



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.
Hovedveileder Bjørn-Arne Lindstedt

Screening for bredspektrede β -laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser i akvatisk nærmiljø.

Screening for bacteria containing broad-spectrum β -lactamases (ESBL and carbapenemases) in aquatic environment by using molecular and phylogenetic investigation methods.

Sissel Solberg

Mastergrad i Matvitenskap.
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

FORORD

Denne masteroppgaven utgjør 30 studiepoeng, og er skrevet som en avsluttende del av mastergradsstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder professor Bjørn-Arne Lindstedt for god hjelp underveis i prosjektet. Takk for muligheten jeg fikk til å jobbe med en spennende oppgave, takk for konstruktive tilbakemeldinger og stor entusiasme. En stor takk også til min biveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie, for gjennomlesninger og konstruktive tilbakemeldinger underveis i skriveprosessen.

Tusen takk til stipendiat Misti Dawn Finton og overingeniør Ahmed Abdelghani for god hjelp og veiledning på laboratoriet, og en takk til ingeniør May Helene Aalberg for god hjelp og hyggelige samtaler på laboratoriet. Laboratoriearbeidet ble utført parallelt med medstudent Hedvig Skaflem. Takk for et hyggelig samarbeid.

En ekstra takk til medstudentene Ruth Kingsrød-Hovden og Ruta Valeckiene. Dere har begge bidratt til å gjøre livet som «voksen» student enklere.

Sist, men ikke minst, en stor takk til familien som har holdt ut med en til tider «fraværende» mor og kone, men nå er Mamma ferdig!

Ås, mai 2018

Sissel Solberg

SAMMENDRAG

Antibiotikaresistens er en naturlig adaptiv prosess som har eksistert i miljøet i årtusener, men resistens kan ha blitt akselerert som følge av økt bruk og forekomst av antibakterielle midler i miljøet, og som følge av medisinsk og landbruksbasert etterspørsel. På grunn av fare for zoonotiske sykdommer er det viktig med økt kunnskap om utbredelse og effekten av antibiotikaresistente patogener i miljøet.

Hensikten med denne oppgaven har vært (i) å undersøke eventuell tilstedeværelse av MRSA og ESBL produserende bakterier i vannprøver fra akvatisk miljø ved NMBU. (ii) Slektskapet til isolater av disse skulle bestemmes ved fenotypiske og genotypiske metoder, samt (iii) mulige resistensmekanismer for disse isolatene. Dette er antibiotikaresistente bakterier av klinisk relevans, og eventuelt funn av disse vil kunne bidra til økt kunnskap om bakterienes opprinnelse, og om hvordan disse resistensgenene kan spre seg i miljøet.

Prøver ble dyrket på ESBL, CRE og MRSA selektive kromogene medier for screening etter bakterier med disse fenotyper. Isolerte prøver ble identifisert ved å benytte 16S rRNA Sanger sekvensering. For å identifisere mulige genotyper fra isolatene ble disse analysert ved å kjøre PCR-multiplexer på noen av de mest utbredte ESBL- og ESBL_{KARBA}- og MRSA-gener. Sanger-sekvensering ble kjørt for verifisering av positive prøver.

Resultatene viste tilstedeværelse av antibiotikaresistensgener i vannprøver fra nærmiljøet. Av totalt 12 rendyrkede vannprøver med vekst, ble ti prøver analysert i denne forskningsoppgaven. I tillegg ble det utført analyser på fire DNA-isolater fra jordprøver isolert av masterstudenter året før. Ved å benytte PCR ble resistensgener fra genfamiliene TEM og CMY-2 påvist i to av vannprøvene, mens VIM gener ble påvist i en av jordprøve. Tilstedeværelse av disse genene ble bekreftet ved Sanger sekvensering. Ved å kjøre 16S rRNA og Sanger sekvensering, ble det isolatene funnet å være *Pseudomonas* spp. og *Escherichia coli* eller *Shigella flexneri*, bakterier som er typisk å finne i akvatisk miljø.

Det kan konkluderes med at: (i) det ble detektert antibiotikaresistens bakterier i vann- og jordprøvene, (ii) slektskapet til isolatene stammet fra bakterier som er vanlige i fuktig miljø og forurenset vann, (iii) ESBL- og CAR- resistensgenene VIM, TEM og CMY-2 som ble funnet, er assosiert med mobile genetiske elementer, noe som gjør at de kan overføres horisontalt til andre bakterier.

Medlemmer av *Enterobacteriaceae* og *Pseudomonadaceae*-familiene inkluderer flere humanpatogener som kan infisere gjennom forurenset mat og vann. Tilstedeværelsen av VIM, TEM og CMY gener som er assosiert med mobile genetiske elementer, og dermed kan overføres horisontalt til andre bakterier, kan i enkelte tilfeller gjøre humanpatogene bakterier multiresistente. At bla_{TEM} og bla_{CMY-2} bærende bakterier av disse familiene finnes i akvatisk miljø i et område med stort potensial for utveksling av bakterier mellom mennesker og dyr er bekymringsfullt.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a naturally adaptive process which has existed for billions of years. This resistance may have been accelerated by increased occurrence and use of antibacterial agents in the environment due to medical and agricultural demand. An increased knowledge about the spread of antibiotic-resistant pathogens in the environment is important due to the risk of zoonotic diseases.

The purpose of this research has been to (i) investigate the presence of MRSA and ESBL producing bacteria in water samples from a little stream at NMBU Campus. (ii) to determine the bacterial genera of these bacteria, and (iii) to search for possible mechanisms of resistance for these isolates. These are antibiotic resistant bacteria of clinical relevance, and any findings may contribute to increased knowledge of the origin of the bacteria and how these resistance genes can spread in the environment.

Samples were grown on ESBL, CRE and MRSA selective chromogenic media for differentiation of bacteria with these phenotypes. The identities of the different isolates were then determined using 16S rRNA Sanger-sequencing method. To establish possible genotypes from the isolates, they were screened by running PCR containing some of the most prevalent ESBLA- and ESBLA_{KARBA}- and MRSA-genes. Sanger-sequencing was run for verification of positive samples.

The results showed the presence of antibiotic resistance genes in the water samples at NMBU Campus. Of a total of 12 rendered water samples with growth, ten samples were analyzed in this research assignment. In addition, analyzes were performed on four DNA isolates from soil samples isolated by master students the previous year. Analyzing the samples by using PCR, resistance genes from the gene families TEM and CMY-2 were detected in two of the water samples, while VIM genes were detected in one of the soil samples. The presence of these genes was confirmed by Sanger sequencing. By running 16S rRNA and Sanger sequencing, the isolates were found to be *Pseudomonas* spp. And *Escherichia coli* or *Shigella flexneri*, bacteria that are typically found in aquatic environments.

From the information obtained in this study, it can be concluded that: (i) antibiotic resistance bacteria were detected in the water and soil samples from the NMBU Campus, (ii) the isolated bacteria are commonly found in humid environment and contaminated water, (iii) the ESBL and CAR resistance genes VIM, TEM and CMY-2 found in this study are associated with mobile genetic elements, which allows them to be transmitted horizontally to other bacteria.

Members of the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* families include several human pathogens that may cause infections through contaminated food and water. The presence of VIM, TEM and CMY genes associated with mobile genetic elements, may be transferred horizontally to other bacteria. This may, in some cases, render human pathogenic bacteria multi resistant. The fact that bla_{VIM}, bla_{TEM} and bla_{CMY-2} carrying bacteria belonging to these families exist in an aquatic environment with great potential for the exchange of bacteria between humans and animals is worrying.

FORKORTELSER

| | |
|------------|--|
| AmpC | Ampicillinase C |
| AMR | Antimikrobiell resistens |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| <i>bla</i> | β -laktamase gener |
| bp | Basepar |
| BR | Broad-range |
| CRE | Carbapenem-resistant <i>Enterobacteriaceae</i> |
| CTX-M | Cefotaxime-Munich (en β -laktamase av gruppe ESBL _A) |
| DNA | Deoksyribonukleinsyre |
| dNTP | Deoksynukleotid |
| ddNTP | Dideoksynukleotid |
| ECDC | European Centre for Disease Prevention and Control |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetra Acetic acid |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| ESBL | Extended spectrum β -laktamase |
| FHI | Folkehelseinstituttet |
| GC | genkasset |
| MDR | Multidrug resistant |
| HGT | Horisontal gene transfer |
| PBP | Penicillin bindende proteiner |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate |
| TAE | Tris-acetat-EDTA |

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|----|
| 1. INNLEDNING | 8 |
| 2. ANTIBIOTIKA | 10 |
| 2.1 HISTORIE | 10 |
| 2.2 ULIKE TYPER..... | 11 |
| 2.2.1 SULFONAMIDER..... | 12 |
| 2.2.2 TETRASYKLINER | 12 |
| 2.2.3 B-LAKTAMER..... | 12 |
| 3. ANTIBIOTIKARESISTENS..... | 13 |
| 3.1 Grunnlaget for resistens..... | 14 |
| 3.2 Ulike mekanismer for antibiotikaresistens..... | 14 |
| 3.2.1 Endring eller erstatning av målsetet. | 14 |
| 3.2.2 Redusert opptak av antibiotikumet. | 14 |
| 3.2.3 Aktive efflux (utpumping) pumper..... | 15 |
| 3.2.4 Enzymatisk degradering. | 15 |
| 3.2.5 β -laktamaser..... | 15 |
| 3.2.6 MRSA | 16 |
| 3.3 Ulike mekanismer for overføring av genetiske elementer..... | 18 |
| 3.3.1 Transduksjon | 18 |
| 3.3.2 Transformasjon | 19 |
| 3.3.3 Konjugasjon | 19 |
| 3.4 Ulike mobile genetiske elementer | 19 |
| 3.4.1 Plasmider..... | 19 |
| 3.4.2 Transposoner..... | 20 |
| 3.4.3 Integroner..... | 20 |
| 4. METODISK TEORI | 20 |
| 4.1 Litteratursøk / Kunnskapsgrunnlag | 20 |
| 4.2 ESBL og CRE screening..... | 21 |
| 4.3 MRSA screening..... | 21 |
| 4.4 Oppdyrking av bakterieprøver. | 21 |
| 4.5 Ekstrahering av genomisk DNA | 22 |
| 4.6 Kvantifisering /kvalitetsbestemmelse av DNA | 22 |
| 4.7 PCR..... | 23 |
| 4.7.1 Singleplex og multiplex PCR | 23 |
| 4.7.2 16S rRNA PCR | 23 |
| 4.8 AGAROSE GELKJØRING | 23 |

| | |
|--|----|
| 4.9 Rensing av PCR produkt..... | 24 |
| 4.10 Sekvensering..... | 24 |
| 4.10.1 Sanger sekvensering..... | 24 |
| 4.10.2 Rensing av ekstensjonsprodukt og kjøring av sekvensgel..... | 25 |
| 5. MATERIALER OG METODER..... | 25 |
| 5.1 Innsamling av prøver..... | 25 |
| 5.2 Oppdyrking og screening av bakterier..... | 26 |
| 5.2.1 ESBL og CRE screening..... | 26 |
| 5.2.2 MRSA screening..... | 26 |
| 5.2.3 Oppdyrking av bakterieprøver..... | 27 |
| 5.2.4 Nedfrysing av bakterier for langtidsoppevaring..... | 27 |
| 5.3 Ekstrahering av genomisk DNA..... | 27 |
| 5.4 Flytskjema fra prøveinnsamling til kvantifisert DNA..... | 28 |
| 5.5 Kvantifisering /kvalitetsbestemmelse av DNA..... | 28 |
| 5.5.1 NanoDrop..... | 28 |
| 5.5.2 QUBIT..... | 28 |
| 5.6 Flytdiagram over DNA analyser..... | 29 |
| 5.7 PCR..... | 29 |
| 5.7.1 16S rRNA PCR..... | 29 |
| 5.7.2 MULTIPLEX OG SINGLEPLEX PCR..... | 30 |
| 5.7.3 MRSA PCR..... | 31 |
| 5.8 AGAROSE GELKJØRING..... | 32 |
| 5.9 Rensing av PCR-produkt..... | 33 |
| 6. RESULTATER..... | 34 |
| 6.1 Fenotypisk deteksjon av antibiotikaresistente bakterieisolater fra selektive skåler..... | 34 |
| 6.2 Isolering av genomisk DNA..... | 35 |
| 6.3 Kvalitetsbestemmelse og kvantifisering av DNA..... | 36 |
| 6.4 PCR multi- og singleplex og visualisering ved agarose gelkjøringer..... | 36 |
| 6.5 PCR og sekvensering av 16S rRNA..... | 38 |
| 6.6 Sekvensering single- og multiplex PCR..... | 38 |
| 7. DISKUSJON..... | 40 |
| 7.1 Fenotypisk deteksjon ved bruk av selektive skåler..... | 40 |
| 7.2 MRSA PCR..... | 40 |
| 7.3 PCR og sekvensering av jordprøver..... | 41 |
| 7.4 PCR og sekvensering av vannprøver..... | 42 |
| 7.5 Forslag til videre forskning..... | 44 |

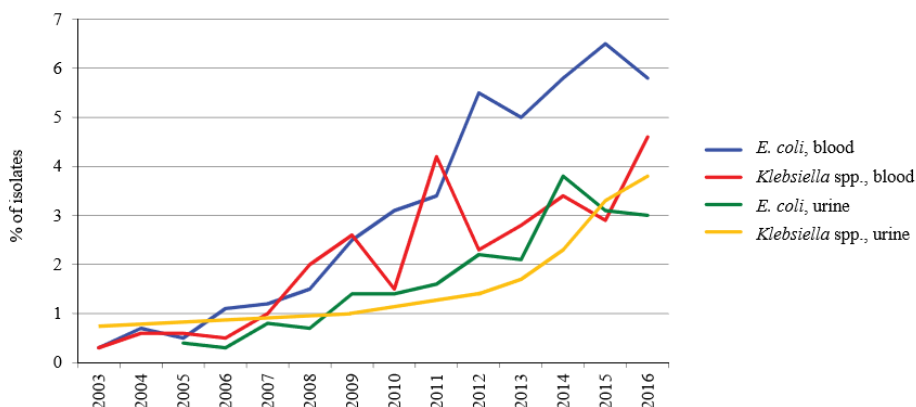
| | |
|---------------------|----|
| 8. KONKLUSJON | 45 |
| 9. REFERANSER | 46 |
| VEDLEGG..... | 50 |
| Vedlegg A..... | 50 |
| Vedlegg B..... | 52 |
| Vedlegg C..... | 60 |

1. INNLEDNING

Antibiotikaresistens er et naturlig fenomen som har eksistert i bakterier i miljøet i årtusener. Vi har en tendens til å glemme det faktum at bakterier har bebodd denne kloden i rundt 3,5 milliarder år, og at de i løpet av denne perioden har vært nødt til å tilpasse seg endringer i omgivelsene. Bakteriene har blitt flinke til å håndtere stoffer som truer deres overlevelse, og for dem utgjør antibiotika en ny truende seleksjonsfaktor som plutselig blir introdusert i deres omgivelser. Faktisk har de fleste antibiotika som brukes i dag sin opprinnelse i antibakterielle forbindelser produsert av andre mikrober som våpen for å beskytte sine territorier. Det faktum at bakterier ikke bare har overlevd, men også tilpasset seg, og kolonisert store deler av kloden sier noe om bakterienes tilpasningsevne. Dette vitner om at bakteriene har klart å utvikle effektive strategier for modifisering av DNA, noe som igjen letter prosessen med bakterienes tilpasning og dermed også bakterienes evolusjon.

Hensikten med denne oppgaven har vært (i) å undersøke eventuell tilstedeværelse av MRSA og ESBL produserende bakterier fra vannprøver i nærmiljøet. (ii) Slektskapet til isolater av disse skulle bestemmes ved genotypiske metoder, samt (iii) mulige resistensmekanismer for disse isolatene. Dette er antibiotikaresistente bakterier av klinisk relevans, og eventuelt funn av disse vil kunne bidra til økt kunnskap om bakterienes opprinnelse, og om hvordan disse resistens-genene kan spre seg i miljøet.

Antimikrobiell resistens (AMR) er en mikroorganismes (eks. bakterier, virus og noen parasitter) evne til å hindre et antimikrobielt middel fra å virke på det. Som et resultat av denne resistensen, blir standard behandlinger av infeksjoner ineffektive, infeksjoner vedvarer, og de kan også spre seg til andre personer. Vi ser nå en rask fremvekst av antibiotikaresistente bakterier i samtlige deler av verden (WHO, 2018), og dette vil kunne true de helsemessige forhold oppnådd gjennom bruken av antibiotika, spesielt gjelder dette spredning av multiresistente bakterier, da behandlingsalternativer blir veldig begrenset. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC, slår fast at det i flere europeiske land fortsatt er en høy forekomst av antibiotikaresistente bakterier (EARS, 2017). Det er store geografiske variasjoner, og i Norge er dette foreløpig et avgrenset problem, men NORM-VET, Veterinærinstituttets overvåkingsprogram for antibiotikaresistens, peker på at det også her til lands har det vært en stabil økning av antall meldte tilfeller av både meticillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin resistente enterokokker (VRE) og bakterier med utvidet (extended) spektrum betalaktamaser (ESBL)(NORM-VET, 2016). Figur 1 nedenfor viser Utbredelse av ESBL produserende *E.coli* og *Klebsiella* spp. isolater fra blod og urin i Norge gjennom de 13 siste årene.

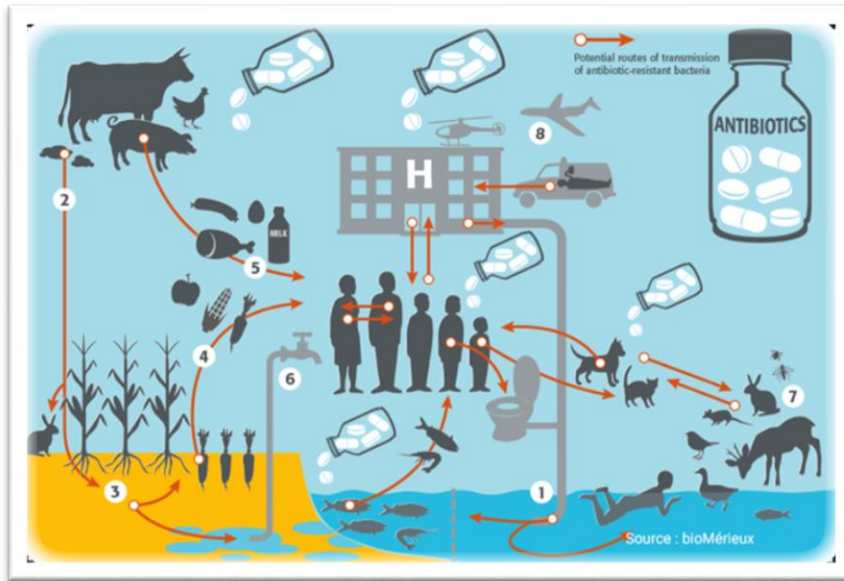


Figur 1: Utbredelse av ESBL produserende *E.coli* og *Klebsiella* spp. isolater fra blod og urin. (NORM-VET 2016).

Forbruket av antibiotika innen human medisin har i flere land vært betraktet som en viktig faktor når det gjelder bidrag til økt resistens (Davies, J. et al. 2010). Det pekes spesielt på feil bruk, overforbruk samt bruken av antibiotika i land med svak regulering. Flere av de antibakterielle stoffene brukt ved behandling av mennesker eller husdyr skilles ut i aktiv form gjennom urin og avføring. Ulike miljømessige faktorer viser seg imidlertid også å bidra til økning av antibiotikaresistens. Forskning viser at faktorer som utslipp av biocider, antibiotika og resistente bakterier i miljøet også er viktige faktorer. Det pekes også på bruken av antibiotika i landbruket, og akkumulering av resistente bakterier og antibiotika i avløpsvann når det gjelder bidrag til økt resistens. Direkte overføring av resistente gener fra dyr til mennesker nevnes også som miljømessig faktor. Oppstått resistens kan videre overføres mellom ulike bakteriearter, og deretter spres videre rundt om i verden (Pruden, A. et al. 2013).

Undersøkelser viser at det har vært en økning av antibiotikaresistente jordbakterier siden produksjon av antibiotika startet opp på 1940-tallet og frem til i dag (Knapp, C.W. et al. 2010). Det pekes på to årsaker til dette; for det første vil bakterier i miljøet, ved eksponering for naturlig tilstedeværelse av antibiotika, utvikle resistens. Når bakterier i tillegg utsettes for antibiotikum i forbindelse med f.eks. infeksjonsbehandlinger, vil denne andelen av resistens øke. I tillegg pekes det på det faktum at både antibiotikum og antibiotikaresistente bakterier som skilles ut fra mennesker og dyr havner direkte i jord og akvatiske miljøer som overflatevann og marine områder. Herfra kan resistens i miljøet spres videre (Knapp, W.C. et al. 2010).

Figur 2 nedenfor viser et forenklet sammendrag av de komplekse veiene som er involvert i spredningen av resistens i miljøet.



Figur 2. Koblinger mellom ulike kilder for resistens. (https://www.antimicrobial-resistance.biomerieux.com/wp-content/uploads/2015/10/Illustration_Chap1-1e.png)

Når det gjelder utvikling og spredning av antibiotikaresistens, er det viktig å se på betydningen av det totale økosystemet. Det er per i dag begrenset kunnskap om hvordan utvikling av resistens påvirkes av miljøet. Tidligere ble det antatt at resistensutvikling primært gikk fra et menneskeskapt miljø til et naturlig miljø. Nyere forskning viser imidlertid at et naturlig miljø også kan bidra til resistensutvikling (National strategi mot ab res. 2010-2015). Det er nå en bred enighet om at tilstedeværelse av antibiotikaresistente bakterier og relaterte resistensgener i miljøet spiller en viktig rolle når det kommer til spredning av antibiotikaresistens. Flere resistensgener assosiert med humane sykdommer har sin opprinnelse i miljøet (Waseem, H. et al.2017). Spredning av antibiotikaresistens er et sammensattproblem, og økosystemet i sin helhet har i de senere år fått større grad av oppmerksomhet.

2. ANTIBIOTIKA

2.1 HISTORIE

De store mikrobiologene Louis Pasteur (1822 – 1895) og Robert Koch (1843 – 1910) hadde begge en klar oppfatning av at mikrober, for å kunne beskytte seg, måtte ha evnen til å danne livstruende våpen, såkalte «antibiosis», mot andre konkurrerende mikrober for å kunne overleve. De mikroberne som overlevde konkurransen, hadde på en eller annen måte klart å ufarliggjøre motpartens «våpen», det ville si at de hadde utviklet «resistens» (Yazdankhan, S. et al. 2013).

Den britiske forskeren Alexander Flemming oppdaget i 1928 penicillin, da han la merke til at muggsoppen *Penicillin notatum* viste seg å lysere og hemme stafylokokker. Penicillinet interfererer med cellevegg-syntesen, primært i Gram-positive bakterier. Penicillin ble først benyttet terapeutisk i 1941, med god effekt. Tre år senere oppdaget de amerikanske forskerne Albert Schatz og Selman Waksman antibiotikumet streptomycin fra bakterien *Streptomyces griseus*. Streptomycinet interfererer med proteinsyntesen i både Gram-positive og Gram-negative bakterier. Oppdagelsen av streptomycin ble veldig viktig, da dette viste seg å være det første antibiotikumet som hadde effekt på tuberkulose (Madsen, E.L. 2008). I 1942 definerte Waksman antibiotika som «et stoff produsert av mikroorganismer som selv i lave konsentrasjoner dreper eller hemmer vekst av andre mikroorganismer». Samtidig med at man lette etter nye antibiotikum, startet også utviklingen av

syntetisk fremstilte stoffer, såkalt kjemoterapeutika, med samme egenskap som antibiotika. I dag inkluderer definisjonen av antibiotika også antimikrobielle stoffer som industrien fremstiller hel- eller halvsyntetisk, og de klassifiseres etter anvendelse, ikke etter deres opprinnelse (Yazdankhan, S. et al 2013).

Oppdagelsen av penicillin og klinisk anvendelse av antibiotika var et revolusjonerende fremskritt innen human medisin da dette ble tatt i bruk for over 70 år siden. Behandling med antibiotika kan sies å være selve grunnsteinen innen moderne medisin. Uten effektive metoder for å hemme bakterielle infeksjoner, ville mange av dagens moderne medisinske behandlinger vært veldig risikofylte, ofte også med høy dødelighet som følge av bakterieinfeksjoner.

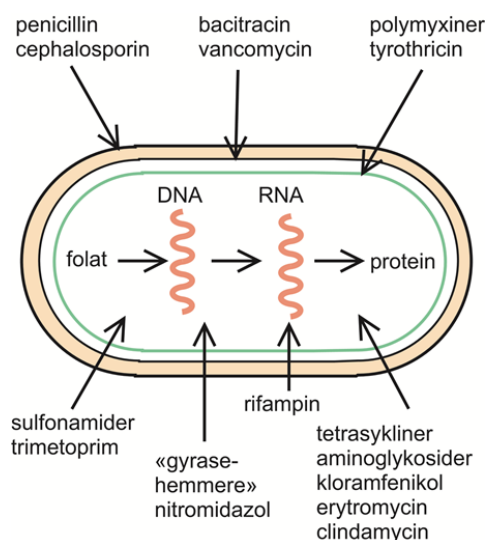
2.2 ULIKE TYPER

For at et antibiotikum skal kunne brukes, må det være i stand til å skade eller drepe bakterieceller (prokaryote celler) uten at det i alt for stor grad skader menneske- eller dyreceller (eukaryote celler). Stoffet må derfor virke på ulike elementer eller prosesser i bakterier som enten mangler, eller som er svært forskjellige fra de man finner hos eukaryote celler.

Det finnes i dag mange ulike typer antibiotikum, og de blir kategorisert som bakteriside eller bakteriostatiske agents avhengig av virkemåte. Bakteriside antibiotikum dreper bakteriene, og disse typene angriper vanligvis viktige cellestrukturer og aktiviteter, som eksempelvis biosyntesen av cellevegg eller DNA. Bakteriostatiske antibiotika hindrer vekst og reproduksjon av bakteriene uten at bakteriene drepes, og disse interfererer vanligvis med protein-syntesen i cellen, og på denne måten hemmes spredning av bakterieceller (Doyle, M.P. 2013).

Antibiotikum klassifiseres etter kjemisk struktur og etter hvordan de virker på bakterien. Eksempelvis virker penicillin på bakteriens cellevegg. Det samme gjør også cefalosporiner som vancomycin, mens eksempelvis tetrasykliner virker ved å hemme bakterienes proteinsyntese. Andre typer antibiotikum som kinoloner virker på bakteriens arvemateriale. Det skilles også mellom smalspektret antibiotikum som er effektive på et fåtall bakterier, og bredspektret antibiotikum, som har stor terapeutisk bredde.

Figur 3 nedenfor viser oversikt over de ulike målområder på bakterien for ulike typer antibiotikum.



Figur 3. Oversikt over ulike typer antibiotikums målområder på bakteriene.

(https://media.snl.no/system/images/40802/standard_3_antibiotika.png)

2.2.1 SULFONAMIDER

Sulfonamidene regnes for å være de første moderne antibiotiske midlene. Disse legemidlene inneholder en svovelholdig organisk forbindelse (sulfonamid-gruppe), og virker bakteriedrepende ved å hemme bakterienes folsyresyntese som er en nødvendig faktor i dannelsen av bakterienes nukleinsyrer. Sulfonamidene ble introdusert og mye benyttet på 30-tallet, med stor suksess. Etter hvert utviklet mikroorganismene resistens mot sulfonamider, og andre typer antibiotikum som penicillin erstattet bruken av sulfonamidene ved behandling av bakteriell infeksjon. I dag benyttes sulfonamidene primært ved behandling av urinveisinfeksjoner, og da i kombinasjon med andre antibiotikum (Snl.no).

2.2.2 TETRASYKLINER

Tetrasykliner er en gruppe bredspektret antibiotika som virker bakteriehemmende ved å hemme bakteriens proteinsyntese. I denne gruppen finner vi blant annet oxazolidinoner, og disse hemmer proteinsyntesen i bakterier ved å binde seg til bakterienes ribosomer. Denne gruppen antibiotikum er aktive mot både Gram-positive og Gram-negative bakterier, og lave kostnader ved produksjon gjør at tetrasykliner fortsatt benyttes i betydelig grad, spesielt i utviklingsland (Yazdankhan, S. et al 2013).

2.2.3 B-LAKTAMER

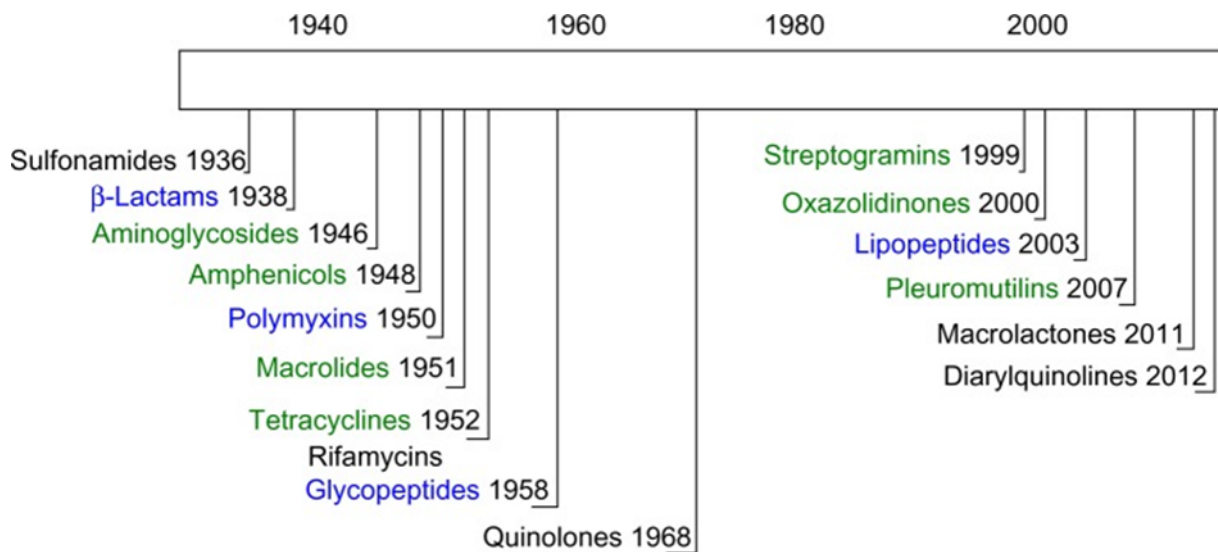
En av de vanligste typene antibiotika er β -laktamer, og antibiotikum tilhørende denne gruppen har en β -laktam-ring i sin struktur. Innen denne gruppen finner vi eksempelvis penicilliner, karbapenemer og cephalosporiner. Penicillinene er spesielt effektive mot Gram-positive, aerobe bakterier som stafylokokker og streptokokker. Mer bredspektret β -laktamer som ampicillin og amoksisillin ble utviklet på 60- og 70- tallet, og disse virket mot både Gram-positive og Gram-negative bakterier (Yazdankhan, S. et al 2013).

β -laktamers virkningsmekanisme går primært ut på å hemme syntetisering av bakteriens cellevegg ved at de bindes til penicillinbindende proteiner (PBP). Disse proteinene er viktige for strukturen av peptidoglykan i celleveggen hos prokaryoter. Hemming her vil resultere i svak cellevegg, og til slutt lysing av cellen. Forskjellige bakterier har ulike PBP, og dette forklarer de ulike β -laktamenes antibakterielle spektrum (Kohanski et al. 2010). Enkelte β -laktam antibiotika har i tillegg andre virkemåter, som eksempelvis gruppen **cephalosporiner**. Denne gruppen antibiotika kan trigge autolytiske enzymer i celleveggen, og på denne måten forårsake lysing av cellene (Kohanski et al. 2010). Det skilles gjerne mellom ulike generasjoner, 1. – 4. generasjon cephalosporiner basert på ulike sidekjeder på molekylet, og dermed ulik antibakteriell virkning (Farrington, M. 2012).

Gruppen **karbapenemer** inneholder virkestoffet karbapenem i tillegg til β -laktamringen, noe som gjør denne gruppen ekstra stabile mot β -laktamaser, enzymene som bryter ned β -laktamer (Doyle, M.P. 2013). β -laktamene deles inn i de fire hovedklassene penicilliner, cefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer. Disse klassene deles videre inn i ulike undergrupper basert på deres antimikrobielle aktivitet (Doyle, M.P. 2013).

Perioden fra slutten av 30-tallet og frem til midten av 60- tallet betegnes ofte som antibiotikum sin gullalder, og etter 1987 er det ikke oppdaget noe antibiotikum med nye virkningsmekanismer. Mesteparten av antibiotikum som benyttes i dag tilhører ulike grupper som ble oppdaget før 70-tallet (Yazdankhan, S. et al 2013).

Figur 4 nedenfor viser tidslinjen for utvikling av ulike typer antibiotikum.



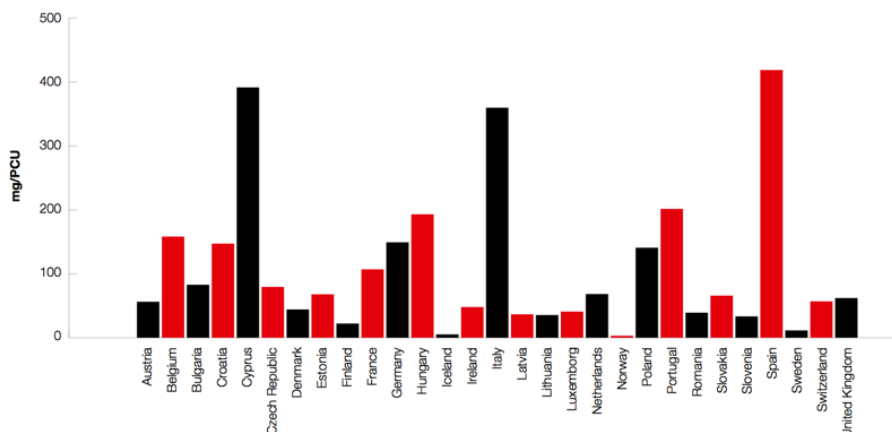
Figur 4: Tidslinje over introduksjon av de ulike klasser antibiotikum. Merk: **Klasser som retter seg mot cellevegg eller membran er markert med blått**, mens **klasser som retter seg mot cellens ribosomer er markert med grønt**. (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159373/)

3. ANTIBIOTIKARESISTENS

Antibiotikaresistens har av Verdens helseorganisasjon, WHO, blitt definert som en av de største globale helseutfordringer. En bakteriestamme betegnes som resistent når en gitt konsentrasjon av et antibiotikum som normalt sett ville inhibere bakterien, ikke har noen effekt. Dette gjøres ved å definere den minste inhibitoriske konsentrasjonen – MIC. Dette er den laveste konsentrasjonen (gitt i mg/L) av et antibakterielt middel som trengs for å hemme bakteriell vekst (Iredell, J. et al. 2015). Ulike MIC-verdier for ulike stoffer og ulike bakterie-kombinasjoner er fastsatt av European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), og brukes som standard i de fleste europeiske land (Leclercq, R. et al. 2013).

Resistens mot antibiotika er ikke noe nytt. Fleming advarte mot penicillin-resistens allerede i 1945 da han mottok Nobelprisen i medisin. Dersom Fleming, Schatz og Waksman hadde levd i dag, ville de nok ha blitt rystet av de tonnevis med mengder av antibiotika som i dag produseres og spres globalt. Bruken av antibiotika har ekspandert fra å bli benyttet i terapeutisk behandling, til profylaktisk sykdomsbekjempelse, til også å promotere rask vekst av dyr ved storskala dyreproduksjon (Madsen, E. 2008). Forskning viser direkte korrelasjon mellom bruken av antibiotika og fremvekst av bakterier som er resistente mot disse midlene (Chantziaras, I. et al 2014).

Figur nummer 5 nedenfor viser salg av veterinær antibiotika til matproduserende dyr i Europa fra 2014.



Figur 5: Salg av veterinær antibiotika til matproduserende dyr i Europa i 2014, oppgitt i mg/PCU (populasjons korrigerende enhet). (EMA 6th ESWAC report. <http://www.ema.europa.eu/ema/>)

3.1 Grunnlaget for resistens.

Bakterier som overlever behandling med antibiotika, vil få avkom med samme overlevelsesmekanisme mot det aktuelle antibiotikum, og på denne måten vil antibiotika virke som et seleksjonsmiddel. Det er flere ulike måter bakterier kan oppnå resistente mot forskjellige typer antibiotikum. Resistensen kan skyldes genetiske og strukturelle endringer, eller temporære metabolske endringer.

Det skilles mellom bakterier som er blitt naturlig resistente, og de som har ervervet resistens. Naturlig resistente bakterier er motstandsdyktige mot antibiotika fordi de mangler strukturer eller egenskaper som antibiotikumet angriper. Denne resistensen skyldes genetiske endringer som kan overføres til avkom ved vertikal overføring- VGT. Ervervet resistens kan oppstå på flere måter, og ofte som en respons på bruk av antibiotika. Ervervet resistens oppstår ved forandringer i arvestoffet som følge av mutasjoner eller opptak av nytt arvestoff fra andre bakterier, såkalt horisontal genoverføring-HGT (horizontal gene transmission) (Doyle, M.P. 2013).

3.2 Ulike mekanismer for antibiotikaresistens.

Det finnes ulike mekanismer for utviklingen av antibiotikaresistens, og disse deles ofte inn i fire ulike grupper: i) endring eller erstatning av det aktive stoffets målsete, ii) redusert opptak av antibiotikumet, iii) aktive efflux pumper, og iv) enzymatisk degradering av det aktive stoffet i antibiotikumet.

3.2.1 Endring eller erstatning av målsetet.

Endringer i antibiotikumets mål molekyl resulterer i at antibiotikumet ikke lenger kan binde seg til setet, og dermed hemmes effekten. Endringer eller modifiseringer av målsetet kan skje ved mutasjon av bakteriens genom, eller ved opptak av nye gener (Spratt, B.G. et al. 1999).

3.2.2 Redusert opptak av antibiotikumet.

Redusert opptak av antibiotikum kan skje hos noen Gram-negative bakterier, da cellenes yttermembran inneholder hydrofile porer kalt poriner. Bakterier som har evnen til å kunne regulere mengde poriner kan benytte dette som beskyttelse mot antibiotika. Tap av poriner vil resultere i redusert permeabilitet, og på den måten hindre penetrasjon av antibiotika inn i bakteriecellen.

3.2.3 Aktive efflux (utpumping) pumper.

Efflux pumper er transport-proteiner som er involvert i utpumping av toksiske stoffer over cellemembranen. Dette skjer via gener uttrykt på plasmid eller kromosom. Disse pumpene finnes både hos Gram-positive og Gram-negative celler, men oppbygningen er mer kompleks i de Gram-negative på grunn av forskjeller i membranstrukturen mellom disse celletypene (Webber, M.A: et al. 2003). Disse pumpene kan være spesifikke mot ett substrat, men de er ofte assosiert med multiresistens (MDR), da mange også transporterer en rekke strukturelt ulike forbindelser, inkludert antibiotikum fra flere ulike klasser. Slike ulike resistenspumper vil igjen kunne gi passende resistensrespons under ulike miljøpåvirkninger, og dette systemet for aktiv utpumping av antibiotikum spiller derfor en viktig rolle ved ervervet multiresistens. Efflux systemer som er kapable til å transportere antibiotika ut av celler er også ofte koblet sammen med andre resistensmekanismer (Fernandez, L. et al. 2012). Man antar at uspesifikke pumper vil kunne få økt betydning som resistensmekanisme, spesielt gjelder dette i kliniske miljøer, etter hvert som ulike typer antibiotika blir fremstilt for å overvinne spesifikke resistensmekanismer (Heir, E. et al. 2001).

3.2.4 Enzymatisk degradering.

Bakteriene produserer enzymer som enten bryter ned eller modifierer antibiotikumet, og på denne måten oppnår bakterien resistens. Slik enzymatisk degradering finner sted hos bakterier som har evnen til å produsere hydrolytiske enzymer. Det finnes mange hundre forskjellige enzymer, og nedenfor nevnes noen klasser og enzymer som er aktuelle i denne oppgaven.

3.2.5 β -laktamaser

β -laktamaser er bakterielle enzymer som inaktiverer β -laktam antibiotikum ved å hydrolysere β -laktamringen. Som en følge av dette mister antibiotikumet evnen til å binde seg til det aktive PBP området. β -laktamasene utgjør en stor gruppe av enzymer, og de kan produseres både av Gram-positive og Gram-negative bakterier. Gener som koder for disse enzymene kalles for *bla*, og disse genene er ofte plassert enten på plasmider eller på ekstrakromosomale mobile genelementer. Som følge av dette kan derfor disse genene enkelt overføres mellom ulike bakterier. β -laktamaser klassifiseres som smalspektret (eks. penicillinaser), bredspektret (eks. ampicillinaser), utvidet (extended)-spektrum β -laktamaser (ESBL'er) og karbapenemaser, avhengig av virkningsmåte.

ESBL'er klassifiseres på ulike måter, og i denne oppgaven har klassifiseringen til Giske (Giske, C. et al. 2009) blitt benyttet. Her kategoriseres ESBL'ene i tre klasser: ESBL_A, ESBL_M and ESBL_{CARBA}. Disse har forskjellig virkningsmåte og ulik effektivitet på β -laktam antibiotika.

Undergruppen ESBL_A inneholder de klassiske ekstended-spektrum β -laktamasene som tidligere ble betegnet ESBL. Denne undergruppen kjennetegnes ved at de har hydrolytisk aktivitet mot penicilliner og cefalosporiner, og de hemmes av β -laktamase-inhibitorer som klavulansyre. Dette er en stor klasse, hvor vi blant annet finner enzymene CTX-M, TEM og SHV. Allerede i 1965 ble den første β -laktamasen beskrevet. Denne var isolert fra en gresk pasient med navn Temoniera, og dermed ble denne β -laktamasen kalt TEM₋₁. I dag er det beskrevet over 900 ESBL varianter, og over 200 TEM varianter. CTX-M'ene utgjør den største gruppen av ESBL'er, og det første enzymet ble isolert i 1989 i Munchen. Dette enzymet hydrolyserer cefotaxime, og derav navnet CTX-M (Iredell, J. et al. 2015). I dag finnes det over 123 CTX-M varianter (Canton, R. et al. 2012).

I ESBL_M klassen (M for miscellaneous) finner vi plasmid-mediert AmpC og OXA-ESBL'er. Denne klassen deles videre inn i ESBL_C med AmpC, og ESBL_D med OXA-ESBL'er.

ESBL_{CARBA} klassen inneholder karbapenemaser, enzymer med hydrolytisk aktivitet mot karbapenem-antibiotika. Flere av karbapenemasene inaktiverer alle β -laktam gruppene. Genene som koder for disse enzymene finnes ofte på mobile genetiske elementer som plasmider og transposoner, og overføres dermed enkelt til andre bakterier. Karbapenemasene er dessuten ofte også forbundet med resistensgener mot andre viktige antibiotikum, og infeksjoner forårsaket av Karbapenem-Resistente *Enterobacteriaceae* (CRE) er nå blitt en global utfordring (Codjoe, F. et al 2018). Når det kommer til effektiv geografisk spredning og hydrolyse av karbapenem, så utgjør KPC, VIM, IMP, NDM og OXA-48-varianter de viktigste typene (Poirel, L. et al 2012). ESBL_{CARBA} klassen deles videre inn i tre underklasser; ESBL_{CARBA-A}, ESBL_{CARBA-B} and ESBL_{CARBA-D}. Forekomsten og spredning av karbapenemaser er blitt et betydelig globalt helseproblem, da de inaktiverer en betydelig antibiotikaklasse.

Figur 6 nedenfor gir en forenklet oversikt over de ulike ESBL-klassene, med enzymer fra de ulike klassene som ble benyttet i denne oppgaven.

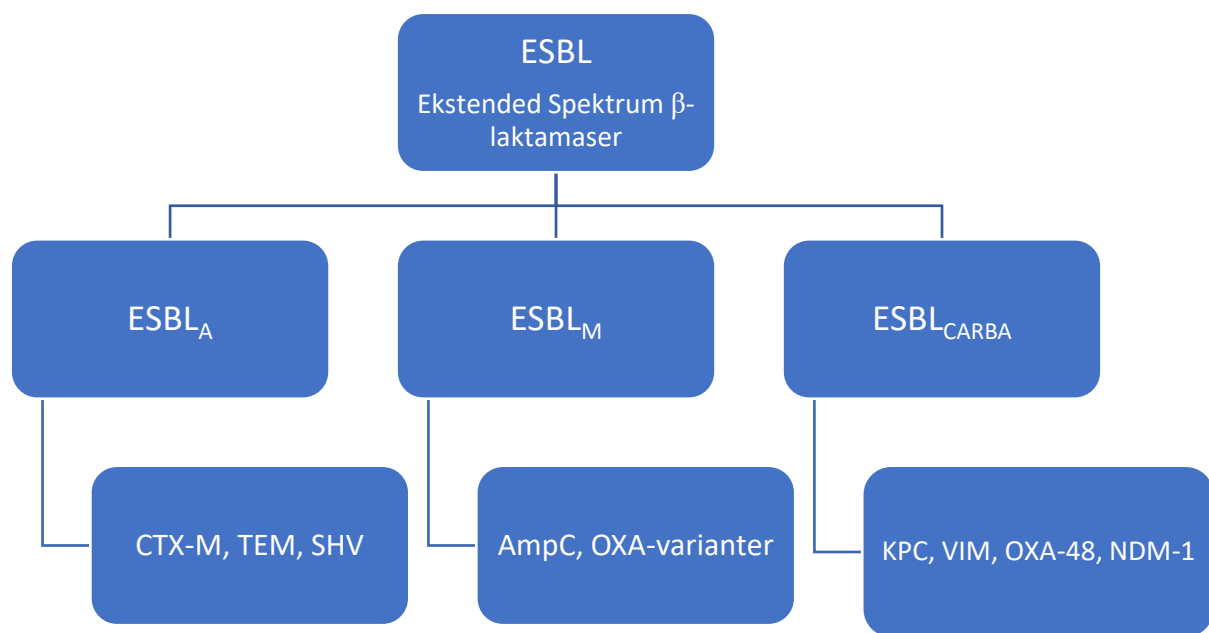


Fig. 6: En forenklet oversikt over de ulike ESBL-klassene.

I denne oppgaven ble det analysert for tilstedeværelse av de 12 ulike enzymgrupper notert i figuren over. Disse enzymgruppene er assosiert med utbredelse, enten i klinisk eller i naturlig miljø, og disse er derfor av spesiell interesse i oppgaven.

3.2.6 MRSA

Methicillinresistente gule stafylokokker, MRSA, er navnet på bakterier av arten *Staphylococcus aureus* som i dag er resistente mot de fleste β -laktamer. *Staphylococcus aureus* resistens mot penicillin dukket opp rundt ett år etter at penicillin ble tatt i bruk, og rundt 10 år senere var denne resistensen spredt over hele verden. Enzymet penicillinase bryter ned virkestoffet penicillin, og gjør dette inaktivt. Som følge av dette, ble virkestoffet kjemisk endret. Det første av disse endrede penicillinene var methicillin. Denne penicillin-varianten var effektiv mot de gule stafylokokkene kun i en kort periode. Allerede ett år etter at methicillin ble tatt i bruk ble de første tilfeller av resistens rapportert. MRSA spredte seg raskt, og har vært epidemiske i Europa siden 70-tallet (Green, B. et al 2012). Selv om methicillin ikke lenger benyttes, har navnet MRSA vedvart, og kan betraktes som å referere til motstand mot nesten alle β -laktam antibiotikum (Paterson, G. et al. 2014).

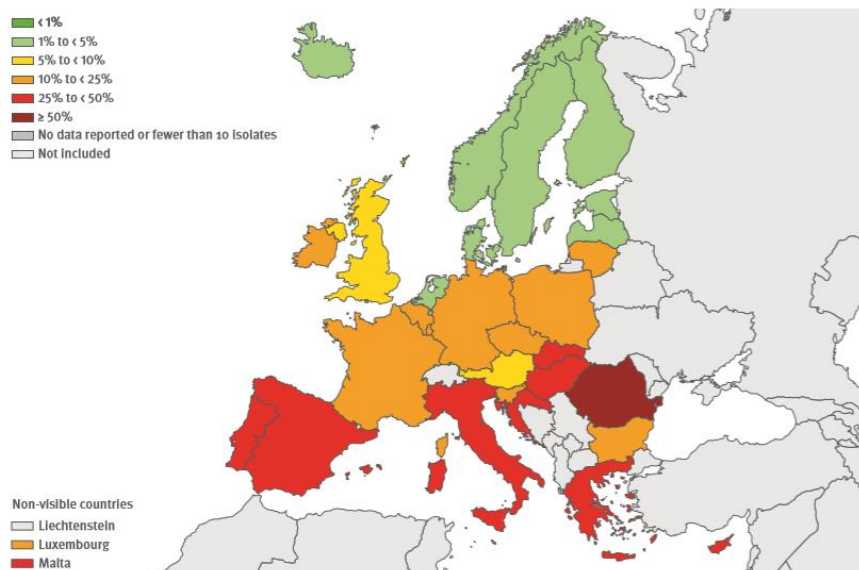
MRSA er vanlig i befolkningen, de utgjør et stort, globalt folkehelseproblem, og disse bakteriene forårsaker betydelig morbiditet, dødelighet samt forhøyede helsekostnader (Green, B. et al 2012). Det pekes på «de 5 C'er» som viktige faktorer for spredning av MRSA i befolkningen, se figur 7 nedenfor. Her nevnes faktorer som kontaminerte gjenstander, dårlig hygiene, trengsel og små huderifter.



Figur 7: Faktorer som bidrar til spredning av MRSA- «The 5C's».
(http://www.chiro.org/LINKS/ABSTRACTS/GRAPHICS/METHICILLIN/Methicillin-resistant_Staphylococcus_aureus_Figure_2.jpg)

I og med at MRSA i starten ble sett på som en sykehus-patogen ble den betegnet «Hospital-Associated» MRSA (HA-MRSA). Fra 1990-tallet dukket MRSA infeksjoner opp blant den øvrige del av befolkningen som ikke var assosiert hverken med sykehus eller sykehusinnleggelse. Disse ble dermed betegnet «Community- Associated» MRSA (CA-MRSA) (Paterson, G. et al. 2014). I tillegg til betydningen av *S.aureus* og MRSA som humane patogener, kan disse bakteriene også kolonisere et bredt spekter av verter, som eksempelvis husdyr, kjæledyr samt ville dyr. Dette er viktig, ikke bare fra et dyrevelferd- og økonomisk perspektiv, men også viktig da MRSA kan også fungere som et reservoar for zoonotisk infeksjon av mennesker. MRSA infeksjon av mennesker som har vært i nær kontakt med slike dyr, har resultert i anerkjennelse av en tredje epidemiologisk form for MRSA, «Livestock-Associated» MRSA (LA-MRSA) (Paterson, G. et al. 2014).

I Norge er forekomsten av MRSA fortsatt lav, blant de laveste i verden, med en andel på fortsatt under én prosent, men forekomsten er økende (NORM-VET 2016). Se figur 8 nedenfor for prosentvis utbredelse av MRSA blant deltagende land i Europa.



Figur 8: Prosentvis resistent mot MRSA blant deltagende Europeiske land i 2016.

Kilde: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf>

MRSA er resistente mot de fleste β -laktamer, og bakteriene kan i tillegg være resistent mot andre typer antibiotikum. Resistens mot meticillin er forårsaket av *mecA* genet. Dette koder for et alternativt penicillin-bindende protein (Wielders, C.L.C. et al 2002). I 2007 ble genet *mecC*, som er et homologt gen til *mecA* genet, oppdaget. Fortsatt er nivået av detektert *mecC* relativt lavt, og det er kun observert i Europa (2014) (Paterson, G. et al. 2014).

Tidligere ble MRSA påvist ved å screene for tilstedeværelse av *mecA* genet, og fra 2012 ble en protokoll fulgt for amplifisering av *mecA*, *mecC*, *spa* og *plv* gener for detektering av MRSA. Denne protokollen benyttes av Food, National Food Institute -DTU, og den er anbefalt av det europeiske referanselaboratoriet for antibiotikaresistens - EURL-AR.

Det ble i denne oppgaven analysert for eventuell tilstedeværelse av MRSA bakterier ved å følge DTU Food protokollen for detektering av MRSA. Deteksjon av *plv* gener ble utelatt, da disse ikke koder for antibiotikaresistens, men for et toksin utbredt i MRSA.

3.3 Ulike mekanismer for overføring av genetiske elementer.

Genetisk materiale kan overføres ved horisontal genoverføring (HGT) til andre bakteriearter, slekter og også mellom Gram-negative og Gram-positive bakterier (Gaustad, P. 2001). Fremmed DNA blir tatt opp i bakterien ved tre mekanismer:

3.3.1 Transduksjon

Transduksjon er en form for horisontal genoverføring hvor bakteriofag overfører DNA fra en bakterie (donor) til en annen (resipient), hvor DNAet kan integreres på resipientens genom eller plasmid (Doyle, M.P. 2013). Bakteriofagene benytter donorcellens transkripsjonsmaskineri til å replikere sitt eget virus-DNA. Ved feil kan bakteriofagen overføre deler av donor-DNA i stedet for sitt eget DNA til resipienten. Hvilke av vertens gener som inkorporeres kan skje tilfeldig og dette vil kunne gi opphav til generell transduksjon (Gaustad, P. 2001).

3.3.2 Transformasjon

Transformasjon er opptak av nakent, fritt kromosomalt DNA fra omgivelsene. Det tas opp enten som DNA-fragment, eller som plasmid-DNA. Cellene integrerer DNA-fragment i sitt eget genom ved rekombinasjon. Celler som har denne muligheten kalles kompetente celler. De kan være naturlig kompetente, eller de kan behandles kunstig ved f.eks. elektroporering eller ved gjentatt frysing og tining, slik at de blir kompetente (Huddleston, J.R. 2014).

3.3.3 Konjugasjon

Ved konjugasjon overføres genetisk materiale fra en bakterie (donor) til en annen (resipient) gjennom celle-til celle kontakt. Vanligvis skjer dette via en pilus som danner en kanal hvor konjugative plasmider, transposoner eller deler av kromosomet kan overføres (Huddleston, J.R. 2014).

Av disse tre mekanismene antas konjugasjon å spille den viktigste rollen med hensyn på spredning av antibiotikaresistens (Norman, A. et al 2009). Dette fordi transformasjon krever homologi mellom DNA i donor og resipient, i tillegg brytes fritt DNA raskt ned i miljøet. Transformasjon kan derfor kun finne sted mellom bakterier som er nært beslektet. Bakteriofager involvert ved transduksjon krever høy vertsspesifisitet, noe som igjen er med på å begrense mulighet for spredning av resistens. Konjugasjon antas dermed å være den viktigste mekanisme for spredning, både på grunn av mekanismens evne til å overføre DNA til et bredt spekter av ulike bakteriearter, og fordi antibiotikaresistente gener ofte er plassert på konjugative genetiske elementer (Norman, A. et al 2009).

3.4 Ulike mobile genetiske elementer

Mobile genetiske elementer (MGE) deles inn i to hovedtyper. Man skiller mellom de typene som kan forflytte seg fra en celle til en annen, som eksempelvis plasmider, og de genetiske elementene som kan forflytte seg fra ett genetisk område til et annet innenfor samme celle, slik som eksempelvis transposoner og integron-kassetter.

3.4.1 Plasmider

Plasmider er små, selvstendige, genetiske enheter som finnes i cellens cytoplasma. Plasmider er ekstrakromosomalt, dobbeltrådet og vanligvis sirkulært DNA, selv om enkelte bakterier også har lineære plasmider. Plasmider defineres som ekstrakromosomale genetiske elementer som har evnen til å replikere uavhengig av bakteriens kromosom, selv om replikasjonssystem hovedsakelig er gitt av bakteriecellen (Bennett, P.M. 2008).

Plasmider kan overføres horisontalt mellom bakterier ved konjugasjon. Dersom plasmidene har evnen til å initiere sin egen overføring til en ny celle ved hjelp av konjugasjonspili, så klassifiseres plasmidene som konjugerbare. Plasmider som derimot er avhengig av tilstedeværelsen av et konjugerbart plasmid, og overføres sammen med dette, klassifiseres som mobiliserbare plasmider. Plasmider er bærere av gener som i perioder kan være til nytte for bakterien for å overleve i bestemte miljøsituasjoner, som eksempelvis i nærvær av potensielt dødelig antibiotikum. Plasmider er derfor bærere av et betydelig utvalg av gener, inkludert de som gir antibiotikaresistens (Bennett, P.M. 2008). Figur 9 nedenfor viser et skjematisk diagram av et typisk antibiotikaresistent plasmid.

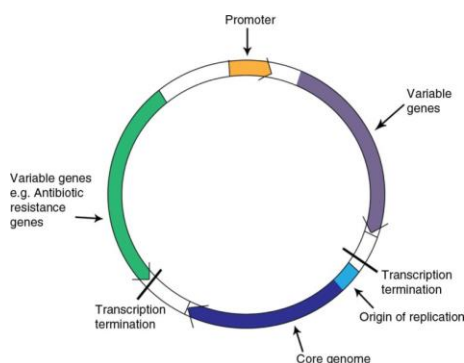


Fig. 9: Eksempel på antibiotikaresistent plasmid. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4185132/>)

Plasmidene kan både sette inn og overføre gener, enten ved rekombinasjon eller ved transposisjon, og siden plasmidene i tillegg kan innføres i nye verter, kan de sees på som et «basseng» av ekstrakromosomalt DNA som ulike populasjoner kan dele seg imellom (Del Solar, G. et al 1998).

3.4.2 Transposoner

Transposoner er små DNA-segmenter, rundt 500 – 1500 bp lange, som er i stand til å forflytte seg fra ett sted til et annet på genomet, en prosess kalt transposisjon. Transposoner har vanligvis repeterende DNA sekvenser på hver ende av segmentet for å gjøre forflyttingen enklere. I tillegg inneholder de et gen for enzymet transposase som katalyserer prosessen (Hill, K.L. et al 2001). Transposisjon kan skje ved to ulike prosesser. Noen transposoner flytter seg etter prinsippet «klipp ut og lim inn» et annet sted i genomet, en prosess som kalles transkripsjon. Andre transposoner, kalt replikative transposoner, replikeres på stedet og kopien settes deretter inn et annet sted i genomet. Denne prosessen kalles replikativ transkripsjon (Willey, J.M. et al 2009). Komplekst oppbygde transponer kan også inneholde andre gener som for eksempel gener for antibiotikaresistens. Disse kan overføres til plasmider og lage resistens faktor, såkalt R-plasmid. Disse plasmidene kan videreføres til andre bakterier. Det finnes også noen konjugative transposoner som kan flytte seg mellom bakterier via konjugasjon (Willey, J.M. et al 2009).

3.4.3 Integroner

Integroner er mobile genetiske elementer som kan ta opp og uttrykke gener i form av genkassetter (GC). Integronene inneholder et *intl*-gen som koder for integrase, et integrasjonssete for ett eller flere GC, og promotor. Disse elementene kan sitte både på plasmider og på kromosomet. I og med at flere GC kan integreres i ett integron, er disse viktige med hensyn på spredning av resistensgener. Integroner er vidt utbredt, spesielt i Gram-negative bakterier (Stalder, T. et al 2012).

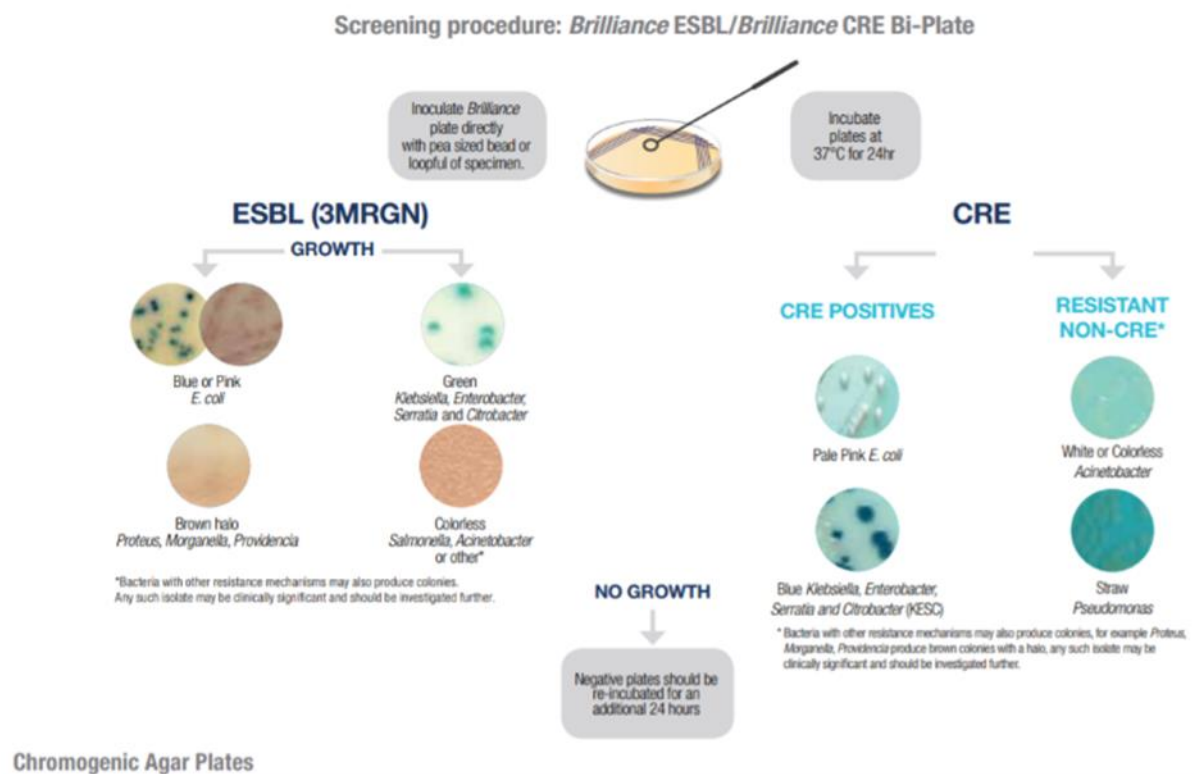
4. METODISK TEORI

4.1 Litteratursøk / Kunnskapsgrunnlag

Under arbeidet med denne oppgaven har jeg fått utdelt flere gode artikler av min veileder som er blitt benyttet. I tillegg har jeg brukt søkeord som «Antibiotic history», «Antibiotics», og «Antimicrobial resistance» samt flere av de benyttede enzymene, og søkene har foregått på Internett, Google Scholar, i PubMed og i Elsevier. Tilsvarende ord på norsk er også blitt benyttet i søket. Relevante oppslagsbøker har også blitt brukt.

4.2 ESBL og CRE screening

Innsamlede vannprøver ble screenet for å undersøke om de inneholder ESBL- eller CRE-fenotypisk resistens. Screening for ESBL-produserende og Carbapenem-resistente Enterobacteriaceae skjer ved å benytte selektive, kromogene medier. Dette er medier tilsatt antibiotika for seleksjon, samt kromogene substanser for species identifisering. I denne oppgaven ble agarskåler med Brilliance™ESBL og Brilliance™CRE Agar, såkalte bi-plater benyttet. (Thermo Scientific Inc.) Eventuelt oppvekst av bakteriekulturer på disse skålene ble sammenlignet og vurdert i samsvar med protokollen «Quick and easy ESBL and CRE screening» (Thermo Fisher Scientific Inc.), og denne er oppsummert i figur 10 nedenfor.



Figur 10: «Quick and easy ESBL and CRE screening» (Thermo Fisher Scientific Inc).

4.3 MRSA screening

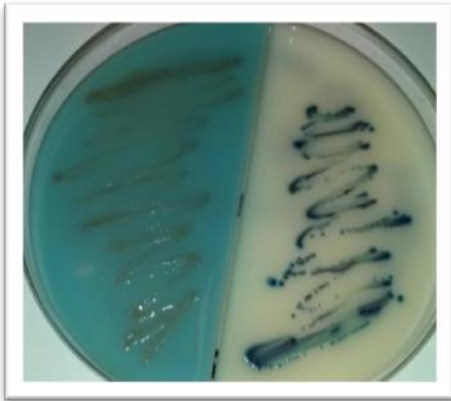
Innsamlede vannprøver screenes også for å tilstedeværelse av MRSA ved å benytte selektive, kromogene medier. Det benyttes Brilliance™ MRSA 2 Agar (Thermo Fisher Scientific Inc.), et medium tilsatt en kombinasjon av antibakterielle stoffer som hemmer vekst av et bredt spekter av konkurrerende organismer, blant annet cefoxitin. I tillegg inneholder mediet et stoff som farger ikke-målorganismer rosa, for på denne måten å kunne skille eventuelt andre kolonier fra MRSA kolonier. Eventuelle MRSA kolonier vil ha en denim-blå farge på dette mediet. Det ble også benyttet MRSA Select™ II Agar Plates (Bio-Rad, California, USA).

4.4 Oppdyrking av bakterieprøver.

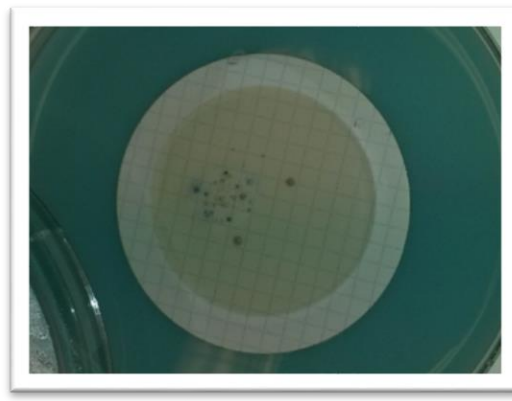
Samtlige skåler inkuberes i inkubatorskap ved 37°C, i ett døgn. Skåler uten bakterievekst kan inkuberes ytterligere ett døgn, eventuelt litt lengre, dette etter anbefaling fra produsenten. Eventuelle enkeltkolonier som vokser opp på disse skålene strykes ut på nytt i egne Brilliance™ESBL,

Brilliance™CRE eller Brilliance™ MRSA 2 Agar skåler, og inkuberes på tilsvarende måte. Enkeltkolonier som vokser opp på skålene strykes ut to ganger før de eventuelt dyrkes opp i flytende Brain Heart Infusion (BHI) medium. Dette gjøres for å være sikker på at det her dreier seg om en antibiotikaresistent bakterie, og ikke kun en bakteriekultur som har overlevd på det selektive mediet på grunn av andre faktorer enn resistensgener. Figur 11 nedenfor viser et eksempel på vekst på biplate og vekst på enkeltskål med filter.

A)



B)



Figur 11. Bilde A) viser vekst på Brilliance™ESBL, Brilliance™CRE av biplate. Bilde B) viser vekst på finfilter plassert på Brilliance™CRE enkeltplate.

Kolonier fra skåler med 2. gangs utstrykning overføres ved bruk av podenål til reagensrør inneholdende Brain Heart Infusion (BHI) medium. BHI-mediet er et næringsrikt vekstmedium, og kan derfor benyttes for kultivering av flere typer kresne mikroorganismer. Prøvene inkuberes i BHI-medium i 2 døgn ved 37°C. Blakket medium indikerer god vekst av bakteriekulturene, og genomisk DNA fra disse prøvene isoleres for videre analyser og synliggjøring av hvilke resistensgener disse koloniene har.

4.5 Ekstrahering av genomisk DNA

Genomisk DNA fra kulturene ekstraheres ved å benytte et GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich). Separering av celler og medium gjøres ved sentrifugering, og man ender da opp med en bakteriepellet. DNA frigjøres fra bakteriecellen ved kjemisk lysering. Lysisbufferen i dette kitet inneholder lysozym for effektiv lysering av bakterienes peptidoglykan-cellevegg. I tillegg inneholder bufferen detergenten sodium dodecyl sulphate (SDS) som bidrar til å løse opp cellemembranen, og innholdet i cellene blir frigitt. Proteinase K tilsettes for å bryte ned DNAs slik at disse ikke bryter ned genomisk DNA.

4.6 Kvantifisering /kvalitetsbestemmelse av DNA

Bestemmelse av konsentrasjonen og kvaliteten på isolert DNA gjøres ved hjelp av UV-absorbansmålinger. Disse målingene baserer seg på nukleotidenes evne til å absorbere lys i den ultrafiolette delen av lysspekteret. Det er de aromatiske ringene til nukleotidene som absorberer lys. Absorpsjonsmaksimum for DNA er ved 260 nm. Renheten bestemmes av forholdet mellom 260 nm og 280 nm (Abs_{260}/Abs_{280}). Ved 280 nm absorberes også eventuelle proteiner som forurenses prøven. Verdier på rundt 1,8 betraktes som «rent» DNA. Eventuelt lavere verdier indikerer tilstedeværelse av protein, fenol eller andre kontaminanter som absorberer sterkt rundt 280 nm. Forholdet 260/230 benyttes som et ekstra mål på renheten til nukleinsyrene. Forventede verdier på «rent» DNA skal her ligge på rundt 2.

4.7 PCR

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode som gjør det mulig å oppformere en ønsket DNA sekvens. Vanligvis består DNA prøvene som skal amplifiseres (oppformerer) av hele DNA genomet. For den DNA sekvensen som ønskes amplifisert, må man derfor kjenne til mellom 15-30 basepar som ligger før og etter ønsket sekvens. På bakgrunn av dette produseres primere (syntetiske oligonukleotider) som er komplementære til disse to områdene. Det blir derfor området mellom primerene som blir amplifisert i PCR reaksjonen. I PCR reaksjoner benyttes enzymet *Taq*-polymerase, en varmestabil DNA polymerase isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*. Enzymet tåler å bli oppvarmet til 95°C gjentatte ganger, og er derfor blitt et veldig viktig redskap ved PCR kjøringer. *Taq*-polymerasen starter DNA-syntesen der primerene har bundet seg på, og det syntetiseres en komplementær tråd til hver av de to opprinnelige DNA trådene etter at disse er blitt denaturert som følge av varmebehandlingen i PCR-metodens to første steg.

Amplifisering av DNA sekvensen skjer ved å syklisk repetere de tre trinnene denaturering, annealing og ekstensjon/DNA-syntese. I denatureringsfasen blir DNA templatet varmet opp til ca. 97°C, og da vil hydrogenbindingene mellom DNA-dobbel-heliksene brytes opp og gå fra hverandre, og man får to enkeltrådede DNA. I annealingsfasen kjøles PCR-løsningen ned til en temperatur hvor primerne kan binde seg til de komplementære baserekkefølgene på de to enkeltrådede DNA (singel stranded DNA). Annealingtemperaturen varierer fra rundt 57–63°C. Eksakt temperatur bestemmes ut i fra hvilke primere som benyttes.

Taq polymerase syntetiserer en komplementær DNA tråd ved å benytte primeren som startpunkt. For at *Taq* polymerasen kan gjøre dette, er det en forutsetning at byggestenene; dNTP'ene er tilstede i PCR-mixen. I den siste fasen, elongeringsfasen, økes temperaturen til 72°C, som er optimal temperatur for DNA polymerasen. På denne måten blir det dannet nye DNA tråder. Prosessen repeteres deretter i de ulike fasene. For hver syklus blir det en fordobling av det ønskede DNA området, og dermed en eksponentiell økning ved gjentatte sykler (Willey, J. et al 2009).

4.7.1 Singleplex og multiplex PCR

PCR kjøring med kun ett primerpar (Forward og Reverse) kalles singleplex PCR. Ved å blande primerpar med ulike størrelser, det vil si ulike basepar (bp), får man det som kalles multiplex PCR. Ved å benytte en mix av ulike primer-par vil man da kunne teste eventuelt tilstedeværelse av flere målgen i en og samme PCR kjøring. For prøver som gir positive bånd ved multiplex-kjøringer, blir det kjørt singleplex PCR for å konfirmere disse.

4.7.2 16S rRNA PCR

Cellenes proteinsyntese foregår i cellenes ribosomer. Disse er i hovedsak bygd opp av ribosomalt RNA (rRNA), som igjen består av tre rRNA fragmenter. Disse fragmentene er navngitt med hensyn på størrelse, hos prokaryoter er det tre slike fragmenter, og disse kalles 5S, 16S og 23S. (Svedbergeheter.) På grunn av den viktige funksjonen til rRNA, har sekvensene til rRNA stort sett blitt konserverte. Fragmentet 16S rRNA er et stort molekyl på rundt 1,5 kbp. Dette fragmentet inneholder sekvensvariasjoner som er store nok til at man klarer å skille ulike prokaryoter fra hverandre. 16S rRNA benyttes derfor mye innen slekts- og artsbestemmelse og evolusjonsstudier. Primere har blitt designet for å binde til de konserverte områdene og for å amplifisere variable områder. DNA sekvensen til 16S rDNA har blitt kartlagt for veldig mange slekter og arter, og det er dette fragmentet som benyttes for identifisering av oppdyrkede bakterie-kolonier fra vannprøvene.

4.8 AGAROSE GELKJØRING

Amplifisert DNA ble kjørt på agarose gel for å sjekke tilstedeværelse av eventuelt positive prøver i form av bånd i ønsket størrelse. Mengden agarose som brukes avgjør størrelsen på porene i gelen.

De negativt ladede DNA fragmentene blir skilt ved størrelse grunnet deres egenskaper til å flytte seg fra den negativt ladde elektroden i gelen, til den positivt ladde. Små DNA fragmenter vil vandre raskere gjennom gelen enn større DNA fragmenter.

DNA vil ved nøytral pH ha negativt ladet fosfatgruppe, og ved å benytte gelelektroforese, vil man kunne separere DNA molekyler på bakgrunn av størrelse og ladning. Tris-acetat-EDTA (TAE) buffer benyttes både i tillaging av gel, og i elektroforesekarer, da denne bufferen bidrar til at pH holder seg stabil innenfor et nøytralt område, hindrer hydrolyse av DNA samt at innholdet av ioner sikrer at buffervesken kan lede strøm gjennom gelen.

4.9 Rensing av PCR produkt

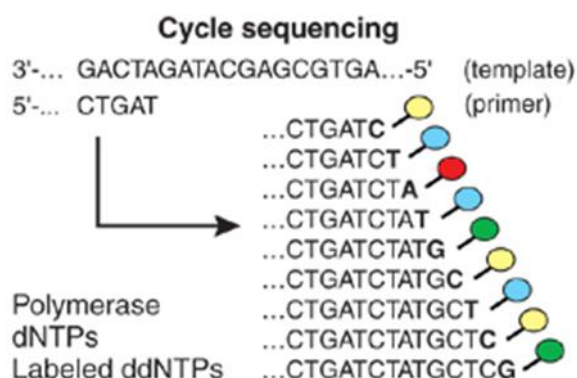
Da det i PCR-miksen benyttes et overskudd av primere, må man etter endt oppformering fjerne primeroverskuddet, ellers vil dette ødelegge for sekvenseringen. For å rense PCR-produkt benyttes kolonner som inneholder et silika-materiale. Denne silika-membranen vil binde dobbeltrådet DNA, mens enkeltrådet DNA (primere) vil bli vasket igjennom kolonnen. Etter rensing av PCR-produkt, kjøres en agarose gelelektroforese på litt av det rensede produktet. Hensikten er å sjekke at primerene er blitt fjernet.

4.10 Sekvensering.

4.10.1 Sanger sekvensering.

DNA sekvensering er en analysemetode hvor eksakt basesekvens i en prøve fremkommer. Ved DNA sekvensering etter Sanger metoden, også kalt dideoksy-metoden, benyttes enkeltrådet DNA (ssDNA) som templat for DNA syntese, en DNA primer, DNA polymerase katalyserer syntesen, dNTP'er og spesielle, fluoriserende dideoksyribonukleotider (ddATP, ddCTP, ddTTP og ddGTP) som terminerer DNA polymeriseringen (kjedeforlengelsen).

Dideoksyribonukleotidene mangler en hydroksylgruppe (-OH) i forhold til de vanlige nukleotidene, men denne forskjellen er så liten at DNA polymerasen ikke klarer å skille dNTP'er fra ddNTP'er. Når så disse ddNTP'ene blir koblet på en elongerende DNA-tråd, vil polymeriseringen stoppe, fordi 3' enden mangler hydroksyl-gruppen. Disse såkalte kjede-terminatorene (ddNTP'ene) er tilstede i relativt lave konsentrasjoner, slik at de ikke blir koblet på ved hver mulig posisjon. Man får da en blanding av kortere og lengre DNA fragmenter, avhengig av hvor ddNTP'ene festet seg på. Figur nummer 11 nedenfor viser prinsippet bak Sangers PCR-sekvensering.

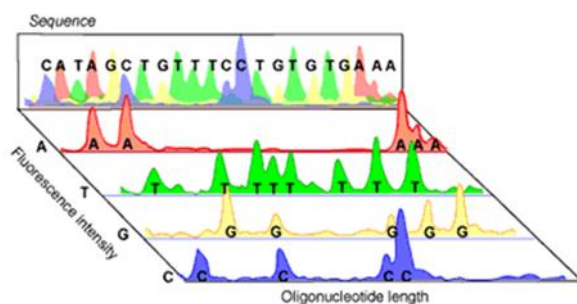


Figur 11. Prinsippet bak Sanger sekvensering. (<http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/images/nbt1486-F1.gif>)

4.10.2 Rensing av ekstensjonsprodukt og kjøring av sekvensgel.

Etter endt sekvenserings-PCR, vil de ulike ekstensjonsproduktene ha ulike lengder, og alle med en dideoksybase i 3'enden. I tillegg er det også overskudd av primer og ddNTP'er som må fjernes, ellers vil dette gi forstyrrelser ved avlesning av den første delen av sekvensen. For å rense ekstensjonsproduktet, felles dette ved å benytte etanol, NaOAc og EDTA. Renset produkt gjør at man kan lese sekvensen helt inntil primeren.

Renset produkt etter syklisk sekvensering blir kjørt på en sekvensator, hvor de blir separert ved hjelp av kapillær elektroforese. Prøven blir sugd inn i tynne rør som inneholder en polymer. Et elektrisk felt blir satt opp, og de negativt ladede DNA-fragmentene vandrer i polymeren. De korteste fragmentene vil bevege seg raskest, og dermed passere først forbi en laserstråle som detekterer fargen DNA-fragmentene er merket med. Baserekkefølgen til prøven blir på denne måten grafisk framstilt. Figur 12 nedenfor viser eksempel på grafisk fremstilling av en DNA basesekvens.



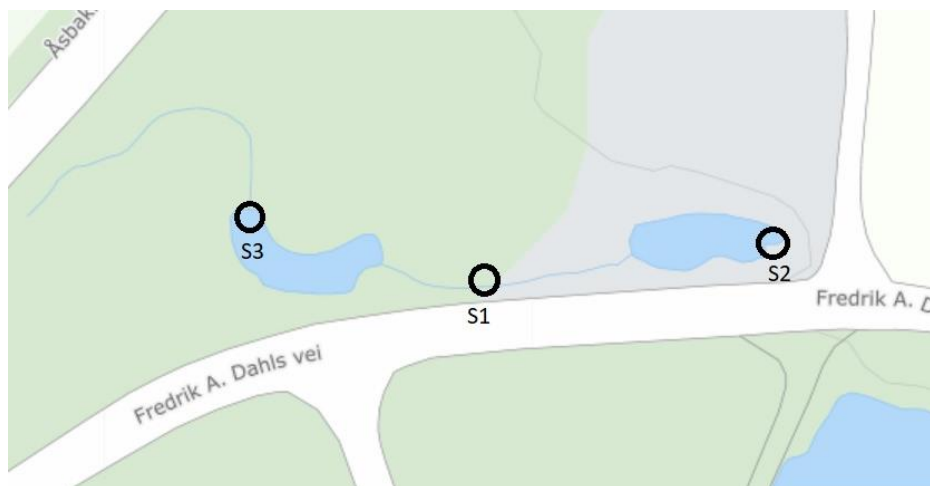
Figur 12. Basesekvenser lest ved laserdeteksjon. (<http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/automatedseq.gif>)

Mottatte filer med sekvensdataer behandles i programmet BioEdit, et program som benyttes til å finne overlappende områder og lage sammenstillinger («alignments») av sekvensene. Sekvensene editeres her ved å fjerne dårlige sekvenser og «N-haler», områder maskinen ikke har klart å lese. Redigerte sekvenser blir deretter kopiert over i et tekstdokument som Word, og sekvensen er klar for å kjøres i et BLAST-søk. BLAST står for «Basic Local Alignment Search Tool», og dette er en database som inneholder veldig mange kjente nukleotidsekvenser. Ulike søk kan kjøres i et BLAST-søk, og i denne oppgaven skal et «blastn» søk benyttes. Dette er et nukleotid-nukleotid søk. Forhåpentligvis vil et BLAST-søk resultere i at man finne sekvenser som er identiske med innsendte prøver, og på denne måten kan man identifisere ukjente bakterier isolert fra vannprøver, og eventuelt positive antibiotikaresistente gener.

5. MATERIALER OG METODER

5.1 Innsamling av prøver.

Vannprøvene som skulle analyseres ble samlet inn fra et område på NMBU kalt Niagara. Dette er en liten bekk som renner ut fra vestsiden av Andedammen. Dette er en liten bekk som renner gjennom to mindre «dammer», og vannprøvene ble samlet inn fra disse to dammene (Figur 13). Prøvene ble samlet inn på sterile 500 ml Scott Duran glassflasker. Flaskene ble merket henholdsvis S1, S2 og S3 ut i fra hvilket område langs bekken de var hentet fra. Prøve S1 ble hentet den 13. februar, mens prøvene S2 og S3 ble hentet den 27. februar. Prøvene ble oppbevart på kjølerom i ett døgn for sedimentering og videre bearbeiding.



Figur 13: Kart over områdene for uttak av vannprøvene S1, S2 og S3.

Prøvene inneholdt mye fine partikler, og flaskene var derfor relativt grumsete og uklare, selv etter ett døgn i ro på kjølerom. En trakt med grovt papirfilter type Whatman™ Ashless/Black ribbon 589/1 (GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, USA) ble satt i et begerglass på 300 ml. Det ble gjort i stand ett slikt oppsett for hver av de tre vannprøvene. Rundt 200 ml av vannprøvene ble overført til trakt med filter, og vannet ble filtrert ved gravitasjon.

Av dette grovfiltrerte vannet ble 100 ml fra hver av de tre prøvene finfiltrert ved å benytte et Millipore vannsug filtreringsoppsats. Filter av typen EZ-Pak® Membrane Filters (Millipore S.A., France) med porestørrelse 22 µm ble benyttet. Etter filtrering ble filtrene overført til agarskåler med antibiotikaresistent medium. Tre ulike resistens-skåler ble benyttet; Brilliance™ MRSA 2 Agar, Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE Agar (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Det ble jobbet sterilt under hele prosessen. Skålene med filter ble overført til Patogenlaben, hvor de ble inkubert ved 37°C i 24 -48 timer, i trå med anbefalinger fra produsent.

Resterende volum av grovfiltrert vann, ca. 100 ml, ble overført til 2 Falconrør, hver på 50 ml, og ble overført til Patogenlaben for videre analyser.

5.2 Oppdyrking og screening av bakterier

5.2.1 ESBL og CRE screening

Innsamlede vannprøver ble screenet for å undersøke om de inneholder ESBL- eller CRE-fenotypisk resistens. Brilliance™ ESBL og Brilliance™ CRE Agar (Thermo Scientific Inc.) bi-plater ble benyttet. 50 µl fra hver av de grovfiltrerte vannprøvene ble strøket ut på romtempererte skåler ved hjelp av podenål. For hver prøve, S1, S2 og S3, ble det strøket ut vannprøver på bi-plater som beskrevet ovenfor, samt 2 helskåler for finfilteret, ett filter på Brilliance™ ESBL agar, og ett på Brilliance™ CRE Agar (Thermo Fisher Scientific Inc.). Til sammen 8 ulike prøver. Da vannprøvene hadde tørket inn på mediet, ble skålene overført til inkubatorskap på 37°C, og inkubert i ett døgn.

5.2.2 MRSA screening

Innsamlede vannprøver screenes for å tilstedeværelse av MRSA ved å benytte Brilliance™ MRSA 2 Agar (Thermo Fisher Scientific Inc.) og MRSA Select™ II Agar Plates (Bio-Rad, California, USA). For hver prøve, S1, S2 og S3, ble det strøket ut vannprøver på bi-plater som beskrevet ovenfor, samt MRSA Select™ II Agar Plates (Bio-Rad) helskåler for finfilteret. Til sammen 7 prøver. Da vannprøvene hadde tørket inn på mediet, ble skålene overført til inkubatorskap på 37°C, og inkubert i ett døgn.

5.2.3 Oppdyrking av bakterieprøver

Kolonier fra skåler med 2. gangs utstrykning ble ved bruk av podenål overført til reagensrør inneholdende 10 ml Brain Heart Infusion (BHI) medium. Det ble benyttet ferdiglaget BHI-medium som var blitt romtemperert før bakteriekolonier ble overført. Totalt ble det dyrket 12 prøver i BHI (n=12).

Prøvene ble inkubert i BHI-medium i 2 døgn ved 37°C. Mediet i de fleste rørene viste god vekst av bakteriekulturene. To av prøvene hadde ikke tegn til vekst, disse ble derfor inkubert ytterligere to døgn. Da det fortsatt ikke var tegn til vekst i disse rørene, ble disse kastet. For de resterende 10 prøvene blir genomisk DNA fra disse prøvene isolert for videre analyser og synliggjøring av hvilke resistensgener disse koloniene har.

5.2.4 Nedfrysing av bakterier for langtidsoppevaring

Bakterieløsninger fra hver av de ti prøvene ble nedfrosset på -80°C for langtidsoppevaring. Dette ble gjort ved at 500 µl bakteriekultur oppdyrket i BHI-medium ved 37°C i 2 døgn ble overført til 2 ml kryorør (Nunc™ CryoTubes™, Thermo Scientific). Deretter ble 500 µl med 60 % glyserol tilsatt hver av rørene, og prøvene ble overført til -80°C fryser for langtidsoppbevaring.

5.3 Ekstrahering av genomisk DNA.

Etter at bakteriestammene var blitt dyrket opp i BHI-medium, ble genomisk DNA fra kulturene ekstrahert ved å benytte et GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich). Det ble overført 1,5 ml bakterieløsning fra hvert reagensrør med BHI-medium til hvert sitt eppendorfrør for høsting av celler. Protokoll fra produsenten ble fulgt, med unntak av siste trinn, hvor genomisk DNA ble eluert ved å benytte elueringsbuffer SequalPrep™ fra Invitrogen (ThermoFisher), dette da denne ikke inneholder EDTA, noe som vil ha negativ påvirkning på sekvensering av prøvene. Oversikt over ekstraherte prøver er gitt i tabell 9, under punkt 6.1.

I tillegg til uttak av celler for ekstrahering, ble det også tatt ut bakterieløsninger fra hver av disse ti prøvene for nedfrysning. Dette ble gjort ved at 500 µl bakteriekultur i BHI-medium ble overført til 2 ml Kryorør, Nunc™ CryoTubes™ (Thermo Scientific). Deretter ble 500 µl med 60 % glyserol tilsatt hvert av rørene, og prøvene ble overført til fryser som holdt -80°C for langsiktig oppbevaring.

Et flytskjema over prosessene fra prøveinnsamling til kvantifisert DNA er gitt i figur 13 nedenfor.

5.4 Flytskjema fra prøveinnsamling til kvantifisert DNA.



Figur 13: Flytskjema fra prøveinnsamling til kvantifisert DNA.

5.5 Kvantifisering /kvalitetsbestemmelse av DNA

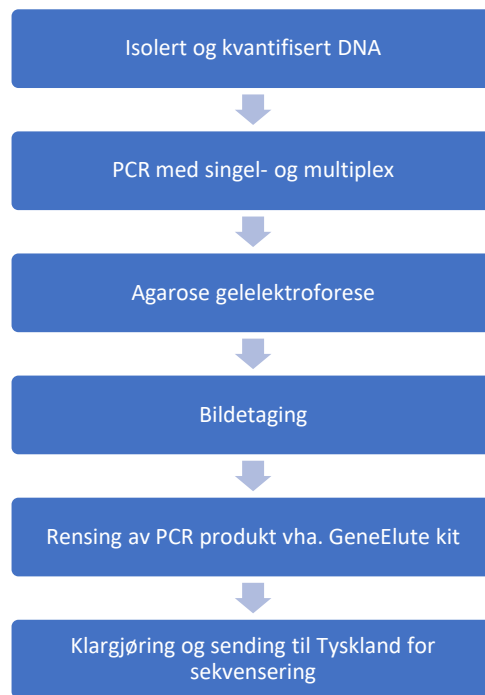
5.5.1 NanoDrop

Et NanoDrop Acid 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc.) ble brukt for kvalitetsbestemmelse av DNA. 2µl prøve ble applisert på prøvesokkelen, og resultatene ble analysert ved å benytte NanoDrop 2000 Software (Thermo Fischer Scientific Inc.)

5.5.2 QUBIT

DNA-konsentrasjonen på isolerte prøver ble målt ved å benytte et Qubit[®]2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc.), og et Qubit[®] dsDNA BR (Broad-Range) analyse kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) ble benyttet for å kunne måle prøvene på fluorometeret. Løsningene ble laget i henhold til angitt prosedyre fra produsenten. Broad Range Qubit dsDNA bufferen ble blandet med prøvene i forholdet 198 µl buffer til 2 µl prøvemateriale. De to standardene i kitet ble blandet med bufferen i forholdet 10 µl standard og 190 µl buffer. Disse to standardene ble benyttet for å lage standardkurve som prøvene igjen skulle avleses mot. Både standardene og prøvene ble vortexes og inkubert i 2 minutter ved romtemperatur før avlesning. For å oppnå gode sekvenseringsresultater bør DNA-konsentrasjonen ligge mellom 20 – 80 ng.

5.6 Flytdiagram over DNA analyser.



Figur 14: Flytskjema DNA analyser.

5.7 PCR

I denne oppgaven ble det benyttet en annealingtemperatur på 60°C for carbapenemase- primere, ESBL-primermixer ble kjørt med annealingtemperatur på 62°C, mens det for MRSA primermixer ble benyttet en annealingtemperatur på 59°C. Dette er gitt i prosedyrene, som igjen baserte seg på tidligere metodeoppbeidelse.

Det ble kjørt PCR, både multiplex og singleplex på DNA prøver ekstrahert våren 2017, (n=4), samt ekstrahert DNA fra bakterievekst i vannprøvene, n= 9. Se tabell 10 for oversikt over prøver analysert.

5.7.1 16S rRNA PCR

Det ble benyttet et «iProof™ High-Fidelity DNA polymerase» kit (Bio-rad Laboratories Inc) for PCR amplifisering av 16S rRNA, men dNTP i kitet ble byttet ut med dNTP fra annen produsent (Thermo Scientific), basert på tidligere erfaringer. Protokoll fra produsenten ble fulgt.

Reagenser og konsentrasjoner benyttet for 16S rRNA amplifisering er gitt i tabell 1 nedenfor. Tabell A.4 i vedlegg A gir informasjon om primersammensetningen. Basert på resultater fra agarose gelelektroforese blir 16S rRNA prøver renses, før sending til Tyskland og sekvensering hos GATC Biotech (GATC Biotech, Cologne, Tyskland).

På grunn av dårlige sekvensresultater, ble 4 av vannprøvene (3S, 6S, 9S og 10S) amplifisert på nytt. 16S rRNA ble da amplifisert med nytt Iproof PCR kit og nye 16S rRNA primere.

Tabell 1: Kjemikalier benyttet ved 16S rRNA.

| Reagenser | Utgangs-konsentrasjon | Slutt-konsentrasjon | Volum (μ l) i 1 reaksjon |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------|
| Iproof HF buffer | 5 X | 1 X | 8 |
| dNTP'er | 10 mM | 200 μ M | 0,8 |
| Forward 1 primer | 5 μ M | 0,25 μ M | 2 |
| Reverse 1 primer | 5 μ M | 0,25 μ M | 2 |
| PCR gradert H ₂ O | | Totalt 40 μ l | 24,8 |
| Iproof DNA polymerase | | | 0,4 |
| Templat DNA | 5 – 100 ng/ μ l | 7,5 – 150 ng | 2 |
| Totalt prøvevolum | | | 40 |

PCR programmet som ble kjørt for 16S rRNA amplifisering er gitt i tabell 2 nedenfor.

Tabell2: PCR program for 16S rRNA.

| Syklar | Temperatur ($^{\circ}$ C) | Tid (minutter) | PCR trinn |
|-------------------------|----------------------------|----------------|----------------------|
| 1 | 98 | 00:30 | Start denaturering |
| 3-trinns syklus: | | | |
| | 98 | 00:10 | Denaturering |
| 35 sykluser | 55 | 00:30 | Primer annealing |
| | 72 | 00:45 | Primer ekstensjon |
| 1 | 72 | 10:00 | Slutt-ekstensjon |
| | 4 | Hold | Nedkjøling / Lagring |

5.7.2 MULTIPLEX OG SINGLEPLEX PCR

For ESBL analyser ble 4 ulike primer-multiplexer benyttet; M1, M2, M3 og M4. Det ble benyttet ferdig blandede stock-løsninger av primere. Disse var fra Thermo Fisher Scientific Inc., og hadde en konsentrasjon på 2 μ M i hver mastermik. Tabell 1 i vedlegg 1 gir informasjon om primersammensetningen i de ulike ESBL multiplexene. (Mastermix ESBL4 er en positiv kontroll.)

For carbapenemase analyser ble 2 ulike primer-multiplexer benyttet, CAR1 og CAR2. Det ble benyttet ferdig blandede stock-løsninger av primere. Disse var fra Thermo Fisher Scientific Inc., og hadde en konsentrasjon på 2 μ M i hver mastermik. Tabell A.2 i vedlegg A gir informasjon om primersammensetningen i de ulike CAR multiplexene.

Et QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN®, Hilden, Tyskland) ble benyttet for å amplifisere prøver. Dette kittet inneholder en mastermix som består av HotStarTaq DNA Polymerase, MgCl₂, dNTP-er og PCR buffer. I tillegg inneholder kitet RNase fritt vann. Kitet oppbevares i fryser ved -20 $^{\circ}$ C, og tines på is sammen med primermikser før bruk.

For hver prøve ble det blandet PCR-mix som gitt i tabell 3 nedenfor.

Tabell 3: Kjemikalier benyttet ved PCR kjøring.

| Reagenser | Utgangskonsentrasjon | Sluttkonsentrasjon | Volum (μ l) i 1 reaksjon |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2 x Quiagen Multiplex PCR Mastermix | 2x | 1x | 12,5 μ l |
| Primermiks | 2 μ M av hver primer | 0,2 μ M | 2,5 μ l |
| RNase fritt H ₂ O | | | 9 μ l |
| DNA | | \leq 1 μ g DNA/reaksjon | 1 μ l |
| Totalt volum i hvert PCR rør | | | 25 μl |

24 µl reaksjonsblanding ble overført til egne PCR-strips, og deretter ble 1 µl DNA prøve tilsatt, totalt prøvevolum 25 µl. Reagenser og prøver ble holdt på is under prosessen. Konsentrasjonen av hver reagens samsvarte med produsentens anbefalinger gitt i protokollen «QIAGEN® Multiplex PCR Handbook» (QIAGEN®). Prøvene ble amplifisert i en «Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler» (Thermo Fisher Scientific Inc). For multiplex PCR med carbapenemase-primere ble program «Master ESBL» benyttet (Tabell 5), mens multiplex PCR med ESBL primere ble kjørt på programmet «Master ESBL 2» (Tabell 4).

Tabell 4: PCR profil «Master ESBL2».

| Sykler | Temperatur (°C) | Tid (minutter) | PCR-trinn |
|-------------|-----------------|----------------|----------------------------------|
| 1 | 95 | 15:00 | Aktivering av taq DNA polymerase |
| | 94 | 00:30 | Denaturering |
| 35 sykluser | 62 | 1:30 | Primer annealing |
| | 72 | 1:30 | Primer ekstensjon |
| 1 | 72 | 10:00 | Endelig ekstensjon |
| | 4 | Hold | Nedkjøling / Lagring |

Tabell 5: PCR profil «Master ESBL».

| Sykler | Temperatur (°C) | Tid (minutter) | PCR-trinn |
|-------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| 1 | 95 | 15:00 | Aktivering taq DNA polymerase |
| | 94 | 00:30 | Denaturering |
| 35 sykluser | 60 | 1:30 | Primer annealing |
| | 72 | 1:30 | Primer ekstensjon |
| 1 | 72 | 10:00 | Endelig ekstensjon |
| | 4 | Hold | Nedkjøling / Lagring |

5.7.3 MRSA PCR

For analyser på MRSA ble protokoll fra DTU Food National Food Institute fulgt, og 2 primer-multiplexer (en «forward» og en «reverse») ble benyttet. Disse var merket hhv. primer mix 1 og primer mix 2 (Thermo Fisher Scientific Inc.) Det ble benyttet ferdig blandede stock-løsninger, og hver mastermix hadde en konsentrasjon på 2 µM. Fem prøver ble analysert for MRSA (n=5). Det testes for tilstedeværelse av genene *mecA*, *mecC* og *spa*. *MecA* genet bæres innenfor et mobilt genetisk element kalt staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) (Garcia-Garotte, F. et al 2014). I 2007 ble genet *mecC*, som er et homologt gen til *mecA* genet, oppdaget. Fortsatt er nivået av detektert *mecC* relativt lavt, og det er kun observert i Europa (per 2014) (Paterson, G. et al 2014). Protein A i *Staphylococcus aureus* er en viktig virulensfaktor som gjør bakterien i stand til å unnsnippe immunrespons hos verten. Dette genet, *spa*, har variasjon i lengde i ulike stammer (Shakeri, F. et al. 2010).

Tabell A.3 i vedlegg A1 gir informasjon om primersammensetningen i de ulike MRSA multiplexene.

Tabell 6: Reagenser benyttet ved PCR på MRSA.

| Reagenser | Volum (μ l) i 1 reaksjon |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| RNase fritt H ₂ O | 6,5 μ l |
| 2 x Quiagen Multiplex PCR Mastermix | 12,5 μ l |
| Primer 1 | 2 μ l |
| Primer 2 | 2 μ l |
| DNA | 1 μ l |
| Prøvevolum | 25 μ l |

Prøvene ble amplifisert i en «Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler» (Thermo Fisher Scientific Inc). Programmet som ble kjørt er vist i tabell 7 nedenfor.

Tabell 7: PCR profil «MRSA program».

| Sykler | Temperatur (°C) | Tid (minutter) | PCR-trinn |
|-------------|-----------------|----------------|----------------------------------|
| 1 | 94 | 5:00 | Aktivering av taq DNA polymerase |
| | 94 | 00:30 | Denaturering |
| 30 sykluser | 59 | 1:00 | Primer annealing |
| | 72 | 1:00 | Primer ekstensjon |
| 1 | 72 | 10:00 | Endelig ekstensjon |
| | 4 | Hold | Nedkjøling / Lagring |

5.8 AGAROSE GELKJØRING

For prøver amplifisert med ESBL- og CAR- multiplexer samt 16S rRNA ble det kjørt en 1% agarosegel for å visualisere resultatet. Gelen lages ved å blande 0,5 gram LE Agarosepulver fra SaeKem® (Lonza Rockland, ME, USA) med 50 ml 1 X TAE buffer. Dette blandes i en Erlenmeyerkolbe, varmes i microbølgeovn ved full effekt i litt over 1 minutt. Etter at blandingen var litt nedkjølt, ble det tilsatt 2,5 μ l SYBER Safe DNA gel stain fra Invitrogen. Dette blandes, og overføres til elektroforesekar fra Biorad. En brønnekam med plass til 8 brønner ble plassert øverst på gelen, og ved behov kan man evt. sette inn ytterligere en brønnekam midt på gelformen, og på denne måten få plass til totalt 16 prøver. For prøver amplifisert med MRSA multiplex benyttes en 2% agarosegel.

Prøvene som skal appliseres på gelen blandes med loadingbuffer og vann i mengdeforhold som vist i tabell 8 nedenfor. Dette blandes i PCR-brett, og totalt 10 μ l prøveblanding appliseres i hver brønn på agarosegelen.

Tabell 8. Reagenser benyttet ved applisering på gel.

| Reagenser | Mengde |
|-------------------|-----------|
| H ₂ O | 6 μ l |
| 6 x Loadingbuffer | 2 μ l |
| DNA | 3 μ l |

Loadingbufferen som benyttes er 6X loading dye fra Amresco® (Amresco®, Solon, Ohio, USA). Denne inneholder blant annet glyserol for at DNA prøvene skal synke ned i brønnene, og fargestoff som gjør

det lettere å se hvilke brønner man har applisert DNA ned i. Bufferen inneholder dessuten tre ulike fargestoffer som migrerer uavhengig av prøvene. Det lyseblå fargestoffet migrerer til 4000 bp, den indigo fargen migrerer til 600 bp, mens magenta-fargestoffet migrerer til 10 baser i en 1% agarosegel. På denne måten blir det enklere å visualisere DNA migrering ved kjøring av gelelektroforese.

For å gjøre det mulig å måle størrelsen på båndene i gelen benyttes en størrelsesmarkør, ladder. Ladder som ble benyttet var Quick-Load® 100 bp DNA ladder (fra New England Biolabs® Inc, Ipswich, England). Det appliseres 10 µl stige i en brønn per rad.

Til elektroforesekjøringen ble det benyttet en «Bio-Rad Powerbank 300» (Bio-Rad Laboratories Inc.) Gelen ble kjørt ved 80 V i ca. en time for ESBL- og CAR- multiplex PCR produktene, mens MRSA multiplex PCR produkter ble kjørt ved 130 V i 1 time.

Etter endt elektroforese ble det tatt bilde av gelene i UV-lys ved å benytte en «Gel Doc™ XR-maskin» (Bio-rad Laboratories Inc.). Bildene ble lagret ved å benytte programmet «Gel Doc™ XR i Quantity One software» (Bio-rad Laboratories Inc.) «Invert display» ble også tatt av samtlige geler, da det i enkelte tilfeller kan være lettere å identifisere prøveresultatene på denne måten. Ved å lese av båndene på gelen og sammenligne disse med størrelsene på ladder og forventet størrelse på PCR produktene ut fra primere benyttet, ga dette et svar på hvorvidt resistensgener var tilstede i prøvene eller ei. Eventuelt positive prøver i en multiplex PCR ble bekreftet ved å kjøre single PCR på kun den primeren det ble detektert bånd for.

5.9 Rensing av PCR-produkt.

Et GenElute™ PCR Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich® ble benyttet for å rense PCR-prøvene, og oppgitt fremgangsmåte ble fulgt. Kvantifisering av rensede PCR produkter ble utført ved å benytte Qubit.

Prøvene ble sendt til Tyskland for sekvensering. Firmaet GATC Biotech ble benyttet, og prøver til sekvensering må klargjøres etter oppgitte spesifikasjoner. Autoklaverte eppendorfrør på 1,5 ml ble benyttet. Til hvert rør med prøve festes en strekkode for merking av prøve. Hvert rør inneholder 5 µl DNA eller RNA med konsentrasjon rundt 20-80 ng/µl og 5 µl primerløsning med en konsentrasjon på 5 µM.

Ved 16S rRNA sekvensering sendes både Forward 1 og Reverse 1 primerene, se tabell A.4 under Vedlegg A. For singleplex PCR kun benyttes Forward-primere, se tabeller i Vedlegg A. Dette gjøres fordi sekvensene i singleplexene er korte, under 800 bp, og det er da tilstrekkelig med binding bare fra enten Forward- eller Reverse-primer. 16S rRNA-genet er på 1500bp, og for denne lengden kreves det binding av begge primere.




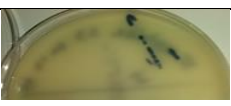




6. RESULTATER

6.1 Fenotypisk deteksjon av antibiotikaresistente bakterieisolater fra selektive skåler.

Det var 3 ulike prøver, S1, S2 og S3, som ble platet ut på 4 ulike antibiotika-resistente selektive medier. I tillegg ble det foretatt finfiltrering av hver av disse 3 prøvene. Det ble foretatt tre finfiltreringer av hver prøve. Hvert av disse filtrerene ble overført til 3 ulike skåler med antibiotika-resistente selektive medier. Av totalt 21 skåler, var det, etter andre runde med utstrykning, vekst på 12 skåler.

Tabell 9 nedenfor gir en oversikt over de ulike prøvene som ble isolert, med type vekstmedium samt innsamlingssted for hver av de ulike prøvene. Prøve 8S var den eneste som vokste opp fra filter.

Tabell 9. Oversikt over prøver med isolert DNA fra bakteriekulturer.

| Prøve | Type medium | Farge på koloni | Bilde av skål | Bakterietype | Innsamlingssted |
|-------|-------------|-----------------|---|--|-----------------|
| 1S | MRSA | Blå | | <i>Staphylococcus aureus</i> | S1 |
| 2S | CRE | Blå |  | <i>Klebsiella</i> , Enterobakter, <i>Serratia</i> eller <i>Citrobakter</i> | S2 |
| 3S | ESBL | Beige |  | <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i> | S3 |
| 4S | MRSA | Lilla |  | <i>Staphylococcus aureus</i> | S3 |
| 5S | MRSA | Blå |  | <i>Staphylococcus aureus</i> | S3 |
| 6S | ESBL | Beige |  | <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i> | S2 |
| 7S | CRE | Grønn |  | <i>Klebsiella</i> , Enterobakter, <i>Serratia</i> eller <i>Citrobakter</i> | S2 |
| 8S | ESBL | Beige | | <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i> | S1 |
| 9S | CRE | Beige |  | <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i> | S2 |
| 10S | ESBL | Blå |  | <i>E.Coli</i> | S2 |

| | | | | | |
|-----|------------------|-------|--|------------------------------|----|
| 11S | MRSA (BioRad) | Blå | | <i>Staphylococcus aureus</i> | S2 |
| 12S | MRSA (BioRad) | Lilla | | <i>Staphylococcus aureus</i> | S1 |

I denne tabellen er bakteriene som vokste på ESBL og CRE skåler blitt identifisert ved å benytte «Quick and easy ESBL and CRE screening» (Thermo Fisher Scientific Inc.). Dette er bakterier som er vokst opp på skåler med klinisk relevante resistensmekanismer. Det er viktig å ta hensyn til at det også kan vokse andre bakterier med andre resistensmekanismer på disse skålene. Det samme kan sies for MRSA skålene.

6.2 Isolering av genomisk DNA

Totalt ble 12 bakteriekulturer oppkonsentrert fra bakterieskåler. Etter at prøvene hadde vært inkubert i 2 døgn ved 37°C, var rørene med BHI medium tydelig blakket, med god vekst av bakteriekulturene. Dette gjaldt for 9 av de 12 prøvene. Prøve 2S og 7S hadde ikke vekst, disse ble inkubert ytterligere 2 døgn, men det var fortsatt ingen vekst. Prøve 8S hadde lite vekst, men det ble foretatt isolering av genomisk DNA fra denne, sammen med de 9 andre prøvene med god vekst. Isolering av genomisk DNA fra de 10 bakteriekulturene ble utført, og resultatet av renhet og konsentrasjon til de ulike prøvene er gitt i tabell 10.

6.3 Kvalitetsbestemmelse og kvantifisering av DNA

Oversikt over isolerte bakteriekulturer, kvalitetsbestemmelse og kvantifisering er gitt i tabell 10 nedenfor. Prøvene 2_i, 6_i, 15_i og 15M_i er prøver som ble isolert av masterstudenter våren 2017, og for disse ble kun DNA konsentrasjonen målt.

Tabell 10. Oversikt over konsentrasjon og renhet på isolert DNA prøver.

| Prøve | Type medium | Type prøve | DNA kons. (ng/μl) | Renhet 260/280 | 260/230 |
|--------------------|---------------|---------------------------|-------------------|----------------|---------|
| 2 _i * | | <i>Pseudomonas putida</i> | For lav | | |
| 6 _i * | | <i>Bordetella petrii</i> | 20,8 | | |
| 15 _i * | | | 4,19 | | |
| 15M _i * | | | 10,5 | | |
| 1S | MRSA | S1 | 10,7 | 1,74 | 0,87 |
| 3S | ESBL | S3 | 25,6 | 1,65 | 0,69 |
| 4S | MRSA | S3 (Lilla) | 5,71 | 1,13 | 0,25 |
| 5S | MRSA | S3 (Blå) | 14,7 | 1,78 | 0,75 |
| 6S | ESBL | S2 (Beige) | 84 | 1,86 | 1,60 |
| 8S | ESBL | S1 (Beige) | For lite | 1,53 | 0,58 |
| 9S | CRE | S2 (Beige) | 30,1 | 1,81 | 1,05 |
| 10S | ESBL | S2 (Blå) | 63,6 | 1,84 | 1,62 |
| 11S | MRSA (BioRad) | S2 (Blå) | 10,2 | 1,67 | 0,54 |
| 12S | MRSA (BioRad) | S1 (Lilla) | 2,28 | 1,63 | 0,29 |

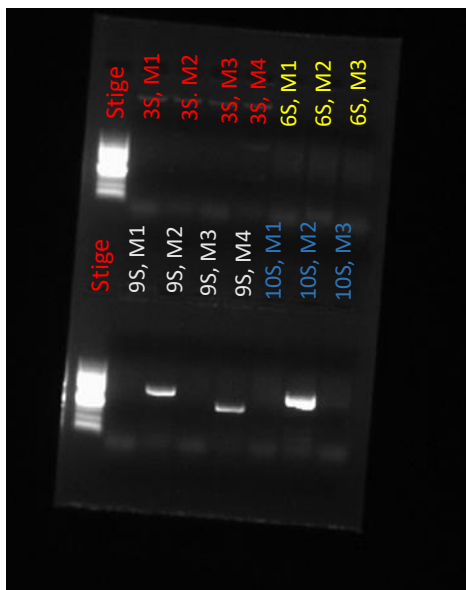
*Jordprøver isolert av masterstudenter i fjor.

Det var stor variasjon med hensyn på DNA-konsentrasjonen til de ulike prøvene. For å oppnå gode resultater på DNA-analyser, bør konsentrasjonen ligge mellom 20-80 ng/μl. Renheten er også generelt lav. Verdiene burde vært opp mot 2,0.

6.4 PCR multi- og singleplex og visualisering ved agarose gelkjøringer.

Samtlige av de 9 isolerte DNA-prøvene fra vann, samt de 4 isolerte DNA-prøvene fra jordprøver våren 2017 ble undersøkt ved PCR (n=13). Prøvene ble testet for 4 ulike ESBL-multiplexer (M1-M4), med til sammen 12 målgen. Prøvene ble også testet for 2 carbapenemase-multiplexer (Car1 og Car2), med til sammen 7 målgen for antibiotikaresistens, samt for tilstedeværelse av MRSA ved å analysere på 3 målgen. Resultatet av PCR-kjøringene ble visualisert ved gelelektroforese. Størrelsen på bånd ble vurdert ved å sammenligne med 100 bp stigen. Ved tilstedeværelse av positive bånd i multiplexene, ble aktuell primer kjørt på nytt i singleplex PCR.

Figur 15 nedenfor viser et eksempel bilde av prøver kjørt med ESBL primermixer M1 -M4. Størrelsesmarkør benyttet er Quik-loadR 100 bp DNA ladder. Positive bånd for prøve 9S med M2 og M4 primer multiplexer. Prøve 10S er positiv for M2. Liste over de ulike primere med målgen er gitt i Vedlegg 1. Resultater av de ulike gelkjøringene er gitt i Vedlegg 2.



Figur 15: Eksempelbilde av 4 ulike prøver og ESBL multiplexer på gel. Prøvene 3S, 6S, 9S og 10S kjørt med M1-M4 primer multiplexer.

Tabellene 11 - 13 nedenfor viser oversikt over resultatene fra PCR-kjøringene som ble utført. Positivt tegn (+) indikerer tilstedeværelse av bånd, mens negativt tegn (-) indikerer fravær av bånd.

Tabell 11: Tolkning av resultatene fra ESBL-multiplex PCR-kjøringene på isolerte DNA vann- og jordprøver som ble testet for tilstedeværelse av antibiotikaresistens-gener. + indikerer bånd.

| Målgen Prøve | M1 | | | | M2 | | | M3 | | | M4 | |
|------------------|--------|----------|-----|-----|----------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| | OXA-48 | CTX-Mgp2 | OXA | SHV | CTX-Mgp9 | CTX-Mgp1 | TEM | NDM | VIM | KPC | rpoB | 16S |
| 2 _i | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 6 _i | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 15 _i | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| 15M _i | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 3S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9S | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - |
| 10S | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |

Tabell 12: Tolkning av resultatene fra Car-multiplex PCR-kjøringene på isolerte DNA vann- og jordprøver som ble testet for tilstedeværelse av antibiotikaresistens-gener. + indikerer bånd.

| Målgen Prøve | Car-1 | | | | Car-2 | | |
|------------------|-------|--------|-----|-----|-------|------|-----|
| | CMY-2 | OXA-48 | IMP | VIM | NDM | SFC1 | KPC |
| 2 _i | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 _i | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 _i | - | - | - | - | - | - | - |
| 15M _i | - | - | - | + | - | - | - |
| 3S | - | - | - | - | - | - | - |
| 6S | - | - | - | - | - | - | - |
| 9S | + | - | - | - | - | - | - |
| 10S | - | - | - | - | - | - | - |

Tabell 13: Tolkning av resultatene fra MRSA-multiplex PCR-kjøringene på isolerte DNA vann- og jordprøver som ble testet for tilstedeværelse av antibiotikaresistens-gener. + indikerer bånd.

| Målgen Prøve | MRSA | | |
|-----------------|------|------|------|
| | spa | mecA | mecC |
| 1S | - | - | - |
| 4S | - | - | - |
| 5S | - | - | - |
| 11S | - | - | - |
| 12S | - | - | - |

Samtlige kjøringene med MRSA var negative. Ved PCR kjøring med Car-primere var prøve 9S positiv for CMY-2. For ESBL primermixer var jordprøve 15, positiv for CTX-Mgp1, og vannprøvene 9S og 10S var positive for både CTX-Mgp1 og SOT primerene.

6.5 PCR og sekvensering av 16S rRNA

Samtlige av de 9 rendyrkede koloniene fra vannprøvene ble sendt til identifisering ved bruk av 16S rRNA sekvensering. Ved kjøring på agarosegel var det positive bånd for 7 av disse etter amplifisering av 16S rRNA genet, mens prøvene 6S og 11S var negative etter 16S rRNA PCR kjøringen. Etter Sanger sekvensering var det var korte og dårlige sekvenser for samtlige prøver, og de ga ingen treff på identifisering ved kjøring i BLAST. På grunn av dårlige sekvensresultater, ble 4 av vannprøvene (3S, 6S, 9S og 10S) kjørt på nytt, med amplifisering av 16S rRNA, denne gangen med nytt Iproof PCR kit og nye 16S rRNA primere. Her var det 2 prøver, prøvene 3S og 9S som ikke hadde synlige bånd ved gelkjøring.

Tabell 14: Resultater av prøver sendt til 16S rRNA sekvensering og identifisering.

| Prøve | Primer | Resultat |
|---------------------------------------|----------|--|
| 1S, 3S, 4S, 5S, 6S, 9S, 10S, 11S, 12S | 16S rRNA | Ingen resultat |
| 6S | 16S rRNA | <i>Pseudomonas spp.</i> |
| 10S | 16S rRNA | <i>Escherichia coli</i> eller <i>Shigella flexneri</i> |

6.6 Sekvensering single- og multiplex PCR.

Basert på resultatene fra PCR kjøringene, ble 3 jordprøver isolert i fjor sendt til sekvensering, to på singleplex, og en på multiplex (se tabell 11). Ingen gode sekvenser ble oppnådd. Ny runde med sekvensering ble utført, hvor økt mengde templat ble benyttet, samt sekvensering med både Forward og Reverse primer for hver prøve ble benyttet, uten at dette ga resultater. Av vannprøvene ble prøve 9S og 10S sendt inn og sekvensert med singleplexer (se tabell 11).

Eksempel på resultat fra sekvensering av prøve 9S med bla_{CMY-2} primer er gitt i figur 16 nedenfor. De øvrige resultater er å finne i Vedlegg 3.

Range 1: 128078 to 128205 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps |
|---------------|---|---------------|-----------|
| 237 bits(128) | 5e-59 | 128/128(100%) | 0/128(0%) |
| Query 1 | CGCAATGCCCTGCTGGAGCGTTTTTCTCCTGAACGTGGCTGGCATCCATGTTGGCCTGAAC | 60 | |
| | | | |
| Sbjct 128078 | CGCAATGCCCTGCTGGAGCGTTTTTCTCCTGAACGTGGCTGGCATCCATGTTGGCCTGAAC | 128137 | |
| Query 61 | CCAGCGGGCCATATCAATAACGCTGGATTTACGCCATAGGCTTCGGCGTCAAGTTGTCC | 120 | |
| | | | |
| Sbjct 128138 | CCAGCGGGCCATATCAATAACGCTGGATTTACGCCATAGGCTTCGGCGTCAAGTTGTCC | 128197 | |
| Query 121 | CGGAGAAA 128 | | |
| | | | |
| Sbjct 128198 | CGGAGAAA 128205 | | |

```

complement (<1..>128)
  CDS
    /locus_tag="C7D56_27285"
    complement (<1..>128)
    /locus_tag="C7D56_27285"
    /inference="COORDINATES: similar to AA
    sequence:RefSeq:WP_000976515.1"
    /note="Derived by automated computational analysis
using
    gene prediction method: Protein Homology."
    /codon_start=2
    /transl_table=11
    /product="class C beta-lactamase CMY-16"
    /protein_id="AWD11885.1"
  
```

Figur 16: Resultat av sekvensering utført på prøve 9S.

Resultatene fra sekvensering med singleplex på viser at prøvene 9S og 10 S er positive for tilstedeværelse av TEM resistensgener. I tillegg er prøve 9S også positiv for CMY resistensgen.

7. DISKUSJON

I denne oppgaven har målet vært å undersøke for tilstedeværelse av antibiotikaresistente bakterier av klinisk relevans i vannprøver fra nærmiljøet, kartlegge slektskapet, og mulige resistensmekanismer til bakteriene. Fenotypisk deteksjon er utført ved å benytte selektive skåler, og ved å benytte genotypiske metoder som PCR og sekvensering har slektskap og resistensmekanismer blitt analysert på isolater fra disse bakteriene.

7.1 Fenotypisk deteksjon ved bruk av selektive skåler.

Ved vekst på selektive skåler ble det foretatt utstrykning to ganger. Dette gjøres både for å oppnå renkultur, og også fordi bakterievekst etter første gangs utstrykning kan skyldes tilstedeværelse av virulensfaktorer. Dette er da fenotypiske trekk ved bakteriene, ikke de genotypiske trekkene som man her er interesserte i å analysere. Totalt ble det dyrket bakterieprøver på 21 skåler, 3 ulike vannprøver på 4 ulike selektive medium, samt 3 ulike vannfilterprøver på ulike skåler med selektivt medium. Det var vekst på 5 skåler med MRSA selektivt medium. 4 skåler med vekst på ESBL selektivt medium, og vekst på 3 skåler med CRE medium. De selektive mediene som ble benyttet i denne studien er beregnet på diagnostisering av antibiotikaresistente *Enterobacteriaceae* av klinisk relevans. Det er viktig å ta dette med i betrakningen av resultatene. Vekst på skåler indikerer tilstedeværelse av resistensmekanisme mot antibiotikum, men hvilken form for resistensmekanisme bakteriene benytter seg av må kartlegges ved sekvensering. Fargescreening av bakteriekulturer på selektive medium ble benyttet for å finne et større mangfold av antibiotikaresistente fenotypiske bakterier i vannprøvene. Skålene med vekst på ESBL selektivt medium indikerer resistens mot β -laktamer som penicilliner og cefalosporiner. Vekst på skålene med CRE medium indikerer resistens mot alle β -laktamer, inkludert karbapenemer, mens vekst på MRSA skålene indikerer methicillin resistens.

Skålene for prøve 2S, 7S og 8S hadde lite vekst. Det ble ingen vekst ved oppdyrking i BHI medium for prøve nummer 2S og 7S. For prøve nummer 8S var det svak vekst, men det ble allikevel valgt å isolere DNA fra denne prøven, da det ble antatt at det var tilstrekkelig mengde celler i kulturen. Etter isolering var imidlertid ikke DNA-konsentrasjonen detekterbar i denne prøven. Totalt ble 12 bakteriekulturer oppkonsentrert fra bakterieskåler, og genomisk DNA ble isolert fra 10 bakteriekulturer.

Konsentrasjonen av de isolerte DNA prøvene varierte fra rundt 3 til 84 ng/ μ l. Renheten lå på mellom 1,13 og 1,86, hvor de fleste hadde verdier rundt 1,7. Verdiene til rene DNA isolater bør ligge over 1,8, kun tre av de isolerte prøvene var over denne verdien. Lavere verdier indikerer protein kontaminering av prøvene.

Vekst på selektive kromogene medier viser resistens mot antibiotikum, men for sikker identifisering av observerte fenotyper anbefales det å benytte andre deteksjonsmetoder. I dette studiet ble det benyttet multiplex og singleplex PCR, samt sekvensering på isolerte prøver.

7.2 MRSA PCR

Dyrking på MRSA ga vekst på fem skåler, og isolert genomisk DNA fra MRSA prøvene ble kjørt på PCR for å analysere for tilstedeværelse av *mecA*, *mecC* og *spa* gensekvenser.

MRSA er resistente mot de fleste β -laktamer, og bakteriene kan i tillegg være resistent mot andre typer antibiotikum. Resistens mot meticillin er forårsaket av *mecA* genet, og selv om dette antibiotikumet ikke lenger produseres, blir navnet MRSA i dag benyttet når det refereres til resistens

mot så å si alle β -lactam antibiotikum (Paterson, G. et al 2014). Tilstedeværelsen av mec-genet er en nødvendighet for at *S. aureus* skal kunne uttrykke meticillinresistens. Den strukturelle komponenten av mec-genet, *mecA*, koder for det penicillinbindende protein 2a (PBP2a) som gir resistens mot meticillin og andre semisyntetiske penicillinase-resistente β -laktamer (Peacock, S.J. et al 2015).

Ingen positive bånd ble detektert etter PCR kjøring med multiplex. Oppvekst på MRSA skåler indikerer tilstedeværelse av antibiotikaresistens, men da disse ikke har gitt utslag på PCR, indikerer dette at disse bakteriene benytter andre resistensgener eller mekanismer mot antibiotikum benyttet i mediet. Det har her blitt testet på klinisk relevante resistensgener. Oppvekst på MRSA skålene kan skyldes resistens forårsaket av andre, ukjente gener og /eller andre resistensmekanismer, eksempelvis effluks-pumper eller poriner.

I Norge er forekomsten av MRSA fortsatt lav, blant de laveste i verden, med en andel på fortsatt under én prosent, men forekomsten er økende (NORM-VET 2016).

7.3 PCR og sekvensering av jordprøver.

Det ble kjørt PCR på fire jordprøver som var blitt isolert og rensset av masterstudenter i fjor. For jordprøvene var det problemer med svake, uspesifikke bånd ved PCR kjøring, men en prøve (15_i) ble etter kjøring på multiplex og singleplex funnet å være positiv for VIM-genet. Dette er en stor familie innen gruppen ESBL_{KARBA-B}. Disse genene er som regel å finne på integroner, inkorporert som genkassetter. Dersom disse er plassert på transposomer eller plasmider, vil overføring til andre bakterier lett forenkles (Queenan, A. et al 2007), og det er rapportert global spredning av VIM-gener (Norman, P. et al 2011).

Det ble sendt inn prøver for sekvensering på singleplex, men ingen gode sekvenser ble oppnådd, tilstedeværelse av VIM på prøve 15_i ble derfor ikke confirmert med Sanger sekvensering. Problemet kan skyldes lav DNA-konsentrasjon på prøver, eventuelt kontaminerte prøver, da renheten ikke ble målt på disse prøvene. Samtlige av jordprøvene hadde lav konsentrasjon, med høyest verdi på 20,8 ng/ μ l (prøve 6_i). Konsentrasjon på prøver til sekvensering bør ligge fra 20 -80 ng/ μ l. Prøver ble sendt inn på nytt for sekvensering, både med økt mengde templat, samt at det ble sendt inn prøver med både Forward og Reverse primere uten at dette resulterte i gode sekvenser. Faktorer som lav konsentrasjon og eventuelt kontaminering av templat kan være mulige årsaker til dårlige resultater.

Mulig tilstedeværelse av VIM-gener fra jordprøver indikerer samme resultat som oppnådd av masterstudenter i 2017, og i og med at VIM-gener stort sett er assosiert med integroner passert på transposomer eller plasmider, utgjør disse genene en av de viktigste typene med hensyn på effektiv geografisk spredning (Poirel, L. et al 2012).

Som nevnt var det for jordprøvene generelt problemer med svake, uspesifikke bånd ved PCR kjøring. Dette kan være artefakter, såkalte primer-dimers, biprodukter fra PCR. Dette kan oppstå når to primere binder hverandre og blir amplifisert av DNA-polymerasen i større grad enn det faktiske målgenet. I tillegg kan det være at konsentrasjoner og mengder på reaktanter i PCR-mixen bør endres for å optimalisere metoden. Annealingtemperatur og antall sykluser i PCR-kjøringer er også faktorer som spiller inn på resultatet, og som eventuelt kan justeres. Ved eksempelvis å gå ned på antall sykluser, vil også mengde uspesifikke bindinger reduseres.

Jordprøvene ble også sendt til sekvensering på 16 S rRNA, men samtlige av resultatene var dårlige. Renhet til DNA-templat er en forutsetning for gode resultater, i tillegg bør DNA konsentrasjonen ligge på mellom 20 og 80 ng/ μ l.

Det var også usikkerhet rundt kvaliteten og konsentrasjonen på 16 S rRNA primerene som ble benyttet, da disse hadde vært benyttet av masterstudenter sist høst. Nye primere ble bestilt og benyttet ved identifisering av bakterier i vannprøver. Her ble det oppnådd gode sekvenser, men beklageligvis ble kun to av jordprøvene kjørt på nytt med de nye primerene. Dårlig primer kvalitet kan derfor forklare problemene med de dårlige sekvensresultatene fra jordprøvene.

7.4 PCR og sekvensering av vannprøver.

Som nevnt var det for jordprøvene generelt problemer med svake, uspesifikke bånd ved PCR kjøring, såkalte primer-dimers, biprodukter fra PCR. Også på vannprøver var det uspesifikke bånd, og endringer på PCR-oppsett ble derfor utført. For carbapenemase PCR ble annealingtemperatur endret fra 62°C til 60°C, og antall sykluser satt ned fra 40 til 30. For ESBL PCR ble antall sykluser redusert fra 35 til 28. I begge tilfeller resulterte dette i en bedre optimalisering av metoden, med tydeligere, mer spesifikke bånd ved PCR kjøring.

For vannprøvene ble samtlige av prøvene isolert fra ESBL-skåler negative for mastermix 1 og 3, men to prøver, 9S og 10S, fikk positive bånd for bla_{TEM} og bla_{CTX-Mgp1} i mastermix 2. For kjøring på carbapenem multiplexer, Car 1 og Car 2, ble det negativt resultat for samtlige prøver med unntak av 9S, som ga positivt bånd på Car 1 multiplex. Ved å sammenligne størrelsesmarkører og kjøre disse på nytt med aktuelle singleplex, ble det påvist at prøve 10S var positiv for TEM, og prøve 9S var positiv for både TEM og CMY-2.

Ved sekvensering ble det bekreftet at prøve 9S inneholdt resistensgenene TEM og CMY-2. Bakteriens identiteten ble sendt til sekvensering, men resultatene var for dårlige til å kunne si noe om identitet. Basert på CRE-fargescreening skulle dette være enten *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*, samtlige Gram-negative tarmbakterier. De selektive mediene som ble benyttet i denne studien er beregnet på diagnostisering av CRE-holdige *Enterobacteriaceae* i kliniske prøver. Det er viktig å ta dette med i betraktningen av resultatene, og det blir derfor vanskelig å sammenligne disse resultatene. Fargescreening av bakteriekulturer på selektive medium ble benyttet for å prøve å finne et større mangfold av CRE og ESBL fenotyper i vannprøvene. Ideelt skulle disse resultatene vært sammenlignet med 16S rRNA sekvenseringsresultater, men som nevnt ble sekvensene for dårlige. Prøve 6S fikk derimot samme resultat som prøve 9S på fargescreening. Denne ble sekvensert, og resultatet fra sekvensering med 16S bekreftet at prøve 6S var en *Pseudomonas subspecies*, enten *P. protegenes*, *P. saphonophila*, *P. sesami* eller *P. fluorescens*. Det er derfor grunn til å anta at prøve 9S er av samme bakterietype.

Pseudomonas er jord- og vannbakterier som finnes overalt i naturen, og den trives best i fuktige omgivelser. *Pseudomonas* spp. tilhører familien *Pseudomonadaceae*. Det er en Gram-negativ, psykrotrof, ikke-fermentativ bakterie. I fuktige omgivelser vil den kunne formere seg. Den finnes i liten grad ellers i den normale flora hos mennesker, men tilførsel fra omgivelsene skjer jevnlig. Den er i stand til å formere seg i bortimot rent vann (FHI). *Pseudomonas*-arter er kjent for å inneha flere ibrørende og ervervede resistensgener assosiert med mobilbare genelementer, samt å utveksle disse med andre familier av Gram-negative basiller som *Enterobacteriaceae* (Kittinger, C. et al 2016). *Pseudomonas* er derfor kjent som utgangspunkt for spredning av flere viktige resistensgener, eksempelvis karbapenemaser. Forekomsten og spredning av karbapenemaser er blitt et betydelig globalt helseproblem, da de inaktiverer en betydelig antibiotikaklasse (B.A. Lindseth, pers. med.).

For prøve 10S indikerte ESBL fargescreening at dette var en *E. coli*. Resultatene fra 16S rRNA sekvensering bekreftet det til å være en *E. coli* eller en *Shigella flexneri*. Begge disse tilhører familien

Enterobacteriaceae, og er Gram-negative, ikke-sporedannende, fakultativt anaerobe stavbakterier. Det er et nært fysiologisk slektskap mellom disse, og det er argumenter for at *Shigella* burde klassifiseres som en subgruppe av *E. coli* (Granum, P.E. 2015). *E. coli* er en normal tarmbakterie hos mennesker og dyr. For *Shigella* derimot, er det eneste reservoaret gastrointestinaltraktus hos mennesker (og aper). Friske smittebærere skiller ut *Shigella*-bakterien i feces. Det er en generell oppfatning at *Shigella* kun kan overleve kort tid i miljøet. Den regnes for å være svak i konkurranse med normalfloraen som til enhver tid finnes i naturen (Granum, P.E. 2015). Det er derfor grunn til å anta at prøve 10S er en *E. coli*.

En interessant betraktning er at disse vannprøvene ble sanket inn i februar måned, under et tykt lag med is. *E. coli* kan vokse ved temperaturer rundt 7°C, men eksakt toleransegrense er vanskelig å fastsette, da andre faktorer som påvirker vekst, som næringsinnhold, temperatur, pH og salter også må vurderes i denne sammenheng. Ved temperaturer som nærmer seg nedre vekstgrense, vil *E. coli* normalt bli utkonkurrert av psykrotrofe bakterier som eksempelvis *Pseudomonas*-arter som (Granum, P.E. 2015). Funn av *E. coli* i vann vurderes generelt som tegn på fersk fekal forurensning, men bakterien kan også formere seg i vann dersom temperatur og næringstilgang er gunstig, som eksempelvis i sterkt fekalt forurenset vann (Granum, P.E. 2015). Niagara renner ut fra Andedammen, og som navnet tilsier er denne dammen et tilholdssted for ender i hele den isfrie perioden av året. Det er derfor stor sannsynlighet for at vannprøvene inneholder sterkt fekalt forurenset vann.

Det er også grunn til å nevne at det for noen år tilbake ble tilkjørt store mengder jord til Niagara og områdene rundt i forbindelse med opparbeiding av bekken. Tilkjørt jord kom fra nærliggende gårder, og dette kan også være en medvirkende årsak til funn av antibiotikaresistente bakterier i vannet.

Det var som tidligere nevnt generelt dårlige sekvenseringsresultater, men ved sekvensering på singleplex ble det bekreftet at prøvene 9S og 10S hadde tilstedeværelse av *bla*_{TEM} gener. Flere av disse genene er assosiert med ulike transposoner, og de plasmid-medierte *bla*_{TEM-1} og *bla*_{TEM-2} β-laktamasene er vanlige i Gram-negative bakterier, spesielt i *Enterobacteriaceae*. Opptil 90% av ampicillinresistensen i *E. coli* skyldes produksjonen av *bla*_{TEM-1}

For prøve 9S ble det, i tillegg til *bla*_{TEM}, også bekreftet tilstedeværelse av *bla*_{CMY-2}. Resistensgenene *bla*_{CMY-2}, sammen med *bla*_{CTX-M-15}, er blitt funnet å utgjøre de mest spredte gener for ESBL og plasmid-mediert AmpC produsert av *E. coli*-stammer globalt (Bajaj, P. et al 2016). Resistens mot β-laktam antibiotika i Gram-negative bakterier forårsakes hovedsakelig av AmpC-lignende β-laktamaser som er kodet av *bla*_{CMY-2} genet, samt ESBL'er som *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} og *bla*_{CTX-M} gener.

For prøver med påvist tilstedeværelse av resistensgener skulle det i utgangspunktet benyttes MinION tredjegenasjons helgenomsekvensering til sekvensering av resistensgenene. Dette for å bekrefte funnene, samt i tillegg for å søke etter andre resistens genotyper enn de det ble testet for i PCR kjøringene. På grunn av tidspress og tekniske utfordringer ble det beklageligvis ikke tid til å utføre MinION analyser.

Medlemmer av *Enterobacteriaceae*-familien inkluderer flere human-patogener som kan overføres via forurenset mat og vann. Tilstedeværelsen av TEM og CMY gener på mobile genetiske elementer som plasmider, transposoner og integroner gjør at de kan overføres horisontalt til andre bakterier, og i enkelte tilfeller gjøre humanpatogene bakterier multiresistente. At *bla*_{TEM} og *bla*_{CMY-2} bærende bakterier av *Enterobacteriaceae*-familien finnes i akvatisk miljø i et område med stort potensial for utveksling av bakterier mellom mennesker og dyr er bekymringsfullt.

7.5 Forslag til videre forskning

Ved videre arbeid basert på dette studiet kan det være interessant å undersøke flere prøver fra miljøet for mulige funn av resistensgener. Det vil også være interessant å kartlegge disse genes plasseringer i bakterienes genom, for å undersøke hvorvidt disse genene har evnen til å forflytte seg til andre bakterier ved horisontal genoverføring, og mulig videre spredning til eksempelvis planter og beitende dyr.

For prøver med påvist tilstedeværelse av resistensgener skulle det i utgangspunktet vært benyttet MinION tredjegerasjons helgenomsekvensering. Dette skulle utføres for å bekrefte positive funn, samt også for å søke etter tilstedeværelse av andre resistens genotyper enn de det ble testet for i PCR kjøringene. På grunn av tekniske utfordringer ble det ikke tid til å utføre MinION analyser. Dette er derfor noe som det hadde vært interessant å gå videre med.

8. KONKLUSJON

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke for tilstedeværelse av MRSA og ESBL produserende bakterier av klinisk relevans i vannprøver fra nærmiljøet. Slektskapet, samt mulige resistensmekanismer til disse isolatene ble bestemt ved å benytte ulike deteksjonsmetoder.

Ved å benytte selektive medier, genotypiske deteksjonsmetoder som PCR og Sanger sekvensering ble det i vannprøvene påvist tilstedeværelse av både MRSA, ESBL og ESBL_{KARBA} produserende bakterier. Ved kjøring av PCR på de isolerte prøvene ble det påvist tilstedeværelse av CMY-2 og TEM gener. Det ble også kjørt PCR på noen jordprøver isolert av masterstudenter i fjor. Her ble det påvist tilstedeværelse av VIM-gener i en prøve. Dette er gener som er assosiert med mobile, genetiske elementer, og som følge av dette utgjør de en av de viktigste typene med hensyn på effektiv geografisk spredning. Ingen sekvenseringsresultater ble oppnådd for denne jordprøven. Basert på resultatene fra sekvensering av vannprøvene med 16S rRNA, var det sannsynligvis en *Pseudomonas* spp. som var bærer av både CMY-2 og TEM genene, mens det sannsynligvis var en *E. coli* som fikk påvist TEM genet. For prøver med påvist tilstedeværelse av resistensgener skulle det i utgangspunktet blitt benyttet MinION tredjegerasjons helgenomsekvensering. Dette for å bekrefte funnene, samt i tillegg søke etter andre resistens genotyper enn de det ble testet for. På grunn av tidspress og tekniske utfordringer ble det ikke tid til å utføre MinION analyser.

Oppsummert kan det konkluderes med at: (i) det ble detektert antibiotikaresistens bakterier i vannprøvene, (ii) slektskapet til isolatene stammet fra bakterier som er vanlige i fuktig miljø og forurenset vann, (iii) ESBL- og CAR- resistensgenene TEM og CMY som ble funnet, er assosiert med mobile genetiske elementer som plasmider, noe som gjør at de kan overføres horisontalt til andre bakterier.

Det at TEM og CMY-2 bærende bakteriene ble funnet i akvatisk miljø, i et område hvor det er et stort potensial for videre spredning av bakterier mellom mennesker og dyr, er bekymringsfullt. Disse resultatene viser viktigheten av å kartlegge ulike miljø, noe som igjen vil bidra til å øke vår kunnskap om spredning av antibiotikaresistens, på tvers av ulike økosystem.

Antibiotikaresistens er en naturlig adaptiv prosess som har eksistert i bakterier i miljøet i årtusener, men denne resistensen kan ha blitt akselerert av økt forekomst av antibakterielle midler i miljøet som følge av medisinsk og landbruksbasert etterspørsel. På grunn av fare for zoonotiske sykdommer er det viktig med økt kunnskap om utbredelse og spredning av antibiotikaresistente patogener i miljøet. Miljøreservoarenes bidrag med hensyn på resistensutvikling er lite forstått, både mellom bakterier og på tvers av ulike miljø. Det trengs derfor mer forskning for å øke kunnskapen om hvordan resistens oppstår og smitter, både mellom mat, dyr, mennesker og miljø.

9. REFERANSER

Bajaj, P. et al.: *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 417. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2016.00417>

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

Bevan, E., et al.: Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 2145–2155.

Brolund, A.: Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *InfectEcolEpidemiol* 2014; 4: 10.3402/iee.v4.24555.

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

Carattoli, A.: Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother*. June 2009 vol. 53 no. 6 2227-2238

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

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

Davies, J. et al. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. September 2010 vol. 74 no. 3 417-433.
<http://mmlbr.asm.org/content/74/3/417.full.pdf&a=bi&pagenumber=1&w=100>

Del Solar, G. et al.: Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998 Jun; 62(2): 434–464.

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

EARS-Net surveillance data. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Nov.2017. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EAAD%20EARS-Net%20summary.pdf>

Farrington, M.: *Antibacterial drug*. *Clinical Pharmacology*, 11th ed., 2012,

Fernandez, L. et al.: Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct; 25(4): 661–681.

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

Garcia-Garotte, F. et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *Journal of Antimicrobial*

Chemotherapy, Volume 69, Issue 1, 1 January 2014, Pages 45–50,
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt327>

Gaustad, P.: Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier. Tidsskr Nor Legeforen 2001; 121: 3090-4

Giske, C., et al.: Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009 Jan; 63(1): 1-4.

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

Green, B. et al.: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview for manual therapists. Journal of Chiropractic Medicine (2012) 11, 64–76.

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

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

Huang, X. et al.: Characteristics of Plasmids in Multi-Drug-Resistant Enterobacteriaceae Isolated during Prospective Surveillance of a Newly Opened Hospital in Iraq. PLoS One 2012; 7(7): e40360
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394789/>

Huddleston, J.R.: Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. Infect Drug Resist; 2014; 7: 167–176.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073975/>

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

Kittinger, C. et al.: Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 586. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00586>

Knapp, C. W. et. Al.: Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. Environ. Sci. Technol., 2010, 44 (2), pp 580–587.
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/es901221x>

Kohanski et al.: How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nature Reviews Microbiology; **volume 8**, s. 423–435 (2010),
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&retmode=ref&cmd=prlinks&id=20440275>

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

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

Meletis, G., et al.: Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. [Ther Adv Infect Dis](#)

Metrichor.com (2018)

National strategi mot antibiotikaresistens 2015-2020.

https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi_antibiotikaresistens_230615.pdf

NORM NORM-VET2016. <https://www.vetinst.no/overvaking/antibiotikaresistens-norm-vet>.

Norman, A. et al.: Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2009 Aug 12; 364(1527): 2275–2289. doi: 10.1098/rstb.2009.0037

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

Paterson, D., et al.: Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 2005. 18(4): p. 657-86.

Paterson, G. et al.: The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 2014 Jan; 22(1): 42–47.

Peacock SJ, Paterson GK: Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:577.

Poirel, L. et al.: OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 67, Issue 7, 1 July 2012, Pages 1597–1606.

Pruden, A. et al.: Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives*, August 2013; 121(8): 878-885. doi: [10.1289/ehp.1206446](https://doi.org/10.1289/ehp.1206446)

Queenan, A. et al.: Carbapenemases: The versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007 Jul; 20(3): 440–458. <https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.00001-07>

Resistance Genes to the Environment. <https://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/121/8/ehp.1206446.pdf>

Rodloff et al.: Susceptible, Intermediate, and Resistant – The Intensity of Antibiotic Action. *Dtsch Arztebl Int*, 2008 Sep; 105(39): 657–662. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701059/#>

Shakeri, F. et al.: *International Journal of Microbiology*, Volume 2010, Article ID 351397, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/351397>

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

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

Steinbakk, M., et al.: Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak Rapport fra tverrsektoriell ekspertgruppe. FHI, 2014.

<https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2014/2014-antibiotikaresistens.pdf>

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

Waseem, H., et al.: Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environment Research*, Volume 89, Number 10, 2017.

Webber, M.A. et al.: The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 51, Issue 1, 1 January 2003, Pages 9–11,

<https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>

WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

Wielders, C.L.C. et al.: *mecA* Gene Is Widely Disseminated in *Staphylococcus aureus* Population. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002 Nov; 40(11): 3970–3975.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2012). *Prescott's principles of microbiology*, international edition, 1 ed., 2009. New York, USA: McGraw-Hill.

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

VEDLEGG

Vedlegg A

Tabell A.1: Liste over de ulike primerene i ESBL-primermixen.

| M1 | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp | Referanse |
|-----------------------|------------------------|----------------------------|---------|---------------------------------------|
| MultiOxa48-F | GCTTGATCGCCCTCGATT | Bla _{OXA-48} | 281 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiOxa48-R | GATTTGCTCCGTGGCCGAAA | | | |
| MultiCTXMGp2_F | CGTTAACGGCACGATGAC | Bla _{CTX-M(Gr.2)} | 404 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiCTXMGp2_R | CGATATCGTTGGTGGTXCCAT | | | |
| MultiTSOO_F | GGCACCAGATTCAACTTTCAAG | Bla _{OXA} | 564 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiTSOO_R | GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG | | | |
| MultiTSOS_F | AGCCGCCTTGAGCAAATTAAC | Bla _{SHV} | 713 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiTSOS_R | ATCCGCAGATAAATCACCAC | | | |
| M2 | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp | Referanse |
| MultiCTXMGp9_F | TCAAGCCTGCCGATCTGGT | Bla _{CTX-M(Gr.9)} | 561 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiCTXMGp9_R | TGATTCTCGCCGCTGAAG | | | |
| MultiCTXMGp1_F | TTAGGAAXTGTGCCGCTGYA | Bla _{CTX-M(Gr.1)} | 688 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiCTXMGp1_R | CGATATCGTTGTGGTXCCAT | | | |
| MultiTSOT_F | CATTTCCGTGTGCCCTTATTC | Bla _{TEM} | 800 bp | Dallenne et. al 2010 |
| MultiTSOT_R | CGTTCATCCATAGTTGCTGAC | | | |
| M3 | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp | Referanse |
| NDM_F | TGGCCCGCTCAAGGTATTTT | bla _{NDM} | 157 bp | B.A. Lindstedt (upub.) NC_022375.1 |
| NDM_R | GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT | | | |
| VIM_F | ATAGAGCACACTCGCAGACG | bla _{VIM} | 564 bp | B.A. Lindstedt (upub.) NC_020452.1 |
| VIM_R | TTATTGGTCTATTTGACCGCGT | | | |
| KPC_F | TCCGTTACGGCAAAAATGCG | bla _{KPC} | 460 bp | B.A. Lindstedt (upub.) NC_025183.1 |
| KPC_R | GCATAGTCATTTGCCGTGCC | | | |
| M4 (Positiv kontroll) | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp | Referanse |
| rpoB-F | CAGGTCGTCACGGTAACAAG | rpoB | 512 bp | Arabestani et. al 2014 |
| rpo-R | GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC | | | |
| 16S-F | AGAGGTTTGATCXTGGCAG | 16S rRNA | 1505 bp | <i>Generic</i> |
| 16S-R | GXTACCTTGTTACGACTT | | | |

Tabell A.2: Liste over de ulike primerene i Carbapenemase Multiplexene.

| CAR 1 | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp | Referanser |
|--------------|------------------------|----------------------|---------|------------------------------------|
| CMY2-F | GCATCTCCCAGCCTAATCCC | Bla _{CMY-2} | 188 bp | B.A. Lindstedt (upub.) |
| CMY2-R | TTCTCCGGGACAACCTTGACG | | | |
| MultiOxa48-F | GCTTGATCGCCCTCGATT | Bla _{OXA48} | 281 bp | Dallenne et. al 2010. |
| MultiOxa48-R | GATTTGCTCCGTGGCCGAAA | | | |
| IMP-F | ACAGGGGAATAGAGTGGCT | Bla _{IMP} | 393 bp | B.A. Lindstedt (upub.) AJ223604 |
| IMP-R | AGCCTGTTCCCATGTACGTT | | | |
| VIM-F | ATAGAGCACACTCGCAGACG | Bla _{VIM} | 564 bp | B.A. Lindstedt (upub.) NC_020452. |
| VIM-R | TTATTGGTCTATTTGACCGCGT | | | |
| | | | | |
| CAR2 | Sekvens (5' – 3') | | | |
| NDM_F | TGGCCCCGCTCAAGGTATTTT | Bla _{NDM} | 157 bp | B.A. Lindstedt (upub.) NC_022375.1 |
| NDM_R | GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT | | | |
| SFC1-F | GGAGGGCGAATGGGGTTTA | Bla _{SFC-1} | 268 bp | B.A. Lindstedt (upub.) AY354402.1 |
| SFC1-R | CACTGTACTGCAGAGTGGCA | | | |
| KPC_F | TCCGTTACGGCAAAAATGCG | bla _{KPC} | 460 bp | B.A. Lindstedt (upub.) NC_025183.1 |
| KPC_R | GCATAGTCATTTGCCGTGCC | | | |

Referanser:

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

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

Tabell A.3: Liste over de ulike primerene i MRSA multiplexen.

| MRSA | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp |
|-------------|------------------------|--------|------------|
| Primer 1 | | | |
| mecA-P4 | TCCAGATTACAACCTCACCAGG | mecA | 162 bp |
| mecC-F | GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC | mecC | 138 bp |
| spa-1113F | TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC | | |
| Primer 2 | | | |
| mecA-P7 | CCACTTCATATCTTGTAACG | mecA | 162 bp |
| mecC-R | GAAGATCTTTCCGTTTCAGC | mecC | 138 bp |
| spa-1514R | CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT | Spa | 200-600 bp |

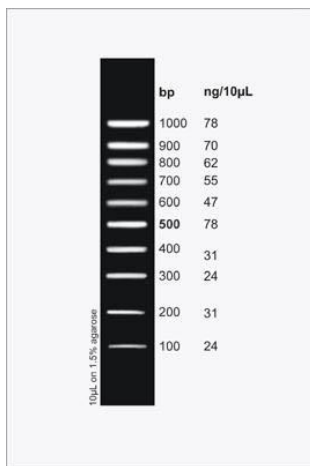
Referanse:

Stegger, M et al.: Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* (LGA251). *Clin Microbiol Infect.* 2012 Apr; 18(4):395-400.

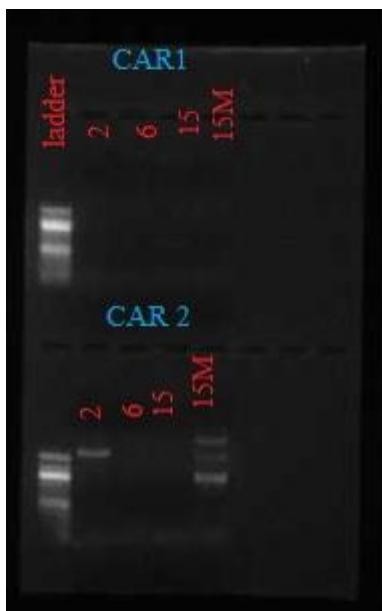
Tabell A.4: Primerparet som ble brukt ved 16S rRNA amplifisering før Sanger-sekvensering.

| Primer | Sekvens (5' – 3') | Målgen | Ant. bp |
|-----------|---------------------|----------|---------|
| Forward 1 | GAGTTTGATCCTGGCTCAG | 16S rRNA | 1500 bp |
| Reverse 1 | GGTACCTTGTTACGACTT | | |

Vedlegg B

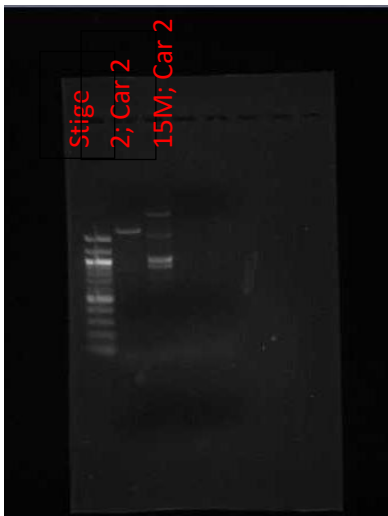


Figur B.1: Bilde av 100 bp ladder som ble benyttet som størrelsesmarkør.



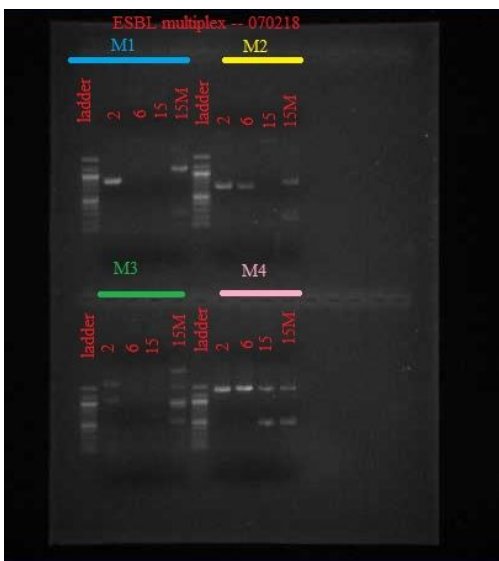
Figur B.2: Gelbilde av Multiplex PCR med Car1 og Car 2 primere på jordprøver.

Bånd på prøvene 2 og 15M, settes opp på ny gel for konfirmasjon.



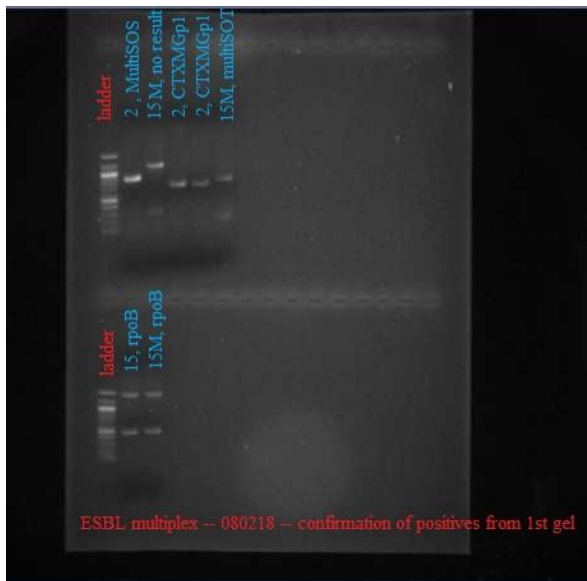
Figur B.3 Gelbilde av Multiplex PCR med Car2 på to av jordprøvene.

Uspesifikt bånd for prøve 2, prøve 15M skal kjøres på nytt med singleplex



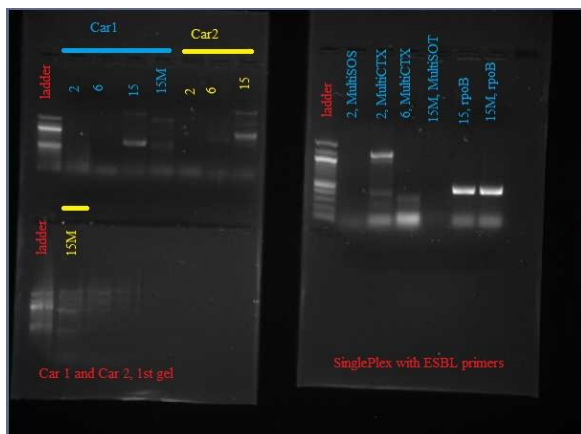
Figur B.4 Gelbilde av Multiplex PCR med fire ESBL multiplexer på jordprøvene.

Prøvene 2 og 15M settes opp på ny gel for konfirmasjon av bånd.



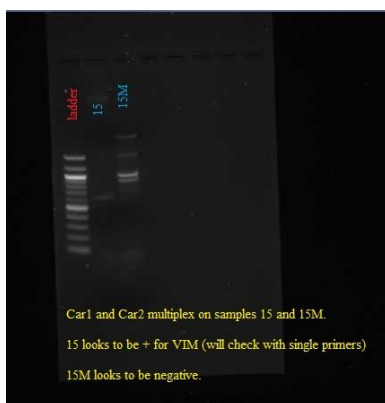
Figur B.5 konfirmering av positive prøver fra B.4.

Falsk positiv for 15M på M1, bånd på rundt 1000 bp, som er utenfor aktuelt område.



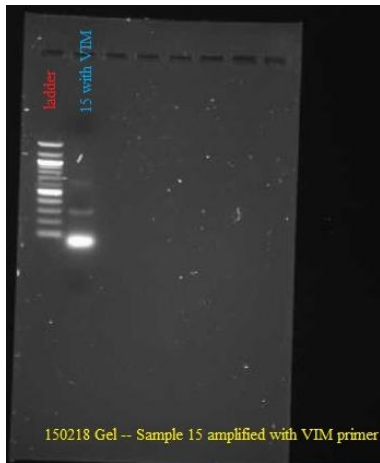
Figur B.6 Gelbilde av Multiplex PCR med Car 1 og Car 2, samt ESBL singleplex PCR på jordprøvene som var positive i B.5.

Endret annealingtemp. Bånd rundt 500 pb for prøve 15 med Car1 og Car2.



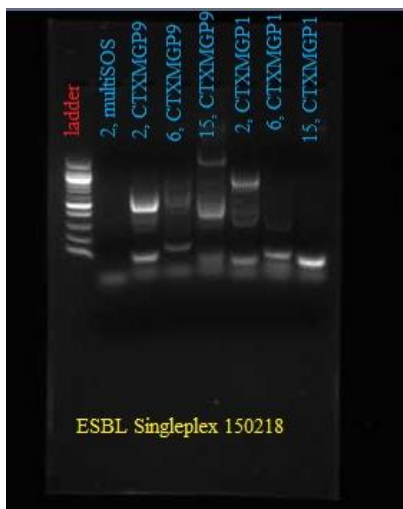
Figur B.7 Konfirmering av positive jordprøver fra B.6.

Prøve 15 ser positiv ut for VIM, prøve 15M ser ut til å være negativ.



Figur B.8 Prøve 15 med VIM-primer.

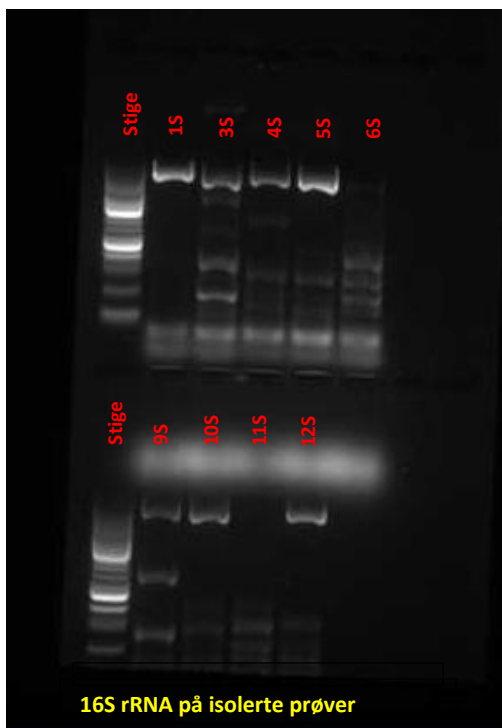
Bånd på litt over 500 bp, noe som stemmer med VIM som skal ligge på 564 bp.



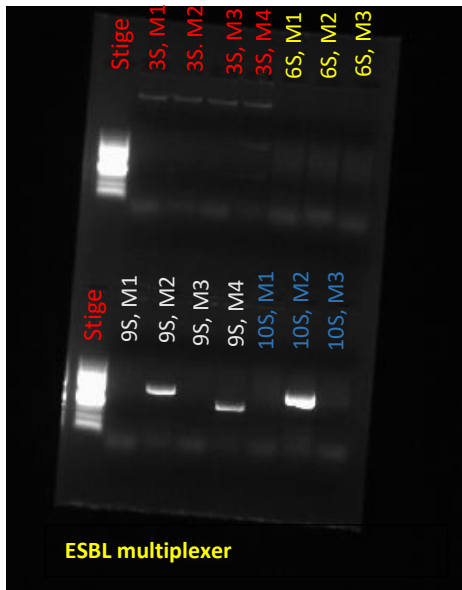
Figur B.9 Gelbilde av ESBL singleplex PCR på jordprøver.



Figur B.10 Gelbilde av ESBL singleplex PCR på jordprøver.

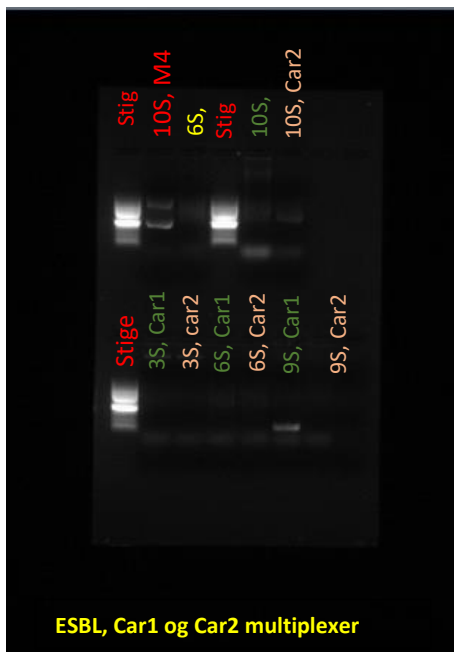


Figur B.11 Gelbilde av 16S rRNA PCR på vannprøvene.



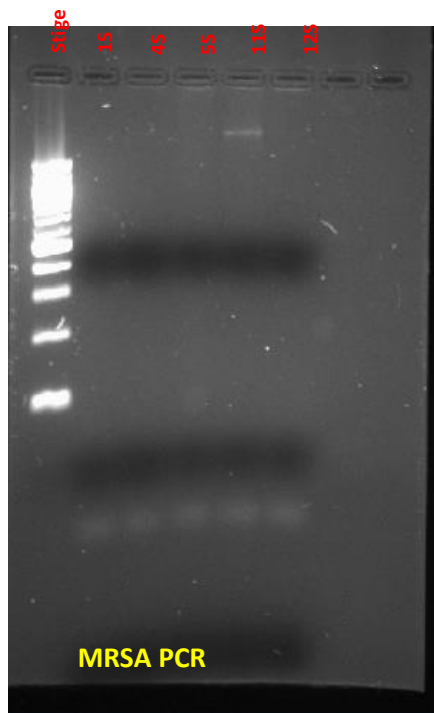
Figur B.12 Gelbilde av ESBL multiplex PCR vannprøvene.

Positive bånd for prøve 9S og 10 S med M2. (M4 er positiv kontroll)



Figur B.13 Gelbilde av ESBL- og Car- multiplex PCR vannprøvene.

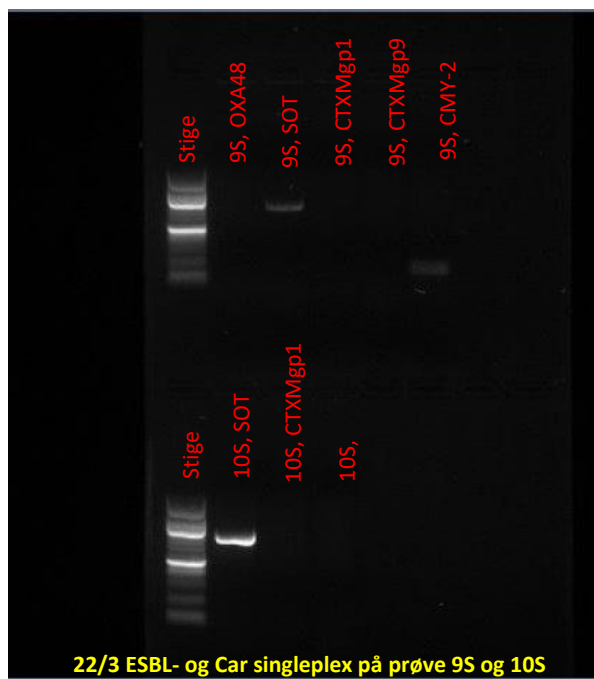
Positivt bånd for 9S med Car1.



Figur B.14 Gelbilde av MRSA PCR på vannprøvene.

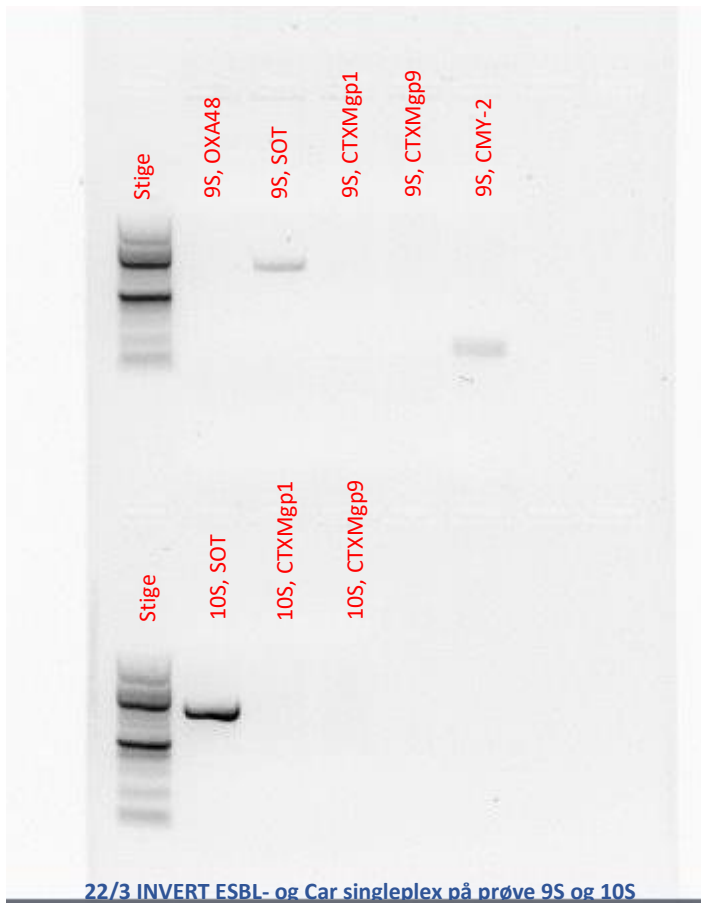
Samtlige er negative.

Gel 22/3 (PCR kjørt 21/3)

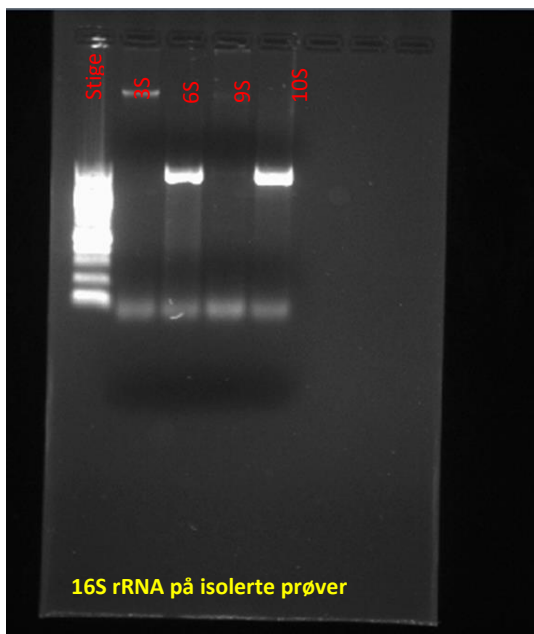


Figur B.15 Gelbilde av ESBL- og Car- singleplex PCR på positive vannprøver.

9S positiv for TEM (800 bp) og CMY-2 (188 bp). 10S positiv for TEM (800 bp).



Figur B.16 Invert gelbilde av ESBL- og Car- singleplex PCR på positive vannprøver.



Figur B.17 Gelbilde av 16S rRNA PCR på vannprøver.

Positive bånd kun for 6S og 10S (1500 bp).

Vedlegg C

Resultater av sekvensering utført på prøve 9S med bla_{CMY-2}

Range 1: 128078 to 128205 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|---------------|-----------|---------|
| 237 bits(128) | 5e-59 | 128/128(100%) | 0/128(0%) | Plus/PI |
| Query 1 | CGCAATGCCCTGCTGGAGCGTTTTCTCCTGAACGTGGCTGGCATCCATGTTGGCCTGAAC | 60 | | |
| | | | | |
| Sbjct 128078 | CGCAATGCCCTGCTGGAGCGTTTTCTCCTGAACGTGGCTGGCATCCATGTTGGCCTGAAC | 128137 | | |
| Query 61 | CCAGCGGGCCATATCAATAACGCTGGATTTACGCCATAGGCTTCGGCGTCAAGTTGTCC | 120 | | |
| | | | | |
| Sbjct 128138 | CCAGCGGGCCATATCAATAACGCTGGATTTACGCCATAGGCTTCGGCGTCAAGTTGTCC | 128197 | | |
| Query 121 | CGGAGAAA 128 | | | |
| | | | | |
| Sbjct 128198 | CGGAGAAA 128205 | | | |

complement (<1..>128)

```

/locus_tag="C7D56_27285"
CDS complement (<1..>128)
/locus_tag="C7D56_27285"
/inference="COORDINATES: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_000976515.1"
/note="Derived by automated computational analysis

```

using

```

gene prediction method: Protein Homology."
/codon_start=2
/transl_table=11
/product="class C beta-lactamase CMY-16"
/protein_id="AWD11885.1"

```

Figur C.1: Resultater av sekvensering utført på prøve 9S med bla_{TEM}

Range 1: 68832 to 69589 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--|--------------|-----------|---------|
| 1397 bits(756) | 0.0 | 757/758(99%) | 0/758(0%) | Plus/PI |
| Query 1 | TTCTGTTTTTTGCTCNCCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG | 60 | | |

```

|||||
Sbjct 68832 TTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG 68891

Query 61 GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTC 120
|||||
Sbjct 68892 GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTC 68951

Query 121 GCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTAT 180
|||||
Sbjct 68952 GCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTAT 69011

Query 181 TATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG 240
|||||
Sbjct 69012 TATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG 69071

Query 241 ACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG 300
|||||
Sbjct 69072 ACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG 69131

Query 301 AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAA 360
|||||
Sbjct 69132 AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAA 69191

Query 361 CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTC 420
|||||
Sbjct 69192 CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTC 69251

Query 421 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA 480
|||||
Sbjct 69252 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA 69311

Query 481 CGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTC 540
|||||
Sbjct 69312 CGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTC 69371

Query 541 TAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC 600
|||||
Sbjct 69372 TAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC 69431

Query 601 TGCCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG 660
|||||
Sbjct 69432 TGCCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG 69491

```

```

Query 661 GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA 720
          |||
Sbjct 69492 GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA 69551

Query 721 TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA 758
          |||
Sbjct 69552 TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA 69589

```

<1..>758

```

          /gene="blaTEM"
          /locus_tag="AM407_25545"
CDS      <1..>758
          /gene="blaTEM"
          /locus_tag="AM407_25545"
          /inference="COORDINATES: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_032489893.1"
          /note="Derived by automated computational analysis
using
          gene prediction method: Protein Homology."
          /codon_start=2
          /transl_table=11
          /product="class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-1"
          /protein_id="AWD06333.1"

```

Figur C.2: Resultater av sekvensering utført på prøve 9S med bla_{TEM}

Range 1: 7301 to 8052 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--|--------------|-----------|---------|
| 1380 bits(747) | 0.0 | 751/753(99%) | 1/753(0%) | Plus/PI |
| Query 4 | GT TTTTGCTCNCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA | 63 | | |
| Sbjct 7301 | GT TTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA | 7360 | | |
| Query 64 | CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC | 123 | | |
| Sbjct 7361 | CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC | 7420 | | |
| Query 124 | GAAGAACGTTTTCCAATGCTGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC | 183 | | |
| Sbjct 7421 | GAAGAACGTTTTCCAATGCTGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC | 7480 | | |
| Query 184 | CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG | 243 | | |

```

|||||
Sbjct 7481 CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTG 7540

Query 244 GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 303
|||||
Sbjct 7541 GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 7600

Query 304 TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 363
|||||
Sbjct 7601 TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 7660

Query 364 GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 423
|||||
Sbjct 7661 GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 7720

Query 424 GATCGTGGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG 483
|||||
Sbjct 7721 GATCGTGGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG 7780

Query 484 CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 543
|||||
Sbjct 7781 CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 7840

Query 544 TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC 603
|||||
Sbjct 7841 TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC 7900

Query 604 TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 663
|||||
Sbjct 7901 TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 7960

Query 664 CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 723
|||||
Sbjct 7961 CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 8020

Query 724 ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGGATGAACG 756
|||||
Sbjct 8021 ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG-ATGAACG 8052

```



```

<1..>752
      CDS      /locus_tag="CNQ50_26150"
               <1..>752
               /locus_tag="CNQ50_26150"
               /EC_number="3.5.2.6"
               /inference="COORDINATES: similar to AA
               sequence:RefSeq:WP_032489893.1"
               /note="hydrolyzes the beta-lactam bond in antibiotics
such
               as the penicillins and cephalosporins; Derived by
               automated computational analysis using gene prediction
               method: Protein Homology."
               /codon_start=1
               /transl_table=11
               /product="class A beta-lactamase TEM-190"
               /protein_id="ATC05305.1"

```

Figur C.3: Resultater av sekvensering utført på prøve 10S med bla_{TEM}



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway