



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Screening av miljøprøver for bredspektrede β -laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser

Screening for broad-spectrum β -lactamase-containing bacteria (ESBL and carbapenemases) in environmental samples by using molecular and phylogenetic investigation methods

Maria Støle
Mastergrad i Matvitenskap

FORORD

Denne masteroppgaven utgjør 30 studiepoeng og er skrevet som en avslutning på et femårig studie i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Masteroppgaven ble påbegynt i januar 2017 og avsluttet i mai 2017.

Det har vært både spennende og lærerikt å få muligheten til å jobbe med temaet antibiotikaresistens. Jeg har stor tro på at arbeidet med masteroppgaven er en god erfaring som jeg kommer til å ha stor nytte av senere i livet.

Alt arbeidet på laboratoriet ble gjennomført i samspill med to andre medstudenter ved NMBU, Elahe Abbasi og Maria Linnèa Simonsen. Tusen takk til dere begge to for et godt og hyggelig samarbeid. Takk til overingeniør Ahmed Abdelghani og postdoktor Davide Porcellato ved KBM for god veiledning og hjelp på laboratoriet. Tusen takk til min hovedveileder professor Bjørn-Arne Lindstedt og min tilleggsveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie ved KMB, som begge to har tålmodig svart på spørsmål og gitt god oppfølging underveis i skriveprosessen. Takk for både hjelpsomme tilbakemeldinger og konstruktiv kritikk.

Jeg vil også takke mine gode venner på lesesalen på Sørhellinga som har fylt studiehverdagen min med mye glede og latter, og som har stilt opp ved å gi meg gode råd på veien. Helt til sist (men slettes ikke minst) vil jeg også rette en kjempestor takk for all moralsk støtte, tilbakemeldinger, oppmuntrende og gode ord fra min kjære samboer Vegard, mamma, pappa, søsknene mine, venner og resten av familien min. Jeg hadde ikke klart meg uten dere alle sammen!

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2017

Maria Støle

ABSTRACT

Background: The increase in antibiotic resistant bacteria is a major global threat against public health. Especially concerning is the elevated prevalence of multidrug resistance among clinically significant bacteria, such as extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Gram-negatives in the *Enterobacteriaceae* family. These bacteria are resistant against some of the most important antibiotics globally; the β -lactams. Much of the knowledge on antibiotic resistance is based on studies of clinical samples. To achieve a comprehensive understanding of antibiotic resistance, it is considered necessary to focus more on research targeting natural environments such as soil.

Purpose: The main goals of this master thesis were (i) to search for ESBL-holding bacteria in soil, (ii) to determine the bacterial genera being resistant to β -lactam antibiotics, including carbapenem and (iii) to search for possible resistance mechanisms related to the occurrence of ESBL-genes in bacterial samples with ESBL-phenotypic resistance.

Method: Selective chromogenic media was used to grow and differentiate bacteria with the ESBL-phenotype. The identity of the isolates was then determined with 16S rRNA Sanger-sequencing method. A possible ESBL-genotype was established by screening for some of the most prevalent ESBL_A- and ESBL_{KARBA}-genes, using Multiplex PCR and agarose gel electrophoresis. Nanopore-sequencing technology was used to verify any such findings. The study of microbial diversity was based on 16S rRNA sequencing with Illumina MiSeq, of DNA extracted directly from soil samples.

Results: Selective growth indicated the presence of 16 multidrug resistant bacterial isolates with ESBL-phenotype, including some with ESBL_{KARBA}-phenotypical resistance. Seven of the resistant isolates were identified either as *Pseudomonas* spp. (n=2), *Bordetella* spp. (n=3) or *Serratia* spp. (n=2). Based on Multiplex PCR, three of these seven isolates were shown to have ESBL-type genes. Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Bordetella* spp. contained the ESBL_A-gene *bla*_{SHV}, while one of the isolate of *Serratia* spp. contained the ESBL-genes *bla*_{KPC} and *bla*_{TEM}. Some of these findings became verified with whole-genome sequencing. The microbial diversity study indicated that the samples from Niagara had a somewhat higher prevalence of *Pseudomonas* spp., while it was no indication of any domination of a certain bacterial species in the soil samples from Veterinærjordet (nord).

Conclusion: In this study ESBL-producing Gram-negative bacteria related to clinical significant species, were found in randomly selected soil samples. These findings emphasize the importance of exploring the environmental soil bacteria, as they are possible reservoirs of antibiotic resistance genes and other resistance mechanisms.

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Antibiotikaresistens er et økende globalt helseproblem. Særlig alvorlig er økt forekomst og spredning av multiresistens blant klinisk relevante bakterier, som ESBL-produserende Gram-negative bakterier i familien *Enterobacteriaceae*. Disse bakteriene er resistente mot noen av de viktigste og mest brukte antibiotika på verdensbasis, nemlig β -laktamantibiotika. Kunnskap om antibiotikaresistens er ofte basert på studier av kliniske isolater. For å oppnå en mer helhetlig forståelse av antibiotikaresistens bør forskningen rettes mer mot naturlige miljø, som jord.

Hensikt: Hovedmålene med denne masteroppgaven var (i) å screene etter ESBL-holdige bakterier i jord, (ii) å bestemme slektskapet til isolat med bredspektrert resistens mot β -laktamantibiotika, inkludert karbapenem og (iii) å kartlegge mulige resistensmekanismer knyttet til tilstedeværelse av ESBL-gener i bakterieisolat med ESBL-fenotypisk resistens.

Metode: Det ble brukt selektiv kromogen agar både for å dyrke frem bakterier med ESBL-fenotypisk resistens, i tillegg til å differensiere mellom bakterier basert på kolonifarge. Sanger-sekvensering av 16S rRNA ble brukt som metode for å verifisere og å fastslå identiteten til bakterier med ESBL-fenotypisk resistens fra selektiv kromogen agar. For å screene etter ESBL-gener i jordbakterier ble det brukt Multiplex PCR med primerpar tilpasset påvisning av de mest utbredte ESBL_A- og ESBL_{KARBA}-genene. Agarose gelelektroforese ble brukt for å synliggjøre eventuelle funn. Resultater fra Nanopore-sekvensering ble brukt for å bekrefte funn fra Multiplex PCR og Sanger-sekvensering. For å kartlegge den mikrobielle diversiteten i prøvene ble DNA ekstrahert direkte fra jord, og 16S rRNA fra DNA-templat ble sekvensert med Illumina MiSeq.

Resultater: Med selektiv oppdyrking ble det isolert totalt 16 multiresistente bakterier med ESBL-fenotypisk resistens, inkludert bakterier med ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens. Syv av disse isolatene ble identifisert enten som *Pseudomonas* spp. (n=2), *Bordetella* spp. (n=3) eller *Serratia* spp. (n=2). Totalt tre av de syv isolatene var ESBL-holdige ifølge Multiplex PCR. I *Pseudomonas* spp. og *Bordetella* spp. ble ESBL_A-genet *bla*_{SHV} påvist, og i *Serratia* spp. ble ESBL-genene *bla*_{KPC} og *bla*_{TEM} påvist. Med helgenomsekvensering ble noen av disse funnene bekreftet. Mikrobiotasekvensering indikerte en relativt stor forekomst av *Pseudomonas* spp. i prøver fra Niagara, mens det i Veterinærjordet (nord) var jevnere forekomster av bakterier.

Konklusjon: Denne studien påviste tilstedeværelsen av ESBL-produserende Gram-negative bakterier i jord, med slektskap til klinisk signifikante bakterier. Funnene kan brukes som utgangspunkt for videre forskning ettersom de understreker behovet for økt fokus på studier rettet mot resistens i miljøet, inkludert jordbakterier som mulige reservoar for antibiotikaresistens og antibiotikaresistente gener.

FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

AmpC	Ampicillinase C (β -laktamase av ESBL _{M-C} -type)
AR	Antibiotikaresistens
ARG	Antibiotikaresistente gener
BHI	Brain Heart Infusion
<i>bla</i>	β -laktamase gener
bp	Basepar
BR	Broad-range
CRE	Carbapenem-resistant <i>Enterobacteriaceae</i>
CPE	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>
CTX-M	Cefotaxime-Munich (β -laktamase av ESBL _A -type)
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotid
ddNTP	Dideoksynukleotid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ESBL	Extended spectrum β -laktamase
ESBL _A	Ambler klasse A ESBL
ESBL _{KARBA}	ESBL med hydrolytisk aktivitet mot karbapenem-antibiotika (delt inn i ESBL _{KARBA-A} , ESBL _{KARBA-B} og ESBL _{KARBA-D})
ESBL _M	Miscellaneous ESBL (delt inn i ESBL _{M-C} og ESBL _{M-D})
FHI	Folkehelseinstituttet
HGT	Horisontal gene transfer
HOD	Helse- og omsorgsdepartementet
HS	High sensitivity

IMP	Impenemase (ESBL _{KARBA-B})
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (ESBL _{KARBA-A})
MBL	Metallo- β -lactamase (ESBL _{KARBA-B})
MGE	Mobile genelementer
MIC	Minimal inhibitory concentration (=minste hemmende konsentrasjon)
MRSA	Meticillinresistente gule staphylokokker (<i>Staphylococcus aureus</i>)
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
NCBI	National Center for Biotechnology Information Search database
NDM	New Delhi metallo- β -lactamase (ESBL _{KARBA-B})
NGS	Next Generation Sequencing
NMBU	Norges- miljø og biovitenskapelige universitet
NORM	Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	NORM - Veterinær
OXA	Oxacillinase (β -laktamase/ESBL _{M-D} og ESBL _{KARBA-D})
PBP	Penicillin-bindende protein
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
ST	Sekvenstype
TAE	Tris-acetat-EDTA (buffer)
SHV	Sulfhydryl-variable (β -laktamase/ESBL _A)
TEM	Temoneira (β -laktamase/ESBL _A)
VIM	Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (ESBL _{KARBA-B})
WHO	World Health Organization

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD.....	I
ABSTRACT	II
SAMMENDRAG	III
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER	IV
1 INTRODUKSJON	1
1.1 Om antibiotika	3
1.2 Antibiotikaforbruk	5
1.3 Antibiotikaresistens	8
1.4 Forekomst og spredning av antibiotikaresistens i miljøet	15
1.5 Forebyggende tiltak	19
1.6 Metoder brukt for screening etter ESBL-holdige bakterier i jord	20
2 MATERIALER OG METODER	26
2.1 Illustrasjon over metoder og prosesser	26
2.2 Utstyr	28
2.3 Jordprøver	28
2.4 Dyrkningsbasert ESBL-fenotypisk deteksjon av multiresistente isolat	29
2.5 Molekylær karakterisering av ESBL-genotyper	31
2.6 16S rRNA Sanger-sekvensering av DNA-templat fra koloni	35
2.7 Helgenomsekvensering med Nanopore-sekvensatoren MinION	38
2.8 Mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq	39
2.9 Kvantifisering av isolert DNA med NanoDrop og Qubit®	40
2.10 Mikrobiotasekvensering av 16S rRNA med Illumina MiSeq	41
3 RESULTATER	45
3.1 Dyrkningsbasert ESBL-fenotypisk deteksjon av multiresistente isolat	45
3.2 Molekylær karakterisering av ESBL-holdige bakterier	48
3.3 Mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq	54
4 DISKUSJON	61
4.1 Dyrkningsbasert ESBL-fenotypisk deteksjon av multiresistente isolat	61
4.2 Identifisering av bakterier med ESBL-fenotypisk resistens	65
4.3 Molekylær karakterisering av ESBL-produserende bakterier	68

4.4	16S rRNA mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq.....	83
4.5	Forslag til videre forskning.....	86
5	KONKLUSJON	88
6	LITTERATURLISTE	90
	VEDLEGG	i
	Vedlegg A	i
	Vedlegg B.....	ii
	Vedlegg C.....	iii
	Vedlegg D	ix
	Vedlegg E.....	xi

1 INTRODUKSJON

Økt forekomst og spredning av antibiotikaresistente bakterier er et eskalerende helseproblem. I Europa dør omtrent 25 000 mennesker årlig på grunn av infeksjoner forårsaket av multiresistente patogene bakterier (ECDC & EMEA 2009). Ifølge Verdens Helseorganisasjon (WHO) betegnes dette som en av de største truslene mot den globale folkehelsen i vår tid (WHO 2016). Antibiotikaresistens kan være iboende eller ervervete egenskaper hos bakterier. Et altfor høyt forbruk og misbruk av antibiotika har bidratt til spredning og utvikling av resistens ved å selektere for antibiotikaresistente bakterier.

Totalt seks antibiotikaresistente patogene mikroorganismer betraktes som særlig helsefarlige; (i) vankomycinresistente enterokokker (VRE), (ii) meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), (iii) *Aspergillus*-arter, (iv) *Acinetobacter baumannii*, (v) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) og (vi) ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* (Slama 2008). De to sistnevnte er Gram-negative bakterier som i økende grad har utviklet resistens (Slama 2008). På grunn av manglende tilgang til ny antibiotika vil sannsynligvis problemene og utfordringene med å behandle infeksjoner med multiresistente bakterier bli enda større i fremtiden.

β -laktamantibiotika er et av de viktigste og mest brukte antibiotika i hele verden. Resistens mot β -laktamantibiotika eksisterte allerede før introduksjonen av penicillin (Bradford 2001). Økt forekomst og spredning av ESBL-produserende, sykdomsfremkallende Gram-negative bakterier som tilhører familien *Enterobacteriaceae* er en svært viktig del av resistensproblematikken (Iredell et al. 2016). Dette skyldes at ESBL-er kan gi resistens mot et bredt spekter av de mest brukte β -laktamantibiotika. Noen av de mest klinisk signifikante bakteriene er *Escherichia coli* (*E. coli*) og medlemmer i KESC-gruppen *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. og *Citrobacter* spp. (Iredell et al. 2016).

Det finnes flere ulike resistensmekanismer mot β -laktamantibiotika, men produksjon av forskjellige varianter av hydrolyserende enzymer som β -laktamaser er en av de viktigste (Gazin et al. 2012; Larsen et al. 2012). ESBL-ene Temoneira β -laktamase (TEM) og «Sulfhydryl-variable» β -laktamase (SHV) har vært svært utbredt tidligere, men slik situasjonen er i dag har varianter av Cefotaxime-Munich β -laktamase (CTX-M) størst global forekomst i familien *Enterobacteriaceae* (Bajaj et al. 2016). β -laktamantibiotika, som tilhører gruppen karbapenem, har vært et av få gjenværende behandlingsalternativer mot Gram-negative ESBL-produserende bakterier (Bajaj et al. 2016). Økt forekomst av ESBL- og Ampicillinase C (AmpC) β -laktamase-produserende *Enterobacteriaceae* har resultert i høyere karbapenem-forbruk. Over tid har dette ført til utvikling og mer utbredt spredning av resistens mot karbapenem på grunn av karbapenemase-produksjon

(Gazin et al. 2012). Karbapenemaser er hydrolyserende ESBL_{KARBA}-enzymmer som deles inn i gruppene; *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaser (KPC), oxacillicin-hydrolyserende (OXA) og metallo β -laktamaser (MBL) (Bajaj et al. 2016). KPC-produserende *Enterobacteriaceae* har stor global utbredelse, men de siste årene har også spredningen av New Dehli metallo-betalaktamasen (NDM) og OXA-48 økt (Albiger et al. 2015; Iredell et al. 2016). Bakterier som er ESBL_{KARBA}-produserende er resistente mot alle β -laktamantibiotika.

Kartlegging av forekomster av antibiotikaresistens og antibiotikaresistente gener kommer stort sett fra kliniske bakterieprøver fra sykdomsrammede pasienter. Foreløpig er det lite kunnskap om hvor utbredt antibiotikaresistens er hos bakterier som lever ellers i miljøet (Allen et al. 2010). Det er et stadig økende behov for å bedre forstå hvordan resistens mot antibiotika oppstår og spres i omgivelsene våre (Kümmerer 2004). Nyere studier indikerer at miljøbakterier spiller en sentral rolle i økt forekomst og økt spredning av antibiotikaresistens (Ben Said et al. 2015; Heuer & Smalla 2007; Kümmerer 2004; Nwosu 2001; Pitondo-Silva et al. 2016; Wright 2010). Det er vist at bakteriene i miljøet er potensielle reservoarer for naturlige eller ervervede resistensegenskaper, men det er manglende kunnskap om deres påvirkning til spredning til klinisk signifikante bakteriene (Allen et al. 2010). Noen resistensgener er svært flyttbare på grunn av at de sitter på mobile genelementer som kan spres via horisontal genoverføring (HGT) mellom bakteriene (Allen et al. 2010; Heuer & Smalla 2007). Dette kjennetegner ofte gener som koder for β -laktamaser i Gram-negative bakterier (Pitondo-Silva et al. 2016). Mobile genelementer kan bidra til at resistensgener både kan spres mellom nært eller fjernt beslektede, patogene eller apatogene bakterier (Riesenfeld et al. 2004; Wright 2010). Økt forekomst av miljøbakterier som er bærere av resistensgener bør betraktes som en del av resistensproblemet på bakgrunn av at de enten indirekte eller direkte utgjør en potensiell helserisiko. Det er derfor et stort behov for mer helhetlig kartlegging av resistens som innebærer å forstå mer om hvordan resistens oppstår, utvikles og spres i naturen og omgivelsene våre (HOD 2015). Mer kunnskap, bedre kartlegging og bedre overvåkning av resistens innen dette området kan bidra til effektive, forebyggende og helsefremmende tiltak.

Faglig interesse, ønske om å forbedre kunnskap om temaet og å bidra til å styrke kartleggingen av resistente bakterier i miljøet er motivasjonen for denne masteroppgaven. Hensikten var å undersøke forekomsten av ESBL-holdige bakterier i jord, som er lite utprøvd i Norge fra før av. Det ble søkt etter bakterier med ESBL-fenotypisk resistens for å sjekke om disse var bærere av noen av de mest utbredte ESBL-genene. For å tilnærme seg denne problemstillingen ble det brukt både fenotypiske dyrkningsmetoder og DNA-baserte genotypiske metoder. Raske og pålitelige påvisningsmetoder er en forutsetning for forskning på antibiotikaresistens. Både generelt dyrkingsmedium og selektive kromogene medier ble brukt til å lete etter ESBL-produserende bakterier (som

inkluderer ESBL_{KARBA}-produserende bakterier). De selektive mediene er først og fremst tilpasset vekst av Gram-negative bakterier med ESBL-fenotypisk resistens. For å kartlegge ESBL-genotypisk resistens ble DNA ekstrahert fra oppdyrkede bakterier i både generelt medium og fra rendyrkede, multiresistente bakteriekolonier på selektivt kromogent medium. Multiplex PCR og agarose gelelektroforese ble brukt for å undersøke DNA-templatene for å forsøke å finne utvalgte ESBL-gener i form av (i) ESBL_A-genene *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} (gruppe 1, 2 og 9) og (ii) ESBL_{KARBA}-genene *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} og *bla*_{NDM}. DNA fra rendyrkede bakteriekolonier med ESBL-fenotypisk resistens ble i tillegg sekvensert med tradisjonell 16S rRNA Sanger-sekvensering for å bestemme taksonomisk tilhørighet og identitet. De samlede resultatene ble til slutt sammenlignet med funn fra Nanopore-sekvensering. Mikrobiell diversitet i jordprøvene ble kartlagt fra bakterielt DNA som ble ekstrahert direkte fra jord, uten oppdyrking. DNA-templatene ble sekvensert med 16S rRNA mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq, som tilhører neste generasjons sekvenseringsmetoder (NGS).

1.1 Om antibiotika

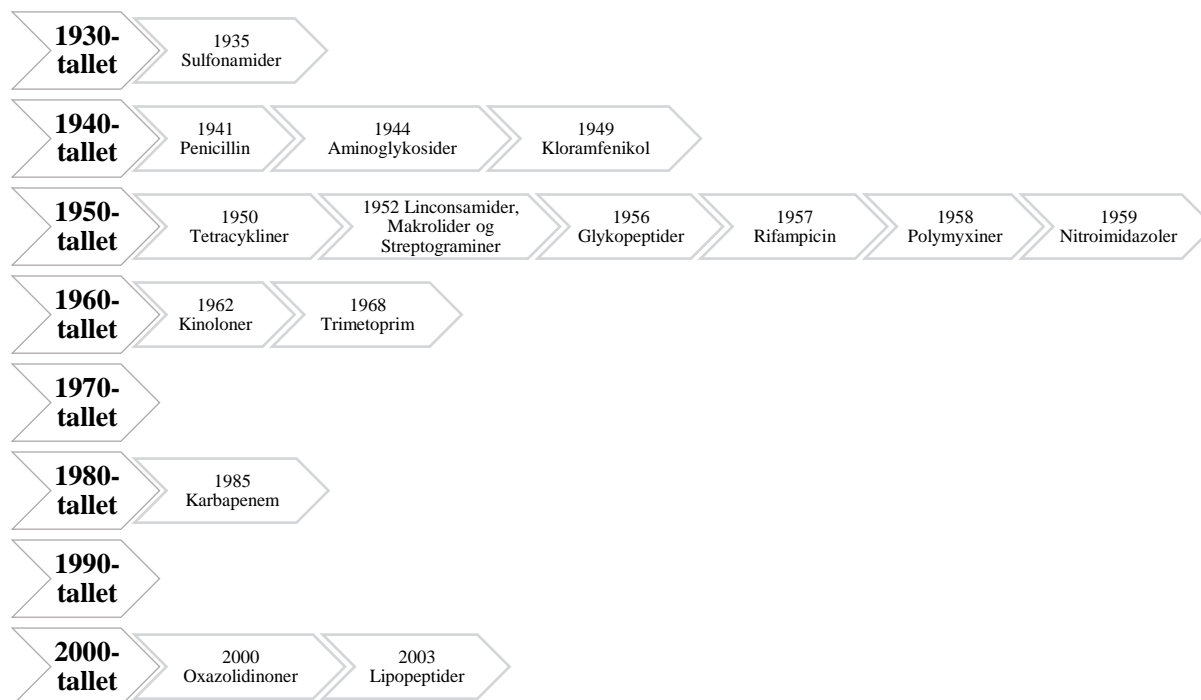
Antibiotika er et antimikrobielt middel som dreper eller inhiberer vekst av bakterier. Som legemiddel brukes antibiotika til behandling og forebygging av sykdom og smitte fra patogene bakterier (Kong et al. 2010). Før antibiotika ble oppdaget fantes det få behandlingsalternativer for pasienter med bakterielle infeksjoner, og disse sykdommene var ofte assosiert med høy dødelighet og stor smittefare. Derfor revolusjonerte oppdagelsen av antibiotika på begynnelsen av 1900-tallet den medisinske verden, noe som reduserte dødeligheten og ga økt levetid.

Antibiotika klassifiseres i ulike kategorier basert på virkningsmekanismer, strukturell oppbygning, toksisitet og virkningsspektrum. Type antibiotika blir blant annet gruppert etter hvilke deler av bakteriene eller hvilke cellulære systemer de påvirker, og om de hemmer vekst eller dreper bakterier (Kohanski et al. 2010). Viktige hovedgrupper av antibiotika er (Iredell et al. 2016; Kohanski et al. 2010):

- De som inhiberer celleveggsyntesen (f.eks. β -laktam, glykopeptider)
- De som inhiberer proteinsyntesen (f.eks. tetrasykliner, makrolider, aminoglykosider)
- De som inhiberer syntesen av folsyre (f.eks. sulfonamider)
- De som inhiberer syntesen av DNA/RNA (f.eks. kinoloner)

Et av de første antibiotika som ble oppdaget var β -laktam antibiotikumet penicillin (figur 1.1). Det var den skotske bakteriologen Alexander Fleming som i 1928 gjorde den store oppdagelsen. I etterkant har flere andre klasser av antibiotika, både naturlige, syntetiske og delvis syntetiske blitt oppdaget (figur 1.1). Vanligvis blir resistente bakterier detektert kort tid etter introduksjonen

av ett nytt antibiotikum til klinisk bruk (Allen et al. 2010; Iredell et al. 2016). Antibiotikabehandling av infeksjoner som skyldes humanpatogene bakterier vil derfor direkte påvirke i hvilken grad sykdomsfremkallende bakterier utvikler resistens mot antibiotika (Allen et al. 2010). En av de viktigste forutsetningene for effektiv behandling av bakterielle infeksjonen er fremdeles å ha et bredt utvalg av antibiotika. Dagens behandlingsalternativ blir i dag satt på prøve på grunn av økt forekomst av antibiotikaresistente humanpatogene bakterier, samtidig som at tilgangen på ny antibiotika har avtatt.



Figur 1.1 Historisk tidslinje som viser årstallet når nye klasser av antibiotika ble introdusert (Powers 2004).

Etter at trimetoprim ble oppdaget i 1968 (figur 1.1) har det vært en kraftig nedgang i funn av nye antibiotikaklasser (Powers 2004). Dette skyldes blant annet at den farmasøytiske industrien har redusert sin satsing på forskning og utvikling av nye antimikrobielle legemidler. Av de nye agentene som har blitt introdusert er flere av disse kjemiske modifikasjoner av antibiotika som allerede er i bruk. Bakteriene vil ofte raskere gjenkjenne og utvikle resistens mot disse (Iredell et al. 2016). En konsekvens av å pådra seg infeksjon med resistente eller multiresistente bakterier er at det er vanskeligere å behandle disse sykdommene. Allerede i dag fins det eksempler på infeksjonssykdommer som er blitt mer utfordrende å behandle, som for eksempel blodforgiftning, lungebetennelse, tuberkulose og gonoreé (WHO 2016). I fremtiden vil stadig flere dø fordi det ikke finnes antibiotika eller andre behandlingsalternativer. Risikoen for sykdom og død ved andre medisinske behandlinger vil også øke, som for eksempel ved organtransplantasjoner, cellegiftbehandlinger,

behandlinger på intensivavdelinger og ved kirurgiske inngrep (WHO 2016). Disse pasientgruppene er ofte fysisk svekket og pådrar seg raskere bakteriesykdommer. Andre sårbare befolkningsgrupper er eldre, barn og personer med kroniske lidelser og svekket immunforsvar. Antibiotikaresistens er også en samfunnsøkonomisk utfordring på grunn av lengre og mer kostbare behandlinger av pasienter. I rapporten «The Bacterial Challenge: time to react» fra 2009 estimerer organisasjonen, European Center of Disease Prevention and Control (ECDC) at infeksjoner med antibiotikaresistente bakterier bidrar til 1,5 milliarder euro årlig i ekstra helsekostnader (ECDC & EMEA 2009). For å møte den helsemessige utfordringen resistente, patogene bakterier utgjør vil det alltid være et kontinuerlig behov for nye behandlingsalternativer (ECDC & EMEA 2009).

1.1.1 β -laktamantibiotika

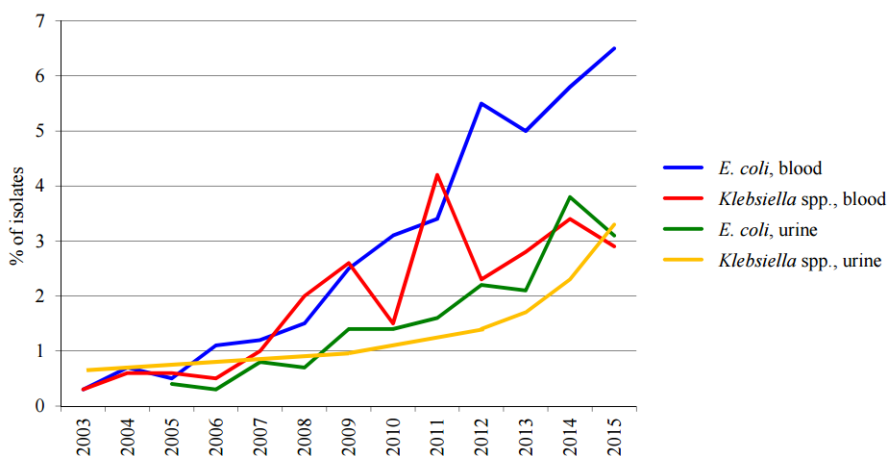
β -laktamantibiotika er et av de mest brukte medikamentene som finnes i verden og viktig for infeksjonsbehandling av Gram-negative bakterier, som *Enterobacteriaceae* (Bajaj et al. 2016). Økt resistens mot β -laktamantibiotika er derfor et stort problem. β -laktamantibiotika er en stor gruppe antimikrobielle midler som inkluderer blant annet penicillin, cefalosporin, cefamycin, monobaktam og karbapenem-antibiotika (Kong et al. 2010). Hver av disse deles også inn i underkategorier av antibiotika. Felles for alle er deres strukturelle oppbygning som består av en β -laktamring. β -laktamantibiotika inhiberer vekst og dreper mottagelige bakterier ved å angripe bakterienes cellevegg, som er bygd opp av peptidoglykan med peptidkryssbindinger imellom. Under celleveggsyntesen dannes kryssbindingene ved hjelp penicillin-bindende proteiner (PBP) (Rawat & Nair 2010). Ved å danne kovalente interaksjoner med PBP hindrer β -laktamantibiotika dannelsen av celleveggen som derved fører til lysering av bakteriecellen.

1.2 Antibiotikaforbruk

Uforsvarlig antibiotikaforbruk har ført til økt spredning og utvikling av resistens. Redusert forbruk anses derfor som et av de viktigste forebyggende tiltakene. Et høyt antibiotikaforbruk skyldes forbruk i helsevesenet, men også fordi antibiotika med tiden har blitt introdusert i andre sektorer som husdyrproduksjon og fiskeoppdrett. I Norge har myndighetene hatt fokus på å få ned forbruket i samsvar med økt resistensproblematikk, i tillegg til å endre forbruket til smalspektrede fremfor bredspektrede antibiotika (HOD 2015; NORM/NORM-VET 2016). I norsk jordbruk og fiske-
rinæring er antibiotikaforbruket i dag derfor lavt sammenlignet med andre land og utgjør kun 10 % av det totale norske forbruket (NORM/NORM-VET 2016). I 2015 ble det brukt henholdsvis 5,9 og 0,3 tonn antibiotika til husdyrproduksjon og fiskeoppdrett, mens omtrent 37 tonn antibiotika ble brukt til mennesker (NORM/NORM-VET 2016). Antibiotikaforbruken til fiskerinæringen utgjorde kun 0,5 % av totalforbruket i 2015, som er en nedgang på hele 99 % siden 1933

(NORM/NORM-VET 2016). Myndighetene i Norge har i tillegg et mål om å redusere den totale antibiotikabruken med ytterligere 30 % innen 2020, som er et viktig tiltak i arbeidet mot antibiotikaresistens (HOD 2015). I Norge utgjør β -laktamantibiotika i form av penicillin den største andelen av det totale antibiotikaforbruket (NORM/NORM-VET 2016).

Å få en totaloversikt over det globale forbruket av antibiotika er en viktig forutsetning for å sette i gang forebyggende tiltak. Undersøkelser gjort av WHO påpeker at overvåkingen av antibiotikabruken har vært svært mangelfull i mange land (WHO 2015). Resistensproblemet er ofte størst i land med dårlige overvåkningssystemer og reguleringer av antibiotikabruk (FAO 2016). Overvåking i Norge gjøres av flere aktører, deriblant Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS), Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) og Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober-veterinærmedisin (NORM-VET). Disse fungerer som nasjonale helseregistre for registrering av tilfeller av antibiotikaresistente bakterier påvist hos friske eller syke smittebærere (dyr og mennesker), i tillegg til i mat og fôr.



Figur 1.2 Forekomst av ESBL-produserende isolater av *E. coli* og *Klebsiella* spp. påvist i prøver av blod og urin i perioden 2003-2015 (NORM/NORM-VET 2016).

Det er samtidig viktig å understreke at resistensproblemet øker også i land med godt oppsyn og strenge tiltak. Selv i land som Canada og Australia har man de siste fem årene observert en økt forekomst av *E. coli* med ESBL-resistensmekanisme (Iredell et al. 2016). Det har også vært observert en synlig økning i Norge i samme tidsrom (se figur 1.2). Dette skyldes at resistensproblemet utfolder seg på tvers av landegrensener blant annet på grunn av økt global reisevirksomhet og handel. Problemet forsterkes ytterligere av faktorer som høye populasjonstettheter, dårlig helsestandard og levestandard, samt manglende reguleringer av antibiotikaforbruk (Holmes et al. 2016; Iredell et al. 2016).

1.2.1 Økt seleksjonspress

Mange år med feilslått antibiotikabruk har økt det selektive presset på bakteriene. Bakterier som utsettes for antibiotika, enten i dyr, mennesker eller i miljøet vil med tiden utvikle og spre resistens som et resultat av naturlige seleksjons- og overlevelsesprosesser (figur 1.5) (McDermott et al. 2002). Økt seleksjonspress vil fremme overlevelsen til resistente bakterier først og fremst ved å drepe eller hemme vekst av mottagelige individer (McDermott et al. 2002). Fra naturens side handler dette om Darwins teori om «survival of the fittest». Økt selektivt press fungerer derfor som en sentral drivkraft bak spredning og utvikling av resistens. Resistente bakterier vil ha størst sjanse for å overleve i et miljø med antibiotika tilstede, som bidrar til at resistensgenene føres videre.

Utslipp av antibiotika som skyldes menneskeskapte aktiviteter anses som en viktig bidragsyter til økt seleksjon av antibiotikaresistente bakterier i miljøet. Ubrukt antibiotika eller rester av umetabolisert antibiotika blir frigjort i miljøet blant annet fra pasienter på sykehus, industri eller fra friske smittebærere via avløps- eller kloakksystemer (Kümmerer 2004). Også rester av antibiotika som brukes i landbruket til terapeutiske og ikke-terapeutisk behandling av husdyr kan ende opp i miljøet, for eksempel via husdyrgjødsel (Kümmerer 2004). I tillegg til medisinsk behandling av husdyr brukes også antibiotika som vekstfremmer i dyrefôr. Dette bidrar til økt seleksjonspress ved å selektere for antibiotikaresistente bakterier i tarmfloraen til dyrene, spesielt ved subinhibitoriske nivåer (Nwosu 2001).

Resistente bakterier og resistensgener på mobile genelementer kan overføres i miljøet, både via mat, mennesker og dyr (figur 1.5). Allerede på 1960-tallet ble det oppdaget en sammenheng mellom overføring av antibiotikaresistente bakterier fra husdyr til mennesker og bruk av antibiotika som vekstfremmer (Holmes et al. 2016). Tidligere forskning har blant annet kartlagt at resistensmekanismer hos patogene bakterieslekter, som *Salmonella* spp. og *Campylobacter* spp., er identiske med resistensmekanismene til bakterier påvist i mennesker (Holmes et al. 2016). I Europa ble det forbudt å bruke antibiotika som vekstfremmer i 2006, men fremdeles er det en rekke land som praktiserer dette (Holmes et al. 2016).

I miljøet utjevnes konsentrasjonene av antibiotika, som ofte foreligger under den minste inhibitoriske konsentrasjonen (MIC) til bakterier (Balcázar et al. 2015). Studier har vist at selv ved konsentrasjoner som er under den minste dosen som skal til for å hemme veksten av bakterier (MIC) kan antibiotika fremdeles påvirke bakteriene (Balcázar et al. 2015; Kümmerer 2004). Antibiotika fungerer da istedenfor som et signalmolekyl som stimulerer en rekke stressresponser og cellulære prosesser i bakteriene som for eksempel økt genekspressjon, horisontal genoverføring, «quorum-

sensing» og celledelingsprosesser, som alle er viktige tilpasningsmekanismer som bakteriene bruker for å overleve i miljø som er i stadig endring (Balcázar et al. 2015). Utslipp uavhengig av konsentrasjoner vil dermed kunne bidra til å akselerere spredning og utvikling av resistens (Balcázar et al. 2015). Selv om menneskeskapte antibiotikautslipp er en sentral drivkraft bak økt selektivt press, er det også slik at enkelte bakterier, sopp eller andre mikroorganismer i jord selv frigjør antimikrobielle stoffer i omgivelsene. Konsentrasjonene av disse komponentene er ukjent, noe som gjør det vanskelig å vurdere i hvilken grad disse forbindelsene bidrar til økt selektivt press (Allen et al. 2010).

1.3 Antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens innebærer at antibiotikumet ikke lenger har en veksthemmende eller bakteriedrepende effekt på bakteriene. Stadig flere bakterier blir resistente mot ulike antibiotikum, ofte også mot flere klasser av antibiotika som gjør de multiresistente. Helt siden antibiotika ble tatt i bruk for første gang ble det observert at bakterier kunne være resistente. Foreløpig finnes det ingen antibiotika som bakterier ikke har resistensmekanismer imot. Allerede da Alexander Fleming i 1945 ble tildelt Nobelprisen i fysiologi og medisin for sin oppdagelse, advarte han i Nobel-talen sin mot konsekvensene av å misbruke dette «nye» legemiddelet: «It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing occasionally happened in the body» (Fleming 1945).

1.3.1 Naturlig og ervervet resistens

Antibiotikaresistens kan være en iboende eller en ervervet egenskap hos bakterier. Iboende resistensgener og forekomst av motstandsdyktige bakterier er ikke et nytt fenomen fra naturens side. Samtidig med introduksjonen av antibiotika ble det observert at enkelte bakterier hadde naturlig resistens (Holmes et al. 2016). En studie av eldgammelt DNA isolert fra permafrost viste at bakteriene der var naturlig resistente mot ulike antibiotika, slik som β -laktamantibiotika, tetrasykliner og glykopeptider (Perry et al. 2014). Ettersom mesteparten av de antimikrobielle midlene som er i bruk er naturlige produkter fra mikroorganismene selv (f.eks. bakterier, sopp), er det heller ikke overraskende at naturlig resistens eksisterer (Holmes et al. 2016). Det er mye som tyder på at bakteriene over tid har utviklet egne resistensmekanismer og kommunikasjonsmetoder for å tilpasse seg og for å overleve i et miljø med toksiske stoffer, enten produsert av andre organismer eller av seg selv.

Ervervet antibiotikaresistens oppstår i hovedsak på to ulike måter, enten gjennom mutasjoner i kromosomale gener eller via horisontal genoverføring. Bakterier har formbare og fleksible genom som blant annet gjør de i stand til å dele DNA med hverandre. De kan dermed tilegne seg nye

egenskaper som øker sjansene for overlevelse, som for eksempel skyldes økt selektivt press på grunn av antibiotika. Bakterier kan utvikle resistens mot antibiotika ved overføring av resistensgener, endret genespresjon og via mutasjoner (Perry et al. 2014). Særlig *E. coli* og andre Gram-negative medlemmer av *Enterobacteriaceae* har svært tilpassingsdyktig genom (Bajaj et al. 2016; Iredell et al. 2016).

1.3.1.1 Horisontal genoverføring

En viktig forutsetning for å kunne forebygge resistens er å forstå mekanismene og drivkreftene som bidrar til utviklingen og overføringen av resistensgener mellom bakteriene, deriblant HGT. Horisontal genoverføring er en måte bakteriecellene overfører gener mellom hverandre på som også innebærer spredning av resistensgener (Heuer & Smalla 2007). Utveksling av DNA bidrar til bakterienes evolusjonære tilpasning, men er også en avgjørende drivkraft for å gi bedre økologisk tilpasning og overlevelse for bakteriene i et kortere tidsperspektiv (Heuer & Smalla 2007). HGT foregår særlig mellom nært beslektede individer, men kan også foregå på tvers av slektskap. De tre vanligste formene for HGT hos prokaryoter i miljøet er konjugasjon, transformasjon eller transduksjon (Demanèche et al. 2001; Heuer & Smalla 2007). Mobile genelementer (MGE) er segmenter av DNA i form av integroner, transposoner og plasmider, som koder for den intercellulære (mellom celler) og intracellulære (innad i genomet) forflytningen av DNA via HGT (Frost 2000). Fremmede gener, inkludert resistensgener som overføres via HGT, kan integreres i mottakerens genom, enten på kromosomet eller plasmider som finnes i bakterien.

Naturlig transformasjon er en mekanisme som bakteriene bruker for å ta opp DNA fra omgivelsene. En forutsetning for naturlig transformasjon er at DNA er frigjort og tilgjengelig i omgivelsene, og at bakteriene er kompetente (Heuer & Smalla 2007). Når bakterier dør lyserer cellene, DNA frigjøres og blir da tilgjengelig for transformasjon. Levende bakterier er også i stand til å skille ut DNA som videre kan tas opp av andre celler. Naturlig transformasjon i miljøet avhenger blant annet av hvor lenge DNA forblir intakt og i hvilken grad bakteriene er i stand til å ta opp DNA (Heuer & Smalla 2007). For eksempel vil DNA raskere brytes ned i jord ved høy fuktighet og høy temperatur (Heuer & Smalla 2007). I følge en studie gjort av Demanèche et al. (2001) ble det observert at DNA absorbert på leire-partikler var mer beskyttet mot nedbrytning. I jord har det tidligere blitt funnet store mengder fritt DNA, noe som legger forholdene til rette for naturlig transformasjon mellom bakteriene.

I konjugasjon overføres DNA i form av konjugative plasmid ved fysisk kontakt mellom to bakterieceller (Frost 2000). Selve overføringen mellom en donor og resipient celle skjer via en sex-pilus som binder de to bakteriene sammen. Konjugative mobile genelementer bidrar i sin egen

forflytning. På disse flyttbare elementene kan det også sitte ikke-konjugative genelementer som for eksempel integroner og transposoner (Frost 2000). Konjugasjon kan forekomme under ulike miljøbetingelser, både mellom nært og fjernt beslektede bakterier. Forholdene i jord kan påvirke i hvilken grad konjugasjon og andre HGT-mekanismer foregår. Høy bakterietetthet vil blant annet kunne fremme konjugasjon (Heuer & Smalla 2007).

Transduksjon er en mekanisme hvor DNA eller DNA-fragmenter overføres og spres via bakteriofager, som er virus som binder spesifikke bakterieceller (Heuer & Smalla 2007). Bakteriofager som blir bærere av resistensgener kan overføre disse videre til andre bakterieslekter og på tvers av nisjer. Dessuten krever ikke overføringen direkte kontakt mellom bakterieceller, og bakteriofagene er i tillegg tolerante under skiftende miljøbetingelser.

1.3.1.2 Multiresistens

Horisontal genoverføring kan bidra til utvikling av bakterier med ervervede, multiresistente egenskaper. Når et overført gen skal integreres i bakterienes genom plasseres de ofte i spesifikke regioner enten på kromosomer eller plasmider (Iredell et al. 2016). Resistensgenet som først blir plassert i en bestemt region fungerer som et utgangspunkt hvor også andre lignende genelementer blir plassert (Iredell et al. 2016). Dette gir opphav til såkalte pluripotente regioner hvor lignende gener er plassert i nærheten av hverandre, for eksempel på mobile genelementer som plasmider, integroner eller transposoner. Dette kalles for ko-resistens. Lignende gener vil dessuten «lettere» inkorporeres i disse regionene, i tillegg til at gener ko-selekteres (Iredell et al. 2016). Ko-seleksjon innebærer at genekspresjon av et gen i en pluripotent region også kan bidra til seleksjon av lignende gener i samme region. Dermed kan eksponering mot en klasse av antibiotika føre til ko-seleksjon av resistens mot andre klasser av antibiotika, forutsatt at resistensgenene sitter sammen i bestemte regioner av genomet (Iredell et al. 2016). Dette gir opphav til bakterier med multiresistente egenskaper. Det er også kjent at bruk av soppdrepende midler, nitrogen gjødsel, eller naturlige forekomster av metaller og tungmetaller i naturen kan føre til ko-seleksjon av antibiotikaresistens hos bakterier. Dette henger sammen med at genene som koder for antibiotikaresistens og beskyttelse mot andre toksiske stoffer ligger plassert i de samme områdene i bakterienes genom (Holmes et al. 2016).

1.3.2 Viktige resistensmekanismer

Det finnes flere ulike mekanismer for hvordan bakteriene kan beskytte seg mot antibiotika. Dette inkluderer for eksempel modifisering og nedsatt tilgang til målet til antibiotikumet, porin-defekt, enzymatisk degradering og effluxpumpe-system. Ofte kombinerer bakterier to eller flere av disse resistensmekanismene. Modifisering av målet innebærer for eksempel mutasjoner som endrer den

strukturelle oppbygningen til målet for antibiotika slik at det blir ugjenkjennelig. En annen mekanisme med samme effekt er såkalt «target-mimicry» hvor et molekyl etterligner strukturen til målet for antibiotikumet.

En viktig forutsetning for virkningseffekten av enkelte typer antibiotika er tilgang til ulike deler av cellen, avhengig av virkningsmåte. Ulike typer antibiotika vil angripe ulike deler av cellen for enten å drepe eller hindre bakterien i å vokse. For eksempel vil transmembranpumper eller såkalte effluxpumper ha en viktig rolle når det gjelder antibiotika som virker intracellulært, som for eksempel β -laktamantibiotika, tetrasykliner, aminoglykosider, kinoloner og makrolider (Iredell et al. 2016). Bakterier med evne til å regulere mengden poriner eller porin-defekt kan også bruke dette som beskyttelsesmekanismer mot antibiotika. Poriner er hydrofile kanaler i den hydrofobe ytre membranen hos Gram-negative bakterier (Iredell et al. 2016). Dette er en mekanisme som brukes for å hindre antibiotika, som for eksempel β -laktamantibiotika fra å trenge inn i cellen. Bakterier som lever i krevende miljø med for eksempel tilstedeværelse av toksiner og varierende osmotisk trykk, har ofte færre poriner og dermed lavere permeabilitet enn bakterier som lever i relativt stabile miljø, som for eksempel *Enterobacteriaceae* i tarmen hos varmblodige pattedyr (Iredell et al. 2016).

Enzymatisk degradering av antibiotika forekommer hos bakterier som kan produsere hydrolytiske enzymer som for eksempel β -laktamaser. Gener som koder for β -laktamaser kalles for *bla*. Både Gram-positive og Gram-negative bakterier kan produsere β -laktamaser, som på ulike måter bryter ned og ødelegger den strukturelle oppbygningen til β -laktamantibiotika slik at de mister sin virkning. De klassifiseres ofte basert på enzymenes strukturelle oppbygning og virkningsspektrum hvorav noen er smalspektrede, mens andre er bredspektrede. β -laktamaser med utvidet spektrum mot β -laktamantibiotika kalles ESBL.

Det finnes ulike måter å gruppere ulike ESBL-er, og i denne masteroppgaven ble klassifiseringen til Giske et al. (2009) brukt som deler ESBL-ene inn i tre hovedkategorier; (i) $ESBL_A$, $ESBL_M$ og $ESBL_{KARBA}$ (tabell 1.1) (Giske et al. 2009). Hver av disse ESBL-gruppene består av ulike varianter av β -laktamaser. Klasse A ($ESBL_A$) består av enzymer som inaktiverer «ekstendert-spektrum» cefalosporiner og inhiberes av klavulansyre (Giske et al. 2009). Klasse M består av plasmid-mediert AmpC, samt OXA-ESBL-er og kalles for «miscellaneoeus» ESBL-er ($ESBL_M$) (Giske et al. 2009). Karbapenemaser med hydrolytisk aktivitet mot karbapenem-antibiotika tilhører siste gruppe, $ESBL_{KARBA}$, som deles inn i underklassene A, B og D (tabell 1.1). De ulike β -laktamasene i ESBL-gruppene har ulik effektivitet og virkningsspektrum når det gjelder β -laktamantibiotika (Giske et al. 2009; Paterson & Bonomo 2005).

Tabell 1.1 Klassifisering av ulike β -laktamaser i ESBL-grupper basert på inndelingen til Giske et al. (2009).

ESBL _A	ESBL _{M-C}	ESBL _{M-D}	ESBL _{KARBA-A}	ESBL _{KARBA-B}	ESBL _{KARBA-D}
Mest forekommende ESBL _A	Plasmid-mediert AmpC	OXA-ESBL-er	KPC	MBL	OXA- karbapenemaser
<u>CTX-M</u>	CMY	OXA-10-gruppe	<u>KPC</u>	IMP	OXA-23-gruppe
<u>TEM</u>	FOX	OXA-13-gruppe	GES-2,-4,-5,-6,-8	<u>VIM</u>	OXA-24 gruppe
<u>SHV</u>	MIR	OXA-2-gruppe	NMC	SPM-1	<u>OXA-48</u>
VEB	DHA	OXA-18	SME	GIM-1	OXA-58
PER	LAT	OXA-45	IMI-1.-2	SIM-1	
	BIL			AIM-1	
	ACT			<u>NDM-1</u>	
	ACC				

*Enzymene som er understreket ble søkt etter i arvestoffet til jordbakterier i denne masteroppgaven.

Bakterier med evnen til å produsere ESBL-er bruker ofte dette som en av hovedmekanismene for å forsvare seg mot β -laktamantibiotika (Zaniani et al. 2012). Genene som koder for β -laktamaser sitter ofte plassert på plasmider eller andre mobile genelementer og kan derfor enkelt forflyttes mellom bakterier (Rawat & Nair 2010). Forskning har påvist et stort antall ulike ESBL-er (Lahey Clinic 2006).

ESBL_A av typen CTX-M ble for første gang rapportert om i München i Tyskland i 1989 (Bajaj et al. 2016; Cantón et al. 2008). De opprinnelige enzymene som tilhører denne ESBL-gruppen ga i hovedsak resistens mot cefotaxime fremfor ceftazidime (Cantón et al. 2008). I etterkant av oppdagelsen har det blitt påvist 172 ulike varianter av CTX-M β -laktamaser (Lahey Clinic 2006). Disse ble tidligere delt inn i fem grupper; CTX-M gruppe 1, 2, 8, 9 og 25 (Shaikh et al. 2015). Nyere forskning har siden indikert at det eksisterer minst to nye grupper (Cantón et al. 2012).

CTX-M er en svært kompleks gruppe bestående av enzymer med ulik aminosyresammensetning og varierende hydrolytisk aktivitet (Cantón et al. 2012). CTX-M β -laktamaser har hatt stor suksess med hensyn til ervervet antibiotikaresistens, som gjenspeiles i den globale spredningen av bakterier med disse enzymene. CTX-M er i dag en av de mest utbredte ESBL-variantene (Rawat & Nair 2010). I økende grad forekommer de særlig i familien *Enterobacteriaceae* som for eksempel *E. coli*. Nyere studier indikerer at de også i økende grad forekommer i andre arter som *Pseudomonas* spp., *Actinobacter* spp., *Vibrio* spp. og *Aeromonas* spp. (Cantón et al. 2012). Enkelte CTX-M-er virker også å ha tilknytning til bestemte geografiske områder. To av de mest utbredte CTX-M variantene, CTX-M-14 og CTX-M-15, er særlig utbredt i henholdsvis India og Kina (Bajaj et al. 2016). Den globale utbredelsen av gener som koder for ulike varianter av CTX-M er et resultat

av rekke faktorer, men mobiliseringen av genene til mobile genelementer har helt klart vært en av forutsetningene. Det er mye som tyder på at CTX-M skiller seg ut i fra de andre ESBL-ene når det gjelder opprinnelse. Forskning har vist at genene som koder for CTX-M (*bla*_{CTX-M}) er kromosomale gener som tidlig ble mobilisert og inkorporert i mobile gen-elementer (Cantón et al. 2012). Videre mutasjoner i genene har siden bidratt til å forme og tilpasse enzymenes hydrolytiske profil og dermed gitt opphav til flere varianter.

Genet *bla*_{CTX-M} ko-eksisterer ofte sammen med andre resistensgener som gir ko-seleksjon og i enkelte tilfeller opphav til at overlevelsesdyktige bakteriekloner (Bajaj et al. 2016). Dette gjelder også andre ESBL-gener. Det har vært flere studier som har undersøkt sammenhengen mellom bestemte resistensgener og sekvenstyper (ST). For eksempel er *E. coli* ST131 ofte bærer av CTX-M-15-genet (Bajaj et al. 2016). I håndteringen av spredningsdyktige og resistente bakterier er rask diagnostisering viktig for å begrense smitteomfanget. Sammenhengen mellom bestemte patogene bakterier og resistensgener kan derfor gi nyttig informasjon for å iverksette smitteverntiltak. Videre forskning og overvåkning kan bidra til å kartlegge slike sammenhenger.

En rekke studier har vist at epidemiologien til ESBL-ene har endret seg over tid. Frem til omtrent slutten av 1990-tallet var TEM og SHV de mest påviste ESBL_A-genene. Enzymene var i tillegg mer utbredt i *K. pneumoniae* enn i *E. coli* (Cantón et al. 2008; Cantón et al. 2012). Dette har imidlertid endret seg og CTX-M-produserende *E. coli* er i dag mest utbredt sammenlignet med de andre ESBL_A β-laktamasene (Bajaj et al. 2016; Cantón et al. 2008).

TEM ble for første gang påvist i 1965 i Hellas fra en pasientprøve av *E. coli* (Paterson & Bonomo 2005). ESBL_A-varianter av TEM betraktes som derivater fra TEM-1 og TEM-2 (Paterson & Bonomo 2005). Det er kun noen få aminosyrer i forskjell som skiller disse fra hverandre, og som gir omfattende endringer i deres enzymaktivitet. Felles for disse er at de kan inaktivere tredje-generasjons cefalosporiner og aztreonam (Rawat & Nair 2010). Genet som koder for SHV har trolig sitt opphav fra *Klebsiella* spp. (Shaikh et al. 2015). Studier indikerer at forflytning av TEM og SHV fra kromosomer og over i mobile genelementer, har ført til at disse genene også har blitt utbredt hos andre i familien *Enterobacteriaceae* (Shaikh et al. 2015). ESBL_A-varianter av SHV og TEM forekommer verden over, særlig i medlemmer av *Enterobacteriaceae* som *K. pneumoniae* og *Enterobacter* spp. (Cantón et al. 2008). Nye varianter av TEM har blitt oppdaget i land som Frankrike, Spania, Italia, Belgia og Portugal (Cantón et al. 2008). TEM-24 er en av TEM-variantene med stor global spredning via overlevelsesdyktige kloner av *Enterobacter aerogenes*. *Salmonella*-bakterier som bærer TEM-52 har også hatt stor utbredelse, særlig i Europa (Cantón et al. 2008). Enzymet SHV-12 er en av de som forekommer oftest av SHV-variantene og har stor

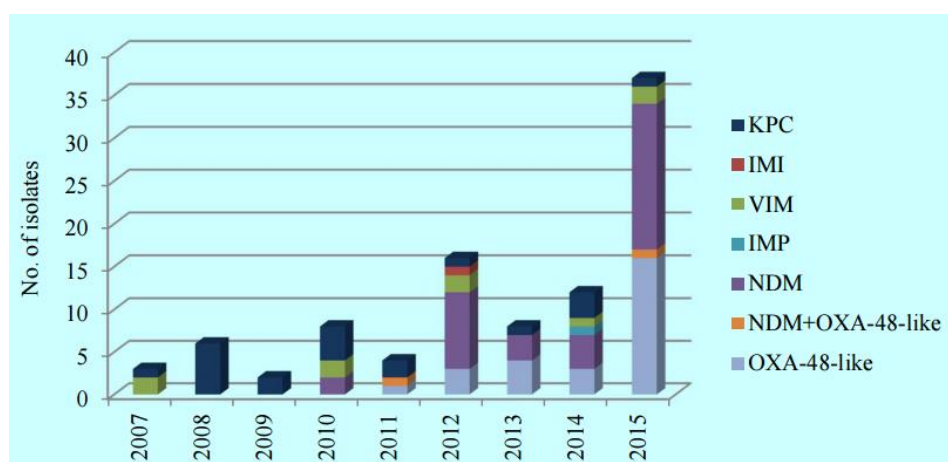
global utbredelse (Cantón et al. 2008). SHV-12 har blitt påvist i kliniske isolater av *K. pneumoniae*, men også i *E. coli* (Cantón et al. 2008). En av årsakene til den globale spredningen av SHV-12 er at resistensgenet ofte foreligger sammen med andre resistensgener, blant annet andre ESBL_A-er som TEM og CTX-M (Cantón et al. 2008).

Karbapenemaser er også svært overførbare, og har den siste tiden fått større oppmerksomhet på grunn av økt global spredning. Produksjon av hydrolyserende enzymer i form av karbapenemaser er en av de vanligste resistensmekanismene mot karbapenem-antibiotika (Bajaj et al. 2016), som i tillegg kan inaktivere all β -laktamantibiotika. ESBL_{KARBA} er β -laktamaser som hydrolyserer karbapenem-antibiotika, men også andre β -laktamantibiotika som penicillin og cefalosporiner. Genene som koder for karbapenemaser er ofte plassert på mobile genelementer, gjerne sammen med andre resistensgener. KPC, OXA og MBL-varianten «Verona integron-encoded metallo β -lactamase» (VIM) er karbapenemaser som oftest forekommer i isolater av *K. pneumoniae* og *A. baumannii* (Bajaj et al. 2016). VIM har hittil kun blitt påvist på integroner (Pitondo-Silva et al. 2016). Medlemmer i familien *Enterobacteriaceae* som er resistente mot karbapenem-antibiotika deles inn i karbapenem-resistente (CRE) og karbapenemase-produserende (CPE). CRE er *Enterobacteriaceae* resistente mot karbapenem-antibiotika, enten fordi de produserer karbapenemaser eller har andre resistensmekanismer som gjør de resistente (van Duin & Doi 2016). CPE derimot er *Enterobacteriaceae* som er resistente mot karbapenem-antibiotika fordi de produserer karbapenemaser (van Duin & Doi 2016).

Økt global spredning og forekomst av ESBL_{KARBA}-produserende Gram-negative patogene bakterier er en alvorlig helsemessig trussel fordi det finnes veldig begrenset med behandlingsalternativer. Infeksjoner forårsaket av disse bakteriene assosieres derfor med høy dødelighet (Bajaj et al. 2016; Iredell et al. 2016). Spesielt har den globale forekomsten av KPC, OXA-48, VIM, og som nevnt NDM økt (NORM/NORM-VET 2016). Også i Norge har forekomsten økt med en firdobling av ESBL_{KARBA}-produserende stavbakterier påvist i pasientprøver i perioden 2012-2016 (FHI 2017). De rapporterte tilfellene er likevel sjeldnere og forekommer mer sporadisk sammenlignet med forekomster i andre land (Albiger et al. 2015). Økt forekomst av NDM og OXA-48 er særlig fremtredende (figur 1.3 og figur 1.4), som også er trenden ellers i Europa (Albiger et al. 2015). Mange av sykdomstilfellene relateres til utenlandsreiser.



Figur 1.3 ESBL_{KARBA}-produserende slekter i familien Enterobacteriaceae påvist i norske kliniske prøver (2007-2015) (NORM/NORM-VET 2016).



Figur 1.4 ESBL_{KARBA}-varianter i ESBL_{KARBA}-produserende Enterobacteriaceae påvist i norske kliniske prøver (2007-2015) (NORM/NORM-VET 2016).

Særlig NDM har hatt en foruroligende global spredning som derved har bidratt til stor bekymring de siste årene. I India er *E. coli* med NDM-1 en av de vanligste årsakene til diaré (Bajaj et al. 2016). Dette gir grunn til stor uro blant annet fordi NDM-1 har spredt seg svært raskt og er både påvist i land som Pakistan, Storbritannia og Australia (Bajaj et al. 2016). Den raske spredningen skyldes trolig at genet *bla*_{NDM-1} sitter på plasmider som kan assosieres med andre resistensgener som igjen gir opphav til multiresistens og ko-seleksjon (Bajaj et al. 2016). I følge Albiger et al. (2015) har den epidemiologiske spredningen av CPE økt i Europa, særlig av *Enterobacteriaceae* med genotypene OXA-48 og NDM. Fortsatt påvises det stadig nye ESBL-varianter som både tilhører ESBL_{KARBA}, men også andre bredspektrede β-laktamaser.

1.4 Forekomst og spredning av antibiotikaresistens i miljøet

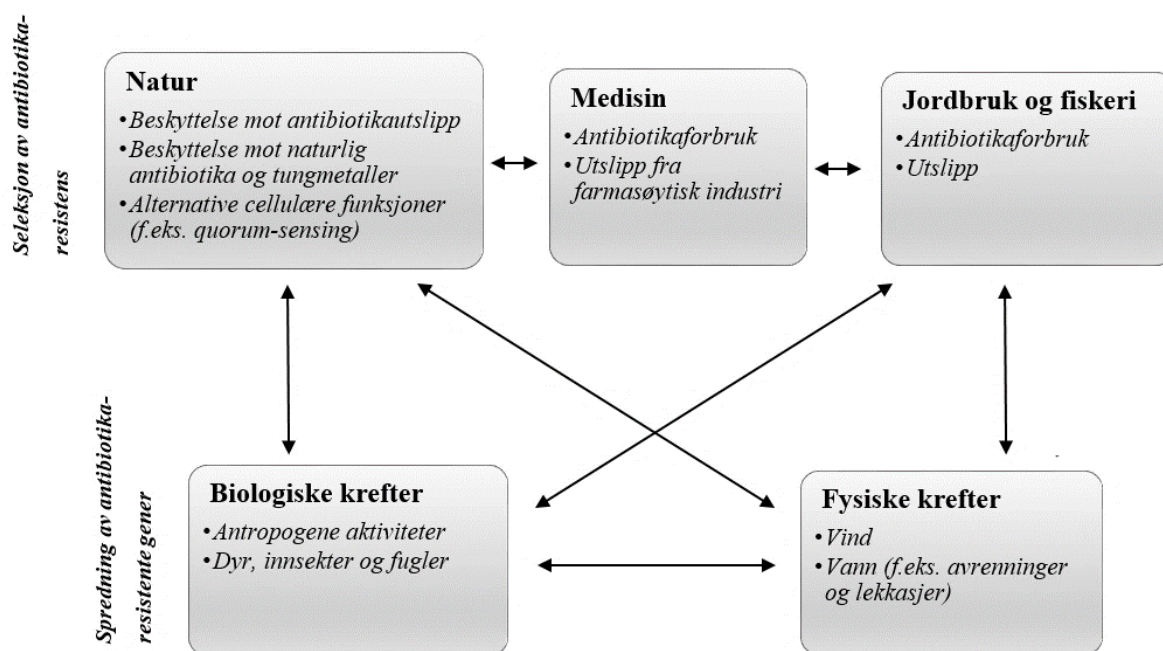
Antibiotikaresistens forekommer i mange ulike bakterielle habitat. Det er i dag begrenset kunnskap om hvordan miljøet påvirker utvikling og spredning av resistens ettersom mesteparten av informasjonen kommer fra studier av antibiotikaresistente patogene bakterier i medisinsk sektor

(Iredell et al. 2016). Den norske regjeringens nasjonale strategi mot antibiotikaresistens har rettet fokuset mot mer helhetlig kartlegging av resistens, som inkluderer naturen som et mulig reservoar for antibiotikaresistente gener (HOD 2015). Bakgrunnen for dette er at nyere forskning indikerer at bakterier i naturen også har en sentral rolle i spredning og resistensutvikling (Allen et al. 2010; Wright 2010). Miljøbakterier kan fungere som potensielle reservoarer for resistensgener uavhengig av sykdomsfremkallende evner, som også inkluderer bakterier som lever i jord eller andre steder i omgivelsene (Ben Said et al. 2015; Kümmerer 2004; Pitondo-Silva et al. 2016). Resistente bakterier i miljøet utgjør en fare fordi de potensielt kan dele resistente egenskaper med andre patogene bakterier som er klinisk signifikante, uavhengig om de selv er patogene eller apatogene (Forsberg et al. 2012; Poirel et al. 2002; Poirel et al. 2005; Wright 2010). Selv om det er kjent fra tidligere studier at bakterier i naturen er potensielle reservoarer for en rekke ulike resistensgener, har det foreløpig vært få studier som har klart å etablere en direkte kobling mellom økt forekomst av resistensgener i det naturlige miljøet og økt spredning og forekomst av antibiotikaresistens blant klinisk signifikante bakterier (Forsberg et al. 2012). Noe av årsaken til dette skyldes at slike sammenhenger er komplekse og utfordrende å kartlegge og å spore.

I hvilken grad bakterier i jord tar opp eller overfører resistensgener til patogene bakterier er derfor foreløpig et delvis ubesvart spørsmål, men flere studier har funnet mulige sammenhenger. I to studier gjort av Poirel et al. (2005) og Poirel et al. (2002) ble det påvist resistensgener i form av en CTX-M β -laktamase og et qnrA-gen med stor likhet til resistensgener detektert i patogene bakterier. I den ene studien ble det oppdaget et resistensgen i *Kluyvera* spp. fra miljøet som hadde 99 % likhet med det plasmid-bårne CTX-M-8 genet påvist i patogene bakterier. I studien til Forsberg et al. (2012) ble det også vist at flere resistensgener, deriblant β -laktamaser som ble detektert i jordbakterier, var identiske med de assosiert med humanpatogene bakterier. Flere av disse resistensgenene kunne i tillegg kobles til mobile genelementer, som dermed indikerte at de kan flyttes via HGT i jord. Denne typen studier er viktige både for å forstå opphavet til resistensgenene, men også for å få en bedre forståelse av den potensielle helsemessige risikoen spredningen av disse utgjør.

Jord er et av de største mikrobielle habitatene i verden med enormt stor diversitet (Kirk et al. 2004). Forekomst av resistente bakterier og deres resistensgener i jord betraktes i enda større grad som en viktig del av problemet med økt antibiotikaresistens (Forsberg et al. 2012; Kümmerer 2004). For å studere antibiotikaresistente bakterier i miljøet har mange tidligere studier brukt oppdyrking etterfulgt av rensing og isolasjon (Allen et al. 2010). Metoder for resistensbestemmelse i miljøet er ikke standardisert og mangelen på retningslinjer for denne typen studier gjør det utfordrende å trekke konklusjoner om forekomst av resistens i et miljø, samt å sammenligne

forskjellige typer miljø (Allen et al. 2010). Selv om kunnskap om utbredelse og forekomst av antibiotikaresistente bakterier og resistensgener i jord eller andre miljø er noe ukjent, har tidligere forskning påvist at de forekommer. Å forstå disse spredningsmekanismene og spredningsveiene er viktig for å begrense smitteomfanget av antibiotikaresistente bakterier, ved å bidra i utviklingen av effektive overvåkningsstrategier og iverksetting av andre forebyggende tiltak. Både resistensspredning innad i bakterielle populasjoner, samt overføring mellom mennesker, dyr og miljø utgjør en viktig del av det totale resistensproblemet. Spredningsveiene og mekanismene for spredning av antibiotikaresistente bakterier og deres resistensgener er oppsummert i figur 1.5-1.6.

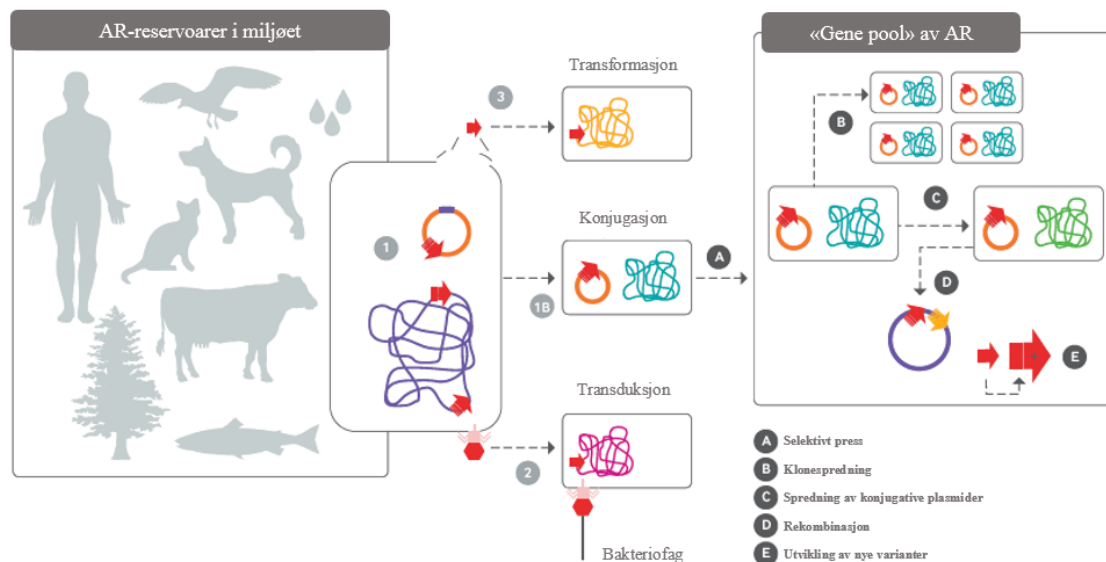


Figur 1.5 Sammenhengen mellom hvordan spredning av resistensgener foregår mellom naturen, jordbruket og det kliniske miljøet (Allen et al. 2010).

Spredning av antibiotikaresistens i miljøet kan foregå på mange måter, blant annet via fysiske krefter i naturen eller via levende organismer (figur 1.5). Resistente bakterier og resistensgener kan forflyttes via jordpartikler, vind eller via rennende vann i bekker og elver, fra grunnvann og innsjøer (Allen et al. 2010). Faktorer i jorda kan også påvirke graden av resistensspredning innad i et miljø, som for eksempel ved forandringer i vekstbetingelser.

Gode vekstbetingelser i jord er en forutsetning for høye celledetall. Ressurstilgang i jorda vil i stor grad påvirke både sammensetningen av den mikrobielle diversiteten og avgjøre graden av vekst og kolonisering av forskjellige bakteriepopulasjoner (Heuer & Smalla 2007). Betingelser i jorda som bidrar til økt nærhet mellom bakteriene vil dessuten kunne bidra til bedre kommunikasjon mellom bakteriene, blant annet gjennom HGT (figur 1.6) (Heuer & Smalla 2007). Studier har vist

at det i jord som har vært behandlet med kompost eller gjødsel forgår aktiv overføring og deling av gener mellom bakteriene (Heuer & Smalla 2007). Ettersom HGT bidrar sentralt til overføring av resistensgener mellom bakterier er derfor hyppigheten av dette relevant, i tillegg til faktorene som påvirker prosessene.



Figur 1.6 Antibiotikaresistens (AR) i et økologisk perspektiv som illustrerer hvordan spredningen av AR og antibiotikaresistente gener (ARG) kan foregå i miljøet via HGT (Iredell et al. 2016).

Figur 1.6 oppsummerer hvordan horisontale genoverføringsmekanismer i form av transduksjon, transformasjon og konjugasjon forflytter resistensgener mellom reservoarer av ARG i ulike miljøer. Ved hjelp av mobile genelementer kan resistensgener fra ulike reservoarer i miljøet mobiliseres (punkt 1 i figur 1.6). Resistensgenene kan dermed forflyttes til nye bakterier ved konjugasjon (1B), transduksjon (2) eller transformasjon (3). Ved økt selektivt press i omgivelsene vil resistente bakterier med en selektiv fordel ha økt sjans for at resistensgenene blir en del av reservoaret av ARG. Antibiotikaresistente bakterier kan spres for eksempel som overlevelsesdyktige kloner (B), som forflytter resistensgener via konjugative plasmider og sprer disse videre (C), eller via mobile genelementer som kan inkorporeres i bakterienes genom (f.eks. ved rekombinasjon) (D). Det kan også skje mutasjoner i resistensgener som fører til videre utvikling av nye varianter av antibiotikaresistente gener (E).

Ville dyr og fugler i naturen som bærer resistente bakterier i tarmfloraen kan også spre resistens til omgivelsene eller mellom hverandre (figur 1.6). Individuer som lever tett på mennesker virker i større grad å være bærere av antibiotikaresistente bakterier, enn de som lever i mer uberørte områder (Allen et al. 2010). Dette er en indikasjon på at antropogen aktivitet, som utslipp av antibiotika i omgivelsene, kan påvirke bærerraten i ville dyr og fugler. Fugler som migrerer kan dess-

uten bidra til langdistanse spredning av resistens. Kjøledyr og husdyr er også potensielle reservoarer for resistens, enten som et resultat av medisinsk behandling med antibiotika eller på grunn av smitteoverføring fra andre individer eller miljøet rundt, for eksempel via avføring.

Mennesker som er friske smittebærere utgjør i tillegg en risiko for spredning av resistens til miljøet, mennesker og dyr (figur 1.6). Det blir rapportert om stadig økende bærerrate av resistente bakterier i menneskets tarmflora, deriblant ESBL-positive *Enterobacteriaceae* (Holmes et al. 2016). Kommensale *E. coli* som er bærere av resistente gener har gjennom en rekke studier blitt påvist i friske barn, voksne og eldre. Konsekvensen av en slik utvikling er at de resistente bakteriene ytterligere kan spres, ofte i det skjulte. Spesielt utgjør friske smittebærere som kommer i kontakt med eldre, gravide, nyfødte og andre spesielt utsatte individer, en helsemessig trussel mot disse befolkningsgruppene (Holmes et al. 2016). Trolig vil denne formen for spredning bli mer og mer vanlig etter hvert som bærerratene øker rundt om i verden. Risikoen for smitte ved reise øker også i områder hvor andelen friske smittebærere er stor. For eksempel er det ifølge Holmes et al. (2016) over 50 % av befolkningen enkelte steder i verden som er bærere av *Enterobacteriaceae* med ESBL-resistens. Forebygging av denne formen for overføring er viktig og da kan målrettede vaksinasjonsprogrammer være et tiltak, som i tillegg til å kunne redusere spredning og forekomst også kan utrydde enkelte resistente bakterier fullstendig (Holmes et al. 2016).

1.5 Forebyggende tiltak

Det er et globalt ansvar å sikre at alle land i verden har tilgang på antibiotika som virker. For å sikre at også fremtidige generasjoner kan bruke antibiotika til medisinske behandlinger mot bakterieinfeksjoner, er hele verden nødt til å iverksette avvergende tiltak (WHO 2015). I realiteten kan det bli vanskelig å eliminere resistenstrusselen helt, derfor bør det være myndighetenes hovedoppgave å sette krav og iverksette handlingsplaner først og fremst for å begrense og redusere ytterligere spredning og resistensutvikling. I regjeringens strategi «Antibiotikaresistens 2015-2020» legges det frem hvilke tiltak Norge planlegger å fokusere på. De norske styresmaktene har som målsetning å blant annet styrke det internasjonale samarbeidet, optimalisere antibiotikaforbruket og øke fokuset på smittevern. I tillegg ønsker styresmaktene i Norge å satse mer på utvikling og bruk av bedre diagnostiske metoder (HOD 2015). Disse strategiene samsvarer med anbefalinger som kommer frem i rapportene til flere andre internasjonale interesseorganisasjoner, som WHO og «Food and Agriculture Organization of the United Nations» (FAO) (FAO 2016; WHO 2015). Det understrekes også at det er et stort behov for å styrke kunnskapsgrunnlaget om antibiotikaresistente bakterier. Det må gjennomføres mer helhetlig kartlegging av resistens, i tillegg til etablering av en bedre forståelse av de mekanismene som ligger bak antibiotikaresistens. Blant

annet hvordan menneskeskapte og naturlige faktorer påvirker forekomst, utvikling og spredning av resistente bakterier (HOD 2015). Det er et økende behov for å bedre forstå hvordan resistens mot antibiotika oppstår og spres enten via gener eller bakterier i naturen.

1.6 Metoder brukt for screening etter ESBL-holdige bakterier i jord

Mikrobiologiske studier av bakterier i jord stiller helt andre krav til metodene på grunn av sin heterogene og komplekse sammensetning som gjør dette til et svært utfordrende medium å jobbe med (Mocali & Benedetti 2010). Selv om jord har den største mikrobielle diversiteten på hele jorda er fortsatt mesteparten av mikroorganismene og deres genetiske reservoarer ukjent (Mocali & Benedetti 2010). Foreløpig er det bare omtrent 1 % av alle bakterier i jord som er dyrkbare under standardiserte betingelser (Kümmerer 2004). Dette skyldes blant annet begrenset kunnskap om hvilke substratkonsentrasjoner, næringsstoffer eller andre betingelser som bakteriene trenger for å vokse (Mocali & Benedetti 2010). Det er viktig å etablere gode metoder eller forbedre gamle for å kunne studere bakterier i jorda, med fokus på resistente bakterier. Utfordringene med tradisjonelle dyrkningsmetoder har delvis blitt taklet med molekylære teknikker (Kirk et al. 2004). Enkelte DNA-baserte metoder har gjort det mulig å studere bakteriene uten å være avhengig av dyrking. I denne masteroppgaven tas det i bruk ulike tilnærminger for å lete etter ESBL-holdige bakterier i jord. Studien ble utført med både dyrkningsbaserte- og DNA-baserte metoder.

1.6.1 Dyrkningsbasert fenotypisk deteksjon av ESBL-produserende isolater

Å bruke dyrkningsmetodikk er en enkel måte å studere bakterienes fenotypiske egenskaper på. Etersom tilgangen på ny antibiotika er begrenset, er satsing på mer effektive og nøyaktige metoder for å identifisere bakterier en alternativ løsning (Gazin et al. 2012). Å bruke selektive kromogene oppdyrkningsmedier er en av de enkleste metodene tilpasset direkte utsåing av klinisk prøvemateriale for å screene etter ESBL-produserende bakterier i kliniske prøver (Gazin et al. 2012). Bruken av disse er svært utbredt både i Norge og internasjonalt. Det finnes flere varianter av slike medier, blant annet *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE som ble brukt i denne masteroppgaven. Disse har både selektive og differensierende egenskaper som i tillegg til å fremme vekst av ønskede bakterier, også gjør det mulig å differensiere bakterier basert på biokjemiske egenskaper. De selektive kromogene mediene inneholder en kombinasjon av agar, pepton, karbohydrater, kromogene stoffer, titanoksid og en antibiotika-blanding (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Antibiotika tilsatt gjør det mulig å selektere for bakterier med ESBL-fenotypisk resistens. Kombinasjonen og konsentrasjonen av antibiotika er en forutsetning for å oppnå dette (Gazin et

al. 2012). De kromogene stoffene bidrar til å differensiere mellom og å identifisere ulike bakterieslekter, ved at det kromogene substratet ved hydrolyse farger bakteriekolonier som produserer et hydrolytisk enzym som reagerer med substratet (Gazin et al. 2012).

*Brilliance*TM ESBL egner seg til å differensiere såkalte 3MRGN, som er multiresistente Gram-negative *Enterobacteriaceae*-bakterier resistente mot tre av fire antibiotikagrupper. *Brilliance*TM CRE er derimot tilpasset påvisning av 4MRGN som er multiresistente Gram-negative *Enterobacteriaceae*-bakterier resistente mot fire av fire antibiotikagrupper, inkludert karbapenem-antibiotika. På sykehus brukes disse til fenotypisk påvisning og differensiering av antibiotikaresistente bakterier i ulike kliniske prøver, ikke bare fekale prøver. Selv om *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE først og fremst er tilpasset deteksjon av *Enterobacteriaceae* vil også en rekke andre bakterier kunne vokse. Selektive kromogene medier kan detektere ESBL-holdige bakterier basert på fenotypiske trekk, men kan ikke brukes til å bestemme ESBL-enes genotype (Gazin et al. 2012). En av utfordringene med å identifisere ESBL-produserende bakterier med fenotypiske metoder er overlappen mellom ESBL-fenotypisk resistens og andre resistensmekanismer, som bør ses i sammenheng med stadig økt diversitet av ESBL-enzymmer, varierende genuttrykk og ikke-ESBL resistensmekanismer (Huang et al. 2010). Funn bør derfor verifiseres med andre metoder (Gazin et al. 2012).

1.6.2 Molekylær karakterisering av ESBL-produserende bakterier

Til tross for at dyrking egner seg til å utforske bakterienes fenotypiske egenskaper og hvilke gener som kommer til uttrykk, gir disse metodene lite innsyn i genetikken som bestemmer disse egenskapene. Molekylære, genotypiske metoder betraktes derimot som selve «gull-standard» for å detektere, identifisere og differensiere mellom ulike resistensgener (Bajaj et al. 2016). Utviklingen av raskere molekylære metoder har dessuten et stort potensiale for fremtidens diagnostiske tester tilpasset Gram-negative, ESBL-produserende og karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (Gazin et al. 2012). Dette er en alternativ måte å studere bakterienes egenskaper på basert på genotypisk trekk, samtidig som at man unngår begrensningene knyttet til manglende standardiserte dyrkningsteknikker (Mocali & Benedetti 2010). DNA-sekvenser inneholder svært mye genetisk informasjon, som egner seg til å utforske mikrobiell diversitet, kartlegge forekomst av bestemte bakterier og deres gener, i tillegg til å finne deres taksonomiske tilhørighet og slektskap. Med utgangspunkt i at PCR er en av de enkleste og vanligste måtene å detektere bestemte ESBL-gener på ble metoden brukt i denne studien for å søke etter ESBL-gener (Bradford 2001). I tillegg ble Sanger-sekvensering av 16S rRNA og helgenomsekvensering brukt til å bestemmes slektskapet til isolat med ESBL-fenotypisk resistens. Helgenomsekvensering ble også brukt for å detektere ESBL-gener.

1.6.2.1 PCR

«Polymerase chain reaction» (PCR) er en metode som gjør det mulig å amplifisere et bestemt målgen eller en gensekvens fra templat-DNA. I tillegg til templat DNA tilsettes også primer («forward» og «reverse»), DNA-polymerase og deoksynukleotid trifosfater (dNTP-er) (Lorenz 2012). DNA-polymerase er et enzym som syntetiserer nye DNA-tråder som er komplementære med et bestemt område på templat DNA-et. Ved PCR blir kun denne bestemte delen av genomet amplifisert. Dette bestemmes ut i fra valg av primere som binder seg til bestemte områder av DNA. DNA-polymerase binder seg til hver primer, og plasseringen av primerene på templat-DNA avgjør hvilket område som blir amplifisert. I PCR brukes vanligvis primerpar som velges spesifikt ut på bakgrunn av hvilken del av DNA-et som skal amplifiseres. dNTP-ene er nukleotidene A, T, C og G, som er byggesteinene som DNA-polymerase bruker til å syntetisere nye DNA-sekvenser med. Hele prosessen deles inn tre hovedtrinn; denaturering, primer annealing og elongering (Lorenz 2012).

Denaturering: Ved oppvarming i PCR-maskin til 94-96 °C blir dobbeltrådet templat-DNA (dsDNA) denaturert. Ved denaturering brytes bindingene mellom de to komplementære DNA-trådene.

Primer annealing: Denaturering av templat-DNA til enkelttrådet DNA (ssDNA) bidrar til at primerne får tilgang til et bestemt gen på ssDNA. Nedkjøling til 50-65 °C gjør det mulig for primere å hybridisere til denne gensekvensen. Primerene er korte oligonukleotider som er tilpasset til å flankere hver sin ende av DNA-sekvensen som skal amplifiseres.

Elongering: Elongeringstrinnet foregår etter oppvarming til 72 °C. I dette trinnet binder DNA polymerase seg til primerene og kopierer ønsket gensekvens. *Taq* DNA polymerase er varme-stabilt og denaturerer ikke ved oppvarming til 95 °C, derfor egner enzymet seg som enzym i PCR reaksjonen.

Denaturering, annealing og elongering gjentas deretter i flere sykluser frem til ønsket antall kopier av sekvensen er oppnådd. Amplifisert produkt kan kjøres på agarosegel for å synliggjøre resultatet ved hjelp av agarose gelelektroforese.

I denne masteroppgaven ble det brukt ulike PCR-metoder. Multiplex PCR ble brukt for å detektere og synliggjøre tilstedeværelsen av bestemte resistensgener. Standard Multiplex PCR er en variant av PCR-metoden hvor flere ulike loci amplifiseres samtidig i samme PCR-reaksjon. På den måten kan man amplifisere flere målgener samtidig ved å bruke flere primerpar. Teknikken brukes både innenfor forskning og etterforskning for å studere DNA enten i fra mennesker, dyr, planter, virus eller bakterier. Før sekvensering med Sanger ble det brukt PCR med kun en primer per reaksjon

for å amplifisere 16S rRNA genet. Ved Illumina MiSeq ble det brukt kvantitativ PCR (qPCR) for amplifisering av 16S rRNA gener og Illumina indexing PCR for å feste på adapter-sekvenser.

Noen av forutsetningene for gode resultater med PCR av DNA fra jord er blant annet å rense prøvene slik at bakteriene blir adskilt fra inhiberende komponenter som kan ødelegge analysen (Kirk et al. 2004). I tillegg er det viktig at nok DNA-ekstraheres fra bakteriecellene, som blant annet påvirkes av lyseringsgraden av bakteriecellene. Dessuten må det også finnes gode markører for påvisning av antibiotikaresistente egenskaper hos bakteriene, som for eksempel ved å designe primere tilpasset resistensgenene som skal studeres.

1.6.2.2 Sekvensering av nukleinsyrer

Sekvensering går ut på å kartlegge den nøyaktige rekkefølgen av nukleotider enten i DNA eller RNA (Grada & Weinbrecht 2013). I lang tid har Sanger-metoden vært den mest brukte sekvenseringsmetoden, men i senere tid har «neste generasjons DNA-sekvensering» (NGS) begynt å ta over (Shendure & Ji 2008). NGS-metodene anses som mer nøyaktige, tidsbesparende og kostnadseffektive sekvenseringsmetoder som gjør det mulig å parallell-sekvensere DNA fra en bestemt prøve (Grada & Weinbrecht 2013). Utvikling av NGS-metoder som for eksempel Illumina MiSeq, har i tillegg bidratt til at sekvensering har blitt mer anvendelige i ulike laboratorier (Grada & Weinbrecht 2013). I denne masteroppgaven ble Sanger-metoden brukt til sekvensering av 16S rRNA fra DNA isolert fra renkulturer, og det samme ble helgenomsekvensering med NanoPore-teknologi. I tillegg ble Illumina MiSeq brukt for å kartlegge mikrobiell diversitet ved å sekvensere 16S rRNA fra mikrobiota-DNA ekstrahert direkte fra jord.

Bakterienes 16S ribosomale RNA (rRNA) koder for 16S rRNA genet i bakterienes ribosomer (Janda & Abbott 2007). Dette er et gen som egner seg godt som genetisk markør for taksonomisk differensiering mellom bakterier. Genet finnes i genomet til alle bakterier og er dessuten stort nok (~1500 basepar) til å gi tilstrekkelig genetisk informasjon. 16S rRNA genet har dessuten blitt konservert over tid og de få endringer som har oppstått, brukes som en indikator på evolusjonær utvikling. Selv om 16S rRNA gensekvensen passer godt til å klassifisere og identifisere bakterier, egner den seg bedre på slektsnivå enn på artsnivå. En av grunnene er at det er større forskjeller i 16S rRNA sekvensene mellom ulike slekter enn mellom ulike arter (Janda & Abbott 2007). 16S rRNA ble i denne oppgaven brukt for å differensiere ulike bakterier ved at sekvenserte ukjente 16S rRNA gensekvenser ble sammenlignet i en database med sekvenser hvor rekkefølgen til bakteriers 16S rRNA gen allerede er kartlagt. Basert på likhetsgrad ble disse sekvensene brukt til å bestemme bakteriens taksonomiske tilhørighet på slekts- og eventuelt artsnivå.

1.6.2.3 Sanger-sekvensering

Sanger-sekvensering tilhører «første generasjons sekvenseringsmetoder» og har tidligere blitt sett på som selve «gullstandarden» innenfor sekvensering. Ved bruk av Sanger-metoden blir et DNA-templat i form av for eksempel 16S rRNA genet, først amplifisert i flere sykluser med PCR. Til dette brukes DNA polymerase, en primer («forward» og «reverse») og deoksyribonukleotider (dNTP-er) (Shendure & Ji 2008). For hver sekvenserings-PCR tilsettes en «forward» og en «reverse» primer i hver sin reaksjonsblanding. I tillegg tilsettes fire typer nukleotider i deoksyform, som kalles for dideoksynukleotid (ddNTP) merket med fluoriserende fargestoff, i hver sin reaksjonsblanding. Disse bidrar til å stanse elongeringen fordi de mangler en hydroksylgruppe og resultatet blir at det lages mange, ufullstendige elongeringsprodukter. Baserekkefølgen i sekvensene fra hver av de fire reaksjonsblandingene (en for hver ddNTP) bestemmes ved å skille mellom DNA-fragmenter med ulike størrelser ved å bruke kapillærgel-elektroforesekolonne med polyakrylamid gel, laserdeteksjon og registrering. De fluoriserende ddNTP-ene synliggjør dermed de ulike størrelsesfragmentene endemerket med fluoriserende farge slik at de kan bli satt sammen igjen til en sekvens.

1.6.2.4 Helgenomsekvensering med MinION

Sekvensering av DNA med Nanopore-teknologi betraktes som en «tredje generasjons» sekvenseringsmetode. Metoden baserer seg på at sekvenseringen gjennomføres uavhengig av amplifisering av DNA-templatet med PCR i forkant av analysen, som gjør det mulig å sekvensere selv små prøvemengder (Haque et al. 2013). Det er heller ikke nødvendig å bruke markører som primere, slik man gjør med Sanger- og Illumina MiSeq-sekvensering (Haque et al. 2013). Ved Nanopore sekvensering blir en ukjent prøve ført gjennom en åpning på noen få nanometer ved hjelp av elektroforese. Nanoporen ligger plassert i en tynn membran i et to-delt elektrisk kammer fylt med elektrolytter. Ved hjelp av spenningsforskjeller forflytter ionene seg gjennom nanoporen og generer strøm i den elektriske kretsen, som da blir målt. Når genmateriale forflyttes gjennom nanoporen endres den elektriske strømtettheten seg, og omslag brukes for å kartlegge baserekkefølgen i genmaterialet som sendes igjennom.

Apparatet som ble brukt for Nanopore-sekvensering kalles MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) og er foreløpig ett av et fåtall instrumentene som kan brukes til Nanopore-sekvensering, i tillegg til å være det eneste flyttbare sekvenseringsverktøyet for sanntidssekvensering av DNA og RNA.

1.6.2.5 *Illumina MiSeq; en NGS for metagenome undersøkelser*

Av alle NGS-metodene er Illumina MiSeq en av de vanligste som brukes i dag (Grada & Weinbrecht 2013). Hele prosessen er delt inn i fire hovedtrinn: (i) forberedelse av templat, (ii) «cluster» dannelse, (iii) sekvensering og (iv) data-analyse.

Første trinn er å lage bibliotek-DNA fra DNA som blir fragmentert og festet til syntetiske oligonukleotider (Grada & Weinbrecht 2013). Disse kalles adaptersekvenser og fungerer som merkelapper som gjør det mulig å skille fragmentene fra hverandre etter sekvenseringen (Grada & Weinbrecht 2013). Metoden gjør at Illumina MiSeq kan brukes til å sekvensere flere prøver med DNA fra ulike organismer samtidig. Disse fragmentene blir videre amplifisert med PCR.

Ved cluster-dannelse fester bibliotek-DNA fragmentene seg til komplementære oligonukleotider som sitter plassert på en overflate hvor hvert fragment amplifiseres i ansamlinger av kloner. Dette kalles «bridge» amplifisering og selve overflaten kalles for «flow cell». Etter at amplifiseringen er fullført blir templatene sekvensert.

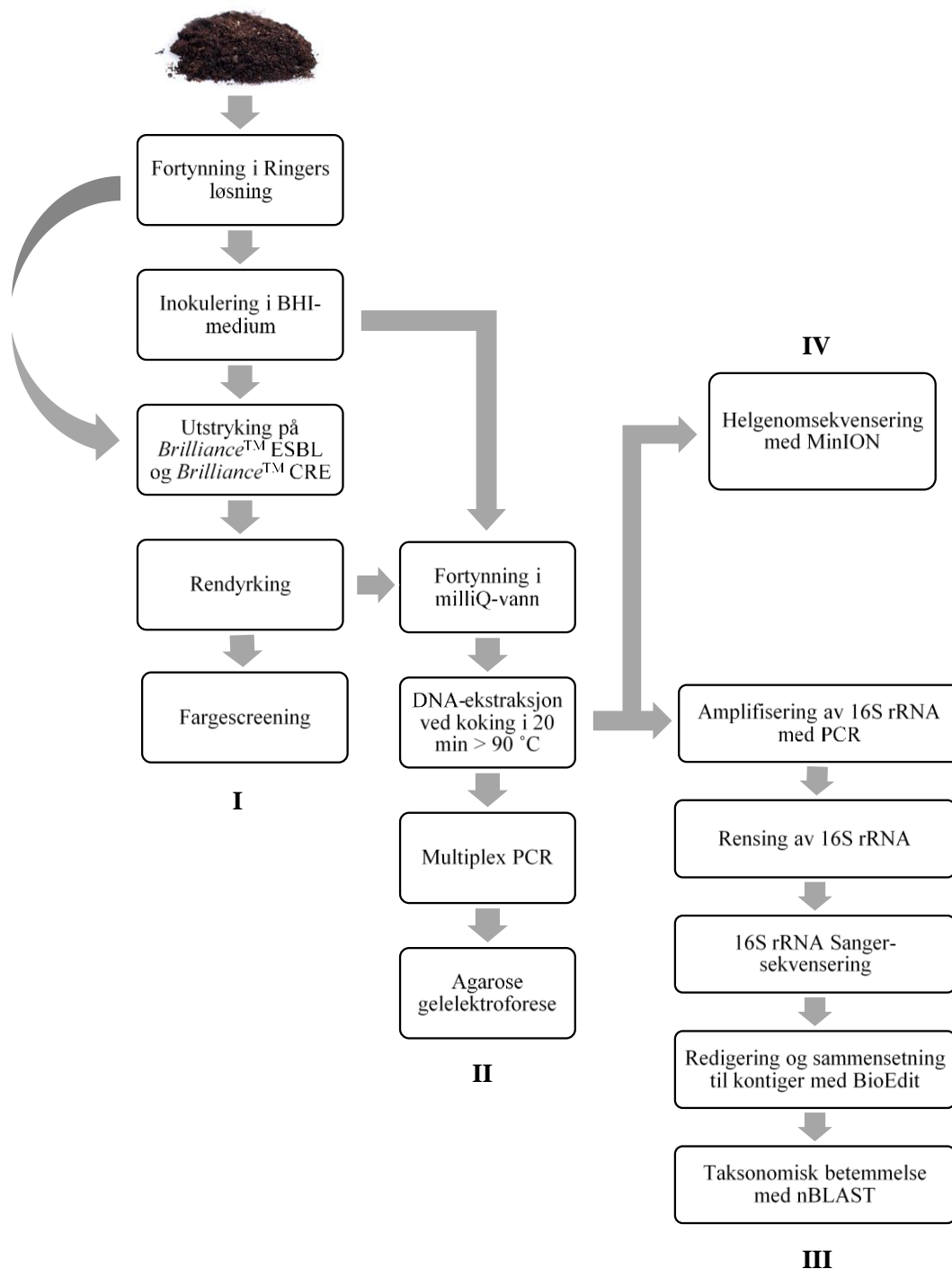
MiSeq-systemet bestemmer nukleotidrekkefølgen ved å detektere fluoriserende nukleotider etter hvert som nytt DNA syntetiseres (Grada & Weinbrecht 2013). Basene blir identifisert ved å måle bølgelengde og lysintensitet fra stråling som avgis fra de fluoriserende nukleotidene. Dette foregår i flere sykluser helt til alle DNA-fragmentene er sekvensert.

Illumina MiSeq sekvensering kan brukes både til å kartlegge hele genom eller utvalgte deler, for eksempel 16S rRNA som ble brukt til mikrobiotasekvensering i denne masteroppgaven. Ved mikrobiotasekvensering av DNA ekstrahert fra jord, ble all rådataen som ble generert, analysert og satt sammen til «operational taxonomic units» (OTU). OTU-er består av grupperinger av homologe DNA-fragmenter som settes sammen ut i fra sammenligning med et referansegеноm i en database. Hver av disse OTU-ansamlingene kjenner en bestemt taksonomisk enhet og kan derfor brukes til å bestemme bakteriers taksonomiske plassering og til å sammenligne diversiteten av ulike bakterier i forskjellige prøver.

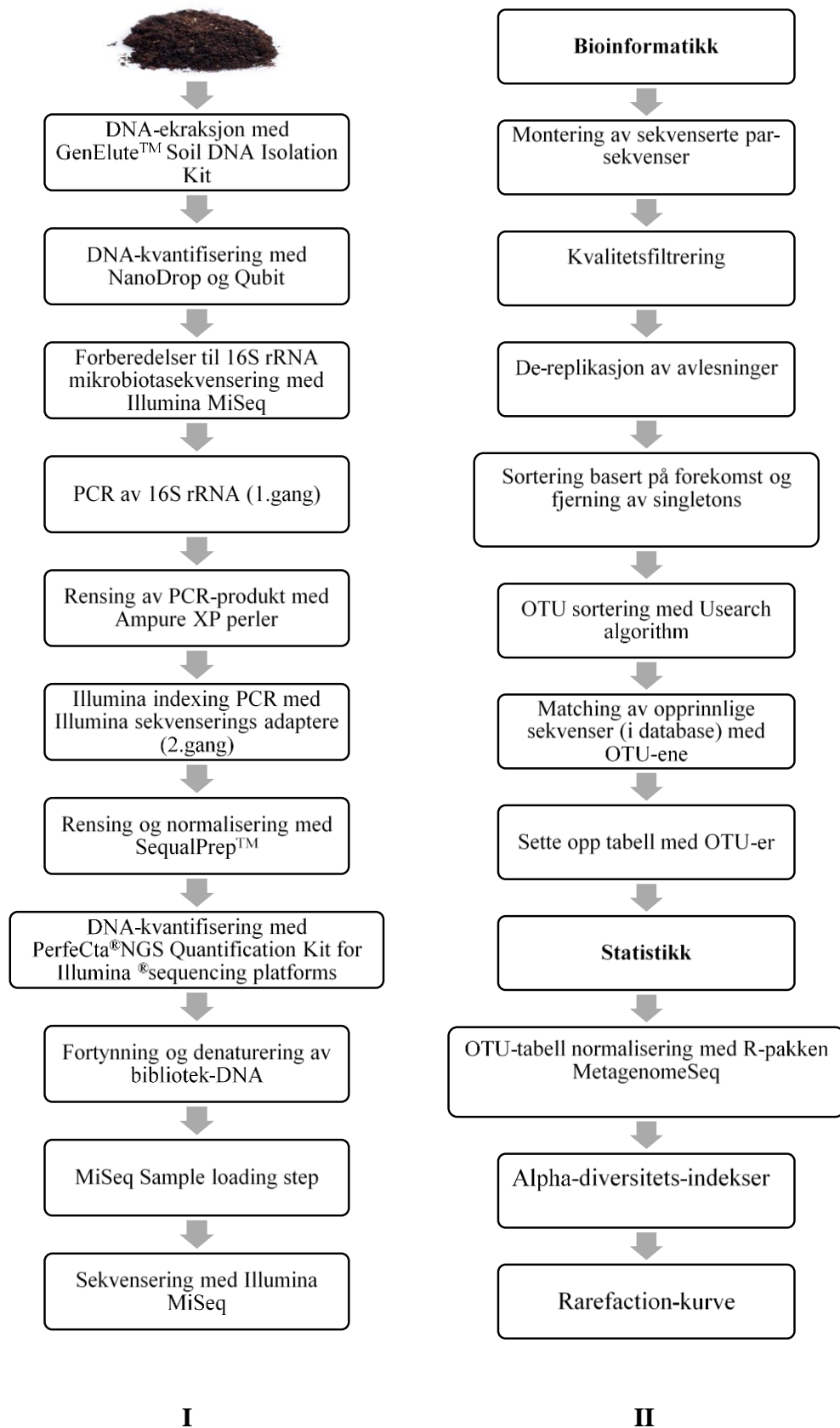
2 MATERIALER OG METODER

2.1 Illustrasjon over metoder og prosesser

Figur 2.1 og figur 2.2 er forenklete flytskjema over de prosessene og metodene som ble brukt for å analysere jordprøvene i denne masteroppgaven.



Figur 2.1 Flytskjema over ESBL-screeningsmetodene som ble brukt til: (I) fenotypisk deteksjon av ESBL-produserende bakterier, (II) molekylær karakterisering av ESBL-genotyper, (III) identifisering av bakterier med ESBL-fenotyper med 16S rRNA Sanger-sekvensering og (IV) helgenomsekvensering med MinION.



Figur 2.2 Flytskjema over metodene som ble brukt for å studere mikrobiell diversitet i jordprøvene: (I) DNA-ekstraksjon og forberedelser av 16S rRNA sekvensering med Illumina MiSeq og (II) prosessering av rådata fra 16S rRNA sekvensering med Illumina MiSeq.

2.2 Utstyr

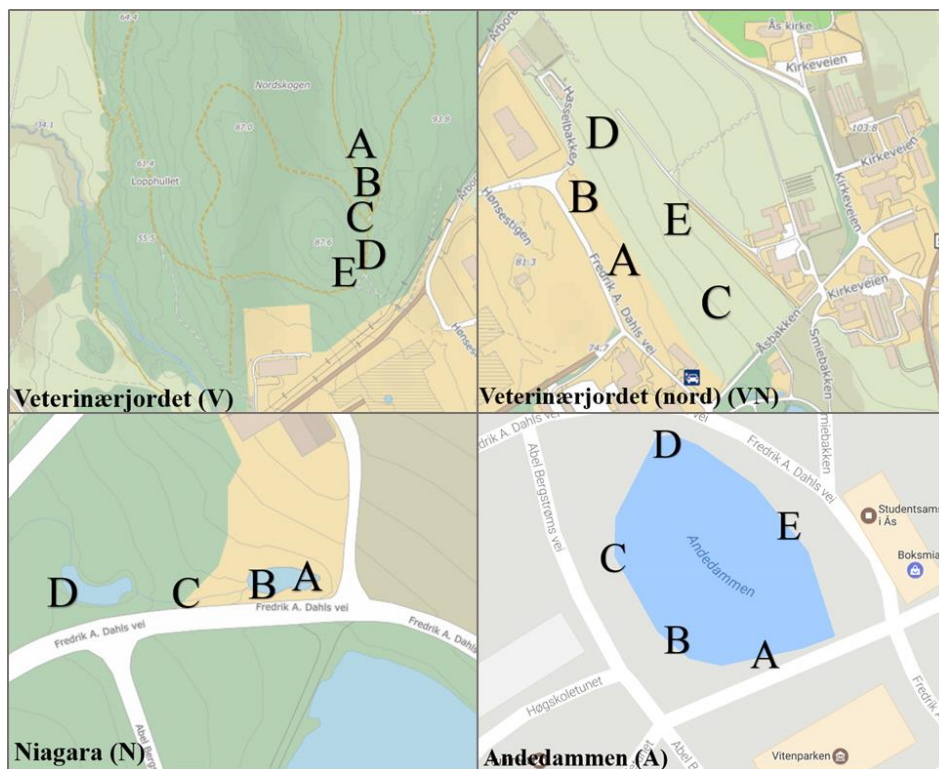
Arbeidet ble utført i samsvar med aseptisk metoder og sterilt utstyr.

2.3 Jordprøver

I denne pilotstudien ble det analysert totalt 19 jordprøver. Alle prøvene er tatt den 27.10.16 og er hentet fra flere steder på områder rundt Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i Ås kommune. Se kart vist i figur 2.3.

Ås er et gammelt jordbruksområde hvor det har foregått, og fremdeles foregår dyrking og husdyrhold. Veterinærjordet (nord) er et av mange gjenværende dyrkingsarealer på Ås. Prøvene fra Veterinærjordet er hentet fra rundt en bekk i dette skogholtet. Bekken renner fra en gård, via Veterinærjordet og ned til innsjøen Årungen. Andedammen er en liten fugledam som ligger plassert på campus-området til NMBU. Fra Andedammen renner det også en bekk som kalles «Niagara». Bekken har nylig blitt rekonstruert blant annet med tilkjørt jord og planting.

- Fra **Veterinærjordet** ble det hentet ut fem prøver merket VA-VE.
- Fra **Veterinærjordet (nord)** ble det hentet ut fem prøver merket VNA-VNE.
- Fra **Niagara** ble det hentet ut fire prøver merket NA-ND.
- Fra **Andedammen** ble det hentet ut fem prøver merket AA-AE



Figur 2.3 Kart over områdene for prøveuttak som var ved; Veterinærjordet (V), Veterinærjordet (nord) (VN), Niagara (N) og Andedammen (A).

Under prøveuttak ble 50 ml plastrør med kork fylt med jord og etterpå oppbevart i kjøleskap ved ca. 4 °C frem til 23.01.17. Før oppstart av analysene ble hver av de 19 prøverørene tatt ut av kjøleskap og oppbevart ett døgn ved romtemperatur.

Prøvene ble delt på et forsøksteam bestående av tre studenter (inkludert undertegnede) og funn i positive prøver ble fordelt etter analysene var gjennomført og avsluttet.

2.4 Dyrkningsbasert ESBL-fenotypisk deteksjon av multiresistente isolat

Dyrkningsbasert ESBL-screening av bakterier i fra jord ble gjennomført med fenotypisk deteksjon på kromogene selektive vekstmedier. I forkant av dette ble alle jordprøvene fortynnet og oppdyrket i et generelt vekstmedium kalt Brain Heart Infusion (BHI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) før de ble strøket ut på selektive vekstmedier.

2.4.1 Oppdyrking i BHI-buljong

Før jordprøvene ble tilsatt BHI-buljong ble de fortynnet i Ringers løsning, og deretter inokulert i flytende BHI-buljong for oppdyrking.

2.4.1.1 Tilberedning av BHI-buljong

BHI-medium ble lagd fra 37 g buljong og 1 liter milliQ-vann, blandet i en 1000 ml glassflaske. Blandingen ble varmet opp i vannbad frem til alt mediet var oppløst. 10 ml ferdig løsning ble pipettert over i 10 ml reagensrør med kork som til slutt ble autoklavert ved 121 °C i 15 min og deretter oppbevart i kjølerom ved 4 °C. Rør som skulle brukes med en gang ble oppbevart på arbeidsbenk ved romtemperatur.

2.4.1.2 Inokulering av fortynnet jordprøve i BHI-buljong

10 ml Ringers løsning (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ble pipettert over i 10 ml reagensrør. Uten oppveiling på forhånd, ble en skje jord fra hver prøve tilsatt og homogenisert i individuelle rør med vortexer. Totalt 100 µl fra disse fortynnede prøvene ble videre inokulert i 10 ml reagensrør med BHI-medium, som ble inkubert i varmeskap ved 37 °C i ca. ett døgn.

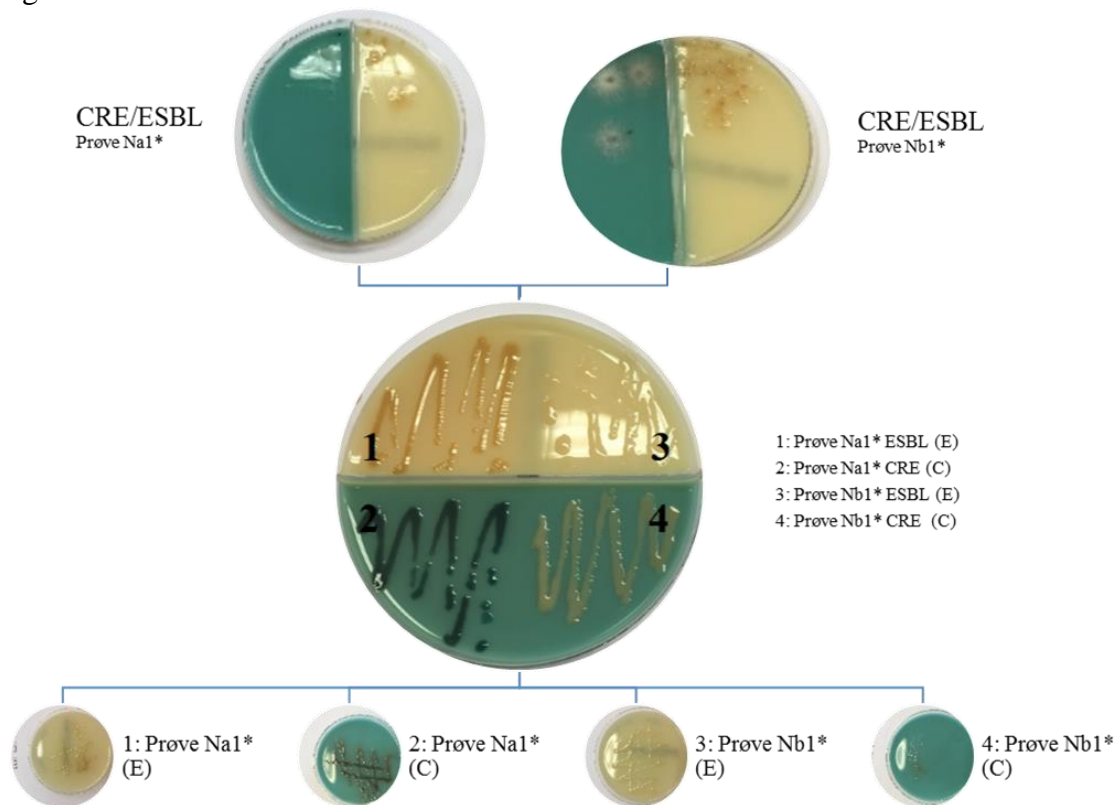
2.4.2 Oppdyrking på selektivt kromogent medium

For å undersøke om jordprøvene inneholdt bakterier med ESBL-fenotypisk resistens ble prøver fra jord strøket ut på selektive *Brilliance*TM ESBL agar (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA) og *Brilliance*TM CRE (Thermo Scientific Inc). Det ble brukt både todelte og hele skåler med *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE agar i.

På bakgrunn av at *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE trolig ikke har blitt brukt til oppdyrking av bakterier direkte fra jordprøver før, ble det både strøket ut inokulum fra inkubert BHI-

medium, men også direkte fra jordprøver kun fortynnet i Ringers løsning. Fra fortynnet jordprøve i Ringers løsning og oppdyrket BHI-medium ble det strøket ut en podeøse hver på egne selektive vekstskåler. Fra Niagara, Andedammen, Veterinærjordet (nord) og Veterinærjordet ble totalt 21 prøver fra inkuberte BHI-rør strøket ut på totalt 42 skåler med 21 skåler av hver type agar. En podeøse fra et utvalg av jordprøve A og B (parallell 1 og 2) ble strøket ut på kromogene vekstskåler direkte etter fortynning i Ringers løsning og plassert i inkubator ved 37 °C i ca. 24 timer. Oversikt over hvilke prøver dette gjelder er vist i tabell B.2 (vedlegg B).

Etter inkubasjon ved 37 °C i ca. 24 timer ble skålene undersøkt. Ved manglende eller svak vekst ble skålene inkubert i minst 24 timer til og vurdert om igjen, som anbefalt fra produsenten. Enkeltkolonier fra hver skål med vekst ble podet og rendyrket i egne *Brilliance*TM ESBL- og *Brilliance* CRETM -skåler som ble inkubert på samme måte (37 °C i ca. 24 timer). Et eksempel på rendyrkingstrinnene for to utvalgte prøver fortynnet i Ringers løsning fra Niagara er illustrert i figur 2.4.



Figur 2.4 Rendyrkingstrinnene for Niagara prøvene Na1* og Nb1* på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE. Tegnet (*) indikerer at jordprøvene kun var fortynnet i Ringers løsning.

2.4.3 Fargescreening

Fargeforandring i bakteriekoloniene ble vurdert i samsvar med protokollen «Quick and easy ESBL and CRE screening» (Thermo Fisher Scientific Inc), som er kort oppsummert i tabell 2.1.

Tabell 2.1 Identifisering av kolonier på *BrillianceTM ESBL* og *BrillianceTM CRE* med fargescreening.

ESBL¹			
Blå eller rosa	<i>E. coli</i>		
Grønne	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i>		
Brun «halo»	<i>Proteus, Morganella</i> eller <i>Providencia</i>		
CRE²			
«CRE positiv»		Resistente «ikke-CRE»	
Lys rosa	<i>E. coli</i>	Hvite eller fargeløse	<i>Acinetobacter</i>
Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i>	«Strå-fargede»	<i>Pseudomonas</i>

2.5 Molekylær karakterisering av ESBL-genotyper

For å påvise eventuelle ESBL-genotyper i jordbakteriene ble det utført Multiplex PCR med primerpar tilpasset de mest utbredte genvariantene av ESBL_A og ESBL_{KARBA}. Før Multiplex PCR ble DNA ekstrahert med koking. DNA-templat ble ekstrahert fra både oppdyrket BHI-medium og fra rendyrkede kolonier med ESBL-fenotypisk resistens på selektive vekstskåler.

2.5.1 DNA-ekstraksjon fra BHI-buljong

Rett etter poding på kromogent vekstmedium ble BHI-rørene varmebehandlet ved over 90 °C i vannbad i 20 min. Koking dreper bakteriene og lyserer cellene slik at DNA og annet cellemateriale lekker ut av bakteriecellene. Fra hvert rør ble det overført 500 µl BHI-medium til 1,5 ml eppendorfrør som ble undersøkt videre med Multiplex PCR og gelelektroforese.

2.5.2 DNA-ekstraksjon fra kolonier

Kromogene skåler med påvist vekst av resistente kolonier ble podet for rendyrking på selektive skåler i forkant av prøveuttak til DNA-isolasjon. DNA-ekstrahering fra cellene ble gjort ved å inokulere kolonier i 200-250 µl milliQ-vann i eppendorfrør som etterpå ble varmebehandlet i vannbad ved over 90 °C i ca. 20 minutter. Totalt 16 isolater av 19 kolonier ble kokt. 1 µl væske med DNA-templat i, ble direkte brukt videre til Multiplex PCR og gelelektroforese for å synliggjøre hvilke resistensgener koloniene hadde.

¹ ESBL er en forkortelse for «Extended Spectrum β -lactamases».

² CRE er en forkortelse for «Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*».

2.5.3 Multiplex PCR for påvisning av ESBL-genotyper

Alt ekstrahert DNA-templat ble amplifisert med Multiplex PCR. Primerpar, polymeraser og PCR-program ble tilpasset metoden som ble brukt for ekstrahering av DNA og til videre analyser av prøvene.

I PCR brukes primere som velges ut avhengig av hvilken del av DNA-et som skal amplifiseres. Målet med å bruke Multiplex PCR var å amplifisere et utvalg av flere $ESBL_A$ - og $ESBL_{KARBA}$ -gener i samme PCR-reaksjon. Tabell 2.2 viser hvilke primere som ble brukt og blandet sammen i primermiksene (M1-M4), som også inkluderte positive kontrollgener.

Primer (Thermo Fisher Scientific Inc) i pulverform ble omgjort til stock-løsninger ved å tilsette 10 x volum (μl) som mengden primer i nanomol (nmol) (se tabell 2.2). Hver stockløsning ble da fortynnet til 100 μM . Fra hver av disse ble det tatt ut 10 μl for å lage blandinger med ulike kombinasjoner av primere i, kalt mastermikser.

Hver mastermiks bestod av tre primerpar og volumet av disse som ble brukt til å lage bruksløsning var 60 μl . Primerblandingen ble fortynnet med 440 μl milliQ-vann og omgjort til bruksløsninger med konsentrasjoner lik 2 μM i hver mastermikser. Totalvolumet var lik 500 μl . Bruksløsningene ble brukt som reagens i Multiplex PCR for deteksjon av bestemte resistensgener, som vist i tabell 2.2.

Tabell 2.2 Informasjon om primere og primermikser som ble brukt i Multiplex PCR.

Primer	Primersekvenser (5'-3')	Målgen	Produktstørrelse (bp)
Mastermiks 1 (M1)			
MultiCTXMGp2_F	CGTTAACGGCACGATGAC	bla_{CTX-M} (gr. 2)	404
MultiCTXMGp2_R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT		
MultiTSOO_F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	bla_{OXA}	564
MultiTSOO_R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
MultiTSOS_F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	bla_{SHV}	713
MultiTSOS_R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
Mastermiks 2 (M2)			
MultiCTXMGp9_F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	bla_{CTX-M} (gr. 9)	561
MultiCTXMGp9_R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCTXMGp1_F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	bla_{CTX-M} (gr. 1)	688
MultiCTXMGp1_R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiSOT_F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	bla_{TEM}	800
MultiSOT_R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		

Mastermiks 3 (M3)			
NDM_F	TGGCCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla_{NDM}</i>	157
NDM_R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
VIM_F	ATAGAGCTCAGTGTCGGCAT	<i>bla_{VIM}</i>	564
VIM_R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT		
KPC_F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla_{KPC}</i>	460
KPC_R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC		
Mastermiks 4 (M4)			
MultiOxa48_F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla_{OXA-48}</i>	281
MultiOxa48_R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		
<i>rpoB_F</i>	CAGGTCGTCACACGGTAACAAG	<i>rpoB</i>	512
<i>rpoB_R</i>	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC		
<i>16S_F</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	<i>16S rRNA</i>	1505
<i>16S_R</i>	GYTACCTTGTTACGACTT		

Standard Multiplex PCR ble brukt for å amplifisere ulike resistensgener i ulike DNA-templat samtidig i en og samme PCR-reaksjon ved bruk av QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN®, Hilden, Tyskland). Det ble gjennomført Multiplex PCR av følgende prøver; (i) templat-DNA i BHI- medium, (ii) DNA isolert direkte fra oppdyrkede multiresistente kolonier og (iii) DNA isolert direkte i fra jord se avsnitt 2.8.1.

Kittet inneholdt QIAGEN Multiplex PCR Master Mix som er en ferdigblandet miks med HotStarTaq DNA Polymerase, MgCl₂, dNTP-er og PCR buffer, i tillegg til RNase fritt vann. I hver reaksjon ble det inkludert negative kontrollprøver med Master Mix uten tilsatt DNA. PCR-reaksjonene ble kjørt i PCR-maskinen «Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler» (Thermo Fisher Scientific Inc).

Før PCR-analysene ble prøvene og QIAGEN Multiplex PCR Kit oppbevart i fryseskap ved -20 °C. Etter å ha tint kittet ble det laget reaksjonsblandinger for hver prøve med 12,5 µl Master Mix ferdigblanding, 8 µl milliQ vann og 2,5 µl primermiks. Konsentrasjonen av hver av reaktantene samsvarer med anbefalingene til produsenten i protokollen «QIAGEN® Multiplex PCR Handbook» (QIAGEN®). Primermiksene som ble brukt er vist i tabell 2.2. Totalt 23 µl reaksjonsblanding ble overført til individuelle brønner på PCR-strips og deretter tilsatt 2 µl DNA templat fra BHI-medium og rensede jordprøver. Ved PCR av DNA direkte fra koloni-prøvene ble 1 µl DNA brukt. Under forberedelsene ble prøvene holdt på is sammen med reagensene og templat DNA ble tilsatt til slutt. Prøvene ble amplifisert i «Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler» som var forhåndsprogrammert til PCR-oppsettet som er vist i tabell 2.3.

Tabell 2.3 PCR-oppsett som ble brukt ved analyser av templat DNA fra BHI-medium og rensede jordprøver.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)
Aktivering av HotStarTaq DNA Polymerase	15:00	95
3-trinns-syklus*:		
1. Denaturering	00:30	94
2. Annealing	01:30	60
3. Ekstensjon	01:30	72
Endelig ekstensjon	10:00	72
Avkjøling	∞	4

*Syklusen ble gjentatt 40 ganger.

På bakgrunn av at ekstraksjon av DNA direkte fra koloni ofte gir store mengder DNA, ble kun 1 µl DNA templat fra koloni-prøvene tilsatt i reaksjonsblandingen. PCR-programmet ble også tilpasset mengden DNA, som vist tabell 2.4.

Tabell 2.4 PCR-oppsett som ble brukt for analyser av templat DNA fra kolonier med ESBL-fenotypisk resistens.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)
Aktivering av HotStarTaq DNA Polymerase	15:00	95
3-trinns-syklus*:		
1. Denaturering	00:30	94
2. Annealing	01:30	62
3. Ekstensjon	01:30	72
Endelig ekstensjon	10:00	72
Avkjøling	∞	4

*Syklusen ble gjentatt 35 ganger.

2.5.4 Agarose gelelektroforese

For å adskille og identifisere de amplifiserte DNA-fragmentene fra Multiplex PCR, ble det utført agarose gelelektroforese på 1,5 % agarosegel lagd av SeaKem[®] LE agarosepulver (Lonza Rockland, ME, USA), 1 X Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) og GelRed[™] (Biotium, Fremont, CA, USA). Bufferen ble brukt både i gel og som kjørebuffer.

100 ml TAE buffer ble blandet med 1,5 g agarosepulver som ble smeltet under oppvarming i mikrobølgeovn. Til 100 ml flytende agarosegel ble 5 µl GelRed[™] tilsatt. Gelen ble støpt i en form med brønnekam som formet brønnene hvor prøvene ble applisert oppi.

Før applisering ble hver prøve blandet med 2 µl agarosegel loading dye 6X (Amresco®, Solon, Ohio, USA). I hver gel ble det applisert 6 µl ladder i en eller to av brønnene, avhengig av størrelsen på gelen og antall prøver. Ladder som ble brukt var Quick-Load® 100 bp DNA ladder (New England Biolabs® Inc, Ipswich, England). I de andre brønnene ble rundt 5-9 µl prøve i tillegg til negativ kontroll applisert. Elektroforesen ble kjørt ved 80-100 V i en «Bio-Rad Powerbank 300» (Bio-Rad Laboratories Inc) i ca. 1-1,25 time.

Gelene ble tatt bilde av med UV-lys i «Gel Doc™ XR-maskin» (Bio-rad Laboratories Inc) og ble redigert med «Gel Doc™ XR i Quantity One software» (Bio-rad Laboratories Inc). Avlesning av gelbildene indikerte hvilke resistensgener som var tilstede eller ikke (tabell 2.2).

2.6 16S rRNA Sanger-sekvensering av DNA-templat fra koloni

Sanger-sekvensering av 16S rRNA ble brukt for å bestemme slektskapet til bakterier med ESBL-fenotypisk resistens fra oppdyrkede kolonier på selektive kromogene medier (n=16).

16S rRNA ble amplifisert med PCR i henhold til protokoll fra produsenten av iProof DNA polymerasen som ble brukt «iProof™ High-Fidelity DNA polymerase» (Bio-rad Laboratories Inc). I reaksjonsblandingen ble det tilsatt iProof polymerase, dNTP-er, PCR-grade H₂O, iProof HF buffer (Bio-rad Laboratories Inc), i tillegg til primerne «1 Forward» og «5 Reverse». PCR-reaksjonen ble utført i maskinen «C1000 Thermal Cycler» (Bio-rad Laboratories Inc). Volum og konsentrasjon av komponentene i reaksjonsmiksen er vist i tabell 2.5 og PCR-programmet i tabell 2.7.

Tabell 2.5 PCR-miksen som ble brukt til amplifisering av 16S rRNA i DNA isolert direkte fra kolonier med ESBL-fenotypisk resistens, før Sanger-sekvensering.

Reagens	Volum (µl) per reaksjon	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon
iProof HF buffer	8	5x	1x
dNTP-er	0,8	10 mM	200 µM
1 Forward	2	5 µM	0,25 µM
5 Reverse	2	5 µM	0,25 µM
iProof DNA polymerase	0,4	2 U/µl	0,02 U/µl
Templat DNA	2		
PCR-grade H ₂ O	24,8		
Totalvolum (µl)	40		

Tabell 2.6 Oversikt over primerparet som ble brukt under 16S rRNA amplifisering før Sanger-sekvensering.

Primer	Sekvens (5'-3')	Målgjen	Produktstørrelse (bp)
1 «Forward»	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	~1500 bp
5 «Reverse»	GGTTACCTTGTTACGACTT		

Tabell 2.7 PCR-oppsett som ble brukt for 16S rRNA amplifisering av templat-DNA fra koloni før Sanger-sekvensering.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)
Aktivering av Iproof DNA polymerase	00:30	98
3-trinns-syklus*:		
1. Denaturering	00:10	98
2. Annealing	00:30	55
3. Ekstensjon	00:45	72
Endelig ekstensjon	10:00	72
Avkjøling	∞	4

*Syklusen ble gjentatt 35 ganger.

Da gelen med PCR-produkt ble undersøkt kom det frem at prosessen hadde mislykkes og det ble ikke påvist 16S rRNA i alle prøvene (n=16). Det ble derfor gjort nye forsøk hvor prøvene ble fortynnet. Alle de 16 prøvene ble fortynnet til 10^{-1} - og 10^{-3} -fortynning med milliQ-vann.

Forsøk to med samme PCR-oppsett ga også for få resultater, og det ble derfor forsøkt videre med ny polymerase, DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc) og nytt PCR-program (tabell 2.8) med de samme fortynningene. Dette ble utført i henhold til protokoll fra produsenten av DreamTaq DNA polymerasen som ble brukt, «Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase» (Thermo Fisher Scientific Inc), som vist i tabell 2.8 og tabell 2.9.

Ettersom dette gav positivt utslag på gel for prøvene som ble diskutert i denne oppgaven, som vist i figur C.10 og figur C.11 (Vedlegg C), ble det testet igjen med både ufortynnet og fortynningene 10^{-1} , 10^{-2} og 10^{-3} . Det ble lagd to paralleller av hver fortynning, hvorav halvparten av prøvene ble tilsatt Bovine Serum Albumin (BSA), som motvirker effekten av eventuelle inhibitorer.

Basert på resultatene fra agarose gelelektroforese ble et utvalg av prøver med 16S rRNA rensset før videre avsending til sekvensering hos GATC i Tyskland.

Tabell 2.8 Reaksjonsmiksen som ble brukt for PCR av alle prøvene med DreamTaq DNA polymerase.

Reagens	Volum (µl) per reaksjon	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon
10X DreamTaq™ buffer	2	10x	1x
dNTP-er	0,5	10 mM	0,25 mM
Forward 1	1	10 µM	0,5 µM
Reverse 5	1	10 µM	0,5 µM
DreamTaq DNA polymerase	0,1	5 U/µl	0,025 U/µl
Templat DNA	2		
PCR grade H ₂ O	13,4		
Totalvolum (µl)	20		

Tabell 2.9 PCR-oppsett til 16S rRNA amplifisering av templat-DNA fra kolonier før Sanger-sekvensering.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)
Aktivering DreamTaq DNA polymerase	05:00	95
3-trinns-syklus*:		
1. Denaturering	00:05	95
2. Annealing	00:05	55
3. Ekstensjon	01:05	72
Endelig ekstensjon	05:00	72
Avkjøling	∞	4

* Syklusen ble gjentatt 30 ganger.

2.6.1 Rensing av PCR-produkt med QIAquick® PCR Purification Kit (50)

QIAquick® PCR Purification Kit (50) (QIAGEN®) ble brukt til å rense prøvene før Sanger-sekvensering og rensingen ble utført i henhold til protokollen fra produsenten. PCR-produktene ble først blandet med fem ganger så mye buffer PB i forhold til mengden prøve. Fordi mengden prøve var 20 µl, ble det derfor tilsatt 100 µl buffer PB. All væske ble overført videre over i en QIAquick-kolonne som sto i et oppsamlingsrør. Prøvene ble sentrifugert ved maks fart på 13 200 «revolutions per minute» (rpm) i 1 minutt og all væske i oppsamlingsrøret ble etterpå kastet. For å vaske DNA-templatet ble det tilsatt 750 µl Buffer PE til kolonnen. Rørene ble sentrifugert på ny og væsken ble kastet. Prøvene ble sentrifugert en gang til for å fjerne eventuelle rester av vaskebuffer.

Kolonnene ble plassert i nye eppendorfrør og tilsatt 30 µl elueringsbuffer, som bidro til å ytterligere øke DNA-konsentrasjonen. Kolonnen med elueringsbuffer stod i ro i ca. 1 minutt før den ble sentrifugert. Væsken i oppsamlingsrøret ble på ny pipettert gjennom kolonnen og sentrifugert for å sikre høy DNA konsentrasjon.

For å sjekke konsentrasjon av 16S rRNA-amplikon i prøvene etter rensetrinnene ble konsentrasjonen målt med Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc) i Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc) i henhold til prosedyren i avsnitt 2.6. Ut i fra konsentrasjonsmålingene i hver prøve ble mengden rensert 16S rRNA og mengden primer tilpasset i hver enkelt prøve (tabell D.1, vedlegg D). Genmaterialet ble tilsatt i et eppendorfrør med «reverse» og ett rør med «forward» primer, hvor totalvolumet ble 10 µl i hvert rør. Til slutt ble disse sendt til 16S rRNA Sanger-sekvensering hos GATC (GATC Biotech AG, Constance, Tyskland).

2.6.2 Data-analyse

BioEdit®: Rådata i form av «reverse» og «forward» sekvenser av 16S rRNA fra Sanger-sekvensering ble montert til kontiger i redigeringsverktøyet *BioEdit*® (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Hver sekvenstråd ble undersøkt og redigert. Ujevne områder med dårlig separering av baser ble tatt bort i hver sekvens. Etterpå ble sekvenspar satt sammen til en kontig-sekvens med funksjonen «CAP contig assembly program» i *BioEdit*®.

Nukleotid Basic Local Alignment Search Tool (nBLAST): Nukleotid BLAST på NCBI sine nettsider (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 27.03.17 Internett) ble brukt for å finne homologi mellom søkesekvensen (16S rRNA kontig) og sekvenser i databasen. Resultatene fra genbanken i nBLAST ble brukt til å bestemme det taksonomiske slektskapet til bakteriekoloniene.

2.7 Helgenomsekvensering med Nanopore-sekvensatoren MinION

For å kartlegge ESBL-genotyper og identifisere isolat fra bakterier med påvist ESBL-fenotypisk resistens ble DNA helgenomsekvensert ved hjelp av Nanopore-sekvensering. Instrumentet MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) ble brukt til sekvenseringen. Både Nanopore-sekvenseringen og databehandling ble utført i samarbeid med PhD-kandidat Misti Dawn Finton, postdoktor Davide Porcellato og professor Bjørn-Arne Lindstedt, som alle tre er ansatt ved KBM-fakultetet på NMBU.

2.8 Mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq

For å utforske den mikrobielle diversiteten i jordprøvene, ble det utført mikrobiotasekvensering av 16S rRNA med Illumina MiSeq av DNA ekstrahert fra jord. Før sekvenseringen ble DNA ekstrahert og rensset direkte fra jord.

2.8.1 DNA-isolasjon med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit

Til DNA isolasjon direkte fra jord ble GenElute™ Soil DNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) brukt. Rensing ble utført i henhold til fremgangsproseduren fra produsenten «Technical bulletin» (Sigma-Aldrich). Prøvematerialet som ble analysert var pellets, oppsamlet ved sentrifugering av de opprinnelige jordprøvene (se avsnitt 2.8.1.1). Etter DNA-isolasjon ble DNA amplifisert med Multiplex PCR og analysert med agarose gelelektroforese, før utvalgte prøver ble sekvensert for 16S rRNA med Illumina MiSeq.

2.8.1.1 Forbehandling av pellets før DNA-isolasjon

Romtempererte jordprøver ble veid inn i tre paralleller á 250 mg opp i hvert sitt eppendorfrør. Eppendorfrørene ble så sentrifugert ved 14 000 rpm og supernatanten ble pipettert bort. Rør med pellets ble inkubert ved romtemperatur frem til rensing. For å kunne ekstrahere genmaterialet ble de romtempererte jordprøvene rensset i flere trinn før DNA-et ble isolert og deretter kjølelageret i frysenskap ved -20 °C.

Lysatfremstilling:

1. I første trinn av rensingen ble pelletene resuspendert i 750 µl Lysisbuffer G og 100 µl Lysis Additive A som lyserer cellene og bryter ned celleveggen, og får DNA til å lekke ut slik at det blir tilgjengelig i løsningen for videre isolering. Prøvene ble vortexet kort og deretter i 30 sekunders intervaller.
2. Prøvene ble så sentrifugert ved 14 000 rpm i to minutter og 450 µl supernatant fra dette trinnet ble overført til nye eppendorfrør og tilsatt 100 µl bindingsbuffer («binding buffer I») som binder genmaterialet under inkubering på is.
3. En ny sentrifugering av prøvene ved 14 000 rpm i to minutter fikk rester av protein og jordpartikler til å felle ut. Fordi jordprøvene trolig inneholdt svært mye organisk materiale ble det gjort et ekstra rensetrinn hvor 450 µl supernatant ble overført til nye 1,5 ml eppendorfrør. 50 µl av OSR Solutio blandes med supernatant og rørene inkuberes fem minutter på is. Deretter ble prøvene sentrifugert i to minutter ved 14 000 rpm.
4. 450 µl supernatant ble pipettert til «Humic Acid Removal»-kolonner i oppsamlingsrør som sentrifugeres ved 8000 rpm i 1 min. Sentrifugeringen forflytter DNA over i oppsamlingsrøret, som i det siste rensetrinnet ble blandet ut med 230 µl etanol.

Binding til kolonne:

5. For å binde DNA til kolonnen ble lysatet overført til «Spin-Column» med oppsamlingsrør, som binder DNA etter sentrifugering ved 8000 rpm i ett minutt. Væsken i oppsamlingsrøret ble kastet, mens DNA festet til kolonnen ble videre vasket.

Kolonnevask:

6. Vaskebuffer ble tilsatt i to ulike trinn for å fjerne ytterligere uønskede komponenter eller forurensninger i DNA. Først ble 500 µl buffer SK tilsatt prøvene og ble deretter sentrifugert ved 8000 rpm i ett min.
7. Væske i oppsamlingsrøret ble fjernet og gjenværende DNA ble vasket på ny med 500 µl «Wash solution A». Prøvene ble sentrifugert på samme måte som i forrige trinn og overflødig væske tatt bort.
8. Sluttcentrifugering ved 14 000 rpm i to minutter, tørker prøvene før det siste trinnet med elueringsbuffer som frigjør genmaterialet fra kolonnen.

Eluering av DNA:

9. 100 µl elueringsbuffer B ble da tilsatt kolonnene opp i 1,7 ml elueringsrør som ble inkubert i ett minutt ved romtemperatur. Elueringsbufferen bidrar til at DNA frigjøres fra kolonnen og sentrifugering i ett minutt ved 8000 rpm gjør at genmaterialet til slutt overføres til elueringsrøret.
10. For å øke utbyttet av DNA ble elueringstrinnene repetert på ny. Deretter ble prøvene oppbevart ved -20 °C frem til videre analyser med Multiplex PCR, gelelektroforese og Illumina sekvensering (MiSeq).

2.9 Kvantifisering av isolert DNA med NanoDrop og Qubit®

Med «NanoDrop 2000 UV-Vis spektrofotometer» (Thermo Fisher Scientific Inc) ble mengden DNA i prøver renset med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit og fra koloniene målt. Fra hver prøve ble 1 µl pipettert på prøvesøkkelen og analysert med NanoDrop 2000 Software (Thermo Fisher Scientific Inc).

Fordi enkelte av prøvene fra GenElute hadde lave DNA-konsentrasjoner, ble et utvalg på 10 prøver analysert med «Qubit®2.0 Fluorometer» (Thermo Fisher Scientific Inc) og Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) Assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc). Qubit® dsDNA BR Reagent ble fortynnet med Qubit® buffer i forholdet 1:200 (dvs. (199 µl buffer + 1 µl reagent) x antall prøver) til en bruksløsning. For hver prøve ble 3 µl DNA templat blandet med 197 µl bruksløsning i 0,5 ml PCR-rør, med et sluttvolum på 200 µl. To standarder ble pipettert fra 10 µl Standard (fra kit) og

190 µl Qubit® bruksløsning. Videre ble prøvene vortexet i 2-3 sekunder og inkubert ved romtemperatur i ca. 2 minutter. Til slutt ble mengden DNA målt med «Qubit® 2.0 Fluorometer» ved å plassere rørene i maskinen. Et utvalg av prøver med lave DNA-verdier ble i tillegg analysert med Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc). Prosedyren var den samme, men reagensene ble byttet ut med HS-reagenser:

- ✓ Qubit® dsDNA HS Reagent
- ✓ Qubit® dsDNA HS Buffer
- ✓ Qubit® dsDNA HS Standard #1
- ✓ Qubit® dsDNA HS Standard #2.

2.10 Mikrobiotasekvensering av 16S rRNA med Illumina MiSeq

Forberedelsene til sekvensering og selve sekvenseringen ble utført i samarbeid med postdoktor Davide Porcellato, ansatt ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (NMBU). Trinnene for gjennomførelse er oppsummert i figur 2.1.

2.10.1 Kvantitativ PCR (qPCR) for 16S rRNA amplifisering av isolert DNA direkte fra jord

Før sekvensering ble 16S rRNA genet i DNA ekstrahert direkte fra jord, amplifisert med qPCR. Under forberedelsene ble prøvene holdt på is sammen med reagensene. Templat-DNA ble tilsatt helt til slutt, rett før PCR. Som forberedelse til PCR ble det lagd en mastermiks bestående av polymerase, dNTP-er, buffer, sybergreen, vann og primerpar. 18 µl ble tilsatt i hver brønn på en 96-brønnsplate og deretter tilsatt 2 µl DNA templat. Reagensene ble vortexet og sentrifugert før platen ble satt inn i PCR-maskinen. Oppsettet er vist tabell 2.10.

Tabell 2.10 Oppsett for PCR-miks brukt i qPCR av 16S rRNA fra DNA ekstrahert direkte fra jord.

Reagens	Volum (µl) per reaksjon	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon
Iproof HF buffer	4	5x	1x
dNTP'er	0,4	10 mM	200 µM
PRK341F (UNI F)	1	5 µM	0,25 µM
PRK806R (UNI R)	1	5 µM	0,25 µM
Sybergreen	1	20x	1x
Iproof DNA polymerase	0,2	2 U/µl	0,02 U/µl
Templat DNA	2		
PCR kvalitet H ₂ O	10,4		
Totalvolum (µl)	20 µl		

16S rRNA ble amplifisert med PCR-maskinen Light Cycler 480II (Roche Molecular Systems Inc, Pleasanton, CA, USA) og analysert med Light Cycler®480 Software (Roche Molecular Systems Inc). Oppsettet for qPCR-programmet er vist i tabell 2.11.

Tabell 2.11 PCR-oppsett for 16S rRNA amplifisering med qPCR av DNA ekstrahert direkte fra jord.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)
Aktivering av Iproof DNA polymerase	00:30	98
3-trinns-syklus*:		
1. Denaturering	00:10	98
2. Annealing	00:30	53
3. Ekstensjon	00:20	72
Endelig ekstensjon	05:00	72
Avkjøling	∞	4

*Syklusen ble gjentatt 35 ganger.

Etter amplifiseringen ble produkt fra 19 utvalgte PCR-prøver renset med Agencourt® AMPure® XP perler (Beckman Coulter, MA, USA) som det ble tilsatt 0,8 ganger så mye av i forhold til mengden DNA, som tilsvarer 20 µl PCR produkt og 16 µl AMPure XP perler. Rensingen ble utført i henhold til protokollen «Agencourt® AMPure® PCR Purification» (Beckman Coulter).

Til hvert PCR-produkt (ca. 20 µl) ble det tilsatt 16 µl Agencourt® AMPure® XP perler på en 96-brønnplate. Dette ble blandet tre ganger med pipette og deretter inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Brønnplaten ble inkubert på magnetplate i to minutter og etterpå ble supernatanten pipettert bort. Gjenværende pellet ble inkubert med 100 µl (80 %) etanol som etterpå ble pipettert bort. Dette ble gjort på ny for å fjerne mest mulig etanol. Etter rensing ble prøvene lufttørket i 15-30 minutter og deretter tatt bort fra magnetene. 20 µl elueringsbuffer ble tilsatt og prøvene ble inkubert i to minutter. Brønnplaten ble så satt tilbake på magnetene igjen og inkubert i nye 5 minutter. 16 µl prøve (eluat) ble til slutt overført til ny 96-brønnplate.

2.10.2 Illumina indexing PCR av renset DNA

Til Illumina indexing PCR ble 5 µl renset PCR-produkt blandet med 1 µl av hver primer («forward» og «reverse») i hver sine PCR-prøverør. Dette ble blandet med 19 µl mastermiks bestående av DNA-polymerase, vann, buffer, dNTP-er og MgCl₂ til et sluttvolum på 25 µl i hver brønn (tabell 2.12).

Tabell 2.12 Oppsett for PCR-miks brukt i Illumina indexing PCR av 16S rRNA

Reagens	Volum (μ l) per reaksjon	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon
HotFirePol [®] DNA polymerase	0,25	5 U/ μ l	1,25 U
HotFirePol [®] buffer B2	2,5	10x	1x
MgCl ₂	2,5	25 mM	2,5 mM
dNTP'er	0,5	10 mM	200 μ M
Index forward primer	1	20x	1x
Index revers primer	1	5 μ M	0,2 μ M
Sybergreen	1	5 μ M	0,2 μ M
Templat DNA	5		
PCR kvalitet H ₂ O	11,25		
Totalvolum (μ l)	25		

Amplifiseringen ble utført med en C1000 Thermal Cycler (Bio-rad Laboratories Inc). Oppsettet for PCR-programmet er vist i tabell 2.13.

Tabell 2.13 PCR-oppsett for Illumina indexing PCR.

PCR-trinn	Tid (min)	Temperatur ($^{\circ}$ C)
Aktivering av HotFirePol [®] DNA polymerase	00:15	95
3-trinns-syklus*:		
1. Denaturering	00:30	95
2. Annealing	01:00	55
3. Ekstensjon	00:45	72
Endelig ekstensjon	07:00	72
Avkjøling	∞	4

*Syklusen ble gjentatt 10 ganger.

Videre rensing og normalisering av PCR-produkt ble gjort av Davide Porcellato med Sequal-Prep[™] Normalization Plate Kit, 96-well (Thermo Fisher Scientific Inc). Konsentrasjonsmålinger ble gjort med Qubit[®] dersom DNA-konsentrasjonene var lave, og eventuelle prøver ble rensset på ny med Agencourt[®] AMPure[®] XP beads. PerfeCta[®] NGS Quantification Kit for Illumina[®] sequencing platforms (Quanta Bio, Beverly, MA, USA) ble brukt for å måle konsentrasjonen i rensset

templat og ble utført i samsvar til protokoll fra produsent, «PerfeCta[®] NGS Quantification Kit for Illumina[®] sequencing platforms» (Quanta Bio).

2.10.3 Illumina MiSeq

Prøvene ble forberedt før sekvensering i henhold til protokollen «MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide» (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Bibliotek-DNA ble fortynnet fra 20 pM til en konsentrasjon på 8 pM, og prøvene ble deretter tilsatt 15 % PhiX-kontroll. Videre ble prøvene sekvensert i maskinen «Illumina MiSeq[™]» (Illumina Inc, San Diego).

Postdoktor Davide Porcellato omgjorde resultatene fra sekvenseringen til «operational taxonomic units» (OTU-er) og sammenlignet disse sekvensene med en database for taksonomisk identifisering. Resultatene ble deretter filtrert i ulike taksonomiske grupper. Fremgangsmåten for mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq er vist i figur 2.1, sammen med utførelsen av de statistiske analysene som også ble gjort av Davide.

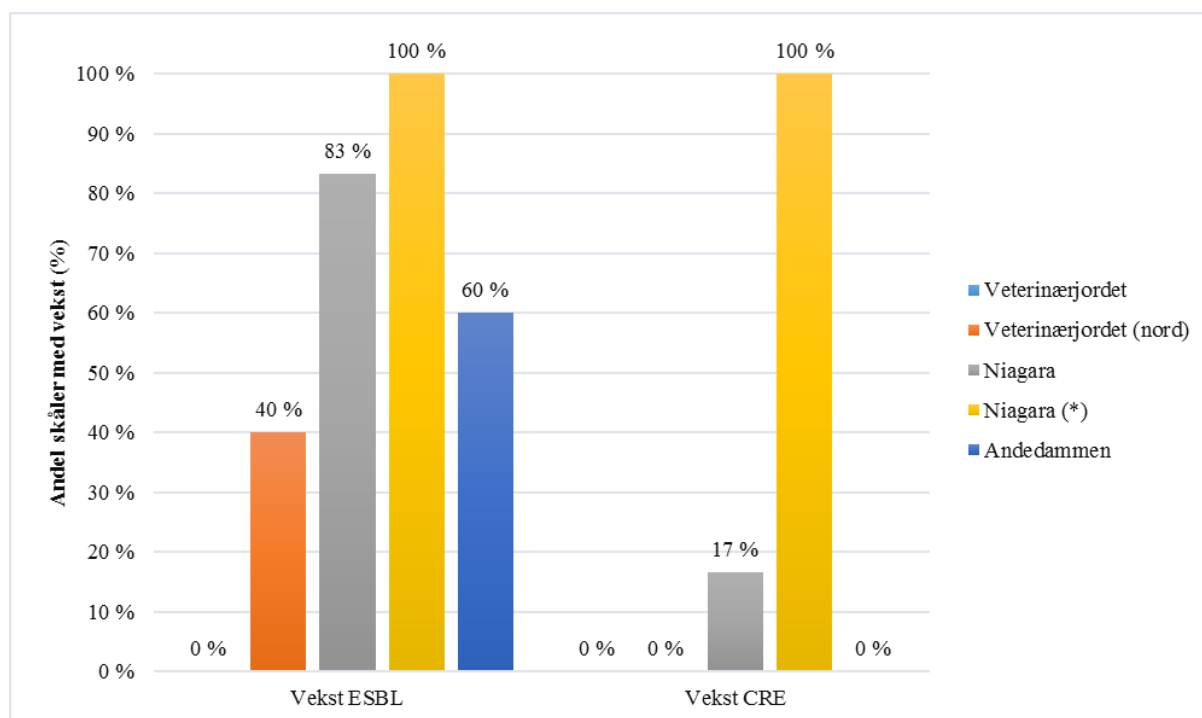
3 RESULTATER

3.1 Dyrkningsbasert ESBL-fenotypisk deteksjon av multiresistente isolat

3.1.1 ESBL-screening med oppdyrking på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE

Det ble undersøkt om jordprøvene inneholdt bakterier med ESBL-fenotypisk resistens mot β -laktamantibiotika ved oppdyrking på de selektive kromogene mediene *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE. Etter inkubasjon ved 37 °C i ca. 24 timer ble skåler med vekst undersøkt.

De selektive vekstskålene ble utstrøket med to ulike fortynninger. Vekstresultatene av jordprøver fortynnet i Ringers løsning er vist i tabell B.2 (vedlegg B), og vekstresultatene fra jordprøver fortynnet i Ringers og deretter oppdyrket i BHI-medium er vist i tabell B.1 (vedlegg B). Prosentvis fordeling av andelen selektive skåler med vekst av bakterier med ESBL-fenotypisk resistens ble beregnet fra disse resultatene (tabell B.3, vedlegg B), og er presentert i figur 3.1.



Figur 3.1 Prosentvis vekstfordeling av skåler med vekst etter oppdyrking av jordprøver fra Veterinærjordet, Veterinærjordet (nord), Niagara, Niagara (*) og Andedammen på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE. «Niagara (*)» er prøver fra Niagara som ble strøket ut direkte etter fortynning i Ringers løsning.

Uten å ta hensyn til parallelle prøver ble det påvist bakterier med ESBL-fenotypisk resistens i 9 av totalt 19 jordprøver. Det var derimot i kun 3 av 19 jordprøver hvor det ble påvist bakterier med ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens.

Av alle skålene som ble utstrøket med jordprøver vokste det totalt sett frem 19 isolat med ESBL-fenotypisk resistens, hvorav 16 ble analysert med Multiplex PCR og Sanger-sekvensering. 10 av disse isolatene ble helgenomsekvensert med MinION.

Av totalt 25 inkuberte *Brilliance*TM ESBL skåler vokste det bakteriekolonier med fenotypisk ESBL-resistens mot β -laktamantibiotika på 56 %. Og av totalt 25 inkuberte *Brilliance*TM CRE skåler vokste det bakteriekolonier med fenotypisk ESBL_{KARBA}-resistens på 20 % av skålene.

Skålene med jordprøver fra Veterinærjordet var de eneste skålene uten synlig vekst av multiresistente bakterier, verken på *Brilliance*TM ESBL eller *Brilliance*TM CRE. I jordprøvene fra Veterinærjordet (nord) og Andedammen ble det derimot påvist multiresistente bakteriekolonier med ESBL-fenotypisk resistens i henholdsvis 40 % og 60 % av ESBL-skålene utstrøket med prøve fra disse områdene (figur 3.1). Det ble ikke påvist bakterier med ESBL_{KARBA}-fenotype i jordprøver fra Veterinærjordet (nord) og Andedammen.

Totalt sett ble det påvist flest positive skåler av de som ble utstrøket med jord hentet fra Niagara og Niagara (*). I disse prøvene ble det påvist bakterier med ESBL- og ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens. Både i prøver fra Niagara (*) og Niagara ble det påvist karbapenem-resistente bakterier. Alle skåler som ble utstrøket med jordprøvene fra Niagara (*) var positive etter inkubering. Oppdyrking av Niagara (*)-prøvene ga dermed flest positive skåler sammenlignet med alle de andre prøvene som først ble oppdyrket i BHI-buljong.

Isolat fra skåler med kolonidannelse ble fordelt mellom undertegnede og en annen gruppe og er oppsummert i tabell 3.1. Prøvene (n=7) som blir omtalt og diskutert i denne oppgaven er markert med (*) i tabell B.1 og tabell B.2 i vedlegg B.

Tabell 3.1 Prøveoversikt over utvalgte prøver som ble analysert i denne masteroppgaven.






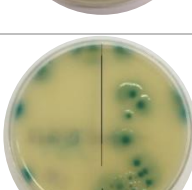
Prøve (n=7) ³	Sted	Selektivt kromogent medium
Na1*(E)	Niagara	<i>Brilliance</i> TM ESBL
Na1*(C)	Niagara	<i>Brilliance</i> TM CRE
Nb1*(E)	Niagara	<i>Brilliance</i> TM ESBL
Nb1*(C)	Niagara	<i>Brilliance</i> TM CRE
Nb2 (E)	Niagara	<i>Brilliance</i> TM ESBL
VNc1 (E)	Veterinærjordet (nord)	<i>Brilliance</i> TM ESBL
VNd1 (E)	Veterinærjordet (nord)	<i>Brilliance</i> TM ESBL

³ Annoteringen (E) eller (C) bak nummereringen brukes for å vise om prøven ble podet fra *Brilliance*TM ESBL eller *Brilliance*TM CRE.

3.1.2 Fargescreening av kolonier

Fargeforandringer i kolonier med ESBL- og ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens ble brukt for å forsøke å finne bakterienes slektskap. Vurderingen ble gjort i henhold til protokollen «Quick and easy, ESBL and CRE screening» (Thermo Scientific Inc) og resultatene er vist i tabell 3.2.

Tabell 3.2 Fargescreening av kolonier på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE.

Prøve	Bilde av skål ⁴	Farge på koloni	Tolkning ⁵
Na1*(E)		Brun/oransje	<i>Proteus, Morganella</i> og <i>Providencia</i>
Na1*(C)		Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i> (KESC) «CRE-positiv»
Nb1*(E)		Gjennomsiktig, rosa/oransje	<i>Salmonella, Acinetobacter</i> , eller andre ⁶
Nb1*(C)		Lys, brun/oransje	<i>Pseudomonas</i> «Ikke-CRE»
Nb2 (E)		Brun/oransje	<i>Proteus, Morganella</i> og <i>Providencia</i>
VNc1 (E) t.v.		Grønn	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i> (KESC)
VNd1 (E) t.h.		Grønn	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i> (KESC)

⁴ Bilder i tabell 5.2 og figur 4.4 er tatt av Elahe Abbasi (student NMBU).

⁵ Bakterier som vokste på *Brilliance*TM CRE ble definert som enten «CRE-positiv» eller «ikke-CRE» avhengig av kolonifarge. «Ikke-CRE» kan også vokse frem som følge av andre resistensmekanismer.

⁶ Det bør tas hensyn til at andre bakterier med andre resistensmekanismer kan danne kolonier på de selektive skålene *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE (Thermo Scientific Inc).

3.2 Molekylær karakterisering av ESBL-holdige bakterier

3.2.1 ESBL-screening med Multiplex PCR og gelelektroforese av DNA i BHI-medium

DNA-templat fra alle prøver inkubert i BHI-medium ble testet med Multiplex PCR for å søke etter ESBL-gener. Hver prøve ble undersøkt med primermikser bestående av tre primerpar hver, tilsatt som mastermiks 1-4 for å søke etter utvalgte resistensgener av typen ESBL_A og ESBL_{KARBA} (tabell 2.2). Hvert PCR-produkt ble undersøkt med agarose gelelektroforese som synliggjorde målgenene som bånd på gel, som er vist i Vedlegg C.

Plasseringen av båndene ble vurdert ved å sammenligne båndene med en 100 bp DNA ladder. Synlige bånd ble vurdert som (++) ved sterke bånd eller (+) ved svake bånd. Resultatene fra tolkingen er oppsummert i tabell 3.3.

Tabell 3.3 Tolking av resultater for påvisning av resistensgener med Multiplex PCR av jordprøver dyrket i BHI-medium.

Målgen Prøve	Mastermiks 1			Mastermiks 2			Mastermiks 3			Mastermiks 4		
	CTX-M (Gr.2)	OXA	SHV	CTX-M (Gr. 1)	CTX-M (Gr. 9)	TEM	NDM	VIM	KPC	OXA-48	rpoB	16S rRNA
Niagara												
Na1	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	++	+
Nb1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
Veterinærjordet (nord)												
VNc1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
VNd1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-

Det ble påvist tre ESBL-gener fra to ulike prøver med Multiplex PCR av templat DNA fra BHI-medium (tabell 3.3). Alle genene tilhører genotypen ESBL_{KARBA}. Genet *bla_{VIM}* som er en ESBL_{KARBA-B}-variant ble påvist både i prøve Na1 fra Niagara og VNd1 fra Veterinærjordet (nord). I den samme Niagara-prøven ble det i tillegg funnet et ESBL_{KARBA-A}-gen i form av *bla_{KPC}*. Det ble ikke påvist ESBL-gener i de to andre prøvene (Nb1 og VNc1).

Postive kontrollprøver bekreftet tilstedeværelsen av amplifisert, bakterielt DNA i alle prøvene. Under kontrollprøven i gel med M3 og M4, vist i figur C.2 og figur C.3, var det et svakt bånd. Det manglet også negativ kontrollprøve i gel vist i figur C.1.

3.2.2 ESBL-screening med Multiplex PCR og gelelektroforese av DNA ekstrahert fra jord

Alle prøver ekstrahert direkte fra jord ble testet med Multiplex PCR, men ingen av gelbildene var mulige å tolke i etterkant av agarose gelelektroforese og ble derfor utelatt.

3.2.3 ESBL-screening med Multiplex PCR og gelelektroforese av DNA fra koloni

Alle isolat (n=7) fra selektivt vekstmedium med påvist ESBL- og ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens ble testet med Multiplex PCR og agarose gelelektroforese på samme måte som DNA-templat

i oppdyrkede BHI-prøver. DNA ekstrahert fra kolonier på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE ved koking ble brukt som templat i PCR-reaksjonen. Resultatene fra gelelektroforesen er presentert i tabell 3.4 og er basert på gelbildene i vedlegg C.

Plasseringen av båndene ble vurdert på samme måte ved å sammenligne båndene med en 100 bp DNA ladder, hvorav synlige bånd ble vurdert som (++) ved sterke bånd eller (+) ved svake bånd. Resultatene fra tolkningen er oppsummert i tabell 3.4.

Tabell 3.4 Tolkning av resultater for påvisning av resistensgener med Multiplex PCR og agarose gelelektroforese av DNA fra kolonier med ESBL-fenotypisk resistens.

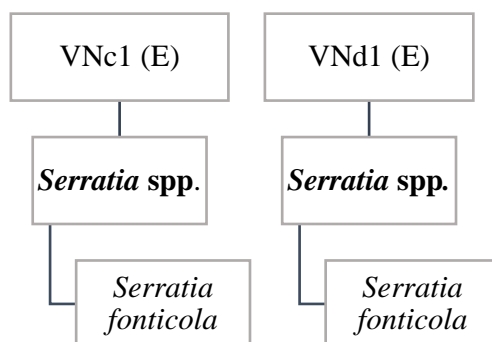
Målgen Prøve	Mastermiks 1			Mastermiks 2			Mastermiks 3			Mastermiks 4		
	CTX-M (Gr. 2)	OXA	SHV	CTX-M (Gr. 1)	CTX-M (Gr. 9)	TEM	NDM	VIM	KPC	OXA-48	rpoB	16S rRNA
Niagara												
Na1*(E)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Na1*(C)	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nb1*(E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
Nb1*(C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
Nb2 (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
Veterinærjordet (nord)												
VNc1 (E)	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	++	-
VNd1 (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-

I DNA-templat direkte fra renkultur med ESBL-fenotypisk resistens ble det påvist fire resistensgener i tre forskjellige isolat. I to av isolatene fra samme sted, men som vokste på ulike skåler, Na1*(E) og Na1*(C), ble det påvist ESBL_A-genet *bla*_{SHV}. Båndene som påviste *bla*_{SHV} var imidlertid vanskelig å tolke fordi begge to, i tillegg til ladder, var dratt nedover. I isolatet fra Veterinærjordet (nord) ble det påvist et ESBL_{KARBA-A}-gen i form av *bla*_{KPC} og et ESBL_A-gen i form av *bla*_{TEM}. Det ble derimot ikke påvist ESBL-gener med Multiplex PCR i de fire andre prøvene.

Positive kontrollprøver bekreftet tilstedeværelsen av bakterielt DNA i alle prøvene, som indikerte at PCR-reaksjonen var vellykket. I tillegg var kontrollprøvene for kontaminering under Multiplex PCR med av isolatene (n=7) hvor resistensgen ble påvist negative, men det manglet negativ kontrollprøve i gelkjøring med M4.

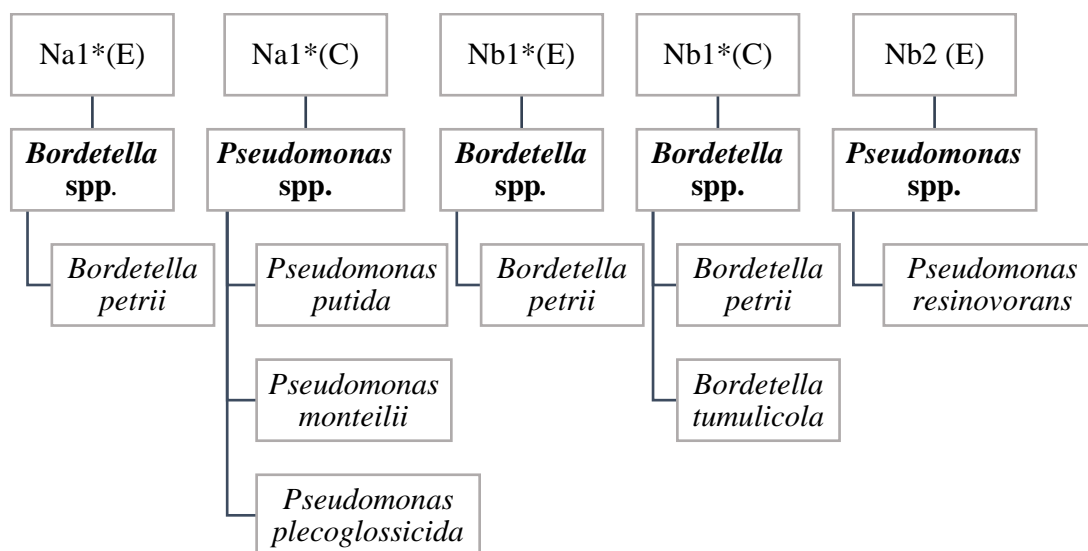
3.2.4 Nukleotid BLAST (nBLAST) av 16S rRNA-gensekvenser fra multiresistente bakterier
Identiteten til bakterier med ESBL-fenotypisk resistens (n=7) ble kartlagt med sekvensering og databasesøk i nBLAST. Isolatenes taksonomiske slektskap er oppsummert i figur 3.2 og figur 3.3.

nBLAST ble brukt for å sammenligne og estimere likhetsgraden mellom ukjente 16S rRNA sekvenser med kjente DNA-sekvenser i databasen. På den måten ble isolatene identifisert på slektsnivå og et mulig artsnivå. Søkeresultatene med nBLAST er vist i tabell D.2 (vedlegg D).



Figur 3.2 Oversikt over taksonomisk kartlegging og identifisering av isolat med ESBL-fenotypisk resistens fra databasesøket med nBLAST av utvalgte prøver fra Veterinærjordet (nord).

Kolonier fra prøve VNC1 (E) og VND1 (E) inneholdt samme bakterieslekt, selv om prøvene opprinnelig er tatt ut fra to ulike steder på Veterinærjordet (nord) (se figur 2.3).



Figur 3.3 Oversikt over taksonomisk kartlegging og identifisering av bakterier med ESBL-fenotypisk resistens fra databasesøket med nBLAST for utvalgte prøver hentet fra Niagara og Niagara (*).

Fra resultatene kommer det frem at bakteriekoloniene fra prøve Na1*(E) og Na1*(C) stammer fra to ulike bakterieslekter, selv om de opprinnelig kom fra samme jordprøve. Prøve Nb1*(E) derimot inneholdt bakteriekolonier av samme slekt som prøve Na1*(E). Resultatet fra nBLAST viste at prøve Nb2 (E) inneholdt resistente *Pseudomonas* spp. bakterier, som skiller seg ut fra resultatene til prøve Nb1*(E) og Nb1*(C) som også kom fra samme jordprøve (se figur 2.3).

Informasjonen fra databasesøket indikerte at treffene var pålitelige. «Query cover» var 100 % for alle de utvalgte treffene for alle prøver undersøkt i nBLAST, noe som indikerte at hele kontig-sekvensene ble sammenlignet med de homologe sekvensene i databasen. Hadde de homologe databaserekvensene eller kontigene vært for korte ville «query cover» for eksempel vært lavere. Da ville færre nukleotider ha blitt sammenlignet og sjansen for feil ville ha økt, som ville gitt en E-verdi > 0. E-verdiene var derimot lik 0 for alle treffene som ble brukt for å identifisere koloniene, som innebærer at sannsynligheten for at treffene kun skyltes tilfeldige hendelser var lav. Identitetsscoren var mellom 99-100 % for alle prøvene med hensyn på type base (A, T, C, G) og posisjoneringen av basene med søkesekvensen. *Serratia* spp. påvist i prøve 5 (E) fra Veterinærjordet (nord) hadde en kontig-sekvens som var 100 % lik ett av treffene i NCBI-databasen. Dette treffet er noe mer sikkert enn treff med 99 % likhet.

Resultatene fra Sanger-sekvensering, Multiplex PCR og kartleggingen fra fargescreening ble videre sammenlignet, som vist i tabell 3.5.

Tabell 3.5 Oppsummering av funn fra fargescreening av kolonier, Multiplex PCR, agarose gelelektroforese og 16S rRNA Sanger-sekvensering.

Prøve	16S rRNA Sanger-sekvensering	Fargescreening av kolonier	ESBL-gen	Positiv kontroll-prøve
Na1*(E)	<i>Bordetella</i> spp.	<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>	<i>bla_{SHV}</i>	Positiv
Na1*(C)	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i>	<i>bla_{SHV}</i>	Positiv
Nb1*(E)	<i>Bordetella</i> spp.	<i>Salmonella, Acinetobacter</i> eller andre (fargeløse)	Negativ	Positiv
Nb1*(C)	<i>Bordetella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i>	Negativ	Positiv
Nb2 (E)	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>	Negativ	Positiv
VNc1 (E)	<i>Serratia</i> spp.	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i>	<i>bla_{KPC}</i> <i>bla_{TEM}</i>	Positiv
VNd1 (E)	<i>Serratia</i> spp.	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> og <i>Citrobacter</i>	Negativ	Positiv

Ingen av resultatene fra nBLAST av Niagara-prøvene samsvarte med resultatene fra fargeanalysen. I begge prøvene fra Veterinærjordet (nord) derimot samsvarte resultatene fra fargescreening

med 16S rRNA Sanger-sekvenseringen. nBLAST-søket bekrefter at de grønne koloniene var *Serratia* spp., som var en av fire alternativer ifølge fargescreeningen.

Sekvenseringen av de andre prøvene viste at det var andre bakterier enn *Enterobacteriaceae* som vokste og lagde fargede kolonier på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE agar, enn de som fargescreenings-prosedyren var tilpasset for. Dette førte til mistolking av koloniens identitet. Som et eksempel lagde *Bordetella* spp. lignende kolonier som *Pseudomonas* spp. på CRE-skålene. Det samme gjaldt *Pseudomonas* spp. som vokste på *Brilliance*TM CRE og ga blå-fargede kolonier, som typisk kjennetegnes KESC-bakteriene.

Fem av isolatene med generell ESBL-fenotypisk resistens ble identifisert som enten som *Bordetella* spp. (n=2) og *Pseudomonas* spp. (n=1) og *Serratia* spp. (n=2). De to siste isolatene med ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens ble identifisert som *Bordetella* spp. (n=1) og *Pseudomonas* spp. (n=1).

Fire resistensgener ble påvist i tre ulike isolat med Multiplex PCR. I to av isolatene av *Bordetella* spp. og *Pseudomonas* spp. ble *bla*_{SHV}-genet påvist. Dette er en type ESBL_A-variant og funnet kan ses i sammenheng med at *Bordetella* spp. dannet kolonier på *Brilliance*TM ESBL. At *bla*_{SHV} i tillegg ble påvist i isolat av *Pseudomonas* spp. forklarer ikke alene hvorfor denne vokste på *Brilliance*TM CRE, men kan ses i sammenheng med at *Pseudomonas* spp. som vokser på CRE-agar betraktes som «ikke-CRE».

I prøve VNc1 (E) ble *bla*_{KPC} påvist, som er en karbapenemase. I tillegg ble også ESBL_A-genet *bla*_{TEM} detektert. Funnene samsvarer med at *Serratia* spp. vokste på *Brilliance*TM ESBL-agar.

For fire av isolatene ble det ikke påvist ESBL_A- eller ESBL_{KARBA}-gener som kunne kobles til bakterienes fenotypiske resistens.

3.2.5 Helgenomsekvensering med NanoPore-sekvensatoren MinION

Fire av de syv isolatene diskutert i denne oppgaven ble sekvensert med MinION. Resultatene fra helgenomsekvenseringen ble sammenlignet med ESBL-screeningsresultatene fra dyrkningsavhengig fenotypisk deteksjon av ESBL-produserende bakterier på selektivt medium, samt med resultatene fra Multiplex PCR og 16S rRNA Sanger-sekvensering. Dette er presentert i tabell 3.6.

Tabell 3.6 Oppsummering av ESBL-screening (ESBL og karbapenemaser) av miljøprøver med fenotypiske, fylogenetiske og molekylærbiologiske deteksjonsmetoder.

Prøve (n=7)	16S rRNA sekvensering (slektsnivå)	16S rRNA sekvensering (artsnivå)	Fra BLAST MinION og Kmer-søk	β-laktamaser påvist med MinION	Multiplex PCR
Na1*(E)	<i>Bordetella</i> spp.	<i>B. petrii</i> ,	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert	SHV
Na1*(C)	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>P. putida</i> , <i>P. monteilii</i> <i>P. plecoglossicida</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	VIM	SHV
Nb1*(E)	<i>Bordetella</i> spp.	<i>B. petrii</i>	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert	
Nb1*(C)	<i>Bordetella</i> spp.	<i>B. petrii</i> , <i>B. tumulicola</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bordetella petrii</i>	OXA, SHV	
Nb2 (E)	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>P. resinovorans</i>	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	GES, OXA	
VNc1 (E)	<i>Serratia</i> spp.	<i>S. fonticola</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	CTX-M, GES, OXA, KPC, SHV, CMY, TEM, FOX, DHA, MOX, IMP	KPC, TEM
VNd1 (E)	<i>Serratia</i> spp.	<i>S. fonticola</i>	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert	

*Kontrollprøvene som ble kjørt ved sekvensering med MinION bekreftet at gjennomføringen var vellykket.

Fra oppsummeringen i tabell 3.6 kommer det frem at helgenomsekvensering av DNA-templat fra isolerte kolonier med ESBL-fenotypisk resistens bekreftet flere av observasjonene og resultatene fra både oppdyrking på selektivt medium, Multiplex PCR og Sanger-sekvensering.

Av isolatene (n=4) som ble sekvensert med MinION var det to av isolatenes identiteter som ble bekreftet på artsnivå på bakgrunn av at resultatet samsvarte med Sanger-sekvenseringen. Det gjaldt funn av *P. resinovorans* i prøve Nb2 (E) og *B. petrii* påvist i prøve Nb1*(C), begge fra Niagara. Det ble også oppdaget en annen art i sistnevnte prøve, nemlig *Staphylococcus epidermis*.

På slektsnivå samsvarte funnene i prøve VNc1 (E) av *Serratia* spp., men ikke på artsnivå. Den mest fremtredende forskjellen i resultatene er i prøve Na1*(C) hvor isolatet ifølge Sanger-sekvensering var *Pseudomonas* spp., mens det med MinION ble påvist *Ochrobactrum anthropi*-bakterier.

Med Nanopore-sekvensering ble det funnet en rekke ESBL-gener i de sekvenserte isolatene (n=4), inkludert ESBL_{KARBA}-gener. ESBL-genotypene som ble påvist med MinION samsvarer i tillegg med noen av funnene gjort med Multiplex PCR. Nanopore-sekvensering bidro dermed til å bekrefte noen av funnene, i tillegg til å bidra med nye funn av ESBL-gener. I isolat VNc1 (E) ble

funnene av ESBL-genene *bla*_{TEM} og *bla*_{KPC} oppdaget med Multiplex PCR bekreftet med MinION-sekvensering. I isolat Nb1*(C) av *Bordetella* spp. ble det ikke påvist resistensgener med Multiplex PCR, men med helgenomsekvensering derimot ble både OXA- og SHV-gen påvist. Funn av *bla*_{SHV} i prøve Na1*(C) med PCR kunne ikke bekreftes med Nanopore-sekvensering.

3.3 Mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq

3.3.1 Konsentrasjon og kvalitet i DNA-templat ekstrahert direkte fra rensset jord

DNA-templat isolert direkte fra jord med dyrkningsuavhengig ekstraksjonsmetode ble brukt i 16S rRNA mikrobiotasekvensering. Etter rensing ble DNA-konsentrasjonene i prøvene målt med NanoDrop. Basert på nukleinsyrenes ulike absorbans av UV-lys ble DNA-mengde og urenheter i prøvene kvantifisert, og disse målingene er presentert i tabell E.2 i vedlegg E.

DNA-konsentrasjonen i alle prøvene varierte mellom 1,7 og 23,7 ng/μl. Konsentrasjonsmålingene av DNA målt med UV-lys avdekket at mengden DNA var lavere enn teoretisk forventet i de fleste prøvene, men likevel høye nok til å gjennomføre qPCR. Forholdet A260/A280 og A260/A230, som var målt med NanoDrop, var klare indikatorer på at det i tillegg var urenheter i prøvene. Av alle prøvene hadde 51 % av prøvene en A260/A280 ratio på over 1,8, som er over grenseverdi for forurensning på grunn av RNA og proteiner (tabell E.2). Samtlige prøver hadde også A260/A230 ratio under 1,5, som indikerte tilstedeværelse av forurensing på grunn av salter i prøvene (tabell E.2).

På bakgrunn av lave DNA-konsentrasjoner i ekstraktene, ble et utvalg prøver kontrollert med Qubit[®]-fluorometer (tabell E.3, Vedlegg E). DNA-konsentrasjonen i de fleste prøvene varierte fra 0,19 til 7,33 ng/μl. Tre av prøvene hadde konsentrasjoner under grenseverdiene. Alle målingene for de utvalgte prøvene var lavere enn tilsvarende DNA-konsentrasjoner målt med NanoDrop. Målingene fra Qubit[®] bekreftet altså også at DNA-konsentrasjonen var lave, i tillegg til å indikere at de var enda mindre enn teoretisk forventet.

DNA-konsentrasjon i samtlige prøver ble videre vurdert med qPCR. I utgangspunktet skulle totalt 39 prøver sekvenseres (tabell E.2), men fordi enkelte målinger fra qPCR også var for lave ble kun et utvalg på 19 prøver videre klargjort til 16S rRNA mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq.

3.3.2 Mikrobiell diversitet

Den mikrobielle diversiteten i hver av de rensede jordprøvene ble kartlagt ved 16S rRNA sekvensering av klargjort bibliotek-DNA med Illumina MiSeq. Totalt 16 166 sekvenser fra 7 utvalgte

prøver ble fordelt på 814 ulike «operational taxonomic units» (OTU). Postdoktor Davide Porcellato omgjorde resultatene fra sekvenseringen og sammenlignet OTU-ene med en database for taksonomisk identifisering. De ble deretter filtrert i ulike taksonomiske grupper.

Prøver uten sekvenser ble utelatt helt fra videre analyser av dataene, mens de med over 0 sekvenser ble vurdert med «Rarefaction»-kurve og α -diversitet (Chao 1 index og Shannon index). Disse prøvene er oppsummert i tabell 3.7.

Tabell 3.7 Oversikt over utvalgte prøver for videre analyser med «Rarefaction»-kurver og α -diversitet.

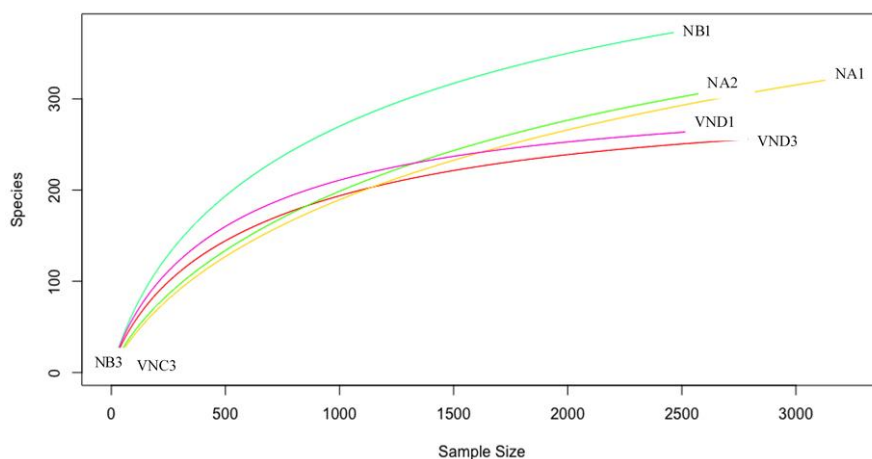
Område	Sted	Parallell	Forkortelse
Niagara	A	1	NA1
Niagara	A	2	NA2
Niagara	B	1	NB1
Niagara	B	3	NB3
Veterinærjordet (nord)	C	3	VNC3
Veterinærjordet (nord)	D	1	VND1
Veterinærjordet (nord)	D	3	VND3

3.3.3 Statistisk analyse av mikrobiell diversitet

De statistiske beregningene er gjort av Postdoktor Davide Porcellato.

3.3.3.1 Rarefaction-kurve

Jord er et komplekst medium med stor mikrobiell diversitet. For å vurdere i hvilken grad den mikrobielle diversiteten påvist med 16S rRNA-sekvensering av DNA ekstrahert direkte fra jord var representativ i forhold til forventet diversitet, ble «Rarefaction-kurver» lagd for hver prøve. Kurvene ble brukt for å bestemme i hvilken grad sekvenseringen og innsamling av prøve var i stand til å detektere alle de representative bakteriene i hver prøve (se figur 3.4).



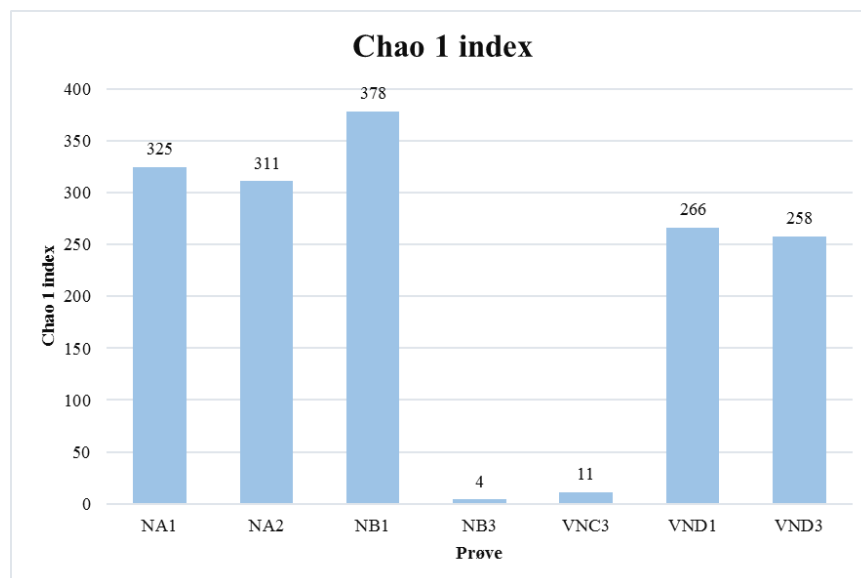
Figur 3.4 Dekningsgraden basert på antall OTU-sekvenser og diversitet i hver prøve illustrert med «Rarefaction-kurver».

Rarefaction-kurvene i figur 3.4 viser dekningsgraden på bakgrunn av form og lengde til hver graf. Desto mer kurvene flater ut desto bedre var dekningsgraden i hver enkelt prøve. Ved sammenligning av kurve NB3 og VNC3 med resten av prøvene kommer det frem at dekningsgraden til disse to prøvene var dårligere enn resten av prøvene. Kurvene var for korte til å danne et platå som betyr at prøvene bør betraktes som lite representative for å beskrive diversiteten i disse prøvene. Dette kan ses i sammenheng med at sekvenseringsdataene fra prøve NB3 og VNC3 var for få.

Kurvene til prøvene fra Veterinærjordet (nord) (VND1 og VND3) flater mer ut i forhold til resten av prøvene fra Niagara (NA1, NA2 og NB1), som tyder på at disse hadde bedre dekningsgrad. Prøve NA1, NA2 og NB1 hadde derimot for færre OTU-sekvenser sammenlignet med diversiteten i hver prøve og burde dermed ikke anses som like representativ for den totale mikrobielle diversiteten med hensyn til hva som forventes å finne. Kurvene til prøve VND1 og VND3 derimot flater mer ut, som indikerer at disse prøvene var mer representative for diversiteten i jord forventet å finne i området Veterinærjordet (nord).

3.3.3.2 α -diversitet vurdert med Shannon og Chao 1 index

α -diversitet ble brukt for å vurdere mikrobiell diversitet innad i hver enkelt prøve. Chao 1 index ble brukt for å fastslå hvor mange ulike typer bakterier som ble funnet i jordprøvene, mens Shannon index tok hensyn til både artsmangfold og den prosentvise fordelingen av ulike bakterier. Resultatene fra beregningene av Chao 1 index og Shannon index er vist i tabell E.4 (vedlegg E).

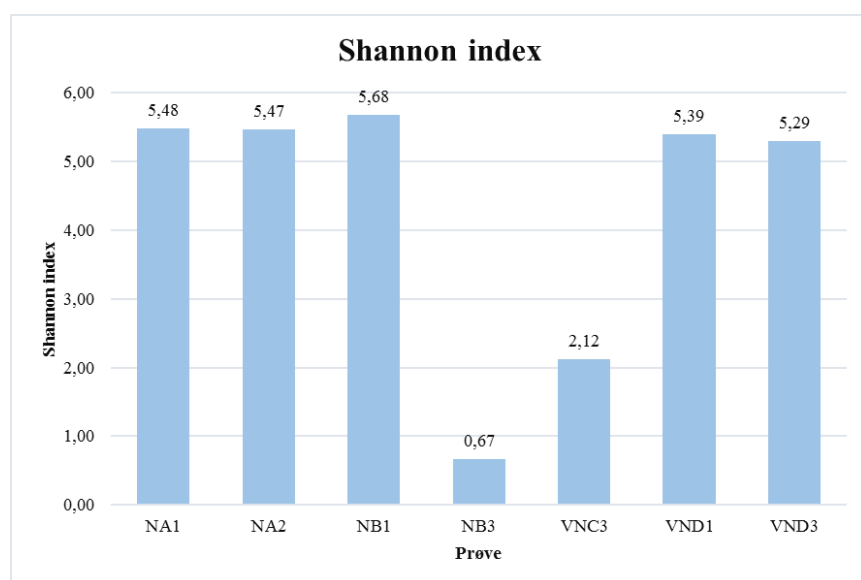


Figur 3.5 Chao 1 index for mikrobiell diversitet i utvalgte jordprøver.

Prøver fra Niagara hadde lignende Chao 1 index-verdier på henholdsvis 325, 311 og 378. Det samme gjaldt prøver fra Veterinærjordet (nord) med verdi lik 266 og 258. Ved sammenligning av

Chao 1 index-verdien til prøver fra Niagara og Veterinærjordet (nord) kom det frem at diversiteten var noe større i Niagara med hensyn på slektsmangfoldet i jorda.

To av prøvene hadde lavere Chao 1 index-verdier enn de andre prøvene. Prøve B, parallell 1 fra Niagara, er svært ulik diversiteten til parallell 3 fra samme sted, med en differanse på hele 374. Avviket mellom de to indikerer at diversitetsmålingen i prøve 3B3 burde vært høyere, ettersom Chao 1 index-verdien til prøve NB1 samsvarer mer med begge parallellene til prøve NA. Selv om prøve VNC3 ikke kan sammenlignes med en parallell fra samme sted, er det likevel tydelig at diversiteten i prøven er svært lav. Sammenligning med Chao 1 index-verdien til prøvene VND1 og VND3, som også kom fra samme område, Veterinærjordet (nord), indikerte at prøve C burde hatt høyere diversitet. Diversiteten i prøve D1 og D3 fra Veterinærjordet (nord) samsvarte derimot mer med hensyn på Chao 1 index.



Figur 3.6 Shannon index basert på den mikrobielle diversitet i utvalgte jordprøver.

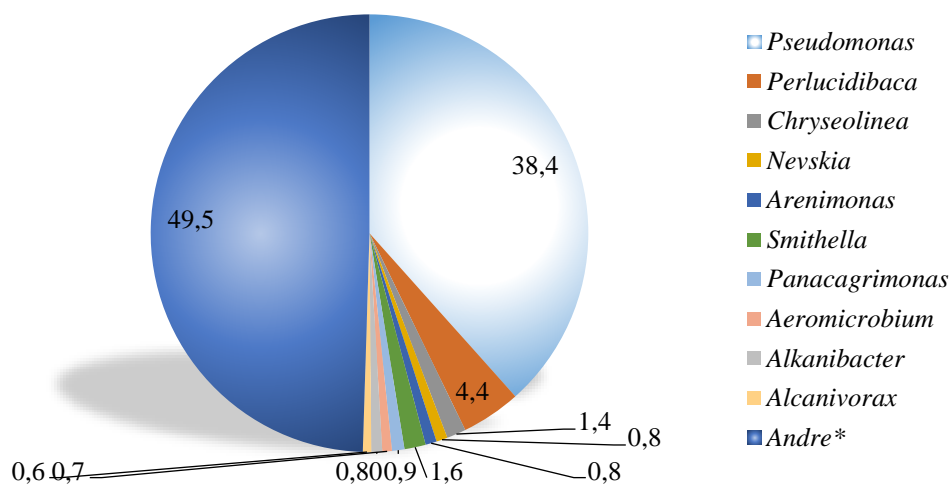
Basert på mikrobiell diversitet og relativ forekomst av de ulike bakteriene i hver prøve var det ifølge Shannon index store likheter mellom mesteparten av prøvene. Prøve NA1, NA2, NB1, VND1 og VND3 hadde en Shannon index-verdi mellom 5,29 og 5,68. Dette indikerte at det var mindre forskjeller mellom prøvene fra ulike områder når relativ forekomst ble tatt i betraktning. Unntaket er prøvene VNC3 og NB3, som hadde lavere diversitet og relativ forekomst sammenlignet med resten.

Det at flere av Shannon index-verdiene i de andre prøvene var svært like indikerte at med hensyn på den relative forekomsten i hver jordprøve var diversiteten jevnere og prøvene mer homologe enn om man kun tok hensyn til mangfoldet i hver prøve (se figur 3.5). Prøvene fra Niagara hadde generelt noe større Shannon index-verdi og dermed et noe større mangfold når man tok hensyn til

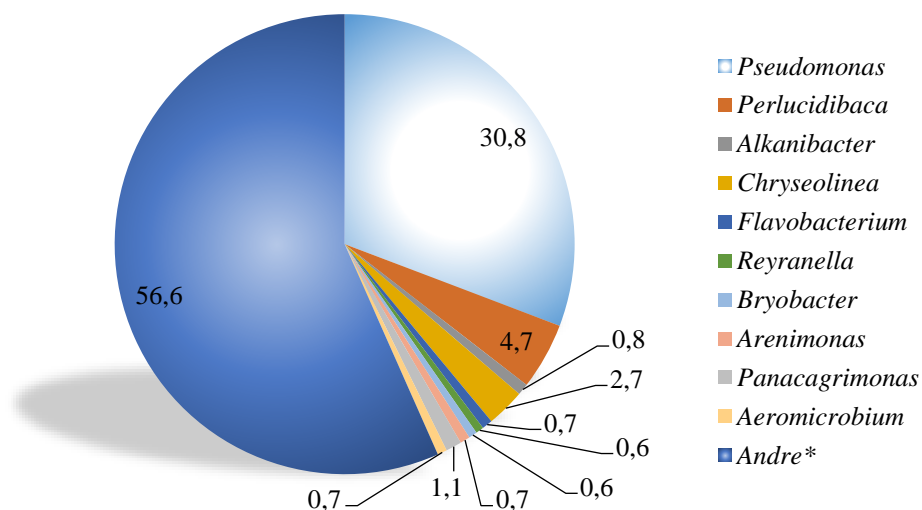
både arts mangfoldet og relativ forekomst av de ulike bakteriene, sammenlignet med prøvene fra Veterinærjordet (nord).

3.3.4 Relativ forekomst av mikrobiota i jord

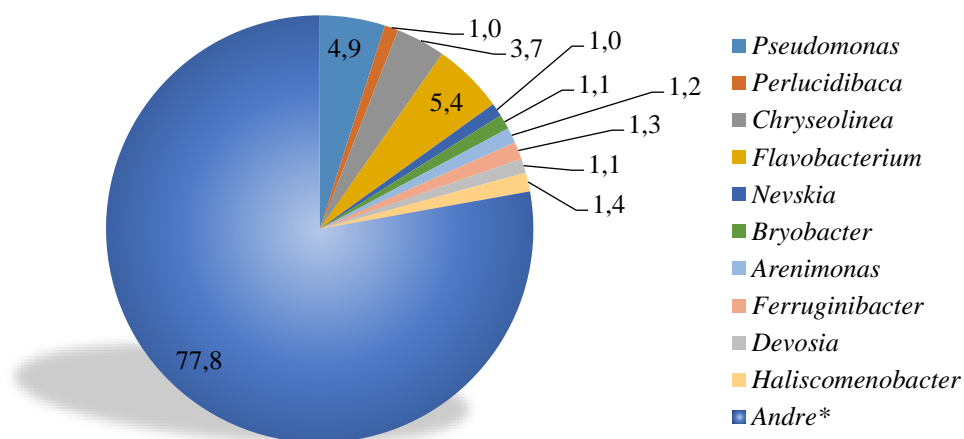
På bakgrunn av de statistiske analysene, ble kun fem prøver vurdert videre med hensyn på relativ forekomst av bakterier. OTU sortert på slektsnivå er presentert i figur 3.7-3.11. Figurene viser «topp-ti» bakterieslekter med størst relativ forekomst i jordprøvene. Resten er kategorisert som «andre» sammen med udefinerbare og ikke-dyrkbare bakterier. To av prøvene (NB3 og VNC3) ble sett bort fra ettersom det totale antallet bakterieslekter i disse prøvene var for lavt.



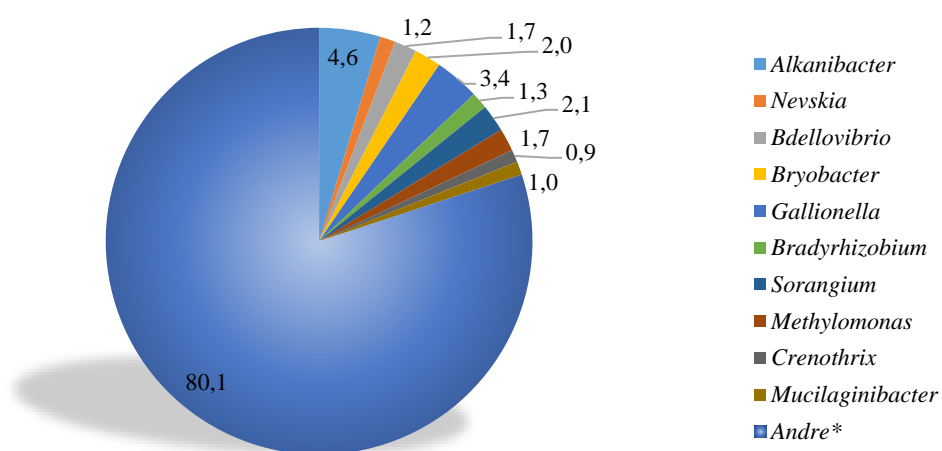
Figur 3.7 Prosentvis fordeling av den mikrobielle diversiteten basert på OTU-fordeling på slektsnivå i prøve NAI fra Niagara.



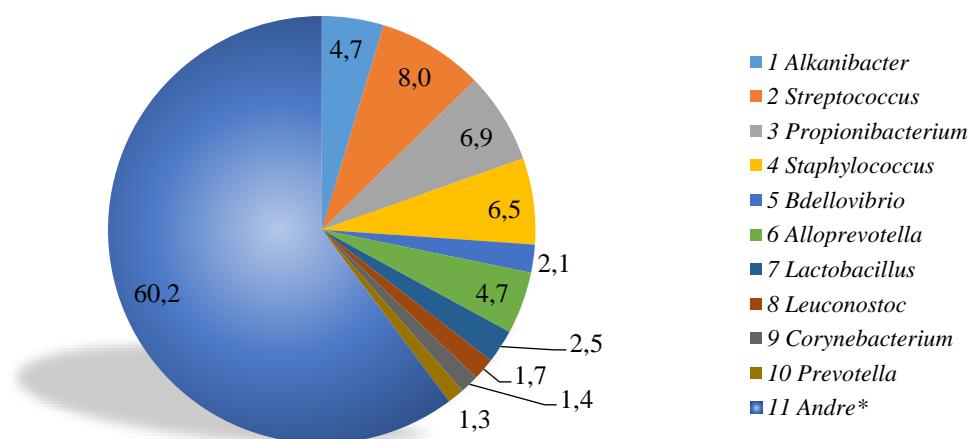
Figur 3.8 Prosentvis fordeling av den mikrobielle diversiteten basert på OTU-fordeling på slektsnivå i prøve NA2 fra Niagara.



Figur 3.9 Prosentvis fordeling av den mikrobielle diversiteten basert på OTU-fordeling på slektsnivå i prøve NBI fra Niagara.



Figur 3.10 Prosentvis fordeling av den mikrobielle diversiteten basert på OTU-fordeling på slektsnivå i prøve VND1 fra Veterinærjordet (nord).



Figur 3.11 Prosentvis fordeling av den mikrobielle diversiteten basert på OTU-fordeling på slektsnivå i prøve VND3 fra Veterinærjordet (nord).

Oppsummering av figur 3.7-3.11: Blant de ti mest dominerende identifiserte bakterieslektene i prøver fra Niagara er *Pseudomonas* spp. den mest påfallende. Basert på den relative forekomsten av bakterier i prøve NA1 fra Niagara utgjorde *Pseudomonas* spp. 38,4 % og *Perlucidibaca* spp. 4,4 % av de mest dominerende slektene (figur 3.7). Dette samsvarer delvis med diversiteten i NA2 hvor *Pseudomonas* spp. og *Perlucidibaca* spp. utgjorde henholdsvis 30,8 % og 4,7 % (figur 3.8). I prøve NA1 og NA2 fra samme sted var det stor overlapp i relativ forekomst av andre slekter som *Chryseolinea* spp., *Alkanibacter* spp., *Arenimonas* spp., *Aeromicrobium* spp. og *Panacagarimonas* spp. I Prøve B1 fra Niagara dominerer også *Pseudomonas* spp. med 4,9 %, men i mindre grad enn i prøvene NA1 og NA2. Flere av bakterieslektene som dominerte i prøvene NA1 og NA2 forekommer også i prøve B. De slektene som skiller de to stedene ut i fra de ti slektene med størst relativ forekomst, var *Smithella* spp., *Alcanivorax* spp., *Reyranella* spp., *Ferruginibacter* spp., *Devosia* spp. og *Haliscomenobacter* spp.

Den mikrobielle diversiteten av bakterier fra Veterinærjordet (nord) var annerledes enn den relative fordelingen i prøver fra Niagara. Sammenlignet med Niagara var det mindre dominans av bestemte slektsgrupperinger. Dessuten var det noe mindre samsvar mellom hvilke bakterier som dominerte i jord fra samme sted i området ved Veterinærjordet (nord). Kun *Alkanibacter* spp. og *Bdellovibrio* spp. ble påvist i begge prøvene fra dette området. I prøve VND3 var det mer fremtredende dominans av enkelte slekter enn i VND1. De mest dominerende slektene i prøve VND3 var *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp. og *Staphylococcus* spp. med henholdsvis 8 %, 6,9 % og 6,5 % forekomst. Mange av de påviste bakterieslektene i denne prøven skilte seg også ut som typiske melkesyrebakterier, inkludert de tre sistnevnte. I tillegg passet også *Lactobacillus* spp. og *Leuconostoc* spp. innunder denne beskrivelsen.

4 DISKUSJON

4.1 Dyrkningsbasert ESBL-fenotypisk deteksjon av multiresistente isolat

Oppdyrking på selektive kromogene medier ble gjennomført for å isolere bakterier med ESBL-fenotypisk resistens. Fra totalt 19 jordprøver ble det i 9 av prøvene påvist bakterier med ESBL-fenotypisk resistens. Av disse var det 3 bakterieprøver med ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens. Fremveksten ble betraktet som større enn hva som var forventet i forkant av studien. Totalt sett var det 14 av 25 (56 %) positive *Brilliance*TM ESBL-skåler og 5 av 25 (20 %) *Brilliance*TM CRE-skåler, som etter rendyrking ga 16 multiresistente isolat til videre analyser. Av disse hadde 12 isolat ESBL-fenotypisk resistens og 4 hadde ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens.

Dyrkningsbaserte metoder gir informasjon om egenskaper bakteriene har og som kommer til uttrykk, men kan ikke brukes for å fastslå sikkert hvilke genotypiske trekk som ligger bak. Sett i sammenheng med de selektive mediene som ble brukt i denne studien, indikerte kun vekst at det sannsynligvis var ESBL-produserende Gram-negative bakterier som vokste frem, men utelukket ikke at andre resistensmekanismer også kunne ha bidratt til ESBL-fenotypisk resistens. Dette henger sammen med at Gram-negative bakterier kan ha en rekke ulike mekanismer som kan gi fenotypisk resistens mot β -laktamantibiotika, uten at det nødvendigvis beror på produksjon av β -laktamaser. Bakterier som *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. og *Enterobacter* spp. kan for eksempel både produsere hydrolyserende enzymer, i tillegg til å regulere membranens permeabilitet via poriner og effluxpumpe-mekanismer (Iredell et al. 2016).

Særlig bakterier som lever i ustabile miljø, som jord, hvor blant annet osmolaritet og tilstedeværelse av toksiske forbindelser kan variere, har ofte redusert membranpermeabilitet og tar i bruk effluxpumper for å kvitte seg med eventuelle giftstoffer som kan være skadelige (f.eks. antibiotika) (Iredell et al. 2016). Disse egenskapene ble derfor tatt i betraktning med hensyn på jordbakteriene som ble analysert i denne studien. Høyt genuttrykk av kromosombundet AmpC enzymer hos såkalte «derepressed mutants» er en annen mekanisme som også bidrar til å gi resistens mot en rekke β -laktamantibiotika uten at bakterien nødvendigvis er ESBL-produserende (Iredell et al. 2016). Dette er også en utfordring ved differensiering mellom karbapenemase-produserende bakterier fra generelt ESBL-produserende bakterier på selektive medier. Det kan i tillegg oppstå falske-positive inntrykk av ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens, som skyldes at bakterier som overlever og vokser på CRE-skål tar i bruk andre forsvarsmekanismer enn kun produksjon av karbapenemaser. For eksempel kan bakterier med porin-defekt og som har høyt genuttrykk av andre ESBL-gener enn ESBL_{KARBA}-gener, i tillegg til høyt genuttrykk av AmpC enzymer, fremstå som resistente mot karbapenem-antibiotika uten å produsere karbapenemaser (Iredell et al. 2016). At

ulike ESBL-er og AmpC-enzymmer også kan angripe karbapenem-antibiotika skyldes strukturelle likheter mellom ulike typer β -laktamantibiotika.

Det er dessuten også variasjon i resistensgrad og ESBL-enzymenes aktivitet mot bestemte typer β -laktamantibiotika, som blant annet er avhengig av type enzym og bakterievert (Gazin et al. 2012). Fordi ESBL_{KARBA-A} og ESBL_{KARBA-B} ofte har høyere aktivitet mot karbapenem-antibiotika enn ESBL_{KARBA-D}-produserende bakterier, vil disse i større grad selekteres frem på *Brilliance*TM CRE (Gazin et al. 2012). Enzymer av typen OXA-48, som var et av enzymene det ble søkt etter i denne oppgaven, tilhører ESBL_{KARBA-D}-gruppen. Graden av resistens kan dessuten være avhengig av verten av resistensgenet. For eksempel er *K. pneumoniae* med *bla*_{KPC} typisk mer resistent enn *E. coli* som bærer det samme genet (Iredell et al. 2016). Hvorvidt dette kan ha påvirket resultatene i denne studien er ukjent, men er helt klart noe man bør være klar over ved bruk av fenotypiske metoder for å detektere mulige ESBL-produserende bakterier.

Utfordringer ved bruk av selektive kromogene medier er særlig viktig å være klar over ved diagnostisering av sykdomsfremkallende bakterier i pasienter. I slike tilfeller er riktig diagnostisering ofte en nødvendig forutsetning for å velge effektive behandlingsalternativer. Det anbefales derfor typisk å benytte andre metoder for å bekrefte observasjoner av ESBL-fenotyper for sikker identifikasjon av bakterier som vokser på slike medier (Gazin et al. 2012). Det er også en viktig forutsetning med sikre resultater i forskningsbaserte studier for å kunne trekke riktige slutninger. På bakgrunn av dette ble det brukt DNA-baserte metoder i form av Multiplex PCR og Nanopore-sekvensering, både for å forsøke å kartlegge genotypiske egenskaper knyttet til produksjon av β -laktamaser, men også for å relatere eventuelle funn til ESBL-fenotypisk resistens påvist med vekst på selektive kromogene medier. Ettersom det finnes enormt mange ulike varianter β -laktamaser ble søket begrenset til de mest utbredte ESBL-genene i form av ESBL_A- og ESBL_{KARBA}-varianter (se avsnitt 4.3.2).

Manglende retningslinjer og standardiserte dyrkningsteknikker for hvordan oppdyrke mesteparten av bakteriene som lever i jord og ellers i omgivelsene, er blant de største utfordringene og begrensningene med dyrkningsbaserte metoder (Kümmerer 2004; Mocali & Benedetti 2010). Ikke-dyrkbare bakterier i jord er potensielle reservoarer av antibiotikaresistente gener, men blir ekskludert fra søk med dyrkningsavhengige metoder. Både fordi det ikke alltid er kjent hvilke vekstbetingelser bakteriene krever, men også på grunn av for komplekse og krevende vekstvilkår. For å kartlegge reservoarer av antibiotikaresistens også blant ikke-dyrkbare bakterier kan dyrkningsuavhengige metoder, som for eksempel Illumina MiSeq brukes (Riesenfeld et al. 2004). I denne

studien ble denne metoden derimot brukt til kartlegging av mikrobiell diversitet og ikke for å søke etter resistensgener.

Manglende retningslinjer for ESBL-screening av bakterieprøver rett fra jord var også en utfordring i denne studien, fordi dyrkingsmediene som ble benyttet først og fremst var tilpasset kliniske prøver og ikke jord. På bakgrunn av at det på forhånd var uvisst hva som var den beste måten å bruke for oppdyrking av bakterier i jordprøver på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE, ble det prøvd ut to ulike tilnærminger til forbehandling av prøvene før utstrykning. Av alle skålene som ble inkubert med jordprøver, var andelen positive skåler større for fortynnede jordprøver som ikke ble oppdyrket i generelt vekstmedium før utstrykning. Denne observasjonen kan både indikere at den faktiske forekomsten av bakterier med ESBL-fenotypisk resistens kan ha vært større i enkelte av områdene, eller at fortynning og oppdyrking av prøvematerialet før utstrykning hadde ulik effekt på vekstresultatene.

Utstrykning direkte med suspendert jord i Ringers løsning ga vekst på samtlige *Brilliance*TM ESBL- og *Brilliance*TM CRE-skåler, mens kun 26 % av alle skålene med prøver dyrket i BHI-buljong var positive. Til tross for at årsaken til forskjellen var ukjent, kan den kanskje ses i sammenheng med hvordan mikrofloraen og dets sammensetning i jordprøvene ble påvirket av oppdyrking i generelt medium først. De generelle vekstfremmende egenskapene til BHI-buljong eigner seg til å fremme veksten av en bestemt andel av floraen i jordprøvene og kan derfor brukes for å dyrke frem og «synliggjøre» bakterier som ellers ikke utgjør en stor del av den totale floraen, avhengig av hvilke bakterier som er tilstede. Dessuten bidrar oppdyrking i BHI til å styrke bakteriene som vokser, og bidro dermed potensielt til å øke sjansen for fremvekst på selektiv agar, forutsatt at det var bakterier med ESBL-fenotypisk resistens tilstede. Samtidig kan oppdyrking også innebære at bakterier man leter etter ikke er i stand til å vokse eller blir utkonkurrert av andre bakterier. Antibiotikaresistente bakterier kan i noen tilfeller betraktes som noe mindre konkurransedyktige enn tilsvarende bakterier uten resistente egenskaper (Holmes et al. 2016). Plasmider kan for eksempel bidra til å redusere bakterienes tilpasningsevne og overlevelsessevne (Iredell et al. 2016). Med utgangspunkt i en slik oppfatning, øker sannsynligheten for at resistente bakterier under oppdyrking i generelle medier som BHI kan utkonkurreres. Det er samtidig viktig å være klar over at en slik forståelse ikke alltid er gjeldene ettersom det er mange faktorer som påvirker bakterienes overlevelse. Blant annet bakterien selv, omgivelsene, resistensgener og deres plassering på mobile genelementer kan være med på å bestemme dette (Holmes et al. 2016; Iredell et al. 2016).

Oppdyrking i BHI kan alternativt også ha bidratt til at bakteriene «kvittet» seg med resistensgener fordi det ikke lenger var et behov for å beholde de. I et BHI-medium vil bakterier eller andre mikroorganismer som vokser frem først og fremst selekteres på bakgrunn av tilpasning til næringsstoffer, temperatur, pH og tilgang til oksygen, fremfor å være avhengig av å beskytte seg mot antibiotika. Jord derimot, er et komplekst miljø hvor det kan være flere faktorer tilstede som bidrar til å bevare bakterienes resistente egenskaper, som for eksempel subinhibitoriske konsentrasjoner av antibiotika eller andre toksiske forbindelser. Når bakteriene overføres til et generelt vekstmedium slik som BHI, endrer vekstvilkårene seg noe som kan føre til at resistensgener blir mindre «viktige» for overlevelse. Dette kan føre til at de fjernes fra bakteriens genom, særlig hvis de i tillegg ytterligere reduserer bakteriens tilpasningsevne (Iredell et al. 2016). Resistensgener som sitter plassert på mobile genelementer kan lettere forflyttes enn de som er festet på bakteriens kromosom. Både varianter av VIM, KPC, TEM og SHV som ble detektert ved multiplex PCR, er assosiert med MGE og kjennetegnes som flyttbare ESBL-er (Bajaj et al. 2016). Det samme gjelder flere av de andre ESBL-variantene det ble søkt etter.

At bakteriene kan «kvitte» seg med gener kan også ha vært årsaken til at andelen isolat var mindre enn det faktiske antallet skåler med vekst, ettersom det ikke var alle koloniene som det gikk an å rendyrke. Eventuelt kan det ha skjedd en fordrøyd reaksjon som innebærer at antibiotika kan ha brukt lengre tid på å trenge inn i cellene, og at effekten dermed inntraff ved et senere tidspunkt. Dette bør ses i sammenheng med at β -laktamantibiotika, som var tilsatt på de selektive mediene, må trenge inn i cellene for å virke. Bakterier i jord har ofte en mindre permeabel membran enn bakterier i stabile miljø (f.eks. i tarm), i tillegg kan enkelte produsere slimlag som hindrer uønskede komponenter som antibiotika i å trenge inn i cellene (Iredell et al. 2016). Dersom gjennomtrengeligheten var lav, burde dette sannsynligvis også påvirket opptak av næringsstoffer som reguleres av membranens permeabilitet. Av de bakteriene som vokste på skål var det derimot tegn til god vekst i de fleste tilfellene. For å forebygge at resistensgener selekteres bort ved oppdyrking i BHI kan β -laktamantibiotika tilsettes i lag med BHI-mediet. Dette kan både bidra til å stimulere til at bakteriene bevarer eventuelle resistensgener, i tillegg til å selektere for bakterier som er resistente mot β -laktamantibiotika. For å hindre at resistensgenene til koloniene som vokste på skål skulle forsvinne, ble hver koloni podet over på nye skåler kort tid i forkant av prøveuttak til videre genotypiske analyser (figur 2.4).

Effekten av å fortynne jordprøvene har også en viktig fordel med tanke på urenheter ved oppdyrking av bakterier fra jord. Ved å fortynne jordprøvene før utstrykning reduseres konsentrasjonen av urenheter og komponenter fra jord, som potensielt kan forstyrre eller ødelegge for videre ana-

lyser. Dette er særlig viktig i molekylære analyser hvor renheten til DNA-templatet er en forutsetning for gode resultater. Fortynningseffekten påvirker dessuten også bakterietetthet og kan bidra til å gjøre det enklere å rendyrke bakterier som er mer ensartet. Prøver som både ble fortynnet i Ringers løsning og i BHI-buljong hadde størst fortynningseffekt og sannsynligvis færre urenheter. Videre studier for å teste effekten av ulike fortynningsfaktorer eller andre rensemetoder av jord før oppdyrking, er eksempelvis noe man kunne utforsket videre. Å finne og etablere standardiserte metoder for å dyrke bakterier i fra jord rettet mot studier av resistens, vil kunne bidra til å forbedre forskningen på dette området. Dyrkning har mange fordeler som for eksempel at fenotypiske trekk kan synliggjøres. Dessuten egner dyrkningsbaserte metoder seg for isolering av renkulturer av bakterier som kan brukes for å kartlegge fylogenetisk slektskap helt ned til arts- og stammenivå. Dyrkningsuavhengige studier egner seg derimot ikke alltid på stammenivå, særlig dersom det involverer store mengder DNA-fragmenter som gjør differensiering og kartlegging mer utfordrende.

Med ESBL-fargescreening og Sanger-sekvensering ble det videre forsøkt å bestemme identiteten til de multiresistente bakteriene som ble dyrket på selektive kromogene medier. Fra de opprinnelige jordprøvene ble 16 renkulturer med ESBL- og ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens isolert til videre analyser. 7 utvalgte prøver ble omtalt i denne masteroppgaven, hvorav 2 isolater hadde bredspektret resistens mot β -laktamantibiotika som også inkluderte karbapenem-antibiotika.

4.2 Identifisering av bakterier med ESBL-fenotypisk resistens

De selektive kromogene mediene som ble brukt i denne studien er først og fremst tilpasset enkel og effektiv diagnostisering av ESBL-holdige *Enterobacteriaceae* i kliniske pasientprøver, og er basert på seleksjon og fargescreening. I denne studien derimot ble fargen på bakteriekoloniene som vokste på de kromogene mediene brukt for å forsøke å differensiere og å kartlegge et bredere artsmangfold av bakterier med ESBL-fenotyper i jordprøver (tabell 3.2). For å vurdere treffsikkerheten til fargescreenings-resultatene ble disse sammenlignet med identiteten til koloniene bestemt fra sekvensert 16S rRNA gen. Databasesøk i nBLAST med 16S rRNA-gensekvenser ga pålitelige treff på slektsnivå (tabell D.2, vedlegg D). «Maks score» var lik «total score» for alle prøvene (n=7), som ble gjenspeilt i at «Query cover» var 100 % for alle prøvene. E-verdien var dessuten lik 0, som indikerte at det var liten sannsynlighet for at treffene var tilfeldige. Alle treffene hadde minst 99 % likhet, med unntak av en av prøvene fra Veterinærjordet (nord) fikk 100 % identitets-score ved treff på slekten *Serratia*.

Databasetreffene ble på bakgrunn av dette derfor brukt for å fastslå taksonomisk plassering på slektsnivå, men også fordi 16S rRNA taksonomisk sett egner seg ofte best til identifisering av

bakterier på slektsnivå fordi treff på artsnivå er ofte mer usikkert (Janda & Abbott 2007). Treffsikkerheten er avhengig av for eksempel av faktorer som; (i) antall sekvenser i databasen som brukes, (ii) om arter har lignende eller nesten identiske 16S rRNA sekvenser og (iii) størrelsene på databasesekvensene og søkesekvensene (Janda & Abbott 2007). Vanligvis er størrelse på 16S rRNA ~1500 bp, mens kontig-sekvensene som ble bruk til søk i denne studien var rundt 750-1250 bp. Søkesekvensene var derfor en del kortere på grunn av at områder med dårlig separering av basene ble redigert bort. For lite variasjon mellom ulike 16S rRNA gener gjør det dessuten utfordrende å differensiere mellom ulike bakterier på artsnivå, med mindre man har tilleggsinformasjon om andre genotypiske trekk. Taksonomiske treff på artsnivå er likevel tatt i betraktning for å vurdere de opp imot hvilke arter som vanligvis lever i jord og sedimenter (figur 3.2 og figur 3.3). Disse resultatene bør betraktes som noe mer usikre, med unntak av de som ble bekreftet med Nanopore-sekvensering. Ettersom de er basert på flere genotypiske trekk enn kun 16S rRNA-genet, slik som ble gjort ved Sanger-sekvenseringen.

Ved sammenligning av resultatene fra fenotypisk og genotypisk identifisering av bakterier med ESBL-fenotypisk resistens, viste det seg å være liten grad av overlapp. For de syv isolatene samsvarte fastslått identitet i kun to av tilfellene. Med fargescreening ble to av jord-isolatene, VNc1 (E) og VND1 (E), fra Veterinærjordet (nord) gjenkjent med sine grønnfargede kolonier. I samsvar med protokollen ble isolatene fra sted C og D identifisert som en av fire *Enterobacteriaceae* i KESC-gruppen. Treff med 16S rRNA bekreftet med stor sikkerhet at sekvensen tilhørte *Serratia* spp. ettersom identitetsscorene var henholdsvis 99 % og 100 % (tabell 3.2). Selv om resultatene i dette tilfellet stemte overens, kom det også frem at fargescreeningen var mindre nøyaktig enn genotypisk identifisering med 16S rRNA. I motsetning til fargescreeningen ga databasesøket ett sikkert treff på slektsnivå for hvert søk, mens differensiering ut i fra fenotypiske trekk varierte mellom alt fra en til fire mulige identiteter.

For de fem andre isolatene var det dessuten ikke samsvar mellom fenotypisk og genotypisk identifisering, som bør ses i sammenheng med at ingen av disse bakteriene viste seg å tilhøre *Enterobacteriaceae*-familien slik som *Serratia*-isolatet. Bruksområdet til *Brilliance*TM ESBL agar og *Brilliance*TM CRE er noe begrenset ettersom de hovedsakelig er tilpasset differensiering mellom et utvalg de mest utbredte ESBL-produserende Gram-negative bakteriene i *Enterobacteriaceae* familien med sykdomsfremkallende evner. Produsenten selv påpeker i protokollen at andre bakterier også kan gro frem på disse mediene, uten at fargescreenings-prosedyren nødvendigvis er tilpasset disse. Å bruke mediene for å dyrke og differensiere mellom resistente bakterier i jord utfordret derfor dette tiltenkte bruksområdet, ettersom jord teoretisk sett inneholder et svært bredt mangfold av forskjellige bakterier. Det kom også frem ved 16S rRNA mikrobiotasekvensering av

jordprøvene i denne studien. Avvikende resultater mellom fenotypisk og genotypisk identifisering indikerte at fargescreeningen ble for lite dekkende for bakterier som ikke tilhørte familien *Enterobacteriaceae*. Dette bør ses i sammenheng med at jord har ett mye større artsmangfold enn kliniske prøver. Sammenlignet med kromogene medier har databasen i nBLAST et større søkeomfang som er i stand til å inkludere et større spekter av taksonomiske grupper, som bidrar til at genotypisk identifisering både er mer nøyaktig og treffsikker.

Enkelte av resultatene fra fargescreening ble dessuten også mistolket fordi det var ulike oppfatninger av nyanser og farger på koloniene. Dette betraktes som en av utfordring ved å bruke analyserende evalueringer for å skille mellom bakterier basert på morfologiske trekk slik som kolonifarge, ettersom differensieringen baserer seg på subjektive observasjoner. For å oppnå mer treffsikre resultater særlig ved diagnostisering, bør tolkningen derfor utføres av mikrobiologer med erfaring innenfor denne typen screeningstester (Gazin et al. 2012). Å kun bruke kolonifarge eller andre fenotypiske egenskaper til å identifisere oppdyrkede bakterier anses i utgangspunktet som mindre sikkert enn genotypisk identifisering (Gazin et al. 2012). Når hensikten er å konstatere identiteten til en bakterie vil det derfor ofte være nødvendig med andre verifiserende tester (Gazin et al. 2012).

Feiltolkninger kan gi «falske-positive» resultater. For eksempel ble isolatet på *Brilliance*TM CRE agar av prøve Na1* identifisert som en «CRE-positiv» bakterie i KESC-gruppen på grunn av den blå fargen på kolonien. Ved genotypisk identifisering ble det derimot avslørt at isolatet var en *Pseudomonas* spp., som ved vekst på *Brilliance*TM CRE vanligvis defineres som «ikke-CRE». Å klartlegge bakterien som «ikke-CRE» innebærer at andre resistensmekanismer kan ha bidratt til vekst på skål, uten at det nødvendigvis betyr at bakterien produserer hydrolyserende karbapenemaser. Sannsynligvis henger feiltolkningen sammen med at *Pseudomonas* spp. er i stand til å produsere flere ulike typer pigmenter, som også er typisk for andre bakterier. Blant annet er det kjent at stammer av arten *P. aeruginosa* kan syntetisere et blågrønt pigment (El-Fouly et al. 2015). Det har også blitt observert i en tidligere studie at *P. aeruginosa* produserte dette pigmentet ved vekst på samme typen medier som ble brukt, men da på *Brilliance*TM ESBL-agar (Gazin et al. 2012). Fargen kan lett mistolkes og forveksles med de blåfargede koloniene til KESC på *Brilliance*TM CRE, særlig dersom fargeanalysen utføres av en utrent person, men også siden det er forventet at *Pseudomonas* spp. danner «strå»-fargede kolonier ved vekst på dette mediet. Slike observasjonen samsvarer med en studie gjort av Huang et al. (2010), men også annen tilsvarende forskning på bruk av kromogene medier for deteksjon av ESBL-produserende bakterier i kliniske prøver (Gazin et al. 2012).

Å skille mellom bakterier som er «CRE-positiv» og «ikke-CRE» er viktig, særlig når de kromogene selektive mediene brukes til diagnostisering av pasienter for å finne ut hva som er årsaken til en bestemt sykdom. Da er identifiseringen avgjørende for å kunne tilpasse behandlingen av den syke personen. Når behandlingsmulighetene med antibiotika er mer begrenset, for eksempel på grunn av at bakterien som det behandles mot produserer hydrolyserende enzymer som inaktiverer antibiotika, kan det i enkelte tilfeller være aktuelt å bruke inhibitorer. Inhibitorer er i stand til å binde enzymer som hydrolyserer antibiotika og hemmer aktiviteten deres slik at antibiotika får virke mot bakterien. Ettersom ESBL-er hydrolyserer og inaktiverer et bredt spekter av ulike β -laktamantibiotika, kan det i noen tilfeller være aktuelt å bruke inhibitorer for å inaktivere disse. For å kunne velge ut de riktige inhibitorene som spesifikt kan inaktivere bestemte enzymer, forutsettes det kjennskap til hvilke typer hydrolyserende enzymer som bakteriene kan produsere. Det kjent at bakterier med ESBL_A-varianter av CTX-M er mindre mottagelige for kombinasjoner av β -laktamantibiotika og β -laktamase-inhibitorer (Bajaj et al. 2016). Å tilpasse behandling med inhibitorer er også avgjørende for å sikre «riktig» bruk og for å unngå at bakteriene unødvendig eksponeres, som i verstefall kan bidra til utvikling av inhibitor-resistens.

Observasjoner gjort i denne studien understreker at man nødvendigvis ikke kan betrakte fargedifferensiering som en metode for sikker identifisering av resistente bakteriekolonier på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE ved oppdyrking av prøver fra jord. At *Bordetella* spp., *Pseudomonas* spp. og andre Gram-negative bakterier fra andre familier, i tillegg til *Enterobacteriaceae* var i stand til å vokse på mediene som ble brukt, indikerer derimot at det er en mulighet for å utvide bruksområdet til å dyrke andre bakterier med ESBL-fenotypisk resistens på denne typen medier. For å finne mer ut om hvilke bakterier dette gjelder, samt hvilke faktorer og vekstbetingelser som bidrar til dette, trengs det mer forskning.

4.3 Molekylær karakterisering av ESBL-produserende bakterier

Resistensgener av typen ESBL_A og ESBL_{KARBA} ble påvist i bakterier ifra jord med Multiplex PCR, både i DNA-templat fra generelt dyrkingsmedium og direkte fra multiresistente kolonier på kromogene medier.

4.3.1 Multiplex PCR av DNA-templat fra BHI-medium

Resistensgener av typen ESBL_{KARBA} ble påvist med Multiplex PCR av DNA ekstrahert fra jordbakterier i BHI-medium. Genet *bla*_{VIM} ble påvist i to prøver fra Niagara og Veterinærjordet (nord). I tillegg ble også ESBL-genet *bla*_{KPC} detektert i samme prøve fra Niagara.

Å gjøre Multiplex PCR med bakterielt DNA i BHI-medium gjorde det mulig å søke etter resistensgener i et større omfang av bakterier, avhengig av veksten i BHI-mediet (se avsnitt 4.1). En

av fordelene med å bruke et generelt vekstmedium for å søke etter ESBL-holdige bakterier, er at man får undersøkt forekomst av resistensgener i et bredere spekter av mikroorganismer, uavhengig av om resistensgenene faktisk kommer til fenotypisk uttrykk. *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE agar selekterer derimot kun for bakterier med aktive resistensmekanismer. Bakterier uten aktiv fenotypisk resistens eller svakt genuttrykk blir dermed selektert bort med dyrkingsmedier med antibiotika. BHI-buljong uten antibiotika vil derimot ikke selektere bort bakterier med inaktive resistensgener eller svake ESBL-fenotyper. Kartlegging av forekomst av bakterier med resistensgener som ikke kommer til fenotypisk uttrykk i bakteriene, som for eksempel «silent»-gener, er også av betydning fordi disse genene potensielt kan aktiveres under visse betingelser (Perry et al. 2014). «Silent»-gener er resistensgener som ikke er aktive, men som er homologe med andre kjente resistensgener. Studier har vist at slike gener kan gi fenotypisk resistens ved mutasjoner, mobilisering eller andre former for aktivering. Økt HGT forårsaket av endringer i seleksjonspress er en faktor som kan bidra til aktivering (Perry et al. 2014).

ESBL-variantene som ble påvist i BHI-medium i denne studien kjennetegnes som noen av de mest utbredte ESBL_{KARBA}-variantene i Gram-negative tarmbakterier som tilhører familien *Enterobacteriaceae*, særlig KPC (Bajaj et al. 2016; van Duin & Doi 2016). I Norge er antallet kliniske tilfeller med karbapenemase-produserende tarmbakterier mer sporadisk. VIM og KPC er dessuten mindre utbredt sammenlignet med karbapenemaser som NDM og OXA-48 (NORM/NORM-VET 2016). Internasjonalt er epidemiologien noe annerledes enn i Norge, særlig i europeiske land som Italia, Ungarn, Hellas og Spania, hvor VIM- og KPC-produserende isolat av *Enterobacteriaceae* er mer utbredt (Albiger et al. 2015).

Å finne disse resistensgenene kan kun indikere tilstedeværelse av resistensgener av typen ESBL_{KARBA} i jord hentet fra Niagara og Veterinærjordet (nord). Funnene kan til en viss grad ses i sammenheng med den relative diversiteten på stedet hvor prøvene var hentet fra, særlig ved Niagara hvor *Pseudomonas* spp. dominerte. *Pseudomonas* spp. er en av bakterieslektene som VIM ofte detekteres i, med særlig stor utbredelse på integroner i *P. aeruginosa* (Pitondo-Silva et al. 2016). *Pseudomonas* spp. betraktes dessuten som en av de første bakteriene MBL-genene ble påvist i (Robin et al. 2010). At metallo- β -laktamasen VIM er særlig utbredt i *Pseudomonas* spp., gjenspeiles i funn i kliniske isolat i Norge hvor VIM-genet ofte påvises i meldingspliktige tilfeller av *Pseudomonas*-bakterier (NORM/NORM-VET 2016; Pitondo-Silva et al. 2016). At vi bekrefter tilstedeværelsen av VIM-genet i jord samsvarer også med funn fra tidligere studier, men da utenfor Norges landegrenser. Studien til Pitondo-Silva et al. (2016) viste at ulike bakterier i brasiliansk jord kunne være bærere av VIM-genet. ESBL-genet ble da funnet i ulike isolater blant annet av *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp. og *Staphylococcus* spp., som er vanlige bakterier å finne i jord

(Pitondo-Silva et al. 2016). KPC-genet har særlig vært utbredt i ulike medlemmer av *Enterobacteriaceae*-familien, som inkluderer *Klebsiella*, *Enterobacter* og *Citrobacter*. *K. pneumoniae* ST258 er en sekvenstype med sterk assosiasjon til KPC-genet, som relateres til at resistensgenet sitter plassert på et plasmid som er spesifikt for *Klebsiella* spp. (Iredell et al. 2016). Spredning av overlevelsedyktige kloner av denne bakterien har bidratt til stor global utbredelse.

Ettersom man ikke kjenner til hvilke bakterier som var tilstede i BHI-mediet eller hvor resistensgenet kom fra, kan likevel ikke funnene av KPC og VIM linkes sammen med verten de kom fra. Det er heller ikke mulig å fastslå om disse resistensgenene virker sammen med andre resistensgener og mekanismer som eventuelt gjør bakteriene resistente eller ikke, eller om resistensgenet sitter på kromosom eller flyttbare genelementer, basert på denne studien. Kjennskap til disse faktorene er nødvendig for å sette det i sammenheng med tidligere funn og for å forstå risikoen av deres tilstedeværelse i bestemte bakterier kan utgjøre. Særlig fordi det finnes enormt mange varianter av disse resistensgenene, men også fordi de er utbredt blant mange forskjellige bakterier. Det er dessuten også utfordrende å bekrefte disse funnene med andre metoder, eller å finne ut av om resistensgenene er aktive gener i bakterien de eventuelt tilhører. Å gjøre Multiplex PCR av DNA direkte fra rendyrkede kolonier med fenotypiske resistensegenskaper, gjør det derimot mulig å koble de resistente egenskapene til en bestemt bakterie, i tillegg til å kunne verifisere funnene med andre metoder som for eksempel med helgenomsekvensering som ble brukt i denne studien.

4.3.2 Multiplex PCR av DNA fra isolater med ESBL-fenotype for å påvise ESBL-genotype

Vekst på selektive kromogene medier i form av *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE var en klar indikator på at bakteriene som vokste der hadde ESBL- eller ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens. De som vokste på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE var multiresistente mot henholdsvis tre av fire, og fire av fire antibiotikaklasser tilsatt i vekstmediet, hvorav sistnevnte også inkluderer resistens mot karbapenem-antibiotika. Multiplex PCR ble videre brukt for å kartlegge eventuelle ESBL_A- eller ESBL_{KARBA}-gener som kan ha bidratt til bakterienes fenotypiske resistens.

I tre av syv utvalgte isolater med ESBL-fenotypisk resistens ble det påvist ESBL-gener med Multiplex PCR. Identiteten til disse tre isolatene var *Bordetella* spp., *Pseudomonas* spp. og *Serratia* spp., funnet med Sanger-sekvensering. To av disse isolatene hadde genotypisk resistens som samsvarte med fenotypisk resistens, basert på vekst på selektivt medium og funn av ESBL-gener med Multiplex PCR.

Isolatet Na1*(E) som vokste på ESBL-skål var bærer av ESBL_A-genet *bla*_{SHV}, og ble med Sanger-sekvensering identifisert som en *Bordetella*-bakterie. *Bordetella* spp. er en Gram-negativ kokkobasill som tilhører familien *Alcaligenaceae*. Flere av medlemmene som tilhører slekten *Bordetella*

er utbredt i naturen og omgivelsene hvor de lever i ulike økologiske nisjer som for eksempel i jord, vann, planter, mennesker og dyr (Hamidou Soumana et al. 2017). Å påvise *Bordetella* spp. i jordprøver er derfor i seg selv ikke uvanlig, men med unntak av *Bordetella petrii* (*B. petrii*) er artene i denne slekten obligat aerobe og kan ofte være vanskelige å oppdyrke. Mikrobiotasekvenseringen viste at til tross for at *Bordetella* spp. ble påvist i tre av syv isolat, ble bakterien ikke påvist blant de topp ti mest forekommende bakteriene i jordprøvene. Sett i sammenheng med at de i tillegg er mindre konkurransedyktige i kampen om næringsstoffer, har sannsynligvis den selektive fordelingen med at bakterien hadde bredspektret fenotypisk resistens mot β -laktamantibiotika, vært avgjørende for fremvekst på selektive kromogene medier.

På bakgrunn av deres evne til å forårsake sykdom i mennesker og dyr, betraktes flere av medlemmene i denne slekten som klinisk signifikante. Mange er vertsspesifikke patogene arter tilpasset kolonisering av luftveiene hos både mennesker og dyr. To kjente eksempler er *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) som er humanspesifikk og forårsaker kikhoste (Hamidou Soumana et al. 2017), og *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) som forårsaker respiratoriske infeksjoner i både pattedyr og fugler, men som mer sjeldent infiserer mennesker. *Bordetella* spp. som er påvist i jord har typisk blitt funnet på steder med kontaminasjon og antropogen aktivitet, som assosieres med deres fleksibilitet tilknyttet nedbrytning av denne typen organiske forbindelser (Hamidou Soumana et al. 2017). At tre av syv multiresistente isolater fra Niagara ble identifisert som *Bordetella* spp., kan ses i sammenheng med gartnervirksomhet (f.eks. gjødsling, jordflytting) som har pågått i dette området og som kan ha bidratt til å endre vekstbetingelsene for *Bordetella* spp. og andre bakterier.

Når det gjelder forekomst av *Bordetella* spp. i miljøet har tidligere studier kartlagt *Bordetella*-arter uten spesifikk tilknytning til mennesker og dyr. Deriblant *Bordetella tumbae*, *Bordetella muralis*, *Bordetella tumulicola* og *B. petrii*. (Hamidou Soumana et al. (2017)). Av disse betraktes *B. petrii* som en av de første artene i sin slekt som ble påvist i jord, og er dessuten kjent for å være en opportunistisk patogen bakterie som forårsaker infeksjon hos personer med nedsatt immunforsvar (Hamidou Soumana et al. 2017). Bakterien er foreløpig den eneste patogene *Bordetella*-arten blant de andre vertsspesifikke og patogene medlemmene i slekten som er funnet i naturlige omgivelser (Gross et al. 2008).

Fra Sanger-sekvensering var et av treffene til isolat Na1*(E) arten *B. petrii*, men dette ble ikke bekreftet fordi isolatet ikke ble sekvensert med MinION. Det samme gjaldt isolatet Nb1*(E). Et av de andre tre isolatene av *Bordetella* spp., prøve Nb1*(C), ble derimot identifisert som *B. petrii* med helgenomsekvensering. Ettersom jordprøvene ble hentet fra samme område (Niagara, sted A

og B) er det en viss sannsynlighet for at disse tre multiresistente *Bordetella*-bakteriene kan ha tilhørt samme art. I prøve Na1*(E) ble også *Staphylococcus epidermis* påvist. Ettersom denne bakterien kjennetegnes som en av de vanligste kontaminantene ved mikrobiologiske undersøkelser, er det sannsynlig at dette var årsaken til at den ble påvist i prøven.

Tidligere undersøkelser av *Bordetella*-bakterier baserer seg på isolat av vertsspesifikke patogene arter fra mennesker og dyr, som *B. pertussis*, *B. parapertussis* og *B. bronchiseptica*. Ett av de mest brukte medikamentene i behandling av respiratoriske infeksjoner forårsaket av humanpatogene *Bordetella* spp. er antibiotikaklassen makrolider, særlig erytromycin. Flere studier har påvist resistens mot erytromycin i *B. pertussis*, men også i *B. bronchiseptica* (Lartigue et al. 2005; Wang et al. 2014). Selv om forekomsten av erytromycin-resistens blant *Bordetella* spp. er sjeldent, har det blant annet i land som Kina blitt påvist en del tilfeller (Wang et al. 2014). Det er derimot mindre kunnskap om hvor utbredt ESBL-relatert resistens mot β -laktamantibiotika er i andre *Bordetella*-arter.

I to av isolatene av *Bordetella* spp. fra Niagara, ble det påvist et ESBL_A-gen i form av *bla*_{SHV}. Det ene isolatet var Na1*(E) og det andre var Nb1*(C), hvor det i sistnevnte ble oppdaget *bla*_{SHV} ved Nanopore-sekvensering i tillegg til ESBL_{KARBA}-varianten *bla*_{OXA}. Funnet av SHV-genet i Na1*(E) ved Multiplex PCR kan ses i sammenheng med bakteriens fenotypiske resistens ved vekst på ESBL-skål, det samme gjør OXA-genet påvist i *B. petrii*-isolatet Nb1*(C). Dette samsvarer også med funn i tidligere studier hvor β -laktamasen OXA-2 har blitt påvist, men da i arten *B. bronchiseptica* og ikke i *B. petrii* (Kadlec et al. 2007). Når det gjelder tidligere ESBL_A-varianter påvist i *Bordetella* spp., har en studie gjort av Adesoji og Ogunjobi (2016) funnet ESBL_A-genet *bla*_{TEM} i *Bordetella* spp. Det har også blitt funnet β -laktamaser med likheter til andre resistensgener, som for eksempel varianter av SHV og TEM. I en studie gjort av Lartigue et al. (2005) ble det i *B. bronchiseptica* og *B. parapertussis* påvist en kromosom-bundet β -laktamase kalt BOR-1 som kunne assosieres med fenotypisk resistens mot flere typer penicillin. Det samme forskningsteamet viste at BOR-1 dessuten hadde over 42 % likhet med en rekke andre β -laktamaser, blant annet iboende SHV-1 fra *K. pneumoniae* og plasmid-bundet TEM-1 (Lartigue et al. 2005).

At det i denne studien ble funnet tre multiresistente isolat av *Bordetella* spp., hvorav ett isolat var *B. petrii*, understreker at det er et potensiale i å forske mer på β -laktam-resistens i *Bordetella*-arter som nødvendigvis ikke kun er vertsspesifikke. Særlig ettersom dette ene isolatet hadde ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens og var bærer av ESBL-genene *bla*_{OXA} og *bla*_{SHV}. Hvorvidt de andre isolatene kan ha vært bærere av de samme resistensgenene og variantene som ble funnet i Nb1*(C) ble ikke bekreftet, men funn av SHV ved Multiplex PCR i Na1*(E) indikerer at det er en viss

sannsynlighet for at det er en sammenheng. Ved å helgenomsekvensere genomet til Na1*(E) og Nb1*(E) kan isolatene identifiseres på artsnivå og det kan eventuelt kartlegges flere genotypiske resistensegenskaper (f.eks. ESBL-gener, effluxpumper, poriner). Oppdyrking av de to isolatene på CRE-skål vil også indikere mulig ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens, som kan gi en indikator på hvor utbredt dette kan ha vært i *Bordetella*-isolatene ifra jord ved Niagara.

Det andre isolatet som også var påvist bærer av *bla*_{SHV}, ble identifisert som *Pseudomonas* spp. (prøve Na1*(C)) med Sanger-sekvensering. Påvisning av SHV-resistensgenene på gel viser at båndene til Na1*(E) ligger parallelt ved siden av båndet til Na1*(C). En vanlig håndteringsfeil ved applisering av PCR-produkt på gel er at produktet flyter opp og ender opp i nærliggende brønner. På bakgrunn av at SHV-ble detektert i et annet isolat av *Bordetella* spp. er det en viss sjanse for at dette ikke har skjedd, ettersom båndet til Na1*(E) var svakest (figur C.4). Funnet av *bla*_{SHV} ble derimot ikke bekreftet med helgenomsekvensering av dette isolatet.

Resistensgenet *bla*_{SHV} i *Pseudomonas*-isolatet kan ikke alene ha bidratt til ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens, men at Nanopore-sekvensering bekreftet funn av *bla*_{VIM}, kan derimot forklare isolatets fenotypiske karbapenem-resistens ved vekst på *Brilliance*TM CRE. Dette er dessuten det samme resistensgenet som ble påvist fra BHI-mediet av samme prøve (sted A) og kan derfor ha en sammenheng, uten at det er mulig å fastslå sikkert. Ved fremvekst på *Brilliance*TM CRE betegnes *Pseudomonas* spp. som en «ikke-CRE» multiresistent bakterie, som indikerer at andre resistensgener og mekanismer enn kun produksjon av karbapenemaser kan ha bidratt til toleranse mot antibiotika. Resistens mot karbapenem-antibiotika kan skyldes produksjon av karbapenemaser, men det er i tillegg også kjent at *Pseudomonas* spp. har effluxpumper som kjennetegnes som en sentral iboende mekanisme, særlig i bakterier fra akvatiske omgivelser (Kittinger et al. 2016). Hvorvidt isolatet har vært bærer av effluxpumper eller andre resistensmekanismer kan undersøkes videre i fremtidige studier.

Pseudomonas spp. tilhører familien *Pseudomonadaceae* og er en Gram-negativ, ikke-fermentativ bakterie som også er utbredt i miljøet. At det ble påvist multiresistente *Pseudomonas* spp. i prøver av jord samsvarer med at de fremstår som viktige bidragsyttere i biologiske nedbrytningsprosesser og resirkulering av organiske forbindelser i jord (Devarajan et al. 2017; Kittinger et al. 2016). Med mikrobiotasekvensering ble det i tillegg detektert dominerende forekomster av *Pseudomonas* spp. sammenlignet med andre arter i jord fra Niagara. Hvorvidt dette har påvirket at *Pseudomonas* spp. ble påvist i to av fem isolat fra dette området er ukjent, men det kan virke som betingelsene i jord fra Niagara kan ha påvirket fremvekst av bakterien. Bakteriens dominerende forekomst kan

for eksempel ha gitt den et konkurransefortrinn ved oppdyrking, i kombinasjon med fordelene av å være bærer av resistensgener og eventuelt andre resistensmekanismer.

Arter i slekten *Pseudomonas* er bærere av en rekke iboende og tilegnede resistensgener som i tillegg er assosiert med flyttbare genelementer. Det har tidligere blitt påvist multiresistente isolat med resistens mot de fleste antibiotikaklasser, både β -laktamantibiotika, makrolider, sulfanomider, flurokinoloner, kinoloner og glykopeptider (Molina et al. 2014). Viktige resistensmekanismer mot β -laktamantibiotika i *Pseudomonas* spp. er produksjon av ulike β -laktamaser i tillegg til iboende effluxpumpe-mekanismer og poriner. En studie av Devarajan et al. (2017) påviste mange ulike β -laktamase-gener i form av *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{NDM} og *bla*_{VIM} i *Pseudomonas* spp. Når det gjelder ESBL_{KARBA} anses *Pseudomonas* spp. dessuten som en av de første bakteriene som MBL-ene VIM og IMP ble beskrevet i, og i tillegg til disse har bakterien også tilegnet seg andre ESBL_{KARBA}-B-enzymmer, som varianter av GIM og SPM (Pfeifer et al. 2010). Deres evne til å dele disse med andre bakterier, som blant annet medlemmer i familien *Enterobacteriaceae*, bidrar til at *Pseudomonas* spp. ofte kan betraktes som et utgangspunkt for spredning av resistensgener som for eksempel koder for karbapenemaser (Kittinger et al. 2016).

Tilfeller av antibiotikaresistente *Pseudomonas* spp. er kjent, særlig fra kliniske prøver av den mest vanlige humanpatogene arten, *P. aeruginosa*. Denne kan forårsake en rekke ulike infeksjoner, alt fra ørebetennelser til mer alvorlige lungeinfeksjoner. I enkelte europeiske land har karbapenem-resistens blitt mer utbredt i *P. aeruginosa*. Hellas har blant annet rapportert om 51 % forekomst av karbapenem-resistente *P. aeruginosa* (Devarajan et al. 2017). Økt forekomst av karbapenem-resistens i disse bakteriene gir stor grunn til bekymring både på grunn av at de er resistente mot alle typer β -laktamantibiotika, men også fordi de også ofte er resistente mot andre typer antibiotika som gjør det vanskeligere å behandle infeksjoner forårsaket av disse.

Andre patogene arter som kan gi opphav til kliniske infeksjoner er *Pseudomonas putida* (*P. putida*) og *Pseudomonas fluorescens*. Sammenlignet med de kliniske tilfellene av *Pseudomonas* spp., er det derimot færre studier med fokus på resistens i *Pseudomonas* spp. fra miljøprøver (Devarajan et al. 2017). *P. putida* var et av artstreffene i nBLAST, og er en variant som er vanlig å detektere i miljøprøver av jord og vann (Molina et al. 2014). Bakterien er typisk svært utbredt, fleksibel og tilpasningsdyktig i ulike miljøer med varierende tilgang til næringsstoffer. Dette samsvarer med observasjoner gjort i studien til Udikovic-Kolic et al. (2014), hvor det ble kartlagt økt forekomst av antibiotikaresistente *Pseudomonas* spp. sett i sammenheng med oppblomstring i jord gjødslet med husdyrgjødsel. En studie gjort av Kittinger et al. (2016) hvor det ble kartlagt ulike

Pseudomonas spp. langs eleven Danube, utgjorde *P. putida* over 66 % av alle isolater. Hvor utbredt denne arten er i jordprøvene ble ikke kartlagt i denne studien, men på slektsnivå utgjorde *Pseudomonas* spp. en stor andel av den totale floraen i prøver fra Niagara.

Resistensgenet som ble påvist i isolatet av *Pseudomonas* spp. med Nanopore-sekvensering var av typen *bla*_{VIM}, som tidligere stort sett har vært assosiert med integroner. Blant annet har det blitt observert MBL-produserende stammer av denne bakterien (Kim et al. 2012). I en studie gjort av Molina et al. (2014) var *P. putida* bærer av et plasmid-bundet β -laktamase-gen som var 100 % likt som VIM-1 påvist i *K. pneumoniae*. I *K. pneumoniae* bidrar dette genet til fenotypisk karbapenem-resistens. Hvorvidt VIM-genet som ble påvist i isolat Na1*(C) var plassert på mobile genelementer ble ikke kartlagt, men på grunn av *bla*_{VIM} sin nære tilknytning til integroner er det stor sannsynlighet for dette er et flyttbart resistensgen.

P. putida har i særlig økende grad vært årsak til alvorlige sykehusinfeksjoner med høy dødelighet. Tidligere anså man denne arten som mindre helsefarlig på grunn av liten grad av virulens og stor mottagelighet mot antibiotika. Sammenlignet med *P. aeruginosa* har *P. putida* dessuten ofte vært mer mottagelig mot antibiotika (Kim et al. 2012). Tilfeller av infeksjon forårsaket av *P. putida* har i tillegg vært sjeldne, men bakterien har tidligere forårsaket sykehusinfeksjoner i personer med svekket immunforsvar (Kim et al. 2012). Nyere forskning har vist at denne i økende grad bør betraktes som en mer klinisk signifikant patogen, fordi det har vært en urovekkende fremvekst av multiresistente og karbapenem-resistente *P. putida* (Kim et al. 2012). Det har blant annet blitt påvist karbapenem-resistente *P. putida* i isolat fra urinveisinfeksjoner (Kim et al. 2012).

Å bekrefte identiteten til isolat Na1*(C) kan eventuelt bidra til å kartlegge om denne er en direkte eller indirekte trussel mot menneskers helse. Til tross for at Sanger-sekvensering identifiserte isolatet Na1*(C) *Pseudomonas* spp. ble identiteten ikke bekreftet med Nanopore-sekvensering, som derimot identifiserte isolatet som *Ochrobactrum anthropi* (*O. anthropi*). Analysen med MinION påviste dessuten også en vertsspesifikk, kromosom-bundet β -laktamase kalt OCH, som indikerte med ganske stor sikkerhet at bakterien var *O. anthropi*. Dette utelukker derfor kontaminasjon som mulig årsak til avviket. En mulig årsak til avvikende resultater kan ha vært overlappende likheter i bakteriens 16S rRNA, eller på grunn av kvaliteten til 16S rRNA gensekvensene fra Sanger-sekvenseringen. På bakgrunn av at resultatene fra helgenomsekvenseringen kom i slutten av denne studien ble det i diskusjonen likevel tatt utgangspunkt i Sanger-sekvenseringsresultatene.

Det tredje isolatet, VNc1 (E), med ESBL-fenotypisk resistens kom fra Veterinærjordet (nord). Bakterien ble identifisert som *Serratia* spp. og var ifølge Multiplex PCR, bærer av ESBL_{KARBA}-genet *bla*_{KPC} og ESBL_A-genet *bla*_{TEM}. *Serratia* spp. er en Gram-negativ stavbakterie som tilhører

familien *Enterobacteriaceae*. Bakterien er en del av KESC-gruppen som kan påvises på *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE, ved at den enten danner grønne eller blå kolonier (tabell 2.1). Derfor ble bakterien også gjenkjent ved vekst på et av de selektive kromogene mediene. At ESBL_{KARBA-A} genot *bla*_{KPC} og ESBL_A-genot *bla*_{TEM} ble påvist i isolatet av *Serratia* spp. samsvarer med bakteriens fenotypiske resistens observert ved vekst på *Brilliance*TM ESBL. Funnet av disse resistensgenene, *bla*_{TEM} og *bla*_{SHV} ble dessuten også bekreftet med Nanopore-sekvensering. Hvorvidt KPC-genet kan ha bidratt til fenotypisk karbapenem-resistens ble ikke påvist, men videre oppdyrking av dette isolatet på *Brilliance*TM CRE kan gjennomføres for å vurdere om den er resistent mot karbapenem-antibiotika. Det ble i tillegg også påvist en rekke andre ESBL-gener i dette isolatet ved helgenomsekvensering, deriblant CTX-M, SHV, IMP og flere andre resistensgener utbredt blant medlemmer i *Enterobacteriaceae*-familien. Funnene med Nanopore-sekvensering tyder på at denne *Serratia*-bakterien er svært multiresistent mot β -laktamantibiotika. Å gjøre videre undersøkelser med for eksempel Nanopore-sekvensering kan bidra til å avdekke om denne bakterien er resistent mot andre antibiotikaklasser også, eller om den har andre resistens- og overføringsmekanismer.

Generelt sett, er slekten *Serratia* utbredt i miljøet, både i ulike organismer (f.eks. insekter, mennesker og dyr), men også i planter, jord og akvatiske miljø (Henriques et al. 2004; Iguchi et al. 2014). Enkelte arter er opportunistiske patogener og assosieres ofte med sykehusinfeksjoner hvor de typisk rammer syke mennesker (Henriques et al. 2004). *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) er av de mest utbredte humanpatogene bakteriene i slekten, etterfulgt av *Serratia liquefaciens* som blant annet kan gi blodforgiftning (Iguchi et al. 2014; Stock et al. 2003). Det er ellers mer begrenset med informasjon om sykdommer forårsaket av andre arter i *Serratia*-slekten (Stock et al. 2003).

I prøvene VNc1 (E) og VND1 (E) var arten *Serratia fonticola* (*S. fonticola*) et av treffene i nBLAST. *S. fonticola* er utbredt i naturlige omgivelser som i jord, vann, avløpsvann og fugler (Stock et al. 2003), som kan ses i sammenheng med at arten ble påvist i jordprøvene fra Veterinærjorden (nord). Det er derfor en viss mulighet for at dette er bakteriens identitet. *S. fonticola* har også blitt påvist i kliniske isolater fra åpne sår og i luftveiene, men er vanligvis en sjelden årsak til infeksjoner i mennesker (Péduzzi et al. 1997; Stock et al. 2003).

Sammenlignet med andre medlemmer i *Enterobacteriaceae* (f.eks. *E. coli* og *K. pneumoniae*), er antibiotikaresistens mindre kartlagt i slekten *Serratia*. Dette henger sannsynligvis sammen med at denne bakterien ikke er av de mest utbredte og helsefarlige antibiotikaresistente *Enterobacteriaceae*-medlemmene. En stor andel av forskningen på antibiotikaresistente *Serratia* spp. kommer

fra kliniske studier av *S. marcescens*, som kan ses i sammenheng med at dette er den mest utbredte humanpatogene arten i slekten (Stock et al. 2003). Ved behandling av *Serratia* spp. brukes ofte kinoloner, aminoglykosider og β -laktamantibiotika (f.eks. cefalosporiner). Det er kjent at blant annet *S. marcescens* kan produsere et kromosombundet enzym som kan inaktivere cefalosporiner (Péduzzi et al. 1997). *Serratia* spp. har i tillegg blitt utpekt som bærer av en rekke ESBL-varianter, slik som andre medlemmer i familien *Enterobacteriaceae*. Slekten har både iboende resistens mot tredje generasjons cefalosporiner på grunn av kromosombundet CTX-M, men kan også være bærer av andre plasmid-assosierte ESBL-er og AmpC β -laktamaser (Blaak et al. 2014; Stock et al. 2003).

At *bla*_{TEM} ble påvist i isolatet av *Serratia* spp. samsvarer med tidligere forskningsfunn. I en studie gjort av Mlynarczyk et al. (2009) ble det vist at TEM var en svært utbredt ESBL-genotype i isolat av *S. marcescens*, i tillegg til CTX-M-varianter som var mest dominerende. Denne arten har også tidligere blitt påvist som bærer av andre plasmid-assosierte β -laktamaser som TEM og SHV, i tillegg til CTX-M, som alle er svært utbredte ESBL-er i Gram-negative stavbakterier (Bajaj et al. 2016; Péduzzi et al. 1997). I tillegg til funn av TEM, ble det også påvist SHV, CTX-M, KPC og en rekke andre ESBL-er med helgenomsekvensering av isolat VNc1 (E). Det ble dessuten også påvist en artsspesifikk β -laktamase kalt FONA. Disse funnene understreker fordelene med helgenomsekvensering, som gjør det mulig å detektere mange genotypiske trekk, ikke kun de man spesifikt leter etter. Ved bruk av Multiplex PCR derimot er søket mer begrenset.

Forskning har vist at *S. fonticola* kan ha iboende resistensegenskaper i form av artsspesifikke AmpC β -laktamaser, i tillegg til et kromosombundet ESBL_A-gen kalt SFO-1 (Henriques et al. 2004). SFO-1 har stor likhet med den vertsspesifikke, kromosom-assosierte β -laktamasen FONA som er påvist i *S. fonticola*. Dette samsvarer med at FONA ble funnet med Nanopore-sekvensering av isolatet VNc1 (E) av *Serratia* spp. Dessuten har flere ulike varianter av FONA-genet tidligere blitt påvist i *S. fonticola* isolert fra jordbruksmiljø (Blaak et al. 2014). Identiteten på isolatet ble bekreftet på slektsnivå, men på ikke artsnivå med Nanopore-sekvensering. Arten som ble påvist med MinION var *Serratia plymuthica*. Med utgangspunkt i at FONA kun har vært påvist i *S. fonticola* tidligere, er det derfor større grunn til å tro at *S. fonticola* er den faktiske identiteten til bakterien.

Resistens mot karbapenem-antibiotika har i økende grad blitt påvist i medlemmer av familien *Enterobacteriaceae*, inkludert i slekten *Serratia*. Karbapenemase-produserende *Serratia* spp. har blitt stadig vanligere å finne i kliniske isolater, særlig variantene VIM, IMP og SME (Zhang et al. 2007). Det har også blitt påvist *S. fonticola* med fenotypisk resistens mot karbapenem-antibiotika

(Henriques et al. 2004; Stock et al. 2003). Fenotypiske karbapenem-resistensen har blant annet vært assosiert med et gen som koder for en ESBL_{KARBA-A}-variant kalt SFC-1 (Henriques et al. 2004). Dette enzymet er foreløpig ikke påvist i andre *S. fonticola*-bakterier, som indikerer at genet kan ha blitt overført med HGT (Henriques et al. 2004). ESBL_A-genet *blas_{SFC-1}* i *S. fonticola* ligner *blas_{FO-1}* og dets homologe sekvens FONA (Henriques et al. 2004). Det som også er interessant er at sekvensen til SFC-1-genet har 61 % likhet med KPC. KPC-genet ble dessuten både påvist med Multiplex PCR og Nanopore-sekvensering av *Serratia* spp. En studie gjort av Zhang et al. (2007) har påvist KPC i *S. marcescens*, men ikke andre *Serratia*-arter. Å kartlegge om TEM, KPC eller noen av de andre ESBL-ene påvist i denne studien foreligger på kromosom, mobile genelementer eller er flyttbare med andre HGT-metoder, er svært relevant for å finne ut om genene kan spres til andre bakterier. Som for eksempel til nært beslektede klinisk signifikante bakterier som *S. marcescens*.

I motsetning til de tre isolatene som har blitt diskutert, ble det i fire av syv isolater med fenotypisk multiresistens ikke påvist verken ESBL_A- eller ESBL_{KARBA}-resistensgener med Multiplex PCR (tabell 3.6). Disse fire isolatene ble identifisert som *Bordetella* spp., *Pseudomonas* spp. og *Serratia* spp. med 16S rRNA Sanger-sekvensering. Tre av disse isolatene hadde fenotypisk resistens mot tre av fire β-laktamantibiotika vist med fremvekst på *Brilliance*TM ESBL. Det fjerde isolatet, *Bordetella* spp., hadde fenotypisk resistens mot fire av fire β-laktamantibiotika og vokste på *Brilliance*TM CRE agar. Manglende funn av resistensgener med Multiplex PCR, til tross for fenotypisk multiresistens, kan henge sammen med at bakteriene var bærere av andre ESBL-varianter enn de det ble søkt etter. Det kan også komme av at det var andre resistensmekanismer som ga fenotypisk ESBL-resistens, eller det kan skyldes kvantiteten eller kvaliteten på både DNA og målgen. Eventuelle forurensninger i prøven kan for eksempel ha hindret PCR-reaksjonen.

Kun to av disse fire isolatene, Nb1*(C) og Nb2 (E), ble helgenomsekvensert. Ved Nanopore-sekvensering ble identiteten til isolatene bekreftet, i tillegg ble det også påvist ulike ESBL-gener i bakterienes genom som kunne samsvare med deres fenotypiske resistens. For eksempel ble identiteten til *Pseudomonas resinovorans* (*P. resinovorans*) i prøve Nb2 (E) bekreftet, og bakteriens ESBL-fenotypiske resistens kan henge sammen med ESBL_{KARBA}-resistensgenene GES og OXA som også ble påvist med Nanopore-sekvensering. Hvorvidt *P. resinovorans* er karbapenem-resistent kan undersøkes ved videre oppdyrking på *Brilliance*TM CRE-skål, særlig ettersom tilstedeværelse av ESBL_{KARBA}-genene GES og OXA potensielt indikerer dette. I følge Nanopore-sekvensering var *B. petrii* identiteten til prøve Nb1*(C). En mulig årsak til hvorfor bakterien vokste på CRE-agar kan ses i sammenheng med at ESBL-variantene OXA og SHV ble funnet med sekvensering. Ettersom både OXA og SHV ble søkt etter med Multiplex PCR, men ikke ble funnet,

indikerer at faktorer som for eksempel urenheter og mengde genomisk materiale, kan ha hindret amplifiseringen av resistensgenene. Ved vurdering av gelbildene fra Multiplex PCR (tabell 3.3 og tabell 3.4) kom det dessuten frem at flere av båndene til målgenene på gel var uklare eller svake, noe som gjorde tolkingen utfordrende. I tillegg var det flere bånd uten samsvar med målgenes plassering.

Viktige forutsetninger for å få tydelige og pålitelige resultater i genomiske deteksjonsanalyser er blant annet at DNA-ekstraksjonen bidrar til kvantitativt nok genomisk materiale, i tillegg til at PCR-inhibitorer blir fjernet (Olson & Morrow 2012). Dette forebygger at amplifiseringen blir hindret slik at mest mulig PCR-produkt blir tilgjengelig for synliggjøring på gel, særlig dersom målgenene er utfordrende å amplifisere. Dette gjelder for eksempel gener som er svakt tilstede i DNA-et, som kan forekomme dersom bakteriene forflytter de av ulike årsaker. I denne studien ble DNA-templat ekstrahert med koking av BHI-buljong og direkte fra kolonier, uten påfølgende rensing. Etersom prøvene kommer fra jord ville det mest optimale for kvaliteten på PCR-reaksjonen og amplifisert produkt vært å rense templatene i flere trinn for å fjerne mulige inhibitoriske substanser, men også for å ta bort cellulært materiale fra de lyserte bakteriecellene. På grunn av tidsbegrensinger lot dette seg derimot ikke gjennomføre. Grundig rensing forebygger at enzymer frigjort ved nedbrytning av celleveggen eller fra jord degraderer DNA, eller på annen måte hindrer PCR-reaksjoner. En vanlig inhibitor i jord er humussyre som kan inaktivere eller inhibere *Taq* DNA polymerase (Kermekchiev et al. 2009).

Selv om kvaliteten til templat-DNA fra koloniene var ukjent, både når det gjaldt mengden urenheter og i hvilken grad DNA-et var intakt etter koking og lagring, indikerte likevel gelbildene at DNA-templatene fra koloni var renere enn DNA-templatene som ble ekstrahert direkte fra jord. For å måle mengden urenheter i prøvene av DNA fra koloniene, kunne man for eksempel brukt NanoDrop. Dessuten finnes det også flere metoder tilpasset rensing av DNA-ekstrakt som kan brukes før PCR. Samtidig er ikke alltid disse er i stand til å fullstendig fjerne inhibitorer, og de kan dessuten bidra til tap av DNA. For å unngå problemer forårsaket av inhibitorer kan det også brukes tilsetningsstoffer som motvirker dette, som for eksempel BSA (Lorenz 2012).

DNA-konsentrasjonen i ekstraktene før Multiplex PCR ble heller ikke målt. Det kan ofte være en fordel å ha kjennskap til mengden DNA tilstede, for å optimalisere mengden reaktanter og tilpasse PCR-programmet deretter. DNA ekstrahert ved koking av bakterier podet fra koloni bidrar ofte til høye DNA-konsentrasjoner. Det kom også frem ved konsentrasjonsmålinger av templat-DNA fra koloni som ble brukt til Sanger-sekvensering (se avsnitt 2.6). For høye DNA-konsentrasjoner ved PCR kan gjøre det vanskelig for primere å binde områdene i DNA-et som skal amplifiseres.

Det øker dessuten også sjansen for dannelsen av uspesifikke PCR-produkter. Det er mulig dette kan ha påvirket Multiplex PCR av DNA fra de kokte koloniene, men det er uvisst ettersom man i utgangspunktet ikke hadde klare forutsetninger for hva som kunne forventes å finne i DNA-templatene på forhånd. Dessuten viste de positive kontrollprøvene at amplifisering av DNA-templatene fra koloniene (n=7) med Multiplex PCR var vellykket, som indikerer at det er mindre sannsynlig at høye DNA-konsentrasjoner var et hinder. For å teste effekten av lavere DNA-konsentrasjoner kunne det eventuelt blitt lagd flere fortynninger av samme prøve for å bestemme hvilke konsentrasjoner som var mest optimale. For lave konsentrasjoner av templat-DNA kan derimot også bidra til mindre nøyaktig resultater fra amplifiseringen.

Avvik i resultatene fra Multiplex PCR kan også skyldes generelle håndteringsfeil, for eksempel ved pipettering. De negative kontrollprøvene som ble inkludert i hver PCR-miks (M1-M4) ved kjøring av Multiplex PCR av DNA fra koloniene ga ingen amplikon, som utelukket kontamineringer med annet genomisk materiale. Derimot kom det frem ved Multiplex PCR av M4 med DNA fra BHI-medie at prøvene trolig ble kontaminert, fordi det oppstod et svakt bånd i kontrollprøven etter agarose gelelektroforese. Årsaken er ukjent, men kan ha skyltes at ved applisering på gel eller ved tillaging av PCR-miks kan noe av PCR-produktet ha kommet over i kontrollen, særlig ettersom båndet ligger parallelt med andre målgen. Selv om amplifiseringen av bakteriens gener hadde vært vellykket, er det usikkert hvorvidt kontaminering kan ha påvirket disse resultatene.

Bånd uten kjent tilknytning til målgen kan skyldes problemer med primer-dimers, som er et biprodukt fra PCR som oppstår når to primere binder hverandre og blir amplifisert av DNA-polymerasen i større grad enn det faktiske målgenet. Justeringer av konsentrasjonen av andre reaktanter i PCR-miksen kan brukes for å forebygge at dette skjer. Flere geler ble også kjørt uten kontrollprøver, på grunn av mangel på PCR-produkt. At det var et par geler som ble kjørt uten negative kontrollprøver i denne studien var ikke optimalt, ettersom den negative kontrollprøven er en indikator på at de positive resultatene som kommer til syne på gel, ikke er et falskt positivt resultat, for eksempel på grunn av kontaminasjoner. Disse prøvene burde i utgangspunktet vært analysert på ny.

En av fordelene med å bruke Multiplex PCR sammenlignet med andre PCR-metoder, er at det er mulig å søke etter flere gener samtidig som dermed effektiviserer søket. Selv om det ikke ble funnet ESBL-gener med Multiplex PCR kan man ved å endre primermiksen utvide søket etter andre resistensgener. Mangfoldet av ulike ESBL-er er likevel så stort at det er umulig å lete etter alle variantene samtidig med Multiplex PCR, som begrenser søkets dekning. Helgenomsekvens-

ring har derimot denne fordel, men forutsetter gode bioinformatiske verktøy ettersom sekvenseringen genererer store mengder data. Manglende funn av ESBL-gener kan også skyldes andre genotypiske egenskaper enn produksjon av β -laktamaser, som nevnt i avsnitt 4.1. Ved å bruke helgenomsekvensering vil man kunne finne mange ulike genotypiske trekk i en og samme analyse, som for eksempel både inkluderer tilstedeværelsen av andre resistensgener, virulente egenskaper eller andre resistensmekanismer (f.eks. effluxpumper, poriner).

Nanopore-sekvensering av isolat (n=4) med ESBL-fenotypisk resistens bidro til å bekrefte noen av observasjonene gjort med selektiv oppdyrking, Multiplex PCR og Sanger-sekvensering. Funn fra Nanopore-sekvensering kunne derimot ikke bekrefte alle funnene som ble gjort med Multiplex PCR, men bidro likevel til å avdekke enda flere resistensgener. Å kartlegge selv små forskjeller i nukleotidrekkefølgen kan bidra til å skille mellom ulike ESBL-varianter med ulik oppbygning som kan være avgjørende for å bestemme deres virkningsspektrum (Paterson & Bonomo 2005).

At det i denne studien ble oppdaget en rekke forskjellige ESBL-gener i identifiserte bakterier med ESBL-fenotypisk resistens med ulike molekylærbiologiske metoder, underbygger påstanden om at bakterier i miljøet representerer et viktig reservoar av antibiotikaresistente gener. Særlig siden disse bakteriene hadde bredspektret fenotypisk resistens mot flere klasser av β -laktamantibiotika. Inkludert karbapenem, som betraktes som et av de siste behandlingsalternativene mot klinisk signifikante ESBL- og AmpC-produserende bakterier. Å finne disse i jord understreker at det ikke nødvendigvis bare er de mest utbredte enteriske, Gram-negative bakteriene som er bærere av utbredte ESBL-gener, som også samsvarer med funn i mange andre miljøstudier (Adesoji & Ogunjobi 2016; Ben Said et al. 2015; Pitondo-Silva et al. 2016). Selv om det ikke ble bekreftet at de identifiserte isolatene var av de mest utbredte humanpatogene multiresistente bakteriene, har alle likevel slektskap til klinisk signifikante bakterier med resistente egenskaper. Særlig *Pseudomonas* spp., men også bakterier som tilhører *Bordetella*- og *Serratia*-slekter.

Funn av antibiotikaresistente organismer med nær tilknytning til patogene bakterier innebærer at de kan utgjøre en helsemessig trussel på bakgrunn av den potensielle risikoen for overføring til klinisk signifikante patogene bakterier. Særlig ettersom HGT i større grad kan forekomme mellom nært beslektede bakterier, men også mellom bakterier med fjernt slektskap, forutsatt at donor og mottaker forekommer i samme habitat samtidig (Iredell et al. 2016). Forholdene i jord kan også under visse forutsetninger fremme økt HGT i jord (Heuer & Smalla 2007). I hvilken grad det forekommer at bakterier i jord tar opp eller overfører resistensgener til patogene bakterier er foreløpig uvisst. Likevel har flere studier funnet likhetstrekk mellom den strukturelle oppbygningen til resistensgener påvist i miljøbakterier og resistensgener påvist i klinisk signifikante bakterier,

som indikerer at slike overføringer sannsynligvis foregår (Forsberg et al. 2012; Poirel et al. 2002; Poirel et al. 2005). At flere av resistensgenene som ble påvist i denne studien assosieres med mobile genelementer, øker sannsynligheten for at de kan delta eller har deltatt i HGT som forekommer i jord. Hvorvidt ESBL-variantene som ble påvist i denne studien kan relateres direkte til resistensgener i klinisk signifikante bakterier, enten i nært beslektede eller fjernt beslektede individer ble ikke kartlagt. Videre studier av resistensgenenes sekvensoppbygning og overførbarhet til klinisk signifikante bakterier kan bidra til å avdekke slike sammenhenger.

Å påvise ESBL-produserende bakterier bør også ses i sammenheng med studier som har vist at forekomsten av antibiotikaresistente gener i jord har økt over tid. En omfattende studie gjort i Nederland har vist at andelen ARG mot alle antibiotikaklasser har økt gradvis fra 1940 og frem til 2008, sannsynligvis på grunn av økt antibiotikaforbruk (Knapp et al. 2010). Faktorer i miljøet hvor de resistente bakteriene ble påvist er av stor betydning for å forstå hva som er årsaken til at bakteriene er resistente, som i tillegg bør ses i sammenheng med om det er ervervede eller iboende resistensmekanismer. Varianter av ESBL-ene det ble søkt etter i denne studien kjennetegnes som flyttbare under visse forutsetninger, som også innebærer at miljøet rundt kan påvirke deres spredning til andre bakterier. Det er derfor en viss sannsynlighet for at resistensgenene som ble påvist kan relateres til området de er hentet fra.

Ås et gammelt landbruksområde, med lange tradisjoner for både korndyrking, husdyrhold (f.eks. storfe, svin og høns) og forskjellig grønnsaksproduksjon. På campus Ås hvor prøvene er hentet fra ligger dessuten den største gården i hele kommunen (SNL 2016). Veterinærjordet (nord) er tilknyttet dette jordbruksområdet. Bruk av antibiotika i jordbruket, for eksempel til terapeutiske eller ikke-terapeutiske behandling av husdyr betraktes som en viktig årsak til økt forekomst av antibiotikaresistens både i dyrene, men også i miljøet rundt (Holmes et al. 2016; Nwosu 2001). Hvorvidt jordbruket kan ha en sammenheng med de antibiotikaresistente bakteriene påvist i jordprøvene fra dette området, må eventuelt utforskes mer i videre studier. Det er blant annet kjent at umetabolisert antibiotika kan spres i miljøet etter medisinsk behandling av dyr eller mennesker via avløpsvann og kloakk, og bidrar til økt seleksjonspress og økt risiko for utvikling av resistente bakterier i omgivelsene. Avføring som overføres direkte eller indirekte via avrenninger fra jordbruk, husdyr, ville dyr og fugler, er også en mulig kilde til hvordan antibiotikaresistente bakterier og deres resistensgener spres ut i naturen. Studier har tidligere vist at jord behandlet med husdyrgjødsel ofte har større mengder antibiotikaresistente bakterier (Kümmerer 2004; Udikovic-Kolic et al. 2014).

At fysiske krefter som rennende vann bidrar til spredning av resistens åpner opp muligheten for at de resistente bakteriene som ble oppdaget i jord fra Veterinærjordet (nord) og Niagara potensielt kan spres også til andre steder i nærliggende omgivelser som innsjøen Årungen. At det finnes mange ulike faktorer som bidrar til spredning av resistens åpner opp muligheten for at de resistente bakteriene som ble oppdaget i jord fra Veterinærjordet (nord) og Niagara potensielt kan spres også til andre steder i nærliggende omgivelser, som innsjøen Årungen, eller til matproduksjonen i området. Til tross for observasjonene gjort i denne studien indikerer at ESBL-produserende Gram-negative bakterier er utbredt i miljøet rundt oss, er imidlertid forekomsten av tilfeller i mennesker og dyr lav i Norge sammenlignet med forekomster i andre land (NORM/NORM-VET 2016).

4.4 16S rRNA mikrobiotasekvensering med Illumina MiSeq

Mangfoldet i jordprøvene som ble kartlagt med 16S rRNA sekvensering ble kun basert på syv utvalgte prøver fra Niagara og Veterinærjordet (nord). Det lave antallet skyltes både at flere prøver måtte utelates på grunn av for lave DNA-konsentrasjoner etter 16S rRNA amplifikasjon, men også fordi mikrobiotasekvenseringen ikke var vellykket. Mange prøver hadde for få eller ingen sekvenser, som var uventet ettersom jord teoretisk sett naturlig inneholder store mengder bakterier (Torsvik & Øvreås 2002).

Fordelingen av bakteriene i jord er svært tilfeldig og komplisert å tolke. Jordas heterogenitet gjenpeiles i tilstedeværelse av mikrobielle samfunn som vokser frem og fordeler seg avhengig av en rekke faktorer og vekstbetingelser, som ennå ikke er forstått helt ut (Mocali & Benedetti 2010). Det er derfor svært vanskelig å estimere akkurat hva som er «representativt for en jordprøve», men Rarefaction-kurver er en mulig tilnærming til dette.

I samsvar med at mikrobiotasekvenseringen ikke var vellykket var dekningsgraden også lav, særlig for enkelte prøver. Jordprøvene fra Veterinærjordet (nord) var noe mer dekkende enn prøver fra Niagara, men ingen av prøvene som kunne betraktes som helt representative fordi ingen av Rarefaction-kurvene flatet ut. Unntaksvis ble prøvene VNC3 og NB3 utelatt på grunn av korte Rarefaction-kurver, som sannsynligvis skyldes det lave antallet OTU-er som er påvist i disse prøvene. Dette kan også forklare hvorfor prøvene skilte seg ut fra resten av prøvene basert på Chao 1 index, som viste at artsmangfoldet i prøve VNC3 og NB3 var svært lavt sammenlignet med de andre prøvene. Når det i tillegg tas hensyn til relativ forekomst utjevnes denne forskjellen seg noe, som i utgangspunktet kan gi et falskt inntrykk av at forskjellen utjevnes på grunn av at det er et fåtall individer som dominerer i jorda. Når man derimot tar i betraktning at jordprøvene har lav dekningsgrad kommer den faktiske årsaken frem.

For de fem andre prøvene viste Chao 1 index at jord fra Niagara hadde størst mangfold, med små forskjeller mellom hvert sted. Rarefaction-kurven til prøve NB1 hadde derimot større stigning enn prøve NA2 og NA1. Dette ses i sammenheng med at prøven har et større artsmangfold vist med Chao 1 index, med færre sekvenser fordelt på flere bakterieslekter. I motsetning til prøve NA2 og NA1 som både hadde lavere mangfold, men også flere sekvenser enn prøve NB1. På grunn av dette blir dermed også dekningsgraden mindre.

Basert på Shannon index var forskjellene mindre mellom prøvene fra Niagara og Veterinærjordet (nord) når både diversitet og relativ forekomst av bakterier ble tatt hensyn til. Dette skyldes trolig at prøver fra Niagara har størst diversitet, men mer av et fåtall bakterier som dominerer. Jord fra Veterinærjordet (nord) hadde derimot mindre mangfold i tillegg til mindre dominans av bestemte slektsgrupperinger, og derimot mer «jevne» forekomst av flertallet av bakterier. Sett i sammenheng med dekningsgrad, bidrar dette til at prøver fra Niagara var noe mindre representative enn prøver fra Veterinærjordet (nord).

Ved vurdering av disse resultatene bør det tas i betraktning at fra et mikrobiologisk perspektiv er jord et av de vanskeligste miljøene å studere. DNA-ekstraksjon fra jord var en utfordring underveis i studien og det finnes flere mulige begrensende faktorer som kan ha bidratt til dette, som for eksempel dårlig kvalitet, urenheter og lite DNA ekstrahert. Det er kjent at bakterier i jorda foreligger ofte sammen på jordaggregater, som forutsetter grundig rensing før DNA-ekstraksjon for å klare å separere bakterier fra jordpartikler. God rensing er da nødvendig for at nok DNA blir frigjort fra cellene, men også for å unngå ødeleggelse av DNA eller komplikasjoner på grunn av urenheter i prøvene (Kirk et al. 2004). Jord kan inneholde forurensinger i form av inhibitoriske forbindelser (f.eks. humus) som må renses bort. Humussyre kan blant annet binde DNA-polymerase som kan hindre amplifisering i PCR-reaksjoner (Kirk et al. 2004; Olson & Morrow 2012). Dessuten kan partikler og andre syrer tilstede i jorda føre til fragmentering av DNA, slik at det blir ødelagt for videre analyser.

Absorbansmålinger av DNA-ekstraktet (tabell E.2 og tabell E.3, vedlegg E) indikerte at rensed DNA inneholdt en uønsket komponent. Det ble påvist forurensinger som skyltes RNA og protein i 51 % av DNA-ekstraktene, i tillegg var samtlige prøver også forurenset med organiske forbindelser eller salter. At prøvene var urene ble også synliggjort ved Multiplex PCR av DNA-ekstrahert direkte fra jord. Ingen av gelbildene var tolkbare fordi de inneholdt svært mange bånd og skygger, som ikke kunne brukes til å differensiere mellom båndene. Derfor ble det ikke mulig å koble en mulig tilstedeværelse av ESBL-gener sammen med den mikrobielle diversiteten i prø-

vene. Håndteringsfeil ved rensing eller at renseskittet ikke strakk til kan forklare hvorfor det oppstod problemer ved amplifisering og sekvensering. En annen begrensende faktor kan ha vært at konsentrasjonen av mikrobielt DNA ekstrahert direkte fra jord var noe lavere enn teoretisk forventet. Samtidig var mengden likevel tilstrekkelig til videre analyser, som tyder på at det sannsynligvis var andre årsaker til utfallet (f.eks. urenheter) eller en kombinasjon av disse faktorene.

Fra de dataene som var tilgjengelig, viser relativ forekomst av bakterier at *Pseudomonas* spp. var en av de mest dominerende bakterieslektene i jordprøvene fra Niagara, særlig i prøver fra sted A (figur 2.3). Sammenlignet med prøvene fra Veterinærjordet (nord) var derimot det mindre dominans av bestemte bakterier, i tillegg til færre likhetstrekk i artsmangfoldet av de ti bakteriene med størst prosentvis forekomst i prøvene fra Veterinærjordet (nord). Med unntak av slektene *Alkanibacter* spp. og *Bdellovibrio* spp. som ble påvist i begge prøvene. Prøver fra Niagara derimot inneholdt en del av de samme bakteriene som *Pseudomonas* spp., *Perlucidibaca* spp., *Chryseolinea* spp., og *Arenimonas* spp. Samtlige er vanlige bakterieslekter som også lever i jord og akvatiske miljø.

Pseudomonas spp. er en av de kartlagte bakteriene fra Niagara som har sterkest tilknytning til klinisk signifikante og resistente bakterier, nemlig *Pseudomonas aeruginosa* (Slama 2008). Den høye forekomsten indikerer at betingelser i jorda kan ha bidratt til at denne bakterien hadde et konkurransefortrinn. Det er blant annet kjent at «hot spots» av bakterier oppstår ved tilfeldig oppblomstring fordi miljøet rundt endrer seg i favør av enkelte bakterier, som et vanlig fenomen som kan oppstå i jord (Mocali & Benedetti 2010). Gjødsling av jord kan påvirke mikrobiell diversitet ved å blant annet endre næringsstofftilgang og vekstbetingelser (Torsvik & Øvreås 2002). I samsvar med en tidligere studie gjort av Udikovic-Kolic et al. (2014) økte forekomsten av *Pseudomonas* spp. i jord gjødslet med husdyrgjødsel. I den samme studien ble det også vist at andelen bakterier resistente mot β -laktamantibiotika også økte (Udikovic-Kolic et al. 2014). Dette kan både ses i sammenheng med diversiteten i prøvene fra Niagara, i tillegg til at det i to av fem isolater med ESBL-fenotypisk resistens fra Niagara ble påvist *Pseudomonas* spp. For å bekrefte en slik sammenheng må det gjennomføres videre kartlegging og mikrobiologiske undersøkelser.

Jordprøver fra Veterinærjordet (nord) hadde en annerledes sammensetning av dominerende bakterieslekter enn jord fra Niagara. I prøve VND1 er *Alkanibacter* spp., *Gallionella* spp. og *Sorangium* spp., de slektene med størst relativ forekomst. I prøve VND3 derimot dominerte *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp. og *Staphylococcus* spp. som er vanlige å detektere i omgivelsene, men deres tilstedeværelse i prøvene kan også relateres til jordbruksområdet prøvene kommer

fra. Totalt seks av de topp ti mest forekommende bakteriene i denne prøven var melkesyrebakterier, av disse har slekten *Staphylococcus* spp. sterkest assosiasjon til klinisk signifikante multiresistente bakterier (MRSA/LA-MRSA). Ettersom fokuset i denne studien var ESBL-produserende bakterier i jord ble det ikke søkt etter resistente *Staphylococcus aureus*, men det utelukker ikke at dette kan utforskes videre.

4.5 Forslag til videre forskning

Funnene i denne masteroppgaven belyser at det er ennå svært lite kjennskap til hvor utbredt antibiotikaresistens er i jord, og at det er et behov for å videre forskning. Studien viser også at det er et stort potensiale i å gjennomføre flere og mer utvidede forsøk for å finne lignende eller andre resistensgener av stor klinisk relevans i jordbakterier.

- I et forsøk på å kartlegge hvilke genotypiske egenskaper som kan forklare ESBL-fenotypene til isolatene som ikke ble påvist, kan det utføres nye Multiplex PCR med andre primere tilpasset påvisning av andre ESBL-gener enn det som ble testet for i denne studien. Helgenomsekvensering er også en alternativ tilnærming for å finne resistensgener i isolatene, i tillegg til å kunne gi informasjon om bakterienes identitet og andre genotypiske trekk.
For å finne ut om isolatene som vokste på *Brilliance*TM ESBL var resistente mot karbapenem kan disse dyrkes på *Brilliance*TM CRE.
- Det kan også være aktuelt å bruke molekylære metoder for å finne en mulig kobling mellom resistensgenene og deres plassering i bakterienes genom, med fokus på å kartlegge om resistensgener foreligger på kromosomer eller mobile genelementer. PCR med primere tilpasset påvisning av bestemte målgener som for eksempel koder for integroner eller plasmider kan brukes for å eventuelt kartlegge dette. Slike forsøk vil kunne gi en bedre forståelse av spredningspotensiale og risiko av aktuelle resistensgener.
- Å søke etter andre resistensmekanismer enn ESBL er også mulig. For eksempel er det mulig å søke etter bakterier med gener som koder for effluxpumper eller lignende, og å kartlegge om disse foreligger sammen med andre resistensgener i bakteriens genom.
- Å gjøre konjugasjonsforsøk er en metode som kan tas i bruk for å undersøke i hvilken grad resistensgenene kan forflyttes til andre bakterier. Å gjøre slike forsøk med isolatet og humanpatogene bakterier som resipienter, vil kunne brukes for å estimere frekvensen og sannsynligheten for at overføringer skjer mellom jordbakterier og klinisk signifikante bakterier. Ved å tilrettelegge med temperatur og andre betingelser kan man forsøke å etterligne forholdene i jorda, for å gjøre omstendighetene mer «realistiske». I tillegg til å kunne vurdere betingelser som er avgjørende for HGT i jord.

4.5.1 Forslag til nye forsøk

- Å kartlegge i hvilken grad ESBL-produserende bakterier forekommer i jord med kvantitative forsøk er en tilnærming for å vurdere hvor utbredt dette er blant bakterier i jord.
- Forsøk for å undersøke hva som kan ha vært årsaken til forekomst av resistens i jordprøvene, som for eksempel kan knyttes til omgivelsene rundt (jordbruk, husdyr, fugler, ville dyr, mennesker). Blant annet kan det gjennomføres flere prøveuttak i området rundt, fra bekker eller nærliggende jordbruk. Forsøk på å spore forekomst tilbake til opphavet er også en viktig angrepsmåte for å kunne forstå hvordan spredning foregår i tillegg til at videre spredning kan begrenses. Det er blant annet kjent at jordmassene ved Niagara nylig ble tilkjørt fra et jorde, trolig tilknyttet en gård med husdyr. Det vil derfor være mulig å spore hvor de resistente bakteriene kommer fra, ved å for eksempel undersøke om de kommer fra husdyr og jordbruk.
- Det er også mulig å utvide søket til andre områder (f.eks. innsjøer med trekkfugl, bekker i nærheten av jordbruk, i nærheten av industri). Eller se nærmere på forekomst av resistente bakterier i urørt natur, sammenlignet med hva som finnes i miljø påvirket av mennesker.
- En annen mulighet er å søke etter andre signifikante resistente bakterier i jord som for MRSA/LA-MRSA, som også er relevant å søke etter i jordbruksområder. For eksempel ved oppdyrking på *Brilliance*TM MRSA-skåler.

5 KONKLUSJON

Hovedhensikten med denne studien var å studere og mulig påvise tilstedeværelsen av ESBL-produserende bakterier i utvalgte jordprøver. Det ble benyttet tre forskjellige tilnæringsmetoder i form av tradisjonell dyrkningsbasert fenotypisk ESBL-screening og mer fremtidsrettede molekylærbiologiske deteksjonsmetoder. De forskjellige metodene har en rekke fordeler og ulemper, men utfylte hverandre når de ble anvendt i kombinasjon.

Ved hjelp av disse metodene ble det påvist ESBL-produserende bakterier i jord med bredspektret resistens mot ulike β -laktamantibiotika. Oppdyrking på selektive medier bidro til å isolere tre ulike bakterieslekter med ESBL- og ESBL_{KARBA}-fenotypisk resistens. De multiresistente isolatene ble identifisert som *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp. og *Serratia* spp. med Sanger-sekvensering av 16S rRNA. Multiplex PCR av DNA-templat fra koloniene påviste at noen av bakteriene var bærere av ESBL_A- og ESBL_{KARBA}-genene *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} og *bla*_{KPC}, som kunne ses i sammenheng med bakterienes fenotypiske resistens. Både *Pseudomonas* spp. og *Bordetella* spp. var bærere av ESBL_A-genet *bla*_{SHV}, mens *Serratia* spp. fikk påvist ESBL-genene *bla*_{KPC} og *bla*_{TEM}. Helgenomsekvensering bidro til å bekrefte noen av disse funnene, i tillegg til å kartlegge ESBL-genotyper som ikke ble funnet med Multiplex PCR.

Områdene der funnene av ESBL-produserende bakterier i jord ble avdekket, er et lokalt landbruksområde på Ås med nær tilknytning til fôr- og matproduksjon. Resultatene fra denne studien viser viktigheten av å fortsette å kartlegge denne typen miljø i et større og bredere perspektiv, med det formål å avdekke tilstanden i jord med fokus på og kampen mot antibiotikaresistente bakterier. Dette er et bidrag til videre forskning på bakgrunn av at studien har belyst at bakterier i jord er et mulig reservoar av flere ulike typer ESBL-gener, som bør ses på i sammenheng med at dette utgjør en risiko for videre spredning til mennesker og dyr.

Flere av ESBL-genene som ble påvist er i tillegg assosiert med mobile genelementer som kan forflyttes under visse miljøbetingelser forutsatt at donor og mottaker er tilstede. Selv om de ESBL-produserende bakteriene som ble detektert ikke var av de mest klinisk signifikante bakteriene, hadde samtlige nært slektskap med sykdomsfremkallende arter. Uavhengig av bakterienes egne virulente egenskaper utgjør de dermed likevel en potensiell helsemessig trussel fordi resistensgenene de var bærere av kan overføres via flyttbare genelementer, som særlig forekommer mellom nært beslektede individer.

Funnene i denne studien er et grunnlag som kan belyse både for forskningsmiljø, men også myndigheter hvilken potensiell risiko dette utgjør og de mulige utfordringene en kan stå ovenfor. Dette er viktig for at det skal kunne legges til rette for videre forskning for å bedre forstå

sammenhengene mellom økt forekomst og spredning av antibiotikaresistens mellom bakterier, og på tvers av ulike miljø. Forskning på antibiotikaresistens i et slikt helhetlig perspektiv er nødvendig både for få mer kunnskap, bedre kartlegging og bedre overvåkning av resistens, som igjen kan bidra til effektive, forebyggende og helsefremmende tiltak.

6 LITTERATURLISTE

- Adesoji, A. T. & Ogunjobi, A. A. (2016). Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamases Resistance Genes among Bacteria Isolated from Selected Drinking Water Distribution Channels in Southwestern Nigeria. *BioMed Research International*, 2016: 9.
- Albiger, B., Glasner, C., Struelens, M. J., Grundmann, H. & Monnet, D. L. (2015). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance*, 20 (45): 18.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Micro*, 8 (4): 251-259.
- Bajaj, P., Singh, N. S. & Virdi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, 7: 417.
- Balcázar, J. L., Subirats, J. & Borrego, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1216.
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Ben Slama, K. & Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203: 86-92.
- Blaak, H., van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., Docters van Leeuwen, A. E., Lynch, G., van Overbeek, W. M. & de Roda Husman, A. M. (2014). Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*, 168-169: 8-16.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 933-951.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 144-153.
- Cantón, R., González-Alba, J. M. & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3: 110.
- Demanèche, S., Jocteur-Monrozier, L., Quiquampoix, H. & Simonet, P. (2001). Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1): 293-299.
- Devarajan, N., Köhler, T., Sivalingam, P., van Delden, C., Mulaji, C. K., Mpiana, P. T., Ibelings, B. W. & Poté, J. (2017). Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. *Water Research*, 115: 256-265.
- ECDC & EMEA. (2009). *The bacterial challenge: time to react*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. Tilgjengelig fra: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf (lest 25.04.17).
- El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., El-Bialy, H. A. & Omara, A. M. A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8 (1): 36-48.
- FAO. (2016). *The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016- 2020*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf> (lest 05.05.17).
- FHI. (2017). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/helse-og-sykdom/antibiotikaresistens---folkehelsera/> (lest 27.04.17).
- Fleming, A. (1945). *Penicillin*. Stockholm: Nobelsenteret (Tale 11.12.1945).

- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A. & Dantas, G. (2012). The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science*, 337 (6098): 1107-1111.
- Frost, L. S. L., Raphael; Summers, Anne O; Toussaint, Ariane. (2000). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews. Microbiology; London*, 3 (9): 722-32.
- Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H. & Malhotra-Kumar, S. (2012). Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (4): 1140-1146.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1): 1-4.
- Grada, A. & Weinbrecht, K. (2013). Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (8): 1-4.
- Gross, R., Guzman, C. A., Sebahia, M., Martins dos Santos, V. A., Pieper, D. H., Koebnik, R., Lechner, M., Bartels, D., Buhrmester, J., Choudhuri, J. V., et al. (2008). The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. *BMC Genomics*, 9 (1): 449.
- Hamidou Soumana, I., Linz, B. & Harvill, E. T. (2017). Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 28.
- Haque, F., Li, J., Wu, H.-C., Liang, X.-J. & Guo, P. (2013). Solid-State and Biological Nanopore for Real-Time Sensing of Single Chemical and Sequencing of DNA. *Nano today*, 8 (1): 56-74.
- Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M. J. & Correia, A. (2004). Molecular Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (6): 2321-2324.
- Heuer, H. & Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environ. Biosafety Res.*, 6 (1-2): 3-13.
- HOD. (2015). *Nasjonalt strategi mot Antibiotikaresistens 2015–2020*. Oslo: Helse- og omsorgsdepartementet. Tilgjengelig fra: https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi_antibiotikaresistens_230615.pdf (lest 05.05.17).
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J. & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387 (10014): 176-187.
- Huang, T.-D., Bogaerts, P., Berhin, C., Guisset, A. & Glupczynski, Y. (2010). Evaluation of Brilliance ESBL Agar, a Novel Chromogenic Medium for Detection of Extended-Spectrum-Beta- Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6): 2091-2096.
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Kurokawa, K., Oshima, K., Hattori, M., Parkhill, J., et al. (2014). Genome Evolution and Plasticity of *Serratia marcescens*, an Important Multidrug-Resistant Nosocomial Pathogen. *Genome Biology and Evolution*, 6 (8): 2096-2110.
- Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 352: 19.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9): 2761-2764.

- Kadlec, K., Wiegand, I., Kehrenberg, C. & Schwarz, S. (2007). Studies on the mechanisms of β -lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (3): 396-402.
- Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E. & Barnes, W. M. (2009). Mutants of *Taq* DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 37 (5): 14.
- Kim, S. E., Park, S.-H., Park, H. B., Park, K.-H., Kim, S.-H., Jung, S.-I., Shin, J.-H., Jang, H.-C. & Kang, S. J. (2012). Nosocomial *Pseudomonas putida* Bacteremia: High Rates of Carbapenem Resistance and Mortality. *Chonnam Medical Journal*, 48 (2): 91-95.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58 (2): 169-188.
- Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A. H., Kirschner, A., et al. (2016). Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Frontiers in Microbiology*, 7 (586).
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. I. & Graham, D. W. (2010). Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, 44 (2): 580-587.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, 8 (6): 423-435.
- Kong, K.-F., Schnepfer, L. & Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS : Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 118 (1): 1-36.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (2): 311-320.
- Lahey Clinic. (2006). *β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes*. Tilgjengelig fra: <http://www.lahey.org/Studies/> (lest 31.03.17).
- 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., et al. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (4): 1355-1361.
- Lartigue, M.-F., Poirel, L., Fortineau, N. & Nordmann, P. (2005). Chromosome-Borne Class A BOR-1 β -Lactamase of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (6): 2565-2567.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments : J. Vis* (63): 15.
- McDermott, P., Zhao, S., Wagner, D., Simjee, S., Walker, R. & White, D. (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal biotechnology*, 13 (1): 71-84.
- Mlynarczyk, A., Szymanek, K., Sawicka-Grzelak, A., Pazik, J., Buczkowska, T., Durlík, M., Lagiewska, B., Pacholczyk, M., Chmura, A., Paczek, L., et al. (2009). CTX-M and TEM as Predominant Types of Extended Spectrum β -Lactamases Among *Serratia marcescens* Isolated From Solid Organ Recipients. *Transplantation Proceedings*, 41 (8): 3253-3255.
- Mocali, S. & Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161 (6): 497-505.
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., de la Torre, J., Segura, A., Plesiat, P., et al. (2014). Antibiotic Resistance Determinants in a *Pseudomonas putida* Strain Isolated from a Hospital. *PLOS ONE*, 9 (1): 11.
- NCBI. (2006). *New Database and View Options for Nucleotide BLAST Services* Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html> (lest 30.03.17).

- NORM/NORM-VET. (2016). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway 2015. Tromsø / Oslo.
- Nwosu, V. C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology*, 152 (5): 421-430.
- Olson, N. D. & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5: 668-668.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4): 657-686.
- Péduzzi, J., Farzaneh, S., Reynaud, A., Barthélémy, M. & Labia, R. (1997). Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A β -lactamase from *Serratia fonticola* CUV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1341 (1): 58-70.
- Perry, J. A., Westman, E. L. & Wright, G. D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Current Opinion in Microbiology*, 21: 45-50.
- Pfeifer, Y., Cullik, A. & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (6): 371-379.
- Pitondo-Silva, A., Devechio, B. B., Moretto, J. A. S. & Stehling, E. G. (2016). High prevalence of *bla*VIM-1 gene in bacteria from Brazilian soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 62 (10): 820-826.
- Poirel, L., Kämpfer, P. & Nordmann, P. (2002). Chromosome-Encoded Ambler Class A β -Lactamase of *Kluyvera georgiana*, a Probable Progenitor of a Subgroup of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (12): 4038-4040.
- Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J.-M., Mammeri, H., Liard, A. & Nordmann, P. (2005). Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (8): 3523-3525.
- Powers, J. H. (2004). Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 23-31.
- Rawat, D. & Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2 (3): 263-274.
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 6 (9): 981-989.
- Robin, F., Aggoune-Khinache, N., Delmas, J., Naim, M. & Bonnet, R. (2010). Novel VIM Metallo- β -Lactamase Variant from Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (1): 466-470.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (1): 90-101.
- Shendure, J. & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech*, 26 (10): 1135-1145.
- Slama, T. G. (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, 12 (Suppl 4): 7.
- SNL: Ås. (2016). Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/%C3%85s> (lest 22.04.16).
- Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Gröger, T. & Wiedemann, B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (4): 865-885.

- Torsvik, V. & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5 (3): 240-245.
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N. A. & Handelsman, J. (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (42): 15202-15207.
- van Duin, D. & Doi, Y. (2016). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*: 1-10.
- Wang, Z., Cui, Z., Li, Y., Hou, T., Liu, X., Xi, Y., Liu, Y., Li, H. & He, Q. (2014). High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (11): 825-830.
- WHO. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Sveits: World Health Organization. Tilgjengelig fra: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1 (lest 05.05.17).
- WHO. (2016). *Antibiotic resistance*. Tilgjengelig fra: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> (lest 17.01.17).
- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13 (5): 589-594.
- Zaniani, F. R., Meshkat, Z., Naderi Nasab, M., Khaje-Karamadini, M., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Nabavinia, M. S. & Darban Hoseini, M. (2012). The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15 (1): 654-660.
- Zhang, R., Zhou, H. W., Cai, J. C. & Chen, G.-X. (2007). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (3): 574-576.

VEDLEGG

Vedlegg A

Tabell A.1 Totaloversikt over alle prøveuttakene som ble gjort til oppdyrking på Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE.

Sted	Parallell 1	Parallell 2
Niagara A	Na1	Na2
Niagara A*	Na1*	Na2*
Niagara B	Na1	Nb2
Niagara B*	Nb1*	Nb2*
Niagara C	Nc1	-
Niagara D	Nd1	-
Andedammen A	Aa1	-
Andedammen B	Ab1	-
Andedammen C	Ac1	-
Andedammen D	Ad1	-
Andedammen E	Ae1	-
Veterinærjordet A	Va1	-
Veterinærjordet B	Vb1	-
Veterinærjordet C	Vc1	-
Veterinærjordet D	Vd1	-
Veterinærjordet E	Ve1	-
Veterinærjordet Nord A	VNa1	-
Veterinærjordet Nord B	VNb1	-
Veterinærjordet Nord C	VNc1	-
Veterinærjordet Nord D	VNd1	-
Veterinærjordet Nord E	VNe1	-

Prøver som kun har vært fortynnet i Ringers løsning er vist med (*) bak prøvenavn. Prøver uten annoteringen; (*) har vært oppdyrket i BHI-buljong før utstrykning.

Vedlegg B

Tabell B.1 Oppdyrking av jordprøver inkubert i BHI-medium på selektive Brilliance™ESBL- og Brilliance™CRE-skåler. Bakterievekst på de to ulike vekstmediene er vist med (+) og skåler uten vekst med (-).

Niagara			Andedammen			Veterinærjordet (nord)			Veterinærjordet		
	ESBL	CRE		ESBL	CRE		ESBL	CRE		ESBL	CRE
Na1	+	-	Aa1	-	-	VNa1	-	-	Va1	-	-
Na2	+	-	Ab1	+	-	VNb1	-	-	Vb1	-	-
Nb1	-	-	Ac1	+	-	<u>VNc1</u>	+	-	Vc1	-	-
<u>Nb2</u>	+	-	Ad1	+	-	<u>VNd1</u>	+	-	Vd1	-	-
Nc1	+	-	Ae1	-	-	VNe1	-	-	Ve1	-	-
Nd1	+	+									

Tabell B.2 Oppdyrking av jordprøver fortynnet i Ringers løsning på selektive Brilliance™ESBL- og Brilliance™CRE-skåler. Bakterievekst på de to ulike vekstmediene er vist med (+) og skåler uten vekst med (-).

Niagara	ESBL	CRE
<u>Na1*</u>	+	+
Na2*	+	+
<u>Nb1*</u>	+	+
Nb2*	+	+

Funnene som ble fordelt mellom undertegnede og en annen gruppe og som blir omtalt og diskutert i videre i denne oppgaven er understreket i tabell B.1 og tabell B.2.

Tabell B.3 Prosentandel vekst på selektive skåler med Brilliance™ agar.

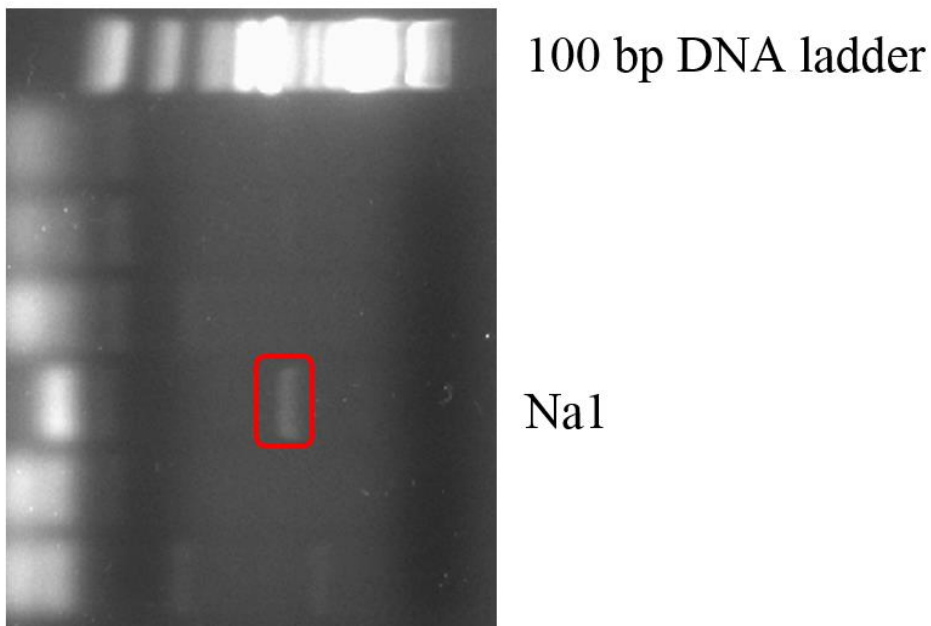
Sted	Brilliance™ ESBL	Brilliance™ CRE
Veterinærjordet	0 %	0 %
Veterinærjordet (nord)	40 %	0 %
Niagara	83 %	17 %
Niagara (*)	100 %	100 %
Andedammen	60 %	0 %
Totalt for hver type vekstmedium:	56 %	20 %

Vedlegg C

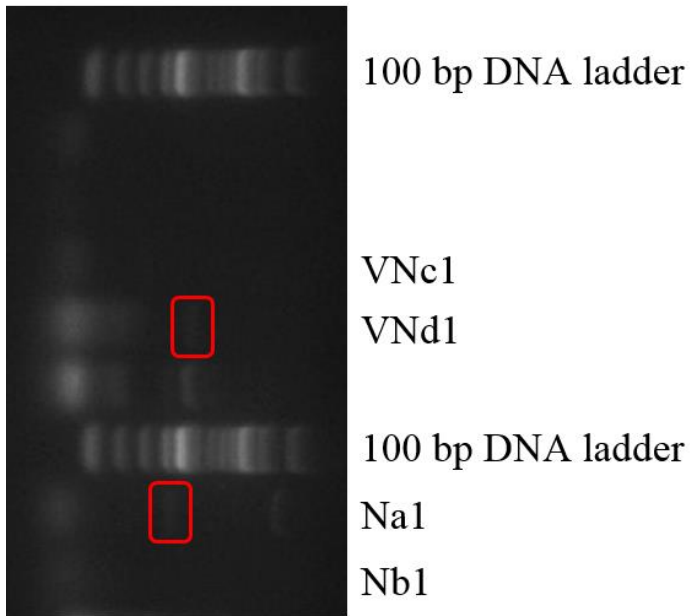
Figur C.1-C.9 viser gelbildene tatt etter agarose gelelektroforese av produkt fra Multiplex PCR (n=7) med Mastermiks 1-4 (M1-M4). Figur C.1-C.3 viser resultatene fra Multiplex PCR av DNA-templat i BHI-medium, og figur C.4-C.9 viser resultatene av Multiplex PCR av DNA-templat fra koloni med ESBL-fenotypisk resistens.

Eventuelle funn av ESBL-genotypene det ble søkt etter er synliggjort med bånd på gel. Genene ble kartlagt ved å sammenligne båndenes plassering med en størrelsesmarkør (100 bp DNA ladder). Synlige bånd som matcher målgene er markert med rød sirkel rundt, inkludert målgene for de positive kontrollprøvene.

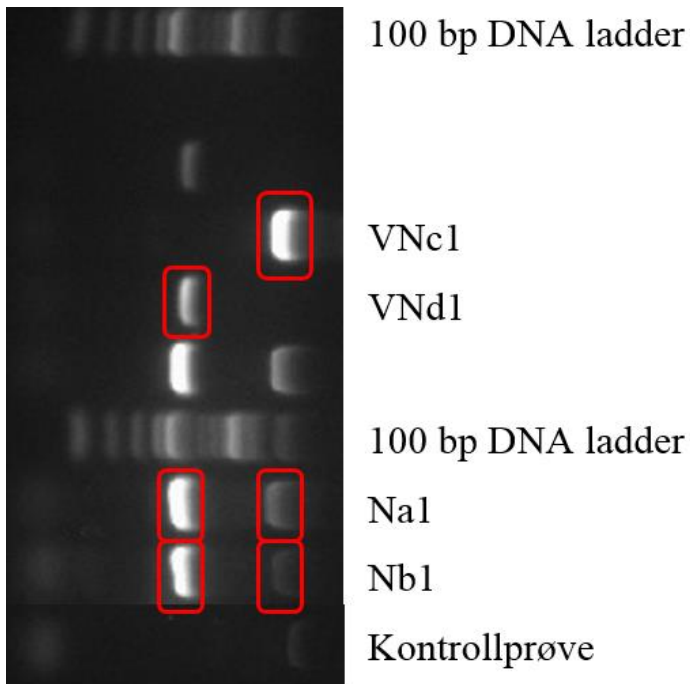
Gelelektroforese av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat i BHI-medium:



Figur C.1 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt fra Niagara prøve Ni1 med M3. inkludert 100 bp DNA ladder. Dette var i utgangspunktet en test med flere paralleller av samme prøve, uten kontrollprøve. Synlig bånd ved ca. 550 bp samsvarte med målgene VIM som har størrelsen 564 bp.

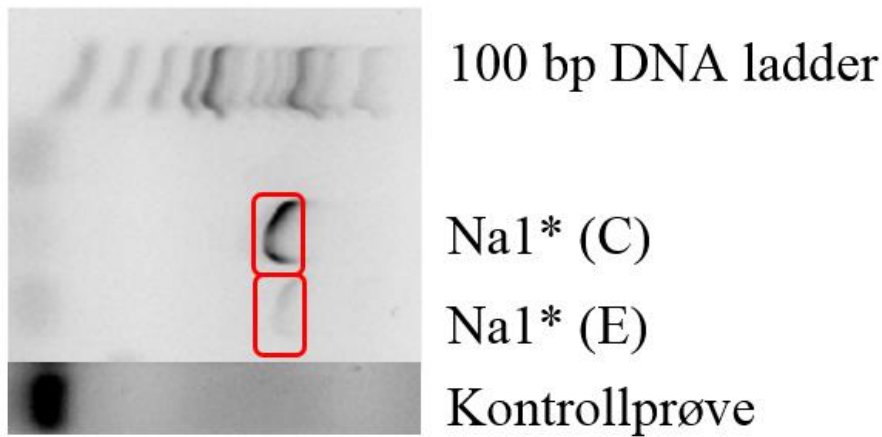


Figur C.2 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt fra Veterinærjordet (nord) prøve VNc1 og VND1, og Niagara prøve Na1 og Nb1 med M3 (brønn 1). Inkludert to 100 bp DNA laddere. Synlig bånd ved ca. 550 bp i prøve VND1 samsvarer med målgenet VIM som har størrelsen 564 bp. Under prøve Na1 var det to svakt synlige bånd. Det nederste båndet ligger plassert i området til KPC-genet som har en størrelse på ca. 460 pb. Størrelsen på det andre båndet matchet ingen målgener.

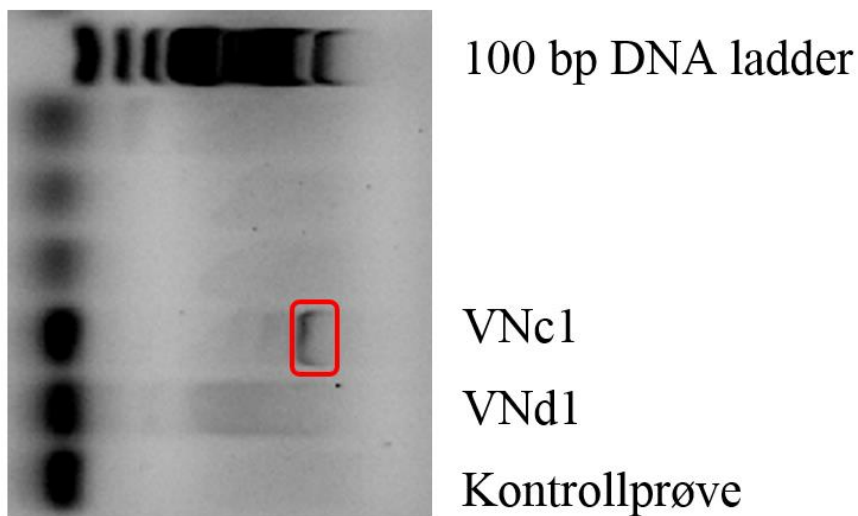


Figur C.3 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt med M4 (brønn 2) fra Veterinærjordet (nord) (VNc1 og VND1) og Niagara (Na1 og Nb1). To 100 bp DNA laddere og en kontrollprøve er også inkludert. Prøve VNc1, Na1 og Nb1 fikk synlige bånd for 16S rRNA-genet. rpoB-genet ble påvist i alle prøver bortsett fra i prøve VNc1. De positive kontrollprøvene indikerer at bakterielt DNA ble amplifisert i PCR-reaksjonen. Negativ kontrollprøve, som også gjelder for gel i figur C.2 var positiv.

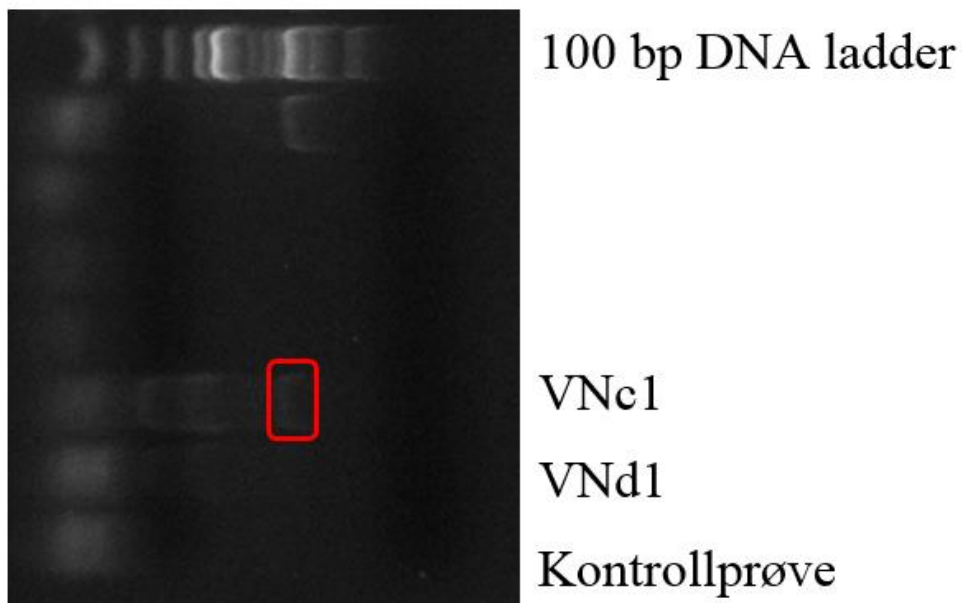
Gelelektroforese av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat fra koloni med ESBL-fenotypisk resistens:



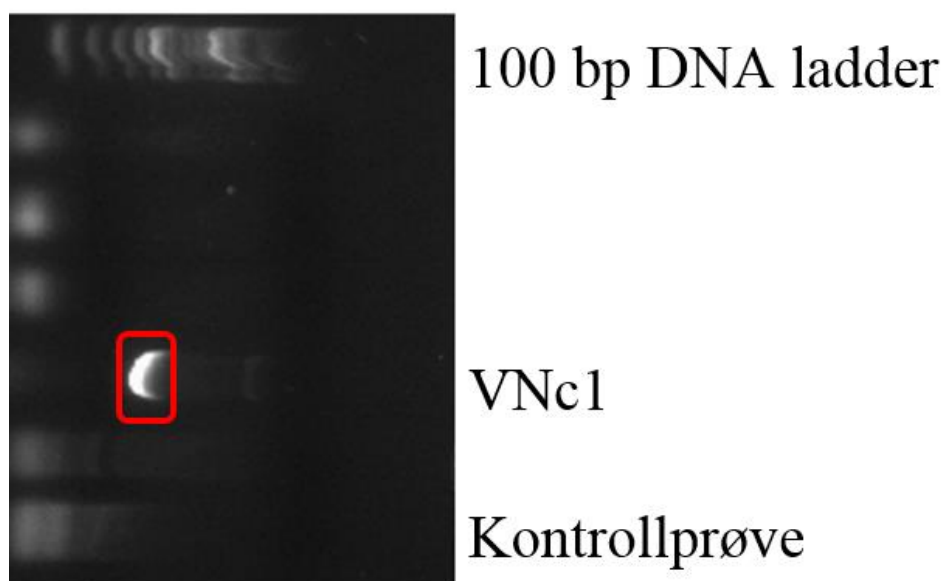
Figur C.4 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat direkte fra renkultur med M1, inkludert 100 bp DNA ladder og negativ kontrollprøve. Her er det ett tydelig bånd (prøve NaI*(C)) og ett svakere (NaI*(E)). Plasseringen til båndene ligger rundt 700 bp, som kan stemme overens med SHV genen. Negativ kontrollprøve gav ingen synlige bånd på gel og var derfor negativ.



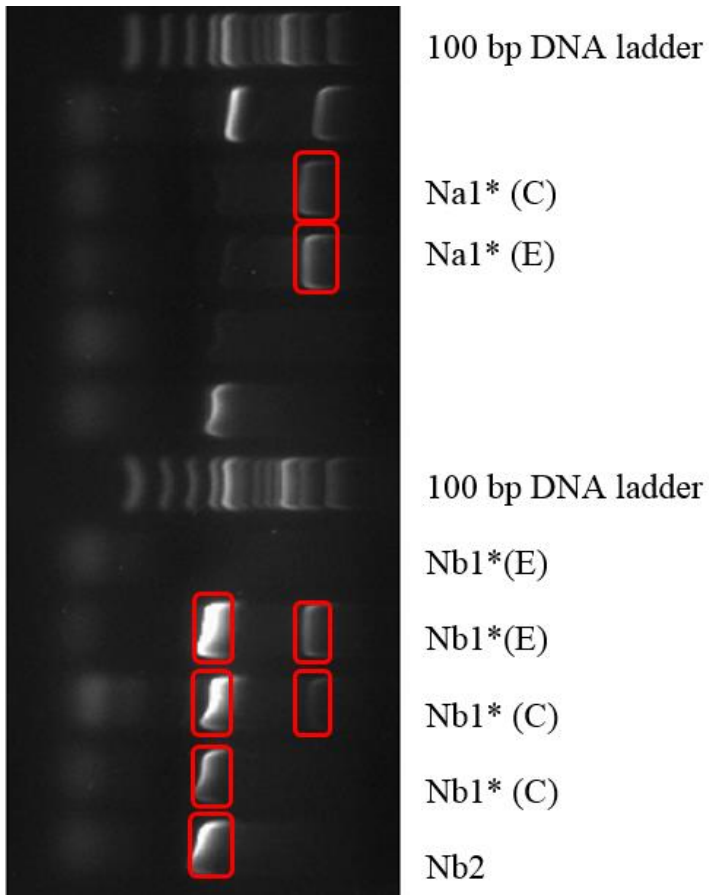
Figur C.5 Gelbildet av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat direkte fra renkultur med M1, inkludert 100 bp DNA ladder og negativ kontrollprøve. Tydelig bånd under prøven VNc1, men plasseringen rundt samsvarer ikke med målgenen for primerne i M1. Den negative kontrollprøven er den samme som i figur C.4.



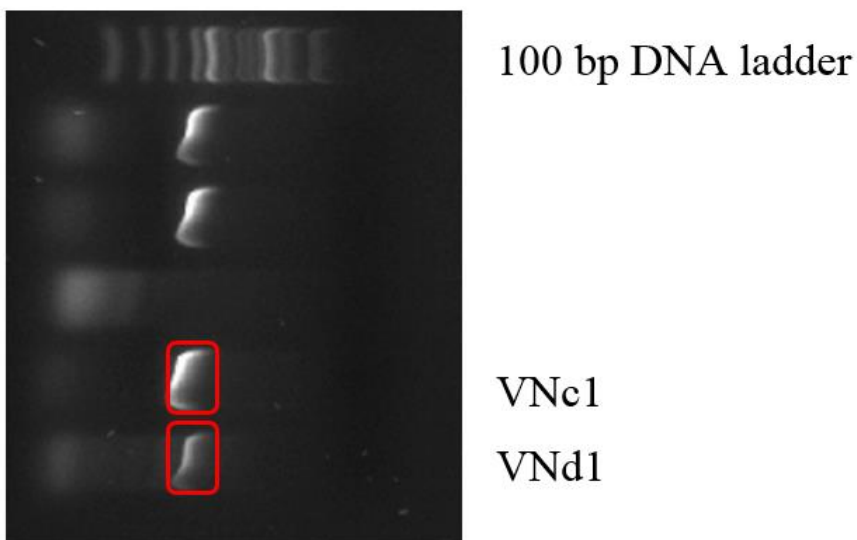
Figur C.6 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat direkte fra renkultur med M2, inkludert 100 bp DNA ladder og negativ kontrollprøve. Svakt bånd under prøve VNc1 og plasseringen rundt 800 bp samsvarer med målgenet til TEM.



Figur C.7 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat direkte fra renkultur med M3, inkludert negativ kontrollprøve og 100 bp DNA ladder. Sterkt bånd under prøve VNc1 ved ca. 460 bp, som samsvarer med KPC-genet. Den negative kontrollprøven var negativ.

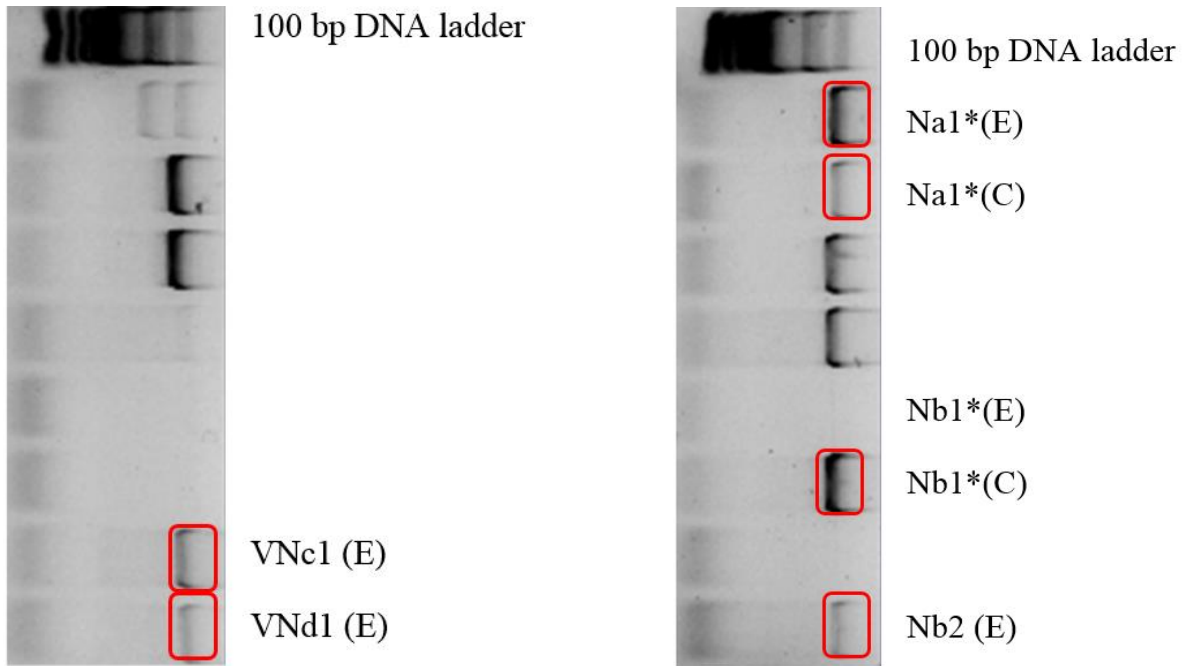


Figur C.8 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt fra DNA-templat direkte fra renkultur med M4 (brønn 1), inkludert 100 bp DNA ladder. Alle prøver for bakterielt DNA var positive enten ved tilstedeværelse av *rpoB* eller 16S rRNA gen, med unntak av et av isolatene av prøven av Nb1*. Negativ kontrollprøve manglet.

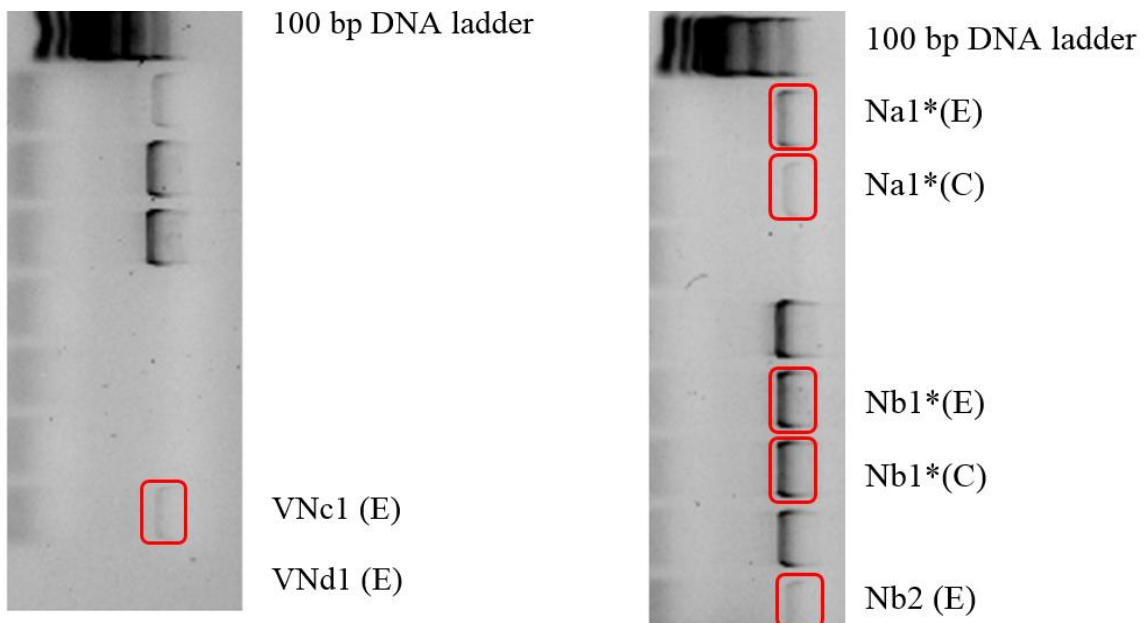


Figur C.9 Gelbilde av Multiplex PCR-produkt av DNA-templat direkte fra renkultur med M4 (brønn 2), inkludert 100 bp DNA ladder. Begge prøvene har målgenet til *rpoB*, men det ble ikke påvist 16S rRNA. Negativ kontrollprøve manglet.

Gelelektroforese av PCR-produkt av 16S rRNA fra DNA-templat fra koloni med ESBL-fenotypisk resistens, før Sanger-sekvensering:



Figur C.10 PCR av 16S rRNA for å bekrefte at det er 16S rRNA tilstede i isolat fra kolonier med ESBL-fenotypisk resistens (10x fortykning av suspendert DNA-templat).



Figur C.11 16S rRNA for å bekrefte at det er 16S rRNA tilstede i isolat fra kolonier med ESBL-fenotypisk resistens (1000x fortykning av DNA-templat).

Ved 10x fortykning ble det bekreftet 16S rRNA i alle prøvene (n=7), med unntak av prøve Nb1*(E). Ved 1000x fortykning ble det bekreftet 16S rRNA i alle prøvene (n=6), med unntak av prøve VNd1 (E).

Vedlegg D

Tabell D.1 Oversikt over fortynnede prøver av 16S rRNA fra multiresistente kolonier som ble sendt til Sanger-sekvensering i GATC. Basert på DNA-konsentrasjoner målt med Qubit® ble volum av prøve og volum av primere tilpasset hverandre og sendt til Tyskland.

Prøve (n=7)	Fortynning	DNA-konsentrasjon (ng/μl)	Volum prøve (μl)	Volum primer (μl)
Na1* (E)	10 x	8,53	7	3
Na1*(C)	10 x	2,53	8	2
Nb1*(E)	1000 x	7,73	7	3
Nb1*(C)	10 x	21,9	5	5
Nb2 (E)	10 x	2,34	8	2
VNc1 (E)	10 x	6,17	8	2
VNd1 (E)	10 x	3,03	8	2

Tabell D.2 Oversikt over resultatene med flest treff fra databasesøk med kontig-sekvenser i nBLAST.

Prøve (n=7)	Maks score ⁷	Total score ⁸	Query cover ⁹	E-verdi ¹⁰	Identitets-score ¹¹
Na1*(E)					
<i>Bordetella</i> spp.	2418	2418	100 %	0.0	99 %
<i>Bordetella petrii</i> stamme	2446	2446	100 %	0.0	99 %
Na1*(C)					
<i>Pseudomonas</i> spp.	2276	2276	100 %	0.0	99 %
<i>Pseudomonas putida</i> stamme	2276	2276	100 %	0.0	99 %
<i>Pseudomonas monteilii</i> stamme	2276	2276	100 %	0.0	99 %
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> stamme	2276	2276	100 %	0.0	99 %
Nb1*(E)					
<i>Bordetella</i> spp.	2418	2418	100 %	0.0	99 %
<i>Bordetella petrii</i> stamme	2401	2401	100 %	0.0	99 %
Nb1*(C)					
<i>Bordetella</i> spp.	2462	2462	100 %	0.0	99 %
<i>Bordetella petrii</i> stamme	2492	2492	100 %	0.0	99 %
<i>Bordetella tumulicola</i> stamme	2420	2420	100 %	0.0	99 %
Nb1 (E)					
<i>Pseudomonas</i> spp.	1400	1400	100 %	0.0	99 %
<i>Pseudomonas resinovorans</i> stamme	1400	1400	100 %	0.0	99 %
VNc1 (E)					
<i>Serratia</i> spp.	2438	2438	100 %	0.0	99 %
<i>Serratia fonticola</i> stamme	2433	2433	100 %	0.0	99 %
VNd1 (E)					
<i>Serratia</i> spp.	2305	2305	100 %	0.0	100 %
<i>Serratia fonticola</i> stamme	2294	2294	100 %	0.0	99 %

⁷ Maks score er summen av alle alignmentene for alle seksjonene i databasetreffet (NCBI 2006).

⁸ Total score angir om det er en bestemt seksjon eller flere seksjoner som overlapper i kontig-sekvensene og databasetreffet (NCBI 2006).

⁹ Query cover indikerer hvor stor andel av kontig-sekvensene som har blitt sammenlignet med homologe sekvenser i databasen (NCBI 2006).

¹⁰ E-verdi eller «expectation-value» bestemmer den statistiske signifikansen til databasetreffet ved å estimere sannsynligheten for at treffet i databasen var tilfeldig (NCBI 2006).

¹¹ Identitets-score angir prosentvis i hvilken grad de to nukleotidssekvensene som blir sammenlignet er homologe med hensyn på plassering av nukleotider/baser (NCBI 2006).

Vedlegg E

Tabell E.1 Oversikt over jordprøvene som ble renset med GenElute™ Soil DNA Isolation Kit for å ekstrahere DNA direkte fra jord. Understrekte prøver viser de som ble diskutert i masteroppgaven, som ble fordelt ut i fra resultatene fra mikrobiotasekvensering.

Sted	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
Niagara A	<u>NA1</u>	<u>NA2</u>	NA3
Niagara B	<u>NB1</u>	NB2	<u>NB3</u>
Niagara C	NC1	NC2	NC3
Niagara D	ND1	ND2	ND3
Andedammen A	AA1	AA2	AA3
Andedammen B	AB1	AB2	AB3
Andedammen C	AC1	AC2	AC3
Andedammen D	AD1	AD2	AD3
Andedammen E	AE1	AE2	AE3
Veterinærjordet A	VA1	VA2	VA3
Veterinærjordet B	VB1	VB2	VB3
Veterinærjordet (nord) C	VNC1	VNC2	<u>VNC3</u>
Veterinærjordet (nord) D	<u>VND1</u>	VND2	<u>VND3</u>

Tabell E.2 DNA-konsentrasjon i DNA-templat ekstrahert direkte fra jord, målt med UV-lys (NanoDrop).

Prøve	DNA-konsentrasjon (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
Veterinærjordet			
VA1	8,8	2,43	0,04
VA2	11,1	2,02	0,12
VA3	13,8	2,54	0,02
VB1	11,2	2,03	0,05
VB2	17,2	1,69	0,07
VB3	6,4	2,53	0,03
Veterinærjordet (nord)			
VNC1	10,4	1,96	0,06
VNC2	11,8	1,82	0,14
VNC3	5,8	2,15	0,11
VND1	16,5	1,56	0,09
VND2	5,8	2,83	0,02
VND3	7,7	1,89	0,03
Niagara			
NA1	6,5	1,87	0,06
NA2	2,1	1,98	0,09
NA3	5,7	1,65	0,09
NB1	5,7	1,97	0,02
NB2	2,3	1,38	0,08
NB3	1,7	2,11	0,04
NC1	1,7	1,50	0,07
NC2	13,5	2,55	0,10
NC3	6,6	1,33	0,10
ND1	7,0	1,57	0,04
ND2	3,1	1,80	0,08
ND3	8,2	1,62	0,07
Andedammen			
AA1	23,7	1,46	0,14
AA2	19,1	1,49	0,12
AA3	12,1	1,73	0,03
AB1	13,6	1,77	0,03
AB2	2,1	6,15	0,01
AB3	3,1	1,93	0,04
AC1	3,2	1,43	0,16
AC2	2,1	-	0,00
AC3	2,5	2,27	0,06
AD1	2,8	2,83	0,01
AD2	11,9	1,76	0,21
AD3	13,5	1,64	0,07
AE1	6,7	1,95	0,04
AE2	13,6	1,63	0,21
AE3	16,8	1,56	0,28

Tabell E.3 DNA konsentrasjon i et utvalg DNA-templat ekstrahert direkte fra jord, målt med fluorometer (Qubit®).

Prøve	Qubit® BR (ng/μl)	Qubit® HS (ng/μl)
Veterinærjordet (nord)		
VNC2	< 0,001 *	0,21
VND1	2,13	0,19
VND3	< 0,001 *	
Veterinærjordet		
VB2	< 0,001*	1,26
Niagara		
NA1	2,27	
NC2	3,99	
ND2	2,59	
ND3	3,89	
Andedammen		
AA2	2, 84	
AB1	1,59	0,54
AD2	7,33	
4AE2	3,87	

* Verdier < 0,001 ng/μl er under grenseverdien for instrumentet.

Tabell E.4 α-diversitet vurdert med Shannon og Chao 1 index.

Sted	Chao 1 index	Shannon index
NA (1)	325	5,5
NA (2)	311	5,5
NB (1)	378	5,7
NB (3)	4	0,7
VNC (3)	11	2,1
VND (1)	266	5,4
VND (3)	258	5,3



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway