerer, 2003).

Multiresistens hos organismer viser seg å bli et større problem. Fremveksten av spesielt utvidet spektrum β -laktamaser (ESBL) som blir produsert av gramnegative bakterier er til stor bekymring. Dette er en kombinasjon av resistens mot flere av de opprinnelige antibiotikaene, og spredningen av genene til disse enzymene er ikke under kontroll (Machowska & Stalsby Lundborg, 2018).

I denne oppgaven ble det samlet inn vannprøver fra flere vann i Follo. Målet var å undersøke forekomsten av ESBL-produserende og multiresistente bakterier fra disse akvatiske miljøene.

2. Bakgrunn

2.1 Antibiotika

2.1.1 Antibiotikas bakgrunn

Siden Alexander Flemming oppdaget av antibiotika i 1928, har utviklingen vært stor. Det startet med en forurensning av muggsopp som førte til at forskere kunne oppkonsentrere penicillin og redde mange liv under andre verdenskrig. Gjennom tiden har hyppigheten av bruken på både penicillin og andre antibiotika økt, og dette medførte en økning i AR. Bruken av bredspektret antibiotika førte etter hvert til at dette ble et stort problem på slutten av 70-tallet. Dette har ført til at multiresistente (MDR) gramnegative stavbakterier har utviklet resistens mot bortimot alle antibiotika i klinisk bruk (Simonsen, 2009).

Dette har ført til at mikroorganismer har utviklet seg og nå i større grad har blitt resistente mot antibiotika. Antibiotikaresistente bakterier er en global helsetrussel og truer det som hittil har vært vellykkede behandlinger av infeksjoner (Kummerer, 2003).

2.1.2 Betalaktamer

Som en respons på β -laktamase-spredningen etter at penicillin først ble tatt i bruk, ble utvikling av flere β -laktamer raskt satt i gang (Nikaido, 2009). De vanligste antimikrobielle midlene både til human og veterinær bruk er β -laktamer som fungerer ved å hemme ett sett med transpeptidase-enzymmer. Disse transpeptidasene er essensielle for syntese av peptidoglykanlaget i bakteriens cellevegg. β -laktamer er strukturmessig like D-alanyl-D-alanin enden til peptidoglykan og hemmer ved å binde seg til det aktive setet på enzymet (Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011a). β -laktam-antibiotika består av penicilliner, kefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer. β -laktamer er bredspektret antibiotika og blir brukt til både grampositive og gramnegative bakterier. For bakterier som er i vekst vil en hemning av peptidoglykan-syntesen være dødelig, og det er dette om utgjør den antimikrobielle effekten til β -laktam-antibiotika (Finton, Meisal, Porcellato, Brandal, & Lindstedt, 2020; Palzkill, 2013). β -laktamer blir karakterisert av en β -laktam-ring med fire ledd som fungerer som et substrat for transpeptidase målenzymer (Palzkill, 2013).

Effekten til β -laktamer er avhengig av konsentrasjonen som utgjør en bakteries minste hemmende konsentrasjon (MIC). For å kunne være sikkert på at alle bakterier dør, benyttes det fira ganger bakteriens MIC, og en får ikke høyere uttelling ved å bruke enda høyere

konsentrasjoner (Walberg et al., 2006). MIC blir forklart nærmere i avsnitt 2.9.8. Av antimikrobielle stoffer er β -laktamer mest brukt, og forekomsten av resistens øker derfor mest i forbindelse med disse stoffene. Resistens mot β -laktamer har av denne årsaken blitt et begynnende folkehelseproblem (Walberg et al., 2006).

2.1.2.1 Penicillin

Alexander Flemming oppdaget penicillin da en muggsopp vokste på prøvene hans med *Staphylococcus* og så at dette skapte hemningssoner i nærheten av muggsoppen. Howard Walter Florey, sammen med Ernst Boris Chain utviklet senere penicillin til et medikament, og det ble første gang testet på mennesker i 1941 (Kong, Schneper, & Mathee, 2010). Penicillin blir laget av soppen *Penicillium chrysogenum* (*Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011a*) og fungerer ved å hemme celleveggsyntese som fører til at celleveggen vil bli for svak etter noen celledelinger og sprekke, noe som fører til at bakterien dør (Øye, 2020b).

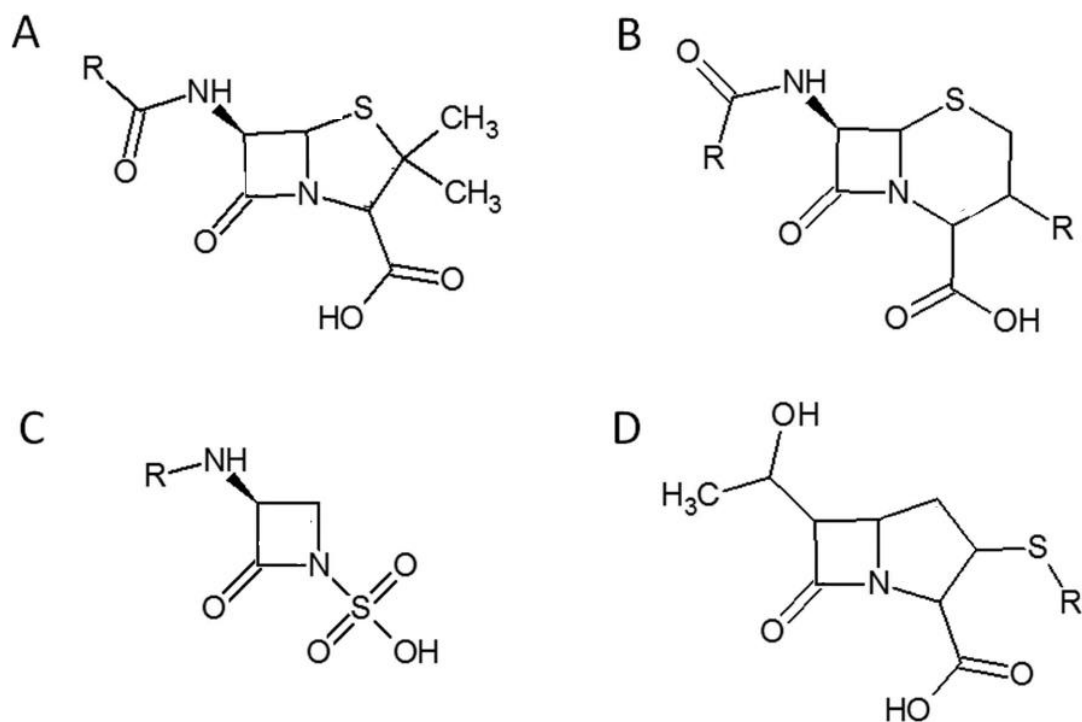
Kjernestrukturen til Penicilliner er vist i Figur 1A. Penicilliner deles inn i kategoriene β -laktamasefølsomme, β -laktamase stabile og bredspektrede penicilliner. Penicillin er ofte et førstevalg mot bakterielle infeksjoner, men mange villtyper av bakteriestammen har utviklet resistens mot β -laktamer, med β -laktamase penicillinase (Norsk Legemiddelhåndbok, 2016a). Det aller første funnet av et penicillinødeleggende enzym var fra *E.coli* i 1940, enzymet fikk etterhvert navnet AmpC β -laktamase (Jacoby, 2009). Enkelte bakterier, som *stafylokokker*, har også blitt resistente ved ervervet resistens gjennom penicillinbindende proteiner, som fører til resistens mot β -laktamase stabile penicilliner. Bredspektret penicillin har en større virkning på gramnegative organismer og innenfor denne gruppen finnes blant annet ampicillin, men også her er flere bakterier resistente og nå har mellom 30 og 40% av *Escherichia coli* isolater fra Norge vist resistens (Norsk Legemiddelhåndbok, 2016a).

2.1.2.2 Kefalosporiner

Kefalosporiner blir brukt mot flere typer infeksjoner i kroppen som blant annet luftveisinfeksjoner, septiske tilstander og gonoré. Basert på tiden de ble oppdaget og deres antimikrobielle egenskaper er kefalosporiner delt opp i første, andre, tredje- og fjerdegenerasjons kefalosporiner (El-Shaboury, Saleh, Mohamed, & Rageh, 2007; Norsk Legemiddelhåndbok, 2018). Fortrinnsvis har første generasjon kefalosporiner aktivitet mot grampositive bakterier, andre generasjon fungerer både på grampositive og gramnegative bakterier, mens tredje- og fjerde generasjons kefalosporiner virker best på gramnegative bakterier. Femtegenerasjons kefalosporiner skiller seg ut fra de andre generasjonene, ved at de

virker mot meticillinresistente *S. aureus* (MRSA). Alle generasjonene har samme kjernestruktur, som vises i Figur 1 B.

Gramnegative stavbakterier med ESBL, har vist seg å være følsomme for in vitro kefalosporiner. Har man muligheten til å bruke penicillin så er det det som skal benyttes, da risikoen for at det utvikles resistens er stor. På grunn av dette skal kefalosporiner kun brukes når annen smalspektret antibiotika ikke gir god nok behandling (Norsk Legemiddelhåndbok, 2018).



Figur 1: Klassene av β -laktam antibiotika. Forskjellige R- grupper skiller β -laktamene fra hverandre. A viser kjernestrukturen til penicilliner. B viser kefalosporiner sin kjernestruktur. C er monobaktamers kjernestruktur. D viser karbapenemer sin kjernestruktur (Palzkill, 2013).

2.1.2.3 Karbapenem

Av alle β -laktamer er det karbapenemer som har det bredeste antibakterielle spektrumet (Norsk Legemiddelhåndbok, 2016c). De fungerer hemmende for mange β -laktamaser ved reaksjon med et aktivt sete med serin, som danner et langt varende mellomprodukt av acyl-enzym. Strukturen til Karbapenem vises i Figur 1D. Karakteristisk for karbapenemer er motstand mot inaktivering av β -laktamaser, da også ESBL. Det har derimot vist seg det siste

tiåret at β -laktamaser har vært i stand til å hydrolysere karbapenemer, og klasse B metallo- β -laktamaser har vist seg og bli en økende kilde til resistens. Hydrolyseringen utføres av enzymer kalt karbapenemaser som OXA og KPC, og disse har blitt et økende problem i mange land (Norsk Legemiddelhåndbok, 2016c; Palzkill, 2013).

2.1.2.4 Fluorokinoloner

Kinoloner er en bredspektrert form for antibiotika, og i Norge er den eneste undergruppen som brukes fluorokinoloner. Dette er syntetiske, antimikrobielle midler og virker hemmende på enzymet gyrase som er viktig for spiraleringen av DNA i mikroorganismer (Norsk Legemiddelhåndbok, 2016b; Walberg et al., 2006; Øye, 2020a). Denne formen for antibiotika, brukes kun om det er nødvendig etter som den gir en rask resistensutvikling og påvirker normalfloraen.

2.2 Antibiotikaresistens

Bakterier kan være resistente ovenfor enkelte eller flere former for antibiotika, og bakterier har utviklet ulike metoder for å beskytte seg. Enzymer kan modifisere antibiotikumets sidegrupper og bindingene, kløyve molekylene og inaktivere det. Blant disse er enzymer som β -laktamaser, metallo- β -laktamaser, og karbapenemaser, som er i stand til å bryte β -laktamringen til penicilliner. Enkelte bakterier har evnen til å endre på bindingsstedet der antibiotikumet ville feste seg, enten ved å danne en hindring eller eliminere reseptoren. Når et antibiotikum fester seg til reseptoren vil dette påvirke en prosess hos bakterien, noe enkelte bakterier løser problemet ved å danne alternative metabolismeveier. De unngår på denne måten veien som påvirkes av antibiotika. Noen bakterier kan endre permeabiliteten i celleveggen, slik at antibiotika ikke skal slippe inn (Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011a; Tenover, 2006).

Slik det er i dag har evolusjonen av AR hos humane patogener nådd det punktet der de originale antibiotikaene og flere av deres etterkommere ikke lenger er effektive. Dette fører til at antibiotikas nytte snart kan være slutt (Clardy, Fischbach, & Currie, 2009). I 1996 ble 50% av antibiotika i EU benyttet til veterinærmedisin. I 1999 hadde dette endret seg kraftig, og 65% av antibiotika ble da brukt til human medisin. På kun tre år hadde antibiotikabruken i EU økt fra 10200 tonn til 13288 tonn i året. En kontinuerlig økning av antibiotika vil kunne gi store problemer, og i dag dør det rundt 700.000 mennesker hvert år grunnet infeksjoner forårsaket av resistente mikroorganismer. Innen 2015 er det anslått inntil 10 millioner dødsfall

i året som følge av antibiotikaresistente organismer, som kan føre til kostnader på opp til 100 milliarder amerikanske dollar. Dette kan bli en realitet hvis det ikke blir funnet en løsning (Machowska & Stalsby Lundborg, 2018).

AR i Norge har vært lavere enn i andre land, men på 90-tallet ble det tydelig at det var et behov for overvåkning på nasjonalt nivå. Norsk overvåkningssystem for AR hos mikrober (NORM) informerer om funn i Norge til Det europeiske overvåkningssystemet for antibiotikaresistens (EARSS), og prioriterer overvåkning av mikroorganismer som kan føre til alvorlig sykdom eller infeksjon som er problematiske å behandle. Det dokumenteres også mikroorganismer fra næringsmidler, som er ført inn fra andre land og som lett kan erverve resistens, i tillegg til bakterier det er tegn til utvikling av resistens (Simonsen, 2009).

Spredningen av AR gir også følger i miljøet, spesielt i vann fra urbane avløpsvann som har videre påvirkning på det akvatiske miljøet. I tørre områder brukes gjerne avløpsvann til vanning og kloakkslam blir brukt som gjødsel, og her det fare for at antibiotikaresistente bakterier kan følge med. Dermed har de resistente bakteriene store muligheter til å spre seg (Kummerer, 2003).

2.2.1 Naturlig og ervervet resistens

Fra evolusjonen sin side har bakterier alltid måttet beskytte seg fra antimikrobielle stoffer. Av det store presset som kommer av antibiotikabruk blir bakterier nærmest tvunget til å nytte seg av resistensgener for å kunne overleve. De har dermed utviklet flere metoder for å bli resistente mot antibiotika. Bakterier kan bli AR ved de novo genmutasjoner eller ved å anskaffe genetisk informasjon som koder for resistens fra andre mikroorganismer. Bakteriene kan anskaffe seg gener fra andre bakterier ved horisontal genoverføring (HGO) (Machowska & Stalsby Lundborg, 2018; Munita & Arias, 2016).

2.2.2 Horisontal genoverføring

HGO gir bakterier muligheten til å tilegne seg genetisk materiale, da også antimikrobiell resistens, som er i miljøet rundt eller fra andre bakterier. Det finnes flere former for HGO og det kan skje mellom samme bakteriestamme og mellom forskjellige stammer. Transposoner kan under alle prosessene lette på overføringen av gener i tillegg til inkorporeringen av de nye ervervede resistensgenene til den mottakende bakterien, enten inn i genomet eller inn i plasmider (Leclerc, Lindsay, & Knight, 2019; Tenover, 2006). Mekanismen for å ta opp og

overføre gener mellom bakterier, sammen med naturlig mutasjon og seleksjon, gjør det mulig for bakterier å tilpasse seg antibiotika som blir introdusert i nærmiljøet. Én enkel mutasjon i et bakteriegen vil bare øke resistensen for et antibakterielt middel noe, men det kan være nok til at det vil gi overlevelsessevner nok til bakterien til den får ytterligere mutasjoner eller mer genetisk materiale, som over tid kan føre til en fullstendig resistens mot det antibakterielle middelet. Edninger forekommet enkeltmutasjoner som kan være nok til å gi resistens til bakterien på et klinisk høyt nivå (Tenover, 2006).

2.2.2.1 Transformasjon

Transformasjon er når bakterier kan ta opp genetisk materiale fra miljøet rundt, og dette genetiske materiale kommer fra bakterier som har frigitt DNA-segenter etter cellelysis. Dermed kan resistensgener bli tatt opp og inkorporert i vertens DNA (Leclerc et al., 2019; Munita & Arias, 2016; Tenover, 2006).

2.2.2.2 Konjugasjon

Ved konjugasjon kommer en gramnegativ bakterie i kontakt med en tilstøtende bakterie. Ofte dannes det en pilus, som er en forlenget proteinstruktur, mellom de to bakteriene for å kunne utveksle genetisk informasjon direkte. Konjugasjon mellom to grampositive bakterier blir vanligvis initiert ved produksjonen av kjønns-feromoner av bakterieparet, som gjør det lettere for kontakt mellom donor og den mottakende organismen. Dette fører til at bakteriene kan utveksle DNA (Leclerc et al., 2019; Munita & Arias, 2016; Tenover, 2006)

2.2.2.3 Transduksjon

Virus som har muligheten til å infisere bakterier, bakteriofager, kan utføre transduksjon. Dette skjer ved at bakteriofagen kopierer opp og pakker ett gen tilhørende den infiserte bakterien, i stedet for sitt eget genetiske materiale, for så å sende dette til en nærliggende bakterie. Denne formen for HGO er veldig sjelden (Leclerc et al., 2019; Munita & Arias, 2016; Tenover, 2006).

2.2.3 Multiresistens

En større bekymrende faktor er spredningen av MDR bakterier, som det ikke finnes behandling for og disse er rapportert om i flere land. Hos EARSS er det rapportert at disse bakteriene finnes i en større andel i den sørlige delen av Europa, mens det en betydelig mindre andel i den nordre delen av Europa (Machowska & Stalsby Lundborg, 2018).

Flere stammer av bakterier har nå begynt å vise resistens mot flere antibiotika, da også mange patogene stammer, og det er dette som beskrives som multiresistent (MDR). Noe som også er bekymringsverdig, er at det er en framvekst av gramnegative patogene som er resistente mot da blant annet, tetrasyklin, kloramfenikol og makrolider. Enkelte bakterier har også begynt å vise seg som pan-resistente, som vil si resistens mot cefepim, cefotaxim, imipenem, meropenem, penicillin—taxobactam, ciproflaxin og levoflaxin. MDR kan oppstå i bakterier på flere vis, ved akkumulering, på resistens plasmider eller transposoner, fra gener og/ eller ved virkningen av «multidrug effluks pumps» som hver av dem har muligheten til å pumpe ut mer enn en form for antibiotika (Nikaido, 2009).

TEM β -laktamase er et enzym som ble funnet i gramnegative bakterier allerede i 1962. Dette enzymet har spredd seg over verden og har ført til at enkelte penicilliner som for eksempel ampicillin som antibiotikum har lite effekt mot gramnegative bakterier er så og si ubrukelig på disse. Noen resistensgener er mer vanlige å finne i kromosomet til bakterier som lever i miljøet. Slik som *ampC* genet, som finnes i bakterier som hører til Enterobacteriaceae. Som nevnt tidligere kan antibiotika bli spredd ut i akvatiske miljøer og jord, og selv i veldig små konsentrasjoner kan noen bakterier bruke antibiotika som et næringsmiddel, som videre har ført til en evolusjonær opprinnelse av gener for AR (Nikaido, 2009).

2.2.4 Betalaktamaser

β -laktamaser dukket opp allerede noen få år etter at penicillin ble introdusert i klinisk praksis (Nikaido, 2009). I gramnegative bakterier er det vanlig å finne naturlige forekomster av kromosomalt lokaliserte β -laktamaser. Dette kommer mest sannsynlig av penicillin-bindende proteiner, men de er ikke signifikant viktige for AR hos bakteriene hvis det bare blir produsert i små mengder (Liakopoulos, Mevius, & Ceccarelli, 2016). β -laktamaser katalyserer hydrolysen av amidbånd i β -laktam-ringen for å danne ineffektive produkter. De er en hyppig årsak til resistens hos gramnegative bakterier og noen grampositive arter. Gener som koder for β -laktamaser kan bli funnet på bakteriens kromosom eller på plasmider. β -laktamasene er delt inn i fire forskjellige klasser, der A, C og D er aktivt serin-sete-enzymmer som katalyserer hydrolysen av β -laktamer, via et mellomliggende serin-bundet acyl. Klasse B enzymmer krever sink for å kunne aktiveres, og katalyse skjer ikke gjennom et kovalent mellomprodukt, men gjennom et direkte angrep av et hydroksidion som er stabilisert av sink i det aktive setet. Serin β -laktamaser på det aktive setet tilhører en større familie penicillingjenkjennende enzymmer. Dette inkluderer transpeptidaser som kryssbinder bakteriecellevegger (Palzkill, 2013).

2.2.4.1 Utvidet spektrum β -laktamaser (ESBL)

Blant β -laktamasene har ESBL blitt en stor bekymring. Det har blitt rapportert om funn over hele verden og de fleste funn er hos Enterobacteriaceae. Det har også blitt vanlig med funn av ESBL hos *Pseudomonas* spp. På 90- tallet var de mest vanligste ESBL- funnene av typene SHV og TEM, mens det nå de siste tiårene har blitt en mye større spredning av CTX-M- typene ESBL som har blitt funnet. Dette har ført til at det nå er CTX-M ESBL som er mest utbredt hos *Enterobacteriaceae* spesielt i Europa, men også andre steder i verden (Dallenne, Da Costa, Decre, Favier, & Arlet, 2010). Vanligvis er ESBL lokalisert på plasmider som lett kan overføres mellom forskjellige bakteriearter (Finton et al., 2020).

2.2.4.2 AmpC β -laktamaser

Bakterieenzymet AmpC β -laktamase var det første som ble rapportert å ødelegge penicillin, da i fra *E. coli* (Jacoby, 2009). AmpC β -laktamaser er klinisk viktige kefalosporinaser som har blitt oppdaget hos mange Enterobacteriaceae og enkelte andre organismer. Denne formen for β -laktamaser viser motstand mot flere antibiotiske midler slik som de fleste penicilliner, kefalotin, cefazolin og flere β -laktamasehemmere. Hos mange bakterier er AmpC enzymer induserbare og kan uttrykkes ved høyt nivå av mutasjoner. Ved høy ekspresjon av AmpC kan det føre til resistens mot bredspektrede kefalosporiner, da blant annet cefotaxim. Det har blitt gjort funn av bakterier som har klart å ta til seg overførbare plasmider som inneholder gener for AmpC enzymer, da disse i utgangspunktet ikke har eller gir dårlig ekspresjon av kromosomalt *bla_{ampC}* gen. Til forskjell fra ESBL er AmpC β -laktamaser vanskeligere å oppdage og har gjerne enda bredere spektrum. Fler og fler AmpC enzymer uavhengig om det kodes fra kromosom eller plasmid har begynt å utvikle egenskapene til å hydrolysere mer bredspektret kefalosporin. For å behandle infeksjoner som kommer av AmpC produserende bakterier blir vanligvis karbapenemer brukt, men karbapenem resistens kan oppstå hos enkelte organismer ved mutasjoner, og dermed forbedre utstrømningen hos bakterien ved aktiviering av efflukspumper (Jacoby, 2009).

2.2.4.3 Karbapenemase- produserende Enterobacteriaceae

Den økende resistensen mot β -laktamer og ESBL, fører til at det også er en økende resistens mot karbapenemer. Karbapenemer er ofte brukt som en siste løsning, men det blir ofte funnet resistente gramnegative bakterier både på sykehus og rundt om i samfunnet. Det har blitt

rapportert om funn av karbapenem- resistente Enterobacteriaceae over hele verden. Resistensen kan komme av nedsatt membranpermeabilitet som har skilt ut mye β -laktamaser som inneholder svak karbapenamaseaktivitet, eller at bakteriene selv skiller ut karbapenamase. Bakterier som er karbapenem-resistente, men ikke produserer karbapenamase gener, har trekk som ikke er overførbare. Dermed er arter som skiller ut karbapenamase mer interessante å undersøke, da disse er det største problemet blant antibiotikaresistente gramnegative (Nordmann et al., 2012). Karbapenamase- produserende Enterobacteriaceae (CPE) blir gjerne karakterisert med resistens mot bortimot alle β -laktam antibiotika (Cohen Stuart et al., 2013)

2.2.4.4 SHV

Enzymene SHV har dukket opp i Enterobacteriae og er bakgrunn for infeksjoner innen helsevesenet i de siste tiårene. Disse enzymene er nå blitt observert i isolater fra forskjellige epidemiologiske omgivelser, både hos mennesker, dyr og i miljøet. Sannsynligvis kommer SHV β -laktamaser fra kromosomal penicillinase fra *Klebsiellapneumoniae*, og for tiden omfatter disse også et stort antall allelvarianter inkludert ESBL, ikke ESBL og flere ikke klassifiserte varianter (Liakopoulos et al., 2016).

SHV- familien har et amplikon som ved optimale forhold og riktige primere vil vises som 713 basepar (bp) (Dallenne et al., 2010).

2.3 *Escherichia coli* ST1193

Escherichia coli er en viktig bakterie som er å finne i tykktarmen, der den er vanlig å finne gjennom hele livet til ett menneske og gir flere fordeler. Slike kommensale *E. coli* skaper sjeldent sykdom, men det er flere *E. coli* som har klart å tilegne seg virulens, der de får muligheten til å tilpasse seg nye nisjer og dermed kan forårsake sykdommer. Den riktige kombinasjonen av virulensfaktorer kan feste seg i genet og dermed skape en patotype *E. coli* (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004). Resistensen er funnet av nye kloner av bakteriearten som har spredt seg over store områder. ST1193 er en av klonene som har begynt å vise seg i større grad, både denne og tidligere funna av kloner kobles opp mot virulensassosiert fylogruppe B2. De første oppdagelsene av klonen ST1193 ble gjort i Australia i 2008 og egenskaper som resistens mot flere antibiotika. Senere tid har det blitt rapportert om funn over hele verden, i land som Tyskland, Norge, Korea, og USA. Alle funnene viser seg som viktige bidrag til fluorokinolon- resistens. ST1193 blir også forbundet med CTX-M ESBL, som også er

forbundet med de originale Australske funnene, dette fører dermed til et forslag om en global klonal spredning av klonen (Johnson et al., 2019).

2.4 *Enterobacter*

Normalt finnes *Enterobacter* i tarmfloraen til både mennesker og dyr, i tillegg til de fleste områder i miljøet da også i vann og jord. De fleste artene er opportunistiske og kan ofte være opphav til sykehusinfeksjoner (Tønjum, 2020). Bakterier i denne slekten har vist seg med økende betydning innen patogene gjennom årene. Mange av bakteriene tilhørende slekten har en medfødt resistens mot de eldste antibiotikaene og har muligheten til å utvikle resistens mot nyere antibiotikum raskere enn før (Pitout, Moland, Sanders, Thomson, & Fitzsimmons, 1997). Slekten er den tredje mest vanlige patogene som er vanlig å finne i luftveiene til pasienter som er innlagt på intensivavdeling, og den femte mest vanlige slekten funnet i urinveiene. *Enterobacter* har også vist en økning for resistens mot β -laktam-antibiotika, spesielt på sykehus har dette vist seg å være et problem. Avhengig av hvilken art innenfor slekten er det store forskjeller i resistens, der det gjerne viser seg at mutanter skiller seg fra villtypenes fenotype og er mye mer resistente mot en rekke β -laktam antibiotika. Data hentet fra National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) viser en økende betydning av *Enterobacter* spp. som sykehus patogener tilsynelatende når isolater hentet fra intensivavdelinger på sykehus ble vurdert separat fra sykehuset generelt. Sannsynligheten for en infeksjon med *Enterobacter* spp. oppstår er større ved et lengere sykehusopphold, ved svekkende underliggende sykdommer og når bakterien får mer vedvarende kolonisering (Pitout et al., 1997; Sanders & Sanders, 1997).

2.5 *Pseudomonas*

Pseudomonas hører til gamma-underklassen av proteobakteriene og er med på å aktivere flere viktige metabolske aktiviteter i miljøet, da også nedbrytning av biogenisk og xenobiotisk forurensning (Nelson et al., 2002). *Pseudomonas* finnes overalt i miljøet, men trives best i områder med langvarig fukt. Slekten inneholder også mange humanpatogene arter, der noen kan forårsake sykdom hos alle mennesker, samtidig som noen av artene bare rammer alvorlig immunsvekkede personer. I Norge er det vanlig å få *pseudomonas*infeksjoner, da urinveisinfeksjoner og infeksjoner i sår, og en av de vanligste årsakene til infeksjon er bading i boblebad. Slekten har mange arter som er antibiotikaresistente og da det er vanlig med resistens mot karbapenemer og ciprofloksacin (Folkehelseinstituttet, 2010).

2.5.1 *Pseudomonas composti*

Pseudomonas composti er gramnegative og ikke spore-formende staver. Bakterien er både katalase- og oxidase- positiv, den er sterkt aerobisk og beveger seg med en enkelt flagell (Gibello et al., 2011). Den er i stand til å stimulere biomassen og lipidinnholdet til grønne alger (Berthold, 2019). Det er svært lite dokumentasjon om *P. composti* noe som fører til at en også vet lite om hvordan den reagerer med antibiotika. Den har heller ikke blitt dokumentert som en bakterie funnet i mennesker.

2.5.2 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida er en bakteriestamme som typisk finnes i jord og vann og har en bred metabolsk allsidighet, noe som fører til at denne bakterien kan tilpasse seg flere forskjellige habitater og miljøer med mye næring (Molina et al., 2014). *P. putida* er en rhizobakterie og er en sterk kandidat for fremming plantevekst for å kunne øke avlinger. Blant annet er denne stammen viktig for inokuleringen av raps, tomat og andre landbruksplanter for å promotere rotveksten hos frøplanter ved å gi jern til planten (Patten & Glick, 2002). Bakterien har blitt funnet hos pasienter ved sykehus både i Europa, Asia og Nord-Amerika, og har vist seg i sammenheng med innsetting av kateter og drenerings-tuber. Isolatene hentet fra sykehus har vist seg å ofte være resistente mot β -laktamer, men de har lite patogen-potensial. Det som kan være et større problem med bakterien er at den har potensialet til å overføre plasmider til *Pseudomonas aeruginosa* gjennom transformasjon, og er en større bekymring i sykehusmiljøer. Spesielt er det stammen *P. putida* HB3267 som har vist seg som mer resistent og analyser viser til at stammen har flere gener som kan være effektive for spredning av AR mellom forskjellige *Pseudomonas* stammer (Molina et al., 2014).

2.6 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia er en gramnegativ bakterie som kan holde til i de fleste akvatiske eller fuktige miljøer over hele verden. *S. maltophilia* er ikke en høyt virulent patogen i seg selv, men blir assosiert med respiratoriske infeksjoner. Stammen er vanligvis tilknyttet til respiratoriske infeksjoner som lungebetennelse, men har vist seg som et viktig patogen som er med på å bidra til sykehusinfeksjoner. Blant annet er det forbundet med bakteriemi, der det har vist seg å øke dødeligheten fra 14 % opp til 69% (Brooke, 2012). *S. maltophilia* har vist seg spesielt farlig for kreftpasienter med lungekreft som følge av kols. Bakterien er med på å skape problemer for moderne medisin, ettersom dette er en

multiresistent bakterie, som gjør den vanskelig å behandle med antibiotika. Bakterien har en iboende motstand mot flere antibiotika, grunnet lav membranpermeabilitet og tilstedeværelsen av kromosomalt kodete multiresistente effluks-pumper. Genomet til *S. maltophilia* viser stor diversitet, som er med på å øke sannsynligheten for at dette er et patogen i seg selv (Brooke, 2012; Hansen, 2012; Looney, Narita, & Muhlemann, 2009). Det er også et problem at bakterien klarer å kolonisere seg i ekstreme nisjemiljøer, slik som på romferger og rene rom (An & Berg, 2018).

2.7 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica er et gramnegativt patogen som kan føre til forskjellige sykdomsforløp. En infeksjon skyldes vanligvis inntak av mat, melk eller vann som er kontaminert med bakterien og kan gi akutte inflammatoriske sykdommer i fordøyelsessystemet som diaré og magesmerter. Det kan også føre til betente lymfeknuter i magen, som videre kan forårsake magesmerter og feber. Infeksjonen varer vanligvis rundt to uker (Bottone, 1997; Wagner, Lin, Borst, & Miller, 2013). Bakteriestammen er en heterogen gruppe som videre kan deles inn i seks biogrupper, som baseres på fenotypisk karakteristika. Innenfor disse gruppene kan den deles inn til 57 forskjellige O serotyper ut ifra antigener på overflaten av bakteriecellen (Fabrega & Vila, 2012). *Y. Enterocolitica* er et enterisk patogen, om bakterien er patogen kommer an på tilstedeværelse eller fraværende av flere virulensfaktorer som fører til invaderingen av celler i tarmen (Aljorayid, Viau, Castellino, & Jump, 2016). Invasin styrt av genet *inv* er en av disse og er et ytre membranprotein som binder til den apikale overflaten til tarmsystemets M- celler, dette fører til translokasjon av bakterien inn til Peryers lappene. Genet *yadA* koder for et ytre membranprotein som fremmer bindingen til epitelceller (Bottone, 1997; Wagner et al., 2013).

2.8 *Rahnella*

Rahnella er en gram-negativ bakteriestamme og hører til Enterobacteriaceae-familien. Den finnes spredd rundt ut over i naturen, men mest typisk er den vanligst å finne i vann og jord, men har også blitt funnet i mat. Hos mennesker ble de aller første funnene av bakteriestammen gjort i brannså, og etter hvert har stammen blitt erkjent som en opportunistisk patogen bakterie (Stock, Gruger, & Wiedemann, 2000). Infeksjoner som er tilknyttet stammen er blant annet bakteriemi, blodforgiftning, respiratoriske infeksjoner, urinveisinfeksjoner, sårinfeksjoner hos pasienter med nedsatt immunforsvar og personer med

medfødte hjertesykdommer kan det føre til infeksjoner i hjertet (Funke & Rosner, 1995; Kuzdan et al., 2015). Det er ikke utført mange resistensforsøk på *Rahnella* til tross for at det er betegnet som en opportunistisk bakterie, men Stock et al. Utførte et større forsøk med 70 *Rahnella*-stammer sammenliknet mot 71 forskjellige antibiotika (Stock et al., 2000).

2.9 Metodisk teori

2.9.1 Screening med selektive kromogene skåler

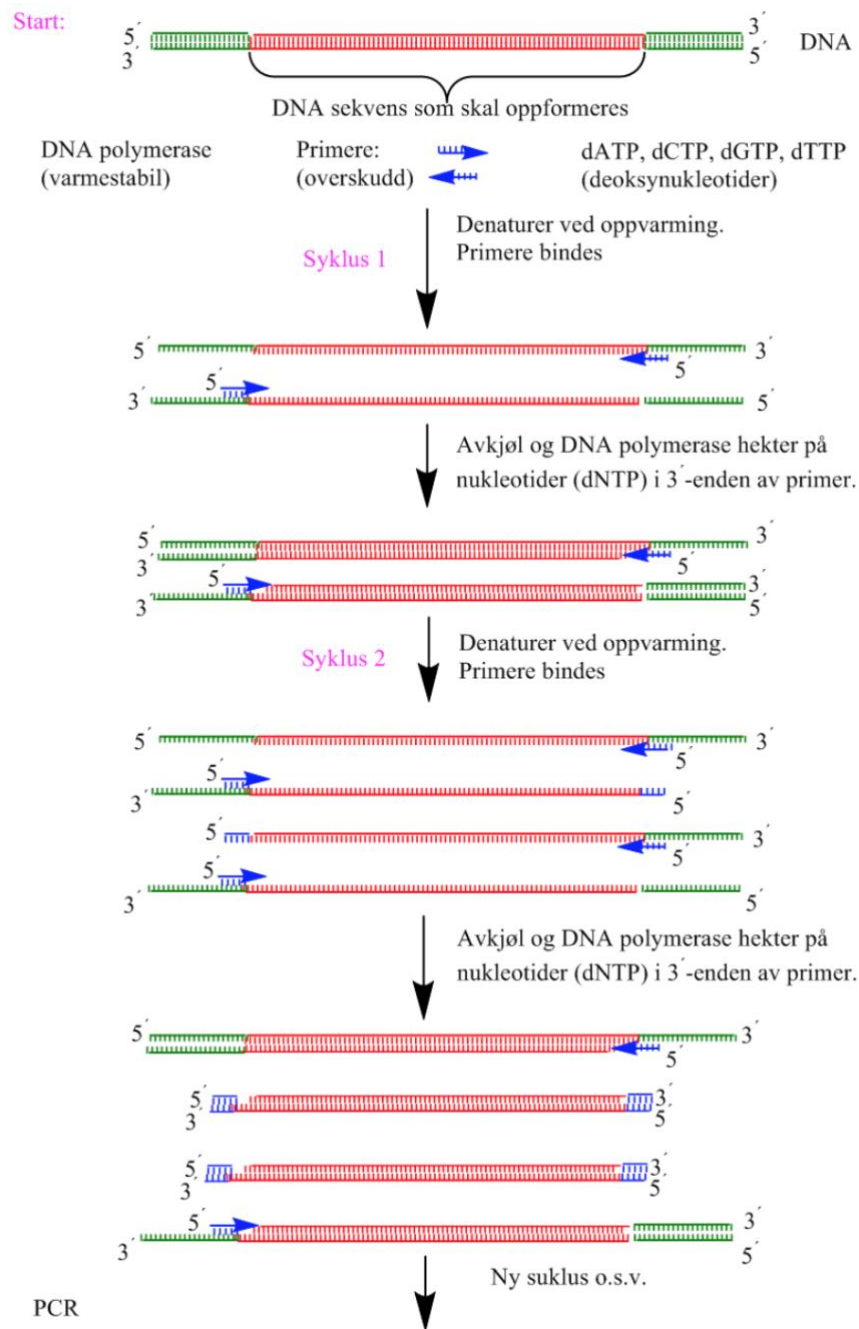
For å detektere ESBL- produserende bakterier blir det i denne oppgaven benyttet Brilliance™ CRE agar og Brilliance™ ESBL. For Brilliance™ CRE agar vil man få resultater etter 18 timer inkubering for carbapenem-resistente Enterobacteriaceae (CRE) og for Brilliance™ ESBL vil man få resultater etter 24 timer (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013, 2016). CRE-agar brukes som et sensitivt verktøy for å kunne oppdage KPC- og metallo-karbapenamase-produserende Enterobacteriaceae (Nordmann et al., 2012).

2.9.2 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) ble utviklet i 1985-86 av Cetus Engeneering og er en in vitro metode for å syntetisere spesifikke DNA-sekvenser ved hjelp av enzymer. Denne metoden baserer seg rundt det varmetålende enzymet *Taq* polymerase fra bakterien *Thermus aquaticus* som er termofil (Erlich et al., 1989). PCR-produkter benyttes for det meste til epidemiologiske bruksområde (Nordmann et al., 2012), men også til flere ulike fagfelt som til identifisering av biologisk materiale og undersøkelser av genetiske sykdommer (Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011b).

Ved bruk av to oligonukleotid- primere hybridiseres to motsatte tråder som dekker området av interesse på DNAet. Under reaksjonen gjentas en syklus som involverer flere trinn, denaturering av templatet til to enkelttråder, annealing og elongering av DNA-primere ved hjelp av DNA-polymerase, hvert trinn blir gjennomført ved egnede temperaturer for en optimal reaksjon (Erlich et al., 1989). Det dobbelttrådede DNAet som skal formeres opp varmes opp til 90- 95 °C for denaturering, for så å kjøles ned til 40- 65 °C for at templatene kan festes til bestemte primere på rundt 20 bp, komplementære til området på templatet som skal kopieres. Når temperaturen heves til 72 °C vil elongering av primeren starte og dermed kopiere opp den ønskede sekvensen fra 3'- OH enden av primeren ved hjelp av *Taq* polymerase. Denne syklusen gjentas så mange ganger som det er nødvendig for å få den

ønskede mengden oppkopierte sekvenser, rundt 20- 30 runder er vanlig (Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011b). På grunn av at primerene bare kan feste seg til en DNA-tråd under elongeringen vil det for hver runde bli ca. en dobling av hvert templat. Som oftest kan annealing og elongering skje ved samme temperatur, som forenkler prosedyren. Ved bruk av temperaturer over 55 °C vil det kunne forbedre spesifisiteten av reaksjonen (Erlich et al., 1989).



Figur 2: Illustrerer syklusen til en polymerase kjedereaksjon vist gjennom to sykluser (Botanisk- og plantefysiologisk leksikon, 2011b).

2.9.3 Multiplex PCR

Nå som det gjøres flere og flere funn av isolater som har mer enn én form for β -laktamase, og det er en høy diversitet av allsidige enzymer, brukes multiplex PCR ofte for delektering av gener, da spesielt til epidemiologiske undersøkelser (Dallenne et al., 2010). Med multiplex PCR kan man ha flere mål i løpet av en PCR-kjøring, dette gjøres ved å bruke flere primere i reaksjonsmiksen. Som en utvidelse av den vanlige bruken av PCR, er dette en tidsbesparende metode.

Falske negativer kan bli funnet ved hjelp av multiplex PCR, ettersom hvert ampikon blir forsterket og har en egen kontroll som skiller seg fra de andre forsterkede fragmentene. Eksoner på det ønskede genet kan amplifiseres og forsterkes under analysen. Så lenge det er fragmenter til stede på agarosegelelektroforesen etter multiplex PCR er gjennomført vil dette bety at reaksjonen ikke har feilet (Edwards & Gibbs, 1994).

2.9.4 Sanger-sekvensering

Denne formen for sekvensering utnytter seg av enzymet DNA-polymerase og ble utviklet av Frederick Sanger. Metoden baserer seg på å kopiere opp templat-tråder fra DNA ved hjelp av DNA-polymerase og dideoksyribonukleotider (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) for å avslutte kjedene. Sekvenseringsmetoden tar utgangspunkt i en løsning med mange kopier av enkelttrådet DNA fra den ønskede organismen. Dette blandes med deoksyribonukleotidene (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), DNA polymerase og primere, som er korte sekvenser komplementære til 3'-enden av DNA-tråden. Primere brukes for å starte syntesen av DNA og er enten merket med fluorocerende fargestoffer eller så er de radioaktivt merket. Dette fordeles over fire rør, der hvert rør også inneholder en av fire nukleotidene i dideoksyform (dd-). Dideoksyformen bidrar til å stoppe DNA-syntesen ved at disse skiller seg smått fra de vanlige deoksyribonukleotidene ved at de mangler en -OH gruppe som fører til at de ikke kan bygges videre på. Dette resulterer i en samling av enkelttrådede kopier av de originale sekvensene. Reaksjonene kjøres med elektroforese på polyakrylmidgeler, der mindre fragmenter vil bevege seg raskere og dermed lenger frem på gelen i det negativt ladde elektriske feltet. Til slutt synliggjøres de merkede oligonukleotidene (A, C, G eller T) på film og sekvensen for de nysyntetiserte trådene kan leses av direkte nedenfra og opp på båndmønsteret (Botanisk - og plantefysiologisk leksikon, 2021).

2.9.5 Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq sekvensering

Neste generasjons sekvensering (NGS) gir muligheten til å analysere større mengder sekvenser av gangen (Fadrosh et al., 2014). Illuminasekvensering er en ofte brukt metode som krever tre steg, bibliotekforberedelse, sekvensering og data analyse. Første steg er å fragmentere DNAet og blandet sammen med et unikt sett med Illumina index primere som fester seg på hver ende av fragmentene. Primerne inneholder et adapter og en strekkode og hvert adapter fester seg til hver side av fragmentet og tillater oligonukleotider å binde seg til en «flow celle». Den unike strekkoden gjør det mulig for fragmentene å bli kartlagt tilbake til den originale prøven, dette fører til at flere prøver kan bli sekvensert samtidig. Videre, når biblioteket er ført over på flow cellen og sekvenseringen begynner, amplifiseres DNA-fragmentene til millionvis av enkeltrådede DNAtråder som samler seg i klynger. Nukleotider binder seg til komplementert DNA, denne prosessen kalles sekvensering ved syntese, der hvert nukleotid inneholder et fluoreserende merke og en reversibel terminator. Disse merkene indikerer hvilke nukleotider som har blitt lagt til, mens den reversible terminatoren blokkerer for nye baser til et fluoreserende signal i fra merket som har blitt sendt ut. Først leses «forward reads» før de kastes vekk, deretter repeteres prosessen for de reverserte reads, som resulterer i «paired end» sekvensering (Illumina, 2021). Etter sekvenseringen, blir nukleotidene identifisert og data kan bli videre analysert med bioinformatiske verktøy. I denne oppgaven har plattformen Galaxy blitt benyttet. NSG slik som Illumina gir muligheten til sekvensering av større DNA-fragmenter og fører dermed til en mer effektiv analyse av DNA.

2.9.6 Nanopore-sekvensering

Nanopore-sekvensering består av flow celler med en elektroresistent membran som har en rekke innebygde små hull, og det er disse som blir kalt nanoporer. Hver nanopore korresponderer til sin egen elektrode som videre er tilkoblet til en kanal og til en sensorchip, denne måler den elektriske strømmen som passerer igjennom en nanopore. Når et molekyl passerer gjennom en nanopore blir strømmen forstyrret for å lage et karakteristisk bølgemønster. Dette mønsteret blir så dekodet ved bruk av basecalling- algoritmer for å bestemme DNA eller RNA sekvensen i sanntid. Dette fører til at Nanopore sekvensering er unikt av sitt slag, da det er den eneste sekvenseringsteknikken som gir direkte analyse i sanntid, uansett om det er lange eller korte fragmenter av DNA eller RNA (Nanoporetech, 2021).

2.9.7 Antibiotika sensitivitetstest

I kliniske sammenhenger er det svært viktig med antimikrobiell sensitivitetstesting av bakterieisolater. Tester som dette er med på å finne mulige AR i vanlige patogene bakterier og for å sikre mottageligheten for antibiotikum som brukes mot bestemte infeksjoner (Jorgensen & Ferraro, 2009). I 1952 utviklet Gould & Bowie en teknikk som nå har blitt en standardisert metode mellom laboratorier. Teknikken bestod av sammenlikning mellom diameteren av soner rundt papir diskettene ved forskjellige konsentrasjoner av antimikrobielle medium som var tilsatt på diskettene, metoden ble satt opp imot kontrollorganismer (Piddock, 1990). I dag brukes denne metoden enten med disketter eller med antibiotikastrips, som har blitt brukt i denne oppgaven. Antibiotikastrips er en stripe i plast, som har en lav konsentrasjon av i antibiotikumet og har en økende konsentrasjonsgradient mot den andre enden av stripsen. MIC- verdien beregnes da ved å se på hemningssonens laveste verdi (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016)

I denne oppgaven har hovedmålet vært å finne tilstedeværelse av ESBL og Karbapenemresistente bakteiriesolater fra akvatiske miljø. For så å undersøke genene disse bakterieisolatene innehar og undersøke hvorvidt spredningen av AR og AR gener i miljøet vil påvirke dagens allerede eksisterende antibiotika.

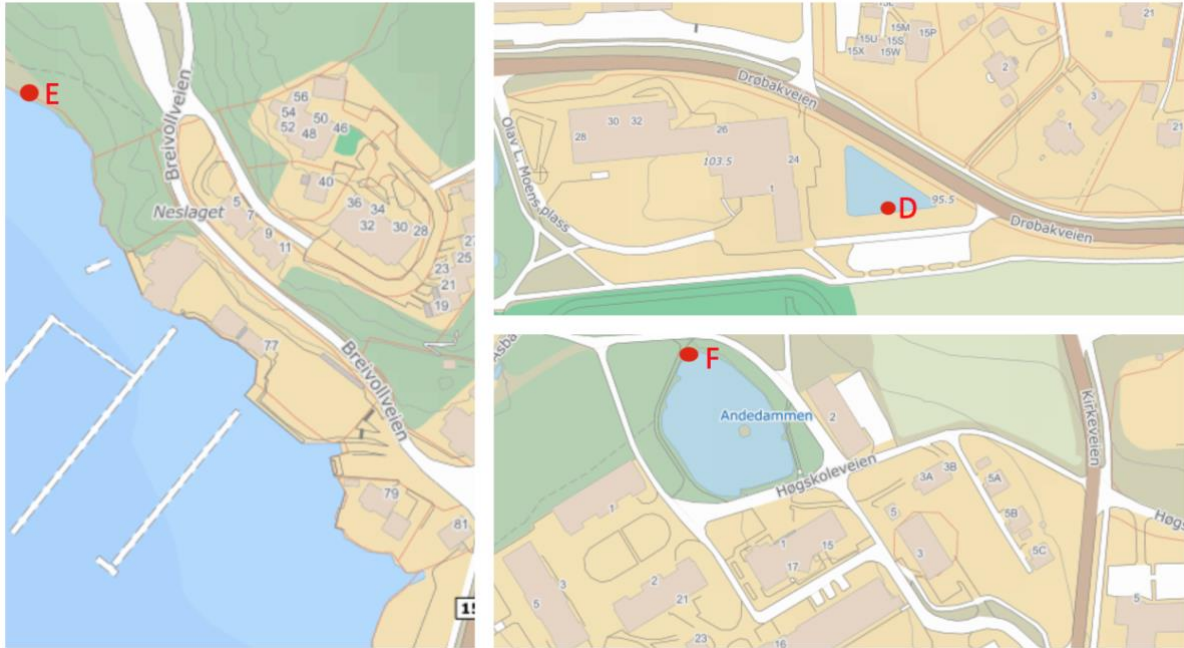
3. Materialer og metoder

3.1 Prøvetakning fra miljø

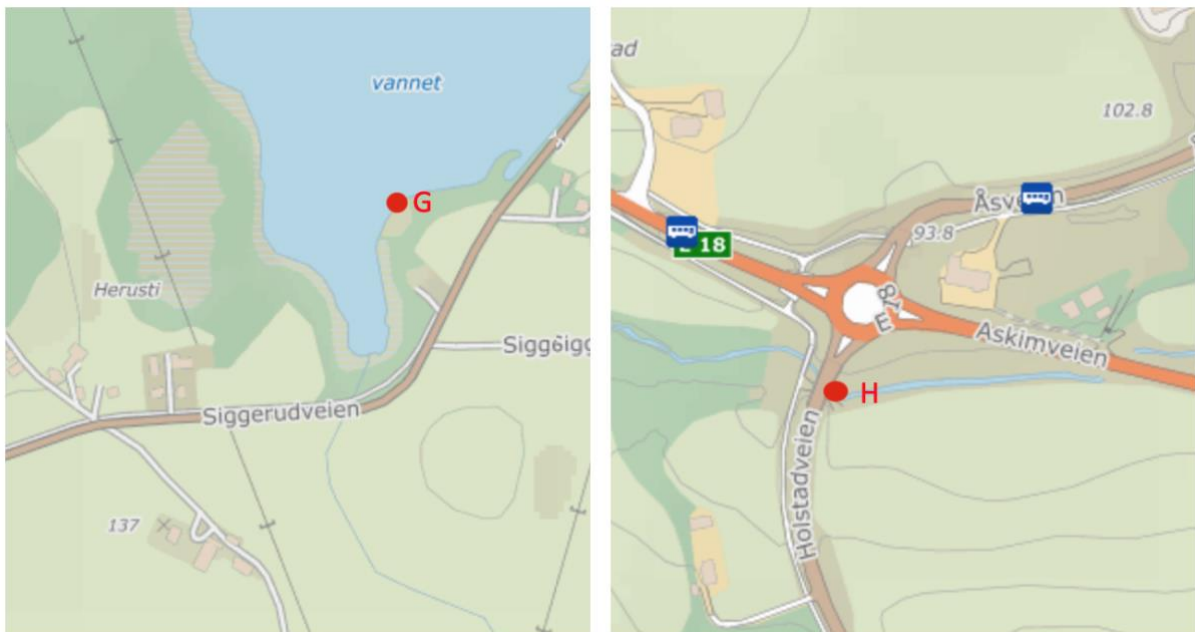
Prøver ble hentet inn fra åtte ulike vann i Follo. Alle prøvene ble hentet inn som vannuttak i 1000 mL sterile Scott Duran glassflasker og lagret i et døgn på 4 °C for sedimentering. Vannuttak A- F ble hentet inn 24. og 25. august 2020, mens vannuttakene G og H ble hentet inn 06. September 2020. De tre første uttakene ble hentet i Drøbak, A ble hentet fra et badevann, Øvre Dammen og B ble hentet fra en tilhørende bekk der vannet renner fra Øvre Dammen til tjernet, Nedre Dammen, vist i Figur 3.1. Uttak C ble hentet fra Vindfangerbukta, innerst ved båthavnen. Videre ble det hentet uttak i fra Ås, D i en dam utenfor Studentsamfunnet, Smilehullet, E ble hentet langs strandkanten på Breivoll badeplass og F ble hentet fra en dam på campusområdet, Andedammen (Figur 3.2). Fra Andedammen ble det også hentet ut prøver i et laboratoriekurs av Prof. Lindstedt som ble hentet ut tidlig i september. De siste to prøvetakningene, vist i Figur 3.3, ble hentet i ski, G ble hentet fra Midtsjøvannet langs strandkanten og H ble hentet ut fra en bekk som går ut fra Østensjøvannet under E18.



Figur 3.1: Kart over områdene vannuttak A, B og C ble hentet i Drøbak. Uttak A ble hentet fra Øvredammen, B ble hentet fra en bekk fra Øvredammen, ned mot Nedredammen.



Figur 3.2. Kart over vannuttak hentet i Ås. Uttak D ble hentet i Smilehullet ved Studentsamfunnet i Ås, E ble hentet på Brevoll badebass og F ble hentet fra Andedammen.



Figur 3.3. kart over vannuttak hentet fra vann i ski. Uttak G ble hentet fra Midsjøvannet og H ble hentet fra en bekk fra Østensjøvannet under E18.

3.2 Filtrering og rensing av vannprøver

Vannet ble videre grovfiltret for å fjerne jord og andre uønskede partikler fra vannet. Dette ble utført med sterile Whatman filter paper 589/1 Black ribbon 150 mm diameter (GE Healthcare, VWR™ Life Science, Pittsburg, USA). Filteret lar bakterier passere, mens jord og større partikler forblir i papiret. Vannet ble helt over i nye sterile 1000 mL sterile Scott Duran glassflasker, gjennom filteret som ble plassert i en trakt. For alle prøvene ble det filtrert fra 400-500 mL vann.

Ved bruk av Millipore™ Microfil-vacuum- filtreringssystem MISP00002 (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) koplet til en vask ved hjelp av en plastslange, ble vannprøvene finfiltrert. Fra hver prøve ble 100 mL fylt i beger og filtrert igjennom filter fra EZ-Pak® membranfilter (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) 087 med 0,47 µm porestørrelse, ved hjelp av trykket fra kranen. Filtrene ble deretter overført med pinsett til agarskåler med AR- mediet Oxoid Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE AGAR (Thermo Fisher Scientific Inc., Hampshire, Storbritannia). Utførelsen av dette ble gjort sterilt både ved bruk av pinsett og nye filter. Det ble også pipettert ut 100 µL av hver prøve over på egne agar- skåler. Skålene ble satt til inkubering ved 37°C i 72 timer, til tross for at det anbefales 24-48 timer fra produsentene. Skålene ble satt til inkubering i ytterligere 24 timer da det var lite vekst.

Etter inkubering ble kolonier av interesse plukket med podenål for så å strekes ut på nye skåler, for å isolere hver enkelt bakterie. Hovedfokuset var på kolonier som var blå, grønne eller rosa i fargen, men det ble også hentet opp noen beige og mer brunsorte kolonier. Skålene ble inkubert i 24 timer ved 37°C. Enkelte prøver ble støket ut en andre gang for å renyrke koloniene og inkubert som tidligere.

Rendykede kolonier ble overført til 5mL Brain Heart Infusion»(BHI) buljong (OXOID Ltd., Loughborough, Storbritannia) i rør med kork. Rørene ble satt til inkubering i 37°C over natten. Videre ble det laget stokkløsninger for langtidslagring av prøvene ved å pipetere 666 µL BHI med bakteriekultur og 333 µL 60% glyserol i 2 mL kryorør (Nunc™ CryoTubes™, Thermo Fisher Scientific Inc., Hampshire, Storbritannia). Kryorørene ble deretter lagret ved -80°C.

3.3 Ekstraksjon av DNA

Videre til ekstrahering av DNA ble det brukt GenEluate™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA). Her ble protokollen for Gram-positive bakterier fulgt, da det var uvisst om bakterieisolatene var gram-positive eller -negative. Ved bruk av den gram-positive protokollen blir det tatt i bruk lysosym som er et enzym som bryter ned celleveggen til eventuelle grampositive bakterier. Protokollen tilhørende kittet ble brukt, med ett unntak. Bufferen som fulgte med ble byttet ut med SequalPrep™ Normalization Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Ekstrahert DNA ble oppbevart i -80°C før vider bruk.

3.3.1 Kvantifisering og renhetsbestemmelse av ekstrahert DNA

For å måle renheten til det ekstraherte DNAet ble NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, USA). Absorpsjonsforholdene ble bestemt til $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$. Før bruk ble instrumentet kalibrert med 2 μL destillert vann som blank og videre ble 2 μL fra hvert isolat pipetert på linsen og avlest. Mellom hver avlesning ble linsen tørket med papir.

Konsentrasjonen av isolatene ble målt med Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) og for å klargjøre DNA isolatene til kvantifisering ble det brukt et Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™ Life Technologies Corporation Eugene, USA) som beskrevet i protokoll. Reagensene fra kittet ble brukt ved romtemperatur og isolatene ble tint opp stående på is og vortexet før de ble tatt i bruk. Kalibreringen av apparatet ble gjort med de to standardene som fulgte med kittet, for å ha en standardkurve prøvene ble målt opp mot, av hver standard ble det brukt 10 μL standard blandet med 190 μL av kittets reagensløsning. Det ble brukt 2 μL av hvert isolat som ble blandet med 198 μL reagensmiks, dette ble så inkubert i to minutter før avlesning av konsentrasjonen.

3.4 Sanger-sekvensering av 16S rRNA

Isolatene ble identifisert ved PCR-amplifisering av gener som koder for 16S rRNA og Sanger-sekvensering av PCR- produktene.

3.4.1 PCR-amplifisering av 16S rRNA

Amplifiseringen av 16S RNA ble gjennomført ved bruk av iProof™ High Fidelity DNA polymerase Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Vilnius, Litauen). Her ble det laget en «mastermix» av Iproof™ HF buffer, dNTP, Forward og Reverse primer (Tabell 3.1), PCR gradert H₂O og Iproof DNA polymerase. 2 μL av templat DNA ble tilsatt til 38 μL i MicroAmp® 8-Tube Strip, 0,2 mL (Applied Biosystems™) Tabell 3.1 viser mengdene og konsentrasjonen på reagensene brukt for PCR reaksjonen.

Tabell 3.1: Primersekvenser brukt til amplifiseringen av genet 16S rRNA.

Primer	Primersekvens (5´-3´)	Størrelse (bp)
Forward (F)	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	1505
Reverse (R)	GGTTACCTTGTTACGACTT	

Tabell 3.2: Oppsett for reagenser, start- og -sluttkonsentrasjon og volum tilsatt for amplifisering av 16S rRNA ved bruk av PCR.

Reagens	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum (μL) per reaksjon
Iproof™ HF buffer	5x	1x	8
dNTP	10 mM	200 μM	0,8
Forward primer	5 μM	0,25 μM	2
Reverse primer	5 μM	0,25 μM	2
PCR grade H ₂ O			24,8
Iproof™ DNA polymerase	2U/ μL	0,02 U/ μL	0,4
Templat DNA	5-100 ng/ μl ¹	7,5-150 ng	2
Totalt			40

Amplifiseringen ble gjennomført på PCR-maskinen SimpliAmp Thermal Cycler (Applied biosystems® by life technologies™) programmet som ble brukt er vist i Tabell 3.3.

Tabell 3.3: Program brukt for PCR-reaksjonen ved 16S rRNA amplifisering.

	Temperatur (°C)	Tid	Sykluser
Aktivering av Iproof™ DNA polymerase	98	00:30	1
3-trinns-syklus:			
Denaturering	98	00:10	35
Primer annealing	55	00:30	
Primer ekstensjon	72	00:45	
Endelig ekstensjon	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

3.4.2 Agarosegelelektroforese

Produktene fra PCR-amplifiseringen ble videre tatt over til gelektroforese og kjørt på en 1% agarosegel. Gelen ble tillaget med 0,5 g SeaKem® LE Agarose (Lonza Rockland Inc., Rockland, USA) dette ble blandet med 50 mL 1x Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer (bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) i Scott Duraln glassflasker, som tåler varme. 1x TAE-bufferen ble fortynnet fra 5x TAE buffer (50 mM EDTA-DInatriumsalt, 2M Tris og 1M iseddik) med destillert H₂O. Blandingen med SeaKem® og 1x TAE-buffer ble varmet opp i mikrobølgeovn til alt pulver var oppløst, det ble deretter satt til kjøling og tilsatt 1 µL med DNA/RNA dye, PeqGreen (2 x 1 ml) (Peqlab) før det ble helt over i utstøpingskar med brønnkammer (Bio-Rad Laboratories Inc.). Ferdig stivnet gel ble videre plassert over i Mini-Sub® Cell Model GT System (Bio-Rad Laboratories Inc.), disse karene ble fulgt med 1x TAE-buffer til gelen var dekket.

For å forberede prøvene til applisering på gel ble 2 µL Agarose Gel Loading Dye 6x (New England BioLabs Inc., Ipswich, England) og 4 µL med RNase-fritt vann blandet med 2 µL fra hver prøve ved å pipetere opp og ned. Hver av de preparerte prøvene på 8 µL ble deretter pipettert over på gel i hver sin brønn. I tillegg ble det tilsatt 5 µL av 1 Kb ladder på hver av radene på gelen. Gelelektroforesen ble kjørt på 90 V i 30-45 min med Bio-Rad PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc.). For å se resultatene på gelen ble det tatt bilder av gelen med Molecular Imager® Gel Doc™ XR Image System (Life science, Bio-Rad Laboratories inc.). Størrelsen på båndene ble målt ved å sammenlikne med 1 Kb ladder.

3.4.3 Rensing av ferdig PCR-produkt og klargjøring til Sanger-sekvensering

For å rense det ferdige PCR-produktet etter 16S rRNA-amplifisering ble Sigma-Aldrich® GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA). Dette ble gjort som beskrevet i protokollen, sett bort ifra selve elueringen, der det ble tilsatt 40 μL «Elution Solution» og ikke 25 μL som beskrevet i protokollen. Videre ble prøvene kvantifisert med bruk av Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) og forberedelsene til kvantifisering ble utført på samme måte som beskrevet tidligere. 1,5 mL eppendorfrør ble merket med strekkoder, to for hver prøve (ett til forward primer og ett til reverse primer). Prøver med en konsentrasjon $>80 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ble tilsatt 3 μL prøve og 7 μL primer, prøver med 20-80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ble tilsatt 5 μL prøve og 5 μL primer, og prøver med $<20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ble tilsatt 7 μL prøve og 3 μL primer. Deretter ble prøvene sendt til Eurofins Gats biotech, Konstanz, Germany for Sangersekvensering.

3.4.4 Dataanalyse av sekvenseringsresultater

Programvaren BioEdit 7.2 ble benyttet for å justere og sammen forward- og reverse-sekvensene til contigs- sekvenser. For deretter å sette contigs-sekvensen inn i programmet Nucleotide Basic Logical Allignment Search Tool (nBLAST) fra nettsiden National Center for Biotechnology Information Serch database (NCBI) for å analysere prøvene fra Tyskland. Cintigs-sekvensen ble søkt opp mot databasen Nucleotide collection (nr/nt). Resultatet av dette ga en bakterieslekt som contigs-sekvensen fra prøvene kunne stamme fra.

3.5 Deteksjon av resistensgener

3.5.1. Multipleks PCR med ESBL- primerkmiks

En multipleks- PCR ble gjennomført for å screene etter ESBL-gener i prøvene med ekstrahert DNA, dette ble utført med multipleks- primerkmiksene ESBL 1, 2, 3 og 4. ESBL 4 brukes som en kontroll. I hver primerkmiks er det flere primerpar, for detektering av forskjellige ESBL-grupper. Reaksjonsmiksen til multipleks PCR ble preparert med QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Tyskland). Under tillagningen ble protokoll fulgt, med halvparten av reagensene og «5x Q Solution» ble ikke brukt. Dette ga en reaksjonsmiks på 24 μL per prøve, som ble blandet med 1 μL prøve (tabell 3.4). PCR ble gjennomført med programmet som er beskrevet i tabell 3.5.

Tabell 3.4: Reagenser til multipleks PCR oppgitt i volum og deres endelige konsentrasjon i reaksjonsmiksen. Før templat-DNAet ble tilsatt etter at mastermiks var fordelt PCR-rør.

	<i>Reagens</i>	<i>Volum per reaksjon</i> (μL)	<i>Endelig konsentrasjon</i>
<i>Mastermiks</i>			
<i>2x QIAGEN Multiplex PCR</i>		12,5	1x
<i>Master Mix</i>			
<i>10x primer mix (2 μM av hver primer)</i>		2,5	0,2 μM av hver primer
<i>RNase- fritt vann</i>		9	-
<i>Templat- DNA</i>		1	
<i>Totalt Reaksjonsvolum</i>		25	

Tabell 3.5: Program brukt på PCR-maskinen for ESBL multipleks-PCR.

<i>Temperatur</i>	<i>Tid</i>	<i>Antall sykluser</i>
95	15 min	1
94	30 s	28
60	90 s	
72	90 s	
72	10 min	1
4	∞	

Etter gjennomført PCR ble produktene satt over på 1% agarosegel gjennomført slik som tidligere beskrevet i avsnitt 3.4.3. I agarosegelen ble det sett etter sekvensene vist med både Forward og Reversed primer sekvenser i tabell 3.6.

Tabell 3.6: Primere brukt til identifisering av β -laktamaser, ESBL og carbapenamase gener, hentet fra (Dallenne et al., 2010) for ESBL 1 og 2 og (Finton et al., 2020) for ESBL 3 og 4.

Målgener	Primer sekvenser	Amplikon størrelse
ESBL 1		
<i>bla_{OXA-48}</i>	F- CGTTGATCGCCCTCGATT R- GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281
<i>bla_{CTX-M/gr.2}</i>	F- CGTTAACGGCACGATGAC R- CGATATCGTTGGTGGTTCCAT	404
<i>bla_{OXA}</i>	F- GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R- GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564
<i>bla_{SHV}</i>	F- AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R- ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713
ESBL 2		
<i>bla_{CTX-M} (gr.9)</i>	F- TCAAGCCTGCCGATCTGGT R- TGATTCTCGCCGCTGAAG	561
<i>bla_{CTX-M} (gr.1)</i>	F- TTAGGAARTGTGCCGCTGYA R- CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688
<i>bla_{TEM}</i>	F- CATTTCGTCGTCGCCCTTATTC R- CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800
ESBL 3		
<i>bla_{NDM}</i>	F- TGGCCCGCTCAAGGTATTTT R- GTAGTGTGCTCAGTGTCCGGCAT	157
<i>bla_{VIM}</i>	F- ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT R- TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	564
<i>bla_{KPC}</i>	F- TCCGTTACGGCAAAAATGCG R- GCATAGTCATTTGCCGTGCC	460
ESBL 4		
<i>rpoB</i>	F- CAGGTCGTCACACGGTAACAAG R- GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC	512
16S rRNA	F- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG R- GYTACCTTGTTACGACTT	1505

Bakteriearter fra samme slekt ble i første omgang kjørt sammen gjennom multiplex. Deretter ble bakteriearter kjørt individuelt dersom blandingen av flere slekter viste bånd på gelen.

Singleplex PCR ble gjennomført på samme måte som multiplex PCR, sett bort i fra at ved sibgleplex ble det bare brukt primere for et ønsket gen i mastermixen. Singleplex ble bare utført på prøver som ga utslag for spesifikke gener på gel etter multiplex PCR.

3.5.2 Helgenomsekvensering ved bruk av Illumina MiSeq

Enkelte prøver ble valgt ut til videre sekvensering, da disse viste seg som interessant mulige patogene funn ut ifra Sanger-sekvenseringen. Prøvene D1, D3, F2, F6 og F11 var de som ble tatt videre til helgenomsekvensering. Illumina MiSeq ble brukt for å kunne finne resistensgener og mulige virulensgener bakteriestammene hadde. Disse prøvene ble fortynnet til en konsentrasjon på 20 ng/ μ L og videre utført av Zhian Salehian.

Ved bruk av LightCycler® 480 II (Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland) ble et prøvebibliotek amplifisert opp. Prøvene ble deretter sekvensert på en Illumina MiSeq plattform med v3-kjemi.

3.5.3 Analyse av MiSeq- resultater i Galaxy

Plattformen Galaxy ble brukt til å analysere filene med «reads» fra helgenomsekvenseringen. For å rense filene for adaptore ble programmet Trimmomatic (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014) brukt. Deretter ble Shovill benyttet for å sette sammen Readsene fra Trimmomatic til «contigs» (T. Seemann, 2017). Denne contigs-filen ble videre skannet i programmet ABRicate (Torsten Seemann, 2016) mot The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) og The Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database gjennom NCBI, for å finne resistensgener. Til slutt i Galaxy ble «PROKKA» (T. Seemann, 2014) brukt for å annotering av assembly-filene. I programmet ABRicate ble også The virulene factor database VFDB brukt for å finne virulensgener, dette ble utført av Prof. Lindstedt. I tillegg ble identifisering av isolatene gjort med «Ribosomal Multilocus Sequence Typing» (rMLST) fra pubMLST.

3.5.4 Nanopore sekvensering

Ved bruk av SQK-RBK004 Rapid Barcoding Sequencing kittet ble DNA biblioteket preparert og pipettert over på MinION R9.4.1 Flongle Flow Cell på en MinION sekvensator. Med programmet MinKNOW ble det benyttet 48 timers basecalling sekvenserings protokoll. Hver runde av sekvenseringen ble gjort i henholdt til Oxford Nanopore Technologies sin protokoll (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Storbritannia).

Filene fra Nanopore ble også lastet inn hos Galaxy, Porechop (Wick, 2017) ble brukt for å fjerne adaptore fra MinION multi FASTQ filene. For å sette sammen sekvensene til konsensussekvenser ble programmet Unicycler brukt, sekvensene ble også satt sammen med ferdige sekvenser fra MiSeq Sekvensering. Deretter ble det brukt PROKKA brukt til

anotering. For å se etter resistens- og virulens- gener ble det gjort det samme som for MiSeq filene, i ABRicate, mot CARD og og NCBI National Database of Antibiotic Resistance Organisms.

3.6 Sensitivitet mot antibiotika

For å finne grad av resistens hos prøvene ble en bakteriesuspensjon strøket ut på ferdigstøpte MH-agarplater (Thermo Fisher Scientific Inc.). Disse bakteriesuspensjonene ble laget ved å overføre 300 μL fra bakterieisolaters overnatt-kulturer til rør med steril salt-løsning (0,85% NaCl), tettheten av dette ble sammenliknet med en Mc. Farland standard 0,5. Dette ble strøket jevnt ut på petriskålene med MH agar- skålene en bomullspinne. Før inkubering ble det plassert M.I.C Evaluator (oxid), ETEST[®] (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), eller MIC (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) gradient-strips. Alle prøver ble testet mot 5 typer antibiotika og prøvene F2 og F6 ble testet mot videre 5 typer antibiotika som tilhører klasser vist i tabell 3.7. Antimikrobielle strips ble plassert på overflaten av MH- agaren ved bruk av en steril pinsett før skålene ble inkubert ved 37 °C i ett døgn. MC-verdiene ble målt ved å lese av hemningssonen på stripsen og videre for å finne graden av resistens ble dette sammenliknet med MIC kliniske brytningspunkt fra EUCAST (EUCAST, 2020).

Tabell 3.7: Viser antibiotika brukt i denne oppgaven og klassene de hører til.

Klasse antibiotika	Antibiotikum
Aminoglykosider	Gentamicin (GM)
Kefalosporiner	Cefotaxime (CT)
	Cefepime (FEP)
Fluorokinoloner	Ciprofloxain (CI)
Karbapenemer	Imipenem (IP)
	Meropenem (MP)
Makrolider	Erytromycin (EM)
Penicilliner	Ampicillin (AM)
Tetracycliner	Tetracyclin (TE)
Trimetoprim	Tripetoprim (TM)

4. Resultater

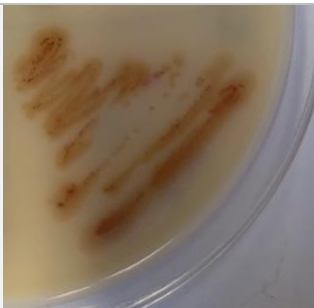

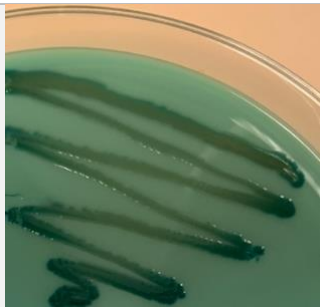
4.1 Fenotypisk deteksjon og 16S rRNA


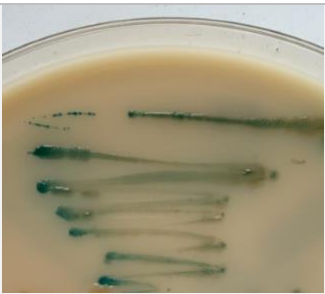

Skålene med Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE agar ga vekst fra alle prøver, totalt ble 36 prøver tatt videre til rendyrking. Disse ble valgt på grunnlag av veksten på skålene og farge. Ved rendyrkning viste flere av prøvene seg som mer enn en bakterie i samme koloni. Noen av disse var mulige å skille fra hverandre med gjentatte forsøk av rendyrkning, mens noen av disse viste seg som vanskelige å separere fra hverandre.

Enkelte av prøvene hadde kort levetid på agarskålene og ga dårlig vekst i BHI buljong, og ble derfor ikke tatt videre til ekstrahering av DNA. Dette gjelder blant annet prøver hentet fra Breivoll, der det var få kolonier i utgangspunktet og utplukkede kolonier som ble rendyrket vokste dårlig etter videre rendyrkning.

I tabell 4.1 vises prøvene som det er lagt fokus på videre i oppgaven, resterende prøver er vist i vedlegg A. Tabellen viser både nBLAST søk fra Sanger-sekvensering og resultatet fra helgenomsekvensering med Miseq. For petriskålene med vannprøver fra hentet fra A, D og F var det tydelig mer vekst, med en større diversitet i koloniene, som kunne tyde på flere stammer til stede i disse miljøene. Derav ble det hentet ut flere kolonier fra disse platene til videre rendyrkning.

Tabell 4.1: Resultatene for rendyrking av vannprøver på Oxoid Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE agar, viser sekvenslikhet fra 16S rRNA nBLAST resultater og helgenomsekvensering fra Illumina Miseq.

Vannuttak og prøvenavn	Skål	Farge på koloni	Bakterieart sekvenslikhet	Helgenomsekvensering Med MiSeq
D, D1		Beige/ dyp rosa	Bordetella 79 %	Pseudomonas putida 100%
D, D3		Grønne/ beige	Enterobacter 94%	Pseudomonas composti 76% Pseudomonas putida 9% Enterobacter spp. 12%
F, F2		Beige/ blå	Stenotrophomonas maltophilia 99.43%	Stenotrophomonas maltophilia 97 % Pseudomonas 2%

F, F6		Mørk blå	<i>Yersinia enterocolitica</i> 100%	<i>Yersinia enterocolitica</i> 100%
F, F11		Lys blå	<i>Rahnella</i> 99.82% <i>Ewingella</i> 99.73%	<i>Rahnella variigena</i> 100%
F, FX		Brun	Ikke utført*	<i>Escherichia coli</i> 100%

*Prøven FX ble hentet frem fra en fryst prøve, som ble hentet med vannuttak våren 2020, det ble av denne grunn ikke utført Sanger-sekvensering på prøven, kun Illumina MiSeq.

Fremvist i Tabell 4.1 er prøvene som er lagt fokus videre i oppgaven hentet fra Andedammen og Smilehullet som begge er lokalisert på universitetsområdet til NMBU. Prøvene D3 og F11 har en liknende blågrønn farge og ifølge protokollen til Thermofisher scientific Inc. Indikerer denne fargen at dette er arter som hører til en av slektene *E. coli* for blå *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* (KESC) for de som er mer grønnfarget. nBLAST-søk med 16S rRNA amplifisert fra prøvene som query- sekvenser viste at prøvene hadde sekvenslikhet med henholdsvis *Enterobacter*, og *Rahnella* eller *Ewingella*. Fra prøvene som ble hentet fra CRE, F2 og F6, agar ble det også observert blå og mørkere blå farge. Dette indikerte til at bakteriearten som har vokst frem tilhørte KESC- gruppen. Søk gjennom nBLAST med query-sekvensene viste henholdsvis *Stenotropomonas maltophilia* og *Yersinia enterocolitica*. Prøve D1 viste seg som beige/ rosa som ga antakelse om bakteriearten er *E. coli* eller *Pseudomonas spp.* og prøve FX var forventet å være *Pseudomonas spp.*. nBLAST-søk med 16S rRNA viste sekvenslikhet med *Bordetella* for prøve D1. Prøve FX viste seg som en mørk brungrønn farge, som ikke er beskrevet i Thermofisher Scientific inc. sin protokoll. Det ble ikke utført amplifisering av 16S rRNA på prøve FX, da denne prøven var fryst ned fra et tidligere uttak våren 2020, og var avklart som *E. coli*.

4.2 Renhetsmåling og kvantifisering

Bestemmelsen av renhet og konsentrasjonene fra det ekstraherte DNAet til prøvene ble målt med henholdsvis NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer og Qubit® 2.0 Fluorometer. Resultatene er oppgitt i Tabell 4.2

Tabell 4.2: Viser renhet målt i absorbansen ($A_{260/280}$ og $A_{260/230}$) til prøvene målt ved hjelp av NanoDrop spektrofotometer., konsentrasjon er målt med Qubit fluorometer.

Prøve	Konsentrasjon (ng/ μ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
D1	50,3	1,95	2,30
D3	53	2,07	2,33
F2	77,5	1,88	1,85
F6	54,9	1,87	1,99
F11	91,9	1,77	1,39
FX	169	1,85	1,93

Konsentrasjonene som ble målt hadde en variasjon på mellom 50,3- 169 ng/ μ L. Forholdet $A_{260/280}$ har en ønsket verdi på 1,80- 2,20. Resultatene viser at bakterieisolatene er forholdsvis rene, der prøve F11 er den eneste som skiller seg ut med en verdi på 1,77. Forholdet $A_{260/230}$ er ønsket at ligger på mellom 2,0 og 2,2 her var det bare prøvene F6 og FX som var i nærheten av ønsket område. Både prøve D1 og D3 var over ønsket verdi, mens prøvene F2 og F11 viste seg som under ønsket verdi, da spesielt F11 med en verdi på bare 1,39.

4.3 Genotypisk deteksjon av resistensgener

4.3.1 Påvisning av gener ved gelelektroforese

For å se at det var produkt til stede etter 16S rRNA amplifisering ble det kjørt en gelelektroforese. Alle prøvene kjørt på gel viste tilstedeværelse av produktet, med bånd på 1500 bp. Dermed ble også alle prøver sendt videre til Sanger-sekvensering. Vedlegg B viser prøver på agarose gelelektroforese. Før videre sekvensering med Nanopore og Illumina MiSeq ble det også sett etter gener β -laktamasegener.

Ved første gjennomkjøring av multiplex PCR ble slekter blandet sammen for å spare tid og forenkle søket etter positive gener, da alle 36 bakteriearter ble tatt med. Flere prøver viste bånd ved 1500 bp, og enkeltbakterier ble derfor tatt gjennom en ny gjennomkjøring. Dette ga videre utslag for bånd ved 1500 bp på enkelte prøver som A7, A9 og D1, i tillegg til prøvene hittil identifisert som *Serratia fonticola*. Det viste seg imidlertid etter flere gjennomkjøringer med multiplex PCR at feil DNA ble brukt og derfor ble prøvene som ble tatt med videre basert på identitet fra 16S nBLAST (Vedlegg B). Tabell 4.3 viser hva som ble tolket som positive bånd fra gelbilder etter multiplex PCR av prøvene som ble det fokusere på videre i oppgaven.

Tabell 4.3: Viser bånd som ble tydet som positive når avlest på gelbilder etter multiplex PCR, da sett på lengden på bånd mot ladder.

Prøve	ESBL 1				ESBL 2			ESBL 3		
	<i>bla</i> _{OXA} - 48	<i>bla</i> _{CTX} - M (gr.2)	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX} - M (gr.9)	<i>bla</i> _{CTX} - M (gr.1)	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{NMC}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}
D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F11	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

For de videre utvalgte prøvene (D1, D3, F2, F6 og F11) viste det seg for tydelige bånd for *bla*_{SHV} for prøve D3 og F11, F6 viste et svakt bånd for *bla*_{OXA}. Dermed ble det utført singleplex for prøvene vist i vedlegg B, for prøve F6 og D3 kom det ikke frem bånd på singleplex, men for prøve F11 viste det seg å komme frem flere bånd ved singleplex gjennomkjøring, som ga tvetydige resultater.

4.3.2 Illumina MiSeq- sekvensering

Illumina MiSeq Sekvensering ble utført både på NMBU (prøve D1, D3, F2, F6 og FX) og i Oslo (prøve F11). Identifisering av isolatene ble utført med rMLST fra pubMLST databasen. Prøve D1 ble identifisert som *P. putida* og prøve D3 som en blanding av *P. composti* (97%), *P. putida* (9%) og 4 bakteriearter innenfor slekten *Enterobacter* (12%), som hver hadde en sekvenslikhet på 3% (Resistensgener er vist i Tabell 4.4). Dette viste at andre ekstraksjon fra D1 ga et annet resultat enn ved Sanger-sekvensering Prøvene F2, F6, F11 og FX ble identifisert som henholdsvis *S. maltophilia*, *Y. enterocolitica*, *R. variigena* og *E. coli*.

4.3.2.1 Funn av resistensgener

I Tabell 4.4- 4.6 vises β -laktamasegener og resistensgener funnet i fra bakterieisolatene. Alle resultater hentet ut fra helgenomsekvenseringen av prøvene finnes i Vedlegg C. Genene ble funnet etter å ha behandlet sekvenser i plattformen Galaxy med søk i databasene NCBI og CARD. Alle annoterte gener av interesse fra PROKKA ble identifisert ved å bruke pBLAST hos NCBI i databasen «Non-redundant protein sequences» (nr).

Tabell 4.4: Resistensgener hos prøve D og D3 identifisert med databasen CARD, database gjennom NCBI, og pBLAST hos NCBI, ved søk med sekvenser fra PROKKA.

Resistens gen	Query coverage (%)	Identitet (%)	Database	Kommentar/ Resistens	Accession number
Prøve D1					
abaF	100	98.03	pBLAST	Fosofomycin	WP_028613508.1
ampC	100	100	pBLAST	Klasse C β -laktamase	WP_043196392.1
bcr	100	98.47	pBLAST	Sulfonamide bicyclomycin	WP_039604277.1
cpxR	98.53	81.12	CARD	MDR*	LT673656.1:188502-2-1884344
czcA	100	99.9	pBLAST	Kobolt, sink, og cadmium resistens	WP_016489717.1
mdtA mdtE	100 100	98.31 99.72	pBLAST	MDR* effluks	WP_132844838.1 WP_016489719.1
mexK mexW	98.73 98.30	81.64 80.87	CARD	MDR*	AE004091.2:411926-5-4116187 NC_002516.2:49046-46-4907703
yaaA	100	100	pBLAST	Hydrogen peroxide	WP_012312824.1
Prøve D3					
abaF	100	95.90	pBLAST	Fosofmycin	WP_047348603.1
acrA acrB	100.00 99.30	87.44 84.87	CARD	MDR*	DQ679966:299-1493 AP009048.1:162128-7-1621671
ampC	100	99.21	pBLAST	Klasse C β -laktamase	WP_112011981.1
bacA	99.51	81.05	CARD	Bacitracin	U00096.3:3204131-3203309
baeR	98.34	81.58	CARD	Aminocoumarin, aminoglycoside	AP009048.1:216641-2-2167135
copA	100	99.52	pBLAST	Kopper resistens	WP_004374656.1
cpxA	99.49	82.52	CARD	Aminocoumarin, aminoglycoside	BA000007.3:490506-2-4903688
CRP	100.00	88.47	CARD	Fluoroquinolone, macrolide, penam	AP009048.1:415429-6-4153663
emrB emrR	100 100.00	99.79 83.62	CARD	Fluoroquinolone	WP_112011390.1 U00096.3:2810769-2811300
H-NS	100.00	88.41	CARD	MDR*	BA000007.3:173810-4-1737690
kpnF kpnG	100.00 100.00	80.61 82.95	CARD	MDR*	AP006725.1:248423-8-2484568 ACWO01000051.1:2-2092-23265
marA	97.92	84.31	CARD	MDR*	AP009048.1:162128-7-1621671
mdtC mdtN	99.84 100	81.94 99.32	CARD pBLAST	MDR* effluks mdtN: sekreeringsprotein	U00096:2158385-2161463

msbA	100.00	81.47	CARD	Nitroimidazole	U00096.3:966620-968369 WP_112010972.1
ohrB	100	100	pBLAST	Hydroperoksid resistens	WP_010427173.1
ramA	100.00	85.33	CARD	MDR*	JQ727668:0-375
tolC	100	100	pBLAST	MDR*	WP_112010778.1

*Multidrug resistant (MDR), oppgitt når genet uttrykker resistens for mer enn tre antibakterielle kategorier og genene kan være med på å bidra til MDR.

Felles for både prøve D1 og D3 er funnet av genet *ampC*, ved bruk av pBLAST hos NCBI, for prøve D1 viste det seg som en 100% sekvenslikhet med klasse C β -laktamaser fra *Pseudomonas putida*. Prøve D3 fikk ett treff på 95.90% sekvenslikhet mot slekten *Enterobacter* også for klasse C- β -laktamase. I Tabell 4.5 vises det at det også er gjort funn av *ampC* hos prøve F6 med en 99.73% sekvenslikhet. Hos begge prøvene ble det gjort flere funn av *mdt* gener som koder for efflukspumper og systemer hos bakteriene. Med treff på henholdsvis 98.31 % og 99.72 % sekvenslikhet for genene *mdtA* og -E for prøve D1, begge genene ga sekvenslikhet mot *Pseudomonas*. Sekvenslikheten for genene *mdtC*- og N viste treff på henholdsvis 81.94% og 99.32%, førstnevnte for efflukspumper og sistnevnte spesifikt som sekureringsprotein, hos *Enterobacter*.

Prøve D3 fikk treff på flere gener, og et flertall av disse viser til en sekvenslikhet på under 90% (80.61- 88.47%), som viser til at genene er unike. Genet *ramA* linkes til genet *marA* kjent fra *E. coli*, som prøven hadde en sekvenslikhet på 84.31% med, både *ramA* og *marA* er gener knyttet til MDR. Det ble også vist sekvenslikhet med genene *tolC*, *emrB* og *emrR*, dette er også gener som knyttes sammen. Genene ble funnet med en sekvenslikhet på henholdsvis 100%, 84.58% og 99.79% og knyttes gjerne opp mot hverandre ved at *emrR* genet påvirker transkripsjons repressor av MDR effluksen MrAB-TolC (Puertolas-Balint, Warsi, Linkevicius, Tang, & Andersson, 2020).

Tabell 4.5: Resistensgener hos prøve F2 og F6, identifisert med databasen CARD, database gjennom NCBI, og pBLAST hos NCBI, ved søk med sekvenser fra PROKKA.

Resistens gen	Query coverage (%)	Identitet (%)	Database	Kommentar/ Resistens	Accession number
Prøve F2					
aac(6')-Iz	97.19	84.86	CARD	Aminoglycosid	vAF140221:389-851

blaL1	100	99.61	NCBI	Penicillin, kefalosporin og karbapenem	VUN48075.1
bmr3	98	53.9	pBLAST	MDR	XP_018735316.1
ehpR	100	100	pBLAST	Phenazine	WP_065174364.1
emrA emrB	100 100	100 100	pBLAST	Colistin, effluks	WP_074900901.1 WP_180875639.1
mdtA mdtB mdtC mdtD mdtK mdtL	86 100 100 100 97 100	99.52 100 99.68 100 59.41 100	pBLAST	MDR* effluks	VUP93632.1 WP_053515615.1 WP_065174390.1 WP_065182627.1 XP_018734852.1 WP_053518007.1
mexA	100	100	pBLAST	MDR*	WP_053515418.1
norM	100	100	pBLAST	MDR* effluks	WP_053515745.1
smeD smeE smeF	99.75 99.58 96.79	92.15 93.41 87.46	CARD	MDR*	AJ252200:81-1266 AJ252200:1278-4401 AJ252200:4493-5894
stp	92	100	pBLAST	Spectinomycin og tetracycline	WP_180875280.1
Prøve F6					
ampC	100	99.73	pBLAST	Klasse C β -laktamase	WP_050158303.1
blaB (ampC)	-	98.39	VirDb**	Klasse A enzyme/ Penicillin og cefalosporiner	MN172161
bcr	100	100	pBLAST	Sulfonamid, bicyclomycin	WP_019079955.1
blaA	100	100	pBLAST	Klasse A β -laktamase	WP_046694984.1
emrD	100	100	pBLAST	MDR* effluks	WP_050880887.1
mdtA mdtB mdtC mdtD mdtH mdtK mdtN	100 100 100 100 100 100 100	100 100 100 100 99.75 100 100	pBLAST	MDR*	WP_046050450.1 WP_050875309.1 WP_050157512.1 WP_046050446.1 WP_050870466.1 WP_019083196.1 CFB69287.1

*Multidrug resistant (MDR), oppgitt når genet uttrykker resistens for mer enn tre antibakterielle kategorier og genene kan være med på å bidra til MDR.

**Hentet fra Prof. Lindstedt sin egen virulens-database

Tabell 4.5 viser funnet av ett β -laktamasegen, hos prøve F2, *blaL1* (L1), med en sekvenslikhet på 99.61% og koder for genet Metallo- β -laktamase L1 type 3. Unikt for prøve F2 er funnet av genene *smeD*, -E og -F (*smeDEF*), med sekvenslikheter på 87.46% - 93.41%. Genene uttrykker enzymer som effektivt hydrolyserer karbapenemer (Majiduddin & Palzkill, 2003). Genet *aac(6)-Iz* skiller seg også ut hos prøve F2, med en 84.86% sekvenslikhet, og er et gen kjent fra *S. maltophilia*, som bidrar til aminoglykosid resistens (Li, Zhang, McKay, & Poole, 2003).

Både prøve F2 og F6 har en rekke *mdt*- gener, og har til felles *mdt*ABCDK. Både for prøve F2 og F6 er det veldig høy sekvensliket hos alle *mdt*- genene vist i Tabell 4.5, men hos prøve F2 skiller *mdtK* seg ut med en lavere sekvenslikhet på 59.41%. Prøve F6 har også et β -laktamasegen *blaA* som har en 100% sekvenslikhet, som koder for klasse A β -laktamase.

Tabell 4.6: Resistensgener hos prøve F11, identifisert med databasen CARD, database gjennom NCBI, og pBLAST hos NCBI, ved søk med sekvenser fra PROKKA.

Resistens gen	Query coverage (%)	Identitet (%)	Database	Kommentar/ Resistens	Accession number
Prøve F11					
bla	100	100	pBLAST	Klasse A β -laktamase	WP_112286530.1
blaRAHN-	100	92.45	NCBI	Kefalosporin	NG_049975.1
bcr	100	99.49	pBLAST	Bicyclomycin/multidrug effluks system	WP_112287617.1
ble	100	98.4	pBLAST	Bleomycin	WP_120163049.1
bmr3	100	100	pBLAST	Fungal trichothecene	WP_120163501.1
CRP	100.00	83.57	CARD	Undertrykker MdtEF MDR* effluks pumpe ekspresjon	AP009048.1:4154296-4153663
cnrA	100	99.51	pBLAST	MDR* effluks pumpe	WP_120163281.1
emrA	100	100	pBLAST	MDR* resistance effluks pump	WP_120163888.1
emrB	100	99.42			WP_132963968.1
emrD	100	99.5			WP_120163793.1
emrK	100	100			WP_112290239.1
fsr	100	100	pBLAST	Fosmidomycin	WP_120160753.1
marR	98	99.34	pBLAST	MFS transporter	WP_112291682.1
mdlB	100	99.83	pBLAST	Putative multidrug transporter membrane	WP_113876137.1
mdtA	100	99.45	pBLAST	MDR effluks	WP_120163282.1
mdtD	100	100			WP_120161090.1
mdtH	100	100			WP_112288248.1
mdtK	100	99.78			WP_120161793.1
mexA	100	96.92	pBLAST	MDR* effluks	RAR90611.1
mexB	100	99			WP_132967302.1
ohrB	100	100	pBLAST	MDR*	WP_112291684.1
oqxB	99.08	80.36	CARD	Diaminopyrimidin, fluorokinoloner	EU370913.1:47850-51003
yheI	100	100	pBLAST	Putative MDR*transporter membran	WP_120160786.1

*Multidrug resistant (MDR), oppgitt når genet uttrykker resistens for mer enn tre antibakterielle kategorier og genene kan være med på å bidra til MDR.

Det ble gjort funn av genet *bla*RAHN (92.45%) i F11, dette er en klasse A β -laktamase, som skiller seg fra tidligere kjente *bla*RAHN1 og -2. I vedlegg E er genet sammenliknet i ett fylogenetisk tre med lignende funn, som viser til at genet er beslektet med *bla*RAHN-1, men også ganske nært beslektet med blant annet CTX-M-165. I tillegg til dette er også funnet av *bla* i F11 med 100% sekvenslikhet, som er en klasse A β -laktamase, sekvenslikheten til genet *bla* fra prøve F11 er vist i Vedlegg E. Genet *marR*, med 99.34% sekvensliket, og koder for en MFS transporter som bidrar til Fosmidomycin (WP_112291682.1).

Som i tidligere prøver har også prøve F11 og FX (Tabell 4.7) flere *mdt*- varianter med stor sekvenslikhet (99.45- 100%).

Tabell 4.7: Resistensgener hos prøve FX, identifisert med databasen CARD, database gjennom NCBI, og pBLAST hos NCBI, ved søk med sekvenser fra PROKKA.

Resistens gen	Query coverage (%)	Identitet (%)	Database	Kommentar/ Resistens	Accession number
FX					
ampC	100	100	pBLAST	Klasse C β -laktamase	WP_001443153.1
bcr	100	100	pBLAST	Bcr/CflA family multidrug efflux MFS transporter	WP_000213379.1
bmrA	100	100	pBLAST	ABC-type multidrug transport system	WP_001009226.1
CTX-M-15	-	100	VirDb**	CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase	KF055402
CTX-M-33	-	99.89	VirDb**	CTX-M-33 extended-spectrum β -lactamase	AY238472
dfrA17	-	100	VirDb**	Trimethoprim-resistens, dihydrofolate reductase	NZ_MSJW02000186
emrA emrB emrD emrK emrY	100 100 97 100 100	100 100 100 100 100	pBLAST	Multidrug effluks	WP_000587188.1 WP_044706187.1 ABE09656.1 WP_001539269.1 WP_001539267.1

fsr	100	100	pBLAST	Fosmidomycin resistance protein	WP_001773866.1
iprA	100	100	pBLAST	Hydrogen peroxide resistance inhibitor	WP_001538362.1
marA marR	100 100	100 100	pBLAST pBLAST	Multiple antibiotic resistance regulator	AAN80410.1 WP_000799375.1
mdfA	-	100	VirDb**	Multidrug transporter	NZ_AP021963
mdlB	100	100	pBLAST	MDG effluks	WP_001538391.1
mdtA mdtB mdtC mdtD mdtE mdtF mdtH mdtK mdtL mdtN mdtO	100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100	100 99.75 100 100 100 100 100 100 100 100 100	pBLAST	MDR effluks system	OSL39579.1 EFK4280778.1 WP_153782286.1 WP_001538943.1 WP_001081971.1 WP_000024853.1 WP_001538552.1 WP_001538796.1 WP_001540130.1 WP_000446369.1 WP_001556737.1
mexA mexB	100 100	100 100	pBLAST	MDG effluks	ESE26730.1 WP_001538701.1
mphA	-	99.78	VirDb**	Macrolide resistens	DQ445270
tehA	100	100	pBLAST	Transport; Drug sensitivitet	AAN80316.1
tetA	100	100	pBLAST	tet operon	AET14913.1
yheI	100	100	pBLAST	MDR ABC transporter	WP_001235630.1
yaaA	100	100	pBLAST	Peroxide stress protein	WP_000906185.1
zraP	100	100	pBLAST	Sink resistens sensor	WP_001298655.1

*Multidrug resistant (MDR), oppgitt når genet uttrykker resistens for mer enn tre antibakterielle kategorier og genene kan være med på å bidra til MDR.

**Hentet fra Prof. Lindstedt sin egen virulens-database.

I likhet med prøvene presentert over er det også funn av *ampC* hos prøve FX, med en 100% sekvenslikhet med kefalosporin- hydrolyserende klasse C- β -laktamase fra *E. coli*. Viktig gen som gjør at denne prøven skiller seg ut er CTX-M-15 og CTX-M-33, som viser en 100% og 99.89% sekvenslikhet henholdsvis med Prof. Lindstedt sin egen database. I den samme databasen ble det også gjort funn av *dfrA17*, som er med på å gi resistens mot thrimetoprim og dihydrofolat. Genet *mpfA* ble også funnet i denne databasen og er en effluks pumpe som

bidrar til resistens mot klinisk viktige antibiotika, da blant annet erythomycin.

Bakterieisolatet har også en 100% sekvenslikhet med genene *marAR*, som er MDR gener. I tillegg viser mange av genene til multiresistens, blant annet *yheI*, *bcr*, *mdlB* som alle viser en 100% sekvenslikhet.

4.3.2.2 Funn av virulensgener

Det ble også gjort flere funn av virulensgener og gener som kan påvirke resistens hos bakterieisolatene, dette blir illustrert i vedlegg C. Fra bakterieisolatene er det F6 og FX som er mest interessante av disse da *Y. Enterocolitica* og *E. coli* begge bakterieartene kan være patogene. Fra prøve F6 var blant annet genene *inv*, *yaxA*, *yaxB* og *ystB* med sekvenslikheter på mellom 87. 79- 100%.

4.4 Sensitivitetstest mot antibiotika

I tabell 4.7 vises gjennomsnittsverdiene etter to runder med sensitivitetstesting mot antibiotika, med totalt 10 antibiotika. Presentert i Vedlegg D er tabell for alle isolater og bilder av skålene. Hovedsakelig ble prøvene bare testet mot 5 antibiotika, men prøve F2 og F6 ble testet mot flere da disse tidlig viste seg som funn av større interesse. Prøvene sammenliknes med verdier fra EUCAST. Prøve D1 og D3 sammenliknes med *P. Aeruginosa* da dette var *Pseudomonas*- arten som hadde flest kliniske brytningspunkter å sammenlikne med. F2 er sammenliknet med *S. maltophilia*, F6 med *Y. Enterocolitica* og for F11 er det i skrivende stund ingen nærliggende bakteriearter å sammenlikne med hos EUCAST.

Tabell 4.7: Viser mål av MIC-verdier av prøvene mot forskjellige antibiotikum.

	D1	D3	EUCAST <i>Pseudomonas</i>	F2	EUCAST <i>S. maltophilia</i>	F6	EUCAST <i>Y. enterocolitica</i>	F11
Ampicillin	>256*	>256*	-	>256*	-	16	8	96
Cefepim	2	1,5	8	-	-	-	4	-
Cefotaxim	>32*	>32*	38	>32*	-	0,64	1	3
Imipenem	0,38	0,38	4	>32*	-	0,25	8	0,25
Meropenem	1,5	0,125	2	**	32	0,032	-	0,23
Erythomycin	-	-	-	>256*	-	48	-	-
Gentamicin	-	-	-	12	-	25	4	-
Trimethoprim	-	-	-	>32*	2	0,5	0,5	-
Tetracycline	-	-	-	4	-	0,75	4	-
Ciprofloxacin	-	-	-	0,5	16	0,38	0,25	-

>n*: Fullstendig vekst på hele skålen

**Ingen vekst på BHI overnattkultur

- Ikke testet/ ingen data

Tabellen 4.7 viser at prøvene D1 og D3 har svært like hemningssoner. For ampicillin var det ingen oppgitt verdi for det kliniske brytningspunktet til *Pseudomonas*, men prøvene viser til en sterk resistens mot antibiotikumet da begge prøvene ikke hadde noen hemningssoner som dermed gir MIC- verdier over 256 µg/ml. Prøve F2 viser sterk resistens mot flere former for antibiotika, til tross for få verdier å sammenlikne med fra EUCAST. For ampicillin, cefotaxim, Imipenem, Erythomycin og Trimethoprim viser prøven F2 full vekst på skålene. Derimot viser dette isolatet seg å ha blitt påvirket av ciprofloxacin, med en verdi langt lavere enn klinisk brytningspunkt vist fra EUCAST, med en verdi på 0,5 µg/ml. Prøve F6 viste hemningssoner på alle skålene, men har få sammenlikningsverdier fra EUCAST. Den høyeste resistensen vist fra F6 mot Erythomycin, med en verdi på 48 µg/ml og laveste verdi hos meropenem med 0,032 µg/ml. Prøve F11 viste høyeste MIC- verdi ved 96 µg/ml mot Ampicillin, men hadde relativt lave verdier for imipenem og meropenem.

5. Diskusjon

5.1 Fenotypisk deteksjon

For en rask deteksjon av antibiotikaresistente bakterier brukes Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE agar, da man har muligheten til å overføre kliniske prøver direkte på mediet. Begge agarene er laget med hensikten å kunne finne resistente bakterier rakt og gi mulighet for å hindre videre spredning innen helsesektoren (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013, 2016). I denne oppgave, ble mediene brukt for å detektere KRE- og ESBL- produserende bakterier hentet i fra forskjellige vann rundt om i Folloregionen. Vekst på skålene ga dermed en indikasjon på at det fantes MDR Enterobacteriaceae og mer spesifikt karbapenem- resistente Enterobacteriaceae, ved vekst på henholdsvis Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE. I denne oppgaven var det vekst på alle skåler, og fra videre rendyrkning ble det ekstrahert DNA fra 36 prøver.

Vekst på skålene viser tilstedeværelse av antibiotikaresistente bakterier i vannuttakene, men det er umulig å si med sikkerhet hvilke bakterier koloniene er. Brilliance™ ESBL viser til en større sannsynlighet for at det er KESC- gruppen, men en kan ikke med sikkerhet si at det er disse stammene som har vokst frem heller. Det samme gjelder for Brilliance™ CRE som skiller mellom lys rosa og blåfargede kolonier henholdsvis til *E. coli* og KESC, i tillegg til hvite eller fargeløse for *Acinetobacter* eller andre (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013, 2016). Skålene gir dermed en lav spesifisitet og fører til at det er nødvendig med videre testing av prøvene, for å kunne bekrefte resultatene. For videre informasjon om hvilke bakterier som vokste opp, ble det derfor benyttet Sanger-sekvensering for identifisering, som viste at det var andre bakterier slekter til stede enn hva som først ble antatt ved fargescreening. Veksten på skålene viste gjennom BLAST- søk av 16S rRNA- sekvenser at det blant annet var tilstedeværelse av slektene *Serratia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* og *Yersinia*.

5.2 Sanger-sekvensering

For å identifisere stammene som vokste på agarene, ble det i denne oppgaven brukt sekvensering av 16S rRNA. Ved bruk av Sanger-sekvensering ble prøvene som ble amplifisert opp med PCR kjørt på gel for å kunne påvise at 16S rRNA var til stede som bånd på 1500 bp (Vedlegg B). Alle prøvene viste gode resultater på gelene, og ble dermed sendt til Sanger-sekvensering. 16S rRNA genet finnes hos så og si alle bakterier og inneholder mye genetisk informasjon, slik at bakteriearter kan skilles fra hverandre (Janda & Abbott, 2007).

Prøvene blir sammenliknet med 16S rRNA sekvenser som allerede har blitt lagret i større databaser, alle sekvensene fra Sanger-sekvensering utført på prøvene ble sammenliknet med nBLAST hos NCBI. Artene kan være vanskeligere å identifisere da enkelte av sekvensene viste seg som en sekvenslikhet for mer enn én art som er kjent fra før er lagret i genbanker. Flere av prøvene sekvensert med Sanger-sekvensering fikk match med mer enn én bakterieart, prøve F11 fikk match med både *Rahnella* og *Ewingella*. utfordringer med å identifisere en art kan komme av at artene er nært beslektet og derfor er vanskeligere å skille fra hverandre ettersom de har mange like sekvenser. Det fins tilfeller der bakteriearter kun skiller hverandre med mindre enn 0,5% sekvenslikhet, derfor er det ønsket en sekvenslikhet på minst 99%, men helst over 99,5% (Janda & Abbott, 2007).

5.2.1 Resultater fra Sanger-sekvensering sammenliknet med fenotypisk deteksjon

Prøve D1 viste seg som en beige/ rosa farget koloni, og indikerte flere bakteriearter som vokste sammen. Bakteriene skilte seg ikke etter videre rendyrkning og sekvenser fra Sanger-sekvensering etter første DNA ekstraksjon viste *Bordetella*, men kun en 79% sekvenslikhet, bakterien ble allikevel tatt videre med i arbeidet. Ettersom arter innenfor *Bordetella* er patogene og skaper respiratoriske sykdommer hos mennesker (Finger & von Koenig, 1996), ville dette vært et funn av større interesse. Senere i arbeidet ble det brukt nytt ekstrahert DNA fra denne prøven som viste seg med 100% sekvenslikhet til *P. putida*, da med sekvenser fra Illumina Miseq. Det samme tilfellet viste seg hos prøve D3, der genomisk materiale fra første ekstrahering ga en 94% sekvenslikhet med *Enterobacter*. Koloniene fra prøve D3 Brilliance™ ESBL viste seg i likhet med prøve D1 vanskelig å skille fra hverandre. *Enterobacter* viste seg å være til stede etter andre ekstraksjon av D3 etter Illumina Miseq sekvensering av prøven. Resultatene fra Illumina Miseq blir diskutert lenger ned.

Både prøve D1 og D3 var bakteriestammer som tidlig i oppgaven viste interesse, og DNAet ble derfor brukt mye til Nanopore-sekvensering. Dessverre viste MinION Flongle cellene i fra Nanopore sekvenseringen seg å ikke gi de ønskede resultatene, og dermed gikk mye DNA bort til dette. Derfor ble det også vanskelig å gå tilbake til den første runden med ekstrahert DNA. Nytt DNA ble ekstrahert fra alle prøver, ved å hente ut nye kolonier som vokste opp i overnattekulturer i BHI rør. MIC- testene ble også gjennomført fra denne samme overnattekulturen, resultatene fra Illumina MiSeq sekvensering av andre ekstraksjon blir derfor sett på med større sammenheng til MIC- testene. Prøvesvar gitt fra første ekstraksjon og Sanger-sekvensering resultater blir dermed ikke diskutert i like stor grad. Dette gjelder da

spesielt for prøvene D1 og D3. Andre ekstraksjon fra D1 ga et annet resultat, som kan komme av at isolatene vokste frem på platene ikke dannet helt rene kolonier. Det samme gjelder for prøve D3, men ettersom det fortsatt viste funn av *Enterobakter* i denne prøven, kan en med større sikkerhet bekrefte at slekten er til stede i Smilehullet som er vannet prøven ble hentet fra.

Prøve F2 viste seg som blå og beige, etter Sanger-sekvensering viste prøven seg med stor sekvenslikhet til *S. maltophilia*. Dette er uforventet, da det på Oxoid sine sider står at det ikke skal være noen fremvekst av bakterien på Brilliance™ CRE agar (Oxoid, 2021). Referansene til Oxoid er hentet fra 2010 og 2011, derfor kan dette være utfatert informasjon. Imidlertid er det funnet resistens hos denne bakteriearten i senere tid, nevnt både hos P. Nordmann & L. Poirel i 2019 og hos Han et al. i 2020 (Han et al., 2020; Tønjum, 2020). Det ble også nevnt allerede i 1999, da skrev S.C. Sanyal og E.M. Mokaddas funn av en økende resistens mot karbapenem i fra til *S. maltophilia* (Sanyal & Mokaddas, 1999). Dette diskuteres nærmere i avsnitt 5.4 om funnet av resistensgener.

Prøve F6 viste seg som mørkeblå og ble gjennom Sanger-sekvensering identifisert som *Y. Enterocolitica*. I protokollen fra ThermoFisher scientific Inc. er det ikke beskrevet noen forventet farge for kolonier fra slekten *Yersinia* (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016). Prøve F6 er et funn av stor interesse, da *Y. enterocolitica* ikke har blitt funnet tidligere underveis i dette studiet som har pågått siden 2015. I utgangspunktet er det ikke forventet at bakterien skal vokse på karbapenemer, og dette er derfor et overraskende og interessant funn, da det er svært lite informasjon å finne om dette (A. Fàbrega, 2015). Én kan ikke utelukke muligheten for at det har vært noe galt med agaren, men ettersom det var god vekst i tillegg til at prøven har vokst frem på en agarskål før isolering, gjør dette usannsynlig. Muligheten er også der for at prøven kunne ha blitt forvekslet med en annen ved DNA ekstraksjon, eller på markering av rør, men DNA ble kun ekstrahert fra andre prøver som hadde vokst frem på Brilliance™ CRE agar, så dette ville ikke vært av betydning.

Prøve F11 vokste frem med en lyseblå farge på Brilliance™ ESBL agar, identifisert som *R. variigena*. Blå er i protokollen til ThermoFisher scientific Inc. beskrevet som *E. coli*, men det er også forklart at andre bakterier som ikke er beskrevet kan vokse opp og burde sees på som klinisk viktig (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013). Det er å forvente at bakteriearter fra

Rahnella vokser opp, selv med ESBL til stede, da det fra tidligere av er kjent at slekten bærer på ESBL-gener (van Hoek et al., 2015). Det bør også nevnes at bakterien vokste opp på Brilliance™ CRE agar, men dette isolatet ble kastet før bilde ble tatt.

Ifølge protokollen fra Thermo Fisher Scientific Inc. skal rosa- fargede kolonier være *E. coli*, men prøve FX viste seg som en mer brungrønn farge og dette var et uforventet utslag. Bakterien var forventet å vokse frem, da en på forhånd visste hvilken bakterieart isolatet var. *E. coli* ST1193 er en bakterieart som har blitt et vanlig funn over hele verden i urinveisinfeksjoner og ved infeksjon i blodet (Valenza et al., 2019).

5.3 Helgenomsekvensering

Ved noen tilfeller vil man kunne få ulike resultater ved identifisering gjennom helgenomsekvensering og 16S- sekvensering, vanligvis kommer dette av få sekvenser i sekvensdatabasene (Janda & Abbott, 2007). Som nevnt tidligere viste fenotypisk deteksjon også at prøver som D1 og D3 ikke grodde opp alene men ga flerfargede kolonier, derfor var det også å forvente at sekvensene fra Illumina MiSeq ville vise gener fra flere bakteriearter.

Det ble forsøkt utført Nanopore sekvensering med flongle celler er en nyere sekvenseringsmetode, og utstyret har ikke blitt brukt av tidligere masterstudenter for Prof. Lindstedt. Det viste seg dessverre at Flongle-cellene ikke fungerte optimalt og porene i cellene fungerte ikke som det skulle, og av 120 porer fungerte ofte ikke flere enn 60 ved testkjøring. Dette førte til at ved én gjennomføring var det rundt 20-30 porer som fungerte ved oppstart og kjøringen måtte stoppe før det hadde gått 48 timer, ettersom alle porene raskt ble ødelagt. Dette førte til at det ble færre fragmenter sekvensert enn ønskelig. Etter flere runder ble det totalt sett samlet opp nok sekvenser av prøve FX fra Nanopore. Disse ble satt sammen med sekvenser fra MiSeq totalt sett ga dette en noe større genbank enn fra MiSeq sekvenseringen alene.

5.4 Resistensgener

5.4.1 β - laktamasegener

Hos prøve F2 var det som nevnt tidligere ikke forventet funn av *S. maltophilia*, men de siste 20- 30 årene har det blitt gjort flere og flere funn av karbapenem resistens hos bakteriearten. Den har nå blitt en større bekymring som et sykehuspatogen fra den begynte å vekke oppsikt

på starten av 90- tallet (Brooke, 2012). I prøve F2 ble det gjort funn av genet L1, som er et medlem av den molekylære klassen B3 Zn²⁺- avhengig metallo-β-laktamase og bidrar til hydrolysen av de fleste β-laktamer, da inkludert penicilliner, kefalosporiner og karbapenemer. I Vedlegg E vises sekvensen sammenliknet med en kjent sekvens av L1, men det har vist seg de siste 17 årene at genet er i stadig forandring og at det finnes flere varianter (Han et al., 2020). Med dette funnet er det også forståelig at bakterieisolatet har klart å vokse frem på Brilliance™ CRE. Dette vises også mot sensitivitetstestene mot antibiotika der prøve F2 var prøven som viste klart mer resistens enn de andre prøvene, da spesielt mot ampicillin, cefotaxim og imipenem, som var forventet. Det hadde også vært forventet sterk resistens mot meropenem, da det har vist seg at *S. maltophilia* har fått en økende resistens mot dette antibiotikumet de siste årene, som er med på å bidra til at det nå blir sett på som et sykehuspatogen (Han et al., 2020).

Helgenomsekvenseringen fant ved bruk av pBLAST genet *blaA* hos prøve F6, som er en klasse A β-laktamase. Dette genet er involvert i å begrense følsomheten for både penicilliner og kefalosporiner. *Y. enterocolica* bærer dette genet kromosomalt og bakteriecelle uttrykker det i en jevn strøm til enhver tid (Fabrega & Vila, 2012). Funnet av BlaB- ampC som også er et kromosomalt gen blir diskutert nærmere under 5.4.2 AmpC.

Prøve F11 hadde flere *bla*- gener, det første som ble funnet «*bla*», koder for en Klasse A β-laktamase og bidrar til penicillin- og kefalosporinresistens hos *Rahnella* som genet hadde sekvenslikhet for. Dette er et gen som naturlig uttrykkes hos bakteriearten, og det har blitt antydnet at β-laktamase fra *Rahnella* kan være en stamfar for plasmidkodende β-laktamaser som er funnet hos andre arter (Tash, 2005). Det er med stor sannsynlighet at disse genene bidrar til overlevelsen på ESBL-agaren, sammen med *blaRAHN*- som også ble funnet hos isolatet. I vedlegg E vises en sammenlikning av dette genet med tidligere kjente RAHN-gener. Det er vanlig å finne RAHN-1 og RAHN-2 hos *Rahnella*, men genet funnet har ikke stor nok sekvenslikhet med noen av disse tidligere kjente genene. Genet er nært beslektet til RAHN-1, med en sekvenslikhet på 92.45%. I Vedlegg E vises også et fylogenetisk tre som viser til at genet er relativt nært beslektet til genet CTX-M-165 fra Enterobacteriaceae. Genet som er funnet er en ESBL og ettersom sekvenslikheten er for lav til å vise seg som et tidligere kjent gen, viser dette til mutasjoner i genet. Én kan stille seg spørsmål om dette kan være et nytt RAHN-gen med nye egenskaper, i videre arbeid ville det vært interessant å se nærmere på dette genet og dets mutasjoner fra det nærmest beslektede RANH-1 som er funnet.

5.4.2 AmpC

Flere av prøvene hadde dette genet til stede som er en kasse C β -laktamase. *ampC*-gener koder for en viktig gruppe med proteiner som er vanlige å finne hos gramnegative stavbakterier. Normalt er disse å finne kromosomalt, men genet har nå blitt et vanlig funn også på plasmider (A. Baceiro, 2004). Produksjonen av dette genet er til stor bekymring da det fører til høy resistens. Genet ble funnet i forskjellige varianter hos prøvene D1, D3, F6 og FX, noe som ikke er uforventet, da genet er et vanlig funn hos blant annet Enterobacteriaceae (Jacoby, 2009; Juan et al., 2010). Kromosomalt *ampC* hos *E. coli* er som regel dårlig uttrykt, men det er gjort funn av *E. coli* som tar opp *ampC* gener fra overførbare plasmider som fører til en bedre uttrykkelse av β -laktamase enzymene (Jacoby, 2009). Prøve FX ble ikke testet mot antibiotikastrips. Det ville vært interessant å se hvor høy resistens bakterieisolatet hadde vist mot β -laktam antibiotikaene og videre sett på om genet som er funnet er kromosomalt eller fra plasmid. Som nevnt over er det vanlig å finne *ampC*-genet hos Enterobacteriaceae, men ett unntak som også er funnet i dette studiet er *S. maltophilia*. Fra prøve F2 var det ikke noe funn av genet, og hadde genet vist seg å være til stede ville dette vært fra opptak av et plasmidbundet gen (Jacoby, 2009).

Fra sekvenseringen av prøve F6 ble genet *blaB-ampC* funnet. Dette er et vanlig gen som er induserbart hos *Y. enterocolitica*, for at bakterien skal kunne uttrykke *blaB-ampC* er den avhengig av deaktivering av genet *ampD*, dette kan da føre til hyperproduksjon av *blaB-ampC* og føre til en svært høy β -laktam resistens i fenotypen (Liu et al., 2016). Under dette studiet ved test mot antibiotikastrips kan det se ut til at *blaB-ampC* har vært aktivert med tanke på verdiene vist i Tabell 4.7, som blant annet for penicillin viser en dobbelt så høy verdi som for det kliniske brytningspunktet.

5.4.3 CTX-M

Dette har blitt et mer fremtredende gen og er nå et vanlig funn blant ESBL gener. *blaCTX-M* genene er vanligst å finne hos patogene bakterier, slik som *E. coli* (Tacao, Correia, & Henriques, 2012). I prøve FX ble det gjort to funn av genet, CTX-M-15 og CTX-M-33. Funnet av CTX-M-15 var å forvente da dette er den mest utbredte enzymet blant CTX-M-gruppen, og har blitt funnet i Norge tidligere. Det er også funnet at CTX-M-15 kommer fra phylogruppene ST131 og ST405 (Coque et al., 2008) som fremmer hydrolyse av ceftazidim veldig effektivt. FX isolatet *E. coli* tilhører fylogruppen ST1193, som viser til at bakterien

mest sannsynlig har tilegnet seg dette genet. CTX-M-33 som også ble funnet er sett på som en nyere variant av CTX-M-15. Denne varianten skiller seg fra CTX-M-15 ved at den utviser en lav karbapenamaseaktivitet ved å hydrolysere meropenem, men ikke imipenem. Denne variasjonen kommer av et punktmutasjonsderivat fra CTX-M-15 (Poirel, Ortiz de la Rosa, Richard, Aires-de-Sousa, & Nordmann, 2019), og er et godt eksempel på hvordan den minste mutasjon kan påvirke AR hos en organisme. Som nevnt ville et videre arbeid med undersøkelse av prøve FX mot antibiotikastrips vært en første prioritet. For å blant annet kunne sett på karbapenemresistensen som kan være stede på grunn av CTX-M-33, og da spesielt sett på forskjellene mellom imipenem og meropenem.

Det diskuteres om genet CTX-M kan være en nøkkelindikator for vannkvalitet og muligens brukes til å spore spredningen av multiresistens i vannmiljøer (Tacao et al., 2012). Dette er usannsynlig sett i sammenheng med at bakterieisolatet FX brukt i denne oppgaven er hentet fra Andedammen, som er et stille vann med lite dybde og et vann med mye fugleaktivitet. I tillegg er vist i oppgaven at det er flere multiresistente bakterier i dette vannet.

5.4.4 Multiresistente efflukspumper

Alle prøvene inneholdt minst to *mdt*-gener, og disse genene har til felles at de koder for forskjellige efflukspumper inn og ut av bakteriecellene. Disse genene er mest fremtredende hos prøvene F2, F6 og FX. Komponenter som er med på å bestemme en bakteries potensielle AR er ofte forbundet med pumper som kan pumpe ut eller kjenne igjen antibiotika som er på vei inn i bakteriecellen (Davies & Davies, 2010). Dette vil si at ofte er det andre gener som fungerer sammen med og aktiverer eller deaktiverer efflukspumpene. Blant annet gener som *ramA* og *marA*, som er nært beslektet, er gener som påvirker efflukspumper som blant annet fører til resistens mot tetracyklin (George, Hall, & Stokes, 1995). Genet *ramA* forbindes med slektene *Klebsiella* og *Enterobacter*, og viste seg i prøve D3, genet er kjent for å gi høyt nivå av MDR. *marA* er kjent fra *E. coli*, som prøven hadde en sekvenslikhet på 84.31% med (Chollet, Chevalier, Bollet, Pages, & Davin-Regli, 2004).

I prøve D3 er det gjort funn av AcrAB-TolC efflukspumpen som kodes av genene *acrAB* og *tolC*. Denne pumpen er med på å bidra til multiresisten (Pradel & Pages, 2002), noe som også kommer frem hos prøve D3 som viste sterk resistens for både ampicillin og for cefotaxim under sensitivitetstesting. Fra sekvensering av FX ble det også funnet *emr*-gener, som koder for MDR pumper, for flere forskjellige antibiotika, avhengig av hvilket *emr*- gen som er til

stede. Eksempelvis gir *emrB* resistens mot tetracyklin og methylenomycin (Lomovskaya & Lewis, 1992). Den store mengden av MDR efflukspumper hos bakterieisolatene viser til at bakteriene har flere muligheter til å regulere resistensmekanismene sine på og er enda en bekræftelse på at bakteriene er MDR. Ettersom flere av bakteriene også har gener som er med på å regulere disse pumpene, viser det også til at bakteriene har mulighet til å skru av og på disse genene når det er nødvendig og dermed kunne bruke energi der det er nødvendig. Ved et videre arbeid hadde det vært interessant å se på plasseringen av disse genene, om de hører til på kromosomer og muterer eller om de blir tatt opp via plasmider.

5.5 Multiplex PCR

Det er også noen ulemper rundt multiplex PCR, da det kan gi dårlig sensitivitet eller spesifisitet i tillegg til at amplifisering av enkelte mål blir foretrukket under PCR-kjøringen. Tilstedeværelsen av flere primere fører til økt sjans for at resultatene viser forsterkede falske produkter, som hovedsakelig kommer av primerdimere. Ikke-spesifikke produkter som for eksempel primerdimere kan bli forsterket og amplifisert mer effektivt enn det ønskede målet. Dermed blir komponenter i reaksjonen brukt til uønskede produkter, som videre fører til svekkede resultater av målgenene (Elnifro, Ashshi, Cooper, & Klapper, 2000). Etter å ha utført multiplex PCR på *R. variigena*, er det grunn til å tro at resultatet viser ønskede produkter. Da gelbildet etter agarose gelektroforese viste positive resultater for genet *bla_{SHV}* ble det videre utført en singleplex PCR som viste seg å være negativ ved gjentatte forsøk. Fra dette kom det frem en usikkerhet over reaksjonsmiksen til multiplex PCR reaksjonen, og hvorvidt reaksjonsmiksen burde hatt en annen primersammensetning. Det har tidligere blitt observert at en optimalisering av metoden hadde vært ønskelig, for å redusere ikke-spesifikke reaksjoner (Elnifro et al., 2000).

5.6 Antibiotikasensitivitet

5.6.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas er allestedsnærværende bakterier, fører til viktige metabolske aktiviteter i miljøet. Bakteriearten har et stort potensial for bioteknologiske verktøy spesielt innen områder som bioremediering, biokatalyse som biokontrollerende midler innen plantevern og til produksjonen av nye bioplaster (Nelson et al., 2002).

P. Putida har en viktig rolle i miljøet og kan være med på å få i gang viktige metabolske aktiviteter i miljøet, da også biogeniske og elementære nedbrytningsprosesser. Resultatene viser at dette er en bakterie med MDR, i Tabell 4.7 viste resistens mot ampicillin og cefotaxim. *P. composti* er en bakterie som det er skrevet lite om, men underveis i denne oppgaven har den vist seg som en bakterie som kan vokse frem på ESBL agar. De fleste resistensgenene som viste seg fra prøve D3 kom fra *Enterobacter*. Selv om bakterien ikke er direkte bekymringsverdig for mennesker, ville den vært interessant å undersøke mer og spesielt sett etter genene som koder for resistens, om disse er tatt opp via HGT og om bakterien har muligheten til å føre genene videre.

5.6.2 *Stenotropomonas*

Prøve F2 viste til desidert sterkest resistens, og skiller seg sterkt ut blant de andre prøvene. Da spesielt med en sterk resistens mot karbapenemer, som med stor sansynlighet kommer fra *blaL1* genet (Sanyal & Mokaddas, 1999). Ved videre studie ville en grundigere undersøkelse av dette genet og dets plassering vært interessant. En tror økningen av karbapenemresistens hos *S. maltophilia* kan komme av at den har blitt direkte utsatt for karbapenemer over lengere tid. Da infeksjoner gjerne oppstår med denne bakteriearten (Sanyal & Mokaddas, 1999), i tillegg til at det er et opportunistisk patogen og kan ha vært til stede i kroppen hos pasienter som har blitt behandlet med karbapenemer for andre infeksjoner. Dermed kan den etter hvert ha ervervet resistens og rukket å tilpasse seg og med virulensgener funnet nisjer for hvordan den kan overleve i mennesker.

5.6.3 *Yersinia*

Prøve F6 er et funn som kunne vært spennende å sett videre på da det vokste frem på CRE agaren. Ved dens fenotypiske trekk kunne det sett ut til at det var en annen bakterie den vokste opp med, og en kan stille seg spørsmålet om den eventuelle andre bakterien var med på å bistå *Y. enterocolitica* til overlevelse på CRE agaren. For videre undersøkelse av *Y. Enterocolitica* kunne det vært interessant å se mer på serotypene, for å finne ut om funnet av bakterien i Andedammen er en virulent bakterie eller ikke. Bakterien kan ha kommet fra fugleavføring (Niskanen, Waldenstrom, Fredriksson-Ahomaa, Olsen, & Korkeala, 2003), men har likefullt overlevd i vann.

Det ble funnet flere virulensgener hos prøve F6 *inv* genet er viktig for dannelsen av proteinet invasin, som spiller en rolle i penetreringen av patogene vertsceller (Pepe & Miller, 1993). Genene *yaxA* og *yaxB* kreves for cytotoxisk aktivitet, og kan sammen føre til celledød ved osmotisk lysis (Wagner et al., 2013). I tillegg til dette fører genet *ystB* til en subtype av det varmestabile (Y-STb) (Ramamurthy et al., 1997). Dette kunne blitt studert videre i en videre studie der en i enda større grad hadde fokusert på virulensgener.

5.6.5 *Rahnella*

R. Variigena fra prøve F11 ble sekvensert og sammenliknet med to andre varianter av bakteriearten av Prof. Lindstedt og masterstudent Kayleigh Sharon Robson Moe, etter at arbeidet for denne oppgaven var avsluttet. Det viste seg at det ikke var samme art isolert flere ganger, men at det er var forskjellige isolater fra samme bakterieart. Som videre arbeid kunne man sett nærmere på disse artene, sett på hvor store forskjeller bakteriearter fra samme vann kan ha, og om forskjellene i DNAet påvirker AR til isolatene. Ifølge Tash er *Rahnella* sensitiv for trimethoprim og kinoloner, men prøven ble ikke testet mot noen av disse formene for antibiotika, dette er noe som kunne blitt utført ved videre arbeid (Tash, 2005).

5.6.6 *E. coli*

Et interessant med funn i prøve *zraP*, som uttrykker sink resistens, da dette også har blitt knyttet opp mot AR. Dette er noe videre arbeid kunne fokusert på, da ved å se på andre kjente resistensgener og se etter om det er flere metaller som kan være med på å påvirke resistensen hos bakterier. I tillegg er det også gjort funn av mange virulensgener i helgenomsekvenseringen. Dette er svært interessant og kan fortelle om hvordan bakterien overlever i menneske. Fra prøve FX ble det gjort funn av genet *vat* som koder for autotransporterende serinproteasetoksin og hører til Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) (Spurbeck et al., 2012), *fyiA* hører også til her og blir forbundet med dannelsen av biofilm i urinveiene hos mennesker (Hancock, Ferrieres, & Klemm, 2008).

5.7 Tanker rundt antibiotika resistens

Hva kan gjøres med bakterier som finnes i miljøet? En vet allerede at mange skyller medisin ned i toalettet. Dette kan dermed ende opp i renseanlegg, i jord og andre hulrom i miljøet. Hvis det ikke løses opp eller blir eliminert i disse områdene vil det etter hvert nå overflaten og påvirke bakterier i disse miljøene (Kummerer, 2003). HGO er sett på som den mest

sannsynlige formen for spredning av MDR gener som videre fører til resistente fenotyper og patogener (Molina et al., 2014). En kan videre spørre seg hvor disse genene oppstår, og hva som fører til at akkurat disse genene spres lett videre?

For videre spredning av AR spiller leger og pasienter en stor rolle, sammen med farmasøyter. Både for å kunne redusere hastigheten og spredningen av AR hos mennesker, og for å hindre mest mulig utslipp av antibiotika og desinfeksjonsmidler ut i miljøet. Det hadde vært fordelaktig med mer lærdom i skolen om antibiotika og konsekvensene av antibiotikabruk. Det er viktig med kunnskap om hvordan antibiotika er et nyttig legemiddel mot mange sykdommer, men at det også kan være skadelig å bruke ved virusinfeksjoner som forkjølelse (Kummerer, 2003). Det er ikke til å unngå den videre utviklingen av AR hos bakterier imot dagens antimikrobielle midler, enten ved nye mutasjoner eller ved å utveksle genetisk informasjon ved HGT. I tillegg til forsiktighet med bruken av antibiotika, er det også nødvendig med videreutvikling av nye antibiotika noe som er vanskelig når man jobber mot organismer som har utviklet seg gjennom mange millioner år og har lært å tilpasse seg utfordrende miljøer (Tenover, 2006). Ved å spre lærdom som dette vil man kunne hjelpe utviklingen av medisin og miljøet, og bremse ned spredningen av resistens. Dette gjelder også for generell bruk av antibiotika i jordbruket og gjennom veterinær medisin (Kummerer, 2003).

Denne studien understreker hvor stor spredningen av β -laktamaser er, og at det når frem til tilsynelatende uviktige bakterier for human helse. Så lenge spredningen er i vann, der dyr ferdes og mennesker er i kontakt med, vil det være en fare for at denne resistensen kan spres videre. Tilstedeværelsen til flere av disse bakteriene er viktig i naturen og derfor vil det være problematisk å undersøke på løsninger for å fjerne disse fra naturen. Spørsmålet om spredningen kan forhindres ved å blokkere HGO, men dette igjen er noe som er viktig for at organismer skal kunne fortsette å utvikle seg i takt med endringene som skjer ellers i naturen. En går gjerne tilbake til den samme løsningen som tidligere, at det er bedre å finne nye medikamenter mot patogene eller opportunistisk patogene bakterier.

MiSeq sekvenseringen og Nanopore sekvenseringen av prøvene ga flere spennende funn av gener, da de viser både virulens og resistens hos bakteriene. I videre arbeid burde resistens- og virulensgenene undersøkes mer, da de viser seg å skille seg ut med sekvenslikheter på under 95% fra tidligere kjente sekvenser. Tiden strakk dessverre ikke til, og undersøkelse av

gener med en sekvenslikhet på under 95% ble derfor ikke gjennomført i dette studiet. Dette ville vært en prioritet i eventuelle videre undersøkelser. Det ville vært interessant å se nærmere på sekvenslikheten i isolater fra større og mer bevegelige vann. Dette for å undersøke om sekvensforskjellene er like store i vann med bevegelse, eller om bakterieisolatene fra Andedammen og Smilehullet har kunnet spesialisere seg til egne nisjer da dette er små vann med lite bevegelse. I denne oppgaven ble det i utgangspunktet sett på bakterier fra forskjellige arter, men ved et videre studie ville det vært interessant å se nærmere på forskjellige isolater innen samme art.

6. Konklusjon

Formålet med dette studiet var å undersøke om det fantes bakterier i vannprøvene samlet opp fra Ås, Drøbak og Ski og se etter gener som koder for ESBL. I Andedammen og Smilehullet ved NMBU, på Ås, ble det påvist flere bakterier med MDR, både ved hjelp av fenotypiske og genotypiske metoder. Mange av disse koder for ESBL, det er også flere virulensgener til stede i bakterieisolatene som er funnet, blant annet i *Y. enterocolitica* og *E. coli*. Dersom resistensgenet er plassert i plasmidet vil resistens kunne overføres til andre bakteriearter i miljøet via HGO. Studiet viser at en kartlegging av miljøet er nødvendig for å se etter AR - gener og -bakterier. Dette gjelder særlig for vann som kan være et viktig spredningspunkt, da vann kan samle og sirkulere bakterier fra både dyr, mennesker og nærmiljø. Noen klar konklusjon kan ikke bli trukket før videre forskning er utført.

7. Referanser

- A. Baceiro, G. B. (2004). Class C -Lactamases: an increasing problem worldwide. 141-152.
- A. Fàbrega, C. B.-D., J. Vila,. (2015). Chapter 5 - Antimicrobial Resistance in *Yersinia enterocolitica*. 77-104. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012147000053>
- Aljorayid, A., Viau, R., Castellino, L., & Jump, R. L. P. (2016). *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature. *IDCases*, 5, 6-8. doi:10.1016/j.idcr.2016.05.003
- An, S. Q., & Berg, G. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends Microbiol*, 26(7), 637-638. doi:10.1016/j.tim.2018.04.006
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*, 6(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Berthold, D. E. a. S., Kateel G and Jayachandran, Krishnaswamy and Laughinghouse IV, H Dail and Gantar, Miroslav. (2019). Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture. *Biomass and bioenergy*, 122, 280-289.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Botanisk - og plantefysiologisk leksikon. (2021). DNA sekvensering. Retrieved from <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/d/dnasekv.html>
- Botanisk- og plantefysiologisk leksikon. (2011a). Antibiotika. In U. i. O. I. f. biovitenskap (Ed.), *Botanisk- og plantefysiologisk leksikon*.
- Botanisk- og plantefysiologisk leksikon. (2011b). PCR. In U. i. O. I. f. biovitenskap (Ed.), *Botanisk- og plantefysiologisk leksikon*, .
- Bottone, E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev*, 10(2), 257-276. doi:10.1128/CMR.10.2.257-276.1997
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 25(1), 2-41. doi:10.1128/CMR.00019-11
- Chollet, R., Chevalier, J., Bollet, C., Pages, J. M., & Davin-Regli, A. (2004). RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7), 2518-2523. doi:10.1128/AAC.48.7.2518-2523.2004

- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Curr Biol*, *19*(11), R437-441. doi:10.1016/j.cub.2009.04.001
- Cohen Stuart, J., Voets, G., Rottier, W., Voskuil, S., Scharringa, J., Van Dijk, K., . . . Leverstein-Van Hall, M. (2013). Evaluation of the Oxoid Brilliance CRE Agar for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *32*(11), 1445-1449. doi:10.1007/s10096-013-1896-7
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., . . . Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*, *14*(2), 195-200. doi:10.3201/eid1402.070350
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, *65*(3), 490-495. doi:10.1093/jac/dkp498
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, *74*(3), 417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl*, *3*(4), S65-75. doi:10.1101/gr.3.4.s65
- El-Shaboury, S. R., Saleh, G. A., Mohamed, F. A., & Rageh, A. H. (2007). Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal*, *45*(1), 1-19. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.002
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*, *13*(4), 559-570. doi:10.1128/CMR.13.4.559
- Erlich, H. A., Cox, D. R., Daugherty, D. L., Garza, D., Gelfand, D., A., G. R., . . . White, T. J. (1989). *PCR technology* (Vol. 246): Springer.
- Fabrega, A., & Vila, J. (2012). Yersinia enterocolitica: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *30*(1), 24-32. doi:10.1016/j.eimc.2011.07.017
- Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M., & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, *2*(1), 6. doi:10.1186/2049-2618-2-6

- Finger, H., & von Koenig, C. H. W. (1996). Bordetella. In th & S. Baron (Eds.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX).
- Finton, M. D., Meisal, R., Porcellato, D., Brandal, L. T., & Lindstedt, B. A. (2020). Whole Genome Sequencing and Characterization of Multidrug-Resistant (MDR) Bacterial Strains Isolated From a Norwegian University Campus Pond. *Front Microbiol*, *11*, 1273. doi:10.3389/fmicb.2020.01273
- Folkehelseinstituttet. (2010). Pseudomonasinfeksjon - veileder for helsepersonell. Retrieved from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon---veileder-for/>
- Funke, G., & Rosner, H. (1995). Rahnella aquatilis bacteremia in an HIV-infected intravenous drug abuser. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *22*(3), 293-296. doi:10.1016/0732-8893(95)00100-o
- George, A. M., Hall, R. M., & Stokes, H. W. (1995). Multidrug resistance in Klebsiella pneumoniae: a novel gene, ramA, confers a multidrug resistance phenotype in Escherichia coli. *Microbiology (Reading)*, *141* (Pt 8), 1909-1920. doi:10.1099/13500872-141-8-1909
- Gibello, A., Vela, A. I., Martin, M., Mengs, G., Alonso, P. Z., Garbi, C., & Fernandez-Garayzabal, J. F. (2011). Pseudomonas composti sp. nov., isolated from compost samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, *61*(Pt 12), 2962-2966. doi:10.1099/ijs.0.027086-0
- Han, L., Zhang, R. M., Jia, L., Bai, S. C., Liu, X. W., Wei, R., . . . Sun, J. (2020). Diversity of L1/L2 genes and molecular epidemiology of high-level carbapenem resistance Stenotrophomonas maltophilia isolates from animal production environment in China. *Infect Genet Evol*, *86*, 104531. doi:10.1016/j.meegid.2020.104531
- Hancock, V., Ferrieres, L., & Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious Escherichia coli in human urine. *Microbiology (Reading)*, *154*(Pt 1), 167-175. doi:10.1099/mic.0.2007/011981-0
- Hansen, C. R. (2012). Stenotrophomonas maltophilia: to be or not to be a cystic fibrosis pathogen. *Curr Opin Pulm Med*, *18*(6), 628-631. doi:10.1097/MCP.0b013e328358d4f8
- Illumina. (2021). Understanding the NGS workflow. Retrieved from <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>

- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 161-182, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00036-08
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2761-2764. doi:10.1128/JCM.01228-07
- Johnson, J. R., Johnston, B. D., Porter, S. B., Clabots, C., Bender, T. L., Thuras, P., . . . Banerjee, R. (2019). Rapid Emergence, Subsidence, and Molecular Detection of Escherichia coli Sequence Type 1193-fimH64, a New Disseminated Multidrug-Resistant Commensal and Extraintestinal Pathogen. *J Clin Microbiol*, 57(5). doi:10.1128/JCM.01664-18
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, 49(11), 1749-1755. doi:10.1086/647952
- Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Alberti, S., Perez, J. L., & Oliver, A. (2010). Metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas putida as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful Pseudomonas aeruginosa clones. *J Antimicrob Chemother*, 65(3), 474-478. doi:10.1093/jac/dkp491
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. doi:10.1038/nrmicro818
- Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118(1), 1-36. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Kummerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother*, 52(1), 5-7. doi:10.1093/jac/dkg293
- Kuzdan, C., Soysal, A., Ozdemir, H., Coskun, S., Akman, I., Bilgen, H., . . . Bakir, M. (2015). Rahnella aquatilis Sepsis in a Premature Newborn. *Case Rep Pediatr*, 2015, 860671. doi:10.1155/2015/860671
- Leclerc, Q. J., Lindsay, J. A., & Knight, G. M. (2019). Mathematical modelling to study the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: current state of the field and recommendations. *J R Soc Interface*, 16(157), 20190260. doi:10.1098/rsif.2019.0260
- Li, X. Z., Zhang, L., McKay, G. A., & Poole, K. (2003). Role of the acetyltransferase AAC(6)-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in Stenotrophomonas maltophilia. *J Antimicrob Chemother*, 51(4), 803-811. doi:10.1093/jac/dkg148

- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum beta-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol*, 7, 1374. doi:10.3389/fmicb.2016.01374
- Liu, C., Wang, X., Chen, Y., Hao, H., Li, X., Liang, J., . . . Jing, H. (2016). Three *Yersinia enterocolitica* AmpD Homologs Participate in the Multi-Step Regulation of Chromosomal Cephalosporinase, AmpC. *Front Microbiol*, 7, 1282. doi:10.3389/fmicb.2016.01282
- Lomovskaya, O., & Lewis, K. (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19), 8938-8942. doi:10.1073/pnas.89.19.8938
- Looney, W. J., Narita, M., & Muhlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis*, 9(5), 312-323. doi:10.1016/S1473-3099(09)70083-0
- Machowska, A., & Stalsby Lundborg, C. (2018). Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health*, 16(1). doi:10.3390/ijerph16010027
- Majiduddin, F. K., & Palzkill, T. (2003). Amino acid sequence requirements at residues 69 and 238 for the SME-1 beta-lactamase to confer resistance to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(3), 1062-1067. doi:10.1128/AAC.47.3.1062-1067.2003
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernandez, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., . . . Ramos, J. L. (2014). Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. *PLoS One*, 9(1), e81604. doi:10.1371/journal.pone.0081604
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Nanoporetech. (2021). How nanopore sequencing works. Retrieved from <https://nanoporetech.com/how-nanopore-sequencing-works>
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A., . . . Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, 4(12), 799-808. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 78, 119-146. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
- Niskanen, T., Waldenstrom, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Olsen, B., & Korkeala, H. (2003). virF-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in

- migratory birds in Sweden. *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 4670-4675.
doi:10.1128/AEM.69.8.4670-4675.2003
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., & European Network on, C. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*, 18(5), 432-438.
doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x
- Norsk Legemiddelhåndbok. (2016a). Antibakterielle midler. In.
- Norsk Legemiddelhåndbok. (2016b). Fluorokinoloner. Retrieved from
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.13.1/Fluorokinoloner>
- Norsk Legemiddelhåndbok. (2016c). Karbapenemer. Retrieved from
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.6/Karbapenemer>
- Norsk Legemiddelhåndbok. (2018). Cefalosporiner. Retrieved from
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.4/Cefalosporiner>
- Oxoid. (2021). Brilliance CRE AGAR. Retrieved from
http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=po1226
- Palzkill, T. (2013). Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*, 1277, 91-104. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*, 68(8), 3795-3801.
doi:10.1128/aem.68.8.3795-3801.2002
- Pepe, J. C., & Miller, V. L. (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14), 6473-6477.
doi:10.1073/pnas.90.14.6473
- Piddock, L. J. (1990). Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. Antimicrobial Agents Research Group. *J Appl Bacteriol*, 68(4), 307-318. doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb02880.x
- Pitout, J. D., Moland, E. S., Sanders, C. C., Thomson, K. S., & Fitzsimmons, S. R. (1997). Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(1), 35-39. doi:10.1128/AAC.41.1.35
- Poirel, L., Ortiz de la Rosa, J. M., Richard, A., Aires-de-Sousa, M., & Nordmann, P. (2019). CTX-M-33, a CTX-M-15 derivative conferring reduced susceptibility to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. doi:10.1128/AAC.01515-19

- Pradel, E., & Pages, J. M. (2002). The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, *46*(8), 2640-2643. doi:10.1128/AAC.46.8.2640-2643.2002
- Puertolas-Balint, F., Warsi, O., Linkevicius, M., Tang, P. C., & Andersson, D. I. (2020). Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, *75*(2), 300-308. doi:10.1093/jac/dkz434
- Ramamurthy, T., Yoshino, K., Huang, X., Balakrish Nair, G., Carniel, E., Maruyama, T., . . . Takeda, T. (1997). The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (ystB) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the yst genes. *Microb Pathog*, *23*(4), 189-200. doi:10.1006/mpat.1997.0146
- Sanders, W. E., Jr., & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*, *10*(2), 220-241. doi:10.1128/CMR.10.2.220
- Sanyal, S. C., & Mokaddas, E. M. (1999). The increase in carbapenem use and emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* as an important nosocomial pathogen. *J Chemother*, *11*(1), 28-33. doi:10.1179/joc.1999.11.1.28
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068-2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Seemann, T. (2016). ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes}. Retrieved from <https://github.com/tseemann/abricate>
- Seemann, T. (2017). Shovill: Faster SPAdes assembly of Illumina reads. Retrieved from <https://github.com/tseemann/shovill>
- Simonsen, G. S. (2009). Overvåkning og forekomst av antibiotikaresistens i Norge. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, *129*, 623-627.
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Jr., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., . . . Mobley, H. L. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyuA, chuA, and yfcV efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun*, *80*(12), 4115-4122. doi:10.1128/IAI.00752-12
- Stock, I., Gruger, T., & Wiedemann, B. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Rahnella aquatilis* and *R. aquatilis*-related strains. *J Chemother*, *12*(1), 30-39. doi:10.1179/joc.2000.12.1.30

- Tacao, M., Correia, A., & Henriques, I. (2012). Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla(CTX-M)-like genes. *Appl Environ Microbiol*, 78(12), 4134-4140. doi:10.1128/AEM.00359-12
- Tash, K. (2005). Rahnella aquatilis bacteremia from a suspected urinary source. *J Clin Microbiol*, 43(5), 2526-2528. doi:10.1128/JCM.43.5.2526-2528.2005
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*, 34(5 Suppl 1), S3-10; discussion S64-73. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2013). Brilliance ESBL. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/Thermo-Scientific-Brilliance-ESBL-Sell-Sheet-EU-EN-PO5302A-low-res.pdf>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). Brilliance CRE. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Specification-Sheets/Thermo-Scientific-Brilliance-CRE-Sell-Sheet-EU-EN-PO1226A-low-res.pdf>
- Tønjum, T. (2020). Enterobacter. *Store medisinske leksikon*. Retrieved from <https://sml.snl.no/Enterobacter>
- Valenza, G., Werner, M., Eisenberger, D., Nickel, S., Lehner-Reindl, V., Holler, C., & Bogdan, C. (2019). First report of the new emerging global clone ST1193 among clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli from Germany. *J Glob Antimicrob Resist*, 17, 305-308. doi:10.1016/j.jgar.2019.01.014
- van Hoek, A. H., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *Int J Food Microbiol*, 204, 1-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014
- Wagner, N. J., Lin, C. P., Borst, L. B., & Miller, V. L. (2013). YaxAB, a Yersinia enterocolitica pore-forming toxin regulated by RovA. *Infect Immun*, 81(11), 4208-4219. doi:10.1128/IAI.00781-13
- Walberg, M., Brantsæter, A. V., Rønning, E. J., Jennum, P. A., D., B., Haug, J. B., & Ringertz, S. H. (2006). Rasjonell bruk av ANTIBIOTIKA. 1-11.
- Wick, R. (2017). Porechop. *GitHub repository*. Retrieved from <https://github.com/rrwick/Porechop>

Øye, I. (2020a). Kinoloner. *Store medisinske leksikon*. Retrieved from <https://sml.snl.no/kinoloner>

Øye, I. (2020b). Penicillin. In *Store medisinske leksikon*.

Vedlegg A

Tabell 1: Viser vann for prøveuttak, prøvenavn, hvilket medium baktarieisolatet har vokst frem på, identitet ut ifra 16S sekvensering og konsentrasjon DNA ekstrahert ut.

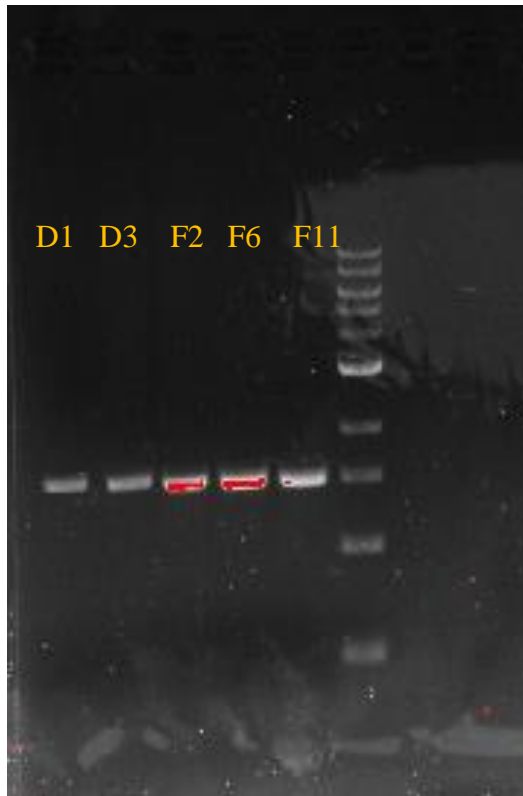
Vann	Prøve	Vekst medium	Farge	Bakterieidentitet, 16S nBLAST	Identitet	
					(%)	Konsentrasjon (ng/μl)
Øvredammen Drøbak	A1	ESBL	Beige, noe blå	Pseudomonas Protegens	100	60
	A2	ESBL	Beige, noe blå	Pseudomonas Protegens	100	65,8
	A3	ESBL	Beige /Lilla	Pseudomonas Saponiphila	100	46
	A4	ESBL	Beige	Pseudomonas Protegens	100	260,5
	A5	ESBL	Gul/Beige	Chromobacterium amazonense	99	47,2
	A6	ESBL	Beige/ Blå	Serratia fonticola	100	170
	A7	CRE	Blågrønn	Novosporingium rhizosphaerae	100	54
	A8	CRE	Rosa	Herbaspirillum huttiense	100	79,5
	A9	CRE	Blågrønn	Novosporingium rhizosphaerae	100	37,1
Bekk fra Øvredammen Drøbak	B1	ESBL	Beige/ Blå	Serratia fonticola	100	5,53
	B2	ESBL	Beige/ Blå	Serratia fonticola	100	16,4
	B3	CRE	Beige/ Rosa	Herbaspirillum	100	0,28
	B4	CRE	Beige/ Rosa	Herbaspirillum	100	181
Breivoll	C1	ESBL	Beige	Alcaligenes aquatis	100	0,342

Smilehullet NMBU, Ås	D1	ESBL	Beige/ Rosa	Uncultured Bordetella**	79	0,241
	D3	ESBL	Beige/ Blå	Enterobacter**	94	17,7
	D4	ESBL	Beige /Lilla	Pseudomonas (composti)	100	0,162
	D5	ESBL	Beige/ Blå	Serratia fonticola	96	14,4
	D6	CRE	Blå	Caulobacter Segins	99	89,2
	D7	CRE	Blå	Caulobacter Segins	100	26,4
	D8	CRE	Blå	Caulobacter Segins	100	27,6
	D9	CRE	Rosa	Caulobacter Segins	100	239
	D10	CRE	Beige	Novospiringium rhizosphaerae	89	42
	D11	CRE	Beige, noe blå	Novospiringium rhizosphaerae	100	12
	Andedammen NMBU, Ås	F1	CRE	Beige, noe blå	Stenotrophomonas Maltophilia	100
F2		CRE	Beige /Lilla	Stenotrophomonas Maltophilia	100	77,5
F6		CRE	Beige	Yersinia Enterocolitica	100	54,9
F5		ESBL	Gul/Beige	Pseudomonas Koreensis	99	27,3
F8		CRE	Beige/ Blå	Aeromonas Caviae	99	24,7
F9		CRE	Blågrønn	Herbaspirillum Aquaticum/ huttiense	99	14,6
F10		ESBL	Rosa	Rahnella/ Ewingella	99,74	99,3
F11		ESBL	Blågrønn	Rahnella/ Ewingella	99,82	91,9
F12		ESBL	Beige/ Blå	Pseudomonas/ Bacillus	99,71	0,75
F13		ESBL	Beige/ Blå	Staphylococcus equorum	99,91	13

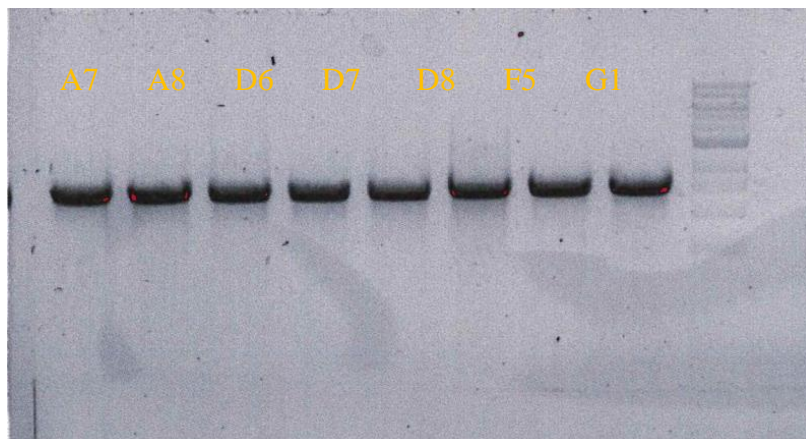
	F14	ESBL	Beige/ Rosa	Rahnella/ Ewingella	99,33	106
	G1	ESBL	Beige/ Rosa	Caulobcter Segins	99	55
	G3	ESBL	Beige	Psaudomoonas fluorencens/ Protegens	100	43,1
Midtsjøvannet Ås	G4	ESBL	Beige/ Rosa	Pseudomonas Koreensis/ Fluroecens	100	59
	G5	CRE	Beige/ Blå	Psaudomoonas fluorencens/ Protegens	99	47,5
	G6	CRE	Beige /Lilla	Herbaspirillum huttiense	100	
	G7	CRE	Beige/ Blå	Caulobcter Segins	99	230
Bekk fra Østensjøvannet	H1	ESBL	Blå	Bacillus Cereus	100	52
	H2	CRE	Blå	Herbaspirillum huttiense	100	37,7

Vedlegg B

Bilder av agarose gelelektroforese

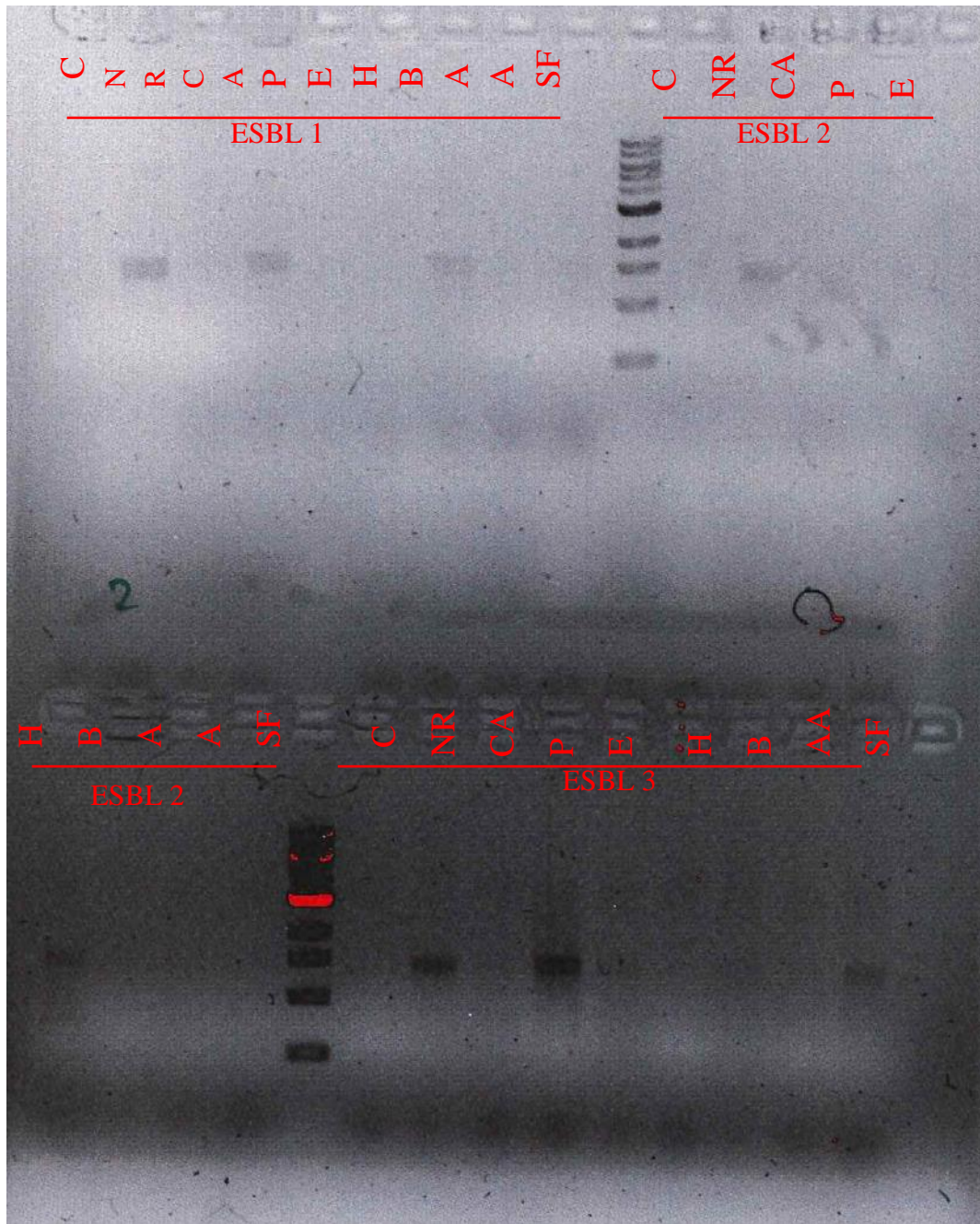


Figur 1: Gelbilde av 16S rRNA fra prøvene som ble jobbet med under hele oppgaven, viser en 1Kb ladder på venstre side.



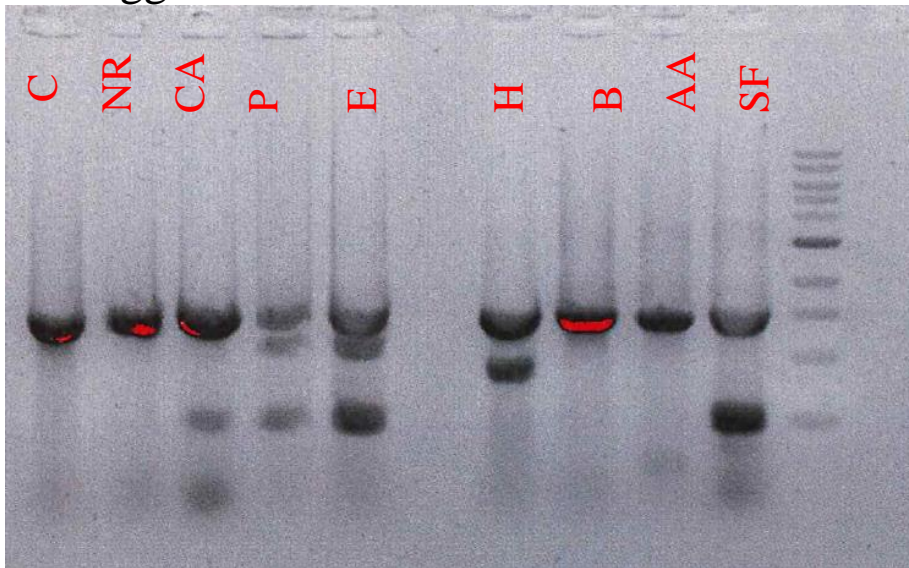
Figur 2: Gelbilde av 16S rRNA, av diverse prøver.

Vedlegg B

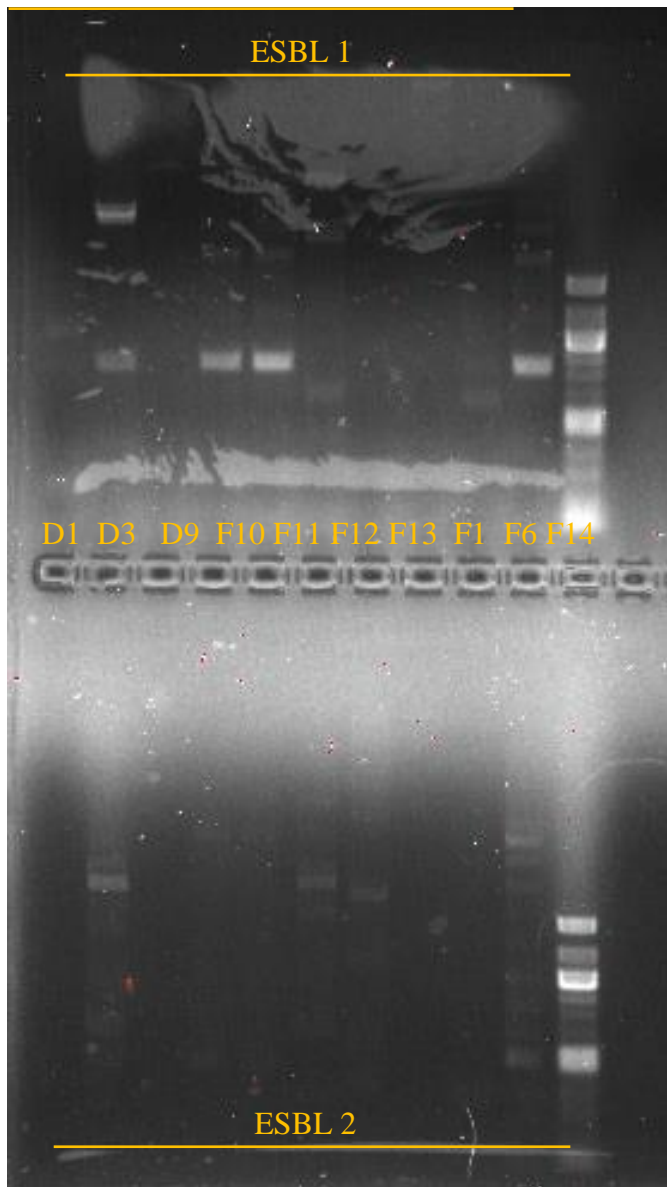


Figur 3: Gelbilde fra Multiplex PCR ESBL 1 2 og 3. Bakteriearter fra samme slekt ble samlet sammen, og bildet viser derfor bare navnet på slekten der det er flere prøver samlet. C: Caulobacter, NS: Novosporingium rhizosphaerae, CA: Chromobacterium Amazonense, P: Pseudomonas, E: Enterobacter, H: Herbaspirillum, B: Bordetella, AA: Alcaligenes Aquatis, SF: Serratia Fonticola.

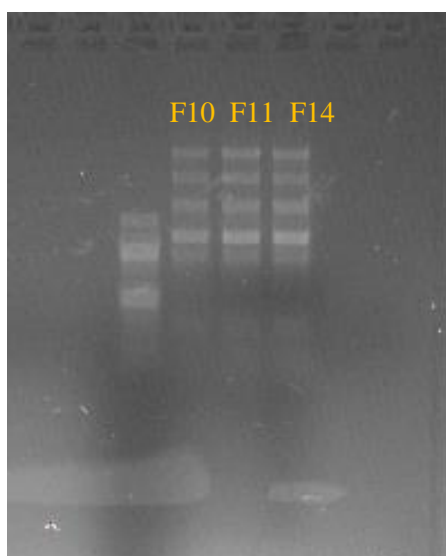
Vedlegg B



Figur 4: Gelbilde fra Multiplex PCR ESBL 4. Bakteriearter fra samme slekt ble samlet sammen, og bildet viser derfor bare navnet på slekten der det er flere prøver samlet. C: *Caulobacter*, NS: *Novosporingium rhizosphaerae*, CA: *Chromobacterium Amazonense*, P: *Pseudomonas*, E: *Enterobacter*, H: *Herbaspirillum*, B: *Bordetella*, AA: *Alcaligenes Aquatis*, SF: *Serratia Fonticola*.



Figur 5: Gelbilde fra Multiplex PCR ESBL 1 og 2. Viser en 100 bp ladder på høyre side av hver rad. Markeringen av brønnene gjelder for både øvre og nedre rad.



Figur 6: Gelbilde fra Singleplex PCR med primererne for bla_{SHV} . 100 bp ladder vist på venstre side.

Vedlegg C

Tabell 1: Viser transporter gener funnet hos prøve D1, D3, F2, F6, F11 og FX.

Gen	% query Cover	% Identity	Produkt	Accession number
F2				
ArpB	100	100	Antibiotic efflux pump membrane transporter	VUN56191.1
BetT1	100	100	Osmo-independent choline transporter	WP_128990539.1
BtuB	100	99.89	Vitamin B12 transporter	WP_053519381.1
citN	100	100	Citrate transporter	VUQ06662.1
iolT	95	51.89	Major myo-inositol transporter	WP_053519381.1
MhbT	100	99.48	3-hydroxybenzoate transporter	WP_053517457.1
MntH	70	60.38	Divalent metal cation transporter	CDO54642.1
NatA	100	100	ABC transporter ATP-binding protein	WP_053515807.1
OqxB7	100	99.88	multidrug efflux RND transporter permease subunit	WP_181452086.1
ribN	100	100	Riboflavin transporter	WP_180876831.1
YfcA	100	99.62	putative membrane transporter protein	WP_180876006.1
YheS	100	100	putative ABC transporter ATP-binding protein	OBT88576.1
D1				
ArpB	100	99.81	Antibiotic efflux pump membrane transporter	WP_016488874.1
artJ	100	100	ABC transporter arginine-binding protein 1	WP_003255747.1
ArtQ	100	100	Arginine ABC transporter permease protein	WP_016497593.1
BepE	100	99.66	Efflux pump membrane transporter	WP_046784877.1
BetT2	100	98.90	Osmo-dependent choline transporter	WP_039603145.1
BmaC	100	98.2	Adhesin BmaC autotransporter	WP_102688821.1
BtuB	61	99.14	Vitamin B12 transporter	WP_197898347.1
cimH	100	98.86	Citrate/malate transporter	WP_060485211.1
citN	100	99.08	Citrate transporter	WP_103518197.1
CysZ	100	98.76	Sulfate transporter	WP_012316215.1
DctM	100	99.77	C4-dicarboxylate TRAP transporter large permease protein	WP_019472239.1
exuT	100	98.84	Hexuronate transporter	WP_019472242.1
FeoB	100	100	Fe(2+) transporter	WP_039602275.1
fhuA	100	99.51	Ferrichrome outer membrane transporter/phage receptor	WP_016484565.1
GlnH	100	99.66	ABC transporter glutamine-binding protein	WP_016489704.1

GlnM	100	100	putative glutamine ABC transporter permease protein	WP_012312833.1
gntT	100	99.78	High-affinity gluconate transporter	WP_096426027.1
gudP	100	99.56	putative glucarate transporter	WP_016487467.1
hcaT	91	98.18	putative 3-phenylpropionic acid transporter	KHL72810.1
HuxB	96	92.70	Heme/hemopexin transporter protein	WP_102689926.1
LcoP	100	87.67	Betaine/ectoine transporter	HAL68294.1
lgoT	100	99.79	putative L-galactonate transporter	WP_197864605.1
lgoT	100	98.77	putative L-galactonate transporter	QDY38886.1
LplT	100	98.08	Lysophospholipid transporter	WP_209953313.1
MgtE	99	91.45	Magnesium transporter	WP_119688113.1
NanT	100	99.46	Sialic acid transporter	WP_016486073.1
nimT	100	99.74	2-nitroimidazole transporter	WP_161872205.1
OqxB9	100	99.72	multidrug efflux RND transporter permease subunit	WP_016486703.1
PanS	99	99.38	Pantothenate precursors transporter	WP_016485299.1
PcaK	100	99.58	4-hydroxybenzoate transporter	WP_016488884.1
pitA	100	99.80	Low-affinity inorganic phosphate transporter 1	WP_024717454.1
proP	100	99.09	Proline/betaine transporter	WP_016488294.1
RfnT	100	99.01	Riboflavin transporter	WP_016488754.1
TtgH	100	96.57	Toluene efflux pump membrane transporter	WP_042943840.1
ttuB	100	99.54	Putative tartrate transporter	WP_016486777.1
UacT	100	99.80	Uric acid transporter	WP_197888997.1
UacT	99	100	Uric acid transporter	WP_016488367.1
uup	100	100	ABC transporter ATP-binding protein	WP_016485635.1
YadG	100	99.35	putative ABC transporter ATP-binding protein	WP_016485471.1
YbiT	100	99.62	putative ABC transporter ATP-binding protein	WP_016486587.1
YcaD	100	98.94	putative MFS-type transporter	WP_016489811.1
YedA	100	99.35	putative inner membrane transporter	WP_023048887.1
YejB	100	99.72	Inner membrane ABC transporter permease protein	BBH45305.1
YejE	100	99.41	Inner membrane ABC transporter permease protein	WP_016488246.1
YejF	100	98.68	putative ABC transporter ATP-binding protein	WP_197863802.1
YfcA	100	100	putative membrane transporter protein	WP_016498840.1

YhdY	100	98.63	Inner membrane amino-acid ABC transporter permease protein	WP_016488997.1
yhhQ	86	41.81	queuosine precursor transporter	VVO44945.1
YhhS	96	98.33	putative MFS-type transporter	WP_016486586.1
FX				
artI	100	100	Putative ABC transporter arginine-binding protein	WP_000756575.1
atoE	100	100	Putative short-chain fatty acid transporter	WP_000580278.1
bmrA	100	100	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding/permease protein	WP_001009226.1
Cydc	100	99.83	putative ABC transporter ATP-binding/permease protein	WP_064577434.1
emrE	100	100	Multidrug transporter	EEJ47676.1
FepC	100	100	C4-dicarboxylic acid transporter	WP_001538640.1
FepD	100	100	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, permease component	WP_001773895
fhuA	100	100	Ferrichrome outer membrane transporter/phage reseptor	WP_000035479.1
glpT	100	100	Glycerol-3-phosphate transporter	CQR81736.1
mdfA	100	100	Multidrug transporter	WP_001180105.1
nanT	100	100	Sialic acid transporter	OSK49546.1
pitA	100	100	Low-affinity inorganic phosphate transporter	WP_000933273.1
sbmA	100	99.75	Peptide antibiotic transporter	EEQ7971713.1
sbnD	100	100	Staphyloferrin B transporter	WP_000074171.1
sdaC	100	100	Serine transporter	WP_000450473.1
uup	100	100	ABC transporter ATP-binding protein uup	WP_001773885.1
ybhF	100	100	putative multidrug ABC transporter ATP-binding protein	WP_001538488.1
ybhR	100	100	putative multidrug ABC transporter permease	WP_000469031.1
ybhS	100	100	putative multidrug ABC transporter permease	EGI27067.1
ycaD	100	99.74	putative MFS-type transporter YcaD	HBE4256638.1
yheI	100	100	putative multidrug resistance ABC transporter TP-binding/permease protein	WP_001235630.1
zitB	100	100	Zinc transporter	WP_001538475.1
zupT	100	100	Zinc transporter	WP_001774048.1

Tabell 2: Viser toxin gener funnet hos prøve D1, D3, F2, F6, F11 og FX.

Gen	% query Cover	% Identity	Produkt	Accession
F2				
apxIB	100	100	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein	WP_180876577.1
tdeA	100	99.66	Toxin and drug export protein A	WP_180875658.1
YjjJ	100	99.60	Toxin	WP_180876577.1
F6				
apxIB	100	100	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein	WP_046694980.1
cdtA	100	100	Cytolethal distending toxin subunit A	CQJ25919.1
cdtB	100	100	Cytolethal distending toxin subunit B	WP_046050779.1
ChpB	100	100	Endoribonuclease toxin	WP_087796025.1
ChpS	100	100	Antitoxin	CNF16106.1
DinJ	100	100	Antitoxin	WP_020424112.1
GhoT	100	100	Toxin	WP_005170265.1
HicB	100	100	Antitoxin	WP_050158801.1
HigB-1	100	100	Toxin	CNI60022.1
PasT	100	100	Persistence and stress-resistance toxin	WP_011815744.1
ptxA	100	100	Pertussis toxin subunit 1	WP_050157859.1
RelB	100	100	Antitoxin	WP_012105237.1
RelE	100	100	mRNA interferase toxin	WP_012105238.1
rtxA	100	99.83	Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin	WP_057625787.1
TabA	100	100	Toxin-antitoxin biofilm protein	WP_019082026.1
tdeA	100	100	Toxin and drug export protein A	WP_050158646.1
YafQ	100	100	mRNA interferase toxin	WP_032901193.1
YfjZ	100	100	Antitoxin	WP_000065326.1
Ykfl	100	100	Toxin	WP_050321835.1
YpjF	100	100	Toxin	WP_000698542.1
ystB	100	100	Heat-stable enterotoxin B	WP_019079716.1

D1				
apxIB	100	99.86	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein	WP_016484320.1
LtxB	100	99.72	Leukotoxin export ATP-binding protein	WP_016484934.1
PrlF	100	99.02	Antitoxin	WP_201198836.1
RatA	100	100	Ribosome association toxin	WP_012312635.1
VgrG1	100	93.90	Actin cross-linking toxin	RFQ00196.1
D3				
CbtA	100	90.40	Cytoskeleton-binding toxin	WP_163306230.1
CbtA	99	91.13	Cytoskeleton-binding toxin	WP_032669201.1
higA1	100	91.92	Antitoxin	WP_174343443.1
higB2	100	83.62	Putative toxin	WP_196391340.1
OrtT	100	100	Orphan toxin	WP_023316025.1
RelB	100	100	Antitoxin	WP_112012061.1
RelE	100	100	mRNA interferase toxin	WP_112012062.1
SocA	100	87.93	Antitoxin	WP_100780703.1
F11				
apxIB	100	99.86	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein	WP_120162047.1
azF	100	99.12	Endoribonuclease toxin	WP_129638057.1
fitB	100	98.74	Toxin	WP_120162609.1
hipA	100	99.11	Serine/threonine-protein kinase toxin	RJT50994.1
relE	100	97.89	mRNA interferase toxin	WP_101079624.1
tabA	100	100	Toxin-antitoxin biofilm protein	WP_113876795.1
tcpA	100	100	Toxin coregulated pilin	WP_120162144.1
tcpE	100	99.71	Toxin coregulated pilus biosynthesis protein E	WP_120162150.1
tcpT	100	100	Toxin coregulated pilus biosynthesis protein T	RJT53776.1
tdeA	100	99.78	Toxin and drug export protein A	WP_120162740.1
vgrG1	100	99.84	Actin cross-linking toxin	WP_120162304.1
yhaV	100	97.48	Ribonuclease toxin	WP_113876895.1

FX				
cbeA	100	100	Cytoskeleton bundling-enhancing antitoxin	WP_001295723.1
cbtA	100	100	Cytoskeleton-binding toxin	WP_000854753.1
ccdA	100	100	Antitoxin	WP_000125568.1
ccdB	100	100	Toxin	WP_001160966.1
ghoS	100	100	Endoribonuclease antitoxin	WP_001312331.1
ghoT	100	100	Toxin	WP_085674725.1
higA	100	100	Antitoxin	AJG09702.1
higB	100	100	Toxin	WP_000057523.1
hipA	100	100	Serine/threonine-protein kinase toxin	HAI5696264.1
mazE	100	100	Antitoxin	WP_000581937.1
mazF	100	100	Endoribonuclease toxin	WP_000254749.1
mqsA	100	100	Antitoxin	WP_000650107.1
mqsR	100	100	mRNA interferase toxin	WP_000415584.1
ortT	100	100	Orphan toxin	WP_000061178.1
pasI	100	100	Persistence and stress-resistance antitoxin	WP_001117834.1
pasT	100	100	Persistence and stress-resistance toxin	WP_000600193.1
pemI	100	100	Antitoxin	WP_000557619.1
prlF	100	100	Antitoxin	WP_001307405.1
tabA	100	100	Toxin-antitoxin biofilm protein	WP_001556858.1
vapB	100	100	Antitoxin	ADL13991.1
vgrG1	100	100	Actin cross-linking toxin	HAI2398150.1
vgrG1	100	100	Actin cross-linking toxin	HAX8937778.1
yafN	100	100	Antitoxin	WP_001263500.1
yafO	100	100	mRNA interferase toxin	WP_001263500.1
yefM	100	100	Antitoxin	WP_152066328.1
yhaV	100	100	Ribonuclease toxin	WP_000347275.1
yoeB	100	100	Toxin	WP_000767822.1

Vedlegg C

Tabell 3: Viser treff for hemolysin funnet hos prøve D1, D3, F2, F6, F11 og FX, ved bruk av databasen pBLAST hos NCBI.

Gen	% query Cover	% Identity	Produkt	Accession number
F2				
plcN	100	100	Non-hemolytic phospholipase C	WP_180876788.1
F6				
hlyD	100	100	Hemolysin secretion protein D, chromosomal	WP_046050905.1
shlA	100	100	Hemolysin	WP_050158569.1
ShlB	100	100	Hemolysin transporter protein	WP_050157247.1
F11				
hha	93	68.66	Hemolysin expression-modulating protein	WP_072010199.1
shlB	100	98.73	Hemolysin transporter protein	WP_112288963.1
FX				
hha	100	100	Hemolysin expression-modulating protein	EFF14269.1

Vedlegg C

Tabell 5: Viser virulensgener funnet i prøvene D1, D3, F2, F6, F11 og FX, funnet ved bruk av databasen VFDB gjennom ABRicate hos NCBI.

Gen	% query Cover	% Identity	Produkt	Accession
F2				
BvgA	100	98.75	Virulence factors putative positive transcription regulator	AZP73048.1
PhoP	100	100	Virulence transcriptional regulatory protein	WP_053518291.1
F6				
BvgA	100	100	Virulence factors putative positive transcription regulator	WP_019080917.1
BvgS	100	100	Virulence sensor protein	CNF54255.1
cheA	100.00	97.53	chemotaxis protein CheA [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006780
cheB	99.90	98.47	chemotaxis-specific methyltransferase CheB [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006775
cheD	100.00	98.03	methyl-accepting chemotaxis protein CheD [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006778
cheR	100.00	98.31	chemotaxis methyltransferase CheR [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006776
cheW	100.00	98.59	purine-binding chemotaxis protein CheW [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006779
cheY	100.00	99.49	chemotaxis regulatory protein CheY [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006774
cheZ	99.84	98.60	chemotaxis regulator CheZ [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006773
ddhA	99.24	87.37	glucose-1-phosphate cytidyltransferase [O-antigen (VF0392)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001007269
fcl	100.00	99.48	GDP-fucose synthetase [O-antigen (VF0392)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001007256
flgA	99.83	95.52	flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006765
flgB	100.00	99.76	flagellar basal-body rod protein FlgB [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006764

flgC	100.00	97.28	flagellar basal-body rod protein FlgC [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006763
flgD	100.00	96.01	flagellar basal-body rod modification protein FlgD [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006762
flgE	100.00	97.22	flagellar hook protein FlgE [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006761
flgF	100.00	96.30	flagellar basal-body rod protein FlgF [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006760
flgG	100.00	91.74	flagellar basal-body rod protein FlgG [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006759
flgH	100.00	96.93	flagellar L-ring protein precursor FlgH [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006758
flgI	100.00	97.12	flagellar P-ring protein precursor FlgI [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006757
flgJ	100.00	96.43	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006756
flgK	100.00	96.40	flagellar hook-associated protein 1 FlgK [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006755
flgL	99.90	97.65	flagellar hook-associated protein 3 FlgL [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006754
flgM	100.00	97.67	negative regulator of flagellin synthesis [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006766
flgN	100.00	94.56	flagella synthesis protein FlgN [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006767
flhA	100.00	96.34	flagellar biosynthesis protein FlhA [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006770
flhB	100.00	97.40	flagellar biosynthetic protein FlhB [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006771
flhC	100.00	98.80	flagellar biosynthesis transcription activator FlhC [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006783
flhD	85.28	98.70	flagellar transcriptional activator FlhD [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006784

fliE	99.53	91.92	flagellar biosynthesis protein FlhE [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006769
fliA	100.00	98.75	flagellar biosynthesis sigma factor [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006726
fliE	98.72	99.35	flagellar hook-basal body complex protein FliE [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006740
fliF	100.00	98.30	flagellar M-ring protein FliF [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006741
fliG	100.00	98.69	flagellar motor switch protein G [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006742
fliH	100.00	97.38	flagellar assembly protein H [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006743
fliI	99.85	96.99	flagellum-specific ATP synthase FliI [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006744
fliJ	100.00	98.43	flagellar protein FliJ [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006745
fliK	100.00	96.82	flagellar hook-length control protein FliK [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006746
fliL	100.00	99.36	flagellar basal body protein FliL [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006747
fliM	100.00	98.51	flagellar motor switch protein FliM [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006748
fliN	100.00	98.56	flagellar motor switch protein FliN [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006749
fliO	85.16	96.86	flagellar protein FliO [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006750
fliP	99.71	95.04	flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006751
fliQ	100.00	99.26	flagellar biosynthetic protein FliQ [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006752
fliR	100.00	97.96	flagellar biosynthetic protein FliR [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006753

fliS	100.00	93.73	flagellar protein FliS [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006732
fliT	100.00	90.63	flagellar protein FliT [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006733
fliZ	100.00	98.63	alternative sigma factor regulatory protein [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006725
gmd	100.00	99.55	GDP-mannose 46-dehydratase [O-antigen (VF0392)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001007257
inv	96.53	87.79	invasin [Invasin (VF0131)] [Yersinia enterocolitica W1024]	CAA88188
manB	99.64	99.27	phosphomannomutase [O-antigen (VF0392)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001007254
manC	100.00	99.57	mannose-1-phosphate guanylyltransferase [O-antigen (VF0392)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001007255
motA	100.00	98.09	flagellar motor protein MotA [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006782
motB	100.00	96.43	flagellar motor protein MotB [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006781
PhoQ	100	100	Virulence sensor histidine kinase	WP_050149239.1
rfpB	84.49	99.34	putative galactosyltransferase [O-antigen (VF0392)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001007258
yaxA	100.00	94.34	cytotoxin YaxA [YaxAB (VF0511)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006237
yaxB	99.13	94.74	cytotoxin YaxB [YaxAB (VF0511)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	YP_001006238
ystB	100.00	100.00	Yersinia heat-stable enterotoxin Type B [Yst (VF0135)] [Yersinia enterocolitica str. 84-50]	BAA13544
D1				
algA	97.16	83.23	phosphomannose isomerase / guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_252241
algB	98.67	80.38	two-component response regulator AlgB [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_254170
algC	95.26	80.73	phosphomannomutase AlgC [Alginate biosynthesis (CVF522)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_254009

algI	81.45	86.98	alginate o-acetyltransferase AlgI [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_252238
BvgA	100	99.51	Virulence factors putative positive transcription regulator	WP_016485605.1
cvfB	100	99.52	Conserved virulence factor B	WP_016488575.1
fleN	92.65	83.53	flagellar synthesis regulator FleN [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250145
fleN	89.32	82.20	flagellar synthesis regulator FleN [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250145
fleQ	97.69	80.43	transcriptional regulator FleQ [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249788
flgC	99.77	80.22	flagellar basal-body rod protein FlgC [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249769
flgC	100.00	80.18	flagellar basal-body rod protein FlgC [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249769
flgG	97.71	85.23	flagellar basal-body rod protein FlgG [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249773
flgH	93.25	81.47	flagellar L-ring protein precursor FlgH [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249774
flgI	94.86	85.94	flagellar P-ring protein precursor FlgI [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249775
flgI	99.73	85.70	flagellar P-ring protein precursor FlgI [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249775
flhA	99.34	81.61	flagellar biosynthesis protein FlhA [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250143
fliA	89.65	82.06	flagellar biosynthesis sigma factor FliA [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250146
fliG	100.00	84.90	flagellar motor switch protein G [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249793
fliI	91.96	82.36	flagellum-specific ATP synthase FliI [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249795
fliM	98.97	86.41	flagellar motor switch protein FliM [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250134
fliP	93.49	82.73	flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250137
fliQ	99.63	80.44	flagellar biosynthetic protein FliQ [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250138
fliQ	99.63	80.81	flagellar biosynthetic protein FliQ [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250138

mbtH-like	97.26	84.98	MbtH-like protein from the pyoverdine cluster [pyoverdine (IA001)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_251102
motC	99.33	82.79	flagellar motor protein [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_250151
mucD	94.81	80.17	serine protease MucD precursor [Alginate regulation (CVF523)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_249457
pilH	88.52	81.17	twitching motility protein PilH [Type IV pili (VF0082)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_249100
pvdH	92.84	80.50	diaminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase PvdH [pyoverdine (IA001)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_251103
pvdS	93.26	81.66	extracytoplasmic-function sigma-70 factor [Pyoverdine (VF0094)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_251116
waaF	94.32	81.18	heptosyltransferase I [LPS (VF0085)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_253699
waaF	93.55	81.50	heptosyltransferase I [LPS (VF0085)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_253699
D3				
algA	92.67	84.02	phosphomannose isomerase / guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase [Alginate (VF0091)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_252241
algB	98.44	80.02	two-component response regulator AlgB [Alginate (VF0091)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_254170
algC	94.90	80.80	phosphomannomutase AlgC [Alginate biosynthesis (CVF522)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_254009
algD	99.54	81.06	GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD [Alginate (VF0091)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_252230
algI	81.45	80.79	alginate o-acetyltransferase AlgI [Alginate (VF0091)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_252238
algR	96.39	81.91	alginate biosynthesis regulatory protein AlgR [Alginate (VF0091)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_253948
algU	99.66	80.34	alginate biosynthesis protein AlgZ/FimS [Alginate (VF0091)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_249453
algW	95.81	81.29	AlgW protein [Alginate regulation (CVF523)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_253136
fleN	98.46	82.39	flagellar synthesis regulator FleN [Flagella (VF0273)] [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	NP_250145

flgC	100.00	81.08	flagellar basal-body rod protein FlgC [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249769
fliA	83.06	81.97	flagellar biosynthesis sigma factor FliA [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250146
fliA	82.93	81.89	flagellar biosynthesis sigma factor FliA [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250146
fliE	99.09	81.38	flagellar hook-basal body complex protein FliE [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249791
fliI	95.65	83.11	flagellum-specific ATP synthase FliI [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249795
fliM	100.00	86.83	flagellar motor switch protein FliM [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250134
fliP	87.37	82.86	flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250137
fliQ	100.00	80.00	flagellar biosynthetic protein FliQ [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250138
hsiB1/v ipA	96.53	85.71	type VI secretion system tubule-forming protein VipA [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_248773
hsiC1/vipB	96.99	89.12	hstype VI secretion system tubule-forming protein VipB [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_248774
iucC	81.47	81.01	aerobactin siderophore biosynthesis protein IucC [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]	NP_755500
mbtH-like	83.11	86.26	MbtH-like protein from the pyoverdine cluster [pyoverdine (IA001)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_251102
motA	99.18	80.05	flagellar motor protein [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_253641
motC	99.87	81.27	flagellar motor protein [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_250151
ompA	98.75	84.75	outer membrane protein A [OmpA (VF0236)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	AAF37887
pilG	96.81	88.86	twitching motility protein PilG [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249099
pilH	99.45	90.93	twitching motility protein PilH [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249100
pilJ	98.83	84.91	twitching motility protein PilJ [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249102

pilM	99.91	81.52	type IV pilus inner membrane platform protein PilM [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_253731
pilU	99.65	88.61	twitching motility protein PilU [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249087
waaG	97.77	80.24	B-band O-antigen polymerase [LPS (VF0085)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_253697
xcpS	99.84	80.46	general secretion pathway protein F [xcp secretion system (VF0084)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_251792
xcpT	91.05	82.31	general secretion pathway protein G [xcp secretion system (VF0084)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_251791
F11				
bvgS	100	98.42	Virulence sensor protein	WP_120163760.1
phoQ	100	100	Virulence sensor histidine kinase	WP_120160656.1
pilH	91.53	84.48	twitching motility protein PilH [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_249100
FX				
virF	100	100	Virulence regulon transcriptional activator	WP_001557140.1
aslA	98.04	98.43	putative arylsulfatase [AslA (VF0238)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	AAG10151
chuS	100.00	99.51	heme oxygenase ChuS [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756169
chuT	100.00	99.70	periplasmic heme-binding protein ChuT [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756175
chuU	100.00	99.50	heme permease protein ChuU [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756179
chuV	100.00	99.75	ATP-binding hydrophilic protein ChuV [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756180
chuW	100.00	99.10	Putative oxygen independent coproporphyrinogen III oxidase [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756176
chuX	100.00	100.00	putative heme-binding protein ChuX [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756177
chuY	100.00	98.40	ChuY [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]	NP_756178
csgB	99.78	83.59	minor curlin subunit precursor curli nucleator protein CsgB [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]	NP_460114
csgD	100.00	81.26	DNA-binding transcriptional regulator CsgD [curli fibers/thin aggregative fimbriae (AGF) (AI094)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]	NP_460113
csgF	99.04	80.76	curli production assembly/transport protein CsgF [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica	NP_460111

			subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]	
csgG	100.00	83.33	curli production assembly/transport protein CsgG [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]	NP_460110
entA	100.00	98.39	23-dihydro-23-dihydroxybenzoate dehydrogenase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752614
entB	100.00	99.18	isochorismatase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752613
entC	100.00	99.66	isochorismate synthase 1 [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752611
entD	85.86	92.75	phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752599
entE	100.00	99.13	23-dihydroxybenzoate-AMP ligase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752612
entF	99.28	98.36	enterobactin synthase multienzyme complex component ATP-dependent [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752604
entS	100.00	98.80	enterobactin exporter iron-regulated [enterobactin (IA019)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752609
fdeC	100.00	99.62	adhesin FdeC [FdeC (VF0506)] [Escherichia coli O45:K1:H7 str. S88]	YP_002390132
fepA	100.00	98.88	ferrienterobactin outer membrane transporter [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752600
fepB	100.00	99.79	ferrienterobactin ABC transporter periplasmic binding protein [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752610
fepC	100.00	99.39	ferrienterobactin ABC transporter ATPase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752606
fepD	100.00	99.51	ferrienterobactin ABC transporter permease [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752608
fepG	100.00	99.80	iron-enterobactin ABC transporter permease [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752607
fes	100.00	99.83	enterobactin/ferric enterobactin esterase [enterobactin (IA019)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752602
fimA	100.00	92.24	Type-1 fimbrial protein A chain precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757241

fimB	100.00	98.18	Type 1 fimbriae Regulatory protein fimB [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757239
fimC	100.00	98.48	Chaperone protein fimC precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757243
fimD	100.00	98.26	Outer membrane usher protein fimD precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757244
fimE	100.00	98.66	Type 1 fimbriae Regulatory protein fimE [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757240
fimF	100.00	97.38	FimF protein precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757245
fimG	100.00	98.02	FimG protein precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757247
fimH	100.00	97.15	FimH protein precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757248
fimI	100.00	98.33	Fimbrin-like protein fimI precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]	NP_757242
fyuA	100.00	99.95	pesticin/yersiniabactin receptor protein [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405467
gspC	100.00	93.86	general secretion pathway protein C [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404599
gspD	100.00	96.06	general secretion pathway protein D [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404600
gspE	100.00	94.91	general secretion pathway protein E [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404601
gspF	100.00	94.17	general secretion pathway protein F [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404602
gspG	100.00	96.05	general secretion pathway protein G [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404603
gspH	100.00	94.73	general secretion pathway protein H [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404604
gspI	100.00	92.20	general secretion pathway protein I [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404605
gspJ	100.00	94.39	general secretion pathway protein J [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404606
gspK	100.00	96.63	general secretion pathway protein K [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404607
gspL	100.00	94.77	general secretion pathway protein L [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404608
gspM	99.76	93.60	general secretion pathway protein M [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]	YP_404609
irp1	100.00	99.33	yersiniabactin biosynthetic protein Irp1 [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405471

irp2	99.95	98.87	yersiniabactin biosynthetic protein Irp2 [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405472
iucA	100.00	99.83	aerobactin synthesis protein IucA [Aerobactin (VF0123)] [Shigella flexneri 2a str. 301]	NP_709454
iucB	100.00	99.79	aerobactin synthesis protein IucB [Aerobactin (VF0123)] [Shigella flexneri 2a str. 301]	NP_709455
iucC	96.21	98.15	aerobactin siderophore biosynthesis protein IucC [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]	NP_755500
iucD	98.80	96.30	L-lysine 6-monooxygenase IucD [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]	NP_755499
iutA	99.96	88.36	ferric aerobactin receptor precursor IutA [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]	NP_755498
kpsD	100.00	99.05	KpsD [K1 capsule (VF0239)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	AAA21682
kpsM	100.00	99.87	KpsM [K1 capsule (VF0239)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	AAA24046
kpsT	100.00	100.00	KpsT [K1 capsule (VF0239)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	AAA24047
ompA	100.00	99.52	outer membrane protein A [OmpA (VF0236)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	AAF37887
papB	99.68	98.41	regulatory protein PapB [P fimbriae (VF0220)] [Escherichia coli CFT073]	
papI	100.00	94.87	regulatory protein PapI [P fimbriae (VF0220)] [Escherichia coli CFT073]	NP_755468
papX	100.00	97.46	PapX protein regulates flagellum synthesis to repress motility [P fimbriae (CVF425)] [Escherichia coli CFT073]	NP_755457
senB	99.91	99.74	enterotoxin [ShET2 (VF0258)] [Shigella flexneri 2a str. 301]	YP_406304
vat	95.45	99.67	Haemoglobin protease [Tsh (VF0233)] [Escherichia coli CFT073]	NP_752330
yagV/e cpE	99.74	98.41	E. coli common pilus chaperone EcpE [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	NP_286006
yagW/ ecpD	100.00	99.15	polymerized tip adhesin of ECP fibers [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	NP_286007
yagX/e cpC	100.00	97.66	E. coli common pilus usher EcpC [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	NP_286008
yagY/e cpB	100.00	98.06	E. coli common pilus chaperone EcpB [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	NP_286009

yagZ/e cpA	100.00	98.47	E. coli common pilus structural subunit EcpA [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	NP_286010
ybtA	100.00	99.48	transcriptional regulator YbtA [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405473
ybtE	100.00	99.81	yersiniabactin siderophore biosynthetic protein [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405468
ybtP	100.00	99.61	lipoprotein inner membrane ABC-transporter [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405474
ybtQ	100.00	99.78	inner membrane ABC-transporter YbtQ [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405475
ybtS	100.00	99.77	salicylate synthase Irp9 [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405477
ybtT	100.00	99.50	yersiniabactin biosynthetic protein YbtT [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405469
ybtU	100.00	99.73	yersiniabactin biosynthetic protein YbtU [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405470
ybtX	100.00	99.61	putative signal transducer [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]	NP_405476
ykgK/e cpR	100.00	99.32	regulator protein EcpR [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	NP_286011

Tabell 6: Viser gener funnet hos *E.coli*, funnet av Prof. Lindstedt ved bruk av hans egen virulensdatabase. Markert i rødt er gener viktige for resistens og markert i med fet skrift er viktige for virulens.

Gene/Marker name	Accession number	Comment	% nucleotide match	Coverage
APEC O1 conserved protein (APECO1_2080)	CP000468	APEC O1 conserved protein from CP000468	97.55	2202 / 2202
AcrA	NC_000913	Multidrug efflux pump subunit AcrA	99.16	1194 / 1194
acs	NC_000913	Acetyl-coenzyme A synthetase. APEC acs-yjch-actP operon, encoding acetate assimilation system, presented the host-induced transcription during its proliferation in macrophages.	97.04	1959 / 1959
actP	NC_000913	Cation/acetate symporter ActP. APEC acs-yjch-actP operon, encoding acetate assimilation system, presented the host-induced transcription during its proliferation in macrophages.	95.76	1650 / 1650
C3D46_003922	AASCBZ010000028.1	Adhesin coding gene	100	1470 / 1470
aec77	NZ_CP023820	YeeW-like protein	99.8	489 / 489
aer	NC_011751	Aerotaxis receptor	98.22	1521 / 1521
ag-43	NZ_WJRE01000040.1	Autotransporter adhesin	99.93	2847 / 2847
ampC	CP009072	AmpC β -lactamases (also termed class C or group 1) are typically encoded on the chromosome of many Gram-negative bacteria	99.82	1134 / 1134
antigen-43	NZ_ANXM01000041.1	A self-recognizing adhesin that is associated with cell aggregation and biofilm formation in <i>E. coli</i> .	97.82	3143 / 3120
arnC	NC_000913	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	97.73	969 / 969
asIA (Arylsulfatase)	CU928163	Arylsulfatase	98.31	1656 / 1656
atoC	NC_011751	Member of the two-component regulatory system AtoS/AtoC	98.41	1386 / 1386
atoE	NC_011751	Short chain fatty acid transporter [<i>Escherichia coli</i> UMN026], positive in EPEC1 and negative in EPEC2	97.88	1323 / 1323

atoS	NC_011751	Member of the two-component regulatory system AtoS/AtoC	98.47	1827 / 1827
autA	KT965673	/product="single-component transcriptional regulator AutA" doi: 10.1038/srep25085	98.62	795 / 795
PP06_RS14115	NZ_JSGN01000113.1	autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein. These genes are often associated with virulence	100	3681 / 3681
autR	KT965673	/product="single-component transcriptional regulator AutR" doi: 10.1038/srep25085	99.08	762 / 762
bcr	CP027060	Bicyclomycin resistance protein	96.31	1191 / 1191
bcsA (cellulose synthase)	CP006632	Catalytically active subunit of cellulose synthase (Biofilm related)	96.96	1347 / 1347
BlaAMPH	AP012030	A weak beta-lactamase	97.24	1158 / 1158
c0426/upaB	AE014075	Autotransporter (AT) adhesin from UPEC strain CFT073	98.24	2337 / 2331
c0478/upaC	AE014075	Autotransporter (AT) adhesin from UPEC strain CFT073	99.93	2988 / 2988
c4485	NC_004431	UPEC-specific gene identified using CGH and in silico BSR analysis of ten UPEC and four fecal/commensal strains. doi: 10.1128/JB.01744-06	99.63	1092 / 1092
c4759	NC_004431	UPEC-specific gene identified using CGH and in silico BSR analysis of ten UPEC and four fecal/commensal strains. doi: 10.1128/JB.01744-06	99.15	1998 / 1998
cadA (lysine decarboxylase)	CP025573	Inducible lysine decarboxylase	99.02	2148 / 2148
cheW	CP027060	Chemotaxis protein	99.01	504 / 504
cheY	CP028306	Chemotaxis protein	98.97	390 / 390
ChuA	LT827011	Outer membrane hemin receptor	99.55	1984 / 1983
cirA	CP018206	Outer membrane receptor for colicins IA and IB	90.56	2002 / 1980
cirA	CP030337	Outer membrane receptor for colicins IA and IB	99.42	1026 / 1026
cjrA	GQ398086.1	TonB-dependent colicin J protein CjrA	100	918 / 918
cjrC	NC_011749.1	Outer membrane colicin Js receptor	100	2262 / 2262
copA	AE014075	Copper-exporting P-type ATPase	98.92	2505 / 2505
csgA	CP000247	curli fimbriae gene	100	459 / 459

csgB	CP000243	curli fimbriae gene	99.59	483 / 483
csgE	NC_002655	curli fimbriae gene	98.72	390 / 390
csgF	NZ_ANXX01000028	curli fimbriae gene	100	417 / 417
csgG	LT903847	curli fimbriae gene	99.76	834 / 834
CTX-M-15	KF055402	CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase	100	876 / 876
CTX-M-33	AY238472	CTX-M-33 extended-spectrum β -lactamase	99.89	908 / 908
cusA	NZ_NMMD01000001	Part of a cation efflux system that mediates resistance to copper and silver.	99.97	3144 / 3144
CvaA-colicin V secretion protein	GG773553	Involved, in conjunction with CvaB, in the secretion of colicin V.	98.55	1242 / 1242
dfrA17	NZ_MSJW02000186	Trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase DfrA17	100	474 / 474
DUF3987-domain protein gene	NQFM01000137	Protein of unknown function (DUF3987). A family of uncharacterized proteins found by clustering human gut metagenomic sequences.	99.74	1560 / 1560
fdeC/eaeh	CU928161	Putative attaching and effacing protein homolog	99.62	4251 / 4251
ecotin	CP025268	General inhibitor of pancreatic serine proteases	97.14	419 / 419
ecpA	BA000007	common pilus gene	98.47	588 / 588
ecpB	NZ_QOON01000045	common pilus gene	98.06	669 / 669
ecpD	CP019777	common pilus gene	99.76	1644 / 1644
ehaC/yfaL	NZ_CP023749	AIDA-I family autotransporter adhesin	99.92	3753 / 3753
elfC	CP021288	Outer membrane usher protein	99.81	2595 / 2595
entA	NC_008253	enterobactin biosynthesis and transportation	99.6	747 / 747
entE	NZ_ANXX01000023	enterobactin biosynthesis and transportation	100	1611 / 1611
entH	CP027060	enterobactin biosynthesis and transportation	94.93	414 / 414
EvfA	JN837480	Hcp-like protein, part of T6SS gene cluster	99.58	480 / 480
EvfQ	JN837480	Putative T6SS gene of the evf cluster (E. coli virulence factors)	99.95	1842 / 1842
EvfW	JN837480	Belongs to the VgrG protein family	98.59	1984 / 1983
fdeC (intimin-like protein)	CP019777	FdeC (factor adherence E. coli) able to mediate E. coli adhesion to mammalian cells and extracellular matrix.	99.53	4251 / 4251

fecA	NC_011751	Outer membrane ferri-siderophore receptor, an E. coli 83972 isolate during deliberate bladder colonization lost genes for the aerobactin siderophore system, which is immunogenic, while expression of the ferric citrate receptor FecA was upregulated	99.78	2325 / 2325
feoB	CP019777	Fe(2+) transporter	98.62	2322 / 2322
fepA	CP000468	Ferrienterobactin receptor	99.54	1947 / 1947
fepB	AE014075	Ferrienterobactin-binding periplasmic protein	99.79	957 / 957
fepC	AE014075	Predicted ATP-binding subunit of a ferric enterobactin ABC transporter	99.39	816 / 816
fepD	AE014075	Ferric enterobactin (Enterochelin) transport	99.51	1017 / 1017
fepE	AE014075	Ferric Enterobactin transport protein	95.15	1134 / 1134
fepG	AE014075	Ferric enterobactin transport system permease protein	99.8	993 / 993
fes	CP027060	Enterochelin esterase	96.36	1125 / 1125
EcSMS35_3916	NC_010498	Fic family protein, EcSMS35_3916, positive in EPEC1 absent from EPEC2	99.85	1296 / 1296
fiu	CP027060	Catecholate siderophore receptor	96.71	2283 / 2283
flgD	CP027060	Basal-body rod modification protein	96.55	696 / 696
flgM	CP028192	Negative regulator of flagellin synthesis	98.3	294 / 294
fmlA (F9-fimbriae)	BA000007	F9 Fimbriae of Uropathogenic Escherichia coli Are Expressed at Low Temperature. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093177	96.81	564 / 564
fsr (Fosmidomycin resistance)	CP027060	Fosmidomycin resistance protein	97.95	1221 / 1221
fyuA	CP016828	The ferric yersiniabactin uptake receptor	99.75	2022 / 2022
gipA	NC_017634	GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated Escherichia Coli. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000609	99.91	1131 / 1131
gspD (E. coli)	NC_011750	Type II secretion system protein	100	2061 / 2061
hbp	CP009072	Hemoglobin-binding protease hbp autotransporter	98.45	4131 / 4131
Hemolysin-III	CP003034	inner membrane protein, hemolysin III family gene	99.57	690 / 690
hmuR	AJ586887	Putative outer membrane heme/hemoglobin receptor	97.26	1971 / 1971

hutX	NZ_CP023820	Cytoplasmic Heme-Binding Protein, heme utilization cytosolic carrier protein HutX	95.35	495 / 495
ibeB	AF094824	Invasion protein	98.12	1383 / 1383
ibeC	CP019777	Invasion protein	99.77	1734 / 1734
iha	CP003297	The IrgA homologue adhesin Iha is an Escherichia coli virulence factor in murine urinary tract infection.	99.52	2091 / 2091
iia	NC_025198	Colicin 1A immunity protein	99.7	336 / 336
DPQ29_RS14535	NZ_CP030111.1	Inverse autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein. These genes are often associated with virulence		100 3552 / 3552
pEC14_8	NC_013175	high affinity Fe+2 binding protein permease component	99.95	1941 / 1941
irp1	CU928163	Yersiniabactin biosynthetic protein, part of the HPI island.	99.28	9493 / 9492
irp2	CP006834	Yersiniabactin biosynthetic protein. The irp2 and fyuA genes in High Pathogenicity Islands are involved in the pathogenesis of infections caused by avian pathogenic Escherichia coli (APEC)	98.85	6108 / 6108
IS26-transposase	AP018456	IS26 transposase from Escherichia coli O25b:H4-ST131 plasmid		100 705 / 705
iucA	CU928163	Part of Aerobactin siderophore	99.44	1788 / 1788
iucB	AE014075	Part of Aerobactin siderophore	99.4	668 / 668
iucC	NC_017646	Part of Aerobactin siderophore		100 1743 / 1743
iucD	CP001232	Part of Aerobactin siderophore	99.84	1278 / 1278
iutA	CP011134	Ferric aerobactin receptor	99.95	2202 / 2202
ivy	CP025268	Inhibitor of vertebrate lysozyme	98.1	474 / 474
kpsC	AWDO01000031	Capsule polysaccharide export protein	96.75	2028 / 2028
kpsD	NC_007946	Capsule transport protein	99.05	1677 / 1677
kpsE	NC_017646	Involved in capsule polysaccharide export		100 1149 / 1149
kpsMII (NU14)	CP019777	E. coli Group 2 Polysaccharide Capsule Synthesis Gene	99.88	837 / 837
kpsS	NC_017646	Capsule polysaccharide export protein		100 1206 / 1206
lpfA	NZ_ANXX01000081	long polar fimbriae gene		100 525 / 525
lpfC	NZ_CP030111	long polar fimbriae usher gene		100 2577 / 2577

lpfE	NZ_ADJX01000009	long polar fimbriae gene	99.81	531 / 531
malX	AF003742	Pathogenicity Island Marker	98.61	1581 / 1581
matD	HM102365	Predicted outer membrane protein associated with E. coli common pilus (ECP) formation in pathogenic E. coli strains	99.72	2526 / 2526
MBL-fold metallo-hydrolase	CP023388	Candidate phylogroup B2 specific marker	99.9	1044 / 1044
mdfA	NZ_AP021963	Multidrug transporter	100	1233 / 1233
mdtH	CP019777	Multidrug resistance protein	99.42	1209 / 1209
mkaC	CYAE01000010	LysR family transcriptional regulator. The intracellular growth and virulence of Salmonella serovar Typhimurium for mice is dependent on a plasmid-borne gene cluster termed mka.	96.89	579 / 579
mphA	DQ445270	Macrolide resistance gene	99.78	906 / 906
neuB	NC_011750	Sialic acid synthase, K1-capsule	100	1041 / 1041
neuC	CP003034	UDP N-Acetylglucosamine 2-Epimerase, K1-capsule	100	1176 / 1176
nika	CU928163	Nickel-binding periplasmic protein	98.41	1575 / 1575
nlpD-lipoprotein	NC_017634	NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in Escherichia coli	99.91	1140 / 1140
ompA	NC_008253	Outer membrane protein A	99.9	1041 / 1041
papA	AP018784	P-fimbriae major subunit	100	270 / 270
papC-family (ECP_RS12110)	NC_008253	papC-family usher protein gene	99.55	2649 / 2649
papI	CU928164	pap operon regulatory protein gene	99.57	234 / 234
papX	NC_022648	putative regulator protein	99.82	552 / 552
pduC	CP030111	PduC (propanediol dehydratase) was enriched in CD-derived AIEC. Inflamm Bowel Dis. 2014 Nov;20(11):1919-32. doi: 10.1097/MIB.0000000000000183.	100	1665 / 1665
pemK	NC_022885	PemK is a growth inhibitor toxin in E. coli known to bind to the promoter region of the Pem operon	100	333 / 333

ppk	CP025268	Polyphosphate kinase	98.84	2067 / 2067
ratA-like (WIS_RS11410)	NZ_ANXX01000068	Gene encoding a RatA-like protein	100	8052 / 8052
recG	CP019455	RecG catalyzes reversal of stalled replication forks in response to replication stress in bacteria.	96.45	2082 / 2082
rpiR	NC_011750	DNA-binding transcriptional repressor RpiR, involved in rpiB and als operon repression, positive. Positive in EPEC absent in EHEC	99.55	891 / 891
sapA	NC_011751	Antimicrobial peptide ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli UMN026]	96.9	1644 / 1644
sat	HG941718	Secreted autotransporter toxin (Sat)	99.79	3889 / 3888
sbmC (DNA Gyrase inhibitor)	CP027060	sbmC, a stationary-phase induced SOS Escherichia coli gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17	97.05	474 / 474
senB/TieB	AP018458	Enterotoxin TieB protein gene	100	1275 / 1275
shiA	NC_011751	shiA, suppress the host inflammatory response	98.71	1317 / 1317
sinH	NIRV01000017	Salmonella virulence factor SinH (also known as SivH)	100	2208 / 2208
sitA	ADUG01000044	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	99.23	915 / 915
sitB	NC_017659	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	98.67	825 / 825
sitC	CP000836	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	98.95	858 / 858
sitD	UGFR01000001	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	97.09	858 / 858
Slp-lipoprotein	NZ_NLYY01000004	The Escherichia coli O157:H7 carbon starvation-inducible lipoprotein Slp contributes to initial adherence in vitro via the human polymeric immunoglobulin receptor. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216791	99.12	567 / 567
stcD (Fimbrial adhesin)	NC_018658	Putative fimbrial-like adhesin protein gene	97.68	1035 / 1035
stfD	LOFW01000008	Fimbrial protein, Associated with systemic and fatal infection in inbred mice	98.01	753 / 753
sugE	CP018976	Quaternary ammonium compound-resistance SugE	98.43	318 / 318

tagH (Type-6 secretion gene)	NC_017626	Type VI secretion system protein	98.85	1389 / 1389
tehA	CP027060	Tellurite resistance protein TehA	99.19	993 / 993
tehB	CP027060	Tellurite resistance protein TehB	98.32	594 / 594
terC	NC_000913	Tellurite resistance protein TerC		100 432 / 432
OA49_26895	JSXL01000209	tetratricopeptide repeat family protein		91 1046 / 1044
tnpA iSEcp1-transposase	NC_014384	Typically associated with CMY-type beta-lactamases		100 1266 / 1266
tonB	CP027060	TonB is a component of the energy transducing Ton system	97.36	720 / 720
tssA (Type-6 secretion gene)	NZ_QOZF01000017	Type VI secretion system protein TssA	99.93	1443 / 1443
tssH (Type-6 secretion gene)	NZ_CP030111	Type VI secretion system ATPase		100 2763 / 2763
tssM (Type-6 secretion gene)	NZ_CP041620	Type VI secretion system membrane subunit TssM		100 3528 / 3528
usp	CU651637	Uropathogenic specific protein gene	99.55	1782 / 1782
vagC	GU371928	Toxin–antitoxin (TA) system. VagCD, was found to be encoded on a virulence plasmid of Salmonella enterica serovar Dublin in 1992		100 405 / 405
vagD	DQ381420	Toxin–antitoxin (TA) system. VagCD, was found to be encoded on a virulence plasmid of Salmonella enterica serovar Dublin in 1992	97.09	760 / 756
vapA	CP030111	Virulence associated gene		100 453 / 453
vapC	NC_022651	Upon release from the stable complex formed with its antitoxin VapB, the toxin VapC (MvpT) of the Gram-negative pathogen Shigella flexneri is capable of globally down-regulating translation by specifically cleaving initiator tRNA(fMet) in the anticodon region.		100 417 / 417
vat	KR094926	vacuolating autotransporter toxin	97.39	5652 / 5631
vgrG	HAI8980085	Valine-glycine repeat protein G (VgrG) is an important component of a functional T6SS	99.95	1959 / 1959

vgrG	NZ_BFN01000341	Valine-glycine repeat protein G (VgrG) is an important component of a functional T6SS	99.64	1965 / 1965
YadA-like	NZ_CP030111	Gene encoding a YadA-like family adhesin	100	4596 / 4596
ybbP (putative ABC-transporter permease)	NC_011751	YbbP is the predicted membrane-spanning subunit of a putative ATP-binding cassette (ABC) exporter complex	96.77	2416 / 2415
ybtA	CP028714	Yersiniabactin transcriptional regulator	99.58	960 / 960
ybtQ	CP003034	Yersiniabactin-iron ABC transporter permease ATP-binding protein YbtQ	99.83	1803 / 1803
ybtS	NC_007946	Yersiniabactin biosynthesis salicylate synthase	99.69	1305 / 1305
ybtX	CP003034	Yersiniabactin-iron transporter permease YbtX	99.69	1281 / 1281
ycho (Autotransporter adhesin)	NC_009801	ycho plays a role in the pathogenicity of APEC strain SEPT362. The ycho gene is highly expressed in the lungs and spleen during in vivo infection assays by strain SEPT362. doi: 10.1186/s12866-016-0654-2	97.78	1395 / 1395
ydeR	CU928163	Two genes of the F9 operon, ydeQ and ydeR, were increased 2.2-fold with bile treatment. doi: 10.1371/journal.pone.0074647	98.21	504 / 504
yecl (ferritin-like protein 2)	AE014075	Gene encoding a ferritin-like protein (FtnB). Ferritin Mutants of Escherichia coli Are Iron Deficient and Growth Impaired	99.8	504 / 504
yfcl	NC_011750	Putative transposase	94.24	906 / 903
yfcP	NZ_CP030111	Putative outer membrane usher protein YfcU; Part of the yfcOPQRSUV fimbrial operon. Could contribute to adhesion to various surfaces in specific environmental niches. Increases adhesion to eukaryotic T24 bladder epithelial cells in the absence of fim genes	100	528 / 528
YfcQ	CYEA01000003	fimbrial-like protein, locus_tag="ERS139232_00678"	97.92	480 / 480
yfcV	NZ_AAJU02000033	Any two of the genes chuA (heme receptor), yfcV (YfC fimbria) or vat (vacuolating autotransporter protein), when detected along with the gene fyuA (yersiniabactin siderophore receptor), can be used to differentiate UPEC strains from commensal and DEC strains	100	567 / 567

yfdV (transporter gene)	NC_011750	Predicted transporter. The EvgA acid response regulator activates transcription of the Escherichia coli yfdXWUVE operon	98.73	945 / 945
ygfI	CU928163	regulatory RNA gene	96.88	897 / 897
yghJ/SsIE	NZ_ANYH01000066	YghJ, the secreted metalloprotease of pathogenic E. coli induces hemorrhagic fluid accumulation in mouse ileal loop, putative surface lipoprotein with peptidase domain	100	4557 / 4557
yjaA	CP021288	YjaA is involved in the cellular response to hydrogen peroxide and acid stress	100	384 / 384
yjch	NC_000913	APEC acs-yjch-actP operon, encoding acetate assimilation system, presented the host-induced transcription during its proliferation in macrophages.	96.51	315 / 315
YqgB (putative virulence promoting factor)	CP023258	Gene of unknown class or function significantly induced by AI-2 quorum signaling	100	147 / 147
zntA	AP010958	Zinc/cadmium/lead-transporting P-type ATPase.	95.04	2199 / 2199
znuA	CP027060	Protein associated with the high-affinity ATP-binding cassette ZnuABC transporter	97.96	937 / 933
ZnuB	BA000007	Protein associated with the high-affinity ATP-binding cassette ZnuABC transporter	97.58	786 / 786
znuC	NC_000913	Protein associated with the high-affinity ATP-binding cassette ZnuABC transporter	98.02	756 / 756
zupT	CP027060	Zinc transporter	99.87	774 / 774

Vedlegg D

Tabell 1: Viser MIC verdier til bakterieisolatene, mot Ampicillin, Cefepim, Cefotaxim, Imipenem og Meropenem. Resultatet er vist som gjennomsnittet av 2 plater.

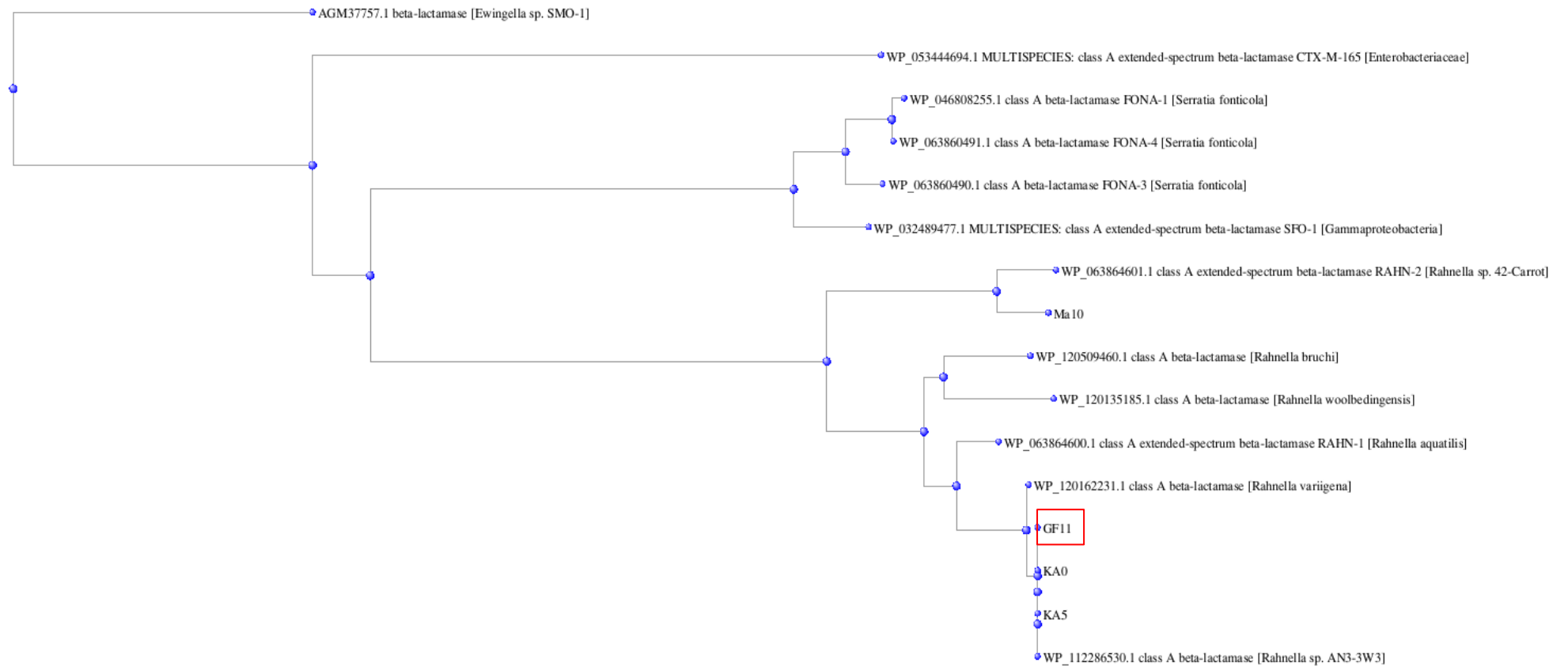
Prøve	Antibiotika (µg/ml)				
	Ampicillin	Cefepim	Cefotaxim	Imipenem	Meropenem
A1	R*	-	R*	1,5	2
A2	R*	-	R*	1,5	0,5
A3	R*	-	R*	1,5	3
A4	R*	-	R*	1,5	1,5
A5	R*	-	R*	0,5	2
A6	0,32	0,64	0,38	3	1,5
A7	0,64	0,75	0,25	0,012	**
A9	0,064	-	1,5	0,032	**
B1	R*	0,5	R*	3	1,5
B2	R*	0,25	**	0,25	0,047
C1	48	-	12	0,38	1,5
D1	R*	2	R*	0,38	1,5
D3	R*	1,5	R*	0,38	0,125
D4	1	2	R*	1	1
D5	R*	0,25	2	0,38	0,047
D9	0,016	0,5	0,25	0,016	**
D10	0,32	0,75	0,21	0,023	**
F1	R*	-	R*	R*	6
F2	R*	-	R*	R*	**
F5	R*	-	3	1	0,19
F6	16	-	0,64	0,25	0,032
F8	R*	-	0,125	0,125	0,012
F9	6	-	0,25	0,094	0,125
F10	64	-	3	0,38	0,032
F11	96	-	3	0,25	0,23
F12	48	-	R*	0,5	0
F13	0,023	-	0,5	0,016	0,023
F14	R*	-	2	0,25	0,023
G1	R*	-	0,75	1,5	1
G3	R*	-	R*	2	0,75
G4	R*	0,19	R*	1	0,38
G5	R*	2	R*	1	0,5
G6	0,032	-	0,64	0,004	**
H1	32	0,19	3	0,25	0,016
H2	0,023	-	0,2	0,047	**

R*: Fullstendig vekst på hele skålen

**Ingen vekst

- Ikke testet

Vedlegg E



Figur 1: Viser fylogenetisk tre for prøve F11 (GF11, markert i rødt), for nærslektede gener. Blant annet sammenliknet med masterstudent Kayleigh Sharon Robson Moe sine prøver (KA0 og KA5).

Vedlegg E

```

Query 1  MNPISEAEAVVMEVLWQQAPRGADEVVAALAHRDWAEPTIKTLLNRLLTKGAIAAEREGR 60
Sbjct 1  MNPISEAEAVVMEVLWQQAPRGADEVVAALAHRDWAEPTIKTLLNRLLTKGAIAAEREGR 60

Query 61  RYLVRPLLQREAWVAAQSQDFLGRVFEGRVAPLVAHFSEGRQLSAQDIAELKKLIQELDH 120
Sbjct 61  RYLVRPLLQREAWVAAQSQDFLGRVFEGRVAPLVAHFSEGRQLSAQDIAELKKLIQELDH 120

Query 121  E 121
Sbjct 121  E 121

```

Figur 2: Sekvensen av genet *BlaL1* fra prøve F2 med 100% sekvenslikhet av tidligere funn ved bruk av NCIBI pBLAST

```

Query 1  MMKNTLRKTVLMAAAVVPMLAFSAPSWAQATKMTSVQQQLTALEKESGGRLGVMLIDTA 60
Sbjct 1  MMKNTLRKTVLMAAAVVPMLAFSAPSWAQATKMTSVQQQLTALEKESGGRLGVMLIDTA 60

Query 61  DNSQIAYRADERFAMCSTSKFMAASAILKESEVKKNLLTQHVGLKKSIDLVNYNPITEKHL 120
Sbjct 61  DNSQIAYRADERFAMCSTSKFMAASAILKESEVKKNLLTQHVGLKKSIDLVNYNPITEKHL 120

Query 121  NEGMTIGELAAAALQYSDNTAMNKLEHLGGPHKVTDYARTLGDNTFRLDRTEPTLNTAI 180
Sbjct 121  NEGMTIGELAAAALQYSDNTAMNKLEHLGGPHKVTDYARTLGDNTFRLDRTEPTLNTAI 180

Query 181  PGDERD'TTSPRAMALSLQHATLGSALAEQRAQLVEWMKGNTTGAMSIRAGLPATWIVGD 240
Sbjct 181  PGDERD'TTSPRAMALSLQHATLGSALAEQRAQLVEWMKGNTTGAMSIRAGLPATWIVGD 240

Query 241  KTGSGDYGTTNDIAVIWPENKAPLVLVTYFTQPEKDAKSRRDVLASA AKIVTQGY 295
Sbjct 241  KTGSGDYGTTNDIAVIWPENKAPLVLVTYFTQPEKDAKSRRDVLASA AKIVTQGY 295

```

Figur 3: Sekvensen av genet klasse *blaRAHN*-, en A β -laktamase fra prøve F11, med 100% sekvenslikhet av tidligere funn hos *Rahnella*, ved bruk av NCIBI pBLAST.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway