



Forord

Denne oppgaven ble utført som et avsluttende prosjekt i mastergrads-studie i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Utførelsen av den praktiske delen av studien ble fordelt mellom Veterinærinstituttet i Oslo (Seksjon for bakteriologi), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) (Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap) og Folkehelseinstituttet (FHI) i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke Marianne Sunde (Veterinærinstituttet og FHI) og Knut Rudi (NMBU) som har vært gode veiledere, og hjulpet meg når jeg har måttet trenge det. Takk for konstruktive tilbakemeldinger, tålmodighet og stor entusiasme. En stor takk for muligheten jeg har fått til en spennende oppgave og for å bli introdusert til tre forskjellige laboratorier.

Videre ønsker jeg å takke Solveig Sølvørød, Jannicke Slettemeås, Heidi Solheim og Aina Barstad ved Veterinærinstituttet som alltid tok seg tid til å hjelpe meg med innføring i nye metoder, uansett hvor hektisk de hadde det. Takk til Thorbjørn Bruvik som tålmodig viste meg rundt på Folkehelseinstituttet. En takk til Jane Ludvigsen på NMBU for hjelp under sekvenseringen og svar på utallige spørsmål, alltid like blid! En stor takk til Davide Porcellato på NMBU for all tid brukt til hjelp med databehandling av sekvensene.

En ekstra takk til Inger Helene Solheim og Sofia Larsen for teknisk støtte og godt samarbeid gjennom hele studietiden.

Jeg er veldig glad for at jeg har fått denne muligheten til å møte så mange ulike og inspirerende mennesker.

Ås, 13. mai 2015

Silje Nøstvedt Ramstad

Sammendrag

Antibakterielle midler bidro til en medisinsk revolusjon da de ble lansert fordi de gjorde det enkelt å behandle sykdommer som tidligere var vanskelige å behandle. Den utstrakte bruken av antibiotika har vært med på å skape et økt seleksjonspress hos bakterier, noe som har økt forekomsten av resistente bakterier. Overføring av genetiske elementer som koder for antibiotikaresistens har mye av skylden for denne spredningen. Den horisontale overføringen kan skje ved konjugasjon, transduksjon eller transformasjon og skjer ofte ved hjelp av elementer som plasmider, transposoner eller integroner. Denne utvekslingen kan føre til nye kombinasjoner og versjoner av resistens-replikoner.

I denne studien ble det sett på antibiotikaresistent *Escherichia coli* funnet hos villrein i Norge. Hensikten med studien var å undersøke og karakterisere isolatene og deres resistensgener. Til sammen 42 stammer ble nærmere undersøkt, 27 antibiotikaresistente og 15 ikke-resistente. Stammene ble undersøkt i forhold til resistens ved lappediffusjon og MIC-test (minste hemmende konsentrasjon) og undersøkt i forhold til overførbarhet ved konjugasjonsforsøk. Stammene ble også sekvensert ved Illumina helgenom-sekvensering og data ble undersøkt nærmere med hjelp av blant annet MLST-finder, ResFinder og RAST. BLAST ble brukt for å undersøke homologi og fylogrupper ble bestemt ved multipleks PCR.

I resultatene kom det frem at flere av stammene var resistente mot flere antimikrobielle midler. De fleste stammene hadde høye MIC-verdier for antibiotika de var resistente mot og omtrent halvparten av stammene overførte resistens ved konjugasjonsforsøk. Mange av sekvensene med resistensgener var svært like. Det ble observert høy diversitet mellom stammene og det ble funnet *E. coli* innenfor alle fylogruppene det ble testet for. Sekvensdata viste blant annet at det fantes likende resistens-replikons i andre isolater.

Informasjonen samlet inn i denne studien viser at antibiotikaresistens funnet hos *E. coli* i villrein i Norge kan overføres til andre stammer, at stammene har multiresistens-replikoner og at det er funnet liknende sekvenser i bakterier isolert fra blant annet mennesker, fugl og bjørn. Dette understreker det faktumet at resistens er svært utbredt og det ofte er de samme elementene som spre den. Antibiotikaresistens er et økende problem i dagens samfunn og setter krav til stadig utvikling av nye antimikrobielle midler. Kartlegging av antibiotikaresistens i ville dyr kan bidra med å bedre forstå spredningsdynamikken og til å få en bredere forståelse av menneskers påvirkning på dette området. Økt kunnskap om resistens i naturen kan også bidra til viten om hvordan vi bedre kan bekjempe dette problemet.

Abstract

Antibiotics revolutionized the medical industry when it was introduced due to its ability to cure infections that previously were difficult to treat. The increased use of antimicrobial agents has increased the selection pressure that selects for resistant bacteria. This has led to higher prevalence of resistant infectious bacteria, especially in clinical environments. Horizontal gene transfer (HGT) has made this possible by mechanisms as conjugation, transduction and transformation. Mobile genetic elements, such as plasmids, integrons and transposons, are important for distribution of the resistance genes. Exchange of mobile genetic elements that contain antimicrobial resistance can contribute to the occurrence of new antimicrobial resistance replicons.

Antimicrobial resistant *Escherichia coli* found in wild reindeer in Norway was examined in this study. The purpose of the study was to investigate the isolates and their resistance genes. Forty-two isolates were included in the study; 27 resistant and 15 non-resistant. Disc dilution and MIC (minimum inhibitory concentration) were used to assess the phenotypic resistance pattern of the isolates. Illumina whole-genome sequencing was used to obtain sequence data, and several online tools were used to investigate the genotypic resistance. Phylogenetic groups were determined by multiplex PCR and MLSTs were determined using MLST-Finder. Conjugation was also tested for through a conjugation test.

The results showed that multiple isolates were resistant to more than one antimicrobial agent. Most of the isolates had high MIC-values and about 50 % transferred resistance by conjugation test. Multiple sequences containing resistance genes were similar in construction. A high diversity of the isolates was observed, and *E. coli* belonging to group A, B1, B2 and D was found.

The information obtained in this study showed that there is antimicrobial resistant *E. coli* in wild reindeer in Norway, containing known resistance genes. Furthermore, the multi-resistant replicons and similar sequences discovered in the isolates have previously been identified in isolates obtained from human, bear and bird. This supports the fact that resistance genes are widespread. Antimicrobial resistance is an increasing problem in the world today and more information about the dissemination is much needed. Mapping of the antimicrobial resistance in wild animals can give new insight to the dynamics of dissemination and give a wider understanding of how humans have influenced it. Increased knowledge on susceptibility in nature can contribute to better insights on how we can handle this development.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1 Introduksjon	1
1.1 <i>Villrein</i>	1
1.2 <i>Antimikrobielle midler</i>	2
1.3 <i>Antimikrobielle midlers virkemåter</i>	2
1.3.1 <i>Inhibering av cellevegg syntese</i>	2
1.3.2 <i>Inhibering av proteinsyntese</i>	3
1.3.3 <i>Inhibering av nukleinsyresyntese</i>	3
1.3.4 <i>Inhibering av metabolske enzymer</i>	3
1.4 <i>Antibiotikaresistens</i>	4
1.5 <i>Fire mekanismer for antibiotikaresistens</i>	4
1.5.1 <i>Inaktivering av det antimikrobielle middelet</i>	4
1.5.2 <i>Modifisering/erstatning av målsetet</i>	5
1.5.3 <i>Effluks</i>	5
1.5.4 <i>Redusert opptak</i>	5
1.6 <i>Mekanismer for overføring av genetiske elementer</i>	5
1.6.1 <i>Konjugasjon</i>	5
1.6.2 <i>Transformasjon</i>	6
1.6.3 <i>Transduksjon</i>	6
1.7 <i>Mobile genetiske elementer</i>	6
1.7.1 <i>Plasmider</i>	6
1.7.2 <i>Transposoner</i>	7
1.7.3 <i>Integroner</i>	8
1.8 <i>Spredning av antibiotikaresistens</i>	9
1.9 <i>Helgenom-sekvensering</i>	10
1.9.1 <i>Første-generasjons sekvensering og shotgun-metoden</i>	10
1.9.2 <i>Andre-generasjons sekvensering og Illumina</i>	11
1.10 <i>Målsetting for oppgaven</i>	12
2 Materialer og metoder	13
2.1 <i>Escherichia coli stammer</i>	13
2.2 <i>Testing av antibiotikaresistens</i>	14
2.2.1 <i>Antibiotikaresistensbestemmelse ved bruk av lappediffusjon</i>	14
2.2.2 <i>Bestemmelse av minste hemmende konsentrasjon (MIC)</i>	14
2.3 <i>Undersøkelse av overførbar resistens ved konjugeringsforsøk</i>	15
2.4 <i>Isolering av DNA</i>	16
2.4.1 <i>Isolering av DNA ved koking</i>	16
2.4.2 <i>Ekstrahering av DNA ved bruk av kit fra Promega</i>	16
2.5 <i>Polymerase kjede reaksjon (PCR)</i>	16
2.5.1 <i>Multipleks PCR for fylotyping av E. coli</i>	16
2.5.2 <i>Kvantitativ PCR (qPCR)</i>	17
2.6 <i>Gelelektroforese</i>	17
2.6.1 <i>Fylotypisk bestemmelse</i>	17
2.6.2 <i>Undersøkelse av produkt fra DNA-ekstrahering</i>	18
2.6.3 <i>Kvalitetskontroll etter steg 3 i sekvenseringsforberedelsene</i>	18
2.7 <i>Helgenom-sekvensering og forberedelser</i>	18
2.7.1 <i>Qubit</i>	18
2.7.2 <i>Ampure</i>	18

2.7.3	Fortynning av DNA	18
2.7.4	Illumina helgenom sekvensering	18
2.8	<i>Dataanalyse</i>	19
2.8.1	Sammensetting av genomet	19
2.8.2	Pangenom-tre	19
2.8.3	MLST- Multi Locus Sequence Typing	20
2.8.4	Undersøkelse av resistensgener	20
2.8.5	Undersøkelse av plasmider	20
2.8.6	Annotering	20
2.8.7	BLAST – Basic Local Alignment Search Tool	20
3	Resultater	21
3.1	<i>Klassifisering og typing</i>	21
3.1.1	Fylootyping	21
3.1.2	MLST – Multi Locus Sekvens Typing	23
3.2	<i>Fenotype</i>	25
3.2.1	Fenotypisk resistens	25
3.2.2	Konjugasjonsforsøk	26
3.3	<i>Genotype</i>	28
3.3.1	ResFinder	28
3.3.2	PlasmidFinder	29
3.4	<i>Undersøkelse av resistensgener og genetiske elementer</i>	30
3.4.1	Stammer med <i>strA</i> og <i>strB</i> plassert på samme kontig	31
3.4.2	Stammer med <i>strA</i> , <i>strB</i> og <i>sul2</i> plassert på samme kontig	31
3.4.3	Sekvenser med <i>drfA5</i>	33
3.4.4	Multiresistens-kontig fra stamme 9	34
4	Diskusjon	36
4.1	<i>Klassifisering, fylootyping og MLS-typing</i>	36
4.2	<i>Fenotypisk og genotypisk resistens</i>	36
4.3	<i>Plasmider og konjugering</i>	38
4.4	<i>Nærmere undersøkelse av genetisk sammensetning</i>	39
4.4.1	<i>strA - strB – gener på samme kontig</i>	39
4.4.2	<i>strA-strB og sul2 –gener på samme kontig</i>	40
4.4.3	<i>Sekvenser med DfrA5-gen</i>	41
4.4.4	<i>Multiresistens hos stamme 9</i>	42
5	Konklusjon	43
5.1	<i>Forslag til videre forskning</i>	44
6	Kilder	45
Vedlegg		i
<i>Vedlegg 1:</i>		<i>i</i>
<i>Vedlegg 2:</i>		<i>iii</i>
<i>Vedlegg 3:</i>		<i>v</i>
<i>Vedlegg 4:</i>		<i>vi</i>

1 Introduksjon

Spredning og utviklingen av antibiotikaresistens er et stadig økende problem. Den utstrakte bruken av antibakterielle midler har ført til at færre typer antibakterielle midler virker mot sykdommer de tidligere kurerte (Madsen 2008). Det kliniske aspektet av spredning er bredt utforsket og det er godt kjent hva slike spredninger kan føre til i kliniske miljø og befolkningen generelt. Det er derimot ikke like godt undersøkt hva spredningen kan ha ført til i naturen. I denne oppgaven blir det sett på antibiotikaresistente *E. coli* isolert fra villrein. Villrein lever i de mer urørte områdene av Norge og vil være en god representant for undersøkelse av spredning av antibiotikaresistens i naturen.

1.1 Villrein

Reinsdyr (*Rangifer tarandus tarandus*) er et hjortedyr som lever i de nordlige delene av verden. Den lever av lav, gress og buskvekster og er et nomadedyr som vandrer rundt på snaufjellet og i skoger (<http://www.villrein.no/fakta-om-villrein/> 02.03.15). I Norge finnes det 24 villreinområder, blant annet Rondane, Nordfjella og Forollhogna som ligger i de sørlige delene av Norge. Svalbard er en øygruppe helt nord i Norge og naturen her har liten grad av direkte menneskelig påvirkning (<http://www.villrein.no/om-villreinomrdene/> 02.02.15). Villrein råder over store områder og er ikke i direkte kontakt med mennesker. Villrein på Svalbard er nesten helt urørt av direkte menneskelig aktivitet, noe som gjør dem til spennende forskningsobjekter (<http://www.villrein.no/svalbard/> 02.03.15).

Veterinærinstituttet hadde i 2003 en undersøkelse sammen med Helseovervåkningsprogrammet for hjortevilt (HOP) som fokuserte på helsen til villrein i Forollhogna. I den sammenheng ble villreinen undersøkt for antibiotikaresistent *Escherichia coli*. Det ble funnet *E. coli* som var resistent ovenfor streptomycin, oxytetracyklin og sulfametoxazole. Det ble også funnet høyere prosentandel resistent *E. coli* i villrein enn i sau og kveg det samme året (NORM/NORM-VET 2003). Norge har en ganske lav forekomst av antimikrobiell resistens sett i forhold til andre land, men med økt bruk av antimikrobielle midler sammen med reise og import fra andre land kan dette endres (Bjørnholdt et al. 2014). Etersom bakterier overføres lett mellom mennesker, dyr og miljøet, kan spredning av antibiotikaresistens gi store konsekvenser (Bjørnholdt et al. 2014).

1.2 Antimikrobielle midler

Antimikrobielle midler har som hensikt å hemme veksten av patogene organismer uten å skade verten. De kan være både naturlig og syntetisk produserte. Antibiotika er betegnelsen på antimikrobielle midler produsert av mikroorganismer (Willey et al. 2009). De kan virke baktericid eller bakteriostatisk. Antimikrobielle midler som virker baktericid dreper bakterien, mens de som virker bakteriostatisk hemmer vekst av bakterien. Denne inndelingen fungerer ikke helt i praksis, men den brukes likevel. (Pankey og Sabath 2004).

I 1928 oppdaget Alexander Flemming antibiotika i form av penicillin produsert av muggsoppen *Penicillin notatum* (Joklik 1996). Soppen hadde ved en tilfældighet kontaminert en skål med stafylokokker og skapt soner med tilsynelatende lyserte bakterieceller (Joklik 1996). I 1940 fortsatte Howard Florey og Ernst Chain arbeidet med å finne metoder for produksjon og rensing av penicillin og testet produktet på mus infisert med stafylokokker eller streptokokker (Willey et al. 2012). Ett år senere ble seks mennesker med alvorlige infeksjoner forårsaket av stafylokokker og streptokokker behandlet med penicillin. Fire av disse overlevde. Kort tid etter, i 1943, ble penicillinproduksjon hovedprioriteten til amerikanske legemiddelprodusenter (Joklik 1996).

Seks år senere (1944) oppdaget Schatz og Waksman streptomycin (Madsen 2008) etter screening av rundt 10 000 jordbakterier –og sopp (Willey et al. 2009). Oppdagelsen av streptomycin var svært viktig ettersom det var det første middelet som kunne kurere tuberkulose. Dette satte i gang mange forsøk på å finne flere antibiotika isolert fra jord. Mikroorganismer som produserte tetracyklin, neomycin, terramycin og kloramfenikol ble oppdaget i løpet av det neste tiåret (Willey et al. 2009). Oppdagelsen av antibiotika hadde en stor samfunnsmessig betydning ettersom til da dødelige sykdommer enkelt kunne kureres med antibiotika (Madsen 2008).

1.3 Antimikrobielle midlers virkemåter

Antimikrobielle midler kan virke på fire forskjellige måter: ved å inhibere proteinsyntese, celleveggsyntese, nukleinsyresyntese eller metabolske enzymer. (Willey et al. 2009)

1.3.1 Inhibering av cellevegg syntese

Penicilliner, cefalosporiner og carbapanemer er antimikrobielle midler som inhiberer cellevegg syntese. Midlene har ulike versjoner av beta-laktam-ringen som viktigste virkestoff. (Kohanski et al 2010, Willey et al. 2009). Beta-laktam har en ringformet struktur som likner D-alanyl-D-alanin (Willey et al. 2009). Beta-laktam binder seg til det aktive setet i

transpeptidase, der D-alanyl-D-alanin vanligvis fester seg (Kohanski et al. 2010) og hindrer krysslinkingen av peptidoglykanenheter (Kohanski et al. 2010, Willey et al. 2009). Dette gjør at bakterien ikke får opprettholdt eksisterende eller produsert ny cellevegg og vil trigge lysering gjennom en rekke reaksjoner (Kohanski et al 2010).

Det har etterhvert vist seg at beta-laktam ikke bare binder seg til transpeptidase, men også flere andre enzymer, kalt penicillin-bindende-enzymmer (Willey et al. 2009). Penicillin kan også trigge lysering på andre måter, som ved å aktivere bakteriens egne autolytiske enzymer (Willey et al. 2009).

1.3.2 Inhibering av proteinsyntese

Antibakterielle midler som aminoglykosider, tetrasykliner, makrolider og kloramfenikoler kan hemme eller stoppe cellevekst ved å binde seg til ribosomer eller andre deler av proteinsyntesen (Willey et al. 2009). Aminoglykosider er baktericide og forårsaker lesefeil av mRNA under proteinsyntese ved å binde seg til den lille ribosomale subenheten (30S). Streptomycin, neomycin og gentamicin er eksempler på aminoklykosider. (Willey et al. 2009).

Tetrasykliner binder seg også til den lille ribosomale subenheten (30S), men hindrer bindingen av molekyler til A-setet og de er kun bakteriostatiske (Willey et al. 2009).

Makrolider og kloramfenikoler binder begge til 23S rRNA på 50S ribosomale subenheten. Mens makrolider inhiberer peptidkjede-elongering under proteinsyntese, inhiberer kloramfenikoler peptidyl transferase reaksjonen. (Willey et al. 2009)

1.3.3 Inhibering av nukleinsyresyntese

Hemming av nukleinsyresyntese kan skje på to måter: inhibering av DNA polymerase og DNA helicase eller inhibering av RNA polymerase. Kinoloner er et eksempel på antimikrobielle midler som hemmer bakteriell DNA gyrase og topoisomerase II. De er baktericide og kan brukes til behandling av et vidt spektrum av bakterier. Nalidixinsyre og ciprofloksasin er eksempler på kinoloner. (Willey et al. 2009).

1.3.4 Inhibering av metabolske enzymer

Antimetabolitter er stoffer som blokkerer metabolske veier ved å fungere som analoge til intermediater i metabolske veier og kompetitivt binde til enzymene. Disse stoffene er like nok til å kunne bindes til enzymene, men ulike nok til å stoppe prosessen. De er bredspektret, men bakteriostatiske ettersom de binder til enzymene reversibelt.

Sulfonamider og trimetoprim er eksempler på antimetabolitter og blir gjerne brukt sammen for en synergistisk effekt. Sulfonamider konkurrerer med *p*-aminobenzoic syre (PABA) om det aktive setet til et enzym (dihydropteroate syntase) som deltar i folsyre syntese. Bakterier kan ikke ta opp folsyre og må produsere dette selv. Folsyre er en viktig forløper til puriner og pyrimidiner. Trimetoprim binder til dihydrofolat-reduktase (DHFR) som også deltar i folsyre syntese. (Willey et al. 2009).

1.4 Antibiotikaresistens

Kort tid etter lanseringen av de første typene antibiotika ble resistens mot disse observert. Penicillinresistens ble oppdaget bare tre år etter lanseringen i 1943. Etter hvert som bruken av antibiotika økte og ble mer vanlig, økte også frekvensen av resistente bakterier (Palumbi 2001). Overforbruk, for lite bruk og feil bruk av antibiotika har ført til økt seleksjonspress som har gitt økt frekvens av antibiotikaresistens som resultat. (Davies og Davies 2010). Dette brer seg mellom mennesker, dyr og miljø via patogene og kommensale bakterier samt genetiske bevegelige elementer som plasmider. (Davies og Davies 2010).

Da antibiotika ble lansert hadde ingen regnet med at resistens skulle bli et så stort problem som det er i dag. Mange av overføringsmekanismene for gener mellom bakterier var enda ikke kjent, og utviklingen av resistens som følge av mutasjoner ville skje alt for sjeldent til at det skulle kunne utgjøre et problem. (Davies 1994). I dag har vi opparbeidet oss mye mer kunnskap og er nå klar over at resistensgener kan deles mellom ulike bakterier. En stamme regnes som resistent når en gitt konsentrasjon av et antibiotika som vanligvis ville inhibert bakterien ikke gir noen effekt (Rodloff et al. 2008).

1.5 Fire mekanismer for antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens kan deles inn i fire grupper: Enzymatisk inaktivisering av det antimikrobielle middelet, modifisering eller erstatning av målsetet for det antimikrobielle middelet, aktiv effluks og redusert opptak. (Willey et al. 2009)

1.5.1 Inaktivisering av det antimikrobielle middelet

Resistens mot betalaktamer, amfenikoler og aminoglykosider er som regel forårsaket av enzymer som inaktiverer det aktive stoffet i det antimikrobielle middelet (Davies 1994). Denne type resistens er, sammen med effluks-pumper og modifisering av målsetet, trolig flere hundre millioner år gammel og utviklet av jordbakterier i form av beskyttelse mot eget produsert eller andre bakteriers produksjon av antibiotika (Spratt 1994). Bakterien produserer enzymer som modifiserer og inaktiverer det antimikrobielle middelet, som for eksempel ved

betalaktam-resistens der bakterien produserer betalaktamase, et enzym som hydrolyserer betalaktamringen. (Davies 1994).

1.5.2 Modifisering/erstatning av målsetet

Ved å modifisere eller erstatte målsetet for det antimikrobielle middelet vil man få et protein som har mye lavere affinitet for det antimikrobielle middelet og det vil i mindre grad kunne hemmes. (Spratt 1994). Dette kan tilegnes ved at bakterien opptar nye gener for et nytt målenzym med lavere affinitet enn det originale enzymet, eller det kan skje ved mutasjon eller rekombinasjon av genet (kromosomalt) (Spratt 1994).

1.5.3 Effluks

Ved aktiv effluks bruker cellen energi på å aktivt pumpe ut det antimikrobielle middelet som kommer inn i cellen (Poole 2005). Disse effluks-pumpene medfører ofte multiresistens ettersom de er relativt uspesifikke med hvilke stoffer de pumper ut (Willey et al. 2009). Gener for tetrasyklin effluks-pumper er nesten alltid funnet på mobile genetiske elementer (Poole 2005).

1.5.4 Redusert opptak

Noen bakterier er naturlig resistente ved at de har en lite permeabel cellevegg (Nikaido 1994). Enkelte antimikrobielle midler, hydrofile, diffunderer inn i celleveggen via poriner som lett tar opp stoffer fra omgivelsene. Fosfolipidlag er gjennomtrengelig for hydrofobe molekyler. Ved å gjøre den ytre membranen mindre gjennomtrengelig kan noen gram-negative bakterier bli mindre følsomme ovenfor enkelte typer antimikrobielle midler. (Nikaido 1994).

1.6 Mekanismer for overføring av genetiske elementer

1.6.1 Konjugasjon

Konjugasjon er overføring av genetiske elementer mellom bakterier og krever nærkontakt. Nærkontakten opprettes via en pilus og type IV sekresjonssystem oppretter en åpning mellom cellene der konjugative plasmider, transposoner eller deler av kromosomet kan utveksles (Willey et al. 2009 og Frost et al. 2005). Gram-positive bakterier bruker ikke pili til å overføre konjugative transposoner og plasmider (Frost et al. 2005). Et område på det konjugative elementet, *oriT*, gjør det konjugativt og det er her prosessen med å separere og kopiere starter (Willey et al. 2009). Bakterien som overfører et plasmid eller annet genetisk

element, kalles donor, bakterien som mottar kalles resipient og resipienten er en transkonjugant etter den har mottatt det konjugerte plasmidet.

1.6.2 Transformasjon

Transformasjon er opptak av fritt DNA, enten som plasmid eller DNA-fragment. Det er kun noen få genera som er kjent som naturlig kompetente, i stand til å ta opp fritt DNA. For at en stamme skal være kompetent er den avhengig av flere forhold, som for eksempel å være i riktig stadium i vekstfasen. Noen bakterier produserer proteiner for å få til dette mens andre har selektive mekanismer som plukker opp DNA. *E. coli* er ikke kjent som naturlig kompetent, men kan bli det ved hjelp av for eksempel elektrosjokk eller eksponering for kalsiumklorid. (Willey et al. 2009).

1.6.3 Transduksjon

Overføring av prokaryotisk DNA mellom bakterier med virus som vektor er også kjent som transduksjon. Ved feil kan virus ta med seg deler av verts-DNA og overføre det til en mottakercelle istedenfor sitt eget DNA. (Willey et al. 2009). Transduksjon kan skje uavhengig av tid og sted på donor og resipient ettersom de genetiske elementene befinner seg i en fag. Nesten all form for gener og genetiske elementer kan overføres på denne måten (Huddleston 2014).

1.7 Mobile genetiske elementer

1.7.1 Plasmider

Plasmider er best kjent som sirkulære, dobbeltrådige DNA-molekyler (Couturier et al. 1988), men har også blitt oppdaget som lineære varianter (Frost et al. 2005). De er ekstrakromosomale og selvreplikerende, startpunkt for replikasjon *ori* (Origin of replication) gjør dette mulig (Willey et al. 2009). De varierer i lengde og kan bli opp til flere hundre kilobasepar (kbp) (Couturier 1988). Plasmid koder for de genene som er nødvendige for selvreplikasjon og andre vedlikeholdsfunksjoner, og noen har gener for stabil arv (Couturier 1988). De inneholder sjelden gener som er essensielle for bakterien (Frost et al. 2005), men kan kode for proteiner som er gunstige for cellen, som antibiotikaresistens (R-plasmid) (Couturier 1988).

Plasmider kan overføres fra en celle til en annen via konjugasjon, transformasjon eller transduksjon (Couturier 1988, Frost et al. 2005, Willey et al. 2009). Plasmider med samme type replikasjonsmekanisme kan ikke være i samme celle samtidig, dette kalles inkompatibilitet (*inc*) (Frost et al. 2005, Couturier 1988).

Noen plasmider kan integrere seg i kromosomet og bli replikert sammen med det, disse plasmidene er også kalt episomer (Willey et al. 2009). Konjugative plasmider inneholder gener for konjugasjon i tillegg til andre gener. Gener for konjugering sitter på plasmidene i *tra*-operoner. Plasmider kan finnes som singel-kopi og multi-kopi plasmider. Singel-kopi plasmider produserer kun en kopi per celle, multi-kopi kan ha 40 kopier eller mer per celle. (Willey et al. 2009)

Herding (curing) er et begrep som brukes når en celle mister et plasmid. Det kan skje ved ulik fordeling til datterceller, eller ved inhibering av plasmidreplikasjon av for eksempel antimikrobielle midler eller ugunstig temperatur. (Willey et al. 2009)

1.7.2 Transposoner

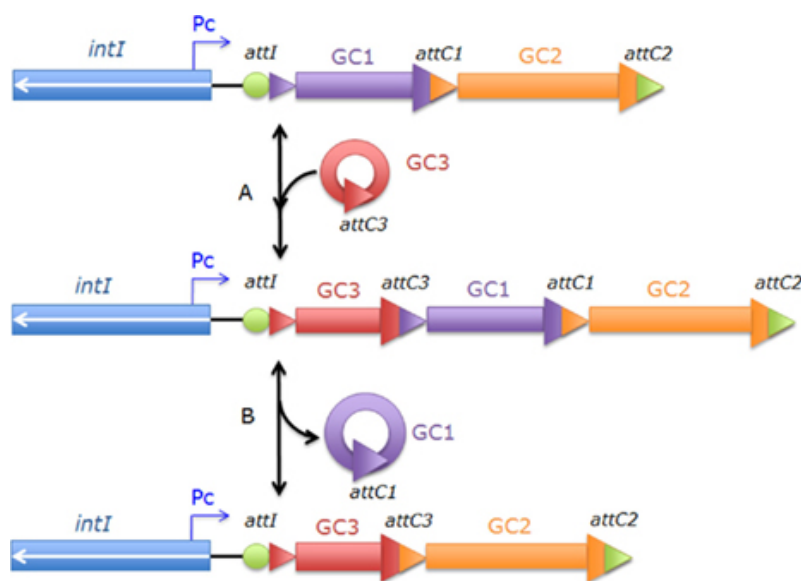
Transposoner er DNA-segmenter som kan flytte på seg i forskjellige deler av genomet. Denne flyttingen er kalt transposisjon. For å kunne transposere må DNA-biten inneholde gen for transposase og inverterte repeterte områder på begge sider av det. DNA-segmenter som kun inneholder dette er kjent som insersjons-sekvenser (IS) og kan være 750-1600 basepar lange. Transposoner kan inneholde gener for antibiotikaresistens. Transposisjon kan skje ved to mekanismer; enkel transposisjon (klipp- og-lim) og replikativ transposisjon. (Willey et al. 2009)

Transposoner kan hoppe mellom plasmider og mellom plasmider og kromosomet. Transposoner kan inneholde resistensgener som overføres til plasmider og lager R-plasmider. Dette kan også skje ved at resistensgener hopper ut av kromosomet over på plasmider og lager R-plasmider som kan videreføres til andre bakterier. Noen transposoner er konjugative og kan flytte seg mellom bakterier via konjugasjon. (Willey et al. 2009).

1.7.3 Integroner

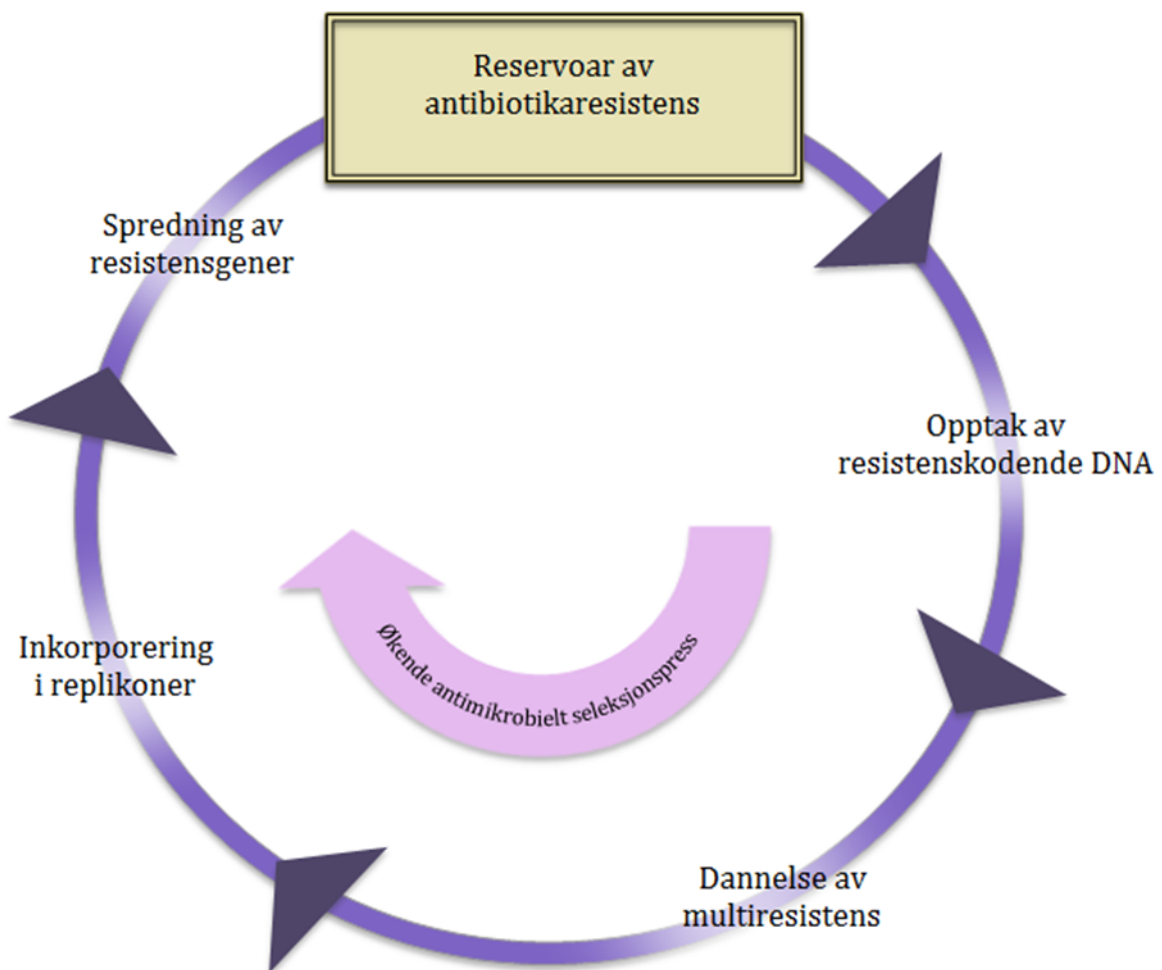
Integroner er genetiske elementer som kan ta opp resistensgener i form av genkassetter (Willey et al. 2009). Et integron inneholder gener for integrase, et kassettområde og promotere (Madsen 2008). Flere kassetter kan integreres i ett integron og alle kan ha samme promoter (Willey et al. 2009, Recchia og Hall 1995).

Genkassetter er små mobile elementer som stort sett består av et enkelt gen og et spesifikt rekombinasjonssete (Recchia og Hall 1995). En genkassett inkorporeres i et integron ved stedsspesifikk rekombinasjon som katalyseres av integrase (Recchia og Hall 1995).



Figur 1: Illustrasjon av integron der *intI* (gen for integrase) katalyserer insersjonen og eksersjonen av genkassetene. *Pc* er promoter for genkassetene og *attC* er repeterte områder som gjør det mulig for kassettene å bli integrert ved *attI*, eksisjon skjer gjerne mellom to *attC* seter. A) illustrerer insersjon og eksersjon av GC3, B) illustrerer insersjon og eksersjon av GC1. (Stalder et al. 2012)

1.8 Spredning av antibiotikaresistens



Figur 2: Reservoar for antibiotikaresistens kan være de fleste steder, kliniske institusjoner, gårder eller naturen. Herfra kan antibiotikaresistente bakterier, plasmider eller andre genetiske elementer spre seg, samt også fager med bakterie-DNA. En annen bakterie eller et nytt reservoar kan ta opp/få overført resistensgenene. At det hele veien er økende seleksjonspress av antimikrobielle midler er viktig å legge merke til. Når en bakterie har tatt opp resistens-DNAet kan det for eksempel inkorporeres i integroner og man får multiresistens (enten i form av selve bakterien eller genetiske elementer). Dette inkorporeres i replikons (i form av plasmider, konjugative transposoner etc.) og kan så spres videre til andre reservoarer, eller komme ut igjen til sitt opprinnelige reservoar som en enda større trussel. (Tekst og figur utformet med inspirasjon fra Davies 1994).

Figur 2 illustrerer et reservoar for antibiotikaresistens-gener som kan komme fra antibiotika-produserende stammer, antibiotikaresistente stammer eller resistenskodende DNA. Davies (1994) definerer reservoar i denne sammenhengen som "alle potensielle kilder for DNA-kodende antibiotikaresistens determinanter i miljøet"; dette inkluderer alle steder der antimikrobielle midler blir brukt for å kontrollere bakteriell vekst (Davies 1994), men kan også være naturlige reservoarer som jord.

Bakterier tar opp resistens-kodende DNA fra reservoaret via mekanismer som konjugasjon, transformasjon eller transduksjon. DNAet kan være i form av plasmider, integroner eller transposoner (Madsen 2008). Når de genetiske elementene er tatt opp i cytoplasma kan det dannes multiresistente genetiske elementer, for eksempel integroner (Madsen 2008). Multi-resistens-kasettene kan inkorporeres i større replikoner som plasmider og spres videre til nye reservoarer (Madsen 2008).

En av konsekvensene av antimikrobiell resistens i ville dyr kan være at det fungerer som et reservoar der mange typer resistens blandes. Antibiotikaresistente enteriske bakterier kan også smitte mennesker (via zoonose) eller hudsyrr. Ville dyr kan også fungere som en spredningsvektor for antibiotikaresistens-gener. (Radhouani et al. 2014)

Skurnik et al. (2006) fant en sammenheng mellom befolkningstetthet og forekomst av antibiotikaresistens hos ville dyr. Dyr med habitat i ubefolkede områder var helt uten resistente bakterier. Det ble funnet høyere (17 %) forekomst av resistens blant dyr som bodde i områder med lett befolkning, og enda høyere (49 %) forekomst av resistens blant ville dyr som levde i områder ved høy befolkningsvekst. Skurnik et al. konkluderte med at denne forekomsten av resistens helt klart er menneskeskapt. (Skurnik et al. 2006)

Antimikrobielle midler kommer opprinnelig fra naturlige habitat og det vil derfor også være naturlig å finne resistente bakterier i naturen. Antibiotika som for eksempel streptomycin er isolert fra mikrober i jorda, og produsenten må være resistent for å kunne overleve (Madsen 2008). Jord kan fungere som et reservoar for resistens som enda ikke har oppstått i klinisk viktige bakterier, og også for de som allerede har det (D'Costa et al. 2006).

Om resistensgener funnet i naturen er av naturlig opprinnelse eller er introdusert via spredning fra menneskelig aktivitet, er vanskelig å vite. Ved å undersøke gensammensetningen til resistente bakterier funnet hos ville dyr eller i naturen kan man se om dette kan ha noen sammenheng. Genomsekvensering kan brukes til å undersøke denne sammenhengen nærmere ved at man kan sammenlikne resistensgener og hvordan de er arrangert i genomet.

1.9 Helgenom-sekvensering

1.9.1 Første-generasjons sekvensering og shotgun-metoden

Den mest kjente formen for første-generasjons sekvensering er Sanger-sekvensering. Sanger-sekvensering benytter seg av kjede-terminering som går ut på at en DNA-tråd syntetiseres helt til en terminerende base blir inkorporert (og stopper videre syntetisering av dobbelttråden). Fragmentet som sekvenseres blir på forhånd klonet opp i mange kopier. Den

videre sekvenseringen med kjede-terminering gir fragmenter i ulik størrelse som, ved hjelp av for eksempel fluorescensen som sitter på de terminerende basene og elektroforese, fremkaller sekvensen (Willey et al. 2009).

Et problem med Sanger-metoden er at det kun er mulig å sekvensere rundt 300bp, etter primeren, av gangen (Sanger et al. 1977). Etter dette blir svært få lengere sekvenser syntetisert fordi kjedetermineringen som regel allerede har oppstått. Shotgun-sekvensering ble introdusert som en løsning på dette. Helgenom shotgun-sekvensering går ut på å amplifisere og fragmentere genomet i tilfeldige deler, og bruke disse delene til sekvensering. Hvert fragment blir sekvensert og sekvensene settes sammen til lengere avlesninger ved hjelp av overlappende områder. Sammenstillingene gjøres av datamaskiner. De sammenhengende sekvensene blir kalt for kontiger. Kontigene kan igjen sammenstilles og danne hele kromosom. (Willey et al. 2009) Dette er en metode som brukes i flere av andre-generasjons sekvenseringsteknikkene.

1.9.2 Andre-generasjons sekvensering og Illumina

Det finnes flere ulike typer andre-generasjons sekvensering, men de fleste har en eller annen form for flere av disse trinnene til felles: tilfeldig fragmentering av DNA (shotgun-basert sekvensering) med ligering av adaptersekvenser til DNA-fragmentene, opprettelse av klonede cluster-kolonier, sekvensering ved syntese med fluorescerende komponenter og optisk avlesning av sekvensen etter hver sykel. Illumina, 454 pyrosekvensering, HeliScope og AB SOLiD er eksempler på andre-generasjons sekvensering. (Shendure og Ji 2008).

Illumina-sekvensering baserer seg på prinsippet beskrevet over. DNAet blir fragmentert i tilfeldig og spesifikke tagger/adaptorer blir satt på endene ved ligering (<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/multiplexing-sequencing-assay.html> 23.02.15, Shendure og Ji 2008). Det opprettes klonede cluster-kolonier ved at fragmentene med adaptere fester seg til en chip, med god plass mellom hverandre, og det settes i gang bro-amplifisering. Dette danner mange identiske sekvenser i clusterene, som i siste steg av amplifiseringen denatureres så de blir enkelttrådige. (Illumina Inc. 2010) Så starter sekvenseringen ved syntese. Et og et nukleotid med fluorescens fester seg sammen med en reversibel terminator som gjør at kun en og en base fester seg av gangen og en av fire farger vil lyse opp fra hvert cluster (Metzker 2010). De ulike fargene oppdages av en sensor og dette vil gi mange kortere avlesninger i kontiger. Ved å sette på ulike tagger på hver prøve kan man sekvensere flere ulike prøver på en gang. (Illumina Inc. 2010). Illumina gir også mulighet for parvis-ende sekvensering, som skvenserer DNA-fragmentet fra begge sider noe som gir bedre

kvalitet på sekvensdata (http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing_assay.html, lokalisert 20.04.15). Data behandles på samme måte som ved shotgun-sekvensering ved at overlappende sekvenser gjør det mulig å sette avlesningene sammen i kontiger, og deretter videre til hele genom.

1.10 Målsetting for oppgaven

Det vil være av stor betydning å se nærmere på om resistens funnet i naturen er menneskeskapt eller har oppstått av naturlige årsaker. Muligheten for at viltmiljøet kan opptre som reservoar og vektor for antimikrobiell resistens gjør det viktig å skaffe mer viten om dette.

For å undersøke dette nærmere er det i denne oppgaven sett på antibiotikaresistent *E. coli* isolert fra villrein i Rondane, Forollhogna, Nordfjella og på Svalbard. Stammene ble først undersøkt fenotypisk ved ulike resistenstester og konjugasjonsforsøk og deretter genotypisk ved helgenom-sekvensering. Fylotyper, MLST-typer og pangenomet ble også undersøkt for å se på diversiteten til stammene.

Målet med oppgaven var å undersøke, karakterisere og sekvensere antibiotikaresistent *E. coli* funnet i avføringen til norsk villrein, samt genetisk karakterisering for å se om det kan finnes noen indikasjon på om dette er oppstått som følge av menneskelig aktivitet eller oppstått naturlig.

2 Materialer og metoder

Alle medier og løsninger som ikke er merket med noe annet er laget av Veterinærinstituttets medieproduksjon. For oppskrifter med leverandører, se vedlegg 1.

2.1 *Escherichia coli* stammer

I denne oppgaven ble det brukt *Escherichia coli* stammer hentet fra villrein i 2003 fra Forollhogna, 2010 og 2011 fra Svalbard og 2012 fra Forollhogna, Rondane og Nordfjella. Av disse 42 stammene var 27 resistente. Alle stammene ble oppbevart på frysemedium med glyserol fra de ble isolert til de ble brukt i denne oppgaven.

E. coli isolatene fra 2003 ble samlet inn av Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler (NORM-VET) og er isolert fra feces-prøver fra villrein i Forollhogna. Prøvene ble tilsendt Helseovervåkningsprogrammet for hjortevilt (HOP) av jegere som hadde felt villrein. Det ble tatt en fecesprøve per villrein og det ble isolert én tilfeldig *E. coli* fra hver prøve som senere ble testet for antibiotikaresistens. Mer om denne undersøkelsen kan leses i NORM/NORM-VET rapporten fra 2003. Isolatene vil i denne oppgaven bli omtalt ved nummereringen 1 -7.

Isolatene fra 2010/2011 ble samlet inn i forbindelse med et prosjekt som skulle undersøke Svalbardrein for virus og/eller parasitter. Reinsdyrene ble skutt med bedøvelsespil og det ble tatt prøver. Fekale prøver ble selektert for antibiotikaresistent *E. coli* ved å så ut fecesprøver på MacConkey agar tilsatt ulike antimikrobielle midler. Hver feces-prøve ble sådd ut på åtte skåler med en av hver av følgende midler tilsatt: ampicillin (16 mg/L og 32 mg/L), tetrasyklin (8 mg/L), nalidixinsyre (16 mg/L), cefotaksim (1 mg/L), sulfametoksazol (256 mg/L) og streptomycin (16 mg/L og 32 mg/L). Det ble også sådd ut på skål uten tilsatt antibiotika. Isolatene fra 2010 har i denne oppgaven fått nummereringen 8 og 9, og fra 2011 er nummerert 10-21.

E. coli isolatene fra 2012 ble isolert på to måter: Tilfeldig valg av en *E. coli* fra hver prøve og selektivt ved å så ut hver prøve på skåler med streptomycin (30 mg/L). Resistente stammer fra 2012 har nummereringen: 23-25, 30, 32, 35, 38 og 42. Ikke-resistente stammer fra 2012 har nummereringen: 22, 26-29, 31, 33, 34, 36, 37, 39-41, 43 og 44.

For opprinnelig nummerering brukt av Veterinærinstituttet se vedlegg 2.

2.2 Testing av antibiotikaresistens

2.2.1 Antibiotikaresistensbestemmelse ved bruk av lappediffusjon

Det ble benyttet en standardisert metode utarbeidet av European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (www.eucast.org). Den praktiske utførelsen kan beskrives på følgende måte: Litt bakteriemateriale ble slemmet opp i 5 mL destillert vann tilsatt 0,9 % NaCl til en turbiditet på 0,5 McFarland. En bomullspinne og en platespinner ble brukt for å spre løsningen jevnt utover Mueller-Hinton(MH)-skåler (Oxoid, Storbritannia), to skåler per stamme, før den ble satt til noen minutters tørking. Lapper med antimikrobielle midler (Oxoid, Storbritannia) med 12 ulike antimikrobielle midler ble spredd utover skålene, 6 lapper per skål. Skålene ble inkubert i 18 ± 2 timer i 35 °C. Det gikk aldri mer enn 15 minutter fra oppslemmingen ble hellet på skålene til de ble satt til inkubering. Hemmesonene ble tolket etter retningslinjer fra European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, per 09.2014) og lest av med linjal mot en mørk bakgrunn. For hver gang det ble testet for antibiotikaresistens ved lappediffusjonsmetoden ble det også gjort en systemkontroll med en ikke-resistent *E. coli* typestamme (ATCC 25922) for å kvalitetssikre metoden.

Antibiotika som ble brukt til lappediffusjon med styrke i parentes:

Ampicillin (10 µg), amoksylin/klavulan (30 µg), sulfa/trimetoprim (25 µg (23,75 + 1,25)), tetrasyklin (30 µg), cefaleksin (30 µg), ciprofloksasin (5 µg), neomycin (30 µg), gentamicin (10 µg), nitrofurantoin (100 µg), kloramfenikol (30 µg) og streptomycin (100 µg).

2.2.2 Bestemmelse av minste hemmende konsentrasjon (MIC)

Litt bakteriemateriale ble slemmet opp i 5 mL sterilt destillert vann til en turbiditet lik 0,5 McFarland. En podenål (10 µL) av oppslemmingen ble satt til 10 mL kationjustert MH-buljong. Litt av buljongen ble sådd ut på en blodskål for å kontrollere vekst. Resten av buljongen ble fordelt på en mikrobuljongdillusjonsplate (VetMIC™, Sverige) med 50 µL i hver brønn. Platen ble forseglet med film og inkubert på 35 °C i 18 ± 2 timer. Resultatene ble lest av med speil ved å se på blakking av buljongen som indikerte vekst og etter retningslinjer fra VetMIC (Skjema for NORM_VET, HT 04.01.10, Veterinærinstituttets metodesamling). Antimikrobielle midler det ble testet for var: Ampicillin, ciprofloksacin, nalidiksinsyre, gentamicin, streptomycin, tetrasyklin, florfenikol, kolistin, sulfametoksazol, trimetoprim, kloramfenikol, kanamycin, cefotaksim og ceftazidim. Det ble satt opp en systemkontroll med en ikke-resistent *E. coli* typestamme (ATCC 25922) for hver dag det ble testet med MIC for å kvalitetssikre metoden.

Stammene fra 2003, 2010 og 2011 var tidligere testet for MIC og det var kun stammene fra 2012 som ble testet for i denne oppgaven. I 2003 ble et annet mikrobuljongdillusjonsplate brukt, så disse stammene er ikke testet for ciprofloksacin, tetracyklin, kolistin, kanamycin, cefotaksim og ceftazidim, men er testet for enrofloksacin, ceftiofur, oksytetracyklin, neomycin og amoksisillin/klavulan.

2.3 Undersøkelse av overførbar resistens ved konjugeringsforsøk

Litt bakteriemateriale ble sådd i 4 mL Luria-Bertani (LB)-buljong, både resistente *E. coli* stammer fra villrein (donor) og *E. coli* DH5 α (resipient, resistent mot nalidiksinsyre), i hvert sitt rør. Dette ble inkubert ved 37 °C over natt. I 4 mL LB buljong ble 500 μ L DH5 α overnattkultur og 10 μ L (fra blå podenål) overnattkultur fra donor sådd ut til en mating. Dette ble inkubert i 4 timer ved 37 °C.

Matingen ble fortynnet med sterilt destillert vann til to fortynninger på 1:10 og 1:100. Hver fortynning og ufortynnet ble sådd ut på MH-agar tilsatt 20 μ g/mL nalidiksin slik at det ble tre skåler per stamme; 1:1, 1:10 og 1:100 fortynnet. For å få en jevn vekst ble 100 μ L pipettert på skålen og fordelt utover med L-stav før det fikk tørke. Det ble plassert lapper med antibiotika (Oxoid, Storbritannia) på skålene etter donorstammens resistensprofil. Skålene ble inkubert ved 37 °C over natt før de ble avlest. Ved vekst av enkeltkolonier i hemningssonene ble det sett på som mulig konjugasjon og en stamme derfra ble sådd ut på en blodskål og inkubert over natt ved 37 °C. Både donor og resipient ble sjekket for vekst på nalidiksin skålene før forsøket startet for å sjekke at DH5 α var resistent og at ingen av donorstammene var det og at det ikke var noe galt med skålene.

Veksten av transkonjugant på blodskål ble sammenliknet med donorstammen (dette skal være DH5 α og bør altså ha mindre kolonimorfologi enn donostammen) og det ble satt opp resistensforsøk som beskrevet under "Antibiotikaesistensbestemmelse ved bruk av lappediffusjon" for å kontrollere at transkonjugantene hadde tatt opp resistensplasmider og blitt resistente.

Halvparten av stammene ble sådd ut på LB-agar tilsatt nalidiksin istedenfor MH-agar. Det skal i prinsipp ikke ha noe å si for forsøket, men alle stammer som ikke fikk transkonjuganter ved utsåing på LB-skåler ble testet på nytt med MH-skåler.

2.4 Isolering av DNA

2.4.1 Isolering av DNA ved koking

Litt bakteriemateriale ble løst opp i 100 µL sterilt destillert vann i et eppendorfrør. Løsningen ble kokt i 10 minutter før det ble sentrifugert (Eppendorf centrifuge 5415 D, Tyskland) i 3-4 minutter ved 5000 runder per minutt (rpm). Supernatanten ble sugd av og oppbevart ved -20 °C til senere bruk.

2.4.2 Ekstrahering av DNA ved bruk av kit fra Promega

For ekstrahering av genomisk DNA ble Wizard® Genomic Purification Kit fra Promega (Promega Corporation, USA) brukt. Rensingen går ut på å først lysesere cellemateriale deretter å degradere RNAet i prøvene med RNase og så felle ut resterende proteiner. Isopropanol tilsettes (ladningen får DNAet til å klumpe seg) slik at DNA samler seg i en supernatant ved sentrifugering, etanol blir tilsatt DNAet for å vaske det ytterligere og fordampes av. Til slutt løses det tørkede DNAet i en buffer. Henvisningene fra produsenten (Promega Corporation, USA) ble fulgt. DNAet ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C fram til det ble brukt.

2.5 Polymerase kjede reaksjon (PCR)

2.5.1 Multipleks PCR for fylotyping av *E. coli*

Det ble brukt en metode ("Multiplex PCR for inndeling av *Escherichia coli* i de fylogenetiske gruppene A, B1, B2 og D.") fra Veterinærinstituttets metodesamling basert på artikler publisert av Clermont et al. (2000) og Doumith et al. (2012).

Det ble brukt fire forskjellige primerpar: *chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2 og *gadA*.

Tabell 1: Viser tolkning av resultater fra multipleks PCR for fylotyping av *E. coli* (hentet fra Veterinærinstituttets metodesamling). + indikerer bånd.

Fylogenetisk gruppe	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	+	-	-	-
B1	+	-	-	+
B2	+	+	+	+/-
D	+	+	-	+

En reaksjonsblanding bestående av 12,5 µL 2x Qiagen Multiplex PCR master mix (QIAGEN®, Tyskland), 0,5 µL primermix (0,2 µM) og 10 µL milliQ vann ble laget.

Primermixen bestod av like deler forward og reverse primere og dobbel mengde milliQ vann. Reaksjonsblandingen ble tilsatt 2 μL DNA templat per reaksjonsblanding. Det ble satt opp en negativ og en positiv kontroll (2003500827).

Følgende PCR program ble brukt på en MJ Dyad (BioRad, USA): 95 °C i 4 minutter, 95 °C i 30 sekunder, 60 °C i 30 sekunder, 72 °C i 30 sekunder, de tre siste trinnene ble repetert 30 ganger før 72 °C i 5 minutter og stopp på 8 °C.

2.5.2 Kvantitativ PCR (qPCR)

Trinnet "Library Normalization" under sekvenseringsforberedelsene går ut på å få lik konsentrasjon av DNA i alle prøvene. Det endelige biblioteket består av enkelttrådet DNA som vil løse seg dårlig på agarose-gel, derfor bør man bruke qPCR for kontroll som er en fin metode for å måle mengde enkelttrådig DNA. qPCR sier noe om hvor mye produkt som har blitt oppformert etter hver syklus ved at en farge fluoriserer når det binder til produkt og en sensor som kan måle dette. Styrken på fluoresensen vil gi et mål (CT-verdi) på hvor mye templat man har og man kan, ved hjelp av antall sykler kjørt, regne ut hvor mye templat man hadde i utgangspunktet. (Kubista et al. 2006)

En miks av 4 μL 5X HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estland), 0.4 μL 10 μM forward primer, 0.4 μL 10 μM reverse primer ("Illumina Colony primers", Illumina, USA), 14.2 μL H₂O ble blandet med 1 μL DNA-templat i hver sin brønn i et qPCR brett.

Et LightCycler 480 (Roche, Tyskland) instrument ble brukt og prøvene ble kjørt på 95 °C i 15 min før følgende syklus ble satt i gang 40 ganger: 95 °C i 30 sekunder, 60 °C i 30 sekunder, 72 °C i 45 sekunder.

2.6 Gelelektroforese

2.6.1 Fylotypisk bestemmelse

PCR-produktene ble satt på en 1,5 % agarosegel tilsatt GelRed nukleinsyre farge (Biotium, USA), og det ble videre benyttet 90 V til fragmentene ble separert (55 min). To laddere, 50 bp og 1kb (Thermo Fisher Scientific, Canada) ble brukt for å kunne avgjøre fragmentenes størrelse. Loading Dye 6x DNA (Thermo Fisher Scientific, Canada) ble tilsatt for å synliggjøre fragmentene under UV-lys. Båndene ble visualisert ved hjelp av BioRad Molecular Imager® ChemiDoc™XRS (USA)+ og programvaren ImageLab™ Software, versjon 5.1 (BioRad, USA). Resultatene ble tolket etter retningslinjer vist i tabell 1.

2.6.2 Undersøkelse av produkt fra DNA-ekstrahering

DNA fra ekstraheringen ble undersøkt på gel for å være sikker på at det ble isolert nok DNA. Dette ble gjort på samme måte som ved fylotypingen (se over), bortsett fra følgende punkter: en 2 % agarosegel ble brukt og varigheten på gelelektroforesen var 1 time og 20 minutter.

2.6.3 Kvalitetskontroll etter steg 3 i sekvenseringsforberedelsene

Samme prosedyre som beskrevet over ble fulgt bortsett fra følgende: 1 % agarose gel ble brukt, prøvene ble kjørt på 80 V i 45 minutter, GelRed™ (Biotium, USA) og laddere fra Solis BioDyne (Estland) med en loading dye (New England Biolabs®, USA) ble brukt og båndene ble visualisert ved bruk av en Molecular Imager® Gel Doc™ fra Bio-Rad (USA) med program Quantity One, versjon 4.6.6 (Bio-Rad, USA).

2.7 Helgenom-sekvensering og forberedelser

2.7.1 Qubit

For å måle konsentrasjonen av ekstrahert DNA og fortynnet DNA ble Quant-iT™ dsDNS High-Sensitivity Assay Kit fra Life technologies™ (USA) brukt. Protokollen fra produsenten ble fulgt. Prøvene ble avlest i et Qubit™ flourometer. Fluorometeret ble alltid kalibrert før bruk som anbefalt i protokollen (Life technologies™, USA).

2.7.2 Ampure

Ettersom ”DNA Rehydration Solution” fra Promega (USA) brukt til å løse det ekstraherte DNAet i inneholder EDTA (etylen-diamin-tetraacetat) må bufferen byttes før sekvenseringen kan starte. Til dette ble AMPure® XP beads (Beckman Coulter, USA) brukt. Veiledningen fra fabrikanten ble fulgt. DNAet ble til slutt løst i tris-buffer (Illumina, USA).

2.7.3 Fortynning av DNA

Nextera XT DNA Sample kit krever en konsentrasjon på 0.2 ng/μL. Alle prøvene ble fortynnet til en konsentrasjon på 0.2 ng/μL, og ble kontrollert med Quant-iT™ som beskrevet over. Formelen $C_1V_1 = C_2V_2$ ble brukt for å regne ut nytt volum. Prøvene ble fortynnet med MilliQ vann type 1 (Merck Millipore, Tyskland).

2.7.4 Illumina helgenom sekvensering

Protokollen til produsenten ble fulgt som beskrevet i Nextera XT DNA Sample Preparation Workflow (Illumina, USA). Forberedelsene til sekvenseringen kan deles inn i 5

trinn: tagmentering av genomisk DNA, PCR amplifisering, PCR rensing, bibliotek-normalisering og bibliotek sammenslåing for MiSeq sekvensering.

PCR-maskin brukt under prosessen var en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), og prøvene ble sekvensert på en Illumina MiSeq® sekvenserer (Illumina, USA). Ved steget ”PCR Clean-Up” ble 30 µL AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) brukt. Ved trinn 8 under ”Library Normalization” ble LNP-platen ristet i 32 minutter istedenfor 30.

Det ble utført to kvalitetskontroller underveis. Første for å sjekke produkt etter PCR Clean-UP ved gel-elektroforese og andre etter Library Normalization ved hjelp av qPCR, metodene er beskrevet over.

Som en kvalitets- og kalibreringskontroll ble PhiX Control v3 (Illumina, USA) tilsatt pooling. PhiX er fag-DNA som har et veldefinert, lite genom med god GC/AT fordeling. Dette gjør at den er en god kontroll for flere steg i sekvenseringen. Det ble satt 5 µL fortynnet PhiX til det fortynnede amplicon-biblioteket (DAL). PhiX ble fortynnet til 1:20 000 i PCR-vann. Det ble brukt 23 µL DAL til den endelige prøven.

2.8 Dataanalyse

2.8.1 Sammensetting av genomet

Monteringen av rådata til kontiger ble utført av Davide Porcellato, postdoktor ved meieriteknologi og matkvalitet (Institutt for kjemi bioteknologi og matvitenskap (IKBM), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU)).

Reads ble trimmet basert på kvalitetsskår (q20) og kontiger ble fra starten av satt sammen ved bruk av SPAdes assembler (Bankevich et al. 2012). Kontiger fra det skisserte genomet og med lengder over 500 bp ble brukt til videre analyse.

2.8.2 Pangenom-tre

Det ble laget et tre basert på pangenomet til stammens sekvenser, dette ble utført av postdoktor Davide Porcellato (NMBU, IKBM). Kodende DNA sekvenser ble sammenliknet på tvers av alle genomene ved en “alle-mot-alle” tilnærming ved bruk av BLASTp (Camacho et al. 2009). Alle distansene mellom hvert gen i hvert genom mot alle genene i alle genomene ble brukt for å konstruere en panmatrix ved bruk av R-pakken micropan (<http://cran.r-project.org>). Kodende DNA sekvenser ble gruppert i et kluster ved bruk av en terskel på 0,75 og komplett kobling.

2.8.3 MLST- Multi Locus Sequence Typing

Multilokus sekvenstyping (MLST) ble gjort i MLST 1.7 (Larsen et al. 2012, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). Et og et genom ble lastet opp. Standard innstillinger ble brukt, *E. coli* #1 ble valgt.

2.8.4 Undersøkelse av resistensgener

Søk etter resistensgener ble gjort ved bruk av ResFinder 2.1 (Zankari et al. 2012, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Standard innstillinger ble valgt, bortsett fra valgt minimum lengde som ble satt til 80 %. Selected threshold for % ID ble satt til 98 %.

2.8.5 Undersøkelse av plasmider

PlasmidFinder 1.2 (Carattoli et al. 2014, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) ble brukt for å søke etter plasmider i genomet. Standard innstillinger ble valgt, og valgt terskel for %ID var 95 %. Noen av stammene ble også undersøkt ved 90 % terskel.

2.8.6 Annotering

Annotering av genomet ble gjort i RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) Server (Aziz et al. 2008, <http://rast.nmpdr.org>). Standard innstillinger ble valgt: Bacteria, Genus Escherichia, species coli, og 11 for bacteria. Filer i xls format ble hentet fra RAST og brukt i Microsoft Excel (Microsoft, USA).

Annoteringen ble visualisert i CLC Sequence Viewer 7 (Qiagen Aarhus A/S), versjon 7.5.

2.8.7 BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BLAST ble brukt på to måter: ved nBLAST på NCBI sine nettsider (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) og pBLAST gjennom UniProt sine nettsider (<http://www.uniprot.org/blast/>).

Søk med DNA-sekvenser i UniProt ble gjort for å finne proteiner som tilsvarte sekvenser. Dette ble gjort fordi annoteringen i CLC ikke var nøyaktig nok. BLAST ble brukt gjennom UniProt sine nettsider for søk i UniProtKB databasen (Magrane og the UniProt consortium, 2011) .

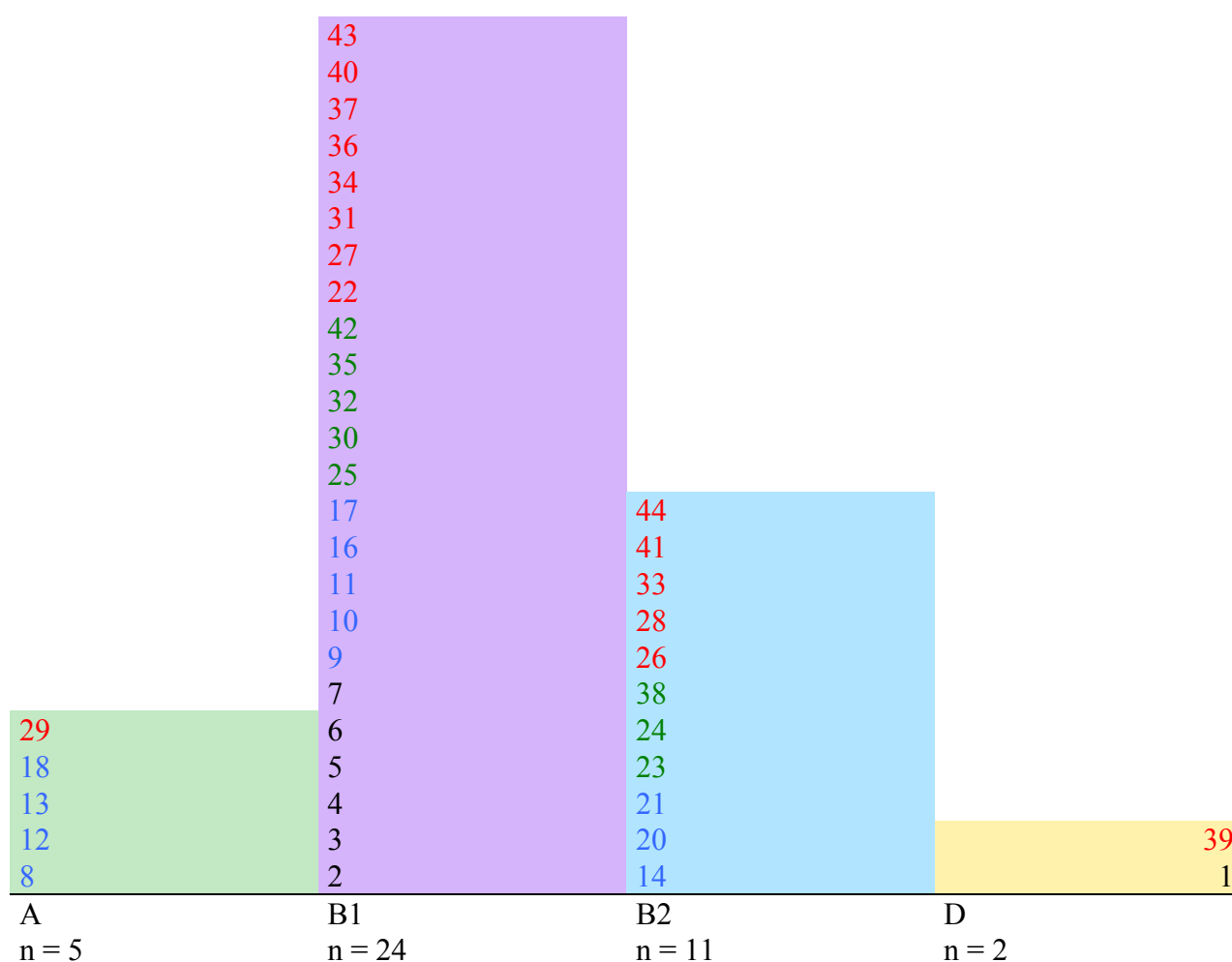
BLAST (Altschul et al., 1990) ble brukt for å finne annoterte sekvenser som var homologe med søkesekvensen.

3 Resultater

3.1 Klassifisering og typing

3.1.1 Fylotyping

Isolatene lot seg gruppere i alle de fire fylogenetiske gruppene det ble undersøkt for. Resultatene kan sees i figur 3. Under fylotypingen ble det oppdaget at stamme 19 ikke var en *E. coli* og stammen falt dermed ut av undersøkelsen.



Figur 3. Inndeling i fylogrupper. Stamme-nummere markert med svart er isolert fra Forollhogna i 2003, blå er isolert fra Svalbard i 2010/2011, grønne og røde er isolert fra Rondane, Forollhogna og Nordfjella i 2012, de røde er ikke-antibiotikaresistente stammer. Under fylogruppene er antall stammer (n) som faller innunder gjeldene fylogruppe vist.

Det er flest stammer faller innunder fylogruppe B1 med hele 24 av stammene, noe som utgjør over 50 %. Elleve stammer ble identifisert som fylogruppe B2, mens fylogruppe

A og D hadde henholdsvis bare 5 og 2 stammer. Stamme 1 og 39 er de eneste stammene som hører til av fylogruppe D.

Fylogruppe B1 er den eneste gruppen som har representanter fra alle isoleringssteder. Fylogruppe B2 følger etter med representanter fra tre av isoleringsstedene, alle utenom Forollhogna 2003 er representert der. Det er kun to stammer som tilhører fylogruppe D: stamme 1 (Forollhogna 2003) og stamme 39 (Ikke-resistent).

De ikke-antibiotikaresistente stammene (røde stamme-navn i figur 3) er de eneste isoleringsgruppen som har representanter innenfor alle fylogrupper. Stammene som er isolert fra Svalbard i 2010/2011 (blå stamme-navn i figur 3) har representanter innenfor tre av fylogruppene (A, B1 og B2). Stammer isolert fra Forollhogna i 2003 (svarte stamme-navn i figur 3) tilhører kun fylogruppe B1 og D, mens stammer isolert fra Rondane/Forollhogna/Nordfjella i 2012 kun har representanter innenfor fylogruppe B1 og B2.

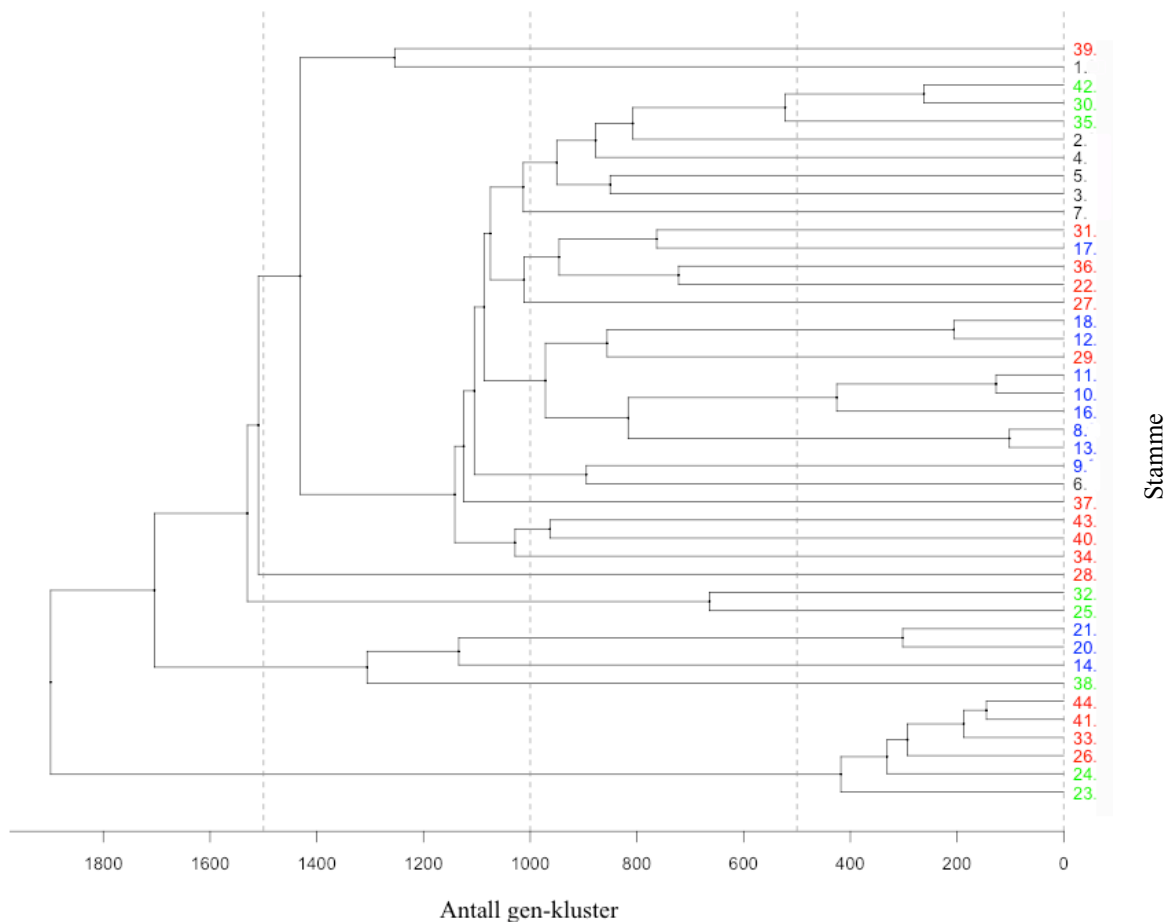
3.1.2 MLST – Multi Locus Sekvens Typing

Isolatene lot seg gruppere i mange ulike sekvenstyper (STer), dette kan sees i tabell 2. Stammene tilhører 19 forskjellige MLS-Typer, mens 8 stammer ble tildelt ukjent MLS-type. Tolv stammer har en MLST som er unik i forhold til de resterende stammene i denne studien, og 12 stammer har samme sekvens-type som en annen. Hele 10 stammer har sekvenstype 58, med representanter fra alle isoleringsopphav. Kun stammer isolert fra Rondane, Forollhogna eller Nordfjella i 2012 hadde en ukjent sekvens-type.

Tabell 2: *E. coli* stammene sortert etter multi lokus sekvens typer (MLST). Antall stammer per MLStype står i kolonnen til høyre. Det var til sammen 19 ulike MLSTer, 20 medregnet ”ukjent”.

MLST	Stammer										Antall stammer
Ukjent	23	24	22	26	28	33	41	44			n = 8
ST-23	29										n = 1
ST-58	2	4	10	11	16	30	35	42	34	40	n = 10
ST-75	6	9									n = 2
ST-88	8	13									n = 2
ST-130	1										n = 1
ST-131	20	21									n = 2
ST-141	38										n = 1
ST-155	43										n = 1
ST-297	37										n = 1
ST-336	7										n = 1
ST-337	5										n = 1
ST-348	27										n = 1
ST-362	39										n = 1
ST-369	12	18									n = 2
ST-447	25	32									n = 2
ST-491	14										n = 1
ST-1079	17	31									n = 2
ST-1081	36										n = 1
ST-1611	3										n = 1

3.1.3 Pangenom-cluster



Figur 4: Viser pangenom-cluster av stammene. Stammene markert med svart er isolert i 2003 fra Forollhogna, blå er Svalbard 2010/2011, grønne og røde er Forollhogna/Rondane/Nordfjella de grønne er resistente stammer og de røde er ikke-resistente.

Pangenom-kuster-treet (figur 4) viser at det er diversitet mellom stammene. De ikke-resistente stammene (røde) ser ut til å være gruppen med størst diversitet innad.

Stamme 23, 24, 26, 33, 41 og 44 er ulike majoriteten av stammene. Stamme 14, 20, 21 og 38 skiller seg også ut med å være mer ulike majoriteten. Sammenliknet med fylogruppingen ser man at noe av grupperingen også går igjen i pangenomet. Stammene (21, 20, 14, 38, 44, 41, 33, 26, 24 og 23) er alle fylotype B2 og er plassert i to grupper, litt for seg selv. Stamme 44, 41, 33, 26, 24 og 23 er også alle av ukjent MLST. Stamme 20 og 21 er samme MLST, mens 14 og 38 hver sin.

En annen utgruppe er stamme 1 og 39. De to stammene er de eneste som faller inn under fylogruppe D. De har to ulike sekvens-typer.

De øvrige stammene som er relativt nærmere i avstand og tilhører fylogruppe A og B1. Det er også her alle stammene som hører under ST-58 hører til. En utgruppe fra

fylogruppe B1 skiller seg ut, stamme 25 og 32. En stamme fra fylogruppe B2 skiller seg ut, stamme 28, som også har en ukjent MLST.

Resultatene fra MLSTen, fylogruppingen og pangenom-treet viser relativ høy diversitet innad i stammene. Det er heller ingen klar oppdeling etter verken isolasjons-sted eller isolasjons-år eller om stammene er resistente eller ikke. Det er relativ høy diversitet innad i stammene, men ikke mellom isolerings-gruppene.

3.2 Fenotype

3.2.1 Fenotypisk resistens

Resultatene fra MIC-testene kan sees i vedlegg 3. Her er samlet resistens lagt sammen i figur 5. Kun en stamme hadde uoverensstemmelser mellom MIC-testen og lappediskdiffusjonene. Stamme 2 var så vidt (1mm) gentamicinresistent ved lappediskdiffusjon, men ikke ved MIC-test, det ble derfor konkludert med at stammen ikke hadde fenotypisk resistens ovenfor gentamicin.

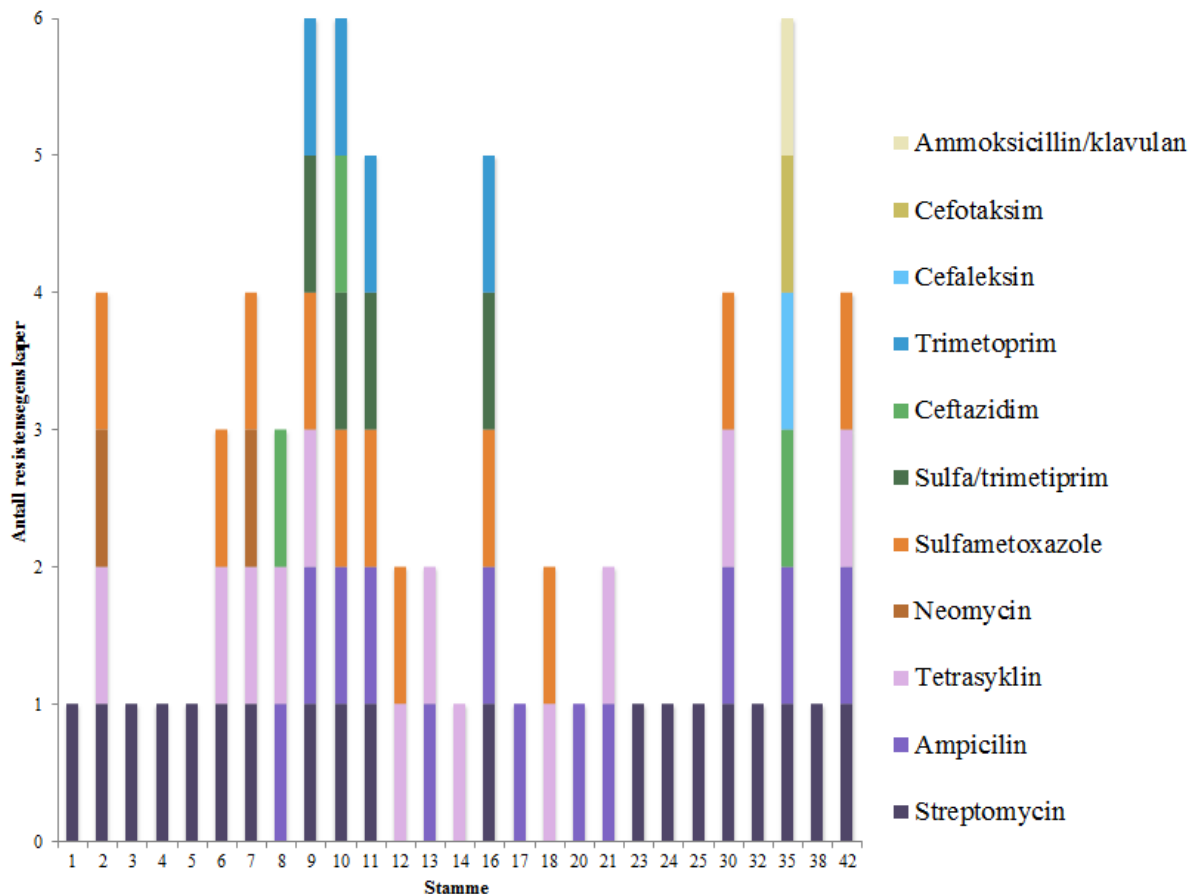
Ved resten av stammene var det god overenstemmelse med resultatene fra MIC-tester og lappediskdiffusjon. Stamme 15 ble ikke tatt med videre da den ikke lenger viste fenotypisk resistens, til tross for at den opprinnelig var isolert fra en skål tilsatt sulfametoksazol.

Et lite flertall (15 av 27) av stammene var resistente mot flere antimikrobielle midler. Stammene isolert fra Svalbard er de med flest multiresistente stammer (9 av 12), de ble isolert selektivt etter resistens. Streptomycinresistens går igjen hos 19 av stammene, mens tetrasyklin-resistens finnes hos 12 av stammene og ampicillin-resistens også hos 12 av stammene.

Stamme 9 og 10 er de to stammene som viste resistens for flest antimikrobielle midler, begge isolert fra Svalbard. Kun en stamme (35) viste resistens mot amoksisillin/klavulan, cefotaksim og cefaleksin, mens 3 stammer (8, 10, 35) var resistente mot ceftazidim. Resistens mot sulfametoksazol ble funnet hos 11 av stammene (2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 18, 30, 42) og var med to unntak (stamme 12 og 18) alltid assosiert med streptomycin-resistens. Trimetoprim-resistens ble funnet hos fire av stammene (9, 10, 11, 16) og alle stammene med trimetoprim-resistens var også resistente mot sulfametoksazol og kombinasjonen av de to (sulfametoksazol/trimetoprim).

MIC-resultatene for de antimikrobielle midlene stammene var resistente mot viste som regel høye verdier, godt over terskel-verdi. Dette gjelder ikke for stammene 8 og 10 i forhold til ceftazidim-resistens og stamme 35 i forhold til cefotaksim-resistens, der var stammene så vidt over terskelen for resistens. Stamme 35 var det eneste tilfelle ved cefalosporin-resistens

som var godt over terskel-verdi. Stamme 13 hadde en lav MIC-verdi for tetrasyklin, men den var over terskelen for resistens og ble bekreftet resistent på lappediffusjons-testen. Resterende stammer hadde enten høye verdier der de var resistente eller lave verdier der de ikke var resistente.



Figur 5: Viser total fenotypiske resistens til stammene basert på resultater fra både lappediskdiffusjon og MIC-tester. 1-7 er stammer isolert fra Forollhogna 2003, 8-21 er stammer isolert fra Svalbard 2010/2011 og 23-42 er stammer isolert fra Forollhogna, Rondane og Nordfjella 2012. Ikke-resistente stammer vises ikke.

3.2.2 Konjugasjonsforsøk

Resultater fra konjugasjonsforsøket kan sees i tabell 3. Det viste seg at over halvparten av de resistente stammene overførte resistensgener ved konjugasjonsforsøk. Ettersom resistensen til transkonjugantene ble undersøkt med lappediffusjon og det kun var lapper med både sulfametoksazol og trimetoprim, kan det fortsatt være at resistens for en av delene kan ha blitt overført. Stamme 11 hadde transkonjuganter med to ulike resistensprofiler, der transkonjuganten isolert fra ampicillin hemmesone ikke hadde resistens mot

sulfa/trimetoprim, mens transkonjuganter fra de to andre hemmesonene (streptomycin og sulfa/trimetoprim) var resistente mot alle tre (streptomycin, ampicillin, sulfa/trimetoprim).

Tabell 3: Resultater fra konjugasjonsforsøk. Streptomycin, tetrasyklin, ampicillin og sulfa/trimetoprim var de typene antibiotikaresistens som ble overført. Totalt 16 av 27 stammer overførte resistens. Alle transkonjuganter fra samme stamme hadde lik resistensprofil. Kun hos en stamme, merket med *, var det to ulike transkonjuganter der den ene ikke hadde resistens ovenfor sulfametoksazol/trimetoprim. ”+” markerer overført resistens, ”-” markerer at stammen hadde resistens for det antimikrobielle middelet, men det overførte ikke og blank markerer at stammen ikke hadde resistens mot det antimikrobielle middelet. De vannrette strekene markerer inndelingen i områder stammene er isolert fra; 1-7 Forollhogna 2003, 8-21 Svalbard 2010/2011 og de resterende Forollhogna, Rondane og Nordfjella 2012.

Stamme	Streptomycin	Tetrasyklin	Ampicillin	Sulfa/trimetoprim
1	+			
2	-	+		
3	+			
4	+			
5	+			
6	-	-		
7	-	-		
8		-	+	
9	+	+	+	+
10	+		+	+
11	+		+	*
12		-		
13		-	+	
14		-		
16	+		+	+
17			+	
18		-		
20			-	
21		+	+	
23	-			
24	+			
25	+			
30	-	-	-	
32	+			
35	-		-	
38	-			
42	-	-	-	

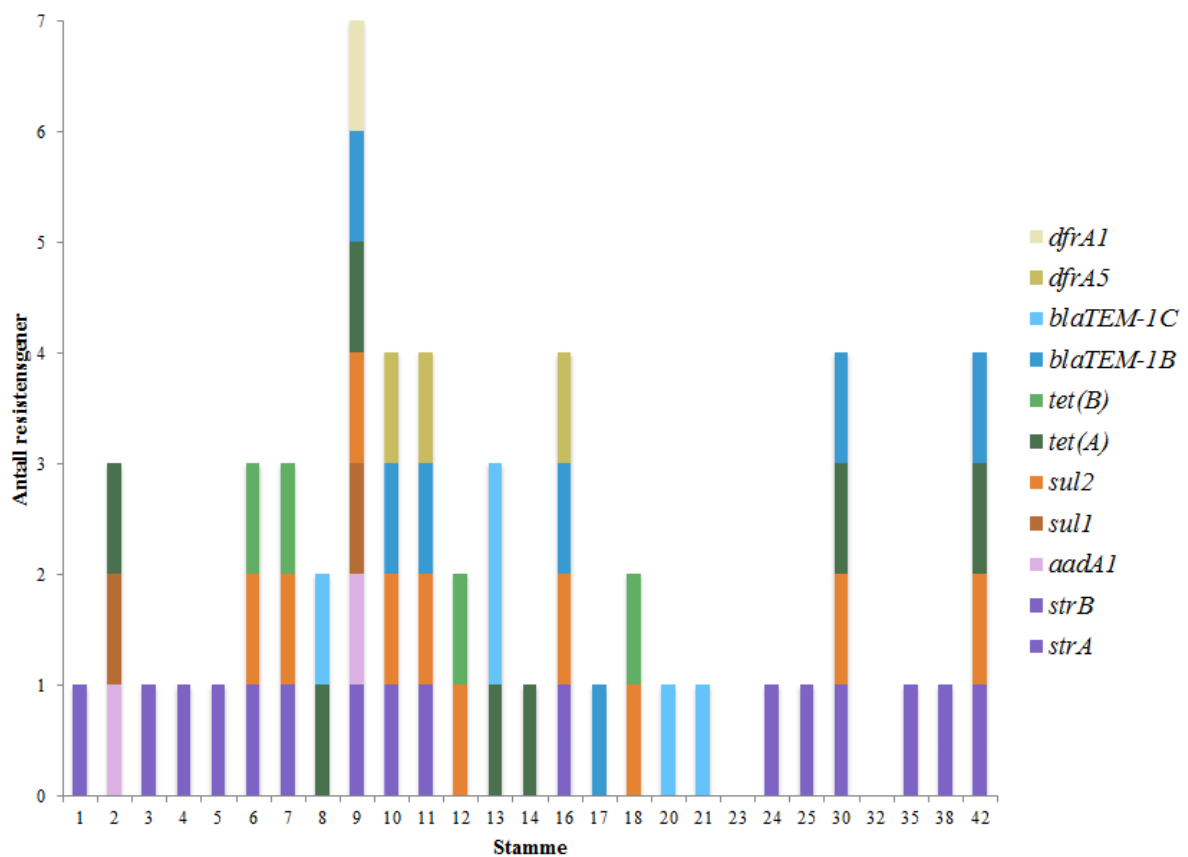
Alle de fire stammene som hadde sulfa/trimetoprimresistens overførte denne egenskapen ved konjugasjonsforsøk. Over halvparten (11 av 19) av stammene som hadde

streptomycin-resistens overførte denne egenskapen ved konjuasjonsforsøk. Hos de ampicillin-resistente stammene overførte 8 av 12 resistensegenskapene, mens bare 3 av 12 tetrasyklin-resistente stammer ga tetrasyklin-resistente transkonjuganter.

Stamme 9 var den eneste som overførte resistens mot alle fire midlene. Stamme 10, 11 og 16 overførte tre resistens-egenskaper: streptomycin- ampicillin- og sulfa/trimetoprim-resistens.

3.3 Genotype

3.3.1 ResFinder



Figur 6: Resistensgener basert på analyse i ResFinder. *StrA* og *strB* er begge gener for streptomycinresistens, cellen vil ikke være resistent med bare en av genene, de blir derfor regnet som 0,5 i dette diagrammet. *dfrA1* og *dfrA5* gir resistens for trimetoprim, *blaTEM-1B* og *blaTEM-1C* gir betalaktamresistens, *tet(A)* og *tet(B)* gir tetrasyklinresistens, *sul1* og *sul2* gir sulfonamid-resistens, *aadA1* gir aminoglykosidresistens.

Det var god overenstemmelse mellom fenotypisk og genotypisk resistens. Ingen stammer fikk påvist resistensgener for en egenskap de ikke hadde vist fenotypisk. Noen stammer hadde fenotypiske egenskaper som ikke ble funnet genotypisk.

Stammene som var resistente mot streptomycin hadde genparet *strA-strB*. I figur 6 er de derfor blitt regnet med som et halvt resistensgen hver. Stamme 23 og 32 var resistente mot streptomycin ved fenotypisk undersøkelse, men det ble ikke funnet noen resistensgener ved genotypisk undersøkelse. Totalt hadde 16 stammer *strA-strB* genparet mot 19 stammer som viste fenotypisk resistens ovenfor det antimikrobielle middelet. Stamme 2 hadde *aadA1*-gen som gir aminoglykosidresistens, eller streptomycin- og spektinomycinresistens, istedenfor *strA-strB*. Stamme 2 og stamme 7 viste også neomycinresistens fenotypisk, men ikke genotypisk. Stamme 23 og 32 var helt blottet for kjente resistens-gener.

Stamme 8, 10 og 35 hadde fenotypisk ceftazidim-resistens, samt stamme 35 viste også fenotypisk resistens for cefotaksim og cefaleksin. Ingen av disse hadde kjente gener for cefalosporin-resistens.

Stamme 13 hadde to gener som koder for beta-laktamresistens (ampicillin) (*blaTEM-1C*). Stamme 21 mangler kjent gen for tetrasyklinresistens og stamme 35 mangler i tillegg til et kjent gen for ampicillinresistens og amoksisicillinresistens.

Resultatene fra ResFinder ga også svar på hvilken kontig resistensgenene satt på. I flere tilfeller satt det flere resistensgener på samme kontig, og ofte var det de samme kombinasjonene som gikk igjen. *StrA-strB* satt alltid på samme kontig. Stammer som kun hadde *strA-strB* på samme kontig var 1, 3, 4, 5, 24, 5, 35 og 38. *StrA-strB* og *sul2* satt også ofte på samme kontig, dette var tilfelle hos stamme 6, 7, 10, 11 16, 30 og 42. *blaTEM-1C* og *tet(A)* satt på samme kontig hos to stammer (stamme 8 og 13). Ellers hadde stamme 2 en kontig med resistens-genene *aadA1*, *sul1* og *tet(A)* på og stamme 9 hadde en kontig med *strA-strB*, *aadA1*, *sul1*, *sul2* og *dfrA1*. Resten av resistensgenene lå på hver sin kontig. Likevel er det ikke nødvendigvis slik at de er plassert langt unna andre resistensgener i genomet.

3.3.2 PlasmidFinder

Stamme 1 og 2 var de eneste der alle resistensgenene sammen med et replikon ble lokalisert på samme kontig. Stamme 1 hadde *strA-strB* -genene og et *incI1* replikon plassert på samme kontig. Stamme 2 hadde *aadA1*, *sul1* og *tet(A)* på samme kontig som det ble funnet et *incP* replikon. Det ble funnet plasmidreplikoner hos alle stammene unntatt hos stamme 5, 35 og 38. Stamme 30 og 42 hadde plasmidreplikoner og resistensgener plassert på samme kontig uten at de overførte noen av resistensgenene i praksis. Begge stammene fikk plassert

strA-strB og *sul2* på samme kontig som det ble funnet sekvenser for et Q1 plasmid og *tet(A)* på samme kontig som det ble funnet sekvenser for et incP plasmid. Stamme 9 og 11 hadde noen av de overførte resistensgenene på samme kontig som plasmider, men ikke alle. Begge hadde sekvenser for et incQ1 plasmid med *strA-strB* og *sul2* på samme kontig, i tillegg hadde stamme 9 *aadA1* og *dfrA1* på samme kontig.

Tabell 4 viser resultatene fra PlasmidFinder. For en sammenlikning av resultatene fra PlasmidFinder og ResFinder med kontiger, se vedlegg 4.

Tabell 4: Inc-gruppene de ulike stammene (S) ble tilegnet i PlasmidFinder.

S	Inc-gruppe	S	Inc-gruppe	S	Inc-gruppe	S	Inc-gruppe	S	Inc-gruppe
1	FIB(AP001918)	8	FIB(AP001918)	16	Q1	25	Col156	26	FII(29)
	FII		FII		FIB(AP001918)		Col156		FIB(AP001918)
	II				FII				
2	FIB(pB171)	9	FII	17	FII(pCoo)	30	P	27	FIB(AP001918)
	P		Q1		II		Q1		II
	FII(pCoo)		FIB(AP001918)						FII(29)
	II								
3	FIB(AP001918)	10	Q1	18	FIB(AP001918)	32	Col156	28	FIB(AP001918)
	FII(pSE11)		FIB(AP001918)		FII(pCoo)				FII(29)
			FII						
4	FIB(AP001918)	11	FII	20	FII	35		29	FII(pCoo)
	FII(pSE11)		FIB(AP001918)		FIB(AP001918)				FIB(pB171)
			Q1						FII(pCoo)
5		12	FII	21	FII	38		31	FLA
			FIB(AP001918)		FIB(AP001918)				FII
			FIC						
6	FII	13	FIB(AP001918)	23	Y	42	II	33	FIB(AP001918)
			FII		FIB(AP001918)		Q1		FIB(AP001918)
							P		FII(pCoo)
7	FII	14	FIB(AP001918)	24	FIB(AP001918)	22	II	34	FII(pSE11)
			FII		FII(pCoo)		FIB(AP001918)		FIB(AP001918)
			FIC				FII(pCoo)		
			FLA						

Stamme 3 og 4 fikk i tillegg treff på Inc B/O/K/Z ved søk med 90 % terskel.

3.4 Undersøkelse av resistensgener og genetiske elementer

For å begrense resultatene er det kun lagt vekt på enkelte stammer/genetiske egenskaper. Nærmere analyse av de ulike resistensgenene og genetiske elementene som omga resistensgenene ble gjort ved bruk av CLC, UniProt og BLAST. Etersom det til sammen var 41 kontiger som inneholdt resistensgener, ble det gjort et mindre utvalg som det ble sett nærmere på. Kontiger med *StrA-strB* ble sett nærmere på fordi dette forekom svært ofte. Kontiger med antibiotikaresistens-genene *sul2* og *dfrA5* ble sett nærmere på fordi dette er resistens mot sulfonamider og trimetoprim som er syntetiske antimikrobielle midler, og ikke

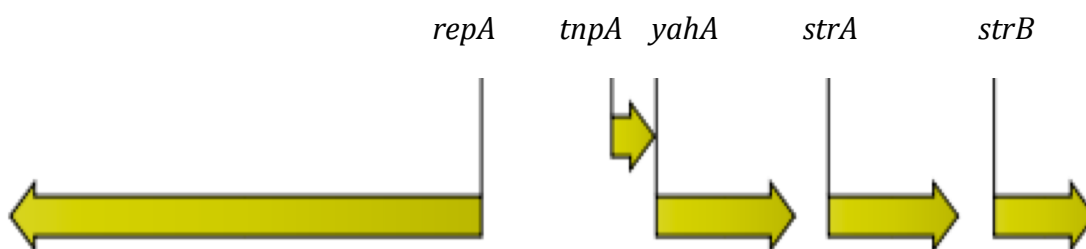
like naturlig å finne i naturen. I tillegg ble kontigier fra stamme 9 også nærmere undersøkt ettersom denne stammen hadde forekomst av mange resistensgener.

3.4.1 Stammer med *strA* og *strB* plassert på samme kontig

Stammer med kun *strA* og *strB* gen på samme kontig var stamme 1, 3, 4, 5, 24, 25, 35 og 38. Stamme 1, 3, 4 og 5 er alle isolert fra Forollhogna mens stamme 24, 25, 35 og 38 er isolert fra Forollhogna, Nordfjella eller Rondane. Kontigene med resistensgenene på ble sammenstilt i BLAST mot en 6650 bp sekvens (EF108308.1) tidligere sekvensert og analysert av Veterinærinstituttet (v. Slettemeås, 2006). Sekvensen er en del av et overførbart resistensplasmid hos *E. coli* isolert fra vill bjørn i Sverige. Halvparten av kontigene (stamme 1, 4, 35 og 38) var 100 % identiske og med 100 % dekning av sekvensen. Stamme 3 (10 ikke-sammenstilte baser) og stamme 25 (1443 ikke-sammenstilte baser) hadde 100 % identitet, men dekket ikke hele sekvensen (EF108308.1). Stamme 5 og 24 hadde kontigier med 99 % identitet med sekvensen. Dette skyldes mismatch, stamme 5 hadde 10 og stamme 24 hadde 1.

I følge innlegget annoteringen inneholder sekvensen (EF108308.1) følgende: *repA*, *tnpA*, *yahA*, *strA* og *strB*. Dette (*yahA*) utgjør en insersjonssekvens IS1133. En mer visuell fremstilling kan sees i Slettemeås gradsavhandling fra 2006. Den 6650bp-lange sekvensen var en del av et 200 kb overførbart plasmid med Tn5393 og et *tnpR*-gen som er trunkert av et IS1133 element.

Sekvensen (figur 7) som går igjen hos fire av stammene har igjen 100 % homologi med en sekvens fra *E. coli* isolert fra human feces ved NTNU (LM996635.1).



Figur 7: Visuell framstilling av den 6650bp lange sekvensen.

3.4.2 Stammer med *strA*, *strB* og *sul2* plassert på samme kontig

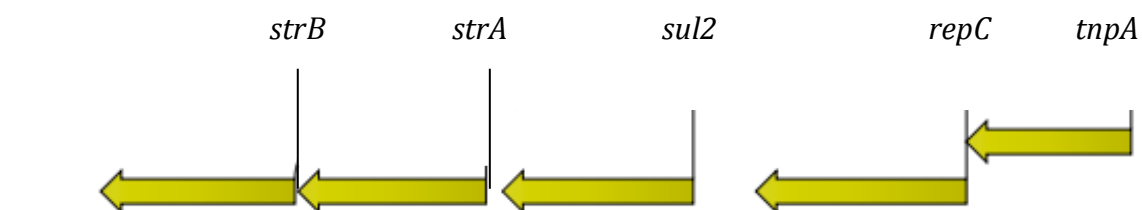
Stammer med *strA-strB* og *sul2* gener på samme kontig er: 6, 7, 10, 11, 16, 30 og 42. Stamme 6 og 7 har arrangert genene i rekkefølgen *strA-strB* og *sul2* (plassert etter hverandre,

med fosfoglukosamin-mutase mellom *strB* og *sul2*), mens de øvrige stammene har de arrangert i rekkefølgen *sul2*, *strA* og *strB*, som vist i figur 8.

Kontigene til stamme 10, 11, 16, 30 og 42 har høy grad av homologi og området med *sul2*, *strA* og *strB* er 100 % samsvarende. Hos stamme 10 og 16 er kontigene kuttet slik at de kun består av resistensgenene, det kan derfor være at de opprinnelig hadde sett like ut som de andre hadde hele sekvensen vært med (figur 8).

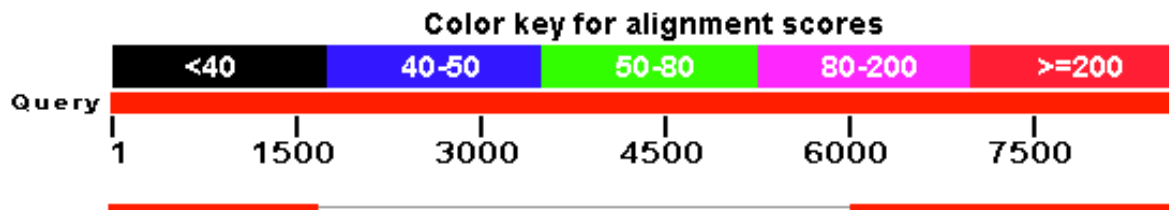
Ved BLAST av regionen som kun inneholder *sul2*, *strA-strB* kommer det opp flere treff med 100 % dekning og 100 % identitet. Mange av dem var ulike plasmider. Treffene var blant annet (de tre første treffene) en sekvens fra *Salmonella enterica* plasmid pSBLT isolert fra menneske (LN794247.1), *E. coli* HUSEC isolert fra menneske (HF572917.2) og *E. coli* isolert fra human feces (LM995927.1).

På kontigene til stamme 11, 30 og 42 var det to proteinkodende sekvenser til, og hele sekvensen med resistensgener (figur 8) ble også blastet. Treff med BLAST ved søk på sekvensen med resistensgener og transposon og replikasjons proteinene før, var 28 stk. på 100 % dekning og 99 % idenitet, de fleste med én gap. Det første treffet var *Salmonella enterica*, operon flanking sequence (KJ999732.1). Ved nærmere undersøkelse av det første treffet hadde sekvensen treff med følgende elementer: aminoglycoside-6-phosphotransferase (*strB*), aminoglycoside-3"-phosphotransferase (*strA*), dihydropteroate syntase (*sul2*), putative replication protein C (*repC*), repA-like protein (avbrutt av IS-sekvens IS26) og transposase (*tnpA*).



Figur 8: Visuell framstilling av den ca 4630 bp lange sekvensen identifisert i stamme 11, 30 og 42.

Ved blast-søk med plasmid RSF1010 (M28829) som søke-sekvens mot kontig til stamme 11, fikk de 50 % dekning med 99 % identitet. (7 mismatches og 6 gaps). Figur 9 viser sekvenssammenstillingen mellom RSF1010 og kontig fra stamme 11.

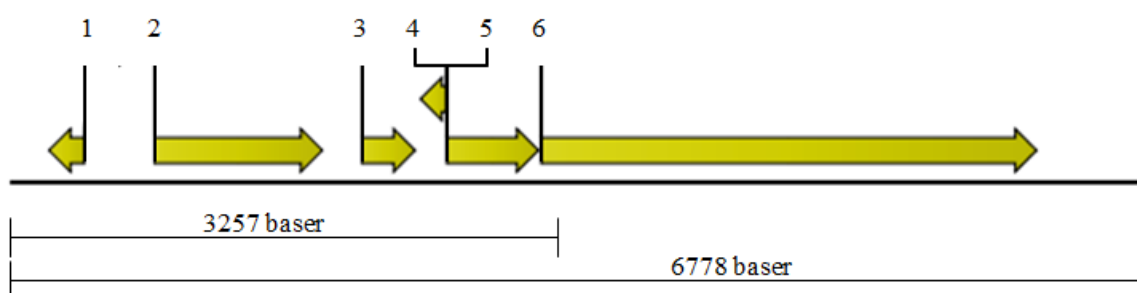


Figur 9: Viser sammenstilling av kontig fra stamme 11 mot plasmid RSF1010 (M28829)

3.4.3 Sekvenser med *drfA5*

Stammer som hadde *drfA5*-genet var stamme 10, 11, 16. De tre kontigene som inneholdt *drfA5* hadde stor grad av homologi. Alle inneholder de samme mobile element proteinene som er vist i figur 10. De tre stammene hadde kontiger med ulik lengde, stamme 10 hadde en kontig på 3257 bp, stamme 11 en på 6778 bp og stamme 16 en på 18 392 bp. Kontigene til stamme 11 og 16 er helt like på den 6778 bp lange sekvensen de har til felles, mens på den 3257 bp lange sekvensen stamme 10 har til felles har den en mismatch i posisjon 3251 der den har en G istedenfor C.

Ved BLAST søk på de ulike nodene så får alle treff med FAP1 plasmid isolert fra *E. coli* (CP009579.1), 100 % dekning. Stamme 11 er den eneste med 100% identity, stamme 10 har 1 mismatch i posisjon 3251 og stamme 16 har en mismatch i posisjon 10925 og en insersjon av A i posisjon 16285 samt 10 bp som ikke er alignet (likevel gir dette 99 % dekning og 99 % identitet).



Figur 10: Visuell framstilling av kontig fra stamme 11. 1 koder for trimetoprim resistent dihydrofolat reduktase, 2 for klasse 1 integron rekombinase, 3 for transkripsjonell regulator, 4 for ukarakterisert protein, 5 for transposon Tn21 resolvase og 6 for transposase.

I følge UniProt er proteinene som følger: dihydrofolat reduktase, klasse 1 integron rekombinase (*IntI1*), transkripsjonell regulator/transposon Tn21 modulator protein, ukarakterisert protein, transposon Tn21 resolvase (*tnpR*) og transposase (*TnpA*).

Sekvenssammenstillingen mellom egne sekvenser og FAP1-plasmidet (CP009579.1) dekker følgende annoteringer: (deler av transposase), dihydrofolat reduktase, integrase,

transkripsjonell regulator, transposase, transposon Tn21 resolvase, transposase, (deler av hypotetisk protein).

Stamme 16 matchet på et område i FAP1-plasmidet (CP009579.1) med *relE* som koder for et toksin-antitoksin system.

3.4.4 Multiresistens-kontig fra stamme 9

Stamme 9 hadde en kontig ("kontig 1") med mange resistensgener på. Kontigen inneholdt resistens-gener for streptomycin (*strA-strB*), aminoglykosid (*aadA1*, streptomycin og spectinomycin), sulfonamid (*sul1* og *sul2*) og trimetoprim (*dfpA1*). Alle disse resistenstypene ble, som beskrevet tidligere, overført ved konjugasjonsforsøk.

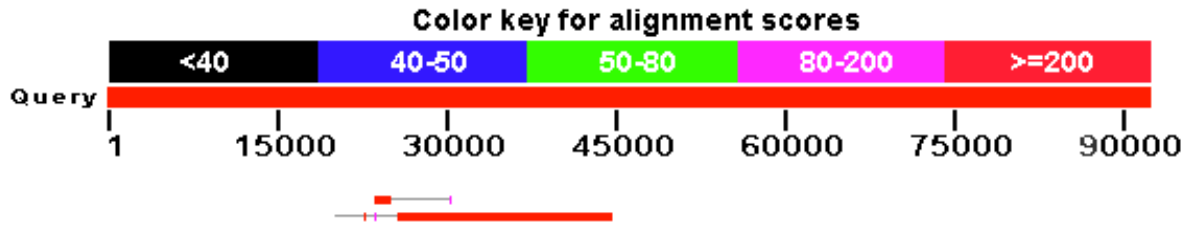
Ved BLAST søk på hele den 19 092 bp lange kontigen kom det et treff på 100 % dekning og 99 % identitet. Det var en mismatch mellom sekvensene, en C i stamme 9 mot en T i treffet ved posisjon 3560 (midt i mercuric resistance operon regulator). Treffet var *Escherichia coli* genome assembly FHI4 (LM995927.1) som også ble treff ved søk av kontiger med *strA-strB* og *sul2*, nevnt over. *E. coli* FHI4 stammen ble samlet inn i 2002 i forbindelse med en undersøkelse av helgenom fra non-O157 STEC stammer med mål å kunne skille mellom stammer med potensiale til å forårsake HUS og mindre virulente stammer. Stammen var isolert fra feces til en human pasient med HUS i Norge.

Det er ett treff til som har 99 % identitet, men med 99 % dekning. Dette er et *E. coli* plasmid pACN001-F (KC853439.1). Sekvenssammenlikningen gir 122 ikke-sammenstilte baser på 5' enden (som gjør at sekvenssammenlikningen starter i posisjon 123) og én mismatch.

På det tredje treffet som også er et plasmid, *Escherichia coli* plasmid IncA/C2 pRYC103T24 (NG_039603.1), hadde det bare 75 % dekning, men med 99 % identitet. Det var to mismatches, 143 ikke-sammenstilte baser på 5' enden og 4610 ikke-sammenstilte baser på 3' enden. Dette ga likevel en sekvens på 14 339 baser med høy homologi.

Annoteringen til de to sistnevnte treffene viser blant annet *intI1* (integron integrase klasse 1), flere resistenskodende genkassetter og transposon Tn21.

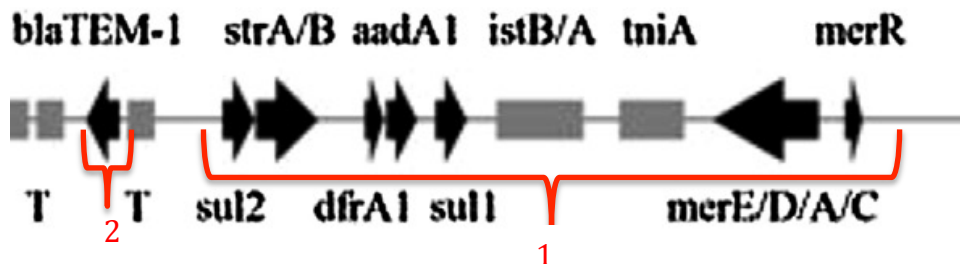
Stamme 9 hadde også enda en kontig ("kontig 2") som fikk treff med plasmid pACN001-F. Denne kontigen inneholdt *blaTEM-1B*, som koder for betalaktam-resistens. Figur 11 viser hvordan de to kontigene sammenstilte seg med plasmidet.



Figur 11: Sammenstilling av kontig 1 (nederst) og kontig 2 (øverst) til stamme 9, med plasmid pACN001-F. Skjermdump hentet fra nBLAST.

Sekvenssammenlikningen til kontig 2 ga 100 % identitet, men hadde 432 ikke-sammenstilte baser. Kontig 1 dekket 20 % av plasmidet mens kontig 2 dekket kun 1 %. De lengste sammenhengende røde strekene i figur 11 er de som gir sekvenssammenlikningen som er omtalt.

Figur 12 viser utdraget av plasmid pACN001-F som matcher med de to kontigene fra stamme 9. Utdraget av figuren er hentet fra Wang et al. 2014.



Figur 12: Viser genene på plasmid pACN001-F i det området det matcher med kontig 1 og 2 fra stamme 9. Utdraget av figuren er hentet fra Wang et al. 2014. De røde strekene markerer hvilke kontig utdraget matchet med, 1) kontig 1 og 2) kontig 2.

4 Diskusjon

4.1 Klassifisering, fylotyping og MLS-typing

Ut i fra fylotypingen, MLS-typingen og pangenom clusteret kan man se at det er relativ høy diversitet mellom stammene. Det er ingen klare ulikheter mellom isoleringsgruppene. Dette kan være fordi det er for få prøver med i dette forsøket, og at man hadde kunnet se forskjeller i grupperingene dersom man hadde inkludert flere prøver. Prøvene som kun er isolert fra villrein viser at det finnes representanter fra mange ulike *E.coli* MLSTer og fylogrupper i tarm hos villrein.

Fylogruppe B1 hadde flest representanter. Deretter B2, A og D. Fylogruppe A og B1 er ofte kommensale bakterier, men intestinale patogene stammer kan også falle inn under her (Carlos et al. 2010). Fylogruppe B2 og D er ofte assosiert med virulensfaktorer (Johnson et al. 2001). Totalt 13 stammer havnet i en fylogruppe som ofte er assosiert med virulens. Alle stammene ble isolert fra friske reinsdyr, men det kan være at disse stammene hadde kunnet gi infeksjon hos menneske.

Det kan være en liten sammenheng mellom de som har samme ST og samme type genotypisk resistens, noe som kan tyde på at dette er nært beslektede arter. Stammer som parvis grupperer innen en ST hadde ofte de samme resistensgenene.

Det er relativ høy diversitet mellom *E. coli* isolatene og det er ingen klare sammenhenger mellom fylogruppene, MLST, eller pangenomet og isoleringsted eller tidspunkt. Til tross for at *E. coli* kun er isolert fra villrein er det relativt stor diversitet mellom stammene. Tarmen hos pattedyr er bakterierik og det er ikke uvanlig med høy diversitet. Noen av artene med samme isoleringsopphav ser ut til å likne ut i fra både MLST, fylotypingen og pangenomet. Dette kan være nært beslektede *E. coli*, muligens av samme klon.

4.2 Fenotypisk og genotypisk resistens

Det var stor grad av overenstemmelse mellom fenotypisk og genotypisk resistens. Det var ingen av stammene som hadde genotypisk resistens for noe de ikke hadde vist fenotypisk. Derimot var det åtte stammer som manglet kjent gen for en eller flere av resistensegenskapene de hadde vist fenotypisk.

Stamme 2 og 7 viste resistens for neomycin fenotypisk, men ved lappediffusjon var de kun innenfor hemmesonen med 1 mm. Dette kan være tilfeldig eller en målefeil, og det kan,

med sammenlikning av resultatene fra ResFinder, konkluderes med at stamme 2 og 7 ikke har resistens mot neomycin.

Stamme 8, 10 og 35 manglet gen for ceftazidim-resistens. Stamme 8 og 10 hadde svært lav MIC-verdi ved ceftazidim (1 mg/L) som betyr at stammene så vidt kan regnes som resistente. De viste heller ingen resistens ovenfor cefotaksim. Resistens mot de to cefalosporinene pleier ofte å følge hverandre, noe de ikke gjør i disse stammene. Det kan derfor også være at dette er en avlesningsfeil eller at dette ikke hadde oppstått dersom MIC-verdien ble testet på nytt. Stamme 35 har derimot høyere MIC-verdi på ceftazidim (4 mg/L) samtidig som den også har resistens mot ceftotaksim (0,5 mg/L) og cefaleksin (ingen hemmesone rundt lappen). Denne resistensen stammer fra en mutasjon i et promoterområde på kromosomet som fører til oppregulering av ampC og er trolig ikke forårsaket av horisontalt overførte gener (NORM / NORM-VET 2012). Oppregulering av ampC kan føre til økt toleranse ovenfor betalaktamer, cefalosporiner og amoksisillin (Jacoby 2009). Dette stemmer overens med resistensprofilen til stamme 35.

Det ble ikke funnet noen resistensgen for tetrasyklin hos stamme 21 og heller ikke noen resistensgen for ampicillin hos stamme 35. Stamme 23 og 32 manglet helt resistensgener (disse hadde streptomycinresistens med en MIC-verdi på 128 mg/L). Mulig forklaring på dette kan være at kontigene har blitt delt på midt over resistensgenene og at ResFinder ikke har klart å oppdage dette. Det kan også være at det er nye resistensgener som ResFinder ikke kjenner til, som for eksempel mutasjoner i kromosomet som endrer målet til det antimikrobielle middelet.

Stamme 2 registrerte som gentamicinresistent ved lappediffusjonsforsøket, men ikke ved MIC-test. Etersom hemmesonen var såpass nære ikke-resistent ved lappediffusjon ble det derfor konkludert med at stammen ikke var gentamicinresistent.

Stamme 15 ble opprinnelig isolert etter å ha vokst på en skål med sulfametoksazol. Den viste ingen resistens ovenfor sulfametoksazol eller noen andre antimikrobielle midler som det ble testet for. MIC-verdien var svært lav (≤ 8 mg/L). I dette tilfellet kan det ha skjedd at stammen har mistet for eksempel et resistensplasmid som har hatt sulfametoksazole-resistens. Dette kan ha skjedd som følge av frysingen eller ved at isolatet ble utsatt for andre ugunstige forhold som kan ha forårsaket curing/herding.

4.3 Plasmider og konjugering

I de fleste tilfellene satt ikke plasmidreplikoner (i følge PlasmidFinder) og resistensgener på samme kontig. De fleste overførbare plasmider er som regel ganske store og det vil derfor være mulig å finne resistensgener og plasmidreplikoner på hver sin kontig, selv om de opprinnelig satt på samme plasmid. Resistensen kan også ha blitt overført på andre måter enn via plasmider, for eksempel ved konjugerende transposoner. Plasmidreplikonene som ble oppdaget trenger ikke å høre til overførbare plasmider.

Stamme 1 og 2 var de eneste som fikk plassert alle resistensgener på et kontig sammen med plasmidreplikon av ResFinder og PlasmidFinder. Stamme 2 overførte kun en av resistensegenskapene ved konjugasjonsforsøk noe som ikke stemmer overens med at alle resistensgener ble registrert på samme kontig som et plasmidreplikon. Mulig forklaring er andre former for overføring, eller feil ved gjennomføring av forsøket. Stamme 9 og 11 overførte alle resistensegenskaper ved konjugasjonsforsøk, og ettersom kun noen av de registrerte resistensgenene var lokalisert på samme kontig som et plasmidreplikon kan det tyde på kontigene med de resterende resistensgenene også stammer fra plasmider. Stamme 30 og 42 overførte ingen resistensegenskaper ved konjugasjonsforsøket, men fikk plassert flere av resistensgenene på to plasmider. Det kan tyde på feil ved konjugasjonsforsøket eller at plasmidene ikke er overførbare.

Noen trender går igjen ser man på de ulike plasmidene som er plassert sammen med resistensgener. Stammer (2, 30 og 42) som fikk plasmidreplikon for inc P hadde alltid resistensgenet *tetA* på samme kontig, og stamme 2 hadde i tillegg *aadA1* og *sul1* på samme kontig. Plasmidreplikon inc Q1 går også igjen; her er *sul2* og *strA-strB* plassert på samme kontig, og dette gjelder stamme 9, 11, 30 og 42. Stamme 9 hadde i tillegg *aadA1* og *dfrA1* plassert på samme kontig.

Stamme 5, 35 og 38 var de eneste det ikke ble funnet noen plasmider hos. Alle stammene hadde kun *strA-strB* som resistensgener. Stamme 5 overførte ved konjugasjonsforsøk, men det gjorde ikke de to andre. Det er mulig at resistensgener hos stamme 5 overførte på andre måter, for eksempel konjugativt transposon, eller at plasmidreplikon har blitt splittet mellom to kontiger og at PlasmidFinder ikke gjenkjenner sekvensen med 95 % terskelverdi.

I forhold til konjugasjonsforsøket og resistensgener var det også noen trender som gikk igjen. Stammer som hadde *sul2* og *tetB* (6, 7, 12, 18) overførte ikke resistens. Stamme 30 og 42 overførte heller ikke i praksis og de var arrangert likt med resistensgener. Selv om man kan se slike tendenser er det likevel en sjanse for at dette er tilfeldig. Det er mange av

stammene som likner på hverandre når det kommer til resistensgener, kontiger og overføring av konjugering i praksis.

Totalt sett er disse resultatene noe usikre. En mulig forklaring kan være at PlasmidFinder ikke er en ideel søkemotor for plasmider, genomet er stykket opp i kontiger som vanskeliggjør dette og selve konjugasjonsforsøket kan ha hatt feil og mangler.

Stamme 3 og 4 har tidligere fått identifisert et inc B/O/K plasmid ved replikon PCR (utført av Veterinærinstituttet). Det viste seg at (dette) incF plasmidet ikke var overførbart. Ved analyse av stammene i ResFinder ble det funnet inc B/O/K/Z hos stamme 3 og 4, som stemmer overens med det tidligere funnet.

Selv om konjugasjonsforsøket kun er en modell på hvordan resistens kan overføres *in vitro*, kan det tenkes at det samme kan skje *in vivo*. Tarmen er et sted med tett bakterievekst, og har gunstige forhold for bakterier, og det er ikke utenkelig at horisontal overføring av resistensgener kan forekomme i praksis.

4.4 Nærmere undersøkelse av genetisk sammensetning

4.4.1 *strA* - *strB* – gener på samme kontig

Hos mennesker og dyr blir *strA-strB* ofte funnet på RSF1010 eller pBP1 plasmider (Sundin og Bender 1996). De er ikke-konjugative og har bredt verts-spekter. Hos planter finner man vanligvis *strA-strB* på store konjugative plasmider med Tn5393. (Sundin og Bender 1996). Sekvensen i stamme W9608 (Slettemeås 2006) er det første tilfelle der transposon Tn5393 er funnet i *E. coli* hos et pattedyr.

Stammene som hadde *strA* og *strB* som eneste resistensgener på samme kontig hadde stor grad av homologi med sekvensen i Slettemeås' oppgave (2006). Slettemeås fant at plasmidet sekvensen ble isolert fra var et overførbart plasmid på omtrent 200 kb som ikke før var funnet hos dyr. *strA-strB* ble funnet på et Tn5393 transposon som inneholdt IS elementet IS1133.

Ved søk i BLAST med sekvensen som inneholdt *strA-strB* og Tn5393 med IS1133 ble det funnet en sekvens som var helt lik søkesekvensen. Denne sekvensen var sekvensert fra *E.coli* isolert fra human faeces (LM996635.1). I denne undersøkelsen hadde 6 stammer 100 % identitet med sekvensen. Dette viser at sekvensen også finnes i *E. coli* hos menneske, og ikke bare hos planter og dyr slik som vist tidligere (Slettemeås 2006).

Alle stammene med kun *strA-strB* genparet på en kontig overførte resistens for streptomycin ved konjugeringsforsøk utenom stamme 35 og 38, og de fleste av disse inneholdt Tn5393. Det ble ikke funnet noen plasmider hos stamme 5, 35 og 38 i

PlasmidFinder. Det er ikke nødvendigvis slik at stammene ikke hadde plasmider eller ikke hadde konjugative plasmider, men kan også være dårlige forhold under konjugasjonsforsøket eller at kontigene kuttet kjente plasmidseter. Resistensgenene har kanskje flyttet seg fra kromosomet til et annet via en fag eller ved rekombinasjon via et plasmid. Transposon Tn5393 har fått satt inn en insersjonssekvens IS1133 i seg og vil lite trolig kunne fungere.

Alle stammene nevnt i dette avsnittet er fra Forollhogna, Nordfjella eller Rondane. Dette er områder som det er vanlig å la beitedyr gå om sommeren. Selv om det er lav forekomst av antibiotikaresistens i norske husdyr kan det være en mulighet for at resistensen har spredd seg på den måten. Streptomycin er isolert fra jord og reinsdyr spiser gress og lav fra bakken, så det er også mulighet for at resistensen har oppstått naturlig, uten påvirkning fra mennesker. Den litt over 6 kb store DNA-fragmentet ble isolert fra området i både 2003 og i 2012 og kan tyde på at fragmentet vedvarer i populasjonen. Grunner til dette kan være som beskrevet over at det er naturlig forekomst av streptomycin, eller det kan være at dersom det sitter på et plasmid som også kan ha et toksin-antitoksin system som medfører opprettholdelse av plasmidet.

4.4.2 *strA-strB* og *sul2* –gener på samme kontig

Stammer med *strA-strB* og *sul2* på samme genetiske element har tidligere stort sett vært å finne i bakterier isolert fra pattedyr og mennesker, gjerne på plasmider i IncQ-gruppen som RSF1010. Det er fordi sulfonamider ikke brukes til å kontrollere bakterievekst hos planter, slik som streptomycin blir. Det er derimot vanlig å bruke sulfonamider til å bekjempe sykdommer hos dyr og mennesker, da ofte i kombinasjon med trimetoprim. (Sundin og Bender 1996).

Plasmidene med *strA-strB* funnet hos planter, er som nevnt over som oftest store konjugative plasmider assosiert med Tn5393, mens funnet hos dyr og mennesker er de som oftest assosiert med *sul2* på små ikke-konjugative plasmider (som RSF1010). Stammene med *strA-strB* og *sul2* hadde i dette tilfellet overført genene ved konjugasjonsforsøk, bortsett fra stamme 42 og 30, men det kan også være grunnet ugunstige forhold ved konjugasjonsforsøket. Stamme 42 fikk inc Q1 plasmidreplikon og resistensgener på samme kontig i følge ResFinder og PlasmidFinder.

Slette-meås (2006) sekvenserte en sekvens bestående av *strA-strB* og *sul2* som var svært lik 5 av de 7 sekvenser som inneholdt *strA-strB* og *sul2* i dette forsøket. Stamme 6 og 7 hadde ikke like god sammenstilling da genene i disse stammene var organisert på en annen måte. Videre var sekvensen hos Slette-meås lokalisert på et ikke-konjugativt plasmid. I denne

oppgaven overførte derimot 3 av de 5 stammene med god sekvenssammenstilling ved konjugasjonsforsøk. Stamme 30 og 42 overførte ikke, som diskutert over.

Det er likevel interessant å se at selv om området med de aktuelle genene på er en del av et konjugativt plasmid så har det stor grad av likhet med RSF1010, som er et ikke-konjugativt plasmid. Dette kan være interessant å se nærmere på med tanke på opprinnelsen til disse resistenselementene. En mulighet er at RSF1010, som er et lite plasmid, kan ha blitt inkorporert i et større konjugerende plasmid. Dersom dette er tilfellet vil det være naturlig å finne ulikheter i sekvenssammenstillingen som følge av forandringer i sekvensen over tid, slik det er observert i denne studien.

4.4.3 Sekvenser med *DfrA5*-gen

Alle kontigene med *dfrA5*-genet fikk 100 % dekning og 100 eller 99 % identitet med ”*E. coli* FAP1 plasmid unnamed” (CP009579.1). Plasmidet er isolert fra *E. coli* i faeces fra gris i Nederland, har en størrelse på omtrent 142 kb og inneholder *dfrA5*-gen (i følge NCBI). Den lengste kontigen i dette forsøket dekket kun 18382 bp (ca. 13 %) av plasmidet.

Komponentene som kontigene består av ser ut til å tilhøre et transposon og integron. I følge UniProt har området elementer fra integron klasse 1 og Tn21, samt *tnpR* og *tnpA* som er gener for transposisjon. Det kan se ut som at det er et integron med en genkassett med antibiotikaresistens, som er en del av et Tn21 liknende transposon. Tn21 er vidt distribuert og har stor suksess som overførbare multiresistens-element (Liebert et al. 1999).

De fleste treffene i nBLAST ser ut til å være plasmider. Sekvensen inneholder klasse 1 integron integrase *IntI1* og transposon Tn21 og derfor kan det se ut som at dette er komponenter som er en del av et plasmid. Alle stammene med *dfrA5* overførte trimetoprim-resistens ved konjugasjonsforsøk. Dette kan tyde på et konjugativt plasmid, eller andre overførbare elementer.

Alle stammene som hadde *dfrA5*-genet var isolert fra Svalbard og overførte denne egenskapen ved konjugasjonsforsøk. En grunn til at genet for trimetoprim-resistens opprettholdes i et miljø uten sannsynlig trimetoprim-tilgang kan være toksin-antitoksin-systemet (*relE*) som stamme 11 inneholdt. Dette er gen for et system som kan sitte på plasmider. Dette sørger for at kun datterceller som får med seg plasmidet overlever. Dette gjør at plasmidene kan opprettholde seg selv i bakteriepopulasjoner, selv i tilfeller der plasmidet ikke er lønnsomt for verten (Van Melderen og De Bast 2009). Ettersom kontigene fra de ulike stammene er såpass like, og alle er isolert fra Svalbard kan dette være et spesifikt plasmid som vedvarer i denne populasjonen. Dette er med på å opprettholde forekomsten av resistens

selv uten seleksjonspress, noe som kan være svært ugunstig i blant annet klinisk sammenheng. Særlig med tanke på å redusere forbruken av antibiotika som et forsøk på få ned forekomsten av antibiotikaresistens, noe som i slike tilfeller ikke vil fungere.

Stamme 10, 11 og 16 var som nevnt isolert fra villrein på Svalbard, de var også av samme sekvens type (ST-58), lå nære hverandre i pangenom-klusteret og tilhørte samme fylogruppe (B1). Stammene ser relativt like ut og det kan også være at de er stammer av samme klon eller er nært beslektet.

4.4.4 Multiresistens hos stamme 9

Stamme 9 kontig 1 inneholdt seks resistensgener, gener for kvikksølvresistens, samt gen for integron integrase *intI1*, *tniA/B* og *istA/B*. *IntI1* vil kunne integrere genkassetter i sekvensen og det stemmer overens med annoteringen til NG_039603.1, der det også er integrase binde-sete, *attI1*, samt *dfrA1* genkassett og *aadA1* genkassett. Sekvensen inneholder også transposon Tn21 (*istA/B*) og *tniA/B* (gener involvert i transposisjon). Dette er elementer som indikerer mulighet for mobilitet av resistensgenene og horisontal overføring.

Treffene pACN001-F (KC853439.1) og pRYC103T24 (NG_039603.1) er anslått å være bred-vertsspekter-plasmider som hører til *incA/C* gruppen eller bærer *repA* og *repC* proteiner (Wang et al. 2014, Novais et al. 2010). Dette kan øke sjansen for spredning av plasmidet. *IncA/C* plasmider med multiresistens er oppdaget på alle kontinenter. pRYC103T24 plasmidet ble funnet i ulike bakterie-arter i samme pasient, noe som kunne tyde på effektiv spredning innad i pasienten. (Novais et al. 2010).

De tre isolatene som ga de beste treffene i BLAST-søk med kontig 1 fra stamme 9 er isolert fra forskjellige steder, noe som understreker at plasmidet er vidt distribuert. Stammene plasmidene er isolert fra har vært forbundet med virulens, APEC, HUSEC og kliniske isolater fra utbrudd/ikke-utbrudd.

Kontig 2 fra stamme 9 hadde i likhet med kontig 1 god sammenstilling med pACN001-F. Ut fra informasjonen man får fra søk med de to kontigene kan mye tyde på at de er en del av et *IncA/C* plasmid. De ser også ut til å inneholde både transposoner og integroner. I følge konjugasjonsforsøkene utført i denne studien var dette alle gener som ble overført, noe som kan tyde på at plasmidet er konjugativt. Det inneholder flere genkassetter og transposoner, tilsynelatende satt inn ved flere anledninger (Novais et al. 2010). Dette kan tyde på at multiresistensplasmidet har oppstått i et miljø der det er flere overførbare resistensgener og et seleksjonspress av antibiotika. Det er derfor merkverdig at stammen som inneholdt dette

plasmidet er isolert fra villrein i Svalbard som ligger relativt skjermet for direkte menneskelig påvirkning.

5 Konklusjon

I NORM/NORM-VET rapportene fra 2003 og 2012 kan det rapporteres at 24 % av *E. coli* isolatene isolert fra villrein i 2003 var resistente mot en eller flere typer antibiotika og i 2012 ble det funnet 10 % resistente isolater. Det er ikke høy forekomst av resistens, men det kan tilsi at det er en bestand av antibiotikaresistente *E. coli* stammer i villrein. I forhold til stammene tatt med i denne studien var de fleste multiresistente stammene isolert fra Svalbard, noe som er interessant med tanke på de øde områdene reinen ferdes i der.

Som nevnt innledningsvis kan resistensgener spre seg via blant annet integroner, transposoner og plasmider, og med spredning kan også nye resistensreplikoner utvikles. I denne studien ble det funnet (antydninger til) plasmider, transposoner og integroner, samtidig som det ble bevist at resistensegenskapene kunne overføres mellom bakterier.

Sekvenser som inneholder resistensgener isolert i denne studien viste svært stor likhet med sekvenser tidligere isolert fra menneskelige feces i kliniske isolater. Alle stammer som hadde resistens mot trimetoprim hadde også resistens mot sulfametoksazole. Trimetoprim og sulfametoksazole er to antimikrobielle midler som ofte blir brukt sammen i kliniske behandlinger. Dette kan tyde på at noe av resistensen som er funnet i *E. coli* i villrein kan ha oppstått i kliniske miljøer. At RSF1010 og et mulig annet konjugativt plasmid kan være en forløper til *sul2-strA-strB*-sekvensen funnet i denne undersøkelsen er med på å bygge opp under påstanden om at spredning kan føre til nye (multi-) resistens replikoner.

Kontigene med resistensgener fra ulike isolater var svært like, noe som kan tyde på at dette er gener som persisterer i populasjonen. Grunner til dette kan være streptomycin/antibiotika produksjon i miljøet, eller toksin-antitoksin systemer på plasmider som gjør at datterceller uten gjeldende plasmid dør. Noen av stammene kan også være av samme klon eller nært beslektede.

Avslutningsvis er det tre ting som er sikkert: (i) det finnes resistente *E. coli* stammer i villrein, også multiresistente, (ii) resistensen er overførbar og inkluderer plasmider, integroner (med genkassetter) og transposoner, og (iii) liknende sekvenser er funnet i kliniske isolater fra menneske.

5.1 Forslag til videre forskning

Forslag til videre forskning kan være å se nærmere på hvor ofte antibiotikaresistent *E. coli* forekommer, både i Rondane, Nordfjella, Forollhogna og på Svalbard. Det kunne også vært interessant å utføre slike undersøkelser jevnlig for å undersøke hvordan resistensforholdene i naturen utvikler seg. Generelt er det alt for liten kunnskap om antibiotikaresistens i naturen.

Det kan også være interessant å se enda nærmere på de genetiske elementene på kontiger med resistens og prøve å sette sammen kontigene til hele plasmider. Videre hadde det også vært interessant å undersøke kontigene med andre resistensgener som ikke ble tatt opp i denne studien, for eksempel gener for ampicillin-resistens eller tetrasyklin-resistens. Dette kunne gitt et bedre innblikk i utbredelsen av antibiotikaresistensgener.

6 Kilder

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. og Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., og Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics.* 9:75 doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., og Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-477.
- Bjørnholdt, J., Kacelnik, O., Elstrøm, P., Seterelv, S. (2014). Antibiotikaresistens – Folkehelse rapporten 2014. *Fhi.no* <http://www.fhi.no/artikler/?id=111478> Publisert 21.08.14, endret 19.02.14.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. og Madden, T.L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:421, 1471-2105.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Volby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., Hasman, H. (2014). *In Silico* Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(7): 3895–3903.
- Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E. M., Sato, M.I.Z., Gomes, T.A.T, Amaral, L.A. og Ottoboni, L.M.M. (2010). Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology.* 2010, 10:161
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Micro. Biol.* 66 (10): 4555-4558.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., Maas, W. K. (1988). Identification and Classification of Bacterial Plasmids. *Microbiol. Rev.* 52 (3): 375-395.
- D’Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D. (2006). Sampling the Antibiotic Resistome. *Science.* 311 (1): 374-377.
- Davies J. (1994). Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science.* 264 (4): 375-382.

- Davies J. og Davies D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 7 (3): 417-433.
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J., og Woodforda N. (2012). Improved Multiplex PCR Strategy for Rapid Assignment of the Four Major Escherichia coli Phylogenetic Groups. *Journal of Clinical Microbiology.* 50 (9): 3108–3110.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology.* 3 (9): 722-732.
- <http://cran.r-project.org>, R. Server av: Institute for Statistics and Mathematics of WU (Wirtschaftsuniversität Wien).
- Huddlestone, J.R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance.* 7: 167-176.
- Illumina Inc. (2105). Paired-End Sequencing. Lokalisert 20.04.15
http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing_assay.html
- Illumina Inv. (2015). Multiplex sequencing. Lokalisert 23.02.15
<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/multiplexing-sequencing-assay.html>
- Jacoby, G.A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews.* 22 (1): 161-182.
- Johnson, J.R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A.L. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in Escherichia coli. *J Infect Dis* 183:78-88.
- Joklik, W.K. (1996). The Story of Penicillin: The View from Oxford in the Early 1950s. *FASEB j.* 10 (4): 525-528.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (6): 423-435.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine.* 27 (2–3): 95-125.
- Larsen, M.V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M. og Lund, O. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50(4): 1455-1362.
- Liebert, C.A., Hall, R.M., Summers, A.O. (1999). Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63(3): 507-522.
- Lillehaug, A., Bergsjø, B., Schau, J., Bruheim, T., Vikøren, T., Handeland, K. (2005). *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Verocytotoxic Escherichia coli, and Antibiotic

- Resistance in Indicator Organisms in Wild Cervids. *Acta vet. scand.* 46 (1-2): 23-32.
- Madsen, E.L. (2008). Environmental Microbiology: From genomes to biogeochemistry, 2. utgave, 2011. Malden (USA): *Blacwell Publishing Ltd.*
- Magrane, M. Og the UniProt consortium (2011). UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database*, 2011:bar009.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 11 (1): 31-46.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science*. 264 (4): 382-388.
- NORM/NORM-VET (2003). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2004. ISSN:1502-2307
- NORM/NORM-VET (2012). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2013. ISSN:1502-2307
- Novais, A., Baquero, F., Machado, E., Cantón, R., Peixe, L., og Coque, T.M. (2010). International Spread and Persistence of TEM-24 Is Caused by the Confluence of Highly Penetrating Enterobacteriaceae Clones and an IncA/C2 Plasmid Containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(10):825-834.
- Palumbi, S. R. (2001). Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science*. 293 (9): 1786-1790.
- Pankey, G.A. og Sabath L.D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 38 (4): 865.870.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56 (5): 20-51
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in microbiology*. 5 (2): article 3.
- Recchia, G. D., Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *SGM journal*. 141: 3015 - 3027
- Rodloff ,A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P., Müller, E. (2008). Susceptible, Intermediate, and Resistant – The Intensity of Antibiotic Action. *Deutsches Ärzteblatt International*. 105(39): 657-662
- Sanger, F., Nicklen, F. og Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Pnas*. 72 (12): 5463-5467.

- Shendure, J. og Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26 (10): 1135-1145.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard B., Denamur E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57 (3): 1215–1219.
- Slette-meås, J.S. (2006). Antibiotikaresistens hos *Escherichia coli* fra villlevende dyr - med hovedvekt på karakterisering av streptomycinresistens. Hovedfagsoppgave v. NTNU / Veterinærinstituttet.
- Spratt, B. G. (1994). Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations. *Science*. 264 (4): 388-393.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C. og Ploy, M.-C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.*, 3(4): artikkel 119.
- Van Melder, L., De Bast, M.S. (2009). Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLOS Genetics*. 5 (3).
- Villrein.no. Alt Lokalisert 02.03.15. Fakta om villrein: <http://www.villrein.no/fakta-om-villrein/> . Villreinområdene: <http://www.villrein.no/om-villreinomrdene/> . Reinen på Svalbard: <http://www.villrein.no/svalbard/>
- Wang, X., Hao, H., Xu, Z., Zheng, H., Liu, C., Zhang, R., Bi, D., Chen, H. og Tan, C. (2014). Plasmid-mediated multidrug resistance and virulence in an avian pathogenic *Escherichia coli* strain isolated in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2 : 57-68.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2012). Prescott's principles of microbiology, international edition, 1 utgave, 2012. New York (USA): *McGraw-Hill Higher Education*.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., Larsen, M.V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 67(11): 2640-2644.

Vedlegg

Vedlegg 1:

Oppskrifter på medier og løsninger laget av Veterinærinstituttets medieproduksjon

Blodskål

	39,5 g	Blodagar base (Difco Laboratories)
	50 mL	citratblod
	Destillert vann til 1000 mL	
eller		
	40,0 g	Blodagar base (Oxoid)
	70 mL	citratblod
	Destillert vann til 1000 mL	
eller		
	40,0 g	Blodagar base (Merck KGaA)
	50-80 mL	citratblod
	Destillert vann til 1000 mL	

Citratblod

400 mL	0,106 M citratløsning
4,0 L	storfeblod

Fysiologisk saltvann (0,9 %):

9,0 g	NaCl, p.a.
1000 mL	destillert vann

Luria agar med 20 mg/ml nalidiksinsyre

	37,0 g	LB Agar (Merck KGaA)
	1000 mL	destillert vann
eller		
	40,0 g	LB Agar (Difco Laboratories)
	1000 mL	destillert vann

Tilsett nalidiksinsyre fra stockløsning til konsentrasjon 20 mg/ml.

Luria-Bertani (LB) buljong:

25,0 g	LB – buljong (Difco Laboratories eller Merck KGaA)
1000 mL	destillert vann

Muller-Hinton buljong, kationjustert

21,0 g	Mueller-Hinton Broth (Difco Laboratories, Oxoid eller Merck KGaA)
1000 mL	destillert vann

Mueller-Hinton skåler

38,0 g	Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, Oxoid eller Merck KGaA)
1000 mL	destillert vann

Mueller-Hinton skåler med 20 mg/mL nalidixinsyre

Samme oppskrift som for Mueller-Hinton skåler, men tilsett nalidixinsyre fra stockløsning til konsentrasjon 20 mg/mL.

Vedlegg 2:

Veterinærinstituttets nummerering	Nummer brukt i denne oppgaven
Villrein Forollhogna	
2003-10-609	1
2003-10-668	2
2003-10-670	3
2003-10-673	4
2003-10-681	5
2003-10-691	6
2003-10-701	7
Svalbard Rein	
2010-01-5555-AMP	8
2010-01-5562-STR32	9
Svalbard Rein	
2011-01-8038-1-STR32	10
2011-01-8038-2-STR32	11
2011-01-8038-5-TET	12
2011-01-8038-13-TET	13
2011-01-8038-14-TET	14
2011-01-8208-1-SUL	15
2011-01-8208-4-STR32	16
2011-01-8208-6-AMP	17
2011-01-8208-7-TET	18
2011-01-8208-11-AMP	19
2011-01-8208-12-AMP	20
2011-01-8597-8-TET	21
Villrein Forollhogna og Rondane	
2012-01-5587	23
2012-01-5723-S30	24
2012-01-5729-S30	25
2012-01-5882-S30	30
2012-01-5888-S30	32
2012-01-6097	35
2012-01-6375	38
2012-01-6513	42
Villrein Forollhogna og Rondane	
Ikke-resistente	
2012-01-5584	22
2012-01-5730	26
2012-01-5738	27
2012-01-5746	28

2012-01-5879	29
2012-01-5888	31
2012-01-6012	33
2012-01-6017	34
2012-01-6098	36
2012-01-6239	37
2012-01-6378	39
2012-01-6380	40
2012-01-6511	41
2012-01-6516	43
2012-01-6577	44

De fire første sifrene i Veterinærinstituttets nummerering viser hvilket årstall stammen ble isolert. Dersom to eller flere stammer har det samme 10-sifferede tallet er de isolert fra samme individ. Er nummereringen avsluttet med tre bokstaver med eller uten tall bak, markerer det at stammen er isolert fra skål med antibiotika. AMP = ampicilling, STR32 = streptomycin 32 µg, TET = tetrasyklin, SUL = sulfametoksazol.

Vedlegg 3:

MIC-verdier

Minste hemmende konsentrasjon (MIC), Verdier oppgitt i mg/L														
Stamme	Ampicillin	Enrofloxacin	Nalidixinsyre	Gentamicin	Streptomycin	Oxytetracyklin	Florfenikol	Neomycin	Sulfametoxazole	Trimetoprim	Kloramfenikol	Amoxicillin/Klavulan	Ceftiofur	
1	2	0,06	2	1	64	1	8	≤ 2	≤ 16	0,5	8	4	0,5	
2	2	0,06	4	≤ 0,05	64	> 64	≤ 4	≤ 2	> 2048	0,5	4	4	0,5	
3	2	0,06	2	1	128	1	8	≤ 2	≤ 16	≤ 0,25	4	4	0,5	
4	2	0,06	2	≤ 0,5	128	1	≤ 4	≤ 2	≤ 16	0,5	4	≤ 2	0,5	
5	2	0,06	4	≤ 0,5	256	2	≤ 4	≤ 2	≤ 16	0,5	4	4	0,5	
6	2	≤ 0,03	2	1	64	> 64	≤ 4	≤ 2	> 2048	0,5	4	≤ 2	0,5	
7	2	0,06	4	1	128	> 64	8	≤ 2	> 2048	0,5	8	4	0,5	
	Ampicillin	Ciprofloxacin	Nalidixinsyre	Gentamicin	Streptomycin	Tetracyklin	Florfenikol	Kolistin	Sulfametoxazole	Trimetoprim	Kloramfenikol	Kanamycin	Cefotaxim	Ceftazidim
8	>128	0,03	4	1	8	16	8	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,12	1
9	>128	0,06	2	1	>256	64	≤ 4	≤ 0,5	>1024	>16	4	≤ 8	0,12	0,5
10	> 128	0,06	4	0,5	128	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	> 1024	> 16	≤ 2	≤ 8	0,12	1
11	64	0,06	8	1	256	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	1024	> 16	≤ 2	≤ 8	0,06	0,5
12	4	0,06	4	0,5	4	64	≤ 4	≤ 0,5	> 1024	0,25	≤ 2	≤ 8	0,06	≤ 0,25
13	> 128	0,03	4	0,5	8	8	≤ 4	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,12	≤ 0,25
14	≤ 1	0,06	4	1	4	32	≤ 4	1	≤ 8	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,12	≤ 0,25
15	≤ 1	0,06	2	1	4	≤ 1	≤ 4	1	≤ 8	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,06	≤ 0,25
16	128	≤ 0,015	≤ 14	1	> 256	≤ 2	≤ 4	≤ 1	1024	> 32	≤ 8	≤ 8	≤ 0,25	≤ 0,5
17	> 128	0,06	4	1	4	≤ 1	≤ 4	1	≤ 8	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,12	0,5
18	4	0,06	4	0,5	4	64	≤ 4	1	1024	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,12	0,5
19	32	0,06	2	0,5	≤ 2	≤ 1	≤ 4	1	16	0,25	≤ 2	≤ 8	0,12	0,5
20	> 128	0,06	2	1	8	≤ 1	≤ 4	1	≤ 8	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,25	0,5
21	> 128	0,03	2	1	8	32	≤ 4	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,12	≤ 2	≤ 8	0,06	≤ 0,25
23	2	0,06	4	0,5	128	2	8	≤ 0,5	≤ 8	0,25	4	≤ 8	0,12	0,5
24	2	0,06	4	0,5	128	2	8	≤ 0,5	32	0,5	8	≤ 8	0,12	≤ 0,25
25	2	0,06	4	1	>256	≤ 1	8	≤ 0,5	32	0,25	4	≤ 8	0,12	≤ 0,25
30	>128	0,03	2	1	256	32	8	≤ 0,5	>1024	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
32	2	0,06	4	0,5	128	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	16	0,25	4	≤ 8	0,06	0,5
35	64	0,03	≤ 1	0,5	128	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	32	0,25	4	≤ 8	0,5	4
38	≤ 1	0,016	≤ 1	0,5	128	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	16	0,25	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
42	>128	0,03	2	0,5	>256	32	≤ 4	≤ 0,5	>1024	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
22	4	0,03	4	0,5	4	2	8	≤ 5	16	0,25	8	≤ 8	0,06	0,5
26	2	0,03	2	1	8	2	≤ 4	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,12	0,5
27	2	0,06	4	0,5	4	2	8	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,12	8	≤ 8	0,12	0,5
28	≤ 1	0,06	2	0,5	4	2	≤ 4	≤ 0,5	16	0,25	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
29	4	0,03	2	0,5	4	2	≤ 4	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
31	2	0,06	4	0,5	4	2	8	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
33	4	0,06	2	1	8	2	8	≤ 0,5	8	0,5	8	≤ 8	0,12	0,5
34	≤ 1	0,06	2	0,5	4	2	≤ 4	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
36	4	0,06	2	0,5	4	2	≤ 4	≤ 0,5	64	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
37	≤ 1	0,03	2	0,5	4	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	≤ 8	0,25	≤ 2	≤ 8	0,03	≤ 0,25
39	2	0,03	4	1	8	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	64	1	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
40	2	0,03	2	1	8	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	32	0,25	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
41	≤ 1	0,03	2	0,5	8	≤ 1	8	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
43	≤ 1	0,03	2	0,5	4	≤ 1	≤ 4	≤ 0,5	≤ 8	≤ 0,12	4	≤ 8	0,06	≤ 0,25
44	2	0,03	2	1	4	2	≤ 4	≤ 0,5	32	0,5	4	≤ 8	0,12	≤ 0,25

Vedlegg 4:

Inc grupper og resistensgener med kontigen det ble funnet på i parentes

Stamme	PlasmidFinder	ResFinder
	Plasmid Inc-gruppe (kontig)	Resistensgen (kontig)
1	FIB(AP001918)(46), FII(42), I1(25)	strA(25), strB(25)
2	FIB(pB171)(59), P(35), FII(pCoo)(38), I1(44)	AadA1(35), sul1(35), tet(A)(35)
3	FIB(AP001918)(53), FII(pSE11)(59)	strA(68), strB(68)
4	FIB(AP001918)(70), FII(pSE11)(36)	StrA(18), strB(18)
5		StrA(28), strB(28)
6	FII(91)	strA(99), strB(99), sul2(99), tet(B)(92)
7	FII(27)	strA(94), strB(94), sul2(94), tet(B)(86)
8	FIB(AP001918)(76), FII(42)	blaTEM-1C(75), tet(A)(75)
9	FIB(AP001918)(119), FII(30), Q1(69)	strA(69), strB(69), aadA1(69), blaTEM-1B(149), sul1(69), sul2(69), tet(A)(98), dfrA1(69)
10	FIB(AP001918)(99), FII(61), Q1(125)	strA(110), strB(110), blaTEM-1B(115), sul2(110), dfrA5(106)
11	FIB(AP001918)(172), FII(150), Q1(166)	strA(166), strB(166), blaTEM1B(200), sul2(166), dfrA5(149)
12	FIB(AP001918)(103), FII(112), FIC(112)	sul2(82), tet(B)(100)
13	FIB(AP001918)(103), FII(43)	blaTEM-1C x2 %8, 58), tet(A)(58)
14	FIB(AP001918)(99), FII(121), FIC(121), FIA(55)	tet(A)(60)
16	FIB(AP001918)(102), FII(91), Q1(135)	strA(117), strB(117), blaTEM-1B(127), sul2(117), dfrA5(67)
17	FII(pCoo)(169), I1(93)	blaTEM-1B(134)
18	FIB(AP001918)(71), FII(pCoo)(67)	sul2(39), tet(B)(64)
20	FII(53), FIB(AP001918)(45)	blaTEM-1C(36)
21	FII(43), FIB(AP001918)(65)	blaTEM-1C(48)
23	Y(252), FIB(AP001918)(117)	
24	FIB(AP001918)(151), FII(pCoo)(102)	strA(80) strB(80)
25	Col156 (2 stk) (115, 111)	StrA(91), strB(91)
30	P(127), Q1(122)	strA(122), strB(122), blaTEM-1B(150), sul2(122), tet(A)(127)
32	Col156(803)	
35		StrA(75), strB(75)
38		StrA(48), strB(48)
42	I1(75), Q1(103), P(68)	strA(103), strB(103), blaTEM-1B(124), sul2(103), tet(A)(68)
22	I1, FIB(AP001918), FII(pCoo)	ingen
26	FII(29), FIB(AP001918)	ingen
27	FIB(AP001918), FII(29), I1	ingen
28	FIB(AP001918), FII(29)	ingen
29	FII(pCoo)	ingen
31	FIA, FII	ingen
33	FIB(AP001918)	ingen
34	FIB(AP001918), FII(pSE11)	ingen
36	FII(29)	ingen
37	Y, FII(pCoo), FIB(pB171), I1	ingen
39	FII(29)	ingen
40	FIB(pB171), FII(pCoo)	ingen
41	FIB(AP001918)	ingen
43	FIB(AP001918), FII, FII(pCoo)	ingen
44	FIB(AP001918)	ingen



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no