



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Identifisering av multiresistente og β -laktamaseproduserende bakterier (ESBL og karbapenemaser) isolert fra vasket og spiseklar salat ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder

Identification of multidrug resistant and β -lactamase producing bacteria (ESBL and carbapenemases) isolated from ready-to-eat salad using phenotypic and genotypic methods

Hilde Skår

Matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven utgjør 30 studiepoeng og ble utført som avsluttende prosjekt ved mastergradstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Masteroppgaven ble startet i januar 2020 og avsluttet i juni 2020.

Prosjektet har vært veldig spennende og lærerikt, samt utfordrende å fordype seg i temaet antibiotikaresistens.

Stor takk til doktorgradsstipendiat Misti Dawn Finton og overingeniør Ahmed Abdelghani ved KBM for god hjelp på laboratoriet. Tusen takk til min hovedveileder professor Bjørn-Arne Lindstedt som har svart på spørsmål og gitt oppfølging underveis i skriveprosessen.

Jeg vil også takke medstudenter og gode venner Martine Skaare og Stina Cathrin Nautnes for et morsomt og godt samarbeid på laboratoriet, samt mange digitale samtaler underveis i skriveprosessen.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, juni 2020

Hilde Skår

Abstract

Background: The increase in prevalence of antibiotic resistant bacteria is an emerging problem that threatens the global public health. The rise of multidrug resistant bacteria is threatening the future treatment of infections. Food is a potential route for spread of antibiotic resistance. Knowledge of the prevalence and pathway for antibiotic resistance is important to be able to initiate effective measures to prevent development and further spread of antibiotic resistance.

Purpose: The purpose of this master thesis was to investigate the prevalence of antibiotic resistance genes in bacteria isolated from ready-to-eat salad sold on the Norwegian market, as well as the presence of β -hemolytic bacteria as an indication of possible pathogenic bacteria.

Method: Three imported ready-to-eat salad was examined in this thesis. Selective chromogenic media was used to grow and differentiate bacteria with ESBL- and CRE-phenotype. Blood agar was used to detect β -hemolytic bacteria. Sanger sequencing of 16S rRNA was used in identification of bacteria genus. Multiplex PCR and agarose gel electrophoresis was used in screening of ESBL and CRE resistance genes. Three isolates were sequenced using Illumina Miseq for detection of genes encoding resistance for antibiotics, metal and disinfectants. Genes encoding virulence were also included. Species of the isolates were detected using rMLST.

Results: Isolates from ESBL-medium was identified as *Pseudomonas* spp. and *Achromobacter* spp. Isolates from CRE-medium was identified as *Stenotrophomonas* spp. β -hemolytic bacteria was identified as *Bacillus* spp. and *Aeromonas* spp. A strain of *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* and *Aeromonas* were whole-genom sequenced with Illumina Miseq, and identifies as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter arsenitoxydans* and *Aeromonas salmonicida*. There three strains, in addition to a strain of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. were susceptibility-tested, all with phenotypic multidrug resistance. The genes *aph(3')-IIc*, *aph(6)-Ic*, *blaL1* and *blaL2* were detected in *S. maltophilia*. The genes *ampC*, *abaF*, *macA* and *macB* were detected in *A. arsenitoxydans*. *aac(6')*, *abaF*, *ampC*, *blaOXA*, *blaFOX-4* and *cphA* were detected in *A. salmonicida*. The OXA-gene was a new variant that hasn't been detected before. In addition, genes encoding a variety of multidrug resistance efflux systems were detected in all three strains, and virulence genes associated with invasion and infection.

Conclusion: In this study, multidrug resistant bacteria were found in ready-to-eat salad sold on the Norwegian market. A new variant of OXA β -lactamase was detected in *A. salmonicida*.

Sammendrag

Bakgrunn: Økningen av antibiotikaresistente bakterier er et stort og alvorlig problem som truer den globale folkehelsen. Økningen av multiresistente bakterier truer behandlingsmulighetene for infeksjoner i fremtiden. Mat er en potensiell spredningsvei for antibiotikaresistens, og forståelse og kunnskap om utbredelse og spredningsvei for antibiotikaresistens er viktig for å kunne sette i gang effektive tiltak for å hindre utvikling og videre spredning av antibiotikaresistens.

Hensikt: Hensikten med denne oppgaven er å undersøke utbredelsen av antibiotikaresistens-gener hos bakterier isolert fra salat som selges på det norske markedet, samt tilstedeværelsen av β -hemolytiske bakterier som en indikasjon på mulig patogene bakterier.

Metode: Tre importerte «vasket og spiseklar» salater ble undersøkt i denne studien. Selektive kromogene medier ble brukt for å dyrke frem bakterier med ESBL- og KRE-fenotypisk resistens. Blodagar ble brukt for påvisning av β -hemoliserende bakterier. Sangersekvensering av 16S rRNA ble brukt for identifisering av bakterieslekt av bakteriekoloniene fra selektive kromogene medier og blodagar. Multipleks PCR ble brukt for å screene etter utvalgte resistensgener. Det ble brukt primerpar rettet mot de mest utbredte ESBL_A- og ESBL_{KARBA}-genene. Agarose gelelektroforese ble brukt for visualisering av eventuelle funn. Tre interessante bakteriestammer ble helgenomsekvensert med Illumina Miseq. Helgenomsekvensering ble brukt for artsbestemmelse av bakterien ved bruk av rMLST, samt påvisning av en gener for antibiotika-, metall- og desinfeksjonsmiddelresistens og gener for virulens.

Resultater: Isolatene fra ESBL-medium ble identifisert som *Pseudomonas* spp. og *Achromobacter* spp. Isolatene fra CRE-medium ble identifisert som *Stenotrophomonas* spp. β -hemoliserende isolater fra blodagar ble identifisert som *Bacillus* spp. og *Aeromonas* spp. Multipleks ESBL og multipleks CRE påviste ingen ESBL- eller KRE-gener. En stamme *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* og *Aeromonas* ble helgenomsekvensert og artsbestemt som *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter arsenitoxydans* og *Aeromonas salmonicida*. Disse tre stammene, i tillegg til en stamme av *Bacillus* spp. og *Pseudomonas* spp. ble følsomhetstestet, alle hadde fenotypisk multiresistens. Genene *aph(3')-IIc*, *aph(6)-Ic*, *blaL1* og *blaL2* ble påvist *S. maltophilia*. Genene *ampC*, *abaF*, *macA* og *macB* ble påvist i *A. arsenitoxydans*. *aac(6')*, *abaF*, *ampC*, *bla_{OXA}*, *bla_{FOX-4}* og *cphA* ble påvist i *A. salmonicida*. OXA-genet som ble påvist var en helt ny variant. I tillegg ble gener som koder for en rekke multiresistens efflux-system påvist hos de tre stammene. Det ble også påvist en rekke virulensgener assosiert med invasjon og infeksjon.

Konklusjon: I denne studien ble det påvist multiresistente bakterier i vasket og spiseklar salat som selges på det norske markedet. Det ble påvist en helt ny variant av OXA β -laktamase hos *A. salmonicida*.

Forkortelser og ordforklaringer

ABC	The ATP-binding cassette family (efflux-pumpe)
AmpC	Ampicillinase C (β -laktamase av ESBL _{M-C} type)
AR	Antibiotikaresistens
<i>bla</i>	β -laktamase-gener
bp	Basepar
BR	Broad-range
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRE	Carbapenem resistant <i>Enterobacteriaceae</i>
CTX-M	Cefotaxime-Munich (β -laktamase av ESBL _A type)
ddNTP	Dideoksyribonukleotidtrifosfat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksyribonukleotidtrifosfat
dsDNA	Double-stranded DNA
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ESBL	Extended-spectrum β -lactamase
ESBL _A	Ambler klasse A ESBL
ESBL _{KARBA}	ESBL med karbapenemase (ESBL _{KARBA-A} , ESBL _{KARBA-B} og ESBL _{KARBA-D})
ESBL _M	Miscellaneous ESBL (delt inn i ESBL _{M-C} og ESBL _{M-D})
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FHI	Folkehelseinstituttet
HGT	Horisontal gene transfer
IMP	Imipenemase
KESC-gruppen	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp. og <i>Citrobacter</i> spp.
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MATE	The multidrug and toxic compound extrusion family (efflux-pumpe)
MBL	Metallo- β -laktamase (ESBL _{KARBA-B})
MDR	Multidrug resistant
MFS	The major facilitator superfamily (efflux-pumpe)
MIC	Minimal inhibitory concentration (=minste hemmende konsentrasjon)
MRSA	Meticillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New Dehli Metallo β -lactamase
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NORM	Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	NORM – veterinær
OXA	Oxacillinase (β -laktamase/ESBL _{M-D} og ESBL _{KARBA-D})

PBP	Penicillin-bindende protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRSA	penicillin resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
RNA	Ribonukleinsyre
RND	The resistance-nodulation-cell-division family (efflux-pumpe)
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
SHV	Sulphydryl-variable (β -laktamase/ESBL _A)
SMR	The small multidrug resistance family (efflux-pumpe)
ssDNA	Single-stranded DNA
TAE	Tris-acetat-EDTA (buffer)
TEM	Temoniera (β -laktamase/ESBL _A)
VIM	Verona integron-encoded metallo- β -laktamase (ESBL _{KARBA-B})
VRE	Vancomycin resistente <i>Enterococcus</i>
VRSA	Vancomycin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Abstract	II
Sammendrag	III
Forkortelser og ordforklaringer	IV
1. Introduksjon	1
1.1 Antibiotika.....	3
1.2 Faktorer som bidrar til utvikling og spredning av antibiotikaresistens.....	8
1.3 Antibiotikaresistens	10
1.4 Mikrobiologi salat	21
1.5 Mat som spredningsvei for antibiotikaresistens	23
1.6 Forekomst av antibiotikaresistens i salat.....	24
1.7 Metodisk teori	27
2. Materialer og metoder	36
2.1 Flytskjema over prosess og metoder	36
2.2 Prøvemateriale.....	37
2.3 Fenotypisk dyrkningsbaserte metoder.....	37
2.4. DNA-ekstraksjon.....	39
2.5 Kvantifisering og renhetsmåling av DNA.....	39
2.6 Sangersekvensering av 16S rRNA	39
2.7 Screening for ESBL- og KRE-genotypisk resistens.....	42
2.8 Antimikrobiell følsomhetstesting.....	45
2.9 Illumina MiSeq sekvensering.....	45
3. Resultater.....	47
3.1 Fargescreening fra fenotypisk dyrkning og Sangersekvensering av 16S rRNA	47
3.2 Agarosegelelektroforese av multi- og singlepleks ESBL og CAR PCR-produkt.....	48
3.3 Antibiotika-følsomhetstest	49
3.4 Illumina Miseq sekvensering.....	52
4. Diskusjon.....	57
4.1 Fenotypisk deteksjon av antibiotikaresistens og 16S rRNA-sekvensering	57
4.2 Påvisning av β -hemolyserende stammer	60
4.3 Påvisning av AR-gener med multipleks PCR og agarose gelelektroforese	64
4.4 Påvisning av antibiotikaresistensgener.....	64
4.5 Påvisning av gener for metall- og desinfeksjonsmiddelresistens.....	70
4.6 Påvisning av gener for virulens, hemolysin og toksiner	71
4.7. Følsomhetstesting.....	75
4.8 Forslag til videre arbeid.....	80

5. Konklusjon	81
Litteraturliste	82
Vedlegg	I
Vedlegg A	I
Vedlegg B	II
Vedlegg C	IV
Vedlegg D	VI
Vedlegg E	XI
Vedlegg F	XIII

1. Introduksjon

I dagens samfunn er antibiotikaresistens (AR) er en av de største truslene for den globale folkehelsen, matsikkerheten og utviklingen (World Health Organization, 2018). Da antibiotika ble tatt i bruk på 1940-tallet ble det sett på som en «mirakelmedisin». Tidligere dødelige infeksjoner ble mulig å behandle med en enkel kur med antibiotika. Etterhvert fikk suksesshistorien en utfordring; antibiotikaresistens. Alexander Fleming, som blir sett på som oppdageren av antibiotika på 1940-tallet, var tidlig ute og advarte mot overdreven bruk av antibiotika (Dadgostar, 2019). Antibiotikaresistens kan forekomme naturlig, men overforbruk i helsevesenet, veterinærmedisin og i landbruket, samt forurensinger til miljøet har akselerert denne utviklingen. Snart kan vi miste vårt beste våpen i kampen mot bakterielle infeksjoner. Uten umiddelbare tiltak er vi på vei inn i en post-antibiotika-epoke hvor vanlige infeksjoner som tidligere var enkle å behandle blir dødelige igjen. Uten effektiv antibiotika vil også kreftbehandling og rutineoperasjoner bli vanskelig å gjennomføre på grunn av infeksjonsfaren (Helse Norge, 2020). Organtransplantasjoner kan bli helt umulig å gjennomføre. I dag blir et voksende antall av infeksjoner som lungebetennelse, tuberkulose og salmonellose stadig mer vanskelige å behandle ettersom antibiotika som brukes i behandlingen blir mindre og mindre effektiv (World Health Organization, 2018).

Antibiotikaresistens fører til lengre sykehusopphold, høyere medisinske kostnader, økt dødelighet og koster samfunnet store summer årlig. Multiresistente bakterier koster den europeiske union (EU) 1,5 milliarder Euro hvert år. En studie i *The Lancet Infectious Diseases* har gjort beregninger på antall sykdommer og dødsfall knyttet til antibiotikaresistente bakterier hos mennesker i Europa (Cassini et al., 2019). Beregningene er gjort fra 2015 og estimerer 671.689 infeksjoner og 33.110 dødsfall relatert til infeksjoner av AR-bakterier i EU. For Norge ble det estimert 1.882 infeksjoner og 69 dødsfall relatert til infeksjoner av AR-bakterier i 2015. Situasjonen i Norge er betraktelig bedre enn for mange andre Europeiske land, spesielt i sør-europeiske land som Italia og Hellas. Norge har tidlig innført strenge restriksjoner for bruk av antibiotika noe som gjenspeiler den mer gunstige situasjonen i Norge. Situasjonen i Norge trues av importert resistens fra økt reising og import. For å bevare den gunstige situasjonen Norge er i, er det imidlertid nødvendig med kontinuerlig innsats med omfattende overvåking og videre restriksjoner slik at antibiotika også vil være effektiv i fremtiden.

Blant det store mangfoldet av multiresistente og patogene bakterier som er påvist er det noen som skiller seg ut som spesielt problematiske. World Health Organization (WHO) fremhever

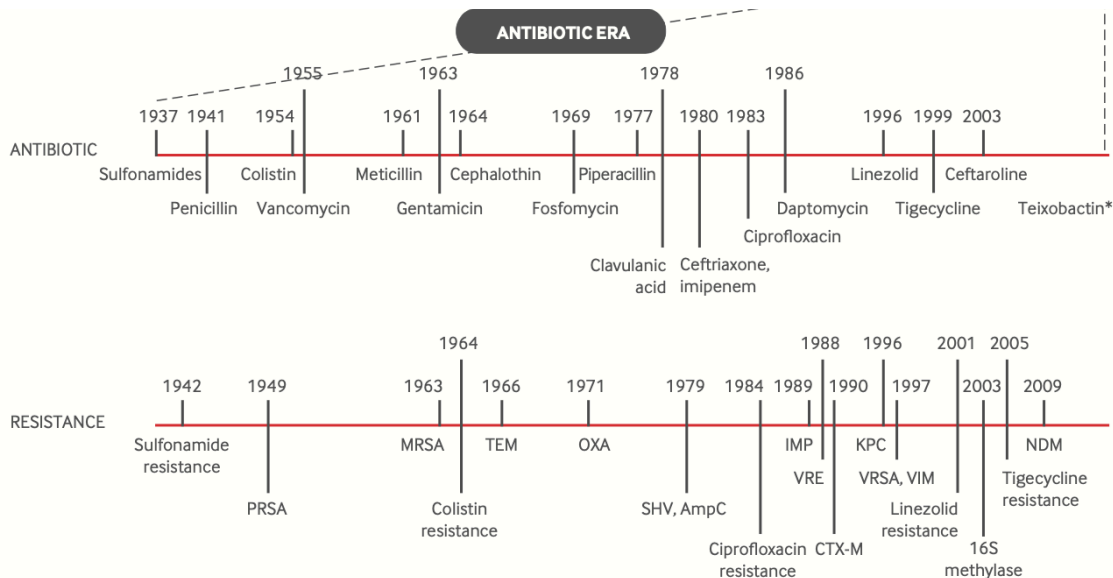
særlig følgende patogener som det er kritisk viktig å utvikle nye antibiotika for; karbapenemaseproduserende *Acinetobacter baumannii* og *Pseudomonas aeruginosa*, samt karbapenemresistente *Enterobacteriaceae* (KRE) og utvidet-spektrum β -laktamase (ESBL)-produserende *Enterobacteriaceae* (World Health Organization, 2017). I tillegg blir blant annet vankomycinresistente enterokokker (VRE), meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) og fluorokinolonresistente *Campylobacter* spp. og *Salmonellae* trukket frem som problematiske. Overvåking av overnevnte bakterier er spesielt viktig.

Hensikten med denne studien er å undersøke forekomsten av antibiotikaresistente bakterier i «vasket og spiseklar» salat som selges på det norske markedet, samt tilstedeværelsen av hemolytiske bakterier som en indikasjon på mulig patogener. En rekke utbrudd av matbårne infeksjoner har de senere årene vært knyttet til denne type produkter, og det er derfor svært interessant å undersøke hva som befinner seg der. I tillegg finnes det manglende kunnskap om utbredelsen av AR-gener i mat. Det er kjent at bakterier i mat og miljø kan være reservoarer for AR-gener som kan overføres til bakterier i tarmfloraen, og videre spres til andre bakterier, deriblant patogene bakterier. Reservoarer av slike AR-gener i matvarer er av bekymring da disse kommer i direkte kontakt med tarmfloraen ved konsum, spesielt i matvarer som ikke varmebehandles eller bearbeides før konsum (som vasket og spiseklare salater). På bakgrunn av dette er det viktig å kartlegge hvilke bakteriestammer som finnes i matvarer, samt hvilke AR-gener disse bakteriene bærer på. Overvåkingen av antibiotikaresistens i mat begrenses ofte til undersøkelser av de mest vanlige resistensgenene og de mest vanlige patogene bakterieartene. Men det er også et behov for å kartlegge utbredelsen av AR-gener i ikke-patogene bakterier, da disse kan være et ledd i spredning av antibiotikaresistens til patogene stammer. I denne studien har det vært spesielt fokus på påvisning av karbapenemase- og ESBL-produserende bakterier på bakgrunn av at disse klassifiseres som kritisk viktige av WHO. Men også mindre vanlige AR-gener påvist ved helgenomsekvensering har blitt inkludert.

1.1 Antibiotika

Bakterielle infeksjon har alltid hatt en plass i mennesker liv selv om årsaken til sykdommene var ukjent. Alexander Fleming fikk anerkjennelsen for å ha oppdaget penicillin i 1928 (Tan & Tatsumura, 2015). Fleming var den første til å oppdage den antibakterielle virkningen av penicillin da bakteriekulturen hans av *Staphylococcus aureus* ble kontaminert med muggsoppen *Penicillium notatum* (Fernandes et al., 2013). Han oppdaget at det var noe muggsoppen produserte som drepte bakteriestammen. Han isolerte og beskrev komponenten rundt muggsoppen og publiserte det han hadde funnet. Men det var ikke før i 1941 at penicillin ble brukt mot streptokokkinfeksjon i et museforsøk. Den første dokumenterte bruken av penicillin for behandling av et menneske var i England senere i 1941, og på dette tidspunktet ble penicillin betegnet som en «mirakelmedisin» (Yazdankhah et al., 2013). Begrepet «antibiotikum» som betyr «mot liv» ble først brukt av Selman Waksman i 1942 (Yazdankhah et al., 2013). Waksman definerte antibiotikum som et stoff som dreper eller hemmer vekst av mikroorganismer.

Oppdagelsen av antibiotika er en av de største suksesshistoriene gjennom tidene, og ble etterfulgt av oppdagelse og kommersiell produksjon av mange andre typer antibiotika. Fremstillingen av nye antibiotika fortsatte frem til 1990-tallet. Men i takt med introduksjon av nye typer antibiotika, ble det også oppdaget at bakteriene utviklet toleranse ovenfor antibiotika (se figur 1.1), og begrepet antibiotikaresistens ble tatt i bruk.



Figur 1.1: Tidslinje for evolusjonen av antibiotika. Introduksjon av nytt antibiotikum har vært raskt etterfulgt av oppdagelse av resistens. *Ikke i klinisk bruk. (Iredell et al., 2015).

I de senere år har det ikke blitt utviklet nye typer antibiotika. Dette er trolig på grunn av legemiddelindustrien prioriterer utvikling av andre typer legemidler som er mer lønnsomme (Livermore, 2011). Antibiotika brukes vanligvis i en kort periode og det er mer lukrativt å utvikle legemidler som brukes til langvarig behandling av kroniske sykdommer. I tillegg vil antibiotikaresistens mot det nye antibiotikumet forekomme etter en stund, slik at det ikke vil være i bruk lenge. Denne kombinasjonen av økende antibiotikaresistens og begrenset utvikling av nye antibiotika er skremmende for fremtiden og krever globale tiltak.

Antibiotika klassifiseres ut fra virkningsmekanismer, virkningsspektrum, strukturell oppbygning og toksisitet (Kohanski et al., 2010). Enkelte antibiotikum induserer celledød (baktericid virkning) og andre hemmer cellevekst (bakteriostatisk virkning). Noen antibiotika har smalspektret virkning, mens andre har bredspekret virkning. Antibiotika kan deles inn i fire hovedkategorier ut i fra virkningsmekanisme (Shaikh et al., 2015):

- (i) Hemming av celleveggsyntese (f.eks. β -laktam)
- (ii) Hemming av proteinsyntese (f.eks. aminoglykosider, makrolider)
- (iii) Hemming av nukleinsyresyntese (f.eks. fluorokinoloner)
- (iv) Hemming av folsyresyntese (f.eks. trimetoprim)

1.1.1 Antibiotika som hemmer celleveggsyntese: β -laktam antibiotika

Den viktigste antibiotika-klassen som hemmer celleveggsyntese er β -laktam. β -laktam inkluderer penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer. Virkningsmekanismen til disse er å hindre enzymer som er ansvarlig for dannelsen av peptidoglykanlaget hos bakterier (Benton et al., 2007). Bakterieceller er omsluttet av et lag av peptidoglykan som er viktig for cellens stivhet og stabilitet. Den mekaniske styrken på dette laget er på grunn av peptidoglykan sin sterkt kryssbundne struktur (Soares et al., 2012). Syntesen av peptidoglykan skjer i 3 stadier. Det første og andre stadiet foregår i cytoplasma og består av dannelsen av forløperne til peptidoglykan. Det siste stadiet skjer på utsiden av cellen hvor disse forløperne festes på det voksende peptidoglykanlaget og tverrbindinger fullføres. β -laktam antibiotika forstyrrer dette siste stadiet i peptidoglykansyntesen. β -laktam har en ringstruktur som er et høyt reaktivt syklisk amid (Fernandes et al., 2013). Denne ringstrukturen binder på penicillinbindende protein (PBP) og hemmer aktivitet av enzymer som er viktige for dannelsen av kryssbindinger. Dette resulterer i dannelsen av peptidoglykankjeder som ikke er kryssbundet og mangler strekkfasthet (Soares et al., 2012). På denne måten utvikles svake punkter i celleveggen, noe som til slutt resulterer i brudd på cellen på grunn av osmotisk trykk. Det har også vist seg at

autolysin spiller en rolle når det kommer til lysing av cellen (Kohanski et al., 2010). Autolysin er et enzym som hydrolyserer β -bindinger i peptidoglykan og er viktig for vedlikehold av cellen. Tilstedeværelse av β -laktam fører til overflod av autolysin som bidrar til lysing av bakteriecellen og celledød.

1.1.1.1 Penicillin

Det første penicillinet som ble oppdaget, penicillin G, er det eneste naturlige penicillinet som brukes i klinisk sammenheng (Soares et al., 2012). Det første semi-syntetiske penicillinet som ble laget, penicillin V, var mer stabilt enn penicillin G. Begge disse har begrenset aktivitet mot Gram-negative bakterier og blir lett brutt ned av β -laktamaser. Senere har det blitt utviklet andre semi-syntetiske penicilliner med forbedret antimikrobielle egenskaper. Disse egenskapene består av forbedret aktivitet mot Gram-negative bakterier i tillegg til aktivitet mot Gram-positive bakterier. Penicilliner har ofte et smalt spekter av aktivitet rettet mot spesifikke bakterier. Ampicillin og amoxicillin hører til antibiotikaklassen penicilliner og har et bredere spekter enn penicillin G, men er fortsatt ganske utsatt for β -laktamaser (Fernandes et al., 2013). På grunn av følsomheten for β -laktamaser gis ampicillin og amoxicillin ofte sammen med klavulansyre for å unngå enzymatisk nedbrytning. Klavulansyre bindes irreversibelt til β -laktamase og dermed inaktiverer dem.

Penicilliner brukes hovedsakelig for behandling av infeksjoner av Gram-positive bakterier som for eksempel pneumokokker, streptokokker og ikke-penicillinaseproduserende stafylokker (Felleskatalogen AS, sist endret 22.06.2017). Penicilliner kan også brukes mot Gram-negative kokker som for eksempel gonokokker, meningokokker og *Haemophilus influenzae* (ved høye doser).

1.1.1.2 Cefalosporiner

Cefalosporiner blir delt inn i 5 generasjoner i henhold til antibakteriell aktivitet. Disse generasjonene er forskjellige i antimikrobielt spektrum, β -laktamase-stabilitet, absorpsjon, metabolisme og bivirkninger (Fernandes et al., 2013). 1. generasjons cefalosporiner har et smalere spekter og mer begrenset aktivitet i sammenligning med 3., 4., og 5. generasjon cefalosporiner som er mer bredspektret. 1. generasjon cefalosporiner er veldig aktive mot Gram-positive kokker (unntatt enterokokker og MRSA) og moderat aktiv mot noen Gram-negative staver (hovedsakelig *E. coli*, *Proteus* spp. og *Klebsiella* spp.). 2. generasjons cefalosporiner har effekt mot samme bakterier som 1. generasjon cefalosporiner, men også ekstra effekt mot Gram-negative staver (unntatt *Pseudomonas aeruginosa*). 3. generasjons

cefalosporiner har noe nedsatt effekt mot Gram-positive kokker (unntatt *Staphylococcus* spp.), men forbedret aktivitet mot Gram-negative staver, inkludert *P. aeruginosa*. 4. generasjons cefalosporiner har økt aktivitet mot arter av *Enterobacter* spp. og *Citrobacter* spp. som er resistent mot 3. generasjons cefalosporiner. 5. generasjons cefalosporiner er utviklet i laboratoriet spesifikt designet for å være resistent mot β -laktamaser (Bradford, 2001). Ceftobiprol og ceftarolin er 5. generasjons cefalosporiner. Ceftobiprol er særlig effektiv mot MRSA (Fernandes et al., 2013). Ceftarolin er også effektiv mot MRSA, men ikke mot ESBL-produserende bakterier eller aktive AmpC. Ceftarolin har derimot vist seg å være mer aktiv mot ESBL og AmpC i synergi med amikacin.

1.1.1.3 Karbapenem

Karbapenem brukes ofte til behandling av bakteriestammer som er resistente mot penicilliner og cefalosporiner. Karbapenem er dermed betraktet som en «siste utvei» for behandling av alvorlige infeksjoner forårsaket av ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* (Shaikh et al., 2015). Imipenem, det første legemidlet av karbapenem, har god aktivitet mot mange Gram-negative staver, Gram-positive organismer og anaerobe bakterier (Fernandes et al., 2013). Meropenem er lignende imipenem når det kommer til farmakologi og antimikrobielt spektrum av aktivitet.

Karbapenem har det bredeste spekteret av β -laktam antibiotika (Norsk legemiddelhåndbok, u.å.-a). Imipenem og Meropenem har baktericid virkning ovenfor de aller fleste Gram-positive og Gram-negative aerobe og anaerobe bakteriearter. Unntaket er enkelte stammer av *P. aeruginosa* og enkelte andre Gram-negative stavbakterier. *Pseudomonas* spp. har vist seg å raskt utvikle resistens mot meropenem og bør derfor ikke brukes i behandling. Karbapenem virker ved behandling av de fleste ESBL- og AmpC-produserende arter, men hydrolyseres av karbapenemaser.

1.1.3 Antibiotika som hemmer proteinsyntese: aminoglykosider og makrolider

Aminoglykosider og makrolider er antibiotika som hemmer proteinsyntesen. Makrolider binder til ribosomal 50S subenhet og hemmer forlengelse av polypeptidkjeden i proteinsyntesen (Leach et al., 2007; Shaikh et al., 2015). Makrolider har god effekt mot Gram-positive kokker (unntatt enterokokker), samt god effekt mot enkelte mykoplasmaarter, *Chlamydia* spp., *Legionella* spp. og *Bordetella* spp. (Norsk legemiddelhåndbok, u.å.-b).

Aminoglykosider binder til ribosomal 30S subenhet og hemmer initiering av proteinsyntesen (Leach et al., 2007). I tillegg har de en destabiliserende virkning på yttermembranen hos Gram-negative bakterier (Norsk legemiddelhåndbok, u.å.-c). Aminoglykosider har bredspektret baktericid virkning på aerobe bakterier, men har noe forskjellig antibakterielt spektrum innad i klassen. Gentamicin virker mot de fleste β -laktamase-produserende og meticillinresistente stammer, samt de fleste intestinale Gram-negative staver. Streptomycin har god effekt mot mykobakterier og brukes ofte for behandling av tuberkulose.

1.1.4 Antibiotika som hemmer nukleinsyresyntese: fluorokinoloner

Antibiotika som hemmer nukleinsyresyntese er blant annet fluorokinoloner. Fluorokinoloner har baktericid virkning og hemmer DNA-syntese ved å interagere med enzymer ved replikasjonen som fører til brudd på dobbeltråden til DNA (Shaikh et al., 2015). Fluorokinoloner hemmer virkningen av DNA-gyrase og topoisomerase IV, to enzymer som er essensielle for DNA replikasjon (van Hoek et al., 2011). Fluorokinoloner har et veldig bredt spekter og bruk bør derfor begrenses (Norsk legemiddelhåndbok, u.å.-d). Fluorokinoloner skal kun brukes som reserve ved behandlingssvikt eller kompliserte infeksjoner ifølge norske retningslinjer for antibiotikabruk. En av de viktigste fluorokinolonene er ciprofloxacin. Ciprofloxacin har et bredt spekter som omfatter de fleste stammer av enterobakterier, stafylokokker, *H. Influenzae*, *P. aeruginosa* og *Legionella* spp.

1.1.5 Antibiotika som hemmer folsyresyntese: trimetoprim

Trimetoprim er et fullstendig syntetisk antibiotikum som hemmer folsyresyntese. Trimetoprim blokkerer nøkkel-steg i syntesen av folat (Shaikh et al., 2015). Folat er en kofaktor i syntesen av nukleotider, byggesteinene til DNA og RNA, og er derfor essensiell. Trimetoprim hemmer enzymet dihydrofolatreduktase (DHFR) ved å binde seg til aktivt sete (van Hoek et al., 2011). DHFR er essensiell i folat-syntesen. Trimetoprim er bakteriostatisk og virker mot en rekke Gram-negative staver og Gram-positive kokker (Norsk legemiddelhåndbok, u.å.-e). Anaerobe bakterier, gonokokker og *P. aeruginosa* er naturlig resistente mot trimetoprim.

1.2 Faktorer som bidrar til utvikling og spredning av antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens er ikke et nytt fenomen. Når bakterier blir utsatt for antibiotika som truer overlevelsen, har de flere måter å beskytte seg på. De kan blant annet endre arvestoffet sitt for å kunne produsere enzymer som bryter ned antibiotika, utrykke efflux-pumper for å pumpe antibiotika ut av bakteriecellen eller blokkere binding av antibiotika (Kolář et al., 2001). Uttrykking av resistensmekanismer er forårsaket av rask utvikling av bakteriegenomet under selektivt press fra antibiotikumet og fra omgivelsene. Seleksjonspress kan beskrives som bakteriepopulasjonens press for å tilpasse seg i nærvær av antibiotika som truer overlevelsen (Iredell et al., 2015). Bakteriene som tilpasser seg best vil overleve. Antibiotikaresistens er en naturlig tilpasningsprosess hos bakterier som trolig har akselerert på grunn av utbredt bruk av antibiotika i medisinsk sammenheng, landbruk og utslipp til miljøet. Antibiotikaresistens forekommer typisk innen få år etter introduksjonen av nytt antibiotikum.

Fra 2000 til 2015 har den globale bruken av antibiotika økt med 65% (Dadgostar, 2019). Det er en rekke faktorer som fører til utvikling av antibiotikaresistens i verden som; mangel på kunnskap, feil bruk av antibiotika, overforbruk av antibiotika, bruk hos friske matproduserende dyr, økonomiske årsaker, økt reisevirksomhet og utslipp til miljøet. I tillegg til menneskeskapte faktorer spiller biologiske faktorer også en rolle i utviklingen av antibiotikaresistens. Utviklingen av antibiotikaresistens kan skje spontant gjennom mutasjoner og bakteriell evolusjon (Dadgostar, 2019). Disse muterte genene kan spres videre gjennom horisontal genoverføring som omtales nærmere senere i oppgaven. Denne utviklingen akselererer med overforbruk/misbruk av antibiotika.

Mangel på kunnskap og overforbruk/misbruk av antibiotika er en viktig faktor for utvikling av antibiotikaresistens. Spørreundersøkelser utført rundt om i verden indikerer stor mangel på kunnskap om antibiotika (Dadgostar, 2019). Mange har en misforståelse om at antibiotika virker mot virus-infeksjoner som for eksempel vanlig influensa. I tillegg blir mange antibiotika av dårlig kvalitet ofte solgt uten regulering over disken i butikker i U-land. For eksempel i India og Vietnam, hvor det ikke er tilstrekkelig regulering av utlevering av legemidler, er salg av antibiotika uten resept i vanlige butikker utbredt. Slik tilgjengelighet av antibiotika i kombinasjon om mangel på kunnskap fører til selv-medisinering hos pasienter som ikke nødvendigvis trenger antibiotikabehandling. I tillegg kan unødvendig lange antibiotikakurer føre til utvikling av antibiotikaresistens. I Kina spiller dette en rolle da kinesiske sykehus motiverer leger til å forskrive antibiotika, som er økonomisk lønnsomt da de får bedre avtaler

med farmasøytisk industri. I tillegg skjer dette i U-land med mangler på ordentlig diagnostisk utstyr der pasienthåndtering hovedsakelig er betinget av forskriving av medisiner, spesielt antibiotika.

En annen viktig faktor i utviklingen av antibiotikaresistens er bruken av antibiotika i landbruket. For eksempel i USA blir 80% av antibiotika som blir solgt brukt i dyrefôr (Dadgostar, 2019). Dette betyr at det blir brukt mer antibiotika hos husdyr enn hos mennesker. Antibiotika som brukes i landbruket blir brukt til behandling av syke dyr, men også tilsatt i fôret og drikkevannet til friske dyr for å forebygge sykdom og som vekstfremmer. Hovedproblemet med bruk av antibiotika i matdyrproduksjon er at mange antibiotika som brukes er fra antibiotikaklasser som også brukes til behandling av humane bakterieinfeksjoner (Rolain, 2013). Ett av de vanligste antibiotika som brukes som vekstfremmer på verdensbasis, spesielt hos svin, er kolistin (Dadgostar, 2019). Kolistin er et kritisk «siste utvei» antibiotikum som brukes til behandling av alvorlige infeksjoner hos mennesker.

Økende reisevirksomhet blant verdens befolkning er også en faktor som bidrar til spredning av resistens. Reisende kolonisert med antibiotikaresistente bakterier kan spre bakteriene til andre land og til hjemlandet. For eksempel har en studie av Ruppé et al. rapportert om franske turister som reiste til India og hadde ingen kontakt med helsevesenet der, men testet fortsatt positivt for karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* (KRE) etter de kom tilbake fra reisen (Ruppé et al., 2014). Denne oppsiktsvekkende overbruken/misbruken av antibiotika har store konsekvenser for utviklingen av antibiotikaresistens. Globale tiltak bør settes i gang, ellers vil det ha store konsekvenser for fremtiden av antibiotika som bruk i behandling av infeksjoner.

1.3 Antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens er bakteriens måte å tilpasse seg for å overleve i nærvær av antibiotika. Antibiotikaresistens kan deles inn i naturlig og ervervet resistens. Vi definerer ofte antibiotikaresistens som reduksjon av effektivitet av et antimikrobielt legemiddel ved behandling av infeksjon, og begrepet brukes ofte om ervervet resistens (Shaikh et al., 2015). Bakterier har en rekke mekanismer for å beskytte seg mot antibiotika, som blant annet (van Hoek et al., 2011):

- (i) Endringer i permeabiliteten til celleveggen som hindrer antibiotika å få tilgang til celleveggen
- (ii) Aktiv efflux av antibiotika fra cellen
- (iii) Enzymatisk modifisering av antibiotika
- (iv) Anskaffelse av alternativ metabolisme som hemmer legemidlet
- (v) Modifisering av målet til antibiotika

Bakterier kan få disse resistensmekanismene fra mutasjon i kromosomalt DNA eller som resultat av overføring av resistensmekanismer gjennom horisontal genoverføring (HGT) (van Hoek et al., 2011). Endringer i permeabiliteten til celleveggen er en vanlig resistensmekanisme som hindrer antibiotika i å få tilgang til celleveggen og utøve sin funksjon. En annen vanlig mekanisme er overuttrykkelse av efflux-pumper som pumper antibiotika ut av cellen slik at effekten hemmes. Mange antibiotika har kjemiske bindinger som amider og estere som er utsatt for hydrolyse (Shaikh et al., 2015). Flere enzymer er kjent for å ødelegge antibiotika-aktivitet ved å spalte disse bindingene (f. eks. β -laktamase). Produksjon av transferase-enzymmer kan også inaktivere antibiotika (f. eks. aminoglykosider og makrolider) ved kjemisk substitusjon der adenylin-, fosforyl- eller acetyl-grupper blir bundet på antibiotika-molekylet. Mange bakterier har evne til å modifisere målet til antibiotika slik at antibiotikaen ikke har evne til å binde til målet og utøve sin funksjon. Disse mekanismene blir omtalt mer senere.

1.3.1 Naturlig og ervervet resistens

Enkelte mikroorganismer har unike fysiologiske egenskaper som gjør dem upåvirket av tilstedeværelse av antibiotika, dette kalles naturlig resistens. Naturlig resistens finnes normalt hos enkelte bakterier som av naturlige årsaker har behov for denne mekanismen for å overleve i miljøet den lever i. Som for eksempel en bakterie som produserer et antibiotikum, må selv være resistent mot dette antibiotikumet for å ikke drepe seg selv. Naturlig resistens er vanligvis kromosomalt kodet og er ofte grunnen til hvorfor det ofte blir observert ulik resistens mellom

forskjellige slekter, arter og stammer av bakterier. Et eksempel på naturlig resistens er mangel på angrepsmålet til antibiotikumet (Safe food, 2010, s. 19). Uten angrepsmålet mister antibiotikumet effekten. Et annet eksempel er forskjeller i celleveggstruktur. Generelt har Gram-negative bakterier høyere resistens mot antimikrobielle midler enn Gram-positive bakterier. For eksempel er Gram-negative bakterier resistent mot penicillin G på grunn av celleveggstrukturen som gjør det umulig for antibiotikumet og få tilgang til angrepsmålet og utøve sin virkning. Naturlig resistens blir ikke ansett som et klinisk problem fordi antibiotika var aldri ment for bruk mot disse bakteriene uansett.

Ervervet resistens er når en tidligere sensitiv bakterie blir resistent mot et antimikrobielt middel (Safe food, 2010, s. 19). Resistensmekanismene kan komme som resultat av mutasjoner i kromosomalt DNA hos bakterien, eller ved anskaffelse av en eller flere resistensgener som resultat av HGT innen og imellom bakteriearter (van Hoek et al., 2011). Mutasjon i kromosomalt DNA forekommer omtrent en gang i hver milliard celledelinger (Pallasch, 2003). Disse mutasjonene er ukorrigerte feil som oppstår under DNA-replikasjon. Selv om det er sjeldent, forekommer mutasjoner altfor ofte på bakgrunn av den store mengden replikasjoner som skjer i bakterier i miljøet. Hoveddelen av disse mutasjonene er ugunstige for bakterien og vil ikke vedvare. Imidlertid kan små mengder av slike mutasjoner være gunstige for bakterien. For eksempel i nærvær av en antibiotika der denne mutasjonen gjør at den blir upåvirket av virkningen av antibiotika. Gjennom en prosess av naturlig seleksjon vil bakterier med denne fordelene vedvare og kan senere by på betydelige problemer ved behandling av infeksjon.

1.3.1.1 Horisontal genoverføring

Ervervelse av fremmed DNA gjennom HGT er en av de viktigste pådriverne for spredning av antibiotikaresistens (Munita & Arias, 2016). De fleste antimikrobielle midlene som brukes i klinisk sammenheng er (eller er derivert fra) produkter som finnes naturlig i miljøet (hovedsakelig jord). Bakterier som deler miljø med disse molekylene har naturlig resistens mot dem, og det finnes robuste bevis på at bakteriene i dette miljøet er kilde for ervervede AR-gener i klinisk relevante bakterier. Disse AR-genene kan spres videre til andre bakterier, som igjen kan spre dem videre igjen. Det viktigste mekanismene for HGT er konjugering, transformasjon og transduksjon. Ved alle disse tre prosessene overføres DNA fra en donor- til en mottakercelle.

1.3.1.1.1 Konjugasjon

Konjugasjon krever direkte celle-til-celle kontakt ved hjelp av en «sex-pilus», hvor genetisk materiale blir overført (Soucy et al., 2015). Konjugering bruker mobile genetiske elementer

som plasmider eller transposoner for å dele genetisk informasjon. Fremvekst av resistens i sykehusmiljø er ofte på grunn av konjugasjon (Munita & Arias, 2016). Konjugasjon er en veldig effektiv metode for genoverføring og skjer sannsynligvis hyppig i gastrointestinal (GI)-trakten hos mennesker under antibiotikabehandling.

1.3.1.1.2 Transformasjon

Transformasjon er når bakterien plukker opp nakent DNA fra miljøet og inkorporerer det i sitt eget DNA (van Hoek et al., 2011). Dette skjer både i Gram-positive og Gram-negative bakterier. Transformasjon er kanskje den enkleste typen HGT, men det er et fåtall av klinisk relevante bakterier som har evne til å naturlig inkorporere nakent DNA i sitt eget DNA (Munita & Arias, 2016).

1.3.1.1.3 Transduksjon

Bakteriofager spiller også en rolle i spredningen av DNA mellom bakterier (van Hoek et al., 2011). Dette gjør de ved en prosess som kalles transduksjon der bakterie-DNA pakkes inn i bakteriofag-hodet og injiseres i mottakerbakterien. Bakteriofager er virus som infiserer bakterieceller og bruker dem som vert for å produsere mer virus. Etter en bakteriofag har multiplisert mange nok kopier av seg selv, monteres fag-partiklene og iblant fjernes en del av vertcellens bakterielle DNA og settes inn. Senere, når bakteriofagen infiserer en ny bakteriecelle, kan denne biten av bakterie-DNA bli inkorporert i en ny bakteriecelle.

1.3.1.2 Mobile genetiske elementer

Ervervede AR-gener er ofte plassert på mobilt DNA som kan overføres fra en del av et genom til et annet eller mellom genomer (van Hoek et al., 2011). De viktigste er de konjugative og mobiliserbare elementene. De konjugative elementene inneholder all genetisk informasjon som kreves for å overføre fra en bakterie til en annen, mens de mobiliserbare elementene bruker konjugasjonsfunksjonene til de konjugative elementene (konjugative plasmider eller konjugative transposoner) for å overføre DNA til en annen vert. Det finnes også elementer som er i stand til å overføres til nye steder i genomet, men som selv ikke er i stand til å overføre til ny vert (bare hvis de overføres til et konjugerende element, kan de flyttes til nye verter). Disse elementene inkluderer transposoner og de mobile integronene.

1.3.1.2.1 Plasmid

Plasmider er selvreplikerende, sirkulært dobbeltrådet DNA som finnes i bakteriecellens cytoplasma uavhengig av kromosomalt DNA. Plasmider er viktige verktøy for at bakteriepopulasjoner raskt skal kunne tilpasse seg skiftende miljøforhold (Smalla et al., 2015). De bærer gener som koder for egenskaper som kan gi fordeler under spesielle forhold. Plasmider er konjugative elementer som inneholder sitt eget replikasjonsorigo (van Hoek et al., 2011). De er funnet i nesten alle bakterieslekter og de enkleste plasmidene inneholder kun replikasjonsorigo og gener som koder for replikasjonsfunksjoner. Ofte har de også gener som koder for mekanismer for overføring til nye verter ved konjugasjon. Plasmider med disse konjugeringsevnene kalles konjugative plasmider. I tillegg til funksjoner som replikasjon og evne til overføring, har plasmider ofte gener som koder for antibiotikaresistens. Hvis et resistensgen er på et konjugativt eller mobiliserbart plasmid har det potensiale til å bli overført til en ny vert. Denne overføringen spiller en viktig rolle i spredningen av AR-gener. Noen plasmider kan overføres til mange forskjellige arter, mens andre er begrenset til en slekt eller art.

1.3.1.2.2 Transposoner

Transposoner er en gruppe av mobile DNA-sekvenser som kan hoppe fra ulike steder på genomet (Babakhani & Oloomi, 2018). Av denne grunn kalles de ofte hoppende gener. Transposoner kan overføres fra plasmid til plasmid, eller fra kromosom til plasmid og omvendt. Konjugative transposoner kan på samme måte som konjugative plasmider inneholde et område med gener for overføring, samt AR-gener (van Hoek et al., 2011). På denne måten kan de overføre resistensgener i bakterien, og til andre bakterier (Babakhani & Oloomi, 2018). For eksempel kan meticillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin-resistente enterokokker (VRE), multidrug-resistente *A. Baumannii* (MDRAB) og karbapenem-resistente *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) få resistensgener gjennom transposoner.

1.3.1.2.3 Integroner

Integroner er «gen-innsamlingssystemer» som ofte finnes i bakteriegenomet (Gillings, 2014). Integroner er genetiske elementer som inneholder et setespesifikt rekombinasjonssystem som kan integrere, uttrykke og utveksle spesifikke DNA-elementer, kalt genkassetter. Genkassetene kan ta opp fremmede gener fra andre bakterier, spesielt AR-gener, og sette det fremmede genet inn i bakteriens genom. Integroner skaper fenotypisk mangfold og former tilpasningsrespons hos bakterien. De har en stor rolle i tilegning og uttrykkelse av AR-gener.

Alle integroner har tre essensielle hovedkomponenter; (i) integron integrase (IntI), (ii) *attI*-site og (iii) promotor (Pc) (Gillings, 2014). IntI er et enzym som setter inn integronkassetter i *attI*-site som er et spesifikt rekombineringsområde. Når genet er innsatt blir deres transkripsjon kontrollert av promotoren Pc. Kombinasjonen av disse tre kjernefunksjonene gir bakterien evne til å fange opp og deretter uttrykke gener i genkassetter.

1.3.2 Multiresistens

«Multidrug resistance» (MDR) er definert som resistens mot tre eller flere individuelle klasser av antimikrobielle forbindelser (EUCAST, 2020). Infeksjoner forårsaket av MDR bakterier er assosiert med økt dødelighet og er et økende problem for behandling av infeksjoner (Munita & Arias, 2016). MDR bakterier har akkumulert gener som koder for resistens mot antibiotika. Dette kan være uttrykkelse av flere ulike gener som koder for resistens mot et enkelt antibiotikum, eller økt uttrykkelse av gener som koder for multiresistens efflux-pumper som pumper ut et bredt spekter av antibiotika (Nikaido, 2009). Endring i membranpermeabilitet ved mutasjoner i gener som koder for poriner er også en viktig mekanisme.

1.3.2.1 Redusert permeabilitet

Mange antibiotika brukt i klinisk sammenheng har intracellulære mål, eller i cytoplasmamembran (indre membran) hos Gram-negative bakterier (Munita & Arias, 2016). Derfor må antibiotika penetrere den ytre membranen og/eller cytoplasmamembranen for å utøve sin effekt. Bakterier har utviklet mekanismer for å hindre antibiotika å nå disse målene ved å redusere opptak av det antimikrobielle molekylet. Denne mekanismen er spesielt viktig i Gram-negative bakterier der den ytre membranen virker som et «første forsvar» mot antibiotika. β -laktam, tetrasykliner og noen fluorokinoloner blir spesielt påvirket av endringer i permeabiliteten av ytre membran, siden de ofte bruker poriner til å krysse barrieren. Et eksempel på dette er vancomycin, et glykopeptid-antibiotika, som ikke er effektiv mot Gram-negative organismer på grunn av at det ikke klarer å penetrere den ytre membranen. I tillegg kan den lave følsomheten til *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter baumannii* for β -laktam (i sammenligning med *Enterobacteriaceae*) delvis forklares med redusert antall av poriner.

Endringer i poriner kan skje som følge av tre prosesser (i) endring i type porin som blir uttrykt, (ii) endring i nivå av uttrykking og (iii) svekkelse av porin-funksjon (Munita & Arias, 2016). Endringer i permeabilitet gjennom disse mekanismene resulterer hyppig i lav-gradsresistens og er ofte assosiert med andre resistensmekanismer som for eksempel økt uttrykkelse av efflux-pumper. Et eksempel på porin-mediert resistens er avvik i produksjonen av OprD i *P.*

aeruginosa. OprD brukes normalt for opptak av aminosyrer og antibiotika, som for eksempel imipenem. Mutasjoner i *oprD* har vist seg å oppstå i kliniske isolater av *P. aeruginosa* ved behandling av infeksjon.

1.3.2.2 Efflux-pumper

Efflux-pumper er komplekse bakterielle maskinerier som har evne til å pumpe toksiske komponenter ut av cellen og dermed bidra til antibiotikaresistens (Munita & Arias, 2016). Efflux-pumper kan være substratspesifikke eller med evne til å pumpe ut et bredt spekter av substrater og finnes vanligvis i MDR bakterier. En multiresistens efflux-pumpe kan ha flere substratbindende seter for strukturelt forskjellige forbindelser (Heir et al., 2001). Setene kan ha ulik affinitet for ulike forbindelser som gjør at det fenotypiske uttrykket blir ulikt for ulike forbindelser. Efflux-pumper kan påvirke et bredt spekter av antibiotikaklasser inkludert fluorokinoloner, β -laktam, karbapenem og polymyxiner (Munita & Arias, 2016). Genene som koder for efflux-pumper kan finnes i både mobile genetiske elementer eller i kromosomet. Kromosom-kodede efflux-pumper kan forklare naturlig resistens som enkelte bakterier har for spesifikke antibiotika (f. eks. *Enterococcus faecalis* sin naturlige resistens mot streptogramin A).

Det finnes 5 hovedfamilier av efflux-pumper; (i) «the major facilitator superfamily» (MFS), (ii) «the small multidrug resistance» (SMR) familien, (iii) «the resistance-nodulation-cell-division» (NDR) familien, (iv) «the ATP-binding cassette» (ABC) familien og (v) «the multidrug and toxic compound extrusion» (MATE) familien. Disse familiene har ulik struktur, energikilde, substratspekter de kan pumpe ut og type bakterier de finnes i.

1.3.2.3 Kryssresistens – desinfeksjonsmidler, metaller og antibiotika

Mens misbruk/overforbruk av antibiotika har fått stor oppmerksomhet som pådriver av antibiotikaresistens, har rollen til andre komponenter som desinfeksjonsmidler og tungmetaller fått mindre fokus. Kryssresistens mellom desinfeksjonsmidler og antibiotika er dokumentert. Eksponering av bakterier ovenfor lave konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler kan trigge utvikling av resistens mot desinfeksjoner (Heir et al., 2001). Dette kan skyldes for eksempel fortykningseffekt av desinfeksjonsmidlet eller tilstedeværelse på materiale som reduserer antibakteriell effekt som gjør at bakterier får mulighet til å tilpasse seg og utvikle resistens mot midlet. Bakterier bruker ofte samme resistensmekanismer mot desinfeksjonsmidler og antibiotika, for eksempel efflux-pumper. I tillegg er resistensgener ofte lokalisert sammen på plasmider, integroner eller transposoner og uttrykkes ofte fra felles promotor. På denne måten

kan bruk av desinfeksjonsmiddel føre til ko-seleksjon av resistensegenskaper kodet for av andre gener, og antibiotikaresistens kan opprettholdes selv ved fravær av direkte seleksjonspress fra antibiotika. Dette betyr at feil bruk av desinfeksjonsmidler i matprosesseringsanlegg kan trigge utvikling og/eller opprettholdelse av antibiotikaresistens. Derfor bør det i matprosesseringsanlegg brukes desinfeksjonsmidler i tilstrekkelig høye konsentrasjoner etterfulgt av grundig skylling for å effektivt drepe bakterier og å hindre muligheten for overlevelse av bakterier som har utviklet resistens mot desinfeksjonsmidlet.

Forurensing av metaller har også potensialet til å være en pådriver for spredning av antibiotikaresistens (Dickinson et al., 2019). Bakterier er vanligvis følsomme for metallforurensinger, men kan utvikle en rekke resistensmekanismer mediert av kromosommutasjoner eller ved opptak av resistensgener fra mobile genetiske elementer gjennom HGT. Når den genetiske endringen fører til resistens mot både metaller og antibiotika (kryssresistens), eller når metallresistens og antibiotikaresistens er lokalisert sammen på mobile genetiske elementer (på samme måte som for desinfeksjonsmidler), kan metaller føre til ko-seleksjon av resistensgener som også er relevante for AR-bakterier.

1.3.3 Resistens mot β -laktam

β -laktam antibiotika inkluderer penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer (van Hoek et al., 2011). De mest vanlige og viktigste resistensmekanismene mot β -laktam er ved produksjon av β -laktamaser som utvidet spektrum β -laktamaser (ESBL), plasmid-mediert AmpC enzymer og karbapenem-hydrolyserende β -laktamaser.

β -laktamaser kan klassifiseres på flere ulike måter. I denne studien ble klassifiseringen til Giske et al. (2009) brukt. Giske deler ESBL inn i tre hovedkategorier; (i) $ESBL_A$, (ii) $ESBL_M$ og (iii) $ESBL_{KARBA}$ (se tabell 1.1) (Giske et al., 2009). Klasse A ($ESBL_A$) og M ($ESBL_M$) blir ofte omtalt som «vanlig» ESBL med evne til å hydrolysere penicilliner og cefalosporiner. Klasse A består av β -laktamaser som har aktivitet mot utvidet spektrum cefalosporiner og som blir hemmet av inhibitoren klavulansyre. Klasse M består av plasmid-mediert AmpC og OXA-ESBL som kalles «miscellaneous» ESBL. $ESBL_M$ blir delt inn i underklassene $ESBL_{M-C}$ (plasmid-mediert AmpC; klasse C) og $ESBL_{M-D}$ (OXA-ESBL; klasse D). $ESBL_{KARBA}$ består av karbapenemaser, med evne til å hydrolysere penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer. $ESBL_{KARBA}$ blir videre delt inn i underklassene A, B og D. Klasse A ($ESBL_{KARBA-A}$) består av de blant annet *Klebsiella pneumoniae* karbapenemase (KPC) og enkelte GES-varianter av β -laktamaser. Klasse B ($ESBL_{KARBA-B}$) består av metallo- β -

laktamaser (MBL). MBL krever bivalent metall-ion (vanligvis sink) som kofaktor for aktivitet (Silveira et al., 2018). Klasse D (ESBL_{KARBA-D}), består av OXA-karbapenemaser (Giske et al., 2009).

Tabell 1.1: Klassifisering av β -laktamaser etter inndeling av Giske et. al. (2009)

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

ESBL-produserende bakterier har β -laktamaser for et utvidet spekter av β -laktam antibiotika og er en viktig mekanisme for resistens i Gram-negative patogener. β -laktamaser hydrolyserer β -laktamringen i β -laktam-antibiotika som resulterer i ineffektive β -laktam-komponenter (Fernandes et al., 2013). ESBL har evne til å hydrolysere og forårsake resistens mot en rekke typer β -laktam, inkludert penicilliner, cefalosporiner (1., 2., og 3. generasjon) og monobaktam, men ikke karbapenem (Shaikh et al., 2015). ESBL hemmes av inhibitorene klavulansyre og tazobaktam (van Hoek et al., 2011). Opp gjennom årene har det blitt detektert en rekke forskjellige β -laktamaser, de mest vanlige er TEM, SHV, CTX-M og OXA.

1.3.3.1 TEM β -laktamase

Den første plasmid-medierte β -laktamase i Gram-negative bakterier som ble oppdaget var TEM-1 og ble beskrevet tidlig på 1960-tallet (Bradford, 2001). TEM-1 enzymet ble funnet i en enkeltstamme av *E. coli* isolert fra blodkultur fra en gresk pasient med navn Temoniera. Innen få år etter TEM-1 først ble isolert, var den spredd over hele verden. TEM-1 kan hydrolysere penicilliner og 1. generasjon cefalosporiner (Shaikh et al., 2015). Over tid har opphavsenzymet TEM-1 gjennomgått punktmutasjoner i *bla*_{TEM-1} som har resultert i endring av aminosyreprofilen og derivater med ESBL fenotype har oppstått (Bradford, 2001). Det første derivatet var TEM-2 som hadde en enkelt aminosyre-substitusjon som ikke endret substratprofilen (Shaikh et al., 2015). TEM-3, isolert i 1989, var den første TEM-varianten som

viste ESBL fenotype med økt aktivitet mot utvidet spektrum cefalosporiner (van Hoek et al., 2011). Et mangfold av TEM β -laktamaser har oppstått som resultat fra enkle punktmutasjoner i eksisterende TEM-gener som fører til endring i substratprofilen.

1.3.3.2 SHV β -laktamase

SHV-familien av β -laktamaser stammer fra *Klebsiella* spp. (Shaikh et al., 2015). Opphavet til SHV-enzymfamilien er SHV-1 enzymet som er utbredt i *Klebsiella pneumoniae*. I mange stammer av *K. pneumoniae* er genet som koder for SHV-1 i kromosomet. Dette genet har trolig utviklet seg som kromosomalt gen i *Klebsiella* spp. og senere blitt inkorporert i et plasmid som har spredd seg til andre *Enterobacteriaceae*. SHV-1 har lignende inhiberingsprofil som TEM-1 og kan hydrolysere penicilliner og 1. generasjon cefalosporiner. På samme måte som for TEM-1, har SHV-1 gjennomgått aminosyresubstitusjoner (punktmutasjoner i *bla*_{SHV-1}) over tid (van Hoek et al., 2011). Dette har resultert i et mangfold av SHV-derivater som viser ESBL fenotype.

1.3.3.3 CTX-M β -laktamase

CTX-M er en nyere familie av plasmid-mediert ESBL som fortrinnsvis hydrolyserer cefotaxim (Bradford, 2001). Organismer som produserer CTX-M enzymer har blitt den mest utbredte typen av ESBL de senere årene (Pitout & Laupland, 2008). På grunn av høy likhet, stammer CTX-M trolig fra kromosomalt AmpC enzym i *Kluyvera* spp. (Bradford, 2001). Mens SHV- og TEM β -laktamaser kommer fra aminosyre-substitusjon av opphavsenzymet, ble CTX-M overført ved HGT, og er ikke veldig beslektet på TEM og SHV β -laktamase (Shaikh et al., 2015). CTX-M enzymers store potensiale for spredning gir grunn til bekymring (Pitout & Laupland, 2008). I dag er over 100 varianter av CTX-M β -laktamaser sekvensert (Shaikh et al., 2015).

1.3.3.4 OXA β -laktamase

OXA-type β -laktamase har fått navnet sitt på grunn av evnen til å hydrolysere oxacillin (Shaikh et al., 2015). OXA-type β -laktamase har på samme måte som for TEM- og SHV-type, utviklet seg fra opphavsenzymet med smalere spektrum. OXA-11 var det første derivatet med ESBL-fenotype (Evans & Amyes, 2014). I tillegg til OXA-11, har flere derivater med ESBL-fenotype utviklet seg; OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19 og OXA-28. Alle disse derivatene er funnet i *P. aeruginosa*. Den første gruppen av karbapenem-resistent OXA-type β -laktamase var OXA-23-gruppen som ble påvist i *Acinetobacter baumannii*. OXA-23-genene, *bla*_{OXA-23}, er ofte plasmid-bårne og har blitt funnet i mange *Acinetobacter* spp. og arter i

Enterobacteriaceae. En rekke andre OXA-karbapenemaser har blitt påvist; OXA-40, OXA-48, OXA-58 og OXA-143.

1.3.3.5 AmpC enzymer

Ampicillinase C (AmpC) β -laktamase var det første bakterielle enzymet som ble rapportert å ødelegge penicillin. (Jacoby, 2009). AmpC skilles seg ut fra penicillinase-type β -laktamaser som TEM-1, men har også serin ved aktivt sete. AmpC-genet, *bla*_{AmpC}, er enten kromosomalt kodet eller plasmid-mediert. AmpC enzymer er aktive mot penicilliner, men er mer aktive mot cefalosporiner. De kan hydrolysere cefamyciner som cefoxitin og cefotetan, og oxyimino-cefalosporiner som ceftazidim, cefotaxim og ceftriaxon. Klavulansyre og tazobactam, som er hemmere av klasse A enzymer, har mye mindre effekt på AmpC β -laktamaser. Cloxacillin, oxacillin og aztreonam er derimot gode til å hemme AmpC.

1.3.3.6 Resistens mot karbapenem

En av de mest problematiske formene for antibiotikaresistens er resistens mot karbapenem, spesielt i *Enterobacteriaceae*-familien (Bonomo et al., 2018). Infeksjoner forårsaket av KRE har begrensede behandlingsmuligheter og er assosiert med høy dødelighet (Gupta et al., 2011). Karbapenem er viktig i behandlingen av ESBL og andre multiresistente bakterier, og brukes som en «siste mulighet» for behandling av organismer med begrensede behandlingsmuligheter. Karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (KRE) er spesielt problematisk med tanke på hvor vanlig *Enterobacteriaceae*-infeksjon er. I tillegg er bakterier som har karbapenemaser ofte resistente mot en rekke andre antibiotikaklasser, som resulterer i begrensede behandlingsmuligheter (Bonomo et al., 2018). Fenotypisk resistens mot karbapenem i Gram-negative bakterier er ofte på grunn av ervervet karbapenemaser, eller produksjon av cefalosporinaser kombinert med mutasjoner som reduserer permeabiliteten til celleveggen slik at karbapenem ikke kommer inn (Bonomo et al., 2018).

I tillegg til OXA-type karbapenemase, har vi klasse A *Klebsiella pneumoniae* karbapenemase (KPC) som er en viktig variant som må følges nøye med på. KPC er omfattende rapportert i *K. pneumoniae* og andre *Enterobacteriaceae*, men har også blitt rapportert i andre Gram-negative patogener inkludert *P. aeruginosa* (Bonomo et al., 2018). Klasse B β -laktamase, eller metallo- β -laktamaser (MBL), er vanlig funnet i *Enterobacteriaceae* og *P. aeruginosa*. Av MBL er «New Dehli metallo- β -laktamase» (NDM), «Verona integron-encoded metallo- β -laktamase» (VIM) og «imipenemase metallo- β -laktamase» (IMP) enzymer de som er hyppigst identifisert

på verdensbasis. Karbapenemase-gener er ofte lokalisert på mobile genetiske elementer, noe som øker sannsynlighet for spredningen.

1.3.4 Resistens mot aminoglykosider

Flere aminoglykosidresistens-mekanismer har blitt påvist: (i) aktiv efflux, (ii) nedsatt permeabilitet, (iii) endring i ribosom og (iv) inaktivering av antibiotika ved aminoglykosid-modifiserende enzymer (van Hoek et al., 2011). Den viktigste aminoglykosidresistens-mekanismen er modifisering av enzymer. Disse enzymene er klassifisert i tre hovedklasser i henhold til type modifisering: AAC (acetyltransferaser), ANT (nukleotidyltransferaser eller adenytransferaser) og APH (fosfotransferaser). Disse tre klassene blir ytterligere inndelt basert på enzymenes forskjellige regionspesifisiteter for aminoglykosidmodifikasjon. Det finnes fire acetyltransferaser: AAC(1), AAC(2'), AAC(3) og AAC(6'); fem nukleotidyltransferaser: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) og ANT(9) og syv fosfotransferaser: APH(2''), APH(3'), APH(3''), APH(4), APH(6), APH(7) og APH(9). I tillegg finnes et bifunksjonelt enzym, AAC(6')-APH(2'') som kan både acetylere og fosforylere substratene.

1.3.5 Resistens mot makrolider

Kort etter introduksjonen av makrolid-antibiotikumet erytromycin på 1950-tallet ble erytromycinresistens rapportert i *Staphylococcus* spp. (van Hoek et al., 2011). Siden dette har et stort antall av bakterier med resistens blitt påvist på grunn av tilstedeværelse av en rekke forskjellige AR-gener. AR-mekanismene ansvarlige for resistens mot makrolider er rRNA metylase, efflux og inaktiverende gener. Den mest vanlige mekanismen for makrolid-resistens er tilstedeværelse av rRNA metylaser kodet av *erm*-gener. rRNA metylaser metylerer adenin. Metylert adenin forhindrer binding av antibiotika på 50S ribosomale subenhet, som er angrepsmålet til makrolider. De to andre mekanismene, efflux pumper og inaktiverende gener, er kodet av *msr*- og *ere*-gener.

1.3.6 Resistens mot fluorokinoloner

De senere år har resistens mot fluorokinoloner økt betraktelig hos *Enterobacteriaceae* både i Norge og internasjonalt (Norsk legemiddelhandbok, u.å.-d). I lang tid trodde man at resistensmekanismene for kinoloner kun var kromosom-kodet, men i de senere år har tre plasmid-medierte resistensmekanismer blitt rapportert (van Hoek et al., 2011). Kromosom-kodet resistens resulterer enten i redusert permeabilitet av ytre-membran som fører til tap av porin eller over-ekspressjon av naturlig forekommende efflux-pumper eller mutasjoner i molekylmålene DNA-gyrase og topoisomerase IV. I siste tilfelle skjer mutasjoner ved

spesifikke «quinolone resistance determining regions» (QRDR) i genene *gyrA*, *gyrB*, *parC* og *parE* som koder for subenheter av DNA gyrase og topoisomerase IV.

Den første plasmid-medierte resistensmekanismen er *qnr* som koder for et protein som beskytter DNA-gyrase og type IV topoisomerase fra hemming av fluorokinoloner (van Hoek et al., 2011). Fem familier av *qnr*-gener har blitt rapportert; *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* og *qnrS*. Den andre typen plasmid-mediert kinolonresistens er en *cr* variant av *aac(6')-Ib* som kalles *aac(6')-Ib-cr* og gir lavt nivå av ciprofloxacin-resistens. Genet koder for et aminoglykosid acetyltransferase som kalles AAC(6')-Ib-cr som har to aminosyreendringer Trp102Arg og Asp179Tyr. Disse to substitusjonene er ansvarlige for enzymets evne til å acetylere ciprofloxacin. Den tredje plasmid-medierte resistensmekanismen er *qepA* som koder for en efflux-pumpe som kan pumpe ut hydrofile fluorokinoloner som blant annet ciprofloxacin og enrofloxacin.

1.3.7 Resistens mot trimetoprim

Resistentmekanismer mot trimetoprim inkluderer nedsatt cellevegg-permeabilitet, produksjon av resistent kromosomalt dihydrofosfat-reduktase (DHFR), overproduksjon av kromosomalt enzym, og produksjon av plasmid-mediert resistent DHFR-enzym (Huovinen, 1987).

Endringer i DHFR gjør at trimetoprim ikke kan utøve sin effekt. Kromosomal trimetoprim-resistens skjer, hovedsakelig på lavt nivå, av mutasjoner i *folA*-gen som koder for DHFR (van Hoek et al., 2011). Plasmid-mediert resistens, som gir høyere nivå av resistens, er en resistent variant av kromosomalt DHFR. Ervervet DHFR kan deles inn i; *dfrA*, *dfrB* og *dfrK*.

1.4 Mikrobiologi salat

Forbruket av grønnsaker har økt betraktelig i de senere årene (Helsedirektoratet, 2018, s. 12). I perioden 2000 til 2017 økte forbruket av grønnsaker fra 59 til 76 kg per person i Norge. De siste ti årene har forbruket av grønnsaker økt med 11 %. I Norge er gulrot, tomat, løk og salat de fire grønnsakene som har størst omsetning (Helsedirektoratet, 2018, s. 13). Den økte tilgjengeligheten av vasket og spiseklare salater reflekterer konsumentenes etterspørsel av fersk, næringsrik og praktisk mat. I Norge importeres frukt og grønnsaker fra over 80 land og dette innebærer en mattrygghetsutfordring siden slike produkter ofte ikke varmebehandles før konsum (Holck et al., 2019, s. 18).

Salat dyrkes ofte i åkeren og er direkte utsatt for kontaminering fra miljøet. Bakteriefloren på planteoverflaten vil dermed reflektere miljøet og vekstforholdene planten har vært utsatt for

(Rudi et al., 2002). Indre vev på friske planter er fri for mikroorganismer, men overflaten kan være kontaminert med en rekke mikroorganismer (Adebayo et al., 2012). Planter har utviklet mange mekanismer for å beskytte seg mot mikrobiell invasjon av vev (Adams et al., 2016, s. 159). Den ytre overflaten er vanligvis beskyttet av et motstandsdyktig lag, men behovet for gassutveksling krever åpninger i bladoverflaten som kan gi tilgang av noen mikroorganismer til plantevev. Imidlertid har plantevev ofte antimikrobielle agenter som ofte produseres i respons til invasjon av mikroorganismer. pH i salat er rundt 6,0-6,4 som gjør at mange mikroorganismer klarer å vokse.

Bladsalater har stor overflate som lett kan kontamineres med bakterier som kommer fra jord, gjødsel og vanningsvann (Rudi et al., 2002). I tillegg blir salaten høstet, transportert og distribuert, som gir ytterligere kontamineringsrisiko. Vasket og spiseklar salat blir i tillegg prosessert ved vasking og kutting, der blant annet vaskevann, kniver og prosessoverflater utgjør kontamineringsrisiko. Kutting kan også overføre eventuelle patogene mikroorganismer fra overflaten og inn i produktet (Adebayo et al., 2012). Siden salat vanligvis ikke varmebehandles før konsum bør salat betraktes som et risikoprodukt da forekomst av patogener ikke kan utelukkes. Av denne grunn er det viktig med god landbruksskikk for å hindre kontaminering ved produksjon. Vasket og spiseklar salat spises vanligvis som den er og det er usikkert hvor stor effekt vaskeprosedyren egentlig har. Vaskingen kan redusere bakteriemengden, men til og med bruk av klorinert vann vil normalt bare gi en reduksjon av 2-3 log i bakterieantall (Adams et al., 2016). Noen overflatebakterier kan gjemme seg i hydrofobe folder eller porer og unngår dermed behandling. I noen tilfeller har patogener vist seg å være tilstede i plantevevet hvor de er fullstendig beskyttet mot overflatebehandling.

For å øke holdbarheten blir vasket og spiseklar salat vanligvis modifisert atmosfære pakket (MAP) med redusert nivå av O₂ og økt nivå av CO₂ sammenlignet med luft (Rudi et al., 2002). I tillegg blir produktene kjølelagret for å redusere vekst av mikroorganismer. Denne endringen i atmosfære og temperatur vil endre den opprinnelige bakteriefloraen i salaten, enkelte bakterier vil hemmes og andre kan få konkurransefortrinn. MAP og kjølelagring kan favorisere bakterier med egenskaper som gjør at de tåler disse forholdene. Et problem med kjølelagrede MAP-produkter er vekst av psykrotrofe fakultativt anaerobe patogener eller opportunistisk patogener. Arter av slekten *Pseudomonas* er et eksempel på dette. Siden salat kan kontamineres fra så mange forskjellige hold, er bakteriefloraen omfattende. En studie gjort av Rudi et al., viste at mikroorganismer fra slekten *Pseudomonas* og familien *Enterobacteriaceae* dominerer i salat

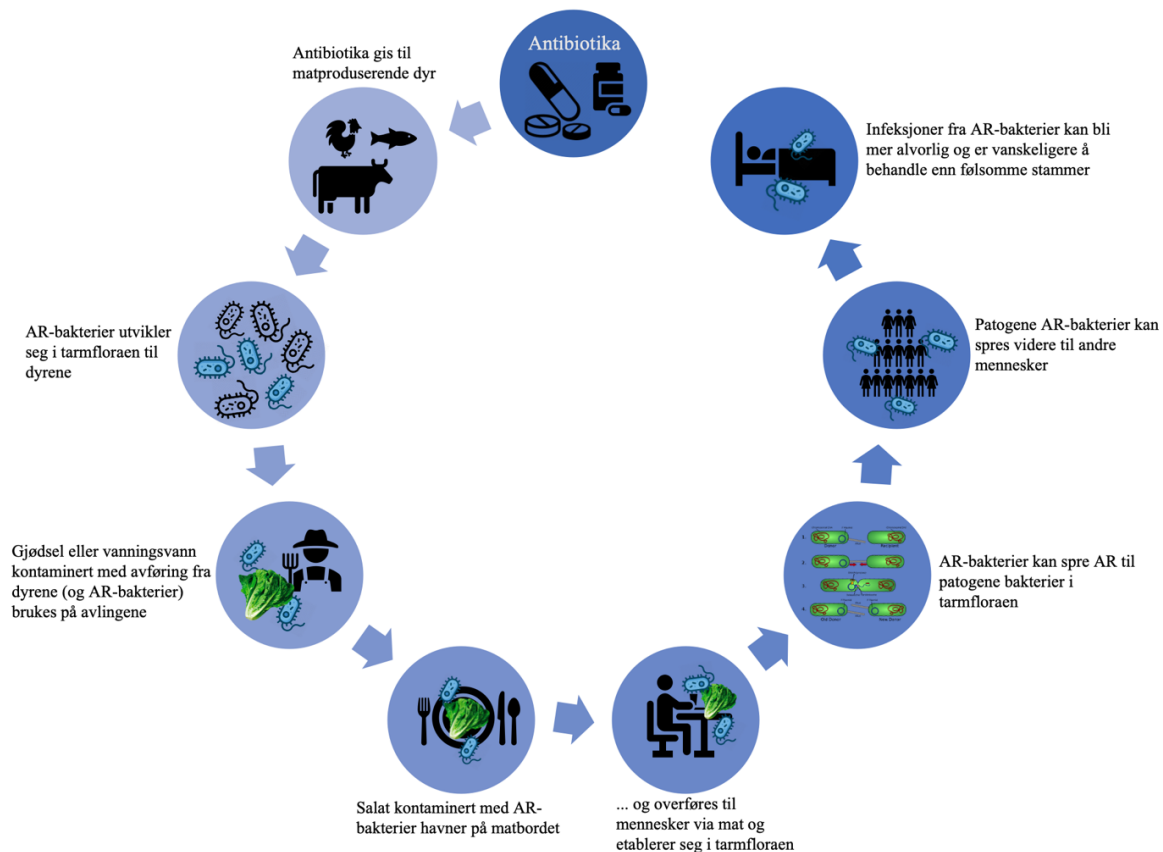
(Rudi et al., 2002). I tillegg er *Erwinia* spp., *Serratia* spp. og *Bacillus* spp. vanlige funn (Magnuson et al., 1990).

Salat har vært årsak til en rekke utbrudd av matbårne infeksjoner i Norge de siste årene. Patogene mikroorganismer kan overleve og vokse i matvarer i konkurranse med andre mikroorganismer, og de kan være tilstede uten å påvirke bederelse av maten (Holck et al., 2019, s. 18). De fleste patogener i salat forårsaker ikke bederelse, selv ved høy mengde (Adebayo et al., 2012). I fravær av tegn på bederelse kan produkter bli konsumert fordi det blir oppfattet som trygt. I 2011 ble det rapportert om 21 sykdomstilfeller som var forårsaket av *Yersinia enterocolitica* O:9 og knyttet til spiseklar ferdigkuttet salatblanding (Lange et al., 2012, s. 23). Våren 2014 var der et utbrudd der 133 ble syke av *Y. enterocolitica* O:9 som ble knyttet til salatprodukter servert ved storkjøkken på en militærleir i Nord-Norge (Guzmán-Herrador et al., 2015, s. 17). I juni 2018 var der et utbrudd av *Y. enterocolitica* O:9 der 11 isolater av bakterien ble påvist og kunne spores tilbake til vasket og spiseklar bladsalat som sannsynlig kilde til utbruddet (Lyngstad et al., 2019, s. 16). I 2013 var det et nasjonalt utbrudd av *Salmonella coeln* der 26 personer ble syke (Herrador et al., 2014, s. 18). Epidemiologiske undersøkelser pekte mot ferdigkuttet salatblanding som opphav, men *S. coeln* ble ikke påvist i den mistenkelige salatblandingen. Den økte forekomsten av utbrudd knyttet til salat i de senere årene kan muligens forklares på bakgrunn av økt konsum. Det tyder også på at mattrygghetskontroll av disse produktene til tider svikter, og dette gjør det spesielt interessant å undersøke hvor utbredt det er med AR-bakterier i disse produktene.

1.5 Mat som spredningsvei for antibiotikaresistens

Mat spiller en viktig rolle i utvikling og spredning av antibiotikaresistens. Mat kan som nevnt tidligere være utsatt for kontaminering fra veldig mange forskjellige hold, og er et viktig ledd for videre spredning. Antibiotikaresistens hos bakterier i matkjeden er en potensiell eksponeringsrute for alle mennesker. Selv om AR-bakteriene ikke nødvendigvis er patogene, kan de fortsatt bidra til spredning ved å være et reservoar for AR-gener. Studier viser at GI-trakten hos mennesker kan være reservoar for AR-gener (Penders et al., 2013). GI-trakten har høy tetthet av mikroorganismer, og er i tillegg et åpent system som hver dag møter et mylder av bakterier som stammer fra miljøet; deriblant mat og vann. Disse innkommende bakteriene kan ha AR-gener, og hvis de i tillegg er patogene eller opportunistisk patogene av matbåren opprinnelse, kan slike AR-bakterier utgjøre en direkte risiko for verten. Alternativt kan disse innkommende bakteriene overføre sine resistensgener gjennom HGT til GI-traktens

mikrobielle samfunn. Studier har påvist store reservoarer for AR-gener i GI-trakten til mennesker (Rolain, 2013). Disse reservoarene av AR-gener kan mobiliseres og overføres fra en bakterie til en annen bakterie i tarmen, og spesielt til menneskepatogener. På denne måten kan mat være en direkte spredningsvei av AR-gener gjennom konsum av kontaminert mat (se figur 1.2). Av denne grunn er det viktig å også studere utbredelsen av AR-bakterier i matkjeden for å kunne igangsette tiltak for å stoppe videre spredning av antibiotikaresistens.



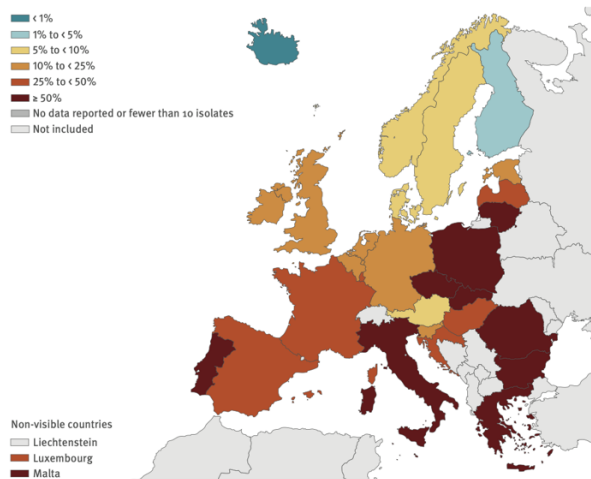
Figur 1.2: Eksempel på spredningsrute for AR-bakterier i salat. Antibiotika gis til matproduserende dyr. AR-bakterier utvikler seg i tarmfloraen til dyrene. Gjødsel eller vanningsvann kontaminert med avføring (og AR-bakterier) brukes på avlinger av salat. Salat kontaminert med AR-bakterier havner på matbordet, overføres til mennesker og kan etablere seg i tarmfloraen. AR kan overføres fra bakterien til patogene bakterier og eventuelt spres videre til andre mennesker. Patogene bakterier med AR kan forårsake infeksjoner som er mer alvorlig og vanskeligere å behandle enn følsomme bakteriestammer.

1.6 Forekomst av antibiotikaresistens i salat

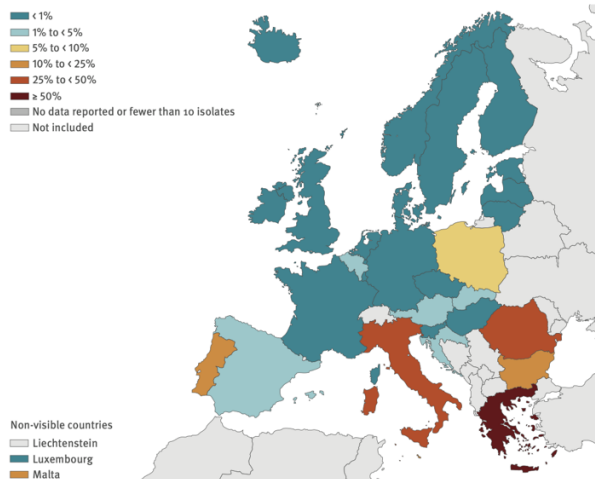
Det har vært mye fokus på antibiotikaresistens i klinisk sammenheng opp gjennom årene, og mer begrenset fokus på utbredelsen av resistens i andre miljøer. I de senere årene har det blitt mer og mer kunnskap om hvordan miljøet og deriblant mat spiller en rolle i spredningen av AR-gener. Studier rundt i verden har påvist en rekke AR-gener i bakterier isolert fra salat. For

eksempel har bakteriestammer resistente mot ampicillin, cefalotin, kloramfenikol, streptomycin, nalidixinsyre, kanamycin og gentamicin blitt påvist i salat og spinat i Canada (Bezanson et al., 2008). *P. aeruginosa*-stammer resistente mot en rekke klasser av antibiotika inkludert ampicillin, kloramfenikol og trimetoprim/sulfametokazol har blitt isolert fra fersk salat fra marked i Jamaica (Allydice-Francis & Brown, 2012). Salat kontaminert med *Shigella* spp. resistente mot tetrasyklin og trimetoprim/sulfametokazol har blitt påvist i Tunisia (Mokhtari et al., 2012). *Salmonella* spp. resistente mot ampicillin, nitrofurantoin, cefalotin og kloramfenikol har blitt isolert fra salat fra to markeder i Mexico (Castaneda-Ramirez et al., 2011). ESBL av CTX-M-15 familien har blitt påvist i *Pseudomonas tessidea*-stammer og ESBL *bla*_{RAHN-2} fra *Rahnella aquatilis* har blitt påvist i spinat i California, USA (Raphael et al., 2011). *Clostridium difficile* resistant mot metronidazol, vankomycin og erytromycin har blitt påvist i salat i USA (Han et al., 2018). Disse funnene tyder på utbredelse av AR-gener hos bakterier isolert fra salat. Selv om det har vært økt bevissthet rundt miljø som kilde til AR-bakterier, er det fortsatt behov for mer kunnskap om utbredelse og spredningsveier.

Norge importerer mye salat fra land i Sør-Europa som blant annet Italia og Spania. Disse områdene er assosiert med høy forekomst av AR-bakterier. For eksempel har et stort utbrudd av New Delhi metallo- β -laktamase (NDM)-produserende «*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase» (KPC) har nylig blitt rapportert i Toscana-området i Italia (The European Centre for Disease Prevention and Control, 2019). Mellom november 2018 og mai 2019 har sykehus i Toscana rapportert om 350 tilfeller. Som figur 1.4 viser, er forekomsten av KPC spesielt høy i Italia og Hellas i sammenligning med andre land i Europa. Til sammenligning viser figur 1.3 forekomsten av *K. pneumoniae* resistant mot 3. generasjons cefalosporiner. Resistens mot bredspekteret cefalosporiner er svært utbredt i Sør-Europa (The European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).



Figur 1.3: *Klebsiella pneumoniae*. Prosent (%) av invasive isolater med resistens mot 3. generasjon cefalosporiner i land i EU/EØS, 2018 (The European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).



Figur 1.4: *Klebsiella pneumoniae*. Prosent (%) av invasive isolater med resistant mot karbapenemer i land i EU/EØS, 2018 (The European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Import av matvarer produsert i land med høy utbredelse av AR-bakterier er en potensiell spredningsrute. I følge NORM/NORM-VET-rapporten fra 2018 er fortsatt forekomsten av AR-bakterier fra mat og dyr i Norge lav i sammenligning med andre land (NORM/NORM-VET, 2018, s. 8-9). Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) og Norsk overvåkingsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler (NORM-VET) utgir en årlig rapport som presenterer data om forekomst av antibiotikaresistens og forbruk av antibiotika i Norge. NORM/NORM-VET følger kravene til overvåking av antibiotikaresistens som er satt av EU-regelverket, i tillegg overvåkes bakterier og resistensformer ut fra nasjonale hensyn. Overvåkingen inkluderer analyser for påvisning av MRSA, *E. coli* resistent mot 3. generasjons cefalosporiner eller karbapenemer, samt kinolonresistente *E. coli*. I 2018 ble blant annet bladsalat undersøkt og det ble påvist noen isolater av *E. coli* resistente mot 3. generasjons cefalosporiner. Det samme isolatet av *E. coli* fikk påvist plasmid-mediert kolistinresistensen. I tillegg ble det påvist enkelte isolater med kinolonresistent *E. coli*. Karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* har aldri blitt påvist i prøver fra dyr eller mat i Norge.

Overvåkingen av AR-bakterier inkluderer hovedsakelig kjente og mer vanlige patogene bakterier i *Enterobacteriaceae*-familien og *Staphylococcus* spp. I tillegg testes det hovedsakelig for de mest vanlige resistensgenene. Dette betyr at vi ikke kan utelukke at det finnes andre bakteriearter som bærer på andre AR-gener i mat som selges på det norske markedet. Disse

bakteriene kan også være et viktig ledd i spredning av resistens. På bakgrunn av studier som har dokumentert hvordan bakterier i tarm kan være reservoar for AR-gener mottatt fra innkommende bakterier, bør også forekomsten av AR-gener i andre bakteriefamilier isolert fra mat, samt forekomsten av mer sjeldne AR-gener undersøkes.

1.7 Metodisk teori

1.7.1 Dyrkningsbaserte metoder

Dyrkningsbaserte metoder er enkle metoder for påvisning av fenotypisk karakteristikk. Screening med bruk av medier tilsatt antibiotika er en mye brukt metode for oppdyrking av bakteriestammer med fenotypisk resistens. Blodagar kan brukes for påvisning av β -hemolyse hos bakteriestammer.

1.7.1.1 Screening for fenotypisk antibiotikaresistens

Screening for fenotypisk antibiotikaresistens gjøres ved bruk av medier tilsatt antibiotika. Stammene som vokser på mediet klarer å vokse i nærvær av antibiotika som er tilsatt. Følsomme stammer vil hemmes av antibiotika og vil ikke vokse på skålen. På denne måten blir stammer med fenotypisk resistens mot antibiotika tilsatt i mediet selektert ut. Ofte er de selektive mediene også kromogene. Kromogene medier inneholder fargeløse molekyler (kromogener) som er substrat for spesifikke enzymer hos en bakterieslekt eller art (Perry, 2017). Når målorganismens enzymer bryter ned det fargeløse kromogene substratet, vil det endre farge. Organismer med enzymer som kan bryte ned kromogenet vil vokse med kolonier med karakteristisk farge og kan skilles fra andre bakterieslekter eller arter.

*Brilliance*TM ESBL (Thermo Fisher Scientific Inc) er en kromogen og selektiv screeningskål for deteksjon av ESBL-produserende organismer. Mediet vil også gi en presumptiv identifisering av ESBL-produserende *E. coli*, samt *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. og *Citrobacter* spp. (KESC-gruppen) (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a). Skålen inneholder cefpodoxim som er et 3. generasjons cefalosporin. I tillegg inneholder skålen andre antimikrobielle stoffer som hemmer de fleste ikke-ESBL *Enterobacteriaceae*, AmpC organismer og andre ikke-ESBL organismer (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a). Skålen inneholder to kromogener som er spesifikke mål-substrat for to enzymer; galaktosidase og β -glucuronidase. KESC-gruppen har enzymaktivitet av galaktosidase som resulterer i grønne kolonier (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a). *E. coli* har enzymaktivitet av både galaktosidase og β -glucuronidase som resulterer i blå kolonier. β -glucuronidase-negative *E. coli* vil danne rosa kolonier. *Proteus*, *Morganella* og *Providencia* kan ikke bryte ned de to kromogenene, men

kan deaminere tryptofan som resulterer i en lys beige farge med brun «halo» (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a). Bakterier med andre resistensmekanismer kan også vokse på skålen.

*Brilliance*TM CRE (Thermo Fisher Scientific Inc) er en kromogen og selektiv screeningskål for deteksjon av karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae*, inkludert NDM-1. Mediet gir også en presumptiv identifisering av KRE. Skålen inneholder et modifisert karbapenem på et nivå som er anbefalt av EUCAST og CLSI (Thermo Fisher Scientific Inc, 2016). Skålen er tilsatt to kromogene stoffer som skiller *E. coli* (rosa kolonier) fra KESC-gruppen (blå kolonier) (Thermo Fisher Scientific Inc, 2016). Resistente ikke-KRE organismer vil vokse med fargeløse kolonier. Bakterier med andre resistensmekanismer kan også vokse på skålen.

1.7.1.2 Påvisning av β -hemolyserende stammer

Blodagar er et næringsrikt medium der et mangfold av bakterier kan vokse og kan brukes for påvisning av β -hemolyse hos bakteriestammer. En generell regel er at bakterier med β -hemolyse er patogene (Sum et al., 2017). β -hemolyse hos ikke-patogene bakterier er sjeldent, derfor er β -hemolyse en prediktiv indikasjon på en patogen bakterie.

Blodagar er et godt medium for vekst av patogene bakterier, da blod bidrar med mange av substansene patogene bakterier krever for å vokse (Turgeon, 2012, s. 486). Blodagar er også et differensierende medium som skiller bakterier etter evnen til å hemolysere erythrocytter. Man skiller mellom α -, β - og ingen-hemolyse. α -hemolyse er ufullstendig/delvis hemolyse av erythrocyttene i mediet og vil vises som grønn misfarging i mediet rundt koloniene (Turgeon, 2012, s. 496). β -hemolyse er fullstendig hemolyse av erythrocyttene i mediet og vil vises som en klar sone rundt koloniene.

1.7.2 Genotypisk deteksjon med molekylærbiologiske metoder

1.7.2.1 DNA-ekstraksjon

Før PCR-reaksjonen må DNA isoleres fra bakteriecellene. Bakterier er prokaryoter og består av ytre lipidmembran, cytoplasma, proteiner, uorganiske salter, metallioner, suktermolekyler og andre elementer som må fjernes for å få rent DNA. DNA-ekstraksjon består hovedsakelig av tre grunnleggende steg; (i) lysing av cellen, (ii) separering av DNA fra andre cellekomponenter og (iii) isolering av DNA (Elkins, 2013). Til dette kan kommersielle DNA-ekstraksjons Kit brukes. GenEluteTM Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich Corporation) lyserer bakteriene i kaotropisk saltløsning. Tilsetning av etanol fører til binding

av DNA når lysatet spinnes gjennom en silica-membran og ned i røret. Materialet blir vasket for å fjerne resterende kontaminanter.

1.7.2.2 Polymerase kjedereaksjon (PCR) og screening for ESBL- og KRE-fenotype ved bruk av multipleks PCR

«Polymerase chain reaction» (PCR) er en etablert metode for amplifisering av små mengder DNA. Små mengder DNA kopieres opp til millioner av identiske kopier av DNA-sekvensen av interesse. Standard PCR er basert på noen få komponenter; vann, buffer, $MgCl_2$, deoksyribonukleotidtrifosfater (dNTP; samlebetegnelse på dATP, dCTP, dGTP og dTTP), to primere (forward og revers), polymerase og templat DNA. Vann tilsettes for å gi et flytende miljø hvor reaksjonen kan skje (Integrated DNA technologies, 2011). Bufferen tilsettes for å gi optimal pH og monovalent saltmiljø. dNTP er byggesteinene i reaksjonen som DNA-polymerase bruker for å syntetisere DNA. Reaksjonen krever energi som fås fra β - og γ -fosfat i dNTP. Templat DNA er DNA fra prøvematerialet som skal amplifiseres. Templat DNA må være så rent som mulig da reaksjonen ikke skiller mellom kontaminert DNA og templat-DNA. $MgCl_2$ tilsettes for å bidra med Mg^{2+} -kationer som kreves som kofaktor for DNA-polymerase. DNA-polymerase er enzymet som katalyserer dannelse av ny DNA-tråd. Vanligvis brukes Taq DNA-polymerase isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*. Taq DNA-polymerase er stabil ved 95 °C og tåler dermed denatureringssteget i PCR-reaksjonen. Primerne av oligonukleotid virker som startsekvens for DNA-polymerase slik at amplifiseringen starter på ønsket del av DNA-sekvensen. Primerne er ofte rundt 18-28 nukleotider som er komplementære til DNA i hver ende av DNA-sekvensen (Lie, 2000). Primerne velges/designes ut fra området av DNA-sekvensen som skal amplifiseres.

PCR-reaksjonen består av tre trinn som gjentas i rundt 30-40 sykluser. Det første trinnet er denaturering med oppvarming til 94-98 °C slik at dobbelttrådet DNA skilles til enkelttrådet DNA. Temperaturen senkes til 50-65 °C slik at primerne kan feste seg på DNA-trådene. Primerne fester seg i område hvor primer-sekvensen er komplementær til templat-DNA-sekvensen. Videre økes temperaturen til 72 °C som er optimal temperatur for aktivitet av Taq-DNA-polymerase (Lie, 2000). DNA-polymerase replikerer DNA fra 3'-hydroksyl-enden av primerne (OH-enden). De tre trinnene gjentas i sykluser med dobling av DNA i hver syklus helt til nok DNA er amplifisert til det formålet det skal brukes. PCR-reaksjonen skjer vanligvis i en termosyklus som har varmeblokker som programmeres etter temperatur, antall sykluser og inkubasjonstid ved hver temperatur. Resultatet av PCR-reaksjonen er millioner av kopier av DNA-sekvensen primerne er rettet mot.

1.7.2.2.1 16S rRNA amplifisering

Amplifisering av gen som koder for 16S ribosomalt RNA (rRNA) gjøres i forkant av Sangersekvensering. 16S rRNA-genet brukes som genetisk markør for taksonomisk differensiering. 16S rRNA-sekvensen sammenlignes med kjente 16S rRNA-sekvenser i en database for å identifisere hvilken bakterieslekt eller art den tilhører. Grunnen til at 16S rRNA-genet egner seg godt som genetisk markør er at det er tilstede i nesten alle bakterier og er stort nok (~ 1,500 bp) for å gi tilstrekkelig genetisk informasjon (Janda & Abbot, 2007). Samtidig har funksjonen av genet ikke forandret seg over tid. 16S rRNA-genet egner seg best for klassifisering på slektsnivå, men i noen tilfeller kan man også klassifisere på artsnivå. Grunnen til dette er at det er større forskjeller i 16S rRNA-genet mellom slekter enn mellom arter.

1.7.2.2.2 Multipleks PCR

Multipleks PCR er en metode der flere ulike primerpar blir brukt i samme PCR-reaksjon. Primerpar som velges er spesifikke for amplifisering av ulike mål-sekvenser, for eksempel resistensgener. Primerpar rettet mot flere resistensgener kan brukes i samme PCR-reaksjon. Dette gjør det mulig å amplifisere flere gener på samme tid i én reaksjon istedenfor én reaksjon for hver av genene (som ved singlepleks PCR). Singlepleks PCR kan brukes for å finne ut hvilket av genene i en positiv multipleks-reaksjon som er tilstede.

1.7.2.3 Renhetsmåling ved bruk av NanoDrop™ 2000

Renheten til ekstrahert DNA vurderes ved å måle absorbans ved bruk av NanoDrop™ 2000 spektrofotometer. NanoDrop™ 2000 spektrofotometer måler absorbans av alle molekyler i prøven som absorberer ved bølglengde av interesse. Siden nukleotider absorberer ved 260 nm vil de bidra til total absorbans i prøven, derfor må nukleinsyreprøver renses før måling (Thermo Fisher Scientific Inc, 2009). Ratioen av absorbans ved 260 nm og 280 nm brukes for å vurdere renheten av DNA. En ratio på ~ 1,8 er vanligvis akseptert som «rent» for DNA. Hvis ratioen er lavere enn dette, indikerer det tilstedeværelse av protein, fenol eller andre kontaminanter som absorberer sterkt ved 280 nm. Ratioen av absorbans ved 260 nm og 230 nm brukes som en sekundær måling av nukleinsyre-renhet. 260/230 ratio for «ren» nukleinsyre er ofte høyere enn for ved 260/280 ratio. Ratioen for 260/230 bør være i området 2,0-2,2. Hvis ratioen er lavere enn forventet kan det indikere tilstedeværelse av kontaminanter som absorberer ved 230 nm, som for eksempel EDTA, karbohydrater og fenol har absorbans nær 230 nm.

1.7.2.4 Kvantifisering av DNA ved bruk av Qubit® fluorometer

Kvantifisering av DNA gjøres for å bestemme mengden DNA i prøven for å vurdere om det er nok DNA i prøven eller om den eventuelt må fortynnes. Kvantifisering gjøres også for å kunne vurdere hvor mye primer som skal tilsettes ved Sangersekvensering. Ved kvantifisering av DNA ved bruk av Qubit® 2.0 fluorometer, brukes fluorescens-baserte reagenser som er selektive for dsDNA. Måleinstrumentet måler fluorescens og kan dermed beregne mengden DNA i prøven. Siden man bruker fargestoffer som er selektive for dsDNA vil effekten av forurensing i prøven som kan påvirke analysen minimeres (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010b).

1.7.2.5 Agarose-gelelektroforese

Agarose-gelelektroforese brukes for å separere DNA-fragmenter ut fra molekylstørrelse. Agarose-gelelektroforese egner seg til separering av DNA-fragmenter i størrelsesområdet 100 bp til 25 kb (Lee et al., 2012). Agarose er et polysakkarid isolert fra tang-artene *Gelidium* og *Gracilaria*. (Lee et al., 2012). Agarose består av 1,3-bundet β -D-galaktose og 1,4-bundet 3,6-anhydro- α -L-galaktose og har en tilfeldig spiralstruktur ved høye temperaturer (Stellwagen, 2010). Ved avkjøling danner agarosekjedene spiralformede fiberbunter som holdes sammen av ikke-kovalente hydrogenbindinger. Gelering skjer ved ytterligere avkjøling, da blir fiberbuntene bundet sammen i «koblingssoner» ved dannelse av ytterligere hydrogenbindinger (Stellwagen, 2010). Dette nettverket av fiberbunter utgjør porer i gelen som DNA-fragmentene kan vandre gjennom. Jo høyere konsentrasjon av agarose, dess mindre porestørrelse i gelen (Lee et al., 2012).

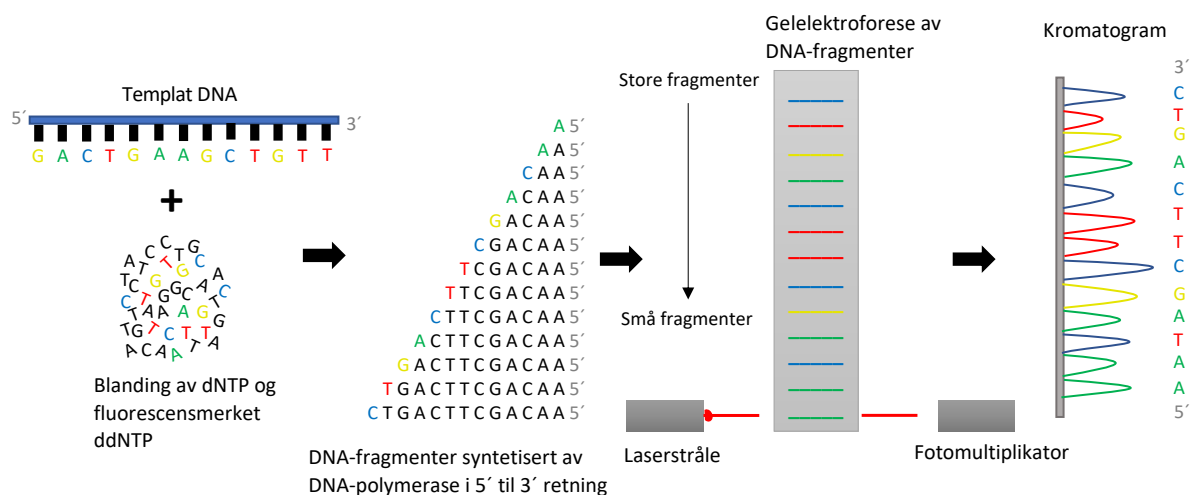
DNA blir tilført i støpte brønner i gelen og strømkilde settes på. Fosfatryggen i DNA-molekylet er negativt ladd og vil migrere til positivt ladd anode på motsatt side av gelen når DNA-fragmentene plasseres i et elektrisk felt (Lee et al., 2012). Migrasjonshastigheten til et DNA-molekyl gjennom en gel bestemmes av størrelsen på DNA-molekylene, konsentrasjonen av agarose i gelen, DNA-konformasjon, spenning påført gelen (volt), nærvær av etidiumbromid, type agarose og elektroforesebuffer (Lee et al., 2012). Mindre molekyler vil ha mindre friksjon når de beveger seg gjennom gelen og vil dermed bevege seg raskere enn store molekyler. På denne måten vil molekylene separeres fra størst til minst når gelen avleses fra bunnen til toppen. Man bruker ofte fargestoffet bromfenylblått for å se hvor langt elektroforesen har gått og kan dermed stoppe elektroforesen når molekylene har vandret tilstrekkelig langt. Etter separasjon kan DNA-molekylene visualiseres som «bånd» på gelen under UV-lys. Omtrentlig størrelse på

molekylene i båndene kan vurderes ved å sammenligne med en «ladder». En ladder er en størrelsesmarkør med bånd der molekylene har kjent størrelse.

1.7.2.6 Sangersekvensering

Sangersekvensering er den mest brukte metoden for DNA-sekvensering. Metoden gir en nøyaktig basesekvens av templat-DNA. På forhånd kjøres standard PCR for å amplifisere nok kopier av DNA. Prinsippet til Sangersekvensering bygger på «kjede-terminering PCR» som ligner veldig på standard PCR, men med en stor forskjell; tilsetning av dideoksyribonukleotidtrifosfat (ddNTP, fellesbetegnelse for ddTTP, ddCTP, ddATP og ddGTP) (Sigma-Aldrich, u.å.). De fire ddNTP er merket med hvert sitt karakteristiske fluorescerende molekyl.

Sekvenseringen starter ved at primer fester seg på templat DNA. Ved begynnelsen av 3'-enden vil en ny DNA-tråd syntetiseres ved at DNA-polymerase fester dNTP til den voksende DNA-tråden (Valencia et al., 2013, s. 4). DNA-polymerase katalyserer dannelse av fosfatdiesterbindinger mellom den frie 3'-hydroxyl-gruppen (OH-gruppen) på den voksende enden av primeren og 5'-fosfatgruppen på dNTP (Valencia et al., 2013, s. 5). Ved en tilfeldig binding av ddNTP istedenfor dNTP avbrytes reaksjonen. ddNTP mangler 3'-OH-gruppe som kreves for å danne fosfodiester-bindinger, og dermed kan ikke sekvensering fortsette (Sanger et al., 1977). Resultatet blir dannelse av millioner til milliarder av DNA-fragmenter avbrutt ved tilfeldige lengder (se figur 1.5) (Sigma-Aldrich, u.å.).



Figur 1.5: Prinsipp for Sangersekvensering. Templat-DNA tilsettes DNA-polymerase, dNTP og fluorescensmerket ddNTP, det dannes millioner av DNA-fragmenter avbrutt ved tilfeldige lengder. DNA-fragmentene blir separert med gelelektroforese. Laster stimulerer fluorescens som resulterer i kromatogram med «fluorecsens-peaks» med baserekkefølgen til sekvensen.

DNA-fragmentene blir videre separert ut fra størrelse ved bruk av gelelektroforese. Mindre fragmenter har mindre friksjon når de beveger seg gjennom gelen og vil derfor bevege seg raskere. Resultatet blir separerte DNA-fragmenter fra minst til størst når man leser gelen fra bunnen til toppen (Sigma-Aldrich, u.å.).

Ved avlesning av gelen kan man bestemme basesekvensen av DNA. På bakgrunn av at DNA-polymerase bare syntetiserer DNA fra 5'-til 3'-retning, vil hver terminator-ddNTP tilsvare et spesifikt nukleotid i den opprinnelige DNA-sekvensen. Det korteste DNA-fragmentet tilsvare det første nukleotidet fra 5'-enden, det nest korteste DNA-fragmentet tilsvare det andre nukleotidet fra 5'-enden osv. (Sigma-Aldrich, u.å.). På denne måten kan man lese av gelbåndene fra minst til størst og bestemme 5'- til 3'-sekvensen. Ved automatisert Sangersekvensering detekteres hvert bånd i kapillærgelen i rekkefølge ved at en laser stimulerer de fluorescerende molekylerne i hvert bånd, og en sensor detekterer lyset som avgis (Sigma-Aldrich, u.å.). Bølgelengden på lyset er karakteristisk for hver av de fire ddNTP og kan dermed knyttes til identiteten til ddTTP, ddCTP, ddATP og ddGTP. Resultatet blir et kromatogram som viser «fluorescens-peaks» for hvert nukleotid langs lengden av templat-DNA.

1.7.2.7 Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq sekvensering

Illumina MiSeq er en neste-generasjonssekvensering (NGS) metode og brukes til helgenomsekvensering. NGS-plattformer utfører en massiv parallellsekvensering der millioner av fragmenter av DNA fra en enkelt prøve blir sekvensert samtidig (Grada & Weinbrecht, 2013). Denne teknologien gjør det mulig å sekvensere hele genomet på under en dag. Hele sekvenseringsprosessen kan dels inn i 4 trinn: (i) forberedelse av templat, (ii) dannelsen av «cluster», (iii) sekvensering og (iv) dataanalyse.

Forberedelse av templat består av bygge et bibliotek av DNA og videre amplifisere dette biblioteket (Grada & Weinbrecht, 2013). Sekvensbiblioteket bygges ved å fragmentere DNA fra prøven og feste på adaptersekvenser på endene av DNA-fragmentene. Adaptersekvensene er syntetiske oligonukleotider med kjent sekvens som gjør det mulig å skille fragmentene fra hverandre etter sekvensering. DNA-biblioteket blir amplifisert og gjør at det blir mulig å sekvensere millioner av fragmenter samtidig.

Dannelsen av cluster skjer ved at DNA-fragmentene blir plassert på en overflate («flow cell») dekket av oligonukleotider. Adapterne på bibliotek-DNA fester seg på komplementære

oligonukleotider. Hvert fragment blir amplifisert til et cluster av kloner gjennom «bridge» amplifisering. Når cluster-dannelse er fullført, er templatene klare for sekvensering.

Miseq-systemet fungerer etter prinsippet «sekvensering ved syntese» og bestemmer nukleotidrekkefølgen ved å detektere fluorescens når fluorescens-merkede nukleotider festes på den voksende DNA-tråden (Grada & Weinbrecht, 2013). Basesekvensen blir bestemt ved deteksjon av bølgelengde og lysintensitet fra stråling som avgis fra de fluorescerende nukleotidene. Hver av de fire nukleotidene har karakteristisk fluorescens og dermed kan basesekvens identifiseres. Dette skjer i flere sykluser til alle DNA-fragmenter er sekvensert.

Etter sekvenseringen er ferdig må sekvens-rådata gjennom flere dataanalysesteg. Sekvensene består av tusenvis av korte fragmenter (300 bp) som kalles «reads». Kort forklart består datanalysen av forbehandling av data for å fjerne adaptersekvenser og sekvenser med lav kvalitet, sammensetning av data og analyse av sammensatt sekvens. Analyse av sekvensen kan omfatte et bredt utvalg av bioinformatiske metoder.

1.7.3 Antibiotika følsomhetstest

Følsomhetstest er en fenotypisk metode som brukes for å vurdere bakteriestammens følsomhet mot utvalgte antibiotika. Antibiotika-gradientstrips legges på en Mueller-Hinton (MH)-agarskål inokulert med bakterieløsning tilsvarende 0,5 McFarland standard. MH-medium er et standardmedium for følsomhetstest som er anerkjent av Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) og European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) og brukes i standardprosedyrer. McFarland standard brukes til å standardisere omtrentlig antall av bakterier i en væskesuspensjon ved å sammenligne turbiditeten av prøvesuspensjonen med turbiditeten til McFarland standarden (Dalynn Biologicals, 2002). McFarland standard er en kjemisk løsning av bariumklorid og svovelsyre. En kjemisk reaksjon mellom disse to kjemikaliene resulterer i dannelse av et fint bunnfall av bariumsulfat. Når dette bunnfallet blandes godt er McFarland standarden visuelt sammenlignbar med en bakteriesuspensjon med kjent konsentrasjon. McFarland standard 0,5 kan sammenlignes med omtrentlig $1,5 \times 10^8$ bakteriesuspensjon/mL.

Når gradientstripsen legges på inokulert medium, diffunderer den forhåndsdefinerte eksponentielle gradienten av antimikrobielt middel til mediet (Liofilchem Inc, u.å.). Etter 18 timer inkubasjon eller lenger, dannes en symmetrisk hemmingsellipse sentrert langs stripsen. «Minimum inhibitory concentration» (MIC) leses av direkte fra skalaen i form av $\mu\text{g/mL}$

(mg/L) på det punktet der kanten av hemmingsellipsen krysser MIC-teststrimmelen. MIC er definert som den laveste konsentrasjonen av et antimikrobielt middel som vil hemme synlig vekst av en mikroorganisme etter inkubering (Andrews, 2001).

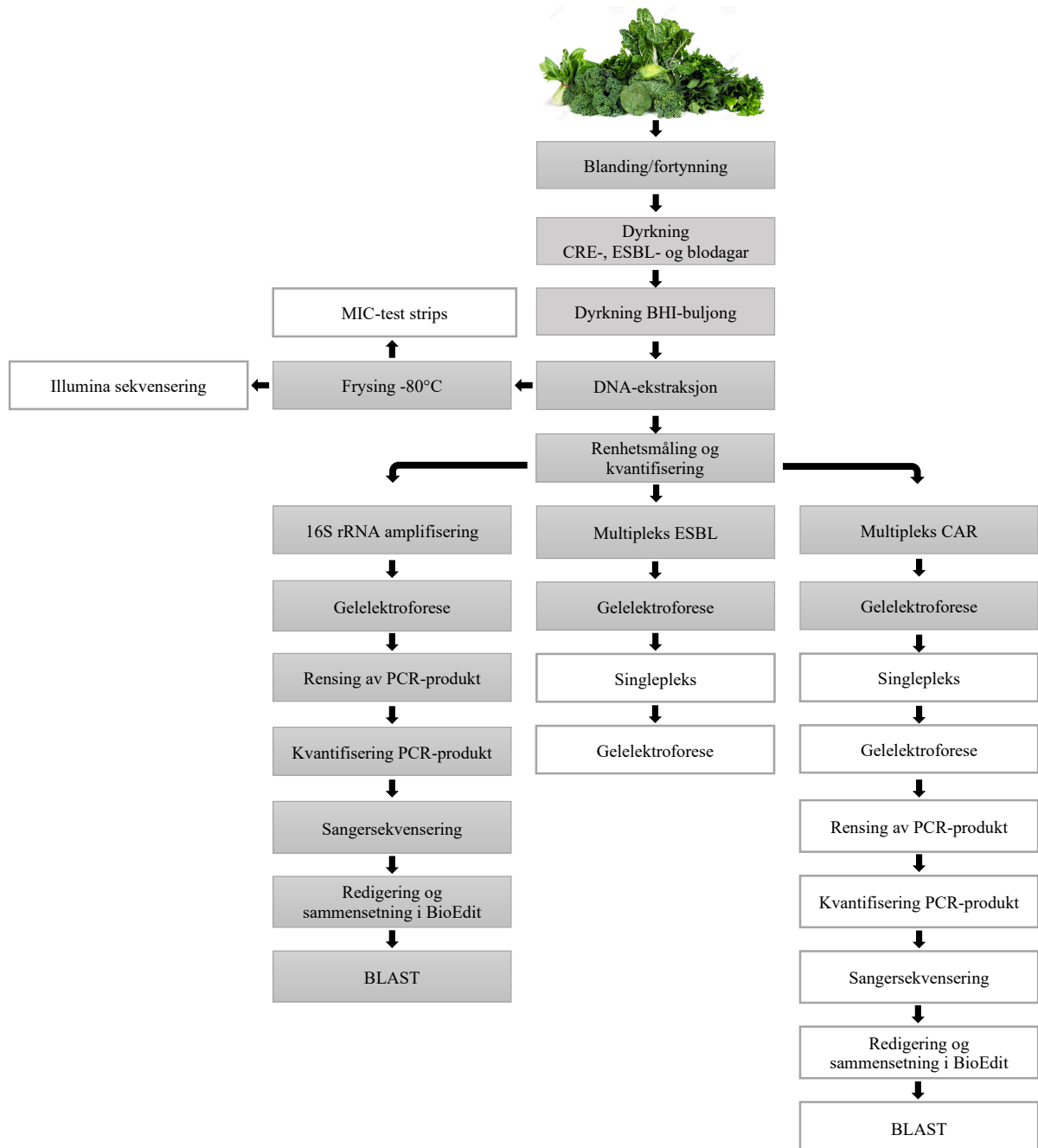
EUCAST har utviklet brytningspunkt for å kategorisere bakterier i tre kategorier; resistent (R), følsom ved økt eksponering (I) og følsom for standarddose (S). Bakterien er kategorisert som R når det er høy sannsynlighet for behandlingssvikt ved bruk av antibiotikumet, selv ved økt eksponering (EUCAST, 2020). Bakterien er kategorisert som I når det er høy sannsynlighet for at behandlingen virker ved økt eksponering av antibiotikumet. Bakterien er kategorisert som S når det er høy sannsynlighet for at behandling med antibiotikumet virker når antibiotikumet gis i henhold til standard doseregime.

Brytningspunktene for resistens settes ved å sammenligne farmakokinetikk/farmakodynamikk av antibiotikumet i kombinasjon med virkning på «villtype» bakterier. Bakterier defineres som resistent mot antimikrobiell forbindelse når MIC er høyere enn for villtypen av samme bakterie (EUCAST, 2020). Av denne grunn vil brytningspunktene variere mellom forskjellige arter og geografiske regioner. EUCAST har ikke utviklet brytningspunkt for alle organismer. I tilfeller hvor det ikke finnes artsspesifikke brytningspunkt eller andre anbefalinger brukes farmakokinetikk/farmakodynamikk (PK-PD)-brytningspunkt. PK-PD brytningspunkt er ikke-artsspesifikke brytningspunkt som er basert på om MIC kan oppnås hos en pasient med hensyn til medisindosering (farmakokinetikk) og virkemåte (farmakodynamikk) og om det kan forventes å resultere i suksessfull behandling. Hvis MIC er høyere enn PK-PD R-brytningspunkt er bruk av middelet frarådet. Hvis MIC er lavere eller samme som PK-PD S-brytningspunkt kan midlet brukes med forsiktighet mot aktuell organisme.

2. Materialer og metoder

2.1 Flytskjema over prosess og metoder

Figur 2.1 viser flytskjema over prosessen og metoder brukt for analyse av salat. Grå bokser illustrerer prosess/metode alle prøvene gikk gjennom. Hvite bokser illustrerer prosess/metode utvalgte prøver gikk gjennom.



Figur 2.1: Flytskjema over prosess- og metodeflyt. Grå bokser: alle prøver. Hvite bokser: utvalgte prøver.

2.2 Prøvemateriale

Prøvematerialet i denne studien var tre «vasket og spiseklar» salater. Salat 1 (S1) ble kjøpt inn 21.01.20 og salat 2 (S2) og salat 3 (S3) ble kjøpt inn 03.02.20. S1 og S3 var importert fra Italia og Spania, og S2 var importert fra Italia.

Prøvemateriale ble veid opp i VWR® Blender Bag med filter og tilsatt 100 ml milliQ-vann (se tabell 2.1) (VWR International). Stomacher 400 Laboratory Blender fra Seward ble brukt til å blande prøvematerialet (Seward Ltd). Posene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

Tabell 2.1: Mengde prøvemateriale for prøve S1, S2 og S3.

Prøve	Vekt (g)	milliQ-vann (ml)
S1	15,56	100
S2	24,60	100
S3	28,90	100

2.3 Fenotypisk dyrkningsbaserte metoder

Prøvematerialet fra inkubert pose ble dyrket på de selektive kromogene mediene; *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE fra Oxoid (Thermo Fisher Scientific Inc). Prøvematerialet ble i tillegg dyrket på Tryptone Soya Agar med saueblod fra Oxoid (Thermo Fisher Scientific Inc).

2.3.1 Dyrkning på Tryptone Soya Agar med saueblod

Prøvematerialet fra inkubert pose ble fortynt 1:100, 1:500, 1:1000 og 1:10.000 med milliQ-vann og dyrket på Tryptone Soya Agar med saueblod fra Oxoid (Thermo Fisher Scientific Inc). Agarskålene ble inkubert ved 37 °C i 24-48 timer. Etter inkubering ble hemolyserende enkeltkolonier fra hver av prøvene (S1, S2 og S3) podet videre på ny Tryptone Soya Agar med saueblod og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Dette ble gjort i to omganger for å rendyrke koloniene. Etter rendyrkning ble hemolyserende koloni dyrket i Brain Heart Infusion buljong (BHI) i 24 timer (Thermo Fisher Scientific Inc). BHI-buljong ble laget etter produsentens prosedyre.

2.3.2 Dyrkning på selektive kromogene medium (*Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE).

Prøvemateriale fra inkubert pose ble dyrket på de selektive kromogene mediene *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE med hensikt å screene bakteriene etter ESBL- og KRE-fenotypisk resistens (Thermo Fisher Scientific Inc). Agarskålene ble inkubert i 24-48 timer ved 37 °C. Enkeltkolonier ble podet videre på ny *Brilliance*TM ESBL- og *Brilliance*TM CRE-skål (Thermo

Fisher Scientific Inc). Dette ble gjort i to omganger for å rendyrke koloniene. Etter rendyrkning ble kolonier dyrket i BHI-buljong i 24 timer (Thermo Fisher Scientific Inc). BHI-buljong ble laget etter produsentens prosedyre.

Fargeforandring i bakteriekoloniene ble vurdert i henhold til screeningprosedyre for *Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE (Thermo Fisher Scientific Inc). Fargescreeningprosedyre er kort oppsummert i tabell 2.2.

Tabell 2.2: Identifisering av bakteriekolonier i henhold til produsentens fargescreeningprosedyre (Thermo Fisher Scientific Inc)

ESBL			
Blå eller rosa	<i>E. coli</i>		
Grønn	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia og Citrobacter</i>		
Brun «halo»	<i>Proteus, Morganella og Providencia</i>		
Fargeløse	<i>Salmonella, Acinetobacter</i> eller andre ¹		
CRE			
«CRE positive»		«Resistent ikke-KRE»	
Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia og Citrobacter</i>	Hvite eller fargeløs	<i>Acinetobacter</i> eller andre ¹
Rosa	<i>E. coli</i>	Brun «halo»	<i>Proteus, Morganella, Providencia</i> eller andre ¹

Bakterier med andre resistensmekanismer kan også vokse på skålen

Prøveidentitet ble gitt ut ifra hvilken salat bakterien stammet fra og hvilket medium den vokste på, som vist i tabell 2.3.

Tabell 2.3: Prøveidentitet gitt ut fra opprinnessalat og vekst på medium

Prøve	Hentet fra ¹	Prøveidentitet
Salat 1	Tryptone Soya Agar med saueblod	S1.1
	<i>Brilliance</i> TM CRE	S1.2
	<i>Brilliance</i> TM ESBL	S1.3
	<i>Brilliance</i> TM ESBL	S1.4
Salat 2	Tryptone Soya Agar med saueblod	S2.1
	<i>Brilliance</i> TM CRE	S2.2
	<i>Brilliance</i> TM CRE	S2.3
	<i>Brilliance</i> TM ESBL	S2.4
	<i>Brilliance</i> TM ESBL	S2.5
Salat 3	Tryptone Soya Agar med saueblod	S3.1
	<i>Brilliance</i> TM CRE	S3.2
	<i>Brilliance</i> TM ESBL	S3.3

¹⁾ Alle mediene er fra Thermo Fisher Scientific Inc.

2.4. DNA-ekstraksjon

DNA-ekstraksjon fra bakteriekoloniene ble utført med bruk av «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits» fra Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Corporation). Ekstraksjonen ble utført i henhold til produsentens prosedyre for Gram-positive bakterier, med unntak av steg 10 hvor bufferen til «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» ble erstattet med «SequalPrep Elution buffer» fra Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc). Årsaken er at Sigma-Aldrich sin elueringsbuffer inneholder EDTA. EDTA hemmer enzym som er viktig for sekvensering, noe som fører til redusert utbytte eller lav og ujevn dekning (coverage) ved bioinformatiske analyser (Lindstedt, 2020).

500 µl av bakteriekultur ble tilsatt 500 µl 60% glyserol i 2 ml Nunc™CryoTubes™ (Thermo Fisher Scientific Inc). Rørene ble fryst ved -80 °C for langtidsoppbevaring.

2.5 Kvantifisering og renhetsmåling av DNA

Renheten til DNA i prøvene etter DNA-ekstraksjon ble vurdert med bruk av NanoDrop™ 2000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc). Instrumentet ble kalibrert med 2 µl destillert vann før bruk. Prøvene ble avlest etter instrumentets prosedyre. Ratioene 260:280 nm og 260:230 nm ble avlest. Linsen ble tørket med papir mellom hver avlesning.

Kvantifisering av DNA-konsentrasjonen i prøvene etter DNA-ekstraksjon ble utført ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc). Utførelsen ble gjennomført etter produsentens prosedyre for dsDNA «broad range» (BR) kvantifisering. DNA Standard 1 og 2 ble avlest før avlesning av prøver (Thermo Fisher Scientific Inc). Det ble laget «working solution» av 199 µl Qubit™ Buffer og 1 µl Qubit™ Reagent per prøve. 198 µl Qubit «working solution» ble tilsatt 2 µl prøve og avlest etter instrumentets prosedyre.

2.6 Sangersekvensering av 16S rRNA

2.6.1 16S rRNA amplifisering ved bruk av PCR

For amplifisering av 16S rRNA ble det brukt «iProof™ High Fidelity DNA Polymerase Kit» (Bio-Rad Laboratories Inc). Det ble laget en «mastermix» av Iproof™ HF buffer, dNTP, Forward og Reverse primer, PCR grade H₂O og Iproof™ DNA polymerase (Bio-Rad Laboratories Inc). 38 µl av mastermix ble tilsatt 2 µl prøve (templat DNA) i «PCR 8 – tube strips» (VWR International) eller «MicroAmp® 8-Tube Strip» (Applied biosystems® by life technologies™) etter hvilken PCR-maskin som ble brukt. Dette ble gjort for hver prøve. Tabell 2.4 viser forberedelse av DNA for PCR; start- og sluttkonsentrasjon i PCR-reaksjonen, samt

volum av reagensene for en reaksjon. Tabell 2.5 viser primersekvensene brukt for amplifisering.

Tabell 2.4: Reaksjonsoppsett for amplifisering av 16S rRNA ved bruk av PCR.

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

¹⁾ Konsentrasjonen av templat DNA varierte i de ulike prøvene, se vedlegg A for konsentrasjonsmålinger.

Tabell 2.5: Primersekvenser brukt til amplifisering av 16S rRNA-genet

Primer	Primersekvens (5'-3')	Størrelse (bp)
«Forward»	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	1505
«Reverse»	GGTTACCTTGTTACGACTT	

PCR-maskinene som ble benyttet i denne masteroppgaven var Bio-Rad C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc), PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research) og SimpliAmp Thermal Cycler (Applied biosystems[®] by life technologiesTM). Tid- og temperaturprogram for PCR-maskinen brukt for amplifisering av 16S rRNA-gen vises i tabell 2.6.

Tabell 2.6: Tid/temperatur-program for PCR-reaksjon for amplifisering av 16S rRNA

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

2.6.2 Agarose gelelektroforese

For utførelse av elektroforese ble det laget 0,8% agarosegel. Det ble laget både store og små geler etter hvor mange PCR-produkter som skulle analyseres. 50 ml 1x Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer (Bio-Rad Laboratories Inc) og 0,4 g SeaKem® LE Agarose (Cambrex Bio Science Rockland Inc) ble blandet sammen i en Erlenmeyerkolbe (for stor gel ble ingrediensene x5). 1x TAE-buffer ble fortynnet fra 5x TAE-buffer (50 mM EDTA-dinatriumsalt, 2 M Tris og 1 M iseddik). Kolben med løsningen ble varmet i mikrobølgeovn på maksimum styrke til løsningen kokte (ca. 1 minutt), etterfulgt av 1 minutt på 600 watt til alt pulveret var oppløst. Etter oppvarming ble kolben satt til avkjøling på benk. Videre ble 2,5 µl (12,5 µl for stor gel) GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) tilsatt før løsningen ble helt over i et utstøpningskar med brønnkammer (Bio-Rad Laboratories Inc).

Etter gelen var fast ble brønnkammene tatt ut. Små geler ble overført til Mini-Sub® Cell Model GT System (Bio-Rad Laboratories Inc) og store geler til Sub-Cell® Cell Model GT System (Bio-Rad Laboratories Inc) som var fylt med 1x TAE-buffer. 1 µl 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs Inc), 4 µl Gel Loading Dye (New England Biolabs Inc) og 20 µl 1x TAE-buffer ble blandet sammen i Eppendorfrør. 6 µl av denne «ladder» ble tilsatt i første brønn på agarosegelen, samt midterste brønn på stor gel. 3 µl prøve, 4 µl milliQ-vann og 3 µl Agarose Gel Loading dye 6x (VWR Life Science Ambresco) ble blandet sammen i brønn på en brønnplate for hver av prøvene. 10 µl av denne blandingen ble tilsatt brønnene på agarosegelen. Bio-Rad PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc) ble brukt som strømkilde for elektroforese. 80-130 volt ble brukt for alle PCR-produktene. Strømmen ble skrudd av da molekylene var vandret tilstrekkelig langt i gelen. Agarosegelen ble tatt bilder av under UV-lys i Molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc). Båndstørrelse på PCR-produktene ble vurdert ved å sammenligne med «ladder».

2.6.3 Rensing av 16S rRNA PCR-produkt

GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich Corporation) ble brukt til rensing av PCR-produkt. Rensing ble utført etter produsentens prosedyre. Etter rensing ble DNA-konsentrasjonen kvantifisert ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc). Utførelsen ble gjennomført etter produsentens prosedyre for dsDNA BR kvantifisering på samme måte som tidligere. Prøver med >80 ng/µl ble tilsatt 3 µl prøve og 7 µl primer i 1,5 ml Microtubes (Axygen Inc) prøver med 20-80 ng/µl ble tilsatt 5 µl prøve og 5 µl primer, og prøver med <20 ng/µl ble tilsatt 7 µl prøve og 3 µl primer. Rørene ble sendt til Eurofins Gac biotech, Konstanz, Germany for Sangersekvensering.

2.6.4 Dataanalyse Sangersekvensering

Rådata mottatt fra Eurofins Genomics i form av «forward»- og «reverse»-sekvenser ble behandlet ved bruk av BioEdit® Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences Inc). Sekvensområder med dårlig separering av baser ble klippet bort. Med bruk av funksjonen «CAP contig assembly program» ble sekvenspar sammenslått til en kontig-sekvens. Kontig-sekvensene ble kopiert inn i «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST) fra «National Center for Biotechnology Information» (NCBI). BLAST finner regioner med likhet mellom sekvenser. Programmet sammenligner nukleotidsekvens til sekvenser i databasen og beregner statistisk signifikans. Det ble utført søk i standard database med valgfunksjonen «Reference RNA Sequences».

2.7 Screening for ESBL- og KRE-genotypisk resistens

2.7.1 Multipleks PCR for påvisning av ESBL- og KRE-genotyper

Det ble benyttet tre multipleks primermikser (ESBL 1, 2 og 3) for screening for ESBL-genotypisk resistens. For screening av KRE-genotypisk resistens ble det brukt to multipleks primermikser (CAR 1 og 2). Hver primermiks inneholdt 3-4 primerpar rettet mot målgen som er vanlige for ESBL og karbapenemaser. Det ble også laget en mastermiks som inneholdt positive kontrollgener (positiv kontroll). Tabell 2.7 og 2.8 viser oversikt over primere i primermiksene. Alle primerne er fra invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc).

Tabell 2.7: Oversikt over primere brukt i primermikser for screening av KRE-genotype

Primere	Primersekvens (5'-3')	Målgen	Størrelse (bp)	Referanse
CAR 1				
CMY2_F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	<i>bla_{CMY}</i>	188	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
CMY2-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACG			
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla_{OXA-48}</i>	281	(Dallenne et al., 2010)
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA			
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	<i>bla_{IMP}</i>	393	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT			
MultiTSOO-F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla_{VIM}</i>	564	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
MultiTSOO-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT			
CAR 2				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla_{NMD}</i>	157	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT			
SFC1-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	<i>bla_{SFC}</i>	268	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
SFC1-R	CACTGTACTGCAGAGTGGCA			
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla_{KPC}</i>	460	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			

Tabell 2.8: Oversikt over primere brukt i primermiksene for screening av ESBL-genotype

Primere	Primersekvens (5'-3')	Målgen	Størrelse (bp)	Referanse
ESBL 1				
MultiOxa48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> _{OXA-48}	281	(Dallenne et al., 2010)
MultiOxa48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA			
MultiCTXMGp2-F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 2)	404	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp2-R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT			
MultiTSOO-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla</i> _{OXA}	564	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSOO-R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG			
MultiTSOS-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla</i> _{SHV}	713	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSOS-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC			
ESBL 2				
MultiCTXMGp9-F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 9)	561	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp9-R	TGATTCTCGCCGCTGAAG			
MultiCTXMGp1-F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 1)	688	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp1-R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT			
MultiSOT-F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla</i> _{TEM}	800	(Dallenne et al., 2010)
MultiSOT-R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
ESBL 3				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla</i> _{NDM}	157	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT			
VIM-F	ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT	<i>bla</i> _{VIM}	564	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT			
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla</i> _{KPC}	460	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			
Positiv kontroll				
rpoB-F	CAGGTCGTCACACGGTAACAAG	<i>rpoB</i>	512	Universale primere
rpoB-R	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC			
16S-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S rRNA	1505	Universale primere
16S-R	GYTACCTTGTTACGACTT			

Amplifisering av aktuelle resistensgener ble utført ved bruk av QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen). Produsentens prosedyre ble fulgt, med unntak av at volumet ble halvert; det ble brukt totalt reaksjonsvolum på 25 µl istedenfor 50 µl (se tabell 2.9). Reagensene ble pipettert i PCR-rør før prøvene ble plassert i PCR-maskin. PCR-program for amplifisering av DNA i ESBL-prøver er vist i tabell 2.10, og for amplifisering av DNA i CAR-prøver er vist i tabell 2.11. Etterpå ble gelelektroforese utført på samme måte som ved amplifisering av 16S rRNA.

Tabell 2.9: Reaksjonsoppsett for multipleks PCR

Reagenser	Volum (1 reaksjon) (µl)	Sluttkonsentrasjon
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12,5	1x*
Primermiks	2,5	0,2 µM av hver primer
PCR-grade H ₂ O	9	-
Templat DNA	1	< 1 µg DNA/reaksjon
Totalt reaksjonsvolum	25	

* Inneholder 3 mM Mg²⁺

Tabell 2.10: Tid/temperatur-program for PCR-reaksjon for amplifisering av ESBL-gener

	Tid (min:sek)	Temperatur (°C)	Sykluser
Aktivering	15:00	95	1
3-trinns-syklus:			
Denaturering	00:30	94	28
Primer annealing	01:30	62	
Primer ekstensjon	01:30	72	
Endelig ekstensjon	10:00	72	1
Avkjøling	∞	4	

Tabell 2.11: Tid/temperatur-program for PCR-reaksjon for amplifisering av CAR-gener

	Tid (min:sek)	Temperatur (°C)	Sykluser
Aktivering	15:00	95	1
3-trinns-syklus:			
Denaturering	00:30	94	30
Primer annealing	01:30	60	
Primer ekstensjon	01:30	72	
Endelig ekstensjon	10:00	72	1
Avkjøling	∞	4	

2.7.2 Singlepleks PCR

Det ble utført singlepleks PCR på prøver som var positive på multipleks PCR. Primerpar rettet mot enkelt-målgen ble tilsatt i separate PCR-rør sammen med resten av reagensene (se tabell 2.9). Det ble benyttet samme reagenser, primere og PCR-program som ved multipleks PCR. Agarosegelelektroforese ble gjennomført på samme måte som ved multipleks PCR. Prøver som var positive på singlepleks PCR ble rensset på samme måte som ved 16S rRNA og sendt til Eurofins Genomics i Tyskland for Sangersekvensering.

2.8 Antimikrobiell følsomhetstesting

MIC (Liofilchem) og ETEST® (bioMérieux) gradient-strips ble brukt for å vurdere følsomhet mot ulike antibiotika. 12 antibiotikum som omfatter 7 antibiotikaklasser ble vurdert (se tabell 2.12). Bakterier ble tilsatt saltvannsløsning med 8,5 % NaCl. 0,5 McFarland standard (Dalynn Biologicals) ble brukt som sammenligning for å få ca. samme antall av bakterier i løsningen. Bakterieløsningen ble «swabet» ut på Mueller Hilton (MH)-agar (Oxoid). Etterpå ble gradient-strips lagt på inokulert MH-agarskål. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Minste hemmende konsentrasjon (mg/L) ble avlest. Det ble gjort to paralleller av alle testene. Gjennomsnittet av de to parallellene ble brukt som MIC-verdi.

Tabell 2.12: Oversikt over panel av antibiotika for følsomhetstesting

Antibiotikaklasser	Antibiotikum
Aminoglykosider	Amikacin Gentamicin Streptomycin
Cefalosporiner	Cefotaxim (3. generasjon) Cefepim (4. generasjon)
Fluorokinoloner	Ciprofloxacin
Karbapenemer	Imipenem Meropenem
Makrolider	Erytromycin
Penicilliner	Ampicillin (3. generasjon) Amoxicillin med clavulansyre
Trimetoprim	Trimetoprim

2.9 Illumina MiSeq sekvensering

Forberedelse og sending av prøver til Illumina MiSeq sekvensering ble utført av PhD kandidat Misti Dawn Finton. 200 ng prøve-DNA til 20 µl sterilt vann ble tilsatt 1,5 ml Eppendorfrør og sendt til Norwegian Sequencing Centre som utførte analysen. Prøvene ble sekvensert på en 201 Illumina MiSeq-plattform.

Databearbeiding av rådata ble utført av professor Bjørn-Arne Lindstedt. Rådatasekvensene består av korte fragmenter (300 bp) som kalles «reads». Adaptersekvensene og «reads» med lav kvalitet ble fjernet med bruk av programmet «Trimmomatic». «Reads» ble sammenslått til lengre fragmenter med bruk av programmet «Shovill». De lengre fragmentene, «contigs», ble brukt til flere søke-analyser; (i) «Comprehensive Antibiotic Resistance Database» (CARD), (ii)

«The Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database» (ved NCBI) og (iii) «The virulence factor database» (VFDB). CARD og «The Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database» ble brukt for å finne resistensgener. VFDB ble brukt for å finne virulensgener. Identifikasjon av isolatene ble gjort ved bruk av «Ribosomal Multilocus Sequence Typing» (rMLST).

3. Resultater

3.1 Fargescreening fra fenotypisk dyrkning og Sangersekvensering av 16S rRNA

Fargeforandringer i kolonier som vokste på *Brilliance*TM CRE og *Brilliance*TM ESBL ble tolket etter produsentens prosedyre (Oxoid). Tolkningen av fargescreening og BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens er oppsummert i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Tolkning av vekst og fargescreening fra fenotypisk dyrkning, samt BLAST-søk

Prøve	Bilde	Tolkning/fargescreening	16S rRNA BLAST-søk
S1.1		β-hemolyserende Mulig patogen	<i>Bacillus</i> spp.
S1.2		Resistent ikke-KRE <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
S1.3		<i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Pseudomonas</i> spp.
S1.4		<i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Achromobacter</i> spp.
S2.1		β-hemolyserende Mulig patogen	<i>Bacillus</i> spp.
S2.2		Resistent ikke-KRE <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
S2.3		Resistent ikke-KRE <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
S2.4		<i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Pseudomonas</i> spp.
S2.5		<i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Achromobacter</i> spp.
S3.1		β-hemolyserende Mulig patogen	<i>Aeromonas</i> spp.
S3.2		Resistent ikke-KRE <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
S3.3		<i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> eller andre	<i>Pseudomonas</i> spp.

Det var vekst av bakterier på alle mediene i denne studien. Alle salatene inneholdt bakterier som vokste på *Brilliance*TM CRE og *Brilliance*TM ESBL. S1 og S2 hadde vekst av to ulike bakterier på *Brilliance*TM ESBL. All vekst på *Brilliance*TM ESBL ble tolket som «*Salmonella*, *Acinetobacter* eller andre» i henhold til fargesceeringsprosedyre (Oxoid). BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens av kolonier fra *Brilliance*TM ESBL indikerte vekst av *Pseudomonas* spp. og *Achromobacter* spp.

Det var vekst på *Brilliance*TM CRE for alle salatene. Prøve S1.2, S2.2 og S2.3 vokste med blå/grønn-farge i områder med mye vekst, men som gul/fargeløs som enkeltkolonier. All vekst på *Brilliance*TM CRE ble tolket som resistent ikke-KRE i henhold til fargescreeningsprosedyre (Oxoid). BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens av kolonier fra *Brilliance*TM CRE indikerte vekst av *Stenotrophomonas* spp. på alle *Brilliance*TM CRE-skålene.

β-hemolysierende kolonier ble funnet i alle salatene og vurdert som mulig patogene. BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens indikerte vekst av *Bacillus* spp. i prøve S1 og S2, og *Aeromonas* spp. i prøve S3.

3.2 Agarosegelelektroforese av multi- og singlepleks ESBL og CAR PCR-produkt

Båndstørrelsen på agarosegel ble vurdert i forhold til båndene på «ladder» som har kjent størrelse (bp). Prøver med bånd i størrelsesområde til målgenene i mastermiksen ble tolket som positive (+) og prøver uten ble tolket som negative (-). Resultatene fra tolkning av gelelektroforese av multipleks ESBL, multipleks CAR og 16Sr RNA PCR-produkt er presentert i tabell 3.2.

Tabell 3.2: Tolkning av gelelektroforese av PCR-produkt fra multipleks PCR og 16S rRNA. Positiv (+): bånd i størrelsesområde til målgen i mastermikse. Negativ (-): ikke bånd i størrelsesområde til målgen i mastermikse.

Målgen Prøve	16S rRNA	ESBL 1 <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 2) <i>bla</i> _{OXA} <i>bla</i> _{SHV}	ESBL 2 <i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 9) <i>bla</i> _{CTX-M} (gr. 1) <i>bla</i> _{TEM}	ESBL 3 <i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{KPC}	CAR 1 <i>bla</i> _{CMY} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{IMP} <i>bla</i> _{VIM}	CAR 2 <i>bla</i> _{NMD} <i>bla</i> _{SFC} <i>bla</i> _{KPC}
S1.1	+	-	-	-	-	-
S1.2	+	-	-	-	-	-
S1.3	+	-	+	-	-	-
S1.4	+	-	-	-	-	-
S2.1	+	-	-	-	-	-
S2.2	+	-	-	-	-	-
S2.3	+	-	-	-	-	-
S2.4	+	-	-	-	+	-
S2.5	+	-	-	-	-	-
S3.1	+	-	-	-	-	-
S3.2	+	-	-	-	-	-
S3.3	+	-	-	-	-	-

Alle prøvene hadde bånd i størrelsesområdet til 16S rRNA-genet og 16S rRNA-PCR ble derfor vurdert som vellykket, og prøvene ble sendt til Sangersekvensering. Prøve S1.3 hadde et svakt bånd i målgen-størrelse (bp) ved multipleks ESBL 2. Det var vanskelig å bestemme nøyaktig størrelse på båndet, derfor ble det utført singlepleks av prøve S1.3 med alle tre primerpar i mastermikse ESBL2. Prøve S2.4 hadde et svakt bånd i størrelsesområde til målgenet *bla_{VIM}*. Derfor ble det utført singlepleks av prøve S2.4 med *bla_{VIM}* som målgen. Resterende prøver hadde ingen bånd i størrelsesområde til målgen i mastermiksene og ble dermed vurdert som negative for disse genene.

Båndstørrelsen på gelen med singlepleks PCR-produkter ble vurdert i forhold til «ladder» på samme måte som ved multipleks. Resultatene fra tolkningen av bånd på gelen fra singlepleks PCR er presentert i tabell 3.3.

Tabell 3.3: Tolkning av gelelektroforese av PCR-produkter fra singlepleks PCR. Positiv (+): bånd i størrelsesområde til målgen. Negativ (-): ikke bånd i størrelsesområde til målgen. Samt resultat fra sangersekvensering av målgen.

Singlepleks ESBL			
Prøve	<i>bla_{CTX-M}</i> (gr. 9)	<i>bla_{CTX-M}</i> (gr. 1)	<i>bla_{TEM}</i>
S1.3	-	-	-
Singlepleks CAR		Sangersekvensering <i>bla_{VIM}</i>	
Prøve	<i>bla_{VIM}</i>	Prøve	<i>bla_{VIM}</i>
S2.4	+	S2.4	-

Prøve S1.3 hadde ikke bånd i størrelsesområde til målgenene *bla_{CTX-M}* (gr. 9), *bla_{CTX-M}* (gr. 1) og *bla_{TEM}* og ble dermed tolket som negative for disse genene. Prøve S2.4 hadde svakt bånd i størrelsesområde til *bla_{VIM}*-genet. PCR-produkt fra singlepleks med bruk av *bla_{VIM}* som målgen ble sendt for sangersekvensering til Eurofins GATC biotech, Konstanz, Germany. Resultatet fra sangersekvensering var negativt, *bla_{VIM}* ble ikke påvist i prøve S2.4.

3.3 Antibiotika-følsomhetstest

Prøve S1.2 (*Stenotrophomonas* spp.), S2.1 (*Bacillus* spp.), S2.4 (*Pseudomonas* spp.), S2.5 (*Achromobacter* spp.) og S3.1 (*Aeromonas* spp.) ble følsomhetstestet med gradient-strips. Brytningspunkt fra «The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST) ble brukt for å vurdere stammens følsomhet for ulike antibiotika (EUCAST, 2020). Det finnes ikke brytningspunkt for antibiotika som ble brukt i denne studien for hverken *Stenotrophomonas* spp., *Bacillus* spp. eller *Achromobacter* spp. For *Pseudomonas* spp. finnes det brytningspunkt for imipenem, meropenem, cefepim og ciprofloxacin (disse var samme som PK-PD-brytningspunkt), og for *Aeromonas* spp. finnes det brytningspunkt for cefepim og ciprofloxacin (ciprofloxacin samme brytningspunkt som PK-PD-brytningspunkt).

Ved manglende artsspesifikke brytningspunkt ble PK-PD (ikke-artsrelatert)-brytningspunkt brukt for å vurdere stammens følsomhet for antibiotika. Det finnes ingen brytningspunkt for streptomycin, erytromycin eller trimetoprim, hverken PK-PD eller artsspesifikke brytningspunkt for bakteriene som ble testet.

Tabell 3.4 viser stammens følsomhet mot panelet av antibiotika. Verdier merket med rødt indikerer resistens mot antibiotikumet (R). Verdier merket med gult indikerer følsom ved økt eksponering av antibiotikumet (I). Verdier merket med grønt indikerer følsomhet for standarddose av antibiotikumet (S).

Tabell 3.4: Stammens følsomhet mot panel av antibiotika vurdert ut fra EUCAST brytningspunkt. Rød = R, gul = I, grønn = S.

	EUCAST ¹		Prøver				
	Brytningspunkt (mg/L)		S1.2 (mg/L)	S2.1 (mg/L)	S2.4 (mg/L)	S2.5 (mg/L)	S3.1 (mg/L)
	S ≤	R >					
Aminoglykosider							
Amikacin	1	1	>256	0,50	0,88	5	2
Gentamicin	0,5	0,5	16	0,44	0,88	1,5	1,5
Streptomycin	IB ³	IB ³	>1024	1,75	6	48	12
Karbapenemer							
Imipenem	2	4	>32	0,055	0,50	0,75	5
Meropenem	2	8	>32	0,110	0,63	0,064	0,88
Cefalosporiner							
Cefotaxim (3. generasjon)	1	2	>32	>32	>32	>32	0,023
Cefepime (4. generasjon)	4	8 (4) ²	64 ⁴	>256	5,5 ⁴	4	0,064
Fluorokinoloner							
Ciprofloxacin	0,25	0,50	1,75	0,079	0,071	0,88	0,003
Makrolider							
Erytromycin	IB ³	IB ³	>256	0,22	>256	7	7
Penicilliner							
Ampicillin (3. generasjon)	2	8	>256	10	64	3	>256
Amoxicillin – klavulansyre	2	8	>256	6	14	2	>256
Trimetoprim							
Trimetoprim	IB ³	IB ³	>32	>32	>32	>32	1,25

¹ EUCAST = The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

² *Aeromonas* spp. brytningspunkt for cefepime (EUCAST, 2020)

³ IB = ingen brytningspunkt

⁴ Usikkert resultat, stor ulikhet i parallellene. Analyse burde blitt gjort på ny, men pga. koronavirus var dette ikke mulig.

Alle bakteriestammene som ble MIC-testet var multiresistente da alle viste resistens mot tre eller flere antibiotikaklasser. Prøve S1.2 (*Stenotrophomonas* spp.) ble kategorisert som resistent

mot all antibiotika i panelet. MIC-verdi for cefepim for prøve S1.2 er usikker da parallellene hadde stor spredning i verdi. Laveste verdi var 32 mg/L, noe som er godt over brytningspunkt for R, og ble derfor vurdert som resistent.

Prøve S2.1 (*Bacillus* spp.) ble kategorisert som resistent mot cefotaxim (3. generasjons cefalosporin) og cefepim (4. generasjon cefalosporin), ampicillin (penicillin) og trimetoprim. Prøve S2.1 ble kategorisert som følsom for økt eksponering av amoxicillin med klavulansyre (penicillin). Prøve S2.1 ble kategorisert som følsom for standarddose for resterende antibiotika i panelet.

Prøve S2.4 (*Pseudomonas* spp.) ble kategorisert som resistent mot gentamicin (aminoglykosid), cefotaxim (3. generasjon cefalosporin), erytromycin (makrolid), ampicillin (3. generasjon penicillin), amoxicillin med klavulansyre (penicillin) og trimetoprim. Prøve S2.4 ble kategorisert som følsom ved standarddose for resterende antibiotika i panelet. MIC-verdi for prøve S2.4 mot cefepim er usikker på grunn av stor spredning i parallellene og ble derfor utelukket.

Prøve S2.5 (*Achromobacter* spp.) ble kategorisert som resistent mot amikacin (aminoglykosid), gentamicin (aminoglykosid), streptomycin (aminoglykosid), cefotaxim (3. generasjon cefalosporin), ciprofloxacin (fluorokinolon) og trimetoprim. Det finnes ingen brytningspunkt for streptomycin, men MIC-verdi er så høy at den ble vurdert som resistent på bakgrunn av at det er vanskelig å oppnå denne konsentrasjonen ved behandling. Prøve S2.5 ble kategorisert som følsom ved økt eksponering for ampicillin (3. generasjon penicillin). Prøve S2.5 ble kategorisert som følsom ved standarddose for resterende antibiotika i panelet.

Prøve S3.1 (*Aeromonas* spp.) ble kategorisert som resistent mot amikacin (aminoglykosid), gentamicin (aminoglykosid), imipenem (karbapenem), ampicillin (3. generasjon penicillin) og amoxicillin med klavulansyre (penicillin). Prøve S3.1 ble kategorisert som følsom ved standarddose for resterende antibiotika i panelet.

3.4 Illumina Miseq sekvensering

3.4.1 Artsidentifikasjon

Prøve S1.2, S2.5 og S3.1 ble sendt til helgenomsekvensering. Artsidentifikasjon ble gjort ved bruk av «Ribosomal Multilocus Sequencing Typing» (rMLST) av Illumina Miseq sekvensene. Resultatene av rMLST er presentert i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Artsidentifikasjon ved bruk av rMLST av Illumina Miseq-sekvenser

Prøve	Identitet (%)	Art
S1.2	100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
S2.5	97	<i>Achromobacter arsenitoxydans</i>
S3.1	95	<i>Aeromonas salmonicida</i>

Prøve S1.2 ble identifisert som *Stenotrophomonas maltophilia*, prøve S2.5 ble identifisert som *Achromobacter arsenitoxydans*, og prøve S3.1 ble identifisert som *Aeromonas salmonicida*.

3.4.2 Påvisning av antibiotikaresistensgener

Påvisning av resistensgener fra Illumina Miseq sekvensene ble gjort ved skanning med CARD og NCBI, samt søk i PROKKA-fil. Funnene av de viktigste resistensgenene er presentert i tabell 3.6.

Tabell 3.6: Påvisning av resistensgener med Illumina Miseq sekvensering

Resistens	Gen	Produkt	Prøve		
			S1.2	S2.5	S3.1
Aminoglykosid	<i>aac(6')</i>	Aminoglykosid 6'-N-acetyltransferase			X
	<i>aph(3')-IIc</i>	Aminoglykosid-fosfotransferase	X		
	<i>aph(6)-Ic</i>	Aminoglykosid-fosfotransferase	X		
β-laktam	<i>bla_{ampC}</i>	AmpC β-laktamase		X	X
	<i>bla_{OXA}</i>	OXA β-laktamase (ny variant)			X
	<i>blaL1</i>	Metallo-β-laktamase L1 ¹	X		
	<i>blaL2</i>	Klasse A β-laktamase L2 ²	X		
	<i>cphA</i>	Metallo-β-laktamase type 2 ³			X
	<i>bla_{FOX-4}</i>	Klasse C β-laktamase FOX-4			X
Fosfomycin	<i>abaF</i>	Resistensprotein		X	X
Makrolid	<i>macA</i>	Efflux-pumpe		X	
	<i>macB</i>			X	
Multiresistenskomplekser - efflux-pumpesystem					
Multiresistens	<i>acrA</i>	AcrAB-TolC	X	X	X
	<i>acrB</i>		X	X	X
	<i>tolC</i>		X	X	X
	<i>acrE</i>	AcrEF-TolC			X
	<i>ceoB</i>	CeoAB-OpcM		X	
	<i>emrA</i>	EmrAB-TolC	X	X	X
	<i>emrB</i>			X	X
	<i>emrY</i>	EmrYK-TolC	X	X	
	<i>mdtA</i>	MdtABC-TolC	X	X	X
	<i>mdtB</i>		X	X	
	<i>mdtC</i>		X	X	X
	<i>mdtE</i>	MdtEF-TolC			X
	<i>mexA</i>	MexAB-OprM	X	X	
	<i>mexB</i>		X	X	
	<i>oprM</i>		X	X	
	<i>mexD</i>	MexCD-OprJ		X	
	<i>oprJ</i>			X	
	<i>mexK</i>	MexJK-OprM	X		
	<i>muxB</i>	MuxABC-OmpB	X	X	
	<i>muxC</i>		X		
	<i>oqxB23</i>	OqxAB		X	
	<i>oqxB9</i>		X		
	<i>smeD</i>	SmeDEF	X		
<i>smeE</i>	X				
<i>smeF</i>	X				

1. Hydrolyserer all kommersielt tilgjengelig β-laktam, med unntak av aztreonam.
2. Hydrolyserer de fleste cefalosporiner og aztreonam, men ingen aktivitet mot karbapenem.
3. Hydrolyserer karbapenem, men har dårlig aktivitet mot cefalosporiner og penicilliner.

I prøve S1.2 (*Stenotrophomonas maltophilia*) ble det påvist *aph(3')-IIC* og *aph(6)-Ic* som gir aminoglykosidresistens, samt β -laktamase-genene *blaL1* og *blaL2*. *blaL1* gir resistens mot alle kommersielt tilgjengelige β -laktam, med unntak av aztreonam. *blaL2* gir resistens mot de fleste cefalosporiner og aztreonam. Prøve S1.2 fikk også påvist en rekke gener som koder for efflux-pumpesystemer som AcrAB-TolC, EmrAB-TolC, EmrYK-TolC, MdtABC-TolC, MexAB-OprM, MexJK, MuxABC-OmpB, oqxAB, og SmeDEF.

Prøve S2.5 (*Achromobacter arsenitoxydans*) fikk påvist β -laktamasegenet *bla_{ampC}* som gir resistens mot β -laktam. Prøve S2.5 fikk også påvist *macA* og *macB*-genene som koder for en efflux-pumpe som gir resistens mot makrolider, samt *abaF* som gir resistens mot fosfomycin. Prøve S2.5 hadde også en rekke gener som koder for efflux-pumpesystemer som AcrAB-TolC, CeoAB-OpcM, EmrAB-TolC, EmrYK-TolC, MdtABC-TolC, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MuxABC-OmpB og OqxAB.

Prøve S3.1 (*Aeromonas salmonicida*) fikk påvist *aac(6')* som gir aminoglykosidresistens, samt *abaF* som gir fosfomycinresistens. Prøve S3.1 fikk også påvist β -laktamase-genene *bla_{ampC}*, *cphA*, *bla_{FOX-4}* og en helt ny variant av *bla_{OXA}*. Prøve S3.1 hadde også en rekke gener som koder for efflux-pumpesystemer som AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrAB-TolC, MdtABC-TolC og MdtEF-TolC.

3.4.3 Påvisning av gener for resistens mot metaller og desinfeksjonsmidler

På bakgrunn av at metall- og desinfeksjonsmiddelresistens kan føre til ko- og kryssresistens med antibiotika, ble disse genene også tatt med i oppgaven. Gener for metall- og desinfeksjonsmiddelresistens er presentert i tabell 3.7.

Tabell 3.7: Gener som koder for metall- og desinfeksjonsmiddelresistens.

Gen	Resistens	Prøve		
		S1.2	S2.5	S3.1
Metallresistens				
<i>acr3</i>	Arsenikk	X	X	X
<i>cnrA</i>	Nikkel Kobolt	X	X	
<i>cnrB</i>		X		
<i>cnrC</i>		X		
<i>copA</i>	Kobber	X	X	X
<i>copB</i>		X	X	X
<i>copC</i>			X	
<i>copD</i>			X	
<i>czcA</i>	Kobolt	X		X
<i>czcB</i>	Sink	X		
<i>czcC</i>	Kadmium	X		
<i>merRI</i>	Kvikksølv	X	X	
<i>tehA</i>	Telluritt			X
Desinfeksjonsmiddelresistens				
<i>qacA</i>	Desinfeksjonsmiddel	X		

Det ble påvist metallresistens hos alle de tre prøvene. Prøve S1.2 (*S. maltophilia*) hadde resistensgener mot arsenikk, nikkell, kobolt, kobber, kvikksølv, sink og kadmium, samt *qacA* som gir resistens mot desinfeksjonsmidler. Prøve S2.5 (*A. arsenitoydans*) hadde resistensgener mot arsenikk, nikkell, kobolt, kobber og kvikksølv. Prøve S3.1 (*A. salmonicida*) hadde resistensgener mot arsenikk, kobber, kobolt, sink, kadmium og telluritt. (Yu et al., 2017).

3.4.4 Påvisning av gener for virulens, toksiner og hemolysin

Påvisning av gener for virulens, toksiner og hemolysin ble gjort ved å skanne kontig-sekvensene fra Illumina Miseq sekvensering med «The virulence factor database» (VFDB), samt søk i PROKKA-fil. Gener som koder for virulens, toksiner og hemolysin er presentert i tabell 3.8.

Tabell 3.8: Påvisning av gener som koder for virulensmekanismer, toksiner og hemolysin

Produkt/involvert i		Prøve		
		S1.2	S2.5	S3.1
Toksiner	Toksin/antitoksin	<i>yjjJ</i>	<i>fitB</i> <i>higA-2/higB-2</i> <i>hipA</i>	<i>eta</i> <i>zot</i>
	Flagellin-syntese	<i>fliA</i> <i>fliC</i> <i>fliN</i>	<i>fliN</i> <i>fliQ</i>	<i>fliA</i> <i>fliC</i> <i>fliN</i>
Adhesjon, kolonisering og bevegelse	Flagell-motorprotein	<i>motD</i>	<i>motC</i>	
	Rotering av pilus	<i>pilG</i> <i>pilH</i> <i>pilT</i> <i>pilU</i>		<i>pilT</i>
	Signaloverføring ved kjemotakse	<i>cheW</i>	<i>cheA</i> <i>cheB</i> <i>cheW</i> <i>cheY</i>	
	T2SS		<i>xcpR</i>	
Sekresjonssystem	T3SS		<i>bscJ</i> <i>bscN</i> <i>bscQ</i> <i>bscS</i>	
	T6SS		<i>vgrG1</i> <i>hsiB1/vipS</i> <i>hsiC1/vipB</i> <i>icmF1/tssM1</i>	
Hemolyse	Hemolysin			<i>hlyA</i>
	Ekspert	<i>hlyB</i>		<i>hlyD</i>
Andre	Serumresistens		<i>brkB</i>	

Prøve S1.2 (*S. maltophilia*) fikk påvist en rekke gener involvert i adhesjon, kolonisering og bevegelse som flagellin-syntesegenene (*fliA*, *fliC* og *fliN*), flagell-motorprotein (*motD*), gener involvert i rotering av pilus (*pilG*, *pilG*, *pilT* og *pilU*) og involvert i signaloverføring ved

kjemotakse (*cheW*). *S. maltophilia*-stammen fikk også påvist *hlyB* som er involvert i eksport av hemolysin, samt toksin-genet *yjjJ* som koder for toksin *yjjJ*.

Prøve S2.5 (*A. arsenitoydans*) fikk påvist gener for flagellin-syntese (*fliN* og *fliQ*), flagell-motorprotein (*motC*) og gener involvert i signaloverføring ved kjemotakse (*cheA*, *cheB*, *cheW* og *cheY*). *A. arsenitoydans*-stammen fikk også påvist en rekke gener assosiert med sekresjonssystemene T2SS (*xcpR*), T3SS (*bscJ*, *bscN*, *bscQ* og *bscS*) og T6SS (*vgrG1*, *hsiB1/vipS*, *hsiC1/vipB* og *icmF1/tssM1*). Genene *fitB*, *higA-2/higB-2* og *hipA* som koder for toksiner ble også påvist i *A. arsenitoydans*-stammen.

Prøve S3.1 (*A. salmonicida*) fikk påvist flagellin-syntese gener (*fliA*, *fliC* og *fliN*) og gen involvert i rotering av pilus (*pilT*). *A. salmonicida*-stammen fikk påvist genene *eta* og *zot* som koder for toksiner, samt *hlyA* som koder for hemolysin og *hlyD* som er involvert i eksport av hemolysin.

4. Diskusjon

4.1 Fenotypisk deteksjon av antibiotikaresistens og 16S rRNA-sekvensering

*Brilliance*TM ESBL og *Brilliance*TM CRE brukes av helsesektoren for hurtig deteksjon av multiresistente *Enterobacteriaceae* med hensikt å redusere spredningen av ESBL og KRE i helseinstitusjoner, samt for optimalisering av behandlingsprosessen (Thermo Fisher Scientific Inc). Vekst på skålene gir en indikasjon på tilstedeværelse av ESBL-produserende og KRE bakterier. I denne studien var det vekst på alle skålene. All vekst på *Brilliance*TM ESBL indikerte «*Salmonella*, *Acinetobacter* eller andre» og all vekst på *Brilliance*TM CRE indikerte resistent ikke-KRE i henhold til screeningprosedyre (Oxoid). Dette betyr at det ikke var indikasjon på tilstedeværelse av fenotypisk ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* eller KRE i salatene. Det har imidlertid vist seg at blant annet *E. coli* kan vokse med fargeløse kolonier på enkelte medier, og dermed kunne man ikke utelukke *E.coli* før videre identifisering (Löhr & Samuelsen, 2015). De selektive mediene gir uansett informasjon om egenskapene bakteriene har og som kommer til uttrykk.

Selv om det ikke var indikasjon på tilstedeværelse av *Enterobacteriaceae* i salatene, utelukker det ikke ESBL-resistensmekanismer og karbapenemaseproduksjon. På bakgrunn av at bakteriene klarte å vokse på skålene tilsatt antibiotika, gir det indikasjon på at de har en form for resistensmekanisme som gjør dem resistente mot 3. generasjon cefalosporiner og/eller karbapenem og var likevel interessante å undersøke videre. Årsaken til vekst på ESBL- og KRE-medium kan fortsatt være produksjon av β -laktamaser, men det kan også skyldes for eksempel endringer i membranpermeabilitet eller uttrykkelse av efflux-mekansimer. BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens bekreftet at det ikke var *Enterobacteriaceae* i prøvene. Vekst på *Brilliance*TM ESBL ble identifisert som *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonadaceae*-familien) og *Achromobacter* spp. (*Alcaligenaceae*-familien).

4.1.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. er psykrotrofe bakterier som ofte utkonkurrerer ikke-psykrotrofe Gram-negative bakterier som blant annet *E. coli* ved temperaturer ned mot nedre vekstgrense (*E. coli* kan vokse i temp. 7-48 °C) (Granum, 2015). Vasket og spiseklar salat kjølelagres som gjør at *Pseudomonas* spp. får en fordel ved lagring i forhold til mindre kulde-tolerante bakterieslekter. *Pseudomonas*-slekten inkluderer en rekke opportunistiske patogene bakterier og *P. aeruginosa* er uten tvil den mest studerte arten. *P. aeruginosa* kan forårsake alvorlige infeksjoner i både friske og immunsupprimerte pasienter (Mena & Gerba, 2009). Selv om det er sjeldent, kan også

andre *Pseudomonas*-arter som *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* og *Pseudomonas putida* være assosiert med humane infeksjoner (Livermore, 2002). På bakgrunn av at vi ikke vet hvilke *Pseudomonas*-arter som ble funnet i prøvene, kan man ikke utelukke en patogen variant. *Pseudomonas* spp. er vanlige bedervelsesbakterier i en rekke matvarer, deriblant salat. En patogen variant av *Pseudomonas* spp. ville imidlertid være bekymringsverdig i et produkt som selges spiseklart.

Medlemmene i *Pseudomonas*-slekten har bemerkelsesverdige evner til å takle forskjellige former for stress, deriblant stress av kjemiske og antibakterielle forbindelser (Vaz-Moreira et al., 2012). Disse evnene er drivkreftene for *Pseudomonas* spp. sin unike evne til å tilpasse seg skiftende miljøforhold og mye av grunnen til hvorfor *Pseudomonas* spp. er så utbredt i alle de store naturlige miljøene som i jord- og vannmiljø. På bakgrunn av utbredelsen av *Pseudomonas* spp. i naturlige miljø, kjølelagring som favoriserer vekst av psykrotrofe bakteriearter, samt at *Pseudomonas* spp. er fakultativt anaerob og kan vokse i MAP-produkter, var det forventet å finne *Pseudomonas* spp. i salatene. I tillegg har *Pseudomonas* spp. blitt isolert fra salat ofte i tidligere studier. Resistens hos *P. aeruginosa* er mye rapportert, men informasjon om resistens i andre arter i *Pseudomonas*-slekten er mer begrenset. Det som gjør *P. aeruginosa* spesielt problematisk er naturlig resistens mot mange antibiotikaklasser kombinert med evnen den har til å erverve resistens via mutasjoner og HGT, samt den hyppige rollen i alvorlige infeksjoner (Livermore, 2002).

Miljøbakterier (Gram-negative) har vanligvis mye lavere permeabilitet enn medlemmer av *Enterobacteriaceae* som lever i konkurrerende samfunn i relativt beskyttet miljø i tarmen til dyr og mennesker (Iredell et al., 2015). For eksempel har *P. aeruginosa* over 10 ganger mindre permeabel membran enn *E. coli*. Dette skyldes hovedsakelig forskjeller i type og antall av ytre-membranporiner og kan være en mulig årsak for hvorfor *Pseudomonas* spp. vokser på selektive ESBL-medier. I tillegg er det kjent at *Pseudomonas* spp. ofte kombinerer nedsatt permeabilitet og hydrolyse med efflux-systemer som resulterer i sterkt resistente fenotyper. *Pseudomonas* spp. har ofte kromosomalt kodet AmpC enzymer som hydrolyserer β -laktam, men det er også påvist at *Pseudomonas* spp. har god kapasitet til å erverve mobile AR-gener (Livermore, 2002). *Pseudomonas* spp. er for eksempel mer allsidige enn *Enterobacteriaceae* når det kommer til å erverve resistensmekanismer (Begum et al., 2013). På bakgrunn av *Pseudomonas* spp. sin unike evne til å tilpasse seg varierende miljøforhold, samt hyppighet av kromosomalt kodet AmpC enzymer, er det ikke uventet med vekst av *Pseudomonas* spp. på selektivt ESBL-medium.

4.1.2 *Achromobacter* spp.

Det andre isolatet fra ESBL-medium var *Achromobacter* spp. *Achromobacter* spp. er Gram-negative, aerobe stavbakterier. Noen medlemmer av *Achromobacter*-slekten er vanlige å finne i GI-trakten hos mennesker, og disse bakteriene kan være opportunistisk patogene (Li et al., 2012). *Achromobacter* spp. er lite studert, men *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter piechaudii* og *Achromobacter arsenitoxydans* har blitt helgenomsekvensert. *A. xylosoxidans* er kjent å være opportunistisk patogen og oppdages i økende grad hos pasienter med cystisk fibrose (CF) (Edwards et al., 2017). *Achromobacter*-stammen fra prøve S2.5 ble helgenomsekvensert, og rMLST identifiserte *A. arsenitoxydans*. *A. arsenitoxydans* er lite studert, men kan oksidere arsenikk og er tidligere isolert fra arsenikk-kontaminert jord på en grisefarm (Cavalca et al., 2013). Helgenomsekvensering i en studie av Li et al. viste at genomet til *A. arsenitoxydans* er mest lik *A. piechaudii* (78,9% identitet) etterfulgt av *A. xylosoxidans* (78,2 % identitet) (Li et al., 2012). Det er ukjent om *A. arsenitoxydans* er patogen, men studien påviste flere virulensfaktorer assosiert med celleadhesjon, endotoksin, eksotoksin og serumresistens, noe som indikerer mulighet for at den er opportunistisk patogen. Siden *A. arsenitoxydans* er så lite studert, er det ukjent hvilken rolle den spiller i spredning av AR-gener. Vekst på ESBL-agar indikerer at *A. arsenitoxydans*-stammen funnet i salat har resistensmekanismer som gjør at den klarer å vokse i nærvær av 3. generasjon cefalosporiner. Så selv om *Achromobacter* spp. ikke er et stort problem i klinisk sammenheng, kan den være reservoar for AR-gener som kan spres videre til andre bakteriearter.

4.1.3 *Stenotrophomonas* spp.

All vekst på *Brilliance*TM CRE ble indentifisert som *Stenotrophomonas* spp. Stammen fra prøve S1.2 ble helgenomsekvensert og rMLST identifiserte *Stenotrophomonas maltophilia*. *S. maltophilia* er en Gram-negativ multiresistent opportunistisk patogen miljøbakterie, og er et økende globalt problem, også i sykehusmiljø (Brooke, 2012). *S. maltophilia* er assosiert med kolonisering og infeksjoner hos immunsvekkede pasienter på sykehus, og har et bredt spekter av iboende resistensmekanismer. *S. maltophilia* er svært utbredt i miljøet og er vanlig å isolere fra salat. En studie av Qureshi et al. isolerte *S. maltophilia* fra 78% av spiseklare salater som var vasket i klorinert vann (Qureshi et al., 2005). Vasking av salat i klorinert vann vil ikke fjerne *S. maltophilia* fra produktet trolig på grunn av evnen den har til å danne biofilm. Det er ukjent hvordan salatene i denne studien ble prosessert, men produsentene oppgir at den er vasket og spiseklar. På bakgrunn av at salatene er vasket og spiseklare skal man kunne regne med at de er trygge å konsumere og frie for opportunistisk patogene bakterier. Viktigheten av *S.*

maltophilia som årsak til matbåren infeksjon er ukjent, men en studie av Apisarnthanarak et al. påviste tarmkolonisering av *S. maltophilia* hos 4 (9,5%) av 41 sykehusinnlagte onkologipasienter (Apisarnthanarak et al., 2003). Dette styrker mistanken om at matvarer kan være en potensiell smittekilde for *S. maltophilia* hos immunsupprimerte pasienter, og tilstedeværelsen av *S. maltophilia* i vasket og spiseklar salat indikerer at slike produkter bør unngås av disse personene.

Som nevnt er *S. maltophilia* en svært resistent bakterieart med mange iboende resistensmekanismer. Behandling av infeksjoner forårsaket av *S. maltophilia* kan dermed være utfordrende. Araoka et al. rapportere om en dødelighet høye enn 50% hos sykehuspasienter med bakteriemi forårsaket av *S. maltophilia* (Araoka et al., 2010). *S. maltophilia* er naturlig resistent mot mange antibiotika som vanligvis brukes i behandling av bakterielle infeksjoner, inkludert karbapenem, som kan gjøre behandling av infeksjon svært utfordrende (Çıkman et al., 2016). *S. maltophilia* produserer β -laktamaser som inaktiverer β -laktam, acetyltransferase som inaktiverer aminoglykosider, i tillegg har bakterien gener som koder for en rekke efflux-pumper. Vanligvis brukes trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-STX) for behandling av infeksjoner forårsaket av *S. maltophilia*.

Bakterievekst på KRE-medium er ikke en sikker indikator på produksjon av karbapenemase. Kombinasjon av ESBL_A/ESBL_{M-C} og andre resistensmekanismer som porinmutasjoner eller efflux-mekanismer kan føre til resistens/nedsett følsomhet for karbapenem og dermed vekst på kromogene medier for ESBL_{KARBA} (Löhr & Samuelsen, 2015). Det er imidlertid kjent at *S. maltophilia* har iboende resistens mot karbapenem, som mest sannsynlig er grunnen til at bakterien klarte å vokse på KRE-medium. I tillegg har *S. maltophilia* gener som koder for efflux-mekanismer og bakterien er svært utbredt i miljøet, det var derfor ikke uventet å finne *S. maltophilia* i salat.

4.2 Påvisning av β -hemolyserende stammer

Prøvene ble dyrket på blodagar for påvisning av β -hemolyse hos bakteriestammene. Fordelen med å bruke generelt vekstmedium som blodagar er at man får vekst av et bredere spekter av mikroorganismer. I denne studien ble det kun tatt med de β -hemolyserende bakteriene fra blodagar på bakgrunn av at β -hemolyse er en prediktiv indikasjon på en patogen bakterie (Sum et al., 2017). Derfor kan man ikke utelukke at det finnes andre patogener ikke-hemolyserende bakterier tilstede i salatene.

Det ble påvist β -hemolyserende bakterier i alle salatene, noe som indikerer tilstedeværelse av patogene bakterier i alle produktene. Bakterienes evne til å bryte ned erythrocytter er et tegn på at den er tilpasset å bruke mennesker og dyr med blodsirkulasjonssystem som vert. En miljøbakterie trenger ikke evne til å bryte ned erythrocytter for å overleve i for eksempel jord og vann. På bakgrunn av at salatene var vasket og spiseklare skal de ikke inneholde patogene bakterier. Slike produkter blir ofte konsumert uten ytterligere vasking og uten varmebehandling, som betyr at konsumenten direkte inntar disse bakteriene. BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens indikerte at de β -hemolyserende koloniene var *Bacillus* spp. og *Aeromonas* spp.

4.2.1 *Bacillus* spp.

Bacillus spp. er Gram-positive sporedannende bevegelige stav-bakterier som har jord som viktigste reservoar (Granum, 2015, s. 153). I jord kan det finnes opptil 10^6 sporer/g, og *Bacillus* isoleres ofte fra matvarer som grønnsaker, kjøtt, egg, meieriprodukter og ris. Det finnes minst fire arter av *Bacillus* spp. som kan forårsake matbåren infeksjon; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* og *Bacillus pumilus* (Granum, 2015, s. 153-161). *B. cereus* er av stor viktighet for matindustrien ettersom den er assosiert med bedervelse av mat, samt matbåren infeksjon (Fiedler et al., 2019). *Bacillus* spp. har gode evner til å danne biofilm på planteoverflater og blir hyppig isolert fra matplanter. Tilstedeværelsen av *B. cereus*-sporer i salat og dens rolle i matforgiftning er mye studert. *B. cereus* er en opportunistisk patogen og er også en vanlig årsak for matforgiftning i Norge. *B. cereus* kan forårsake to typer matforgiftning avhengig av toksinproduksjon; emetisk type (oppkast) og diarétype (magesmerter og diaré). Emetisk type er forårsaket av produksjon av det emetiske toksinet som kalles cereulide som er et ringformet peptid (Granum, 2015, s. 153-161). Diarétypen er forårsaket av enterotoksinet hemolysin BL (Hbl), «non-hemolytic» enterotoksin (Nhe) og cytotoksin K (cytK). Hbl hydrolyserer erythrocytter, mens Nhe har liten effekt på erythrocytter, men begge har cytotoksisk effekt og ødelegger membranen i epitelceller i tarmen med diaré som resultat. Hbl blir uttrykt i 42-73% og Nhe i 97-99% av *B. cereus*-stammer assosiert med matbåren infeksjon. Hbl uttrykkelse ser ut til å være mindre hyppig i ikke-patogene isolater (Sastalla et al., 2013). CytK har mange fellestrekk med β -toksin i *Clostridium perfringens* type C, men er ikke like alvorlig selv om det kan forårsake blodig diaré (Granum, 2015, s. 153-161). Alle disse tre toksinene reguleres gjennom «quorum sensing» som registrerer når celletettheten er stor, som gjør at produksjon av toksinene settes i gang. *B. cereus* er hovedsakelig årsaken til *Bacillus*-matforgiftning, men *B. subtilis*, *B. licheniformis* og *B. pumilus* kan i sjeldne tilfelles gi matbåren

infeksjon (Granum, 2015, s. 153-161). *B. subtilis* kan produsere toksinet surfactin, *B. licheniformis* kan produsere lichenysin, og *B. pumilus* kan produsere pumilacidin.

Bacillus spp. er fakultativt anaerobe bakterier som klarer å vokse i MAP-produkter og er hyppig isolert fra salat (Elhariry, 2011). Ved BLAST-søk av 16S rRNA-sekvens ble det kun identifisert bakterieslekt, og vi kan dermed ikke vite hvilke *Bacillus*-arter som var tilstede i salatene. Vi vet derfor ikke om *Bacillus*-stammene fra salatene var patogene, hadde toksin-produksjon eller om de var mange nok til å forårsake matbåren infeksjon. β -hemolyse er likevel en indikasjon på at de er patogene, og som nevnt er patogene bakterier bekymringsverdig i vasket og spiseklare produkter som konsumeres direkte. På bakgrunn av dette er det spesielt viktig med kjølelagring av disse produktene. *Bacillus* spp. hemmes vanligvis av kjølelagring, men det finnes også psykrotrofe stammer.

Antibiotikaresistens hos *Bacillus* spp. er hovedsakelig problematisk med tanke på spredning av resistensgener. *Bacillus cereus* er typisk resistent mot penicilliner og andre β -laktam antibiotika, og kan videre erverve resistens mot vanlig brukte antibiotika som ciprofloxacin, erytromycin, tetracyklin og streptomycin (Fiedler et al., 2019). Matbårene infeksjoner av *Bacillus* spp. trenger sjeldent behandling av antibiotika, men *Bacillus* spp. kan likevel ha en rolle i overføring av AR-gener i matkjeden.

4.2.2 *Aeromonas* spp.

Aeromonas spp. er Gram-negative stav-bakterier som er vidt utbredt i fersk- og saltvann, men er også isolert fra matvarer og drikkevann, deriblant fisk, skalldyr, kjøtt, meieriprodukter og freske grønnsaker (Chen et al., 2017). En rekke *Aeromonas* spp. produserer hemolysin og vil dermed vokse med β -hemolyse på blodagar. *Aeromonas* spp. vokser godt i ulike atmosfærer og ved temperaturer fra 0-42 °C, og har dermed gode egenskaper for å vokse i kjølelagret MAP-salat. *Aeromonas* spp. sin evne til å forårsake matbåren infeksjon er omdiskutert. Noen mener den er veldig patogen, mens andre mener den ikke er det. *Aeromonas hydrophilia*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* og *Aeromonas jandaei* har størst betydning i klinisk sammenheng (Jordi et al., 2003). I sjeldne tilfeller kan disse være involvert i alvorlige infeksjoner hos mennesker som gastroenteritt, luftveisinfeksjoner og sepsis (Bottoni et al., 2015). En studie av Jordi et al. studerte forekomsten av *Aeromonas* spp. assosiert med turistdiaré, og påviste *Aeromonas* spp. i 18 (2%) av 863 pasienter med turistdiaré (Jordi et al., 2003). Dette indikerer at *Aeromonas* spp. kan ha en rolle som matbåren patogen.

Aeromonas spp. stammen i prøve S3.1 ble identifisert som *Aeromonas salmonicida* ved bruk av rMLST. *A. salmonicida* er en viktig fiskepatogen og er assosiert med hudinfeksjoner hos fisk, hovedsakelig hos laksefisk (Charette et al., 2012; Moore et al., 2017). Sykdom av *A. salmonicida* hos mennesker er svært sjeldent, men en studie av Moore et al. rapportere om et tilfelle av *A. salmonicida* bakteriemi hos en mann med underliggende sykdom etter konsum av brønnvann over en lengre periode (Moore et al., 2017). *A. salmonicida* ble også påvist i blodkultur hos en 34 år gammel dame i India (Tewari et al., 2014). Dette indikerer at *A. salmonicida* kanskje kan være assosiert med humane infeksjoner, også etter inntak av kontaminerte drikkevannskilder selv om det er svært sjeldent. Det tyder også på at infektiv dose av *Aeromonas* spp. assosiert med diaré er lav (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). *Aeromonas* spp. har blitt funnet klorinert drikkevannsforsyningsnettverk i flere land, der de forekommer i biofilmer hvor de kan beskytte seg mot desinfeksjon (Igbiosa et al., 2012). På bakgrunn av *Aeromonas* spp. er så utbredt i vannmiljø, kan vanningsvannet brukt til vanning av salat være en mulig kontamineringskilde for *Aeromonas* spp. i salat.

Medlemmer i *Aeromonas* spp. har utviklet høyt nivå av resistens mot antibiotika, spesielt mot β -laktam og fluorokinoloner (Bottoni et al., 2015). Flere klasser av β -laktamaser er påvist i *Aeromonas* spp., men MBL er hyppigst påvist. Av denne grunn er *Aeromonas* spp. interessant å undersøke videre og ble sendt til helgenomsekvensering.

Selv om det ble påvist mulig patogene bakterier i denne studien, er de ikke nødvendigvis tilstede i stor nok mengde til å forårsake matbåren infeksjon. Vi kan ikke bestemme mengde bakterier i salatene på bakgrunn av vi hadde et ekstra inkubasjonssteg før utsåing på agarskåler i denne studien. Matbårne patogener har en minimum mengde (infektiv dose) som kreves for at de skal klare å lage infeksjon. Infektiv dose er svært forskjellig hos bakterieartene og avhenger av grad av virulens hos bakterien. Infektiv dose er også svært individuelt hos mennesker og avhenger blant annet av konsumentens helse og immunsystem. For immunsupprimerte mennesker kan infektiv dose være svært lav, og derfor bør ikke patogene mikroorganismer være tilstede i vasket og spiseklare produkter. Slike produkter spises ofte uten varmebehandling eller annen behandling som reduserer mengden bakterier, og vil dermed kunne utgjøre en risiko for immunsupprimerte pasienter. For at disse produktene skal være trygge for alle må strenge krav til hygiene og overvåking være på plass. Det kan imidlertid ikke forventes at matprodukter dyrket i naturlig miljøer skal være frie for mikroorganismer. Effektiv vasking av salat er vanskelig, og det er omdiskutert hvor effektiv vaskeprosedyren er med tanke på fjerning av patogene bakterier. Det er en økende bekymring angående mikrobiologisk trygghet for slike

produkter, derfor er det spesielt viktig med grundig overvåking av patogene bakterier i produkter som konsumeres direkte, som vasket og spiseklare salater.

4.3 Påvisning av AR-gener med multipleks PCR og agarose gelelektroforese

Påvisning av AR-gener med bruk av multipleks ESBL og multipleks CAR ble gjort ved å sammenligne båndstørrelsen på agarosegel med størrelsen (bp) til aktuelle gen. Prøve S1.3 (*Pseudomonas* spp.) hadde svakt bånd i størrelsesområdet til mastermiks ESBL2 som inneholdt primere rettet mot *bla*_{CTX-M} (gruppe 9), *bla*_{CTM-X} (gruppe 1) og *bla*_{TEM}. Videre undersøkelse ved bruk av singlepleks avkreftet at noen av disse genene var tilstede. Prøve S2.4 (*Pseudomonas* spp.) hadde utslag i størrelsesområdet til *bla*_{VIM}. Singlepleks med bruk av primere rettet mot *bla*_{VIM} ga også svakt utslag i «riktig» størrelsesområde. «Verona integron-encoded metallo- β -lactamase» (VIM) stammer fra Italia og er tidligere funnet i en rekke *Pseudomonas* spp. og var derfor veldig mistenkelig i en salat importert fra Italia (Hong et al., 2015). PCR-produkt fra singlepleks av prøve S2.4 ble dermed sendt til Eurofins Gac biotech Konstanz i Tyskland for Sangersekvensering. Resultatet fra sangersekvenseringen var negativt og det ble dermed avkreftet at *bla*_{VIM}-genet var tilstede i prøven.

Resterende prøver ga ingen utslag på multipleks ESBL og multipleks CAR, dermed ble tilstedeværelsen av genene som primerne var rettet mot utelukket. Primerne som ble valgt i mastermiksen er rettet mot de mest vanlige ESBL- og karbapenemase-genene. Selv om prøvene ikke hadde noen av disse genene kan vi ikke utelukke at bakteriene har andre β -laktamase-gener eller andre resistensgen som gjør at de klarte å vokse på ESBL- og KRE-medier.

4.4 Påvisning av antibiotikaresistensgener

4.4.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Ved Illumina Miseq helgenomsekvensering ble det påvist et mangfold av resistensgener. *S. maltophilia* (prøve S1.2) er som nevnt kjent for å være multiresistens og har mange iboende AR-gener. Isolater av *S. maltophilia* viser naturlig resistens mot mange vanlig klinisk brukte antibiotika, spesielt β -laktam og aminoglykosider (Okazaki & Avison, 2007). Resistens mot β -laktam i *S. maltophilia* er på grunn av to β -laktamase-enzymmer: L1 og L2. Genene som koder for L1 og L2 β -laktamase, *blaL1* og *blaL2*, ble som forventet påvist i *S. maltophilia*-stammen. L1 er metallo- β -laktamase med et bredt substrat-spekter som ligner andre MBL og hydrolyserer alle kommersielt tilgjengelige β -laktam med unntak av aztreonam. L2 er en relativt

smalspekteret cefalosporinase som hydrolyserer de fleste cefalosporiner og aztreonam, men ingen aktivitet mot karbapenem (Okazaki & Avison, 2008).

S. maltophilia er også naturlig resistent mot aminoglykosider ved produksjon av aminoglykosid-modifiserende enzymer (Lin et al., 2015). I denne studien ble *aph(3')-IIc* og *aph(6)-Ic* ble påvist hos *S. maltophilia*. *aph(3')-IIc* er kromosomkodet aminoglykosid-fosfotransferase og er et iboende gen i *S. maltophilia* som gir naturlig resistens mot aminoglykosider (Okazaki & Avison, 2007). *aph(6)-Ic* er transposon-kodet aminoglykosid-fosfotransferase og er en av tre resistensgener som vanligvis er tilstede i transposonet Tn5 (Ramirez & Tolmasky, 2010). På bakgrunn av at det tidligere er påvist iboende resistensgener mot aminoglykosid, var det ikke uforventet å finne APH(3')-IIc og APH(6)-Ic i *S. maltophilia*-stammen. APH(3')-IIc er typisk for *S. maltophilia* og ble først påvist i denne arten.

S. maltophilia sin kapasitet til å tolerere et bredt spekter av antibiotika og andre toksiske komponenter er mye på grunn av aktivitet av energiavhengige transportører, såkalte efflux-pumpe-systemer (Du et al., 2014). Spesielt RND-type efflux-pumper gir resistens mot et bredt spekter av antibiotika og bidrar signifikant til antibiotikaresistens i Gram-negative bakterier, deriblant *S. maltophilia* (Lin et al., 2015). I *S. maltophilia*-stammen ble det påvist en rekke efflux-systemer; AcrAB-TolC, EmrAB-TolC, EmrYK-TolC, MdtABC-TolC, MexAB-TolC, MexJK, MuxABC, OqxAB og SmeDEF. I mange Gram-negative bakterier spenner efflux-pumpene over både indre og ytre membran. AcrAB-TolC er et sliktpumpe-kompleks som omfatter den ytre membrankanalen TolC, den sekundære transportøren AcrB som er plassert i indre membran, samt periplasmatiske AcrA som danner en bro mellom disse to integrerte membranproteinene (Du et al., 2014). AcrAB-TolC systemer er svært utbredt i Gram-negative bakterier (Pérez et al., 2012). AcrAB-TolC har evne til å transportere et mangfold av strukturelt forskjellige forbindelser og gir resistens mot et bredt spekter av antibiotika, deriblant β -laktam, kinoloner, tetracyklin og kloramfenikol (Anes et al., 2015; Du et al., 2014). Det er også påvist at AcrAB-TolC er involvert i virulens hos enkelte bakterier, som blant annet *Enterobacter cloacae* og *Yersinia pestis* (Lin et al., 2015). Det kan ikke utelukkes at AcrAB-TolC også spiller en rolle i virulens hos *S. maltophilia*. TolC er involvert i utskillelse i mange andre efflux-komplekser; deriblant MdtABC og MdtEF som også hører til RND-familien og krever TolC for funksjon. (Du et al., 2014). MdtABC-TolC gir resistent mot blant annet fosfomycin, novobiocin, enterobactin og kinoloner (Anes et al., 2015). MdtEF-TolC gir blant annet resistens mot erytromycin og doxorubicin.

I *S. maltophilia* er overproduksjon av SmeDEF efflux-pumper en kjent årsak til kinolon-resistens (Garcia-Leon et al., 2014). SmeDEF er kromosomalt kodet i *S. maltophilia*, og ble også påvist i *S. maltophilia*-stammen i denne studien. Kinoloner er syntetiske antibiotika og hovedårsaken for resistens mot kinoloner er mutasjoner i gener som koder for angrepsmålet. Men i kontrast til mange andre bakterier, er slike mutasjoner ikke funnet i kinolon-resistente *S. maltophilia*. I *S. maltophilia* er det vanligvis SmeDEF-efflux-systemet som gir kinolon-resistens. I tillegg bidrar OqxAB-efflux-systemet til resistens mot kinoloner, tigecyklin og nitrofurantoin, samt en rekke desinfeksjonsmidler (Li et al., 2019). For mange av kompleksene ble det kun påvist en eller to deler av komplekset, som for eksempel OqxAB, der det ble påvist *oqxB*, men ikke *oqxA*. Dette betyr ikke at genet ikke er tilstede, men kan skyldes at sekvensen er noe ulik som gjør at vi ikke får den opp ved søk-analysene utført i denne studien.

MexAB-OprM ble også påvist i *S. maltophilia* stammen. MexAB-OprM er en RND-familie efflux-pumpe som vanligvis finnes kromosomalt i *P. aeruginosa* (Pan et al., 2016). MexAB-OprM systemet gir resistens mot fluorokinoloner, makrolider, novobiocin, kloramfenikol, tetracyklin, lincomycin og β -laktam antibiotika (Pesingi et al., 2019). MexJK-OprM ble også påvist som gir resistens mot tetracyklin og erytromycin (Chuanchuen et al., 2002). Samt MucABC som er en RND-type efflux-pumpe som gir resistens mot aztreonam, novobiocin, tetracyklin, erytromycin og ampicillin. I tillegg fikk *S. maltophilia*-stammen påvist EmrAB-TolC og EmrYK-TolC. EmrAB-TolC gir resistens mot hovedsakelig hydrofobe komponenter som carbonyl cyanid *m*-kloramfenyl-hydrazone (CCCP), 2-klorofenolhydrazin-hydroklorin, tetraklorosalicylanilid (TSA) og nalidixate (Tanabe et al., 2009). EmrAB-TolC spiller også kanskje en rolle i resistens mot colistin (Lin et al., 2017).

Alle disse efflux-systemene i kombinasjon med iboende resistens mot β -laktam og aminoglykosider fører til en svært resistent fenotype. Ifølge Illumina Miseq-sekvenseringen har *S. maltophilia* tilsammen gener som koder for resistens mot penicilliner, cefalosporiner, karbapenem, aminoglykosider, fluorokinoloner, tetracyklin, nitrofurantoin, makrolider, novobiocin, kloramfenikol, lincomycin, aztreonam, CCCP, TSA og flere. *S. maltophilia* er opportunistisk patogen og derfor kan resistensmekanismene være svært problematisk ved behandling av infeksjoner forårsaket av denne organismen. I tillegg kan spredning av disse resistensgenene utgjøre en stor risiko for mattrykgheten og folkehelsen. *S. maltophilia* er et økende problem på bakgrunn av den er patogen, er multiresistent og er svært utbredt i miljøet. På bakgrunn av dette er det bekymringsverdig med tilstedeværelse av denne bakterien i vasket og spiseklar salat, spesielt med tanke på risiko for immunsupprimerte pasienter. Som nevnt er

det ikke lett å unngå mikroorganismer i salat, og heller ikke *S. maltophilia* som er såpass utbredt i miljøet.

4.4.2 *Achromobacter arsenitoxydans*

I prøve S2.5 (*Achromobacter arsenitoxydans*) ble det påvist AmpC β -laktamase, *abaF* som koder for resistens mot fosfomycin, samt *macA* og *macB* som koder for en efflux-pumpe som gir makrolidresistens. AmpC er kromosomkodet i mange bakteriearter og uttrykkelsen er vanligvis lav, men uttrykkelsen øker i respons til eksponering av β -laktam (Jacoby, 2009). Overuttrykkelse av AmpC er en kompleks mekanisme og fører i varierende grad til resistens mot penicilliner og cefalosporiner. Både kromosomkodet og plasmid-mediert AmpC gir resistens mot et bredt spekter av β -laktam, inkludert penicilliner og oxyimino- β -cefalosporiner. AmpC-aktivitet mot cefepime og karbapenem er lav. β -laktamasehemmere, spesielt klavulansyre, har liten hemmende effekt på AmpC-aktivitet, i motsetning til andre β -laktamaser. En studie av Traglia et al. påviste AmpC i alle isolater av *Achromobacter xylosoxidans* som tyder på iboende AmpC i denne arten (Traglia et al., 2012). *A. arsenitoxydans* er ikke like studert og det er ukjent om AmpC er iboende i denne arten, men generelt er AmpC kromosomalt lokalisert og man kan dermed anta at det også er det i denne arten.

abaF-genet gir fosfomycinresistens. Fosfomycin er et antibiotikum som brukes i behandling av urinveisinfeksjon (UVI) siden det holder seg aktivt ved relativt lav pH (Sharma et al., 2017). *AbaF* er en transportør som er ansvarlig for efflux av fosfomycin og har fått navnet sitt etter rollen den spiller i fosfomycinresistens ved å pumpe ut fosfomycin i *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii* Fosfomycin efflux). *AbaF* har også vist seg å være viktig i dannelsen av biofilm og virulens i *A. baumannii*. En studie gjort av Sharma et al. viste at *AbaF* er viktig for utskilling av biofilm-matrix og bidrar til patogenitet i bakterien. *AbaF* er også mulig involvert i utskilling av vertsbakteriens forsvarsmolekyler, noe som resulterer i påvirkning av virulens. Det er ukjent om *AbaF* har samme virkning i *A. arsenitoxydans*.

Makrolidresistens-genene *macA* og *macB* koder for ABC efflux-komplekset MacAB. MacAB gir, sammen med TolC, spesifikk resistens mot makrolider via aktiv efflux av antibiotika (Kobayashi et al., 2001). Det ble også påvist en rekke andre multiresistens-efflux-komplekser i *A. arsenitoxydans*-stammen; som AcrAB-TolC, CeoAB-OpcM, EmrAB-TolC, EmrYK-TolC, MdtABC-TolC og MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MuxABC-OmpB og OqxAB. Som nevnt kan AcrAB-TolC pumpe ut et mangfold av strukturelt forskjellige forbindelser og gir resistens mot

et bredt spekter av antibiotika, deriblant β -laktam, kinoloner, tetracyklin og kloramfenikol (Anes et al., 2015; Du et al., 2014). CeoAB-OpcM gir resistens mot kloramfenikol, fluorokinoloner og trimetoprim (Podnecky et al., 2015). EmrAB-TolC gir resistens mot hydrofobe komponenter (Tanabe et al., 2009). MdtABC gir resistens mot fosfomycin, novobiocin, nalidixinsyre og norfloxacin. MexAB-OprM gir resistens mot fluorokinoloner, makrolider, novobiocin, kloramfenikol, tetracyklin, lincomycin og β -laktam (Pesingi et al., 2019). MexCD-OprJ gir resistens mot makrolider, kloramfenikol, novobiocin, tetracyklin, trimetoprim og enkelte β -laktam som cefoperazone, ceftazidim og cefepime (Tauch et al., 2003). MuxABC-OmpB gir resistens mot tetracyklin, novobiocin, aztreonam, erytromycin, kitasamycin, ampicillin og karbenicillin. OqxAB gir resistens mot kinoloner, tigecyklin og nitrofurantoin (Li et al., 2019). De fleste efflux-pumpene er kromosomkodet, men plasmidmedierte efflux-pumper har også blitt beskrevet de senere årene, deriblant MexCD-OprJ (Li et al., 2019). Plasmidmedierte efflux-pumper er av spesiell bekymring da disse lettere kan spres til andre bakterier. Med analysene brukt i denne studien vet vi ikke hvor på genomet genene befinner seg, og kan dermed ikke si om de er kromosomkodet eller plasmidkodet. Helgenomsekvenseringresultatene viste at *A. arsenitoxydans* har en rekke resistensgener, samt efflux-pumpesystemer som gjør at den har potensiale til å være resistent mot mange antibiotika. *A. arsenitoxydans* har trolig liten klinisk betydning, men spredning av disse AR-genene er av bekymring.

4.4.3 *Aeromonas salmonicida*

Prøve S3.1 (*Aeromonas salmonicida*) ble også helgenomsekvensert. *A. salmonicida* er som nevnt vanlig isolert fra akvatiske miljø og medlemmer av *Aeromonas*-slekten har utviklet et høyt nivå av resistens mot antibiotika, spesielt β -laktam og fluorokinoloner (Bottoni et al., 2015). Tidligere har det blitt påvist β -laktamasegenene *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{ACC}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PSE1/CARBI}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{FOX}. *imiH*, *cepH*, *cphA* og *ampC* fra *Aeromonas* spp. (Piotrowska et al., 2017). I *A. salmonicida*-stammen fra prøve S3.1 ble det påvist *ampC*, *bla*_{OXA}, *cphA* og *bla*_{FOX-4}. Som nevnt er AmpC kromosomkodet i mange bakteriearter, og overuttrykkelse av AmpC kan gi resistens mot et bredt spekter av β -laktam inkludert penicilliner, oxyimino- β -cefalosporiner og cefamyciner, mens aktivitet mot cefepime og karbapenem er lav. I *Aeromonas* spp. er AmpC β -laktamase kjent, og kombinasjonen av AmpC og andre mekanismer som f. eks. redusert permeabilitet gir en spesielt resistent fenotype.

I *A. salmonicida*-stammen ble det påvist en helt ny variant av *bla*_{OXA}-genet. Ulike varianter av OXA β -laktamase er ofte funnet i *Aeromonas* spp. (Piotrowska et al., 2017). OXA-varianten

som ble funnet i denne studien var ikke identisk til noen andre ved BLAST-søk. Av OXA-variantene som har fått navn ligner den mest på OXA-427, men ligner aller mest på en ikke-navngitt OXA-variant med referansenummer WP_021139936.1. Forskjellen var aminosyren histidin istedenfor aminosyren tyrosin i posisjon 202 (H202Y) sammenlignet med WP_021139936.1. Den nye OXA-varianten har trolig samme funksjon som de andre OXA-variantene den ligner på. OXA-427 gir resistens mot penicilliner, ceftazidim og aztreonam, og i noen tilfeller karbapenemer (Bogaerts et al., 2017). Det er mulig at *A. salmonicida*-stammen tidligere har vært utsatt for antimikrobielt middel som gjør at OXA-genet har mutert, og at den muterte OXA-varianten har gjort at stammen har fått en fordel og dermed overlevd.

Genet *cphA* er vanlig å finne i *Aeromonas* spp. (Piotrowska et al., 2017). CphA er en MBL som krever sink-ion på aktivt sete for aktivitet. I *Aeromonas* spp. er en rekke MBL tidligere påvist; AsbM1, IMP-19, VIM, ImiS, ImiH og den vanligste CphA. CphA er karbapenemaser som har veldig spesifikt substrat-spekter med høy hydrolytisk aktivitet mot karbapenem, men redusert aktivitet mot penicilliner og cefalosporiner. CphA finnes iboende i *Aeromonas veronii* og *Aeromonas hydrophilia*, og er mulig også iboende i *A. salmonicida* (Bottoni et al., 2015). På bakgrunn av at *cphA*-genet ofte blir påvist i *Aeromonas*-slekten var det ikke uventet å finne dette i prøve S3.1.

Det fjerde β -laktamase-genet som ble påvist i *A. salmonicida*-stammen var *bla*_{FOX-4}, som blir klassifisert som ESBL_{M-C} β -laktamase og er hyppig funnet i *Aeromonas*-slekten (Piotrowska et al., 2017). ESBL_{M-C} er plasmid-mediert AmpC-enzym. Plasmid-medierte AmpC enzymer er funnet verden rundt og er mindre vanlige enn ESBL-enzym, men kan være vanskeligere å påvise (Jacoby, 2009). ESBL_{M-C} kan ha bredere spekter enn andre ESBL ved overuttrykkelse. Overuttrykkelse gir resistens mot et bredt spekter av cefalosporiner inkludert cefotaxim, ceftazidim og ceftriaxon. Det er påvist tilfeller hvor bakterier er følsomme mot antibiotikumet i starten, men blir resistent ved behandling som tyder på at eksponering av β -laktam fører til overuttrykkelse av genene.

Genet *aac(6')* som gir aminoglykosidresistens ble påvist i *A. salmonicida*-stammen. AAC(6') katalyserer binding av acetyl-gruppe AcCoA til 6'-NH₂ av aminoglykosider. Denne modifiseringen av aminoglykosid, forstyrrer dannelsen av hydrogenbinding mellom 6'-NH₂ på aminoglykosid og A1408 på 16S rRNA og gjør aminoglykosid ufunksjonelt (Vong & Auclair, 2012). AAC(6') har blitt funnet i både plasmider og kromosomer, og er ofte del av mobile genetiske elementer (Ramirez & Tolmasky, 2010). Ut fra analysene vi har gjort i denne studien,

vet vi ikke om genet er plasmid- eller kromosom-kodet i *A. salmonicida*-stammen. *A. salmonicida* er hovedsakelig et problem med tanke på spredning av AR-gener, og fordi AAC(6') ofte er del av mobile genetiske elementer, kan man ikke utelukke at dette genet kan spres videre fra denne stammen.

Resistensgener mot fosfomycin, *abaF*, ble også påvist i *A. salmonicida*-stammen. Som nevnt er AbaF også involvert utskillelse av biofilm-matrix og mulig involvert i forsvarsmolekyler som påvirker virulens. Det er ukjent om AbaF har samme virkning i *A. salmonicida*. I tillegg ble efflux-pumpene AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrAB-TolC, MdtABC-TolC og MdtEF-TolC påvist i *A. salmonicida*-stammen. Som nevnt gir AcrAB-TolC resistens mot et bredt spekter av strukturelt forskjellige antibiotika, deriblant β -laktam, kinoloner, tetracyklin og kloramfenikol (Anes et al., 2015; Du et al., 2014). AcrEF-TolC gir resistens mot kinoloner og tigeicyklin (Anes et al., 2015). EmrAB-TolC gir resistent mot hydrofobe komponenter (Tanabe et al., 2009). MdtABC-TolC gir resistent mot novobiocin, kinoloner, fosfomycin og andre (Anes et al., 2015). MdtEF-TolC gir resistent mot erytromycin, doxorubicin og andre.

4.5 Påvisning av gener for metall- og desinfeksjonsmiddelresistens

Det er dokumentert sammenhenger mellom metall- og desinfeksjonsmiddelresistens med antibiotikaresistens. Ko-seleksjon av metallresistens og antibiotikaresistens har blitt påvist, som betyr at selv uten bruk av antibiotika, kan metall og desinfeksjonsmidler vedlikeholde eller øke antibiotikaresistens (Yu et al., 2017). Ko-seleksjonsmekanismene inkluderer ko-resistens og kryssresistens (Baker-Austin et al., 2006). Ko-resistens skjer når forskjellige resistensgener er tilstede på samme genetiske element, som for eksempel plasmid, transposon eller integron. Kryssresistens er når det samme resistensgenet er ansvarlig for resistens mot både antibiotika og metaller/desinfeksjonsmiddel. På denne måten kan metallforurensing og feil bruk av desinfeksjonsmiddel bidra til spredning av antibiotikaresistens. I motsetning til antibiotika og desinfeksjonsmiddel, blir metaller ikke brutt ned og vil derfor bidra til seleksjonspress i miljøet i lang tid.

Noen kjente eksempler på delte systemer for antibiotika- og metallresistens er; (i) redusert permeabilitet, (ii) inaktivering og modifisering, (iii) efflux og (iv) modifisering av mål (Baker-Austin et al., 2006). Det ble påvist metallresistensgener hos alle tre stammene som ble Illumina Miseq sekvensert. *S. maltophilia*-stammen hadde resistensgener mot arsenikk, kobolt, kobber, kvikksølv, sink og kadmium, *A. arsenitoxydans*-stammen hadde resistensgener mot arsenikk,

nikkel, kobolt, kobber og kvikksølv, og *A. salmonicida*-stammen hadde resistensgener mot arsenikk, kobber, kobolt, sink, kadmium og telluritt. Metaller brukes ofte som tilsetning i dyrefôr som spormetaller som kreves for god helse og vekst hos dyret (Yu et al., 2017). Kopper og sink kreves for hormonfunksjon, normal reproduksjon, vitaminsyntese, enzymdannelse og opprettholdelse av godt immunsystem. I tillegg tilsettes ofte krom, vanadium, tinn, nikkel og molybden i dyrefôr. På grunn av begrenset kunnskap om hvilken konsentrasjon som er nødvendig for god helse hos dyret, blir disse ofte tilsatt i høyere konsentrasjoner enn hva som trolig er nødvendig. Mange av disse metallene blir ikke fullstendig absorbert fra fôret, men skilles ut av dyret og havner i miljøet hvor de forblir. I tillegg til metaller som er tilsatt dyrefôr, finnes også metaller som arsenikk, kadmium og kvikksølv i jord. Metaller kan også stamme fra gjødsel. Salat dyrkes i åkeren og er i direkte kontakt med jord, og mikrofloraen i salat består i stor grad av bakterier som stammer fra jord. Har disse jordbakteriene hatt metall-kontaminert jord som reservoar, kan det ha skjedd en ko-seleksjon av metallresistens og antibiotikaresistens. Bakteriene isolert i denne studien hadde som nevnt en rekke metallresistensgener som indikerer at de har vært utsatt for disse metallene, som gjør at disse resistensgenene har gitt dem en fordel og overlevd.

S. maltophilia-stammen hadde også genet *qacA* som gir resistens mot en rekke desinfeksjonsmidler, inkludert kvartære ammoniumforbindelser (Russel, 2000). QacA er en vanligvis plasmid-kodet efflux-pumpe (Kumar & Varela, 2012). QacA efflux-pumpe gir også resistens mot tetracyklin-antibiotika og er svært lik efflux-mekanismen som er funnet i tetracyklinresistente bakterier. I miljø utsatt for kvartære ammoniumforbindelser, som for eksempel prosesseringsanlegg for vasking av salat, vil overlevelsen av *S. maltophilia* med *qac*-gener være økt.

4.6 Påvisning av gener for virulens, hemolysin og toksiner

4.6.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

I tillegg til iboende resistensmekanismer, innehar *S. maltophilia* et stort antall kjente virulensfaktorer (Kalidasan et al., 2018). *S. maltophilia* har evne til å forårsake infeksjoner som bakteriemi, endokarditt, pneumoni, meningitt, øyeinfeksjoner, enteritt og hud-/bløtvevsinfeksjoner. Invaderende patogener må være i stand til å produsere en rekke virulensfaktorer for å klare å forårsake slike infeksjoner. Hos *S. maltophilia* er det påvist faktorer som bidrar til patogenitet til bakterien som; (i) pili, flagell, fimbrier og adhesiner, (ii), ytre membranlipopolysakkarider (LPS), (iii) «diffusible signal factor» (DFS) og (iv)

produksjon av ekstracellulære enzymer. Pili, flagell, fimbrier og adhesiner bidrar til adhesjon, autoaggregering og kolonisering. LPS spiller en viktig rolle i dannelsen av biofilm og resistens mot antibiotika, samt komplement-mediert celledød. DFS spiller en viktig rolle i «quorum sensing» som formidler signaler som fører til motilitet, ekstracellulær enzymproduksjon, LPS-syntese, kolonidannelse og toleranse av antibiotika og metaller. Produksjon av ekstracellulære enzymer inkluderer hovedsakelig lipaser, proteaser, esteraser, DNase, RNase og fibrinolysin. Ekstracellulære enzymer kan blant annet bryte ned molekyler slik at bakterien kan komme seg gjennom cellevegger og invadere celler. I tillegg er ekstracellulære proteiner viktig for nedbrytning av næringsstoff slik at bakterien kan ta de inn i cellen.

S. maltophilia-stammen fikk påvist en rekke gener som koder for komponenter assosiert med rotering av pili (*pilG*, *pilH*, *pilT* og *pilU*), syntese av flagellin (*fliA*, *fliC* og *fliN*), flagellmotorprotein (*motD*), samt protein involvert i signaloverføring ved kjemotakse (*cheW*). Pili bidrar til adhesjon til overflater og mellom bakterier ved for eksempel dannelsen av biofilm. Flagell er bevegelsesorganet i mange bakterier, og er hårlignende filamenter bygget opp av flagellin. Filamentene er festet til et roterende ledd slik at de kan beveges i flere retninger. Leddet er igjen festet i et basallegeme som ankrer flagellen og kan få den til å rotere. Flageller bidrar til virulens og er viktig i kolonisering og invasjon av celler (Chaban et al., 2015). Flagellmotoren reagerer på signaler fra kjemotakse-reseptorer for å endre hastighet og rotasjon på bevegelsen, slik at den kan bevege seg mot gunstige miljøer, og gjør det mulig for patogener å oppsøke infeksjonssteder. Flagellen er viktig gjennom hele infeksjonen for; (i) å nå vert/målsted, (ii) kolonisering eller invasjon, (iii) vekst og vedlikehold og (iv) spredning til nye verter. *S. maltophilia* er som kjent opportunistisk patogen, og disse mekanismene vil hjelpe bakterien med å forårsake infeksjon.

Ved infeksjon kan de fleste bakterier få tak i alle næringsstoff som nitrogen, aminosyrer, nukleotider, fosfater og andre uorganiske ioner som kreves for overlevelse i for eksempel en human vert. Jern er ofte begrensende faktor da det ikke er fritt tilgjengelig i vevet hos verten (Kalidasan et al., 2018). Jern er avgjørende for cellevekst og spiller en kritisk rolle i regulering av virulensaktiviteter. For å få tak i jern i en human vert, har patogene bakterier utviklet en rekke mekanismer, som gjør at de får tak i jern i miljø med begrenset tilgjengelighet. For mange patogene bakterier fungerer heme proteiner som jernkilde. Dette betyr at de har produksjon av blant annet hemolysin som bryter ned erythrocytter for å få tak i hemoglobin som er rikt på jern. Selv om heme proteiner fungerer som jernkilde for mange patogene bakterier, er dette ikke fullstendig forstått i *S. maltophilia* enda. *S. maltophilia* isolater har fått påvist HgbBC som er

et hemoglobin-bindende protein, noe som antyder potensielt opptak av heme og hemoglobin. *S. maltophilia*-stammen fikk i denne studien påvist *hlyB* som er involvert i eksport av hemolysin. Imidlertid er det påvist at *S. maltophilia* har produksjon av sideroforer som en viktig mekanisme for jernopptak. Sideroforer er sekundære metabolitter som har høy affinitet for jern, og skilles ut for å danne løselige jernkomplekser som kan bli tatt opp av bakterien. Alle patogene stammer som har evne til overproduksjon av sideroforer er betraktet som hypervirulente, men stammer som ikke kan skille ut sideroforer har nedsatt virulens ved kolonisering og infeksjon. Dette tyder på at *S. maltophilia* har gode muligheter til å få tak i jern ved invasjon av humane vertsceller, som øker patogenitet av bakterien.

S. maltophilia-stammen fikk påvist genet *yjjJ* som koder for toksin YjjJ. Funksjonen til dette toksinet er ukjent, men en studie av Maeda et al. viste at YjjJ trolig har hemmende effekt på cellevekst og har en lignende funksjon som HipA (Maeda et al., 2017).

4.6.2 *Achromobacter arsenitoxydans*

Achromobacter spp. er assosiert med infeksjoner i respirasjonssystemet hos CF-pasienter. *A. arsenitoxydans* er lite studert og virulens hos denne arten er relativt ukjent. Andre arter av *Achromobacter* spp. har derimot vært assosiert med adhesjon, kolonisering og infeksjon. Isolater av *Achromobacter* spp. fra CF-pasienter har vist evne til bevegelse, biofilmdannelse og affinitet til å binde mucin, kollagen og fibronectin (i epitelvev). *A. arsenitoxydans* (prøve S2.5) fikk påvist gener for flagellin-syntese (*fliN* og *fliQ*), flagell-motorprotein (*motC*) og gener involvert i signaloverføring ved kjemotakse (*cheA*, *cheB*, *cheW* og *cheY*). Dette indikerer at stammen har evne til bevegelse. Flagell er tidligere påvist i *Achromobacter* spp. og flere arter i slekten har kjent evne til motilitet (Nejdat et al., 2008). Genene *cheA*, *cheB*, *cheW* og *cheY* er involvert i signaloverføring ved kjemotakse. Kjemotakse er måten bakterier beveger seg mot eller fra kjemiske stoffer i omgivelsene. *cheA* koder for histidin kinase som autofosforilerer og blir substrat for respons-regulatoren CheY (Szurmant & Ordal, 2004). *cheY* er en responsregulator som interagerer med motilitetsapparatet (flagell) for å endre retning eller hastighet på rotasjonen. CheW er et koblingsprotein som binder CheA til reseptorene. CheB er metylesterase-enzym som hydrolyserer metylglutamat på «methyl-accepting chemotaxis protein» (MCP) og spiller en rolle i tilpasning. Dette indikerer at også *A. arsenitoxydans* har evne til motilitet slik som mange andre arter i *Achromobacter*-slekten.

A. arsenitoxydans-stammen fikk påvist gener involvert i en rekke sekresjonssystem som type II sekresjonssystem (T2SS), type III sekresjonssystem (T3SS) og type VI sekresjonssystem

(T6SS). Sekresjonssystemet T2SS fremmer spesifikk transport av proteiner i en kanal gjennom ytre membran i Gram-negative bakterier (Nivaskumar & Francetic, 2014). Hovedfunksjonen til T2SS er næringsopptak ved å skille ut hydrolytiske enzymer som bryter ned karbohydrater, lipider, proteiner og nukleinsyre. I tillegg kan T2SS fremme sekresjon av toksiner, adhesiner, slimproteiner eller cytokrom, og har funksjoner assosiert med respirasjon, motilitet eller biofilmdannelse. Dette betyr at selv om hovedfunksjonen er næringsopptak, er T2SS også assosiert med virulens. Sekresjonssystemet T3SS er virulens-assosiert og bidrar til infisering av bakterielle effektorproteiner i eukaryote vertsceller (Wagner et al., 2018). T6SS er også virulens-assosiert og dens viktigste rolle er gjennom å drepe nabobakterier i konkurrerende miljø. Bakterier med T6SS har evne til utskillelse av proteiner med antibakteriell aktivitet direkte inn i periplasma til målbakteriene ved celle-celle-kontakt som resulterer i celledød (Navarro-Garcia et al., 2019).

Genene som koder for toksinene FitB, HipA, og toksin/antitoksin (TA)-systemet HigB-2/HigA-2 ble påvist i *A. arsenitoxydans*-stammen. FitB er en del av FitAB systemet. Studier har vist at FitAB er assosiert med intracellulær vekstkontroll og hastighet på epitelcelle-krysning i *Neisseria gonorrhoeae* (Lobato-Márquez et al., 2016). HigB/HigA TA-system er utbredt i mange bakterier og rollen til TA-systemer er å bidra med regulering av patogenitet (Wood & Wood, 2016). I HigB/HigA-systemet maskerer HigA RNase-aktiviteten av toksin HigB gjennom direkte binding. HipA toksin hemmer syntese av DNA, RNA og proteiner og dermed hemming av cellevekst (Germain et al., 2013; Maeda et al., 2017). HipA inaktiverer seg selv ved autofosforylering. I tillegg fikk stammen påvist *brkB* som er assosiert med serumresistens i *Bordetella pertussis* (Fernandez & Weiss, 1994). BrkB er viktig for å unngå drap av komplementsystemet som er en viktig del av immunsystemet i serum. Det har tidligere blitt påvist virulensfaktorer assosiert med celleadhesjon, endotoksin, eksotoksin og serumresistens i en stamme av *A. arsenitoxydans*, noe som indikerer mulighet for at den er opportunistisk patogen (Li et al., 2012).

4.6.3 *Aeromonas salmonicida*

Virulens i *Aeromonas* spp. avhenger av en rekke faktorer som ikke er fullstendig forstått. *Aeromonas* spp. produserer et bredt spekter av ekstracellulære enzymer som trolig bidrar til patogenesen (Igbino et al., 2012). I tillegg har *Aeromonas* spp. evne til å binde seg på og invadere vertsceller gjennom produksjon av flageller, pili og adhesiner. I *A. salmonicida*-stammen i denne studien ble det påvist flagellinsyntesegenene (*fliA*, *fliC* og *fliN*) og gen involvert i rotering av pilus (*pilT*).

Aeromonas spp. sin evne til multiplisering i vertsvæv er assosiert med produksjon av sideroforer og ytre membranproteiner, mens produksjon av kapsel, S-lag, LPS og poriner bidrar til resistens mot vertens forsvarsmolekyler. Produksjon av enterotoksiner, proteaser, fosfolipaser og hemolysin forårsaker skader på vertens celler og fører til celledød. I *A. salmonicida*-stammen i denne studien ble det påvist genet *eta* som koder for eksotoksin A (ETA). ETA er assosiert med *P. aeruginosa* og er et av de mest toksiske virulensfaktorene produsert av denne bakterien (Hamood et al., 2012). Bakteriemi forårsaket av *P. aeruginosa* som produserer ETA er assosiert med økt dødelighet. Toksisiteten av ETA er på grunn av evnen til å irreversibelt hemme proteinsyntese i eukaryote celler hos verten. ETA blir sektrert ut via sekresjonssystemet T2SS. T2SS ble ikke påvist hos *A. salmonicida*-stammen i denne studien, men både T2SS og T3SS har tidligere blitt påvist i *Aeromonas* spp. (Igbinosa et al., 2012). Genet *zot* som koder for «Zonula occludens toxin» (Zot) ble også påvist hos *A. salmonicida*-stammen. Zot er et enterotoksin som først ble beskrevet i *Vibrio cholerae*. Zot øker permeabiliteten til epitelceller i tynntarmen ved å interagere med cellereseptorer og på denne måten kan bakterien lettere invadere cellen (Di Pierro et al., 2001). *zot*-genet har tidligere blitt påvist i *A. salmonicida*, men det ble antydnet at funksjonelle proteiner ikke kan syntetiseres fra genet som ble påvist (Reith et al., 2008). *A. salmonicida*-stammen fikk også påvist *hlyA* som koder for hemolysin, samt *hlyD* som er involvert i eksport av hemolysin. Hemolysin er eksotoksin som kan lysere celler ved å danne porer i cellemembranen hos erytrocytter, leukocyttter og epitelceller (Kerényi et al., 2005). Produksjon av hemolysin vises som en stor klar sone av hemolyse rundt kolonien på blodagar. *A. salmonicida*-stammen ble isolert fra blodagar på bakgrunn av β -hemolyse rundt kolonien. *Aeromonas* spp. sin rolle i matbåren infeksjon er omdiskutert, men det tyder på at den har flere virulensfaktorer som er assosiert med invadering av celler og celledød.

4.7. Følsomhetstesting

Følsomhetstesting ved bruk av MIC gir en god indikasjon på fenotypisk resistens hos bakteriestammer. En resistent MIC kan forutse behandlingssvikt ved bruk av antibiotikumet, men en følsom MIC er ikke en garanti for vellykket behandling (Iredell et al., 2015). Selv om en bakterie blir karakterisert som følsom in vitro, kan dette være på grunn av bakteriene er mest sårbare når de er i en fase hvor de vokser hyppig og har høy metabolisme (som for eksempel i et vekstmedium på laboratoriet). De fleste antibiotika er målrettet denne vekstfasen hos bakterien. Dessverre kan vekststadiet i organismer ved klinisk infeksjon i noen tilfeller avvike fra antibiotikafølsomheten som bestemmes in vitro. Metoden gir likevel god indikasjon på

fenotypisk resistens, og hvilke antibiotika som mest sannsynlig gir vellykket behandling av infeksjon.

4.7.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Prøve S1.2 (*S. maltophilia*) ble kategorisert som resistent mot all antibiotika i panelet, og kan dermed betraktes som en multiresistent bakterie. Som tidligere nevnt er multiresistens i denne bakteriearten kjent. *S. maltophilia* var resistent mot alle aminoglykosid-antibiotika den ble testet for i denne studien; amikacin, gentamicin og streptomycin. Dette er trolig på grunn av *S. maltophilia* har iboende resistens mot aminoglykosider (Lin et al., 2015). Ved Illuminasekvensering ble det påvist fosfotransferasene APH(3')-IIc og APH(6')-Ic. APH(3')-IIc er kjent for å være iboende i *S. maltophilia* (Sanchez, 2015). Både APH(3')-IIc og APH(6')-Ic har evne til å modifisere aminoglykosid-molekyler ved fosforylering. Aminoglykosid virker ved å binde på ribosomal 30S subenhet og hemme proteinsyntesen. Fosforylering av aminoglykosid-molekyler hindrer binding av aminoglykosid til ribosomal 30S subenhet, slik at aminoglykosid ikke får hemmet proteinsyntesen til bakterien. Dette kan være en årsak for hvorfor *S. maltophilia* klarer å vokse i nærvær av aminoglykosid-antibiotika.

S. maltophilia var også resistent mot alle β -laktam antibiotika den ble testet mot i denne studien. Som nevnt har *S. maltophilia* iboende gener for produksjon av β -laktamasene L1 og L2 (Okazaki & Avison, 2007). β -laktamaser virker ved å hydrolysere ringstrukturen i β -laktam. *S. maltophilia*-stammen var resistent penicilliner (ampicillin og amoxicillin-klavulansyre), cefalosporiner (cefotaxim og cefepime) og karbapenemer (imipenem og meropenem). MIC-verdi for cefepime var usikkert på grunn av stor spredning i parallellen, men på bakgrunn av at verdien var så høy (64 mg/L) ble den betraktet som resistent. 64 mg/L er så høyt at det er vanskelig å oppnå denne konsentrasjonen ved behandling, og derfor vil cefepime trolig være ufunksjonelt ved behandling med lavere konsentrasjon. L1 og L2 β -laktamase bidrar trolig til resistens mot β -laktam hos *S. maltophilia*-stammen. L1 metallo- β -laktamase er Zn^{2+} -avhengig og kan inaktivere nesten all β -laktam-antibiotika med unntak av aztreonam (Sanchez, 2015). L2 hydrolyserer de fleste cefalosporiner og aztreonam, men ikke karbapenem. I tillegg ble det påvist en rekke efflux-pumper i *S. maltophilia*-stammen som kan bidra til resistens mot β -laktam, som for eksempel MexAB-OprM efflux-system som er kjent for å gi resistens mot β -laktam antibiotika. MucABC efflux-system er assosiert med resistens mot ampicillin, og kan også være en mulig årsak til resistens mot ampicillin.

S. maltophilia-stammen var også resistent mot fluorokinolon (ciprofloxacin). Mutasjoner i topoisomerase, målet til kinoloner, har hovedsakelig vært betraktet som hovedmekanismen for resistens mot fluorokinoloner (Sanchez, 2015). Imidlertid har det ikke blitt påvist topoisomerase mutasjoner i *S. maltophilia* tidligere, men kinolon-resistens i *S. maltophilia* har blitt påvist at skyldes efflux-pumper og kinolonresistensproteinet SmQnr. SmQnr ble ikke påvist i denne studien, men SmeDEF efflux-system ble påvist. SmeDEF har blitt assosiert med fluorokinolonresistens i tidligere studier og er en mulig årsak for resistens mot ciprofloxacin i *S. maltophilia*-stammen isolert fra salat i denne studien (Garcia-Leon et al., 2014). I tillegg er OxqAB og MexAB-OprM efflux-systemer, som ble påvist i *S. maltophilia*-stammen, assosiert med resistens mot fluorokinoloner (Li et al., 2019; Pan et al., 2016).

S. maltophilia-stammen var også resistent mot makrolidet erytromycin. Efflux-systemene MexAB-OprM og MucABC er assosiert med resistens mot makrolider (Pan et al., 2016). Disse ble påvist i *S. maltophilia*-stammen og kan være en mulig årsak til resistens mot erytromycin.

S. maltophilia-stammen var også resistent mot trimetoprim (TMP). Trimetoprim-sulfametozazol (TMP-SXT) er anbefalt for behandling av infeksjoner av *S. maltophilia* (Al-Jasser, 2006). Økende forekomst av resistens mot TMP-SXT i *S. maltophilia* er et problem for behandling av infeksjoner. På bakgrunn av at *S. maltophilia* er resistent mot så mange antibiotika-klasser, er det få behandlingsmuligheter igjen. Selv om stammen viser resistens mot TMP, er det ikke sikkert den er resistent mot TMP-SXT som er en blanding av to antibiotika. Det hadde vært interessant å teste denne stammen for følsomhet for TMP-SXT for å undersøke om stammen også er resistent mot anbefalt legemiddel for behandling av *S. maltophilia*-infeksjon.

4.7.2 *Bacillus* spp.

Prøve S2.1 (*Bacillus* spp.) ble kategorisert som resistent mot cefalosporiner (cefotaxim og cefepime), penicillin (ampicillin) og trimetoprim. Stammen kan dermed kalles multiresistent på bakgrunn av at den er resistent mot tre antibiotikaklasser. *Bacillus*-stammen ble kategorisert som følsom for økt eksponering av amoxicillin med klavulansyre, og kategorisert som følsom for aminoglykosider (amikacin og gentamicin), karbapenem (imipenem og meropenem) og fluorokinoloner (ciprofloxacin). Dette resistensmønsteret ligner tidligere analyse av *B. cereus*. En studie av Fiedler et al. utførte følsomhetstesting av *B. cereus*-stammer der; 100% var resistente mot penicillin G og cefotaxim, 99,3% var resistente mot ampicillin og amoxicillin-klavulansyre (Fiedler et al., 2019). Mens 99,3% av stammene var følsomme for ciprofloxacin,

98,0% var følsomme for amikacin, 93,9% var følsomme for imipenem, 91,8% var følsomme for erytromycin og 88,4% var følsomme for gentamicin.

4.7.3 *Pseudomonas* spp.

Prøve S2.4 (*Pseudomonas* spp.) ble kategorisert som resistent mot ampicillin og amoxicillin-klavulansyre (penicilliner), cefotaxim (3. generasjon cefalosporin), erytromycin (makrolider), gentamicin (aminoglykosid) og trimetoprim, og er dermed multiresistent. *Pseudomonas* spp. er kjent for å være svært tilpasningsdyktig, med gode evner til å erverve mobile AR-gener (Livermore, 2002). Samtidig har mange arter i *Pseudomonas*-slekten kromosomalt kodet AmpC enzymer som hydrolyserer β -laktam som penicilliner og cefalosporiner. På bakgrunn av *Pseudomonas*-stammen i prøve S2.4 er viser fenotypisk resistens mot penicilliner og cefalosporiner, men ikke karbapenem, kan man ikke utelukke at den har kromosomalt AmpC. Resistens mot cefotaxim kan forklare hvorfor *Pseudomonas* spp. klarte å vokse på ESBL-medium som er tilsatt cefpodoxim som også er et 3. generasjon cefalosporin. Produsenten av *Brilliance*TM ESBL oppgir imidlertid at den skal inneholde antimikrobielle stoffer som hemmer de fleste AmpC-organismer.

Stammen var følsom for ciprofloxacin (fluorokinoloner), amikacin (aminoglykosid), imipenem og meropenem (karbapenemer). Ifølge folkehelseinstituttet er *Pseudomonas* spp. ofte følsom for aminoglykosider, ceftazidim, aztreonam, karbapenem, piperacillin-tazobactam og ciprofloxacin (Folkehelseinstituttet, 2010). MIC-verdi for cefepime ble utelukket på bakgrunn av stor spredning i paralleller som gjør resultatet usikkert.

4.7.4 *Achromobacter arsenitoxydans*

Prøve S2.5 (*A. arsenitoxydans*) ble kategorisert som resistent mot alle aminoglykosider den ble testet mot; amikacin, gentamicin og streptomycin. *A. arsenitoxydans*-stammen var også resistent mot cefotaxim (3. generasjon cefalosporin), ciprofloxacin (fluorokinolon) og trimetoprim. Dette betyr at stammen er multiresistent. *A. arsenitoxydans* er lite studert, og kunnskap om resistensgener hos denne arten er stort sett ukjent. Det har imidlertid blitt påvist aminoglykosidresistensgenene *aac(6')-Ib* og *aadA1*, trimetoprimresistensgenene *dfrA1* og *dfrA16*, og β -laktamase *bla_{OXA}* og *bla_{AmpC}* hos en annen art i denne slekten; *Achromobacter xylosoxidans* (Traglia et al., 2012). *aac(6')-Ib*, *aadA1*, *dfrA1*, *dfrA16* og *bla_{OXA}*, ble ikke påvist i *A. arsenitoxydans*-stammen, men kan likevel ikke utelukkes. AmpC ble imidlertid også påvist i *A. arsenitoxydans*-stammen og kan være en mulig årsak for resistens mot cefotaxim. AmpC kan gi resistens mot et bredt spekter av β -laktam inkludert, penicilliner og cefalosporiner, men

ikke karbapenem (Jacoby, 2009). Stammen var følsom for cefepime (4. generasjon cefalosporin) og karbapenem. *A. arsenitoxydans* var ikke resistent mot penicillinene ampicillin og amoxicillin-klavulansyre. Stammen ble kategorisert som følsom ved økt eksponering for ampicillin. Nedsatt følsomhet mot ampicillin kan ha sammenheng med AmpC-enzymet. β -laktamasehemmeren klavulansyre har liten effekt på AmpC-enzymet, og derfor forklarer ikke dette følsomhet for amoxicillin-klavulansyre.

En mulig årsak til resistens mot disse antibiotikaklassene kan være alle efflux-systemene som ble påvist i *A. arsenitoxydans*-stammen. MexAB-OprM og Oqx-AB kan mulig spille en rolle i resistens mot fluorokinoloner (Li et al., 2019; Pesingi et al., 2019), CeoAB-OpcM i resistens mot fluorokinoloner og trimetoprim (Podnecky et al., 2015) og MexCD-OprJ i resistens mot trimetoprim (Tauch et al., 2003).

A. arsenitoxydans-stammen fikk påvist makrolidresistens-genene *macA* og *macB*, men var følsom for erytromycin. MacAB-TolC er et kompleks med aktiv efflux av makrolid-antibiotika (Kobayashi et al., 2001). Selv om bakterien hadde gener som tilsier at den kan ha resistens, hadde den ikke fenotypisk resistens mot makrolider. En studie av Rouquette-Loughlin et al. viste at i *N. gonorrhoeae* er MacAB spesielt aktiv ved mutasjoner i promotor som driver transkripsjon av MacAB (Rouquette-Loughlin et al., 2005). Vi har ikke sett på mutasjoner i genene i denne studien, og heller ikke gjort ekspresjonsstudier og kan dermed ikke vite hvorfor *A. arsenitoxydans* ikke viser fenotypisk resistens mot makrolider selv om den har gener som koder for MacAB. I tillegg, som nevnt innledningsvis, er bakterier ofte i en mer følsom situasjon ved vekststadiet som i in vitro forsøk, noe som kan påvirke resultatet.

4.7.5 *Aeromonas salmonicida*

Prøve S3.1 (*A. salmonicida*) var også multiresistent. Stammen ble kategorisert som resistent mot amikacin og gentamicin (aminoglykosid), imipenem (karbapenem), ampicillin og amoxicillin med klavulansyre (penicillin). *A. salmonicida*-stammen fikk påvist AAC(6') ved Illumina-sekvensering og kan være en årsak til hvorfor *A. salmonicida*-stammen er resistent mot aminoglykosider. AAC(6') er et enzym som acetylerer aminoglykosid og forstyrrer hydrogenbinding av aminoglykosid til 16S rRNA (Vong & Auclair, 2012). Det finnes hovedsakelig to undergrupper av AAC(6') som gir forskjellig resistens mot amikacin og gentamicin C1 (Ramirez & Tolmasky, 2010). AAC(6')-I enzymer viser høy aktivitet mot amikacin og gentamicin C1a og C2, men veldig lav aktivitet mot gentamicin C1. AAC(6')-II enzymer acetylerer alle tre former av gentamicin (C1, C2 og C3), men ikke amikacin. Det ble ikke påvist hvilken undergruppe av *aac(6')*-genet som var tilstede i stammen. MIC-testen

indikerer at AAC(6') ligner mest på undergruppen AAC(6')-I, men dette kan ikke sies med sikkerhet da vi ikke vet om det er tilstedeværelse av dette genet som fører til fenotypisk resistens mot aminoglykosid hos stammen.

A. salmonicida-stammen var resistent mot alle penicilliner og imipenem (karbapenem). Men stammen var følsom mot alle cefalosporiner (cefotaxim og cefepime), samt meropenem (karbapenem). Denne stammen fikk påvist AmpC, OXA, cphA og FOX-4 ved Illumina Miseq, og har dermed fått påvist gener som gjør at den kan være resistent mot alle β -laktam-antibiotika som ble testet for i denne studien. Imidlertid viste pBLAST-søk at ingen av disse proteinene påvist hos *A. salmonicida*-stammen er 100% identiske til andre proteiner i NCBI-databasen. På bakgrunn av dette kan man ikke fastslå om disse genene har tilsvarende funksjoner som tidligere påvist i andre arter av *Aeromonas*. For å finne ut hvordan disse genene fungerer må det brukes andre forsøk som blant annet subkloning, knock-out og ekspresjonsstudier.

4.8 Forslag til videre arbeid

Utbredelsen av antibiotikaresistens i mat som selges på det norske markedet er lite studert. Tradisjonelt har spredning av antibiotikaresistens inkludert analyser av patogene bakterier relatert til human- eller dyrehelse. Imidlertid er det viktig også å inkludere ikke-patogene mikroorganismers på bakgrunn av disse kan være reservoar for AR-gener og et viktig ledd i videre spredning. Studier har påpekt at AR-gener fra ikke-patogene bakterier kan spres til patogene bakterier i tarmfloraen og kan bli et problem ved behandling av infeksjoner i klinisk sammenheng. Kunnskap om omfanget av AR-gener i bakterier i mat er nødvendig for å kunne sette i gang effektive tiltak for å motvirke utvikling og redusere spredning av AR-bakterier. Derfor bør det gjøres videre arbeid med å identifisere utbredelsen av AR-gener i mat.

Det hadde også vært interessant å helgenomsekvensert *Pseudomonas* spp. og *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. er en bakterieslekt det har vært funnet mye AR-gener hos. Det er også vist seg at nyere isolater av *Pseudomonas* spp. har mer resistens enn eldre isolater. I tillegg står karbapenemaseproduserende *P. aeruginosa* på WHO sin liste over bakterier det er kritisk viktig å utvikle nye antibiotika mot. *Bacillus* spp. hadde vært interessant å sett videre på for å undersøke om stammene hadde gener som koder for emetisk toksin eller enterotoksiner. Stammer med produksjon av emetisk eller enterotoksiner har ofte evne til å forårsake matbåren infeksjon. Slike bakterier skal ikke finnes i vasket og spiseklare produkter. I tillegg hadde det vært interessant å undersøke mengden av de ulike bakteriene i vasket og spiseklar salat.

5. Konklusjon

I denne studien er det påvist at det finnes multiresistente bakterier i vasket og spiseklar salat som selges på det norske markedet. Det ble påvist opportunistisk patogene bakterier, samt bakterier som trolig ikke har stor klinisk relevans. Alle fem bakteriestammene som ble følsomhetstestet hadde fenotypisk multiresistens. Vasket og spiseklar salat konsumeres vanligvis direkte uten varmebehandling og bakteriene havner i GI-trakten og møter det store mangfoldet av bakterier i tarmfloraen. I tarmfloraen finnes det opportunistisk patogene bakterier og i dette tette miljøet kan AR-gener spres videre til disse bakteriene. Ved en senere anledning, for eksempel hvis personen går på antibiotikabehandling, kan disse patogene bakteriene med ny-erhvervede AR-gener få konkurransefortrinn og mulighet til å forårsake infeksjon, eller eventuelt spres videre via avføring. Det ble påvist en svært multiresistent *S. maltophilia* i salatene. Dette er bekymringsverdig da denne bakterien er assosiert med kolonisering, spesielt hos immunosupprimerte pasienter. Vi vet ikke mengden *S. maltophilia* i salatene og kan dermed ikke vite om de er mange nok til å være et problem. Det ble også påvist en rekke virulensfaktorer assosiert med invadering og infeksjon hos *A. arsenitoydans* og *A. salmonicida*. Det er imidlertid ukjent om disse bakteriene har evne til å forårsake matbåren infeksjon hos mennesker. I motsetning til *S. maltophilia*, er ikke disse artene et økende problem i klinisk sammenheng. Imidlertid kan disse bakteriene fortsatt være en bidragsyter i spredningen av AR-gener. I denne studien ble det også påvist en helt ny variant av OXA β -laktamase. Denne ble funnet i en stamme av *A. salmonicida*.

Flere studier må imidlertid gjøres for å få et helhetlig perspektiv om utbredelsen av antibiotikaresistens i matvarer som selges på det norske markedet. Dette er viktig for å få mer kunnskap, forbedret overvåking og kartlegging av antibiotikaresistens, som igjen kan bidra til mer effektive og forebyggende tiltak som gjør at vi forhåpentligvis også kan bruke antibiotika i behandling mot infeksjoner i fremtiden.

Litteraturliste

- Adams, M. R., Moss, M. O. & McClure, P. (2016). *Food Microbiology*. 4. utg. United Kingdom: Royal Society of chemistry.
- Adebayo, E., Majolagbe, O. N., Ola, I. O. & Ogundiran, M. A. (2012). Antibiotic resistance pattern of isolated bacterial from salads. *Journal of Research in Biology*, 2: 136-142.
- Al-Jasser, A. M. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: an increasing problem. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 5: 23-23. doi: 10.1186/1476-0711-5-23.
- Allydice-Francis, K. & Brown, P. D. (2012). Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *Int J Microbiol*, 2012: 426241. doi: 10.1155/2012/426241.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.
- Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S. & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 6: 587-587. doi: 10.3389/fmicb.2015.00587.
- Apisarnthanarak, A., Fraser, V. J., Dunne, W. M., Little, J. R., Hoppe-Bauer, J., Mayfield, J. L. & Polish, L. B. (2003). *Stenotrophomonas maltophilia* intestinal colonization in hospitalized oncology patients with diarrhea. *Clin Infect Dis*, 37 (8): 1131-5. doi: 10.1086/378297.
- Araoka, H., Baba, M. & Yoneyama, A. (2010). Risk factors for mortality among patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in Tokyo, Japan, 1996-2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29 (5): 605-8. doi: 10.1007/s10096-010-0882-6.
- Babakhani, S. & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*, 58 (11): 905-917. doi: 10.1002/jobm.201800204.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14 (4): 176-182. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>.
- Begum, S., Salam, M. A., Alam, K. F., Begum, N., Hassan, P. & Haq, J. A. (2013). Detection of extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas* spp. isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. *BMC research notes*, 6: 7-7. doi: 10.1186/1756-0500-6-7.
- Benton, B., Breukink, E., Visscher, I., Debabov, D., Lunde, C., Janc, J., Mammen, M. & Humphrey, P. (2007). Telavancin inhibits peptidoglycan biosynthesis through

- preferential targeting of transglycosylation: Evidence for a multivalent interaction between telavancin and lipid II. *International Journal of Antimicrobial Agents - INT J ANTIMICROBIAL AGENTS*, 29. doi: 10.1016/S0924-8579(07)70166-8.
- Bezanson, G. S., MacInnis, R., Potter, G. & Hughes, T. (2008). Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 127 (1): 37-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.008>.
- Bogaerts, P., Naas, T., Saegeman, V., Bonnin, R. A., Schuermans, A., Evrard, S., Bouchahrouf, W., Jove, T., Tande, D., de Bolle, X., et al. (2017). OXA-427, a new plasmid-borne carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 72 (9): 2469-2477. doi: 10.1093/jac/dkx184.
- Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A. & Westblade, L. F. (2018). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66 (8): 1290-1297. doi: 10.1093/cid/cix893.
- Bottoni, C., Marcoccia, F., Compagnoni, C., Colapietro, M., Sabatini, A., Celenza, G., Segatore, B., Maturo, M. G., Amicosante, G. & Perilli, M. (2015). Identification of New Natural CphA Metallo-beta-Lactamases CphA4 and CphA5 in *Aeromonas veronii* and *Aeromonas hydrophila* Isolates from Municipal Sewage in Central Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, 59 (8): 4990-3. doi: 10.1128/aac.00628-15.
- Bradford, P. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*: 933-951.
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25 (1): 2-41. doi: 10.1128/CMR.00019-11.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19 (1): 56-66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- Castaneda-Ramirez, C., Cortes-Rodriguez, V., de la Fuente-Salcido, N., Bideshi, D. K., del Rincon-Castro, M. C. & Barboza-Corona, J. E. (2011). Isolation of *Salmonella* spp. from lettuce and evaluation of its susceptibility to novel bacteriocins of *Bacillus*

- thuringiensis and antibiotics. *J Food Prot*, 74 (2): 274-8. doi: 10.4315/0362-028x.Jfp-10-324.
- Cavalca, L., Corsini, A., Zaccheo, P., Vincenza, A. & Muyzer, G. (2013). Microbial transformations of arsenic: Perspectives for biological removal of arsenic from water. *Future microbiology*, 8. doi: 10.2217/fmb.13.38.
- Chaban, B., Hughes, H. V. & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46: 91-103. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>.
- Charette, S. J., Brochu, F., Boyle, B., Filion, G., Tanaka, K. H. & Derome, N. (2012). Draft Genome Sequence of the Virulent Strain 01-B526 of the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*, 194 (3): 722. doi: 10.1128/JB.06276-11.
- Chen, P.-L., Wu, C.-J. & Ko, W.-C. (2017). *Aeromonas species*: Antimicrobe. Tilgjengelig fra: <http://www.antimicrobe.org/b74.asp> (Lest 10. mai 2020).
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. & Schweizer, H. P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *Journal of bacteriology*, 184 (18): 5036-5044. doi: 10.1128/jb.184.18.5036-5044.2002.
- Çıkman, A., Parlak, M., Bayram, Y., Güdücüoğlu, H. & Berктаş, M. (2016). Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. *African health sciences*, 16 (1): 149-152. doi: 10.4314/ahs.v16i1.20.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and drug resistance*, 12: 3903-3910. doi: 10.2147/IDR.S234610.
- Dallenne, C., Costa, A. D., Decré, D., Favier, C. & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 490-495.
- Dalynn Biologicals. (2002). *McFARLAND STANDARD, Catalogue No. TM50-TM60*. Tilgjengelig fra: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf (Lest 23. mars 2020).
- Di Pierro, M., Lu, R., Uzzau, S., Wang, W., Margaretten, K., Pazzani, C., Maimone, F. & Fasano, A. (2001). Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J Biol Chem*, 276 (22): 19160-5. doi: 10.1074/jbc.M009674200.
- Dickinson, A. W., Power, A., Hansen, M. G., Brandt, K. K., Piliposian, G., Appleby, P., O'Neill, P. A., Jones, R. T., Sierocinski, P., Koskella, B., et al. (2019). Heavy metal

- pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environ Int*, 132: 105117. doi: 10.1016/j.envint.2019.105117.
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., Venter, H., Chiu, W. & Luisi, B. F. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509 (7501): 512-515. doi: 10.1038/nature13205.
- Edwards, B. D., Greysen-Wong, J., Somayaji, R., Waddell, B., Whelan, F. J., Storey, D. G., Rabin, H. R., Surette, M. G. & Parkins, M. D. (2017). Prevalence and Outcomes of *Achromobacter* Species Infections in Adults with Cystic Fibrosis: a North American Cohort Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 55 (7): 2074. doi: 10.1128/JCM.02556-16.
- Elhariry, H. M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol*, 28 (7): 1266-74. doi: 10.1016/j.fm.2011.05.004.
- Elkins, K. M. (2013). *DNA Extraction*: Science Direct. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/dna-extraction/pdf> (Lest 26. mars).
- EUCAST. (2020). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Version 10.0*, 2020.
- Evans, B. A. & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 27 (2): 241-263. doi: 10.1128/CMR.00117-13.
- Felleskatalogen AS. (sist endret 22.06.2017). *Penicillin, Actavis*. Oslo. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/penicillin-actavis-562706> (Lest 18. april 2020).
- Fernandes, R., Amador, P. & Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24 (1): 7-17. doi: 10.1097/MRM.0b013e3283587727.
- Fernandez, R. C. & Weiss, A. A. (1994). Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infection and immunity*, 62 (11): 4727-4738.
- Fernández-Bravo, A. & Figueras, M. J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*, 8 (129). doi: 10.3390/microorganisms8010129.
- Fiedler, G., Schneider, C., Igbinosa, E. O., Kabisch, J., Brinks, E., Becker, B., Stoll, D. A., Cho, G.-S., Huch, M. & Franz, C. M. A. P. (2019). Antibiotics resistance and toxin

- profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiology*, 19 (1): 250. doi: 10.1186/s12866-019-1632-2.
- Folkehelseinstituttet. (2010). *Pseudomonasinfeksjon - veileder for helsepersonell*: FHI. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon---veileder-for/> (Lest 12. mai 2020).
- Garcia-Leon, G., Hernandez, A., Hernando-Amado, S., Alavi, P., Berg, G. & Martinez, J. L. (2014). A function of SmeDEF, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots. *Appl Environ Microbiol*, 80 (15): 4559-65. doi: 10.1128/aem.01058-14.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N. & Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol Cell*, 52 (2): 248-54. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.045.
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 (2): 257-277. doi: 10.1128/mnbr.00056-13.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63 (1): 1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.
- Grada, A. & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol*, 133 (8): e11. doi: 10.1038/jid.2013.248.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning - smitte gjennom mat og vann*. 4. utg. Oslo: Cappelen Damm akademisk.
- Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B. & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*, 53 (1): 60-7. doi: 10.1093/cid/cir202.
- Guzmán-Herrador, B., Berg, T. C., Bjørnholt, J. C., Elstrøm, P., Kacelnik, O., Kapperud, G., Lange, H., MacDonald, E., Tønnessen, R., Vold, L., et al. (2015). *Årsrapport: utbrudd av smittsomme sykdommer i Norge i 2014*. Oslo: Folkehelseinstituttet: divisjon for smittevern.
- Hamood, A. N., Colmer-Hamood, J. A. & Carty, N. L. (2012). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A synthesis. I: *Virulence and Gene Regulation*: Springer Science.
- Han, Y., King, J. & Janes, M. E. (2018). Detection of antibiotic resistance toxigenic *Clostridium difficile* in processed retail lettuce. *Food Quality and Safety*, 2 (1): 37-41. doi: 10.1093/fqsafe/fyx032.

- Heir, E., Langsrud, S., Sidhu, M. S. & Steinbakk, M. (2001). Kan desinfeksjonsmidler bidra til bakteriell antibiotikaresistens? *Tidsskriftet for den norske legeforening*, 27 (121): 3201-6.
- Helse Norge. (2020). *Hva skjer hvis antibiotika ikke lenger virker?* Tilgjengelig fra: <https://helsenorge.no/legemidler/antibiotika-og-resistens/hva-skjer-ved-antibiotikaresistens> (Lest 20. april 2020).
- Helsedirektoratet. (2018). *Utviklingen i norsk kosthold. Rapport IS-2759*. Oslo: Helsedirektoratet.
- Herrador, B. G., Arnesen, T. M., Berg, T. C., Bjørnholt, J. V., Elstrøm, P., Kacelnik, O., Kapperud, G., Lange, H., MacDonald, E., Vold, L., et al. (2014). *Utbrudd av smittsomme sykdommer i Norge, årsrapport 2013*. Oslo; Folkehelseinstituttet; divisjon for smittevern.
- Holck, A., Wasteson, Y., Aspholm, M. E., Lindstedt, B.-A., Paulsen, J. E., Hoff, M. E. B., Heir, E., Næs, H., Johannessen, G., Skjerdal, O. T., et al. (2019). *KUNMAT2 - Kunnskapsnotat om mattrygghet i næringsmiddelindustrien*. NMBU, Nofima, Veterinærinstituttet, NIBIO.
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I.-H., Jeong, S. H., Kang, H.-K. & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & chemotherapy*, 47 (2): 81-97. doi: 10.3947/ic.2015.47.2.81.
- Huovinen, P. (1987). Trimethoprim resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31 (10): 1451-1456. doi: 10.1128/aac.31.10.1451.
- Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F., Tom, M. & Okoh, A. I. (2012). Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *TheScientificWorldJournal*, 2012: 625023-625023. doi: 10.1100/2012/625023.
- Integrated DNA technologies. (2011). *The Polymerase Chain Reaction*. Tilgjengelig fra: https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/biotech-basics/the-polymerase-chain-reaction.pdf?sfvrsn=7493407_4 (lest 26. mars 2020)
- Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2015). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *the bmj*, 351: h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22 (1): 161-82, Table of Contents. doi: 10.1128/cmr.00036-08.
- Janda, J. M. & Abbot, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9): 2761-2764.

- Jordi, V., Joaquin, R., Francisco, G., Martha, V., Lara, S., Maria José, F. & Joaquin, G. (2003). *Aeromonas* spp. and Traveler's Diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. *Emerging Infectious Disease journal*, 9 (5): 552. doi: 10.3201/eid0905.020451.
- Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Awang Hamat, R. & Neela, V. K. (2018). Iron and Virulence in *Stenotrophomonas Maltophilia*: All We Know So Far. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8: 401-401. doi: 10.3389/fcimb.2018.00401.
- Kerényi, M., Allison, H. E., Bártai, I., Sonnevend, A., Emödy, L., Plaveczyk, N. & Pál, T. (2005). Occurrence of hlyA and sheA genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, 43 (6): 2965-2968. doi: 10.1128/JCM.43.6.2965-2968.2005.
- Kobayashi, N., Nishino, K. & Yamaguchi, A. (2001). Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183 (19): 5639-5644. doi: 10.1128/JB.183.19.5639-5644.2001.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 8 (6): 423-35. doi: 10.1038/nrmicro2333.
- Kolář, M., Urbánek, K. & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17 (5): 357-363. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00317-X).
- Kumar, S. & Varela, M. (2012). Biochemistry of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (4): 4484-4495. doi: 10.3390/ijms13044484.
- Lange, H., Heier, B. T., Nygård, K., Vold, L., Wester, A. L. & Kapperud, G. (2012). *Årsrapport - Næringsmiddelbårne infeksjoner og utbrudd i 2011. Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) og Vevbasert system for utbruddsvarsling (Vesuv)*. Oslo: Folkehelseinstituttet, divisjon for smittevern.
- Leach, K. L., Swaney, S. M., Colca, J. R., McDonald, W. G., Blinn, J. R., Thomasco, L. M., Gadwood, R. C., Shinabarger, D., Xiong, L. & Mankin, A. S. (2007). The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell*, 26 (3): 393-402. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.005.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* (62). doi: 10.3791/3923.

- Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z. & Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8 (1): 44. doi: 10.1186/s13756-019-0489-3.
- Li, X., Hu, Y., Gong, J., Lin, Y., Johnstone, L., Rensing, C. & Wang, G. (2012). Genome Sequence of the Highly Efficient Arsenite-Oxidizing Bacterium *Achromobacter arsenitoxydans* SY8. *Journal of Bacteriology*, 194 (5): 1243. doi: 10.1128/JB.06667-11.
- Lie, A. K. (2000). DNA analyser i diagnostisk patologi. *Tidsskriftet for den norske legeforening*, 120: 589-594.
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y. & Lan, C.-Y. (2017). Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology*, 55 (2): 130-136. doi: 10.1007/s12275-017-6408-5.
- Lin, Y.-T., Huang, Y.-W., Chen, S.-J., Chang, C.-W. & Yang, T.-C. (2015). The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59 (7): 4067-4073. doi: 10.1128/AAC.00372-15.
- Lindstedt, B.-A. (2020). *Personlig kommunikasjon*. Ås: NMBU: (Våren 2020).
- Liofilchem Inc. (u.å.). *MIC Test Strip*. Tilgjengelig fra: <https://www.liofilchem.com/en-us/products/featured-products/mic-test-strip-liofilchem.html> (Lest 23. mars 2020).
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34 (5): 634-640. doi: 10.1086/338782.
- Livermore, D. M. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 66 (9): 1941-4. doi: 10.1093/jac/dkr262.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R. & García-del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 40 (5): 592-609. doi: 10.1093/femsre/fuw022.
- Lyngstad, T. M., MacDonald, E., Berg, T. C., Brandal, L. T., Kacelnik, O., Lange, H., Paulsen, T. H., Vold, L. & Nygård, K. (2019). *Årsrapport Utbrudd av smittsomme sykdommer i Norge i 2018*. Folkehelseinstituttet, divisjon for smittevern.
- Löhr, I. & Samuelson, Ø. (2015). Litteraturgjennomgang og vurdering av mulige strategier ved bruk av selektive kromogene medier for screening for bærerskap av multiresistente (ESBL-holdige) Gram-negative stavbakterier. *Nasjonal*

- kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens. Tromsø: Universitetssykehuset Nord-Norge.*
- Maeda, Y., Lin, C.-Y., Ishida, Y., Inouye, M., Yamaguchi, Y. & Phadtare, S. (2017). Characterization of YjjJ toxin of Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, 364 (11). doi: 10.1093/femsle/fnx086.
- Magnuson, J. A., King, A. D. & Török, T. (1990). Microflora of Partially Processed Lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (12): 3851-3854.
- Mena, K. D. & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water. *Rev Environ Contam Toxicol*, 201: 71-115. doi: 10.1007/978-1-4419-0032-6_3.
- Mokhtari, W., Nsaibia, S., Majouri, D., Ben Hassen, A., Gharbi, A. & Aouni, M. (2012). Detection and characterization of Shigella species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. *J Appl Microbiol*, 113 (1): 209-22. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05324.x.
- Moore, C. A., Khalid, M. F., Patel, P. D. & Goldstein, J. S. (2017). Aeromonas salmonicida Bacteremia Associated with Chronic Well Water Consumption in a Patient with Diabetes. *Journal of global infectious diseases*, 9 (2): 82-84. doi: 10.4103/jgid.jgid_147_16.
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á. & Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic Escherichia coli: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Frontiers in microbiology*, 10: 1965-1965. doi: 10.3389/fmicb.2019.01965.
- Nejdat, A., Saadi, I. & Ronen, Z. (2008). Effect of flagella expression on adhesion of Achromobacter piechaudii to chalk surfaces. *J Appl Microbiol*, 105 (6): 2009-14. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03930.x.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78: 119-146. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.
- Nivaskumar, M. & Francetic, O. (2014). Type II secretion system: A magic beanstalk or a protein escalator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843 (8): 1568-1577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.020>.
- NORM/NORM-VET. (2018). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø/Oslo 2019: ISSN:1502-2307 (print)/1890-9965 (elektronisk).

- Norsk legemiddelhåndbok. (u.å.-a). *L1.2.6 Karbapenemer*. Tilgjengelig fra:
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.6/Karbapenemer> (Lest 18. april 2020).
- Norsk legemiddelhåndbok. (u.å.-b). *L1.2.8 Makrolider*. Tilgjengelig fra:
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.8/Makrolider> (Lest 18.april 2020).
- Norsk legemiddelhåndbok. (u.å.-c). *L1.2.9 Aminoglykosider*. Tilgjengelig fra:
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.9/Aminoglykosider> (Lest 18. april 2020).
- Norsk legemiddelhåndbok. (u.å.-d). *L1.2.12.1 Fluorokinoloner*. Tilgjengelig fra:
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.13.1/Fluorokinoloner> (Lest 18. april 2020).
- Norsk legemiddelhåndbok. (u.å.-e). *L1.2.12.3 Trimetoprim*. Tilgjengelig fra:
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.12.3/Trimetoprim> (Lest 18. april 2020).
- Okazaki, A. & Avison, M. B. (2007). Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51 (1): 359-360. doi: 10.1128/AAC.00795-06.
- Okazaki, A. & Avison, M. B. (2008). Induction of L1 and L2 beta-lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52 (4): 1525-1528. doi: 10.1128/AAC.01485-07.
- Pallasch, T. J. (2003). Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am*, 47 (4): 623-39. doi: 10.1016/s0011-8532(03)00039-9.
- Pan, Y. P., Xu, Y. H., Wang, Z. X., Fang, Y. P. & Shen, J. L. (2016). Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol*, 198 (6): 565-71. doi: 10.1007/s00203-016-1215-7.
- Penders, J., Stobberingh, E. E., Savelkoul, P. H. M., Wolffs, P. F., Medical, M., Infection, C. & Immuno-pathogenesis, C. C. A. (2013). The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4: urn:issn:1664-302x.
- Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., Fernández, M. d. C., Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M. P. & Bou, G. (2012). Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56 (4): 2084-2090. doi: 10.1128/AAC.05509-11.
- Perry, J. D. (2017). A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30 (2): 449-479. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-16>.
- Pesingi, P. V., Singh, B. R., Pesingi, P. K., Bhardwaj, M., Singh, S. V., Kumawat, M., Sinha, D. K. & Gandham, R. K. (2019). MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas*

- aeruginosa Offers Resistance to Carvacrol: A Herbal Antimicrobial Agent. *Frontiers in Microbiology*, 10 (2664). doi: 10.3389/fmicb.2019.02664.
- Piotrowska, M., Przygodzinska, D., Matyjewicz, K. & Popowska, M. (2017). Occurrence and Variety of beta-Lactamase Genes among *Aeromonas* spp. Isolated from Urban Wastewater Treatment Plant. *Front Microbiol*, 8: 863. doi: 10.3389/fmicb.2017.00863.
- Pitout, J. D. D. & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, 8: 159-66.
- Podnecky, N. L., Rhodes, K. A. & Schweizer, H. P. (2015). Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Frontiers in microbiology*, 6: 305-305. doi: 10.3389/fmicb.2015.00305.
- Qureshi, A., Mooney, L., Denton, M. & Kerr, K. G. (2005). *Stenotrophomonas maltophilia* in salad. *Emerging infectious diseases*, 11 (7): 1157-1158. doi: 10.3201/eid1107.040130.
- Ramirez, M. S. & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 13 (6): 151-171. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- Raphael, E., Wong, L. K. & Riley, L. W. (2011). Extended-spectrum Beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Appl Environ Microbiol*, 77 (5): 1601-7. doi: 10.1128/aem.02506-10.
- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., et al. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC genomics*, 9: 427-427. doi: 10.1186/1471-2164-9-427.
- Rolain, J.-M. (2013). Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in Microbiology*, 4 (173). doi: 10.3389/fmicb.2013.00173.
- Rouquette-Loughlin, C. E., Balthazar, J. T. & Shafer, W. M. (2005). Characterization of the MacA–MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (5): 856-860. doi: 10.1093/jac/dki333.
- Rudi, K., Flateland, S. L., Hanssen, J. F., Bengtsson, G. & Nissen, H. (2002). Development and Evaluation of a 16S Ribosomal DNA Array-Based Approach for Describing Complex Microbial Communities in Ready-To-Eat Vegetable Salads Packed in a Modified Atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (3): 1145-1156. doi: 10.1128/AEM.68.3.1146-1156.2002.

- Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., El-Mniai, A., Boussadia, Y., Consigny, P. H., Girard, P. M., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Pialoux, G., et al. (2014). Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Eurosurveillance*, 19 (14): 20768. doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20768>.
- Russel, A. D. (2000). Do Biocides Select for Antibiotic Resistance?*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (2): 227-233. doi: 10.1211/0022357001773742.
- Safe food. (2010). *The Problem of Antibiotic Resistance in the Food Chain*. Tilgjengelig fra: <https://www.safefood.eu/SafeFood/files/8a/8abb9354-4cc2-49a4-b586-2bf0008eb8cf.pdf> (Lest 15. april 2020).
- Sanchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol*, 6: 658. doi: 10.3389/fmicb.2015.00658.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463-5467.
- Sastalla, I., Fattah, R., Coppage, N., Nandy, P., Crown, D., Pomerantsev, A. P. & Leppla, S. H. (2013). The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe tripartite enterotoxin components assemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable. *PLoS one*, 8 (10): e76955-e76955. doi: 10.1371/journal.pone.0076955.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 90-101.
- Sharma, A., Sharma, R., Bhattacharyya, T., Bhandu, T. & Pathania, R. (2017). Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother*, 72 (1): 68-74. doi: 10.1093/jac/dkw382.
- Sigma-Aldrich. (u.å.). *Sanger Sequencing Steps & Method*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html> (Lest 24. mars 2020).
- Silveira, M. C., Azevedo da Silva, R., Faria da Mota, F., Catanho, M., Jardim, R., R Guimarães, A. C. & de Miranda, A. B. (2018). Systematic Identification and Classification of β -Lactamases Based on Sequence Similarity Criteria: β -Lactamase Annotation. *Evolutionary bioinformatics online*, 14: 1176934318797351-1176934318797351. doi: 10.1177/1176934318797351.

- Smalla, K., Jechalke, S. & Top, E. M. (2015). Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiology spectrum*, 3 (1): 10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014.
- Soares, G. M. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P. M. & Feres, M. (2012). Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 20 (3): 295-309. doi: 10.1590/s1678-77572012000300002.
- Soucy, S. M., Huang, J. & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16 (8): 472-482. doi: 10.1038/nrg3962.
- Stellwagen, N. C. (2010). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *National Institutes of Health (NIH) Public Access, Department of Biochemistry, University of Iowa, USA*.
- Sum, R., Swaminathan, M., Rastogi, S. K., Piloto, O. & Cheong, I. (2017). Beta-Hemolytic Bacteria Selectively Trigger Liposome Lysis, Enabling Rapid and Accurate Pathogen Detection. *ACS Sensors*, 2: 1441-1451.
- Szurmant, H. & Ordal, G. W. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68 (2): 301-319. doi: 10.1128/MMBR.68.2.301-319.2004.
- Tan, S. Y. & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore medical journal*, 56 (7): 366-367. doi: 10.11622/smedj.2015105.
- Tanabe, M., Szakonyi, G., Brown, K. A., Henderson, P. J., Nield, J. & Byrne, B. (2009). The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from *Escherichia coli* forms a dimer in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 380 (2): 338-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.081.
- Tauch, A., Schlüter, A., Bischoff, N., Goesmann, A., Meyer, F. & Pühler, A. (2003). The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla_{NPS-1}, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Molecular Genetics and Genomics*, 268 (5): 570-584. doi: 10.1007/s00438-002-0785-z.
- Tewari, R., Dudeja, M., Nandy, S. & Das, A. K. (2014). Isolation of *Aeromonas salmonicida* from Human Blood Sample: A Case Report. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 8 (2): 139-140. doi: 10.7860/JCDR/2014/6883.4032.

- The European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe*. . Stockholm.
- The European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). *Regional outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Italy, 2018-2019*. Stockholm.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2009). *260/280 and 260/230 Ratios*. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers. USA. Tilgjengelig fra: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> (Lest 18. mars 2020).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010a). *Brilliance ESBL*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/oxoid-Brilliance-ESBL.pdf> (Lest 17. mars 2020).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010b). *Qubit® 2.0 Fluorometer Catalog no. Q32866 User Manual*. Tilgjengelig fra: https://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2_Fluorometer_UserManual.pdf (Lest 19. mars 2020).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). *Brilliance CRE*. Tilgjengelig fra: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Specification-Sheets/Thermo-Scientific-Brilliance-CRE-Sell-Sheet-EU-EN-PO1226A-low-res.pdf?_ga=2.83746134.1196544098.1584461016-1037256406.1584461016 (Lest 17. mars 2020).
- Traglia, G. M., Almuzara, M., Merkier, A. K., Adams, C., Galanternik, L., Vay, C., Centrón, D. & Ramírez, M. S. (2012). *Achromobacter xylosoxidans*: an emerging pathogen carrying different elements involved in horizontal genetic transfer. *Current microbiology*, 65 (6): 673-678. doi: 10.1007/s00284-012-0213-5.
- Turgeon, M. L. (2012). *Linné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science: The Basics and Routine Techniques*. 6. utg. USA: Elsevier Mosby
- Valencia, C. A., Pervaiz, M. A., Husami, A., Qian, Y. & Zhang, K. (2013). *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics*. 1. utg. New York, USA: Springer
- van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P. & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2: 203-203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2012). Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of The Total Environment*, 426: 366-374. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046>.

- Vong, K. & Auclair, K. (2012). Understanding and overcoming aminoglycoside resistance caused by N-6'-acetyltransferase. *MedChemComm*, 3 (4): 397-407. doi: 10.1039/C2MD00253A.
- Wagner, S., Grin, I., Malmsheimer, S., Singh, N., Torres-Vargas, C. E. & Westerhausen, S. (2018). Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS microbiology letters*, 365 (19): fny201. doi: 10.1093/femsle/fny201.
- Wood, T. L. & Wood, T. K. (2016). The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. *Microbiologyopen*, 5 (3): 499-511. doi: 10.1002/mbo3.346.
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Lest 1. mai 2020).
- World Health Organization. (2018). *Antibiotic resistance*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (Lest 20. april 2020).
- Yazdankhah, S., Lassen, J., Midtvedt, T. & Solberg, C. O. (2013). Historien om antibiotika. *Tidsskriftet for den norske legeforening*, 133 (23-24): 2502-7.
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P. & Fanning, S. (2017). Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology*, 64: 23-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.009>.

Vedlegg

Vedlegg A

Tabell A.1: Kvantifisering og renhetsmåling av DNA etter ekstrahering og isolering fra prøvemateriale, samt etter rensing av 16S rRNA- og singlepleks-produkt. Renhet vurdert ut fra absorbansmåling ved bruk av NanoDrop™ 2000 og konsentrasjon av DNA (ng/ml) målt med Qubit® 2.0 Fluorometer

Prøve	DNA etter ekstrahering og isolering			16S rRNA produkt	Singlepleks VIM produkt
	Qubit®	Nanodrop™		Qubit®	
	Konsentrasjon DNA (ng/μl)	A _{260/280} (nm)	A _{260/230} (nm)	Konsentrasjon DNA (ng/μl)	Konsentrasjon DNA (ng/μl)
S1.1	38,4	1,58	0,57	36,2	-
S1.2	39,1	1,90	1,82	30,4	-
S1.3	64,7	1,78	1,32	31,2	-
S1.4	70,5	1,89	1,75	26,7	-
S2.1	128,0	1,92	2,17	53,4	-
S2.2	84,0	1,95	1,84	48,9	-
S2.3	74,0	1,85	1,38	49,8	-
S2.4	89,0	1,87	1,71	41,6	8,23
S2.5	82,6	1,88	1,56	56,4	-
S3.1	85,4	1,87	1,74	48,9	-
S3.2	142,0	1,95	1,97	50,7	-
S3.3	12,9	2,00	1,63	44,9	-

Vedlegg B

Tabell B.1 Bakteriestammer med høyest identitetsscore ved BLAST-søk av kontig-sekvenser fra 16S rRNA-sekvensering

Prøve	Maks score	Total score	Query cover	E-verdi	Identitets-score
S1.1					
<i>Bacillus paramycoides</i> stamme	2532	2532	100 %	0.0	99.01 %
<i>Bacillus wiedmannii</i> stamme	2527	2527	100 %	0.0	98.94 %
<i>Bacillus proteolyticus</i> stamme	2527	2527	100 %	0.0	98.94 %
<i>Bacillus albus</i> stamme	2527	2527	100 %	0.0	98.94 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	2521	2521	100 %	0.0	98.87 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	2521	2521	100 %	0.0	98.87 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	2521	2521	100 %	0.0	98.87 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	2521	2521	100 %	0.0	98.87 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	2521	2521	100 %	0.0	98.87 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	2521	2521	100 %	0.0	98.87 %
S1.2					
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme	1823	1823	99 %	0.0	99.50 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	1805	1805	99 %	0.0	99.20 %
S1.3					
<i>Pseudomonas koreensis</i> stamme	2451	2451	98 %	0.0	98.98 %
<i>Pseudomonas moraviensis</i> stamme	2446	2446	98 %	0.0	98.91 %
<i>Pseudomonas reinekei</i> stamme	2444	2444	98 %	0.0	98.77 %
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> stamme	2436	2436	98 %	0.0	98.76 %
S1.4					
<i>Achromobacter animicus</i> stamme	2471	2471	99 %	0.0	99.49 %
<i>Achromobacter mucicolens</i> stamme	2471	2471	99 %	0.0	99.49 %
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> stamme	2460	2460	99 %	0.0	99.34 %
S2.1					
<i>Bacillus paramycoides</i> stamme	1757	1757	97 %	0.0	98.69 %
<i>Bacillus albus</i> stamme	1757	1757	97 %	0.0	98.69 %
<i>Bacillus anthracis</i> stamme	1757	1757	97 %	0.0	98.69 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1751	1751	97 %	0.0	98.59 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1751	1751	97 %	0.0	98.59 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1751	1751	97 %	0.0	98.59 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1751	1751	97 %	0.0	98.59 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1751	1751	97 %	0.0	98.59 %
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1751	1751	97 %	0.0	98.59 %
S2.2					
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	1879	1879	99 %	0.0	99.23 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	1875	1875	99 %	0.0	99.14 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	1875	1875	99 %	0.0	99.14 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	1873	1873	99 %	0.0	99.14 %
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme	1868	1868	99 %	0.0	99.04 %
S2.3					
[<i>Pseudomonas</i>] <i>hibiscicola</i> stamme	2030	2030	98 %	0.0	99.64 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2019	2019	98 %	0.0	99.46 %
S2.4					
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> stamme	2398	2398	98 %	0.0	98.67 %

<i>Pseudomonas taiwanensis</i> stamme	2398	2398	98 %	0.0	98.67 %
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> stamme	2398	2398	98 %	0.0	98.67 %
<i>Pseudomonas monteilii</i> stamme	2386	2386	98 %	0.0	98.52 %
<i>Pseudomonas graminis</i> stamme	2386	2386	98 %	0.0	98.52 %
<i>Pseudomonas coleopterorum</i> stamme	2385	2385	98 %	0.0	98.52 %
S2.5					
<i>Achromobacter mucicolens</i> stamme	2274	2274	99 %	0.0	98.53 %
<i>Achromobacter deleyi</i> stamme	2257	2257	99 %	0.0	98.30 %
<i>Achromobacter spanius</i> stamme	2257	2257	99 %	0.0	98.30 %
S3.1					
<i>Aeromonas salmonicida</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
[<i>Haemophilus</i>] <i>piscium</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas bestiarum</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas salmonicida</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas piscicola</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas salmonicida</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas salmonicida</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas salmonicida</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
<i>Aeromonas salmonicida</i> stamme	1986	1986	100 %	0.0	98.66 %
S3.2					
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2451	2451	100 %	0.0	99.48 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2447	2447	100 %	0.0	99.41 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2447	2447	100 %	0.0	99.41 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2446	2446	100 %	0.0	99.41 %
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme	2429	2429	100 %	0.0	99.19 %
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> stamme	2425	2425	100 %	0.0	99.11 %
S3.3					
<i>Pseudomonas koreensis</i> stamme	2050	2050	98 %	0.0	99.12 %
<i>Pseudomonas reinekei</i> stamme	2039	2039	98 %	0.0	98.95 %
<i>Pseudomonas moraviensis</i> stamme	2034	2034	98 %	0.0	98.86 %
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> stamme	2034	2034	98 %	0.0	98.86 %

Vedlegg C

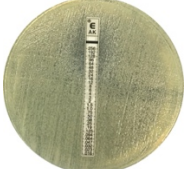
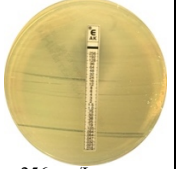
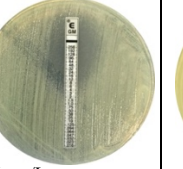
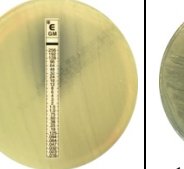
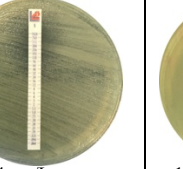
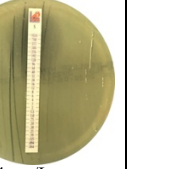
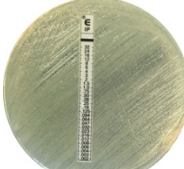
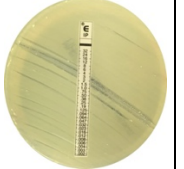
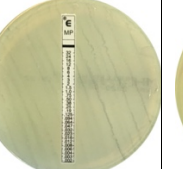
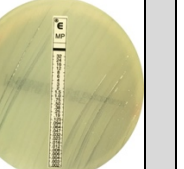
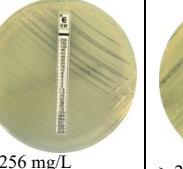
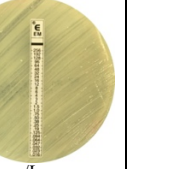
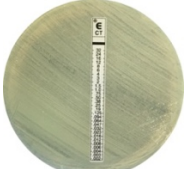
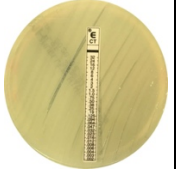
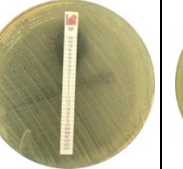
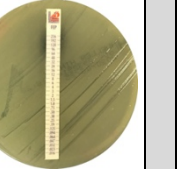
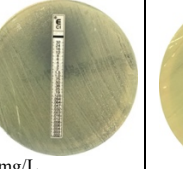
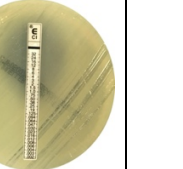
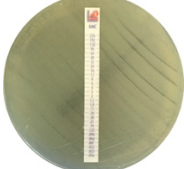
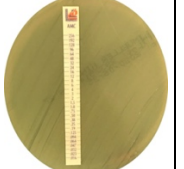
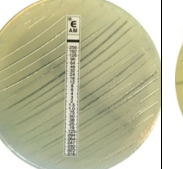
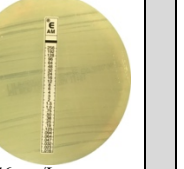
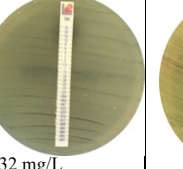
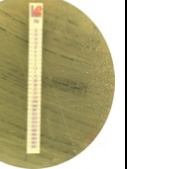
Tabell C.1 Kontig-sekvens av 16S rRNA-sekvens fra Sangersekvensering

Prøve	16S rRNA-sekvens
S1.1	GCTTAAACCTGCAAGTCGAAGCGAATGTGATCAAAGAGCTTGCCTTATGAAGTTAGCGGGCAGCGGTTAGTAAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTTCGAAATGAAAGCGGCTTCGGCTGTACTTATGGATGGACCCGCTCGCATAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCAACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGGCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACC TTGACGGTACTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGGTAAGCGCGCGAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCGCTCAACCGTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAAACTGGGAGACTTGGTGCAGAAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAACCATGGTGGTTAATTCGAAGCAACGCCAAGAACCTTACCAGGCTTTCACATCTCTGACAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTACTTATGTGCCATCTTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGCTGAACTCATATGCCCTTATGACTGGGCTACACAGCTGACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAACTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAACTCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTAGGGTAA
S1.2	GCAAGAAGAGCTTGCCTCTCGGGTGGCAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGCTGTTGGGGATAACGTTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGCACTACGGGTGAAAGCAGGGGACTTCGGGCTTGGCGATTGAATGAGCCGATTCGGGATGCGGATGTTGGCGGGTAAAGGCCACCAAGGCGCAGTCCGTAGCTGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCTTCCGGTTGTAAGCCCTTTTGGGAAAGAAATCCAGCTGGTAAATACCCGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAACGCTGAGCTGCGTAAAGCTTCCGTCGACGACCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTAACGGGCTAAAGCGTGCAGTGGTCTTTAAGTCCGTTGTAAGCCCTGGCTCAACCTGGGAACCTGACAGTGGGACTAGAGTGTGGTGAAGGTAAGGTAATTCCTGGTAGCAGTGA AATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATTGCGAAGCTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGT TAAAGTCCGCCCTGGGAGTACGGTGCACAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATGTGGTTTAA TTGCATGCAACCGGAAGAACCTTACCGGCCCTTGACATGTGCGAAGCTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGAACACAGG TGCTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCCGGT
S1.3	ACGAGGAGGTAGACAGAGCTTGCCTCGGATTACGCGGCGACGGGTGAGTAAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAAACGTT TCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACTTCGGGCTTGGCGTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATT AGCTAGTTGGTGAAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAACCTGAGACACGGT CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCTTCCG GATTGTAAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAACTCTGCAATTTTACGCTTACCGACAGAAATAGCACCAGGTAACCTC TGTCCAGCAGCCGCGTAATAAAGAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTAACGGGCTAAAGCGTGCAGTGGTCTTTAAGTCCGTTGTAAGTGGGA TGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGATCCAAACTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTGGAATTCCTGTGTAGCGG GTGAAATCGCTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGTAAACGATGCTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAAGCTTGAAGTGGCGAGTAAACG CATTAAGTTAGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATTTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAAGCAATGGT GGTTTAATTGAAAGCAGCGCAAGAACCTTACAGCCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAAAGATGGATTGGTCTCGGGAACATTT GAGACAGGTGCTTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCGTGTCCGGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTAC CAGCAGCTTATGGTGGGACTCTAAGGAGACTGCGGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTAAGTCAATGACCTATGCGCTTACGG CTTGGCTACACAGTGTACAATGGTCCGTACAAGGGTGGCAAGCCGCTTACCTGACAGTACCGGAGTGAAGTAAATCCATGAAACCGATCCTAGTCCGG ATCGCAGCTGCAACTGACTGCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAACTCGGAATCAGAATGTGCGGTTGAATACGTTCCCGGCCCTGTAC ACACCGCCCTCACACCATGGGAGTGGGTCGCCACCAAGTAGTACTACACA
S1.4	TAGGCTAACTACTTCTGGGTAAAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGTTGTGTACAAGACCCGGAAACGTTATCACCGGACATGCTG TCCCGGATTAAGTACGATCCGACTTACGCAAGTCCGAGTTGACAGTCCGATCCGACTACGATCCGGTTCTGGGATTTGGCTTCCACC ATCCGGGTTGGCGACCCCTCTGTCCCGACCATTTGATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTGAGGCTATCCACC TTCTCCGGTTTGTACCCGCGACTCTCATTAGAGTGCCTTTCTGAGCAACTAATGACAAGGGTTCGCTCGTGGGGACTTAAACCCAA CATCTCAGCAGCAGGCTGACGACAGCCATGACAGCACCTGTGTTCCGGTTCTTTCGCGAGCACTACCAAACTCTTCCGCACTTCCAGACA TGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTCGCGTTCGATCAATTAATCCACATCATTCCAGCCGTTGTGCGGGTCCCGCTAATCTTGAAGTTT AATCTTGGCAGCCTTACCCAGGGCGTCAACTCAGCGCTTAGCTGCGCTACCAAGGCCGAAGGCCCAACAGCTAGTTGACATCGTT TAGGCGTGGCTACACAGGATCTAATCTGTTGCTCCCAAGCTTTCGTGATGAGCGTCAAGTGTATCCAGGAGTGCCTTCCGCTTCCG TACCGTTCCTCCGATACTACGCAATTTACTGCTACAGCCGGAATTCACCTCCCTCTGACACACTAGCTAGCTCGGTAGTAAAAAATG CAGTTCAAAAGTAAAGCTCTGGGATTACATCTTTCTTCCGAACCGCCTGCGCACGCTTACGCCCCAGTAAATCCGATTAACCGTTGCAC CTACGATTACCGCGCTGCTGGCAGTATGTTAGCCGCTGCTTACTGCAAGTACCGTCAAGTTTCCCGGGTAAACCCGCGAGCTTT CTCTTCCGCAAAAGTCTTACAACCCGAAGCCCTCATCGCACAGCGGGATGGCTGGATCAGGGTTCCCCATTGTCCAAAATTC CCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGTGGTCTCTCAAAACAGCTCAGGATCTGCGCTTGGT GAGCCGTTACCCCACTAGCTAATCCGAAATCGGCCGCTCTAATAGTGAAGTCTTGGCATCCCTGCTTTCCCGCTTCCCGGTTAAGGGGTA TGCGGTATTAGCTACGCTTTCGCTAGTTATCCCGCTACTAGGCAGTTCGATACATTACTACCCGTTCCGCACTGCCACCAGACC GAAGTTGGT
S2.1	TAACCATGCAAGTCTGTAACAAGGTAGCACGAGAGCTTGCCTGTATGACAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACCTGCC CATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTGAAATGAAAGGCGGCTTCGGCT GTCACCTATGATGGACCCCGCTCGCAATTAGTGGTGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGCACTGAGAGGGTG ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA GCAACCGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATACTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTG ACGGTTACCTAACCCAGAAAAGCCACGGGCTAAAATTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCCGAATTTAT TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAAGGGTCAATGGAACTGGGAGACT TGAGTGCAGAAAGAGAAAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCT GGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAAGGATAGATACCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAGTGTAA GTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAACATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTTCGATCCTCTGAC ACCTAGAGATAGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGTGGT
S2.2	GGCGGAATAGCTAGTTGGCGGGTAAAGGCCCAAGGGCAGACTCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTTGAAG AAGGCCCTTCGGGTTGTAAGGCCCTTTGTTGGGAAAGAAATCCATCTGGTTAATACCCGGTGGGATGACGGTACCCAAAGAAATAAGCA CCGGTAACCTTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAGCGCTTACTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGGTGGTGGTCT TTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGTACTGGGCGACTAGAATGTGGGAGGTAAGGGAATTC TGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAAGTACCTGGACCAACATGACACTGAGGCAGGAA GCGTGGGGGCAACACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAGCCCTAACACGATGCGAATGGATGTTGGGCAAGTGGTGGTGGTGGT CGAAGTAAACCGTAAAGTTCGCCGCTGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACTGGCTGACATGTGCGAAGCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG AACTCGAACACAGTGTGCTGCTCAGCTGCTGCTGAGTGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCGCAACCTTGTCTTGTAG TTGCCAGCAGTAAATGGTGGGAACTAAGGAGACCCGCGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAATGACCTTACG CCGCAGGGCTACACAGTACTACAATGGTAGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCAGCTAGAGCC

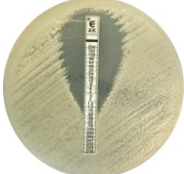
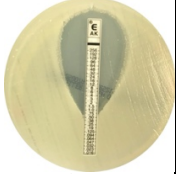
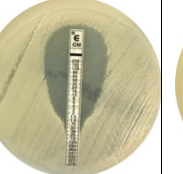
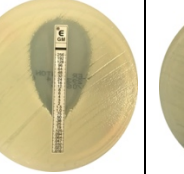
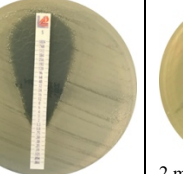
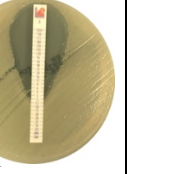
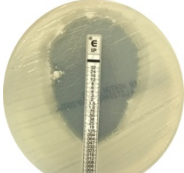
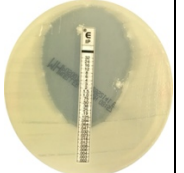
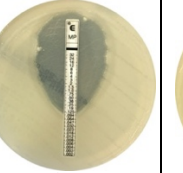
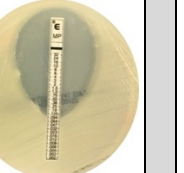
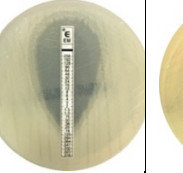
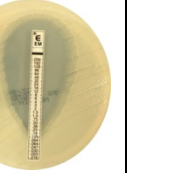
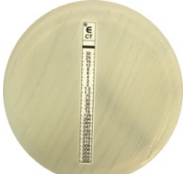
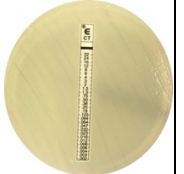
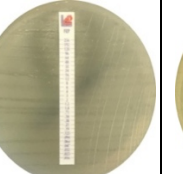
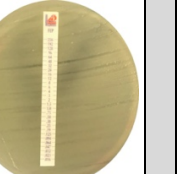
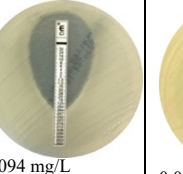
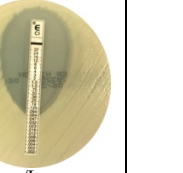
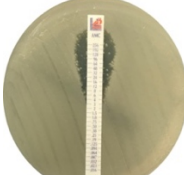
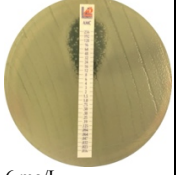
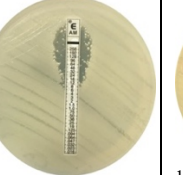
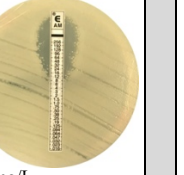
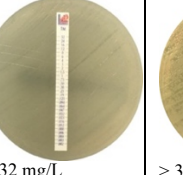
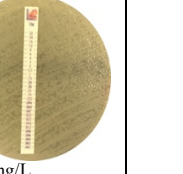
S2.3	<p>GATCATAAACACTGGAAGTACAGACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC AGCCATACCCTGGTGAAGAAGCCCTCCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCTGGTGGGATG ACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAATCTCGTCCAGCAGCCGGTAAATACGAAGGGTCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCG TAAAGCGTGGTAGGTGGTCTGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACTGGGAAGTGCAGTGGTACTGGGCGACTAGAAATGT GGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGTACAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGACAGTACCTGGACCAA CATTGACACTGAGGCGACAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGTAACTCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATTGGT GTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACCGTAAAGTTCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGCTGAAACTCAAGGAATGAC GGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCCTGACATGTCCGAGAATTTCCAG AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTAAACACACGCTGTCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCTTTGCCCTTAGTTGCCAGCAGTAAATGGTGGGAACCTAAAGGAGACCCTGGTGAACACCGGAGGAAGTGGGGATG ACGTCAAGTATCATGGCCCTACGGCCAGGGCTACACAGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAAGCA ATCCAGAAACCTTATCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGCAGATCAGCATTGCTG CGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCTCACACCAATGGAGTCTGA</p>
S2.4	<p>ATACTACTGGTGAACCTCAACTCCCATTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCAGATTCGATTCCGG ATTACTAGCCGTTCCGACTTACAGCAGTGCAGTGTGCAGCTGGATCCGGACTCAGATCGGTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCCGGCT TGGCAACCTCTGTACCGACCATTTGAGCAGCTGTGTAGCCAGCCGCTAAGGGCCATGATGACTTACCGTCAATCCCACTCCCGG TTTGTACCGGCGAGTCTCCTTAGAGTGCACATAACGTGTGGTAAAGCAAGGGTTCGCTCGTTCACGGGACTTAAACCAACA TCTCAGCAGCAGTACGACAGCCATGCAACCTGTCTCAATTTCCCGAAGGCAACCAATCCATCTCTGGAAGTTACTTGGATGTC AAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGGTGTCTGCAATTAACACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTGAGTTTAACT TTGCGGCGTACTCCCGAGGCGGCTCAACTAATGCGTGTAGCTGCACATAAAATCTCAAGGATTCACCGCTAGTTGACATGCTTTAC GGCGTGGCTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTCCCGCTTTCGACCTCAGTGTAGTCAAGTATGAGAGTCCGCTCGCTCCGCTTCCACT GGTGTCTCTTCTATATCTACGCAATTCACCGCTACACAGGAAATCCACACCTCTGCCCTACTCTAGCTGCCAGTTTTGGATGTCAGT TCCAGTGTGAGCCCGGGATTTCACATCACTAACGAACACTACCGCGCTTACGCCAGTAATTCGTAATACGCTGACCTTCCACCC TCTGTATTACCGCGGCTGTGGCACAGAGTTAGCCGGTCTTACTGTGCGTAAAGTCAAAACAGCAAGGATTAGCTTACTGCTCCCTTC CTCCCAACTTAAAGTGTCTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACAGCGGCGAGGGCTGGATCAGGCTTCCGCCATTTGCCAATATTC ACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGGTTACCGTCCGCTGGTGA GCCATTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCTGCTTCTCCCTAGGACGATG CGGTATTAGCGTCTCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTATCAGGCAGATTCTAGGATTACTACCCGTCGCGCGTGAATACAAGGAGC AAGCTCGTCTG</p>
S2.5	<p>AGCGAGCTAGTAGCGGGGATAACTACGCGAAGCGTAGCTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCT CGCACTATTAGAGCGCGGATATCGGATTAGTGTGGTGAACCGCTACCAAGGCGACGATCCGTTAGTGGTGGAGGAA CGACATGACCGACTGAGACAGCGCCAGCTCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGAAACCCCTGATC CCAGCATCCCGGCTGTGCGATGAAGGCCCTTCGGGTTGAAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGTCGCGGGATAATACCTGGGAAAC TGACGGTACCTCCAGAAATAAGCACCGGCTAACTACGTCGCCAGCGCGGTAATACGTAAGGTTGCAAGGTTAATCGGAACTTAGG CGTAAAGCGTGGCAGGCGGTTCCGAAAGAAAGATGTAAATCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGAGCTAGAGT GTGTCAGAGGGAAGGTGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCGAGCTCTGGGA TAAACTGACGCTATGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAACCTG TTGGGCCCTTCGGGCTTGGTAGCGCAGCTAACCGGTGAAGTGTACCGCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACAAAGGAATG ACGGGACCCGCAAGCGTGGATGAAGGGATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCTGATGCTGGAATGCGCAATGCGCA AAAGATTGGCAGTGTGCAAGGAAACCGGAACACAGGTGTGATGGTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC GCAACGAGCGCAACCTTGTCTATTAGTGTACGAAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGCAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC GTCAAGTCCCTATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGTTGCGGACAGAGGGTCCGCAACCGGAGGGGAGCAAT CCAGAAACCGGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAAATCCGGATCAGCATGTCGG GTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGTGAGTGTAT</p>
S3.1	<p>CCCGCTACGTTTACCGCGACATTCGATTGCGGATTACTGAGGATTCCGACTTCCGAGTTCACGGAGTTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTA CGACCGCTTTTGGGATTGCTCACTATCGCTAGCTTTCAGCCCTCTGATCCGCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGG CATGATGACTGACGTCATCCCACTTCCCGGTTTATCCCGGAGTCTCCCTGAGTTCACCACTTCCGAAACAAAGGA CAGGGGTTGCGCTCGTTGGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAGCTGTGTTCTGATTCCCGAAG GCATACCGCATCTACAGGATCCAGACATGTCAAGGCCAGTAAAGGTTCTTCGGCTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCCCT TTGCGGGCCCGCTCAATTCATGTGAGTTTAACTTGCGCCGACTCACAGCCGCTGATTTAAGCGTACCGTCCGGAAGCCAGC TCTCAAGGACACAGCTCCAAATCGACATCGTTACCGGCTGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCAAGCTATCGACCTG AGCGTCACTTGTCCAGGGGCGCCTTCGCCACCGGTTACTCTCAGATCTTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTTACCCCT CTTCAAGACTAGCTGGACAGTTTAAATGCAATTCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAATTTCAACCCCTGCGTGC GCTTACGGCTAGTAAATTCGATTAACGCTTGCACCTCCGTTAATCCCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCGCGAGTA ACGTCAAGGTTACAGCTATTAGGCGCAACCTTCTCCTCGTAAAGTGTCTTAAACCCGAAAGGCTTTCACACAGGCTGATG GCTGCATCAGGGTTTCCCAATTTGCAATATTCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGAAGTCTGAACCGTGTCTCAGTTCAGGGTGGCTGTAT CATCTCTCAGACAGCTAGGGATCGTCCGCTTCGTTG</p>
S3.2	<p>CTCTGGATGGCAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTCTGTTGGGGATAACGTAGGGAACCTTACGCTAATACCG CATACGACTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCATTGATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGTAAAGG CCCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGAAGTACGACAGCGTCCAGACTCCTACGGGAGGACG AGTGGGAAATTTGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCATACCCGCTGGGTGAAGAAAGCCCTTCGGGTTGTAAGGCTTTGTTG GGAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCGGTTGGGATGACGGTACCAAAAGAAATAAGCACCGGCTAATCTGTCGACGACCGCGGTA TACGAAGGTTGCAAGCGTTACTCGGAATTAAGGCGGTAAGCGTGGCTAGGTTGCTGTTAAGTCCGTTGTAAGCCCTGGGCTCAA CCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAG GAGGAACATCCATGGCGAAGGACGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTT GGTAGTCCAGCCCTAAACGATGCGAAGTGGATGTTGGTGAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCGGCTG GGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAAGCGGTGGAATATGTGGTTAATTCGATGCAACCGG AAGAACCTTACCTGGCTTACATGTCGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGT GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAGGCGCAACCCCTTGTCTTACTGTCAGCAGTAAATGGTGGAACTTAA GGAGCCCGGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGCTCAAGTCAATGTCAGTGGCCCTTACGGCCAGGCTACACAGTACTCAAT GGTAGGACAGAGGCTGCAAGCGGCGACGGTAAAGCAATCCAGAAACCTTACTCAGTCCGGATTGAGTCTGCAACTGCACTCCCA TGAAGTCCGAATCGCTAGTAAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGGGA GTTTAGTAGCACCAG</p>
S3.3	<p>ACTACTTGTCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAAGTACGACAGCGTCCAGACTCCTACGGAAGGCGAGCAGTGGGGA ATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCCGATTGTAAGACACTTAAAGTTGGGAGGAA GGGTTGTAGATTAATCTGCAATTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGG GTGCAAGCGTTAATCCGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGCTAGGTTGGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTAATTTCTGTGTAGCAGTGAATTCGATAGATAGGCAAGGAA ACCGATGCGAAGGCGACCACTGGACTGATGACTGACACTGACGTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGATGCC ACGCGGTAACGATGCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGGAGCTTACTGTTGGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGTTAAACTCAATGAATTTGACGGGGGCGGCAAGCGGTTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTAC CAGCCCTTACAGATCAATGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTTGCTGATGCTGCTGCTGCTGCTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGTTACGAGCGCAACCTTGTCTTACTGATACGACGTAATGGTGGGACTTAAAGGAGTACCGG GTGCAAAACCGGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTATCATGCCCCTTACGGCCTGGGCTACACAGCTGCTACAATGGTCCGTAACA GGGTTGCCAAGCGCGAGGTGGAGTAAATCCCAAGAACCGATGCTAGTCCGGATCGAGCTGCAACTGACTGCTGCAAGTCCGAAT CGCTAGTAAATCGCAATCAAGATGTCGCGGTAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGTGAGTCTGAGTAG</p>

Vedlegg D


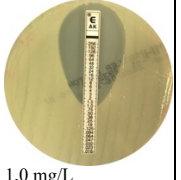
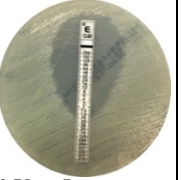
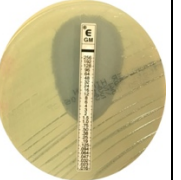
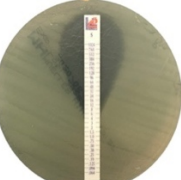

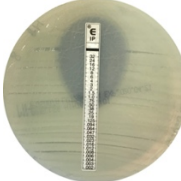
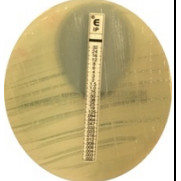
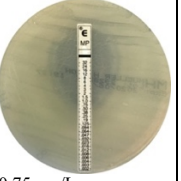

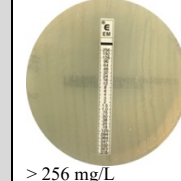
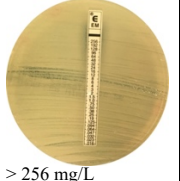
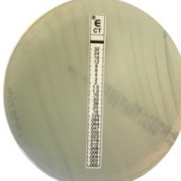
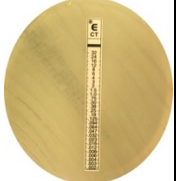
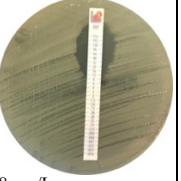
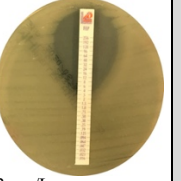
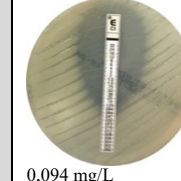
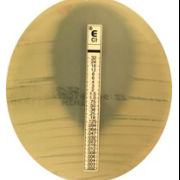
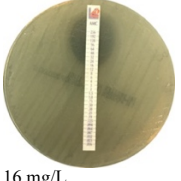

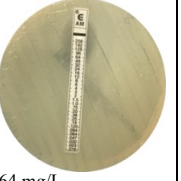
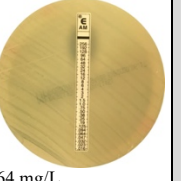
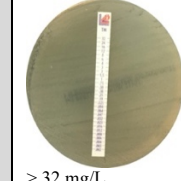
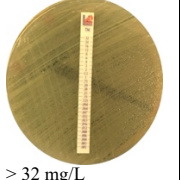
Tabell D.1 Bilder av skåler og MIC-verdi ved antibiotika-følsomhetstest for prøve S1.2

Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2
Prøve S1.2 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)					
Aminoglykosider					
Amikacin		Gentamicin		Streptomycin	
 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 16 mg/L	 16 mg/L	 ≥ 1024 mg/L	 ≥ 1024 mg/L
Snitt: ≥ 256 mg/L		Snitt: 16 mg/L		Snitt: ≥ 1024 mg/L	
Karbapenem				Makrolider	
Imipenem		Meropenem		Erytromycin	
 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L
Snitt: ≥ 32 mg/L		Snitt: ≥ 32 mg/L		Snitt: ≥ 256 mg/L	
Cefalosporiner				Fluorokinoloner	
Cefotaxim		Cefepim		Ciprofloxacim	
 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 32 mg/L	 96 mg/L	 2 mg/L	 1,5 mg/L
Snitt: ≥ 32 mg/L		Snitt: 64 mg/L		Snitt: 1,75 mg/L	
Penicilliner				Trimetoprim	
Amoxicillin - clavulansyre		Ampicillin		Trimetoprim	
 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L
Snitt: ≥ 256 mg/L		Snitt: ≥ 256 mg/L		Snitt: ≥ 32 mg/L	

Tabell D.2 Bilder av skåler og MIC-verdi ved antibiotika-følsomhetstest for prøve S2.1


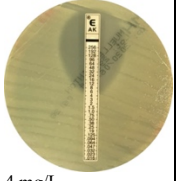
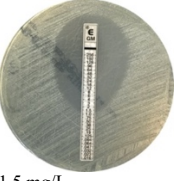
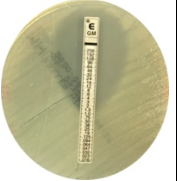
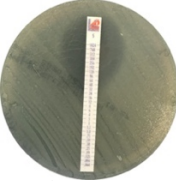
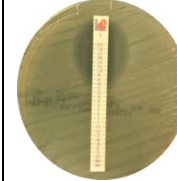

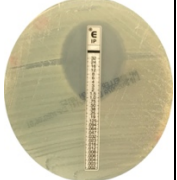
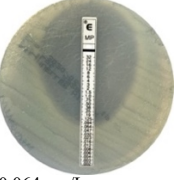
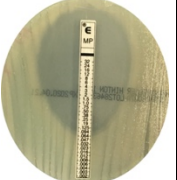
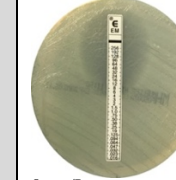
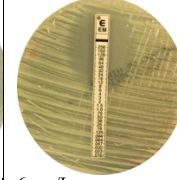
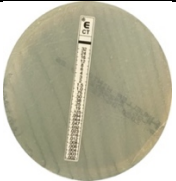
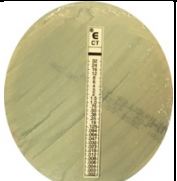
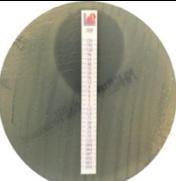

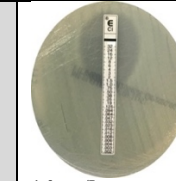
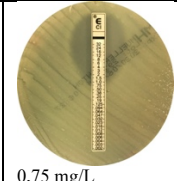
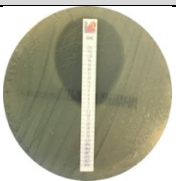

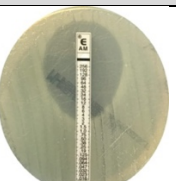
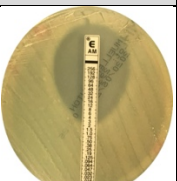
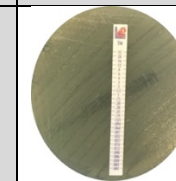
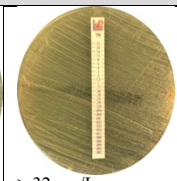
Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2
Prøve S2.1 (<i>Bacillus</i> spp.)					
Aminoglykosider					
Amikacin		Gentamicin		Streptomycin	
 0,50 mg/L	 0,50 mg/L	 0,38 mg/L	 0,50 mg/L	 1,5 mg/L	 2 mg/L
Snitt: 0,50 mg/L		Snitt: 0,44 mg/L		Snitt: 1,75 mg/L	
Karbapenem				Makrolider	
Imipenem		Meropenem		Erytromycin	
 0,064 mg/L	 0,047 mg/L	 0,125 mg/L	 0,094 mg/L	 0,25 mg/L	 0,19 mg/L
Snitt: 0,055 mg/L		Snitt: 0,110 mg/L		Snitt: 0,22 mg/L	
Cefalosporiner				Fluorokinoloner	
Cefotaxim		Cefepim		Ciprofloxacin	
 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 0,094 mg/L	 0,064 mg/L
Snitt: ≥ 32 mg/L		Snitt: ≥ 256 mg/L		Snitt: 0,079 mg/L	
Penicilliner				Trimetoprim	
Amoxicillin - clavulansyre		Ampicillin		Trimetoprim	
 6 mg/L	 6 mg/L	 8 mg/L	 12 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L
Snitt: 6 mg/L		Snitt: 10 mg/L		Snitt: ≥ 32 mg/L	

Tabell D.3 Bilder av skåler og MIC-verdi ved antibiotika-følsomhetstest for prøve S2.4.


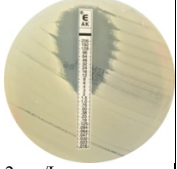
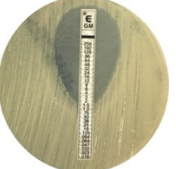
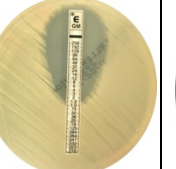
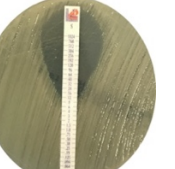
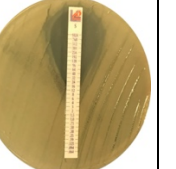
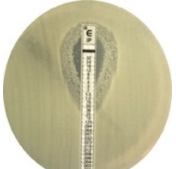
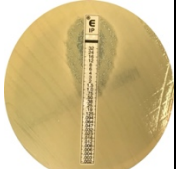
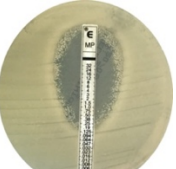
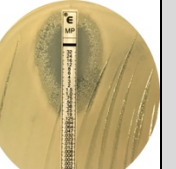
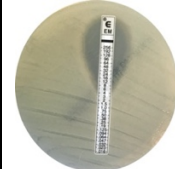
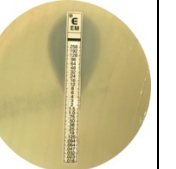
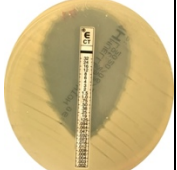
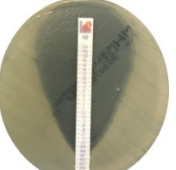
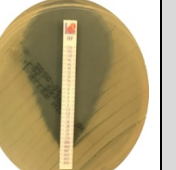
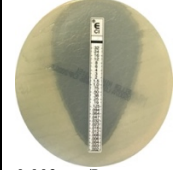


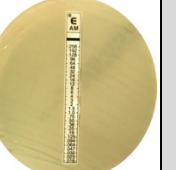
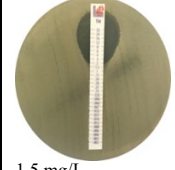
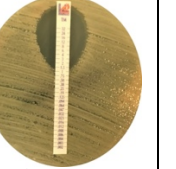
Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2
Prøve S2.4 (Pseudomonas spp.)					
Aminoglykosider					
Amikacin		Gentamicin		Streptomycin	
 0,75 mg/L	 1,0 mg/L	 0,75 mg/L	 1,0 mg/L	 6 mg/L	 6 mg/L
Snitt: 0,88 mg/L		Snitt: 0,88 mg/L		Snitt: 6 mg/L	
Karbapenem				Makrolider	
Imipenem		Meropenem		Erytromycin	
 0,50 mg/L	 0,50 mg/L	 0,75 mg/L	 0,50 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L
Snitt: 0,50 mg/L		Snitt: 0,63 mg/L		Snitt: ≥ 256 mg/L	
Cefalosporiner				Fluorokinoloner	
Cefotaxim		Cefepim		Ciprofloxacin	
 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 8 mg/L	 3 mg/L	 0,094 mg/L	 0,047 mg/L
Snitt: ≥ 32 mg/L		Snitt: 5,5 mg/L *		Snitt: 0,071 mg/L	
Penicilliner				Trimetoprim	
Amoxicillin - clavulansyre		Ampicillin		Trimetoprim	
 16 mg/L	 12 mg/L	 64 mg/L	 64 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L
Snitt: 14 mg/L		Snitt: 64 mg/L		Snitt: ≥ 32 mg/L	

* MIC-verdi er usikker på grunn av stor ulikhet i parallellene.

Tabell D.4 Bilder av skåler og MIC-verdi ved antibiotika-følsomhetstest for prøve S2.5

Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2
Prøve S2.5 (<i>Achromobacter arsenitoxidans</i>)					
Aminoglykosider					
Amikacin		Gentamicin		Streptomycin	
 6 mg/L	 4 mg/L	 1,5 mg/L	 1,5 mg/L	 32 mg/L	 64 mg/L
Snitt: 5 mg/L		Snitt: 1,5 mg/L		Snitt: 48 mg/L	
Karbapenem				Makrolider	
Imipenem		Meropenem		Erytromycin	
 0,75 mg/L	 0,75 mg/L	 0,064 mg/L	 0,064 mg/L	 8 mg/L	 6 mg/L
Snitt: 0,75 mg/L		Snitt: 0,064 mg/L		Snitt: 7 mg/L	
Cefalosporiner				Fluorokinoloner	
Cefotaxim		Cefepim		Ciprofloxacin	
 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 4 mg/L	 4 mg/L	 1,0 mg/L	 0,75 mg/L
Snitt: ≥ 32 mg/L		Snitt: 4 mg/L		Snitt: 0,88 mg/L	
Penicilliner				Trimetoprim	
Amoxicillin - clavulansyre		Ampicillin		Trimetoprim	
 2 mg/L	 2 mg/L	 3 mg/L	 3 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L
Snitt: 2 mg/L		Snitt: 3 mg/L		Snitt: ≥ 32 mg/L	

Tabell D.5 Bilder av skåler og MIC-verdi ved antibiotika-følsomhetstest for prøve S3.1

Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2
Prøve S3.1 (<i>Aeromonas salmonicida</i>)					
Aminoglykosider					
Amikacin		Gentamicin		Streptomycin	
					
2 mg/L	2 mg/L	1,5 mg/L	1,5 mg/L	12 mg/L	12 mg/L
Snitt: 2 mg/L		Snitt: 1,5 mg/L		Snitt: 12 mg/L	
Karbapenem				Makrolider	
Imipenem		Meropenem		Erytromycin	
					
4 mg/L	6 mg/L	0,25 mg/L	1,5 mg/L	8 mg/L	6 mg/L
Snitt: 5 mg/L		Snitt: 0,88 mg/L		Snitt: 7 mg/L	
Cefalosporiner				Fluorokinoloner	
Cefotaxim		Cefepim		Ciprofloxacin	
					
0,023 mg/L	0,023 mg/L	0,064 mg/L	0,064 mg/L	0,003 mg/L	0,003 mg/L
Snitt: 0,023 mg/L		Snitt: 0,064 mg/L		Snitt: 0,003 mg/L	
Penicilliner				Trimetoprim	
Amoxicillin - clavulansyre		Ampicillin		Trimetoprim	
					
≥ 256 mg/L	≥ 256 mg/L	≥ 256 mg/L	≥ 256 mg/L	1,5 mg/L	1 mg/L
Snitt: ≥ 256 mg/L		Snitt: ≥ 256 mg/L		Snitt: 1,25 mg/L	

Vedlegg E

Tabell E.1 Fullstendig liste over resistensgen funnet ved Illumina Miseq sekvensering

Resistens	Gen	Prøve		
		S1.2	S2.5	S3.1
Aminoglykosid	<i>Aac(6')</i>			X
	APH(3')-IIc	X		
	APH(6)-Ic	X		
β-laktam	<i>ampC</i>		X	X
	<i>bla_{OXA}</i>			X
	<i>blaL1</i>	X		
	<i>blaL2</i>	X		
	<i>cphA</i>			X
	<i>blaFOX-4</i>			X
Fosfomycin	<i>abaF</i>		X	X
	<i>mdtG</i>	X	X	X
Makrolid	<i>macA</i>		X	
	<i>macB</i>		X	
	<i>srmB</i>	X		
Multiresistens efflux-pumpesystem	<i>acrA</i>	X	X	X
	<i>acrB</i>	X	X	X
	<i>tolC</i>	X	X	X
	<i>acrE</i>			X
	<i>arpC</i>	X		X
	<i>ceoB</i>		X	
	<i>emrA</i>	X	X	X
	<i>emrB</i>		X	X
	<i>emrY</i>	X	X	
	<i>mdtA</i>	X	X	X
	<i>mdtB</i>	X	X	
	<i>mdtC</i>	X	X	X
	<i>mdtE</i>			X
	<i>mexA</i>	X	X	
	<i>mexB</i>	X	X	
	<i>oprM</i>	X	X	
	<i>mexD</i>		X	
	<i>oprJ</i>		X	
	<i>mexK</i>	X		
	<i>muxB</i>	X	X	
	<i>muxC</i>	X		
	<i>norM</i>	X	X	X
<i>oqxB23</i>		X		
<i>oqxB9</i>	X			
<i>smeD</i>	X			
<i>smeE</i>	X			
<i>smeF</i>	X			
Bidrar til polymyxin-resistens	<i>arnA</i>			X
Bicyclomycin Sulfonamid	<i>bcr</i>	X	X	X

Puromycin Tosufloxacin Norfloxacin	<i>bmr3</i>		X	X
Daunorubicin Doxorubicin	<i>drrA</i>		X	X
Phenazine	<i>ehpR</i>		X	X
CCCP	<i>emrD</i>			X
Methyl viologen Etidium-bromid Acriflavin	<i>emrE</i>	X	X	
Fosmidomycin	<i>fsr</i>	X	X	
Etmabutol Isoniazid	<i>jefA</i>		X	
Fosfomycin Deoxycholate	<i>mdtG</i>	X	X	X
Norfloxacin Enoxacin	<i>mdtH</i>		X	X
Kloramfenikol	<i>mdtL</i>	X	X	X
Kloramfenikol	<i>mdtN</i>			X
Tigecyklin	<i>mepA</i>	X		X
Spectinomycin Tetracyklin	<i>stp</i>		X	
Mulig	<i>ybhF</i>	X	X	
cefoperazone	<i>ybhS</i>	X	X	X

Vedlegg F

pBLAST av ampC hos *Achromobacter arsenitoxydans*

Achromobacter arsenitoxydans, pBLAST:

ampC proteinet er 99% identisk med (pBLAST):

Class C beta-lactamase [*Achromobacter* sp. MFA1 R4]

Sequence ID: WP_076520218.1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
805 bits(2080)	0.0	Compositional matrix adjust.	394/396(99%)	394/396(99%)	0/396(0%)
Query 1		MNIRRHFCAGVVCAGLLAAVSGPAFGRSELPYIDSVINEAARAVIRQHDIAGMVIAVTHQ		60	
Sbjct 1		MNIRRHFCAGVVCAGLLAAVSGPAFGRSELPYIDSVINEAARAVIRQHDIAGMVIAVTHQ		60	
Query 61		GRQRFPTYGVESLETRRAVNRDTLFEELGSIKTFATLAAYAQAQKGLLALTDSPAKHLPE		120	
Sbjct 61		GRQRFPTYGVESLETRRAVNRDTLFEELGSIKTFATLAAYAQAQKGLLALTDSPAKHLPE		120	
Query 121		LAGTDFAKLTLLNLATHTTGGFPLQVPDAVRDDAQLMQYLKAWKPEHAPGTTTRTYANPSI		180	
Sbjct 121		LAGTDFAKLTLLNLATHTTGGFPLQVPDAVRDDAQLMQYLKAWKPEDAPGTTTRTYANPSI		180	
Query 181		GMLGVATAASMKQPFQAQALEKDLFPKLGLSSTYVNVPAAKASRYAQGYNKQGAPVRVNP		240	
Sbjct 181		GMLGVATAASMKQPFQAQALEKDLFPKLGLSSTYVNVPAAKASRYAQGYNKQGAPVRVNP		240	
Query 241		VLAAEAYGVKSSARDMLRYVEASMDMDVLDKDVRRAIADTHVGYQVGGMTQDMAWEQFP		300	
Sbjct 241		VLAAEAYGVKSSARDMLRYVEASMDMDVLDKDVRRAIADTHVGYQVGGMTQDMAWEQFP		300	
Query 301		YPVALDTLLTANAGNLNSQSHPAKALLPPLAPQADTWINKTGSTNGFGAYVAFVPARKLG		360	
Sbjct 301		YPVALDTLLTANAGNLNSQSHPAKALLPPLAPQADTWINKTGSTNGFGAYVAFVPARKLG		360	
Query 361		IVILANRNYPNEARVRLAAEILGALDKPPA QGRAAR	396		
Sbjct 361		IVILANRNYPNEARVRLAAEILGALDKPPA QGRAAR	396		

Query = ampC proteinet fra stamme_9 (locus_tag="NMBU_Hild9_03201")

Sbjct = WP_076520218.1

pBLAST av *bla*_{FOX-4}, *bla*_{OXA} og *cphA* hos *Aeromonas salmonicida*

BLAST - NCBI resistance ref. database (nBLAST):

GENE	COVERAGE	COVERAGE_MAP	GAPS	%COVERAGE	%IDENTITY
blaFOX-4	23-1149/1149	=====	0/0	98.09	87.49
blaOXA-427	1-795/795	=====	0/0	100.00	85.79
cphA5	1-752/765	=====/=	2/2	98.17	95.35

blaOXA proteinet er 99% identisk med (pBLAST):

Class D beta-lactamase [*Aeromonas salmonicida*]

Sequence ID: WP_021139936.1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
536 bits(1382)	0.0	Compositional matrix adjust.	263/264(99%)	264/264(100%)	0/264(0%)
Query 1		MSRILLPGLLAAGLIFSLPASAASGCMLFADGTGKPISSQDCSSQLPPASTFKIPLALM		60	
Sbjct 1		MSRILLPGLLAAGLIFSLPASAASGCMLFADGTGKPISSQDCSSQLPPASTFKIPLALM		60	
Query 61		GYDSGFLVDENLPALPFKPGDDWLPWRETTPSRWLTYSVWVYSQRLTEWLGMERFQQ		120	
Sbjct 61		GYDSGFLVDENLPALPFKPGDDWLPWRETTPSRWLTYSVWVYSQRLTEWLGMERFQQ		120	
Query 121		YVDRFDYGNRDLAGNPGKHDGLTQAWLSSSLAISPQEQARFLGKMOVSGKLPVSAQTLQHT		180	
Sbjct 121		YVDRFDYGNRDLAGNPGKHDGLTQAWLSSSLAISPQEQARFLGKMOVSGKLPVSAQTLQHT		180	
Query 181		ANILRQPDIDGWQIHGKTGMG H PKLLDGTLNRDQQIGWVFGWASKPGKQLIFVHTVVQKP		240	
Sbjct 181		ANILRQPDIDGWQIHGKTGMG Y PKLLDGTLNRDQQIGWVFGWASKPGKQLIFVHTVVQKP		240	
Query 241		GKQFASLKAKEEVFAALPDQLKKL 264			
Sbjct 241		GKQFASLKAKEEVFAALPDQLKKL 264			

Query = proteinet fra stamme_10

Sbjct = WP_021139936.1

blaFOX proteinet er 98% identisk med (pBLAST):

FOX/MOX family class C beta-lactamase [*Aeromonas salmonicida*]

Sequence ID: WP_113720114.1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
762 bits(1968)	0.0	Compositional matrix adjust.	373/382(98%)	377/382(98%)	0/382(0%)
Query 1		MEKATTRSLLVLSTLLLSPLSHAKEAEPLTA L VDG T IQPLLKEHRVPGMAVAVLKEGKA H		60	
Sbjct 1		MEKATTRSLLVLSTLLLSPLSHAKEAEPLTA V VDG A IQPLLKEHRVPGMAVAVLKEGKA Y		60	
Query 61		YFNYGVADRESGARVSEQTLFEIGSVSKTLTATLGAYA AVKGGFQLEDKASQHAPWLKGS		120	
Sbjct 61		YFNYGVADRESGARVSEQTLFEIGSVSKTLTATLGAYA AVKGGFQLEDKASQHAPWLKGS		120	
Query 121		AFDGITMAELATYSAGGLPLQFPDEVSTDKMHAYYRQWTPAYPAGTHRQYNSPSIGLFG		180	
Sbjct 121		AFDGITMAELATYSAGGLPLQFPDEVSTDKMHAYYRQWTPAYPAGTHRQYNSPSIGLFG		180	
Query 181		HLAANSLGQPPEQLMSQTLPLKGLHHTYIQVPESAMANYAYGYSKEDKPVV R PGVLAD		240	
Sbjct 181		HLAANSLGQPPEQLMSQTLPLKGLHHTYIQVPESAMANYAYGYSKEDKPVV S PGVLAA		240	

```

Query 241 EAYGIKTGSADLLKFVEANMGYQGDAAVKSAIALTHHTGFHSGVGGMTQGLGWESYAYPVTE 300
Sbjct 241 EAYGIKTGSADLLKFVEANMGYQGDAAV SAIALTHHTGFHSGVGGMTQGLGWESYAYPVTE 300

Query 301 QVLLAGNSPAVSFQANPVTRFAVPKAMGEQRLYNKTGSTGGFGAYVAFVPAKIGIVMLA 360
Sbjct 301 QLLAGNSPAVSFQANPVTRFAVPKAMGEQRLYNKTGSTGGFGAYVAFVPAKIGIVMLA 360

Query 361 NRNYPTEARVKAAHAILSQLAE 382
Sbjct 361 NRNYPTEARVKAAHAILSQLAE 382

```

Query = proteinet fra stamme_10
Sbjct = WP_113720114.1

cphA proteinet er 99% identisk med (pBLAST):

CphA family subclass B2 metallo-beta-lactamase

[Aeromonas salmonicida]

Sequence ID: WP_087757157.1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
520 bits(1339)	0.0	Compositional matrix adjust.	250/253(99%)	253/253(100%)	0/253(0%)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
520 bits(1339)	0.0	Compositional matrix adjust.	250/253(99%)	253/253(100%)	0/253(0%)
Query 1	MKGWIKCGLAGAVVLMASFWGGSVHAAAIISLTQVSGPVYVVEDNYYVKENSMVYFGAKGV				60
Sbjct 2	MKGWIKCGLAGALVLMASFWGGSVHAAAIISLTQVSGPVYVVEDNYYVKENSMVYFGAKGV				61
Query 61	TVVGATWTPDTARELHKLKRVSNKPVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTR				120
Sbjct 62	TVVGATWTPDTARELHKLKRVSNKPVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVSTRQTR				121
Query 121	DLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDDLPLVLPNVVHDGDFSLQEGKLRIFYAGPAHTPDGIFV				180
Sbjct 122	DLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDDLPLVLPNVVHDGDFSLQEGKRVAFYAGPAHTPDGIFV				181
Query 181	YFPDQQVLYGNCILKEKLGNLSFADVKAYPQTLERLKAMKLPKIKIVVGGHDSPLHGPELI				240
Sbjct 182	YFPDQQVLYGNCILKEKLGNLSFADVKAYPQTLERLKAMKLPKIKIVVGGHDSPLHGPELI				241
Query 241	DHYQSLIKAAPQA	253			
Sbjct 242	DHYQSLIKAAPQA	254			

Query = proteinet fra stamme_10
Sbjct = WP_08775715



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway