



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

## **Påvisning av hemolysiner og $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) blant bakterier isolert fra spiseklar salat i Norge**

Detection of hemolysins and extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL and carbapenemases) among bacteria isolated from “ready to eat” (RTE) salad in Norway

**Martine Skaare**

Mastergrad i matvitenskap – matvaretrygghet, kvalitet og hygiene



## FORORD

Denne masteroppgaven utgjør 30 studiepoeng og er skrevet som en avsluttende del av masterstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Arbeidet med oppgaven har foregått fra januar 2020 til juni 2020. Det har vært spennende, tankevekkende og lærerikt å fordype seg i temaet antibiotikaresistens. I tillegg har det vært interessant å undersøke mangfoldet av bakterier som finnes i ferdigvasket salat og egenskapene disse bakteriene har.

Jeg vil takke min veileder professor Bjørn-Arne Lindstedt for sitt engasjement rundt temaet, og for all hjelp med oppgaven. I tillegg vil jeg takke doktorgradsstipendiat Misti Dawn Finton for hjelp og tålmodighet på laboratoriet, samt med alle spørsmål rundt dette arbeidet. Takk til overingeniør Ahmed Abdelghani for gode innspill og veiledning på laboratoriet.

Jeg vil også takke venner og familie og korrekturlesning. Til slutt vil jeg takke mine gode venner og medstudenter Hilde Skår og Stina Cathrin Nautnes for motivasjon og hjelp i denne perioden. Det har vært lærerikt og gøy å jobbe med dere på laboratoriet. De siste månedene har vi vært spredt rundt om i landet, men jeg setter stor pris på diskusjonene vi har hatt digitalt.

Oslo, juni 2020

---

Martine Skaare

## ABSTRACT

**Background:** Antibiotic resistance is a growing problem and a threat to global health. The spread of multidrug-resistant bacteria is a concern, especially human pathogenic bacteria that have extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL). They develop resistance to  $\beta$ -lactam, the most important group of antibiotics. There are bacteria everywhere in the environment, as well as among animals and humans. As a consequence, food can easily be contaminated. It is important to get an overview of the diversity of bacteria in food and whether they are multidrug resistant.

**Purpose:** The purpose of this master thesis was to detect hemolysins and extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL and carbapenemases) among bacteria isolated from RTE-salad in Norway.

**Method:** Various samples of RTE-salad were collected. The samples were diluted and grown on blood agar, as well as the selective agar *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL- and *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE. Bacterial colonies were isolated and extracted for 16S- and multiplex-PCR, where they were screened for ESBL genes. Gel electrophoresis was used to detect resistance genes, and the samples were sequenced by Sanger sequencing. Four samples were submitted for whole-genome sequencing with Illumina MiSeq. A total of six samples were sensitivity tested with MIC for different types of antibiotics.

**Results:** Blood agar growth was observed from all samples, with most colonies having beta-hemolysis. Several of the samples showed phenotypic resistance to antibiotics with the growth of colonies on selective agar. The colonies showed no results by gel electrophoresis after multiplex PCR. Whole-genome sequencing showed which bacteria were in the samples and findings of resistance and virulence genes. Sensitivity testing revealed that the bacteria were resistant to several types of antibiotics and that some bacterial strains were multidrug resistant.

**Conclusion:** Different strains of bacteria from RTE-salad were identified. Several of the bacteria grew with beta-hemolysis on blood agar, which could indicate that they were pathogenic. Colonies grew on selective agar containing antibiotics, indicating that the bacteria were resistant. Whole genome sequencing showed that several of the bacterial strains had genes that encodes resistance to antibiotics, disinfection and metals. The bacteria also had various virulence factors that can cause human disease.



## SAMMENDRAG

**Bakgrunn:** Antibiotikaresistens er et økende problem og en trussel for den globale folkehelsen. Spredningen av multiresistente bakterier er en bekymring, spesielt humanpatogene bakterier som har  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL). De er resistente mot  $\beta$ -laktam, den viktigste gruppen antibiotika som benyttes i dag. Det finnes bakterier over alt i miljøet, samt blant dyr og mennesker, og mat kan lett kontamineres. Det blir viktig å få en oversikt over mangfoldet av bakterier i mat, om disse kan forårsake sykdom og om de er multiresistente.

**Hensikt:** Hensikten med denne masteroppgaven var å påvise hemolysiner og  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser) blant bakterier isolert fra spiseklar salat i Norge.

**Metode:** Det ble samlet inn ulike varianter av spiseklar salat, med og uten tilbehør. Prøvene ble fortennet og dyrket på blodagar, samt de selektive mediene *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL- og *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE agar. Bakteriekolonier ble isolert og ekstrahert for 16S- og multiplex PCR, der de ble screenet for ESBL-gener. Gelelektroforese ble benyttet for å se eventuelle funn av gener, og prøvene ble sekvensert ved bruk av Sanger-sekvensering. Fire prøver ble sendt til helgenomsekvensering med Illumina MiSeq. Totalt seks prøver ble sensitivitetstestet med MIC for ulike typer antibiotika.

**Resultater:** Det ble observert vekst på blodagar fra alle prøvene, der de fleste koloniene vokste med beta-hemolyse. Flere av prøvene viste fenotypisk resistens mot antibiotika med vekst av kolonier på selektiv agar. Koloniene viste ingen utslag ved gelelektroforese etter multiplex PCR. Helgenomsekvensering viste hvilke bakterier som var i prøvene og viste funn av resistens- og virulensgener. Sensitivitetstesting viste at bakteriene var resistente mot flere typer antibiotika, og at enkelte bakteriestammer var multiresistente.

**Konklusjon:** Det ble gjort funn av flere ulike bakterier fra spiseklar salat og tilbehør. Flere av bakteriene vokste med beta-hemolyse på blodagar og kunne være patogene. Kolonier vokste på selektiv agar med antibiotika, noe som indikerte at bakterien var resistent. Helgenomsekvensering viste at flere av bakteriestammene hadde gener som kodet for resistens mot både antibiotika, desinfeksjonsmidler og ulike metaller. Bakteriene hadde også ulike virulensfaktorer som er sett i sammenheng med sykdom hos mennesker.

## FORKORTELSER

AmpC	Ampicillinase C
AR	Antibiotikaresistens
ARB	Antibiotikaresistente bakterier
BHI	Brain Heart Infusion
<i>bla</i>	Gener som koder for betalaktamaser
bp	Basepar
BR	Broad range
CARD	The Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRE	Karbapenemresistente <i>Enterobacteriaceae</i>
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTX-M	Cefotaximase
ddNTP	Dideoksynukleotid trifosfat
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoksynukleotid trifosfat
dsDNA	Double stranded DNA (dobbeltrådet DNA)
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ESAC	European Surveillance of Antimicrobial Consumption
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase ( $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum)
ESBL <sub>A</sub>	Ambler klasse A ESBL
ESBL <sub>KARBA</sub>	ESBL med hydrolytisk aktivitet mot karbapenem
ESBL <sub>M</sub>	Miscellaneous ESBL
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FHI	Folkehelseinstituttet
G <sup>+</sup>	Gram-positiv bakterie
G <sup>-</sup>	Gram-negativ bakterie
Hfr	High frequency of recombination
HGT	Horizontal gene transfer (horisontal genoverføring)
IMP	Imipenem-resistant <i>Pseudomonas</i>
KBM	Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
kde	Kolonidannende enheter
KESC	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> og <i>Citrobacter</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemase
LAB	Lactic acid bacteria (melkesyrebakterier)
LA-MRSA	Livestock associated methicillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
LPS	Liposakkarid

MBL	Metallo- $\beta$ -laktamase
MDR	Multidrug resistant (multiresistent)
MGE	Mobile genelementer
MH	Mueller-Hinton
MH-F	Mueller Hinton Fastidious
MIC	Minimum inhibitory concentration (minimum inhiberingskonsentrasjon)
MLST	Multilocus sekvens typing
mRNA	Messenger-RNA
MRSA	Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
nBLAST	Nukleotid BLAST
NDM	New Delhi metallo- $\beta$ -laktamase
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NORM	Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler
OXA	Oxacillinase
PBP	Penicillin bindende proteiner
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekjedereaksjon)
rMLST	Ribosomal multilocus sekvens typing
RNA	Ribonukleinsyre
RND	Resistance-Nodulation-Division
RTE	Ready to eat (spiseklar)
<i>rps</i>	Ribosome protein subunits (ribosomale protein-underenheter)
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
SHV	Sulfhydryl variabel $\beta$ -laktamase
ssDNA	Single-stranded DNA (enkeltrådet DNA)
TA	Toksin-antitoksin
TAE	Tris-acetat-EDTA
TEM	Temoineira $\beta$ -laktamase
tRNA	Transfer-RNA
TSA	Trypton soya agar
VFDB	The virulence factor database
VIM	Verona integron kodet metallo- $\beta$ -laktamase
VRE	Vancomycinresistente Enterokokker
UVI	Urinveisinfeksjon
WHO	World Health Organization (verdens helseorganisasjon)



# INNHALDSFORTEGNELSE

Forord .....	I
Abstract .....	II
Sammendrag .....	III
Forkortelser .....	IV
1.0 Introduksjon.....	1
2.0 Bakgrunnsteori .....	2
2.1 Antibiotika.....	2
2.1.1 Antibiotikas historie.....	2
2.1.2 Antibiotikatyper .....	3
2.1.3 Virkemåter .....	4
2.1.4 Bruk .....	6
2.2 Antibiotikaresistens.....	8
2.2.1 Seleksjonspress og utvikling av resistens .....	8
2.2.2 Resistensgener .....	9
2.2.3 Resistensmekanismer.....	12
2.2.4 Resistenszymer .....	14
2.2.5 Multiresistens .....	16
2.2.6 Spredning av resistens i samfunnet .....	17
2.2.7 Forekomst av antibiotikaresistente bakterier.....	18
2.2.8 Tiltak mot spredning av antibiotikaresistens .....	20
2.3 Salatens mikrobiologi.....	22
2.3.1 Patogene, matødeleggende og fordelaktige bakterier .....	22
2.3.2 Virulensfaktorer.....	22
2.3.3 Sykdomsutbrudd.....	23
2.3.4 Tidligere funn av antibiotikaresistente bakterier i RTE-salat .....	24
2.4 Metodisk teori .....	25
2.4.1 Fenotypiske metoder.....	25
2.4.2 Molekylærbiologiske metoder.....	27
2.4.3 Sensitivitetstesting av antibiotika .....	30
3.0 Metoder og materialer.....	31
3.1 Oversikt over prosessen og metoder .....	31
3.2 Prøveinnsamling.....	32
3.3 Oppdyrking av bakterier .....	32
3.3.1 Forarbeid .....	32
3.3.2 Blodagar.....	33
3.3.3 ESBL- og CRE-agar .....	33
3.3.4 Oppdyrking i BHI-buljong.....	34
3.4 Isolering og ekstraksjon av DNA .....	34
3.5 Renhetsmåling og kvantifisering av DNA.....	35
3.6 Amplifisering av DNA med PCR.....	35
3.6.1 16S rRNA PCR.....	35
3.6.2 Multiplex PCR.....	37

3.7 Identifisering av DNA/RNA-fragmenter ved agarosegelelektroforese.....	39
3.8 Sekvensering av PCR-produkt.....	40
3.8.1 Rensing av PCR-produkt .....	40
3.8.2 Sanger-sekvensering .....	40
3.8.3 Data-analyse .....	40
3.9 Sensitivitetstesting av antibiotika .....	41
3.10 Illumina MiSeq sekvensering.....	43
<b>4.0 Resultater.....</b>	<b>44</b>
4.1 Fenotypiske resultater .....	44
4.1.1 Påvisning av kolonier på selektive skåler.....	44
4.2 Genotypiske resultater .....	47
4.2.1 Renhetsmåling og kvantifisering .....	47
4.2.2 Påvisning ved gelelektroforese.....	47
4.2.3 Sekvensering.....	48
4.2.4 Sensitivitetstesting av antibiotika .....	53
<b>5.0 Diskusjon .....</b>	<b>56</b>
5.1 Funn av bakterier ved sekvensering og tidligere funn i mat.....	56
5.2 Virulens.....	58
5.2.1 Bakteriernes virulens og patogenitet.....	58
5.2.2 Funn av virulensgener fra bakteriene.....	59
5.2.3 Fenotypisk hemolyse og hemolysiner .....	60
5.2.4 Toksiner .....	61
5.3 Antibiotikaresistens.....	63
5.3.1 Resistens mot $\beta$ -laktam.....	63
5.3.2 Resistens mot fluorokinoloner .....	65
5.3.3 Resistens mot fosfomycin .....	65
5.3.4 Påvisning av multiresistens ved sensitivitetstesting .....	66
5.3.5 Påvisning av multiresistensgener.....	67
5.4 Annen resistens.....	69
5.4.1 Desinfeksjon .....	69
5.4.2 Metaller.....	70
5.5 Øvrige funn .....	70
5.6 Forslag til videre forskning .....	72
<b>Konklusjon .....</b>	<b>74</b>
<b>Referanser .....</b>	<b>75</b>
<b>Vedlegg.....</b>	<b>I</b>
Vedlegg A .....	I
Vedlegg B .....	II
Vedlegg C .....	VII
Vedlegg D.....	X
Vedlegg E .....	XI
Vedlegg F .....	XIII

## 1.0 INTRODUKSJON

Antibiotika blir ansett som en av de viktigste oppdagelsene som er gjort i nyere tid, da middelet har forhindret sykdom og dødsfall verden over (WHO, 2019). Overforbruk blant mennesker og dyr har imidlertid ført til at bakterier har utviklet resistens mot antibiotika. Dette betyr at bakteriene kan leve videre og formere seg, selv etter at de har blitt utsatt for antibiotika som har til hensikt å hemme eller drepe dem. Dersom antibiotikaresistens (AR) blir utbredt, kan ikke lenger enkle infeksjoner kureres. Store operasjoner og cellegift kan også bli vanskelig å gjennomføre uten antibiotika som fungerer optimalt. AR blant humanpatogene bakterier er en stor bekymring, og WHO anser dette som en av de største truslene for den globale helsen.

Blant gram-positive ( $G^+$ ) bakterier er meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en av de største bekymringene, og den første stammen av MRSA ble rapportert i 1961 (Medina & Pieper, 2016). MRSA er et godt eksempel på bakterier med multiresistens (MDR), og infeksjoner med slike bakterier kan være nesten umulig å behandle. De siste årene har flere bakterier utviklet MDR, og blant disse er vancomycinresistente Enterokokker (VRE) (Steinbakk et al., 2014) og karbapenemresistente *Enterobacteriaceae* (CRE) (Medina & Pieper, 2016). Gram-negative ( $G^-$ ) bakterier med enzymer kalt  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL) er også et økende problem. Det er spesielt bakterier fra *Enterobacteriaceae* familien og *Pseudomonas* spp. som har vist å ha slike enzymer. ESBL bryter ned  $\beta$ -laktam antibiotika, som er vanlig å bruke ved en rekke bakterieinfeksjoner (Shaikh et al., 2015).

Ville dyr og miljøet har vist seg å være et reservoar for antibiotikaresistente bakterier (ARB) (Wright, 2010). Slike bakterier kan spres fra miljøet til mennesker gjennom innsjøer, elver og drikkevann (Iredell et al., 2016). De kan også kontaminere maten vi spiser via avlinger, eller ved at de overlever i kjøttprodukter fra dyr som har gjennomgått behandling med antibiotika (CDC, 2013). Det er en bekymring at slike bakterier spres fra miljøet til salat, og videre til menneskers tarmflora, der de kan formere seg og overføre resistensgener til andre bakterier.

«Ready to eat» (RTE) salat som er ferdig vasket og spiseklar, har blitt populært på markedet (Walia et al., 2013). Slike salater kan bestå av en eller flere typer bladsalat, eller de kan ha flere ingredienser som kylling, skinke, ost eller pasta. Det er imidlertid gjort funn av flere bakterier i slike produkter, og flere sykdomsutbrudd har oppstått som følge av patogene bakterier i denne typen salat og tilbehøret. Flere bakterier som er funnet i RTE-salat har vist seg å være

humanpatogene, spesielt for personer med underliggende sykdom eller nedsatt immunforsvar (Koczura et al., 2016). Det vil derfor være viktig å få en oversikt over utbredelsen av AR blant disse bakteriene, samt mekanismer for spredning.

Hensikten med denne studien er å se etter bakterier som er tilstede RTE-salat som selges i Norge i dag. Studien skal undersøke bakterienes virulensegenskaper, inkludert forekomsten av hemolysiner. I tillegg skal bakterienes resistensegenskaper undersøkes ved påvisning av  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL og karbapenemaser).

## **2.0 BAKGRUNNSTEORI**

### **2.1 ANTIBIOTIKA**

#### **2.1.1 ANTIBIOTIKAS HISTORIE**

Antibiotika defineres som «en antimikrobiell forbindelse produsert av en mikroorganisme som hemmer andre mikroorganismer i svært lav konsentrasjon» (Tronsmo, 2016, s.20). Antibiotika betyr «mot liv», og kan deles inn i bakteriostatisk som betyr bakteriehemmende, og bakteriocidal som betyr bakteriedrepende (Yoneyama & Katsumata, 2006). Slike forbindelser kan produseres naturlig av sopp og andre mikroorganismer, eller de kan syntetiseres til medisin (Smith et al., 2015). Antibiotika brukes i hovedsak til å behandle bakterielle infeksjoner, men andre antimikrobielle midler kan benyttes mot mikroorganismer som virus, sopp og parasitter. De mest brukte antibiotikatyperne i medisin er bakteriedrepende (Watson, 2014, s.552). Slike midler skal imidlertid ikke ha noen toksisk effekt på mennesker, da de har liten eller ingen effekt på eukaryote celler.

Antibiotika ble oppdaget i 1928 av Alexander Flemming ved en feil under arbeidet med patogene mikroorganismer (Tronsmo, 2016, s.20). Prøvene ble infisert med soppen *Penicillium notatum* og rundt denne soppen vokste ikke bakteriene. Forbindelsen som soppen produserte kalte han for penicillin, noe som viste seg å inhibere veksten av flere patogene bakterier. Senere gjennomførte Howard Florey og Ernst Chain kliniske tester etter isolering av en *Penicillium*-stamme som produserte store mengder penicillin. Middelet ble tatt i bruk under andre verdenskrig og har siden den gang vært med på å kurere sykdom og redde liv.



Like etter andre verdenskrig ble bakteriers resistens mot Penicillin et problem, og derfor startet utviklingen av nye antibiotikatyper (Ventola, 2015). Fra 1960 til 1980 ble mange nye typer antibiotika introdusert, men etter dette avtok utviklingen. Årsaken anses å være mangel på økonomiske insentiver og utfordrende forskriftskrav, samt at prosessen med å utvikle nye typer antibiotika er svært tidkrevende. Årene mellom 1945 og 1965 kalles «gullalderen» for oppdagelse av antibiotika, og de fleste typene som benyttes i dag ble oppdaget før 1970 (Livermore et al., 2011).

### 2.1.2 ANTIBIOTIKATYPER

Det finnes mange typer antibiotika som klassifiseres og deles inn i underklasser (Davies & Davies, 2010). De ulike klassene har ulike mål for hvordan de skal hemme eller drepe bakterier. Antibiotikatyperne som er relevante for denne studien er oppgitt i tabell 2.1.2. Eksempler på antibiotika i de ulike klassene og angrepsmål er også vist.

*Tabell 2.1.2. Oversikt over antibiotikaklasser og eksempler på antibiotikatyper fra de ulike klassene. Angrepsmål i bakteriene er også oppgitt (Davies & Davies, 2010).*

	<b>Antibiotikaklasse</b>	<b>Eksempel</b>	<b>Mål</b>
<b>β-laktam</b>	<b>Penicilliner</b>	Ampicillin Amoxicillin	Inhiberer celleveggsyntese
	<b>Cefalosporiner</b>	Cefotaxim Cefepim	
	<b>Karbapenemer</b>	Imipenem Meropenem	
	<b>Aminoglykosider</b>	Amikacin Gentamicin Streptomycin	Inhiberer translasjon
	<b>Makrolider</b>	Erytromycin	Inhiberer translasjon
	<b>Fluorokinoloner</b>	Ciprofloxacin	Inhiberer replikasjon av DNA
	<b>Pyrimidiner</b>	Trimetoprim	Blokkerer metabolismeveier
	<b>Kolistin</b>	Polymyxin	Ødelegger cellemembranens funksjon

Cefalosporiner kan videre deles inn etter generasjoner. Første generasjon cefalosporiner er aktive mot G<sup>+</sup> kokker, men har også en liten aktivitet mot G<sup>-</sup> bakterier som *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae* (Percival et al., 2014). Slike cefalosporiner brukes vanligvis mot enklere

og ukompliserte infeksjoner som kan være forårsaket av for eksempel stafylokokker eller streptokokker. Andre generasjon cefalosporiner er mindre aktiv mot G<sup>+</sup> kokker og har større aktivitet mot G<sup>-</sup> baciller enn første generasjon. Cefotaxim inkluderes i tredjegerasjons cefalosporiner. Denne generasjonen har utvidet aktivitet mot G<sup>-</sup> bakterier og kan benyttes til behandling mot infeksjoner av bakterier som er resistente mot første- og andre generasjon β-laktam antibiotika. Fjerde generasjon cefalosporiner inkluderer blant annet cefepim som er et bredspektret antibiotikum. Det er aktivt mot G<sup>+</sup> bakterier som *Staphylococcus aureus* og G<sup>-</sup> bakterier som *Pseudomonas aeruginosa*. Denne generasjonen benyttes ved omfattende infeksjoner hos pasienter som sannsynligvis har sykdom som følge av MDR bakterier (Okamoto et al., 1994). Femte generasjon cefalosporiner er i likhet med fjerde generasjon, bredspektret antibiotika som kan benyttes mot infeksjoner av både G<sup>+</sup> og G<sup>-</sup> bakterier (Zhanel et al., 2009). Slike antibiotikum kan blant annet benyttes mot infeksjoner i huden, og det er sett at den kan ha en effekt mot behandling av hudinfeksjoner med MRSA.

### 2.1.3 VIRKEMÅTER

#### 2.1.3.1 INHIBERER CELLEVEGGSYNTESE

Bakterieceller har et høyt osmotisk trykk grunnet innhold av høye konsentrasjoner av oppløste forbindelser (Tronsmo, 2016, s.52). Celleveggen er derfor viktig for at cellene ikke skal sprekke, og den er komplekst bygd med et makromolekylært nettverk. Nettverket kalles peptidoglukan og består av disakkarider som er bundet sammen med polypeptider. G<sup>+</sup> bakterier har et tykkere peptidoglukanlag enn G<sup>-</sup> bakterier (Yoneyama & Katsumata, 2006). Peptidkjeder blir tværbundet av glycinrester når det er penicillin bindende proteiner (PBP) til stede, noe som styrker celleveggen til bakteriene (Kapoor et al., 2017). β-laktam antibiotika hemmer syntese av celleveggen ved at det etterlikner delen av peptidkjeden der PBP vanligvis binder. Dette medfører at PBP i stedet binder seg til β-laktam ringen, noe som forstyrrer syntesen av nytt peptidoglukan. Dette fører til at bakteriecellen lyses fordi det osmotiske trykket inne i cellen blir for høyt (Tronsmo, 2016, s.253).

#### 2.1.3.2 INHIBERER PROTEINSYNTESE

Proteinsyntese er dannelsen av nye proteiner, og skjer ved at ulike aminosyrer settes sammen i en kjede ved flere trinn (Watson, 2014, s.249). Første trinn er transkripsjon, der et gen fra DNA kopieres til RNA. Siste trinn er translasjon, der RNA overføres til protein. mRNA fungerer som templat for translasjonen og består av tre og tre baser som til sammen danner et kodon som koder for en aminosyre. mRNA fester seg til ribosomer, og hit kommer også tRNA. tRNA har

antikodon som danner basepar med kodon fra mRNA (Watson, 2014, s.514). Ribosomene spiller en viktig rolle i baseparingen, og katalyserer peptidbånd i den voksende polypeptidkjeden (Watson, 2014, s.510). Bakterier har 70S ribosomer, som består av underenhetene 30S og 50S (Kapoor et al., 2017). Når antibiotika inhiberer proteinsyntesen til bakterier, skjer det ved at middelet hemmer translasjonen på ribosomene.

Flere typer antibiotika angriper 50S underenheten (Kapoor et al., 2017). Blant annet kloramfenikol som hindrer at tRNA får bundet seg til A-site på ribosomet. Makrolider og linkosamider har lignende mekanismer og påvirker transllokasjon som skjer tidlig i proteinsyntesen. Dette medfører at uferdige peptidkjeder blir løsrevet. Erytromycin binder seg til 50S-underenheten og hindrer også transllokasjon (Tronsmo, 2016, s.253), og det samme gjør oxazolidinoner (Kapoor et al., 2017).

Aminoglysidene, tetrasykliner og streptomycin angriper 30S-underenheten (Kapoor et al., 2017; Tronsmo, 2016). Aminoglysidene binder seg til ytre cellemembran og lager store porer, noe som medfører at antibiotika kan slippes inn i cellen (Kapoor et al., 2017). Videre binder de nær A-site som medfører feillesing og tidlig terminering av translasjonen av mRNA. Tetrasykliner hindrer innsetting av aminosyrer til den voksende polypeptidkjeden ved at det hindrer binding av tRNA til A-site på 30S-underenheten (Tronsmo, 2016, s.253). Streptomycin fører til feillesing av mRNA ved at den forandrer formen på 30S-underenheten.

### *2.1.3.3 INHIBERER REPLIKASJON OG TRANSKRIPSJON AV DNA*

Kinoloner og rifampin er antibiotika som kan inhibere replikasjon og transkripsjon av bakterieceller (Tronsmo, 2016, s.253). Slike midler er imidlertid lite brukt ettersom det er liten forskjell mellom DNA-replikasjon og transkripsjon i eukaryote og prokaryote celler. Fluorokinoloner er imidlertid en type kinoloner som skiller seg ut (Kapoor et al., 2017). Middelet inhiberer DNA gyrase som er et enzym som splitter dobbeltrådet DNA til enkelttrådet DNA, og sørger for at det ikke kveiler seg under replikasjon og transkripsjon. Til slutt sørger enzymet for å forsegle de splittende endene. I  $G^+$  bakterier angriper fluorokinoloner enzymet topoisomerase IV som deler datter-DNA tråder etter DNA replikasjon. Eukaryote celler i pattedyr har enzymet topoisomerase II som har lav affinitet for fluorokinoloner. Derfor har fluorokinoloner lav toksisitet for eukaryote celler og kan brukes på mennesker.

#### *2.1.3.4 ØDELEGGER CELLEMEMBRANENS FUNKSJON*

Peptidantibiotika forandrer permeabiliteten til membraner (Tronsmo, 2016, s.253). Noen typer virker spesifikt mot prokaryote celler og benyttes derfor som medisin. Eksempler på peptidantibiotika er polymyxin B eller polymyxin E, også kalt kolistin (Zavascki et al., 2007). Begge typene interagerer med liposakkarid (LPS)-laget til G<sup>-</sup> bakterier og tas opp i cellen. Dette medfører forstyrrelser av kalsium og magnesium som stabiliserer LPS. Polymyxiner fører til permeabilitetsendringer i den ytre membranen slik at molekyler kan vandre over membranen, noe som medfører celledød.

#### *2.1.3.5 BLOKKERER METABOLISMEVEIER*

Vekstfaktor-analoger er forbindelser som organismen ikke kan syntetisere selv, men som den er avhengig av (Tronsmo, 2016, s.253). Forbindelsen fungerer ikke i cellen, men likner vekstfaktoren. Eksempler på vekstfaktor-analoger er sulfanilamid og trimetoprim, som begge inhiberer viktige trinn i folsyremetabolisme (Kapoor et al., 2017). Sulfanilamid virker kun på bakterier som syntetiserer folinsyre (vitamin B9) selv (Tronsmo, 2016, s.253). Årsaken til dette er at det erstatter paraaminobenzosyre i folinsyre som er nødvendig i biosyntesen av purin- og pyrimidin. Trimetoprim inhiberer dihydrofolatreduktase og folsyresyntesen på et senere trinn i prosessen (Kapoor et al., 2017). Hver for seg virker sulfanilamid og trimetoprim bakteriehemmende, men sammen er de bakteriedrepende (Yoneyama & Katsumata, 2006).

### **2.1.4 BRUK**

#### *2.1.4.1 MENNESKER*

Antibiotika har bidratt til store fremskritt innen medisin og kirurgi (Ventola, 2015). Middelet har reddet mange liv og økt forventet levealder betraktelig. I utviklingsland reduserer antibiotika sykkelighet og dødelighet, selv om sanitære forhold fortsatt er dårlig. Personer med nedsatt immunforsvar, kroniske sykdommer og kreftpasienter som gjennomgår cellegift, har fått antibiotika for å forhindre og behandle infeksjoner. Bruken av antibiotika er høy, men det antas at halvparten av reseptene som utskrives er unødvendige (Smith et al., 2015). Blant annet utskrives antibiotika for ulike virusinfeksjoner, selv om dette ikke har noen virkning. Antibiotika er utviklet for å drepe bakterier og er tilpasset bakteriers struktur og funksjoner. Virus har andre mekanismer for overlevelse og replikasjon enn bakterier (Tronsmo, 2016, s.232). Behandling med antibiotika mot en virusinfeksjon, som for eksempel forkjølelse, vil derfor ikke ha noen effekt (Tronsmo, 2016, s.256).

Det er vist at mange pasienter ikke fullfører antibiotikabehandlinger de har startet på (Tronsmo, 2016, s.256). Flere sparer også på restene etter antibiotikakuren og bruker den igjen på et senere tidspunkt. Selv om en pasient føler seg frisk, kan det fortsatt være bakterier igjen i kroppen (Zaman et al., 2017). Dersom pasienten velger å ikke fullføre kuren, blir disse bakteriene igjen uberørt og kan utvikle styrke, og videre resistens mot den aktuelle typen antibiotika. Pasienter som sparer på antibiotika og bruker den senere, kan risikere at medisinen er gammel, og kanskje svekket (Chokshi et al., 2019). Det er heller ikke sikkert at personen har bruk for antibiotika og kan derfor bli utsatt for bieffekter uten grunn. I tillegg kan man ende opp med å bruke feil type og dose, noe som kan medføre at det senere blir vanskelig å finne den egentlige årsaken til sykdom. Å bruke antibiotika som har gått ut på dato vil ikke ha noen effekt, og noen typer kan i tillegg få en toksisk effekt etter forbruksdato. Overforbruk av antibiotika kan medføre at «gode» bakterier som er viktig for helsen blir drept. I tillegg kan bruk av rester av antibiotika fra tidligere, hjelpe bakterier til å bli resistente.

Å drepe flere bakterier enn det som er nødvendig kan også skje ved bruk av bredspektret antibiotika (Tronsmo, 2016, s.252). Slike typer benyttes dersom det er usikkert om bakterieinfeksjonen er forårsaket av en  $G^+$  eller en  $G^-$  bakterie. Dersom det er bevist at det for eksempel er en  $G^+$  bakterie som forårsaker sykdom, kan denne behandles ved bruk av en smalspektret type som kun hemmer de  $G^+$  bakteriene. Bredspektret antibiotika dreper i tillegg store deler av normalfloraen i tarmen som er viktig for beskyttelse mot patogene- og andre mikroorganismer.

#### *2.1.4.2 DYR*

Bruken av antibiotika på dyr er svært utbredt og har blitt en viktig del av matproduksjonen (Chowdhury et al., 2009). Rundt 80% av dyrene som benyttes til matproduksjon mottar antibiotika i deler av, eller gjennom hele livet. Det er flere årsaker til dette, blant annet dyrevelferd, hensyn til folkehelsen og økonomi. I tillegg benyttes antibiotika på flere dyr som vekstfremmer.

Behandling og forebygging av bakterielle sykdommer blant husdyr er viktige årsaker til bruken av antibiotika (Gustafson & Bowen, 1997). Forskjellen på bruken av antibiotika på mennesker og dyr er først og fremst at dyr har vanskeligheter med å uttrykke om de er syke, og det kan være vanskelig for en veterinær å se kliniske tegn. I tillegg er det ofte mange dyr på en liten plass, noe som medfører at sykdom kan spres fort. I en grisebesetning er det vanlig å behandle

mange av grisene samtidig og så tidlig i sykdomsforløpet så mulig, for å unngå eventuelle økonomiske tap. I USA er det vanlig å bruke antibiotika for å kontrollere respiratorisk sykdom som kan forekomme når kyr blir utsatt for stress. Dette medfører økonomiske fordeler for produsenten, ettersom det reduserer dødsfall og dyrene gir bedre utbytte grunnet mindre skader.

Etter flere års bruk av antibiotika som behandling og forebygging av sykdom, ble det observert en vekstøkning hos dyrene (Redondo et al., 2014). Veksten til dyrene øker som følge av at antibiotika hemmer enkelte bakterier i fordøyelsen, slik at dyrene legger på seg mer (Tronsmo, 2016, s.256). I USA er det vanlig å bruke antibiotika i fôret til dyr. Fra 1950-tallet har antibiotika blitt brukt for bedre utnyttelse av fôr, økt vekst hos dyrene og dermed også reduserte kostnader for produsenter (Redondo et al., 2014).

Det er flere bekymringer knyttet til bruken av antibiotika på dyr (Thacker, 2013). Kontinuerlig bruk av antibiotika kan medføre at bakterier blir resistente og at de videre kan overføre sine resistensgener til patogene bakterier hos både mennesker og dyr. I tillegg er forbrukerne bekymret for at det er rester av medikamenter i kjøttproduktene de skal spise. Flere land forbyr nå bruk av antibiotika som vekstfremmer og det fokuseres på å finne alternativer. Siden 2006 har det vært ulovlig å bruke antibiotika som vekstfremmer i EU (Redondo et al., 2014). I Norge har en generelle bruken av antibiotika på dyr gått ned, og nedgangen fortsetter fra år til år (NORM/NORM-VET, 2018). Dette gjelder for matproduserende landdyr som gris, storfe og sau, oppdrettsfisk og andre husdyr som hunder og katter.

## **2.2 ANTIBIOTIKARESISTENS**

### **2.2.1 SELEKSJONSPRESS OG UTVIKLING AV RESISTENS**

Når bakterier blir utsatt for antibiotika blir de presset til å tilpasse seg omgivelsene for å overleve (Iredell et al., 2016). Dette kalles seleksjonspress, og medfører at bakteriene kan utvikle resistens og dermed motstå effekten av antibiotika. Resistens er en overlevelsesmekanisme som forekommer naturlig hos bakterier (Tønjum & Otterholt, 2020). Dersom bakterien mangler angrepsmål for antibiotika, har den naturlig resistens, noe som er arvet ved vertikal genoverføring. AR kan også utvikles over tid, noe som kalles ervervet resistens.

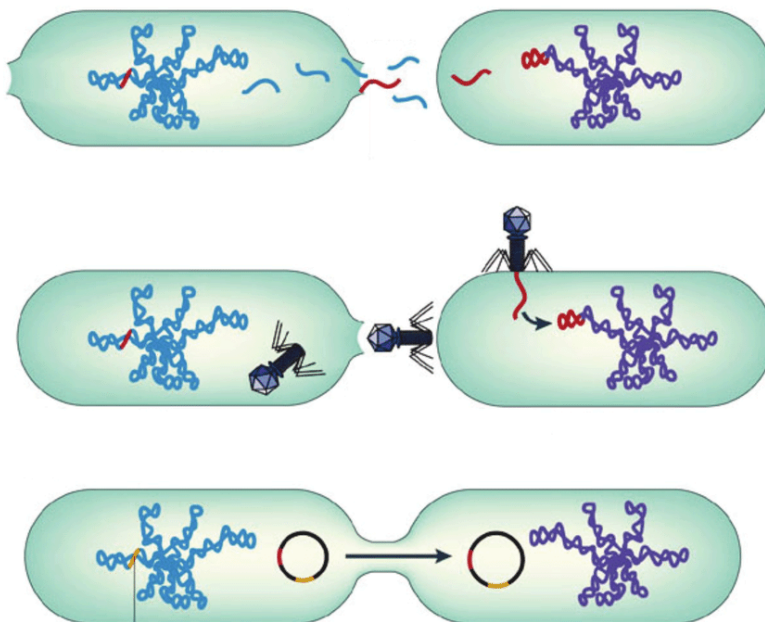
Bruk av antibiotika vil drepe alle bakterier som er mål for den typen som brukes, i tillegg til de «gode» bakteriene som skal hindre infeksjoner i kroppen (CDC, 2013). De eneste bakteriene som overlever er de resistente bakteriene, og disse kan dermed vokse videre. I noen tilfeller kan de også overføre sine resistensgener til andre bakterier, noe som medfører at flere bakterier blir resistente mot antibiotika.

## 2.2.2 RESISTENSGENER

### 2.2.2.1 HORIZONTAL GENOVERFØRING

Bakterier kan bli resistente mot antibiotika gjennom mutasjoner eller ved horisontal genoverføring (HGT) av resistensgener fra andre bakterier, noe som kalles ervervet resistens (Martínez & Baquero, 2014). Mutasjoner er permanente forandringer i basesekvensen til DNA og blir betegnet som en passiv mekanisme for resistens. Årsaken til dette er at mutasjonene koder for endringer i transportører, mål og proteiner som skal aktivere antibiotika. Slike mutasjoner påvirker derfor ikke middelet direkte.

HGT er overføring av gener mellom ulike arter (Tronsmo, 2016, s.150). Genene som overføres blir inkorporert i mottakerens kromosom og blir en del av denne bakteriens DNA. HGT kan skje ved transformasjon, konjugasjon eller transduksjon. Figur 2.2.2.1 viser en oversikt over de tre ulike formene for HGT.



**Figur 2.2.2.1.** Horisontal genoverføring (HGT) mellom bakterier. Viser transformasjon, transduksjon og konjugasjon (Furuya & Lowy, 2006).

Bakterier kan ta opp fritt DNA fra lyserte celler fra fremmede bakterier ved transformasjon, og inkorporere det i eget kromosom (Tronsmo, 2016, s.150-151). Inkorporeringen skjer ved rekombinasjon mellom donor og mottaker, der DNA kan utveksles. Det dannes en såkalt hybrid, som er en bakterie med gener fra en fremmed bakterie.

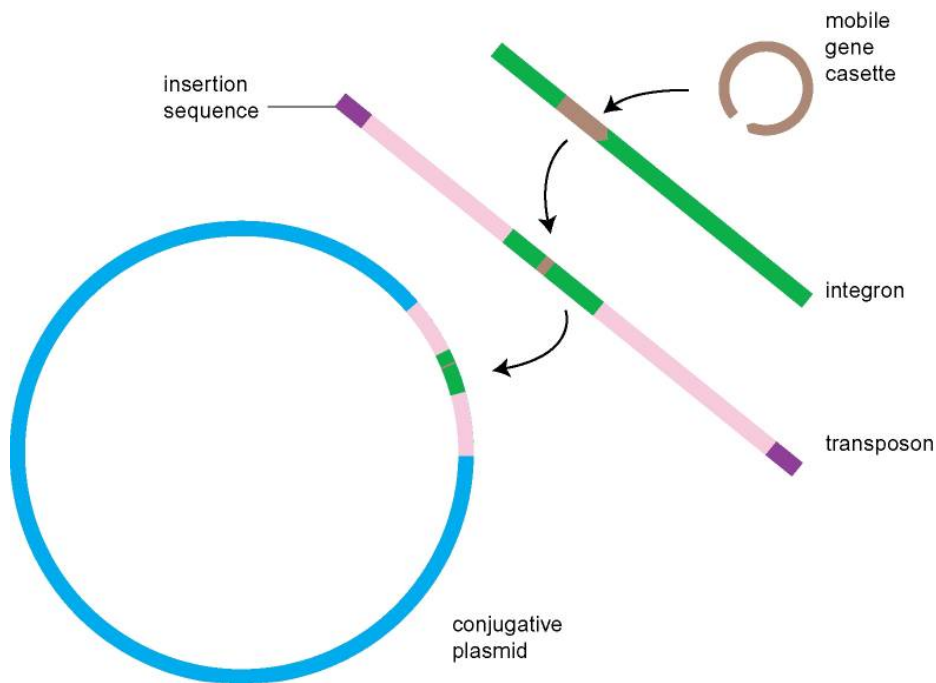
Transduksjon er overføring av DNA med bakteriofager (Tronsmo, 2016, s.153). Bakteriofager er virus som inneholder DNA eller RNA og er omgitt av en proteinkappe. Slike virus kan angripe bakterier, og infisere dem med sitt eget arvemateriale. Når fag-DNA har kommet inn i bakteriecellen kan det enten gå over i lysogen eller lytisk syklus (Tronsmo, 2016, s.239). Ved lysogen syklus integreres fag-DNA i bakteriens kromosom ved rekombinasjon. Videre skjer det mange celledelinger slik at de lysogene bakteriene reproduseres. I noen tilfeller kan fag-DNA frigjøres fra bakteriegenomet og gå inn i lytisk syklus. I den lytiske syklusen blir bakteriens eget DNA kuttet opp og benyttet til å danne nye viruspartikler. I disse samles nytt fag-DNA og virusproteiner. Til slutt sprekker cellene og de nye viruspartiklene frigjøres.

Ved konjugasjon må det være direkte kontakt mellom bakteriene for utveksling av DNA (Tronsmo, 2016, s.152). Bakteriecellene må inneholde ulike plasmider og være av ulike paringstyper. Donorbakterien må ha et F-plasmid, som er et fertilitetsplasmid. Dette plasmidet kan enten forbli som et eget plasmid i mottakercellen, eller det kan inkorporeres i mottakerens hovedkromosom. Dersom plasmidet inkorporeres i hovedkromosomet kalles bakterien Hfr (High frequency of recombination), og konjugasjon kan også skje i denne tilstanden. Da kan hele kromosomet, med F-plasmidet, overføres til en ny mottakercelle. Deler eller hele kromosomet kan overføres, og kan videre integreres i mottakerens kromosom.

#### 2.2.2.2 *MOBILE GENELEMENTER*

Mobile genelementer (MGE) er en viktig årsak til at bakterier kan spre sine resistensgener (Partridge et al., 2018). Slike gener kan fanges opp av andre bakterier, akkumuleres i deres DNA og fungere som en del av den fremmede bakteriens DNA. Begrepet MGE refererer til elementer som fremmer intracellulær DNA-mobilitet, der gener kan overføres fra kromosom til plasmid, eller mellom plasmider. MGE inkluderer innsettingssekvenser som transposoner, genkassetter/integroner, samt plasmider og integrerende konjugative elementer som begge kan overføres mellom bakterieceller. Figur 2.2.2.2 viser en oversikt over de ulike genelementene.





**Figur 2.2.2.2.** Illustrasjon av mobile genkassetter, integroner, transposoner med innsetningssekvenser og konjugative plasmider (Norman et al., 2009).

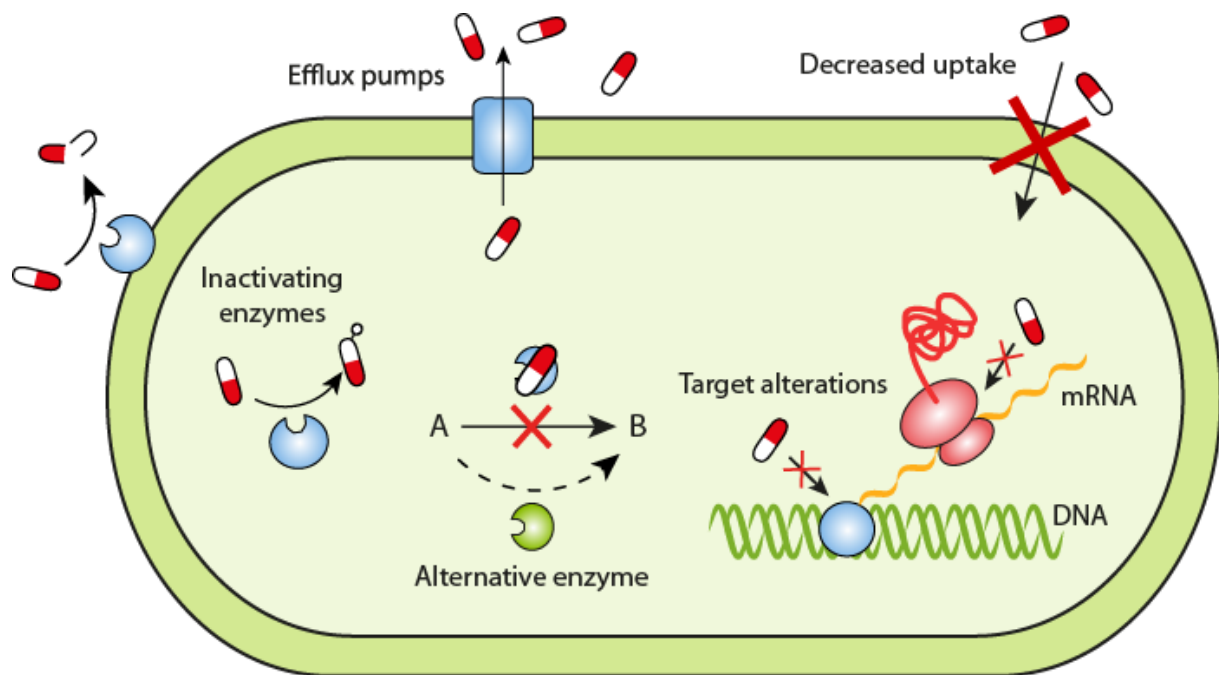
Plasmider er sirkulært DNA som prokaryote organismer, for eksempel bakterier, har i tillegg til kromosomer (Watson, 2014, s.201). Plasmider er vanligvis ikke nødvendig for bakterienes vekst, men kan være bærere av ulike gener, som for eksempel resistensgener mot antibiotika. Konjugative plasmider kan overføre gener horisontalt ved konjugering og har gjort HGT mulig, selv med store taksonomiske avstander (Norman et al., 2009). Resistensplasmider kan bestå av ett eller flere resistensgener med tilhørende mobile elementer i form av transposoner eller integroner (Partridge et al., 2018).

Innsetningssekvenser og transposoner er deler av DNA som kan forflytte seg i kromosomer og integreres i plasmider (Partridge et al., 2018). Transposoner kalles også hoppende gener og kan forårsake mutasjoner når de innsettes i aktive gener (Aarnes, 2017). På hver ende av transposonet er det inverte repeterbare sekvenser, som vil si at de er identiske, men at de leses fra motsatt side. For at transposonet skal bli aktivt må det ha et gen som koder for enzymet transposase som kutter og forflytter transposonet. Transposoner kan være bærere av antibiotikaresistente gener som kan overføres mellom bakteriearter ved direkte kontakt når transposonene er konjugative (Tronsmo, 2016, s.154).

Integroner er ikke MGE i seg selv, men kan plasseres i transposoner og deretter bli en del av et plasmid (Davies & Davies, 2010). Ved spesifikk rekombinasjon kan resistensgener, i form av genkassetter, bli en del av integronene (Norman et al., 2009). Det er vist at integroner er en viktig kilde til de fleste overførbare resistensgener mot antibiotika og at de er kritiske mellompunkter i henting og ekspresjon av slike gener (Davies & Davies, 2010).

### 2.2.3 RESISTENSMEKANISMER

Alle mekanismer av resistens er enten basert på modifisering av målet eller å redusere konsentrasjonen av fritt antibiotika som kan nå målet (Martínez & Baquero, 2014). Det er flere ulike mekanismer for hvordan en bakterie kan bli resistent mot de forskjellige typene antibiotika (Shaikh et al., 2015), og figur 2.2.3 illustrerer ulike resistensmekanismer.



**Figur 2.2.3.** Illustrasjon av ulike resistensmekanismer (Gullberg, 2014). Inkluderer effluxpumper, redusert opptak av antibiotika, inaktivering ved enzymer og endret målsted.

Effluxpumper er en resistensmekanisme som effektivt pumper antibiotika ut av bakteriecellen (Tønjum & Otterholt, 2020). På denne måten oppnås ikke tilstrekkelig konsentrasjon av antibiotika inne i cellen, og bakterien blir ikke hemmet eller drept. Like raskt som antibiotika entrer cellen, vil disse pumpene sørge for at antibiotika pumpes ut igjen (Kapoor et al., 2017). Alle typer antibiotika, med unntak av polymyxin, er mottakelig for denne mekanismen. De fleste effluxpumpene kan pumpe ut et bredt spekter av antibiotika, selv de som ikke er relatert til hverandre. Dette kan bidra til at bakteriene utvikler MDR.

Bakterier kan modifisere angrepsmålet for antibiotika ved at det endrer målmolekyler der antibiotika skal angripe (Tønjum & Otterholt, 2020). Dette kan gjøres ved å tilføre nye typer målmolekyler eller å øke antall av de eksisterende, noe som medfører at antibiotika bindes svakere. En liten endring i målmolekylet kan få store konsekvenser for bindingen av antibiotika, ettersom interaksjonen er svært spesifikk (Kapoor et al., 2017). Endringene kan skje flere steder, og gi konsekvenser for ulike typer antibiotika. Endringer i 30S- eller 50S-underenheten av ribosomer fører til resistens for antibiotika som påvirker proteinsyntesen. Endringer i PBP kan medføre redusert affinitet av  $\beta$ -laktam antibiotika. Noen gener koder for dannelse av nye PBP, noe som medfører at antibiotika ikke kan bindes og dermed blir bakterien resistent. Andre angrepsmål som kan modifiseres og medføre resistens er bindingssteder i celleveggen til bakteriene og mutasjoner i DNA gyrase og topoisomerase IV. I tillegg kan bakterier utvikle ribosomale beskyttelsesmekanismer og mutasjoner i RNA-polymerase.

Cellemembranen til bakterier kan endres på ulike måter slik at den blir mindre gjennomtrengelig for antibiotika (Tønjum & Otterholt, 2020). G<sup>-</sup> bakterier kan for eksempel lukke porer (poriner) i yttermembranen og hindre antibiotika fra å komme frem til målet (Tronsmo, 2016). Disse bakteriene har et utvalg av poriner i den hydrofobe delen av yttermembranen, som er en viktig barriere mot  $\beta$ -laktam antibiotika (Iredell et al., 2016). Bakteriene kan enten lukke poriner eller fjerne de helt. Type og antall poriner medfører ulik resistens blant bakterier.

Bakterier kan produsere enzymer som ødelegger eller endrer antibiotika slik at virkestoffet blir inaktivert og ikke lenger kan utøve sin oppgave (Tønjum & Otterholt, 2020). Inaktivering av antibiotika kan skje på ulike måter, for eksempel ved hydrolyse (Shaikh et al., 2015). Bakterier kan produsere enzymer som målrettet kan hydrolysere mottakelige bindinger i antibiotika. Dette er kjemiske bindinger i form av estere eller amider, og når bindingene spaltes blir antibiotika inaktivert. Enzymet penicillinase er en type  $\beta$ -laktamase som splitter antibiotikamolekylet til en inaktiv form (Tronsmo, 2016, s.256). Enzymet ødelegger  $\beta$ -laktamringen i penicillin, noe som medfører at antibiotikumet blir inaktivert og bakterien blir dermed resistent mot penicillin.

## 2.2.4 RESISTENSENZYMER

### 2.2.4.1 $\beta$ -LAKTAMASER MED UTVIDET SPEKTRUM (ESBL)

Behandling med  $\beta$ -laktam antibiotika er vanlig ved bakterieinfeksjoner, og har ført til økt resistens blant G<sup>-</sup> bakterier over hele verden (Shaikh et al., 2015). Bruken har ført til økt produksjon og mutasjon av  $\beta$ -laktamase enzymer. Disse enzymene blir også kalt  $\beta$ -laktamaser med utvidet spektrum (ESBL), og de bryter ned karbapenem, penicillin og cefalosporiner. ESBL har blitt klassifisert på flere måter, der de to vanligste er molekylær klassifisering av Ambler eller funksjonell klassifisering av Bush-Jacoby-Mederios. Giske et al. har samlet klassifiseringene og forenklet terminologien av  $\beta$ -laktamaser (Giske et al., 2009), og i Norge benyttes denne klassifiseringen som består av ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> og ESBL<sub>KARBA</sub> (FHI, 2019). Bakterier som har ESBL<sub>KARBA</sub> er resistente mot alle typer  $\beta$ -laktam antibiotika, som inkluderer penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer. Bakterier med ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub> er resistente mot penicilliner og de fleste typer cefalosporiner.

I denne studien ble bakterier screenet for ulike ESBL ved bruk av PCR, og klassifiseringen av disse er oppgitt i tabell 2.2.4.1.

**Tabell 2.2.4.1.** Oversikt over ESBL det ble screenet for i denne studien. Viser gruppeinndeling etter ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> (ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>M-D</sub>) og ESBL<sub>KARBA</sub> (ESBL<sub>KARBA-A</sub>, ESBL<sub>KARBA-B</sub> og ESBL<sub>KARBA-D</sub>) (Giske et al., 2009).

ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M</sub>		ESBL <sub>KARBA</sub>		
ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M-C</sub>	ESBL <sub>M-D</sub>	ESBL <sub>KARBA-A</sub>	ESBL <sub>KARBA-B</sub>	ESBL <sub>KARBA-D</sub>
CTX-M	CMY	OXA-ESBL	KPC	IMP	OXA-48
TEM-ESBL				VIM	
SHV-ESBL				NDM-1	

### 2.2.4.2 ESBL<sub>A</sub>

Funksjonelle klasser med 2be  $\beta$ -laktamaser tilhører «klasse A ESBL», også kalt ESBL<sub>A</sub> (Giske et al., 2009). I denne studien ble det screenet for tre ulike gener innenfor denne klassen: CTX-M, TEM-ESBL og SHV-ESBL. Den vanligste genetiske varianten av ESBL er CTX-M (Shaikh et al., 2015). Den hydrolyserer cefotaxim og har blitt funnet i isolater fra *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *E. coli* og fra enkelte andre *Enterobacteriaceae*-arter. Det finnes over 100 ulike varianter av CTX-M som kan deles inn i undergruppene 1, 2, 8, 9 og 23 etter aminosyresekvens. CTX-M forflyttes mellom bakterier ved HGT ved bruk av konjugative plasmider eller transposoner.

TEM- og SHV-ESBL kan deles inn i flere undergrupper. De første og største undergruppene av 2<sup>de</sup>  $\beta$ -laktamaser som har blitt funnet er TEM-1, TEM-2 og SHV-1 (Bush & Jacoby, 2010). Disse enzymene dannes ved aminosyresubstitusjoner, er funksjonelt like, og er de vanligste plasmidmedierte  $\beta$ -laktamasene (Shaikh et al., 2015). TEM-1 kan hydrolysere penicillin og førstegenerasjons cefalosporiner, og ble først isolert fra *E. coli*. SHV familien av  $\beta$ -laktamaser antas å komme fra *Klebsiella* spp., og SHV-1 er isolert fra *K. pneumoniae* over hele verden. SHV-1 er funnet i kromosomer hos *Klebsiella* som videre har blitt overført med plasmider til andre *Enterobacteriaceae* arter. SHV-1 er forbundet med resistens mot flere typer penicillin, og bakterier som har dette enzymet klassifiseres derfor som MDR mot bredspektrede penicilliner.

#### 2.2.4.3 ESBL<sub>M</sub>

ESBL<sub>M</sub> består av plasmidmedierte AmpC og OXA-ESBL og kalles «miscellaneous ESBL» (Giske et al., 2009). Denne klassen deles videre inn i ESBL<sub>M-C</sub> som består av plasmidmediert AmpC, klasse C, og ESBL<sub>M-D</sub> som består av OXA-ESBL, klasse D. Det er kun ESBL<sub>M-C</sub> enzymer som kan påvises ved bruk av fenotypiske metoder, og det antas derfor at mange laboratorier kun vil oppdage disse, og ikke ESBL<sub>M-D</sub>. For å skille plasmidmediert AmpC i *E. coli* fra kromosomal hyperproduksjon av AmpC, må det imidlertid benyttes PCR som er målrettet mot ESBL<sub>M-C</sub>. Kromosomalt AmpC har generelle likheter med PBP og hydrolyserer ampicillin (Iredell et al., 2016). Slike enzymer er ofte funnet i *Enterobacteriales* og *Pseudomonadales*. Høy produksjon av AmpC har blitt observert som følge av tilstedeværelse av et eller flere plasmidmedierte *AmpC*-gener (Bajaj et al., 2016). I tillegg kan det bli store mengder av dette enzymet som følge av hyperproduksjon.

For å påvise ESBL<sub>M-D</sub> må det benyttes genotypiske metoder (Giske et al., 2009). OXA-ESBL, klasse D, er enzymer som hydrolyserer oxacillin (Bajaj et al., 2016). Det er et stort mangfold innenfor denne klassen av enzymer, både genetisk og biokjemisk (Poirel et al., 2010). Det er forskjeller mellom enzymene der noen har et bredt, og andre har et smalt spektrum av hydrolyse. Flere klasser har et utvidet spektrum som følge av punktmutasjon, der kun et nukleotid er byttet ut med et annet.

#### 2.2.4.4 ESBL<sub>KARBA</sub>

Karbapenemaser med hydrolytisk aktivitet mot karbapenem-antibiotika tilhører gruppen ESBL<sub>KARBA</sub> (Giske et al., 2009). Denne gruppen deles videre inn i undergruppene A, B og D. Innenfor ESBL<sub>KARBA-A</sub> finnes *K. pneumoniae* karbapenemase (KPC). Slike gener er ofte funnet på plasmider som er relativt *Klebsiella*-spesifikke, og det er derfor en sterk assosiasjon mellom KPC genet og *K. pneumoniae* stammer (Iredell et al., 2016). KPC er assosiert med høye nivåer av AR i slike stammer.

ESBL<sub>KARBA-B</sub> inkluderer såkalte «metallo  $\beta$ -laktamase» (MBL) enzymer, som «Verona integron kodet metallo  $\beta$ -laktamase» (VIM) og «New Delhi metallo  $\beta$ -laktamase» (NDM) (Giske et al., 2009). VIM forekommer for det meste i *Acinetobacter* og *Pseudomonas*, og noen isolater av NDM er også funnet i slike bakteriestammer (Codjoe & Donkor, 2018). NDM er imidlertid dominerende i isolater fra *K. pneumoniae* og *E. coli*. Imipenem-resistent *Pseudomonas* (IMP) inkluderes også i ESBL<sub>KARBA-A</sub> gruppen. Det er identifisert 18 varianter av dette enzymet, som er undersøkt fra *Enterobacteriaceae* familien og arter av *Acinetobacter* og *Pseudomonas*.

OXA-48 tilhører ESBL<sub>KARBA-D</sub> (Giske et al., 2009), og er en vanlig og mangfoldig gruppe enzymer som hydrolyserer  $\beta$ -laktam (Iredell et al., 2016). Slike enzymer er vanlig å finne hos *K. pneumoniae* (Codjoe & Donkor, 2018), men er også identifisert i *Enterobacteriaceae* familien (Bush & Jacoby, 2010). Gener for OXA-48 enzymet er plassert på plasmider, og kan derfor enkelt overføres mellom bakterier.

#### 2.2.5 MULTIRESISTENS

Bakterier som er resistente mot tre eller flere antimikrobielle klasser defineres som MDR (Magiorakos et al., 2012). En klasse antibiotika kan være for eksempel aminoglykosider, fluorokinoloner eller makrolider.  $\beta$ -laktam antibiotika som penicillin, cefalosporiner og karbapenem defineres også som tre ulike klasser av antibiotika. Dersom en bakterie er resistent mot en type antibiotika fra hver av disse klassene, kan den defineres som MDR.

Bakterier kan utvikle MDR på ulike måter (Nikaido, 2009). I én celle kan bakterier akkumulere flere ulike gener som koder for resistens mot ulike typer antibiotika. Mange resistensgener er effektive når de uttrykkes fra plasmider, og akkumuleringen av gener skjer ofte på resistensplasmider. På ett plasmid kan det finnes gener som koder for flere typer resistens. Slike

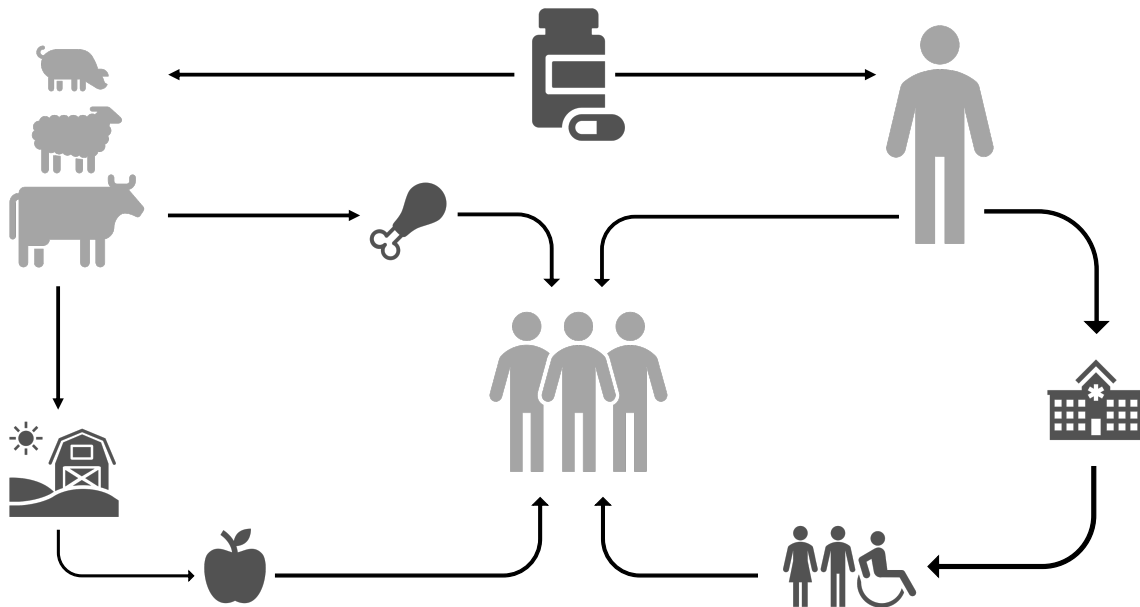
plasmider kan ofte enkelt transporteres mellom bakterier, og dette bidrar til spredningen av resistensgener mellom bakterier. En annen mekanisme for MDR er økt ekspresjon av gener som koder for multiresistens-effluxpumper. Slike pumper kan pumpe et bredt spekter av antibiotika ut av bakteriecellen. G<sup>-</sup> bakterier kan ha spesielle pumper som kalles for «Resistance-Nodulation-Division» (RND) multiresistens-effluxpumper. Slike pumper kan pumpe ut det meste av antibiotika som i dag benyttes, og kan overuttrykkes fordi de vanligvis blir kodet av kromosomgener.

Humanpatogene mikroorganismer har tilegnet seg resistente egenskaper (Medina & Pieper, 2016). Flere av disse har utviklet MDR og infeksjoner forårsaket av slike bakterier kan være umulig å behandle. Blant de viktigste og mest kjente i dag finnes MRSA, CRE, og bakterier med produksjon av ESBL.

#### **2.2.6 SPREDNING AV RESISTENS I SAMFUNNET**

Spredningen av ARB til mennesker kan skje på flere måter, som vist i figur 2.2.6. Spredningen mellom mennesker kan skje dersom en person får antibiotika og utvikler resistente bakterier inne i magesekken (CDC, 2013). Denne personen kan videre spre de resistente bakteriene til andre mennesker i samfunnet. Dersom personen har et opphold på sykehus, sykehjem eller liknende, kan de resistente bakteriene enten spres direkte til andre pasienter og ansatte, eller indirekte via overflater på sykehuset. Når de andre pasientene drar hjem fra sykehuset, kan også de spre resistente bakterier videre i samfunnet.

Spredningen av ARB til mennesker kan også komme fra dyr (CDC, 2013). Resistente bakterier kan utvikle seg i dyrenes mage når de mottar behandling med antibiotika, og disse bakteriene kan bli gjenværende i kjøtt som mennesker spiser. Dersom kjøttet ikke er tilstrekkelig varmebehandlet kan bakteriene overleve og spres til mennesker. Ved bruk av gjødsel eller vann som er forurenset med feces fra dyr, som inneholder ARB, kan disse spres videre til avlinger og mat, og videre til mennesker.



**Figur 2.2.6.** Illustrasjon av spredningen av antibiotikaresistente bakterier i samfunnet, ved bruk av antibiotika blant dyr og mennesker.

Ved bruk av antibiotika i landbruket kan resistente bakterier spres til innsjøer, elver og drikkevann (Iredell et al., 2016). Dersom mennesker bader i vann med resistente bakterier og får en infeksjon i et sår eller svelger vann med slike bakterier, kan det blir vanskelig å behandle infeksjonen. Bakteriene kan også spres fra elver og lignende til gjødsel, ville dyr og avlinger. På denne måten kan de igjen spres til husdyr og mennesker.

## 2.2.7 FOREKOMST AV ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIER

### 2.2.7.1 OVERVÅKNING AV ANTIBIOTIKARESISTENS

Det er viktig å overvåke bruken av antibiotika og utviklingen av AR (Zarb & Goossens, 2011). AR er et globalt helseproblem og bruken av antibiotika har fått konsekvenser for pasienter og hele samfunnet. I USA har «Centers for Disease Control and Prevention» (CDC) en oversikt over forekomsten av AR (CDC, 2013). I Europa finnes «European Surveillance of Antimicrobial Consumption» (ESAC) som overvåker forbruket av antibiotika, der totalt 34 nasjoner deltar.

Norge har en egen funksjon som overvåker dyr- og menneskers helse, i tillegg til matproduksjonen (NORM/NORM-VET, 2018). Overvåkningsprogrammet NORM følger med på forekomsten av antimikrobiell resistens blant humanpatogene bakterier, og NORM-VET overvåker forekomsten av AR blant dyr, mat og fôr. Folkehelseinstituttet (FHI) i Norge har



oversikt over smitte med patogene bakterier og enkelte mikrober som er kjent for å ha resistens (Steinbakk et al., 2014). Flere slike bakterier er meldepliktige til meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS), slik at FHI kan ha en oversikt over forekomsten av resistens i Norge.

#### 2.2.7.2 ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIER I SAMFUNNET

På verdensbasis øker spredningen av AR, og dette har blitt en global utfordring som tar mange liv (Tønjum & Otterholt, 2020). Stadig flere infeksjoner som tuberkulose og lungebetennelse blir vanskeligere å behandle som følge av at bakterier blir resistente mot antibiotika. I tillegg kan ulike matbårne infeksjoner bli vanskelig å behandle, som følge av at de patogene bakteriene har blitt resistente mot de antibiotikatyperne vi har i dag. Uten antibiotikabehandling kan slike sykdommer medføre dødsfall. I Europa dør det hvert år 33.000 mennesker som følge av ARB, og i USA er det omtrent 23.000 menneskeliv som går tapt av samme årsak (CDC, 2013).

Problemer med AR er økende i Norge, selv om forekomsten er lavere her sammenlignet med andre land (Steinbakk et al., 2014). Det er vist økt resistens mot  $\beta$ -laktam, aminoglykosider og fluorokinoloner. I Norge har det vært utbrudd med ESBL (ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub>) og MRSA, og det er gjort funn av VRE. Funn av G<sup>-</sup> bakterier med ESBL<sub>KARBA</sub> ble meldepliktig til MSIS for noen år siden. Resistens mot karbapenem, en gruppe bredspektret  $\beta$ -laktam antibiotika, er bekymringsverdig ettersom slik antibiotika i hovedsak benyttes ved alvorlige infeksjoner hos mennesker. Flere G<sup>-</sup> bakterier som har vist resistens mot karbapenem, og er nå utbredt globalt. I Norge er det foreløpig lav forekomst av bakterier som er karbapenemresistente.

#### 2.2.7.3 ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIER I MILJØET

Det er vist at miljøet er et reservoar for resistente organismer og deres gener (Wright, 2010). Dyr er en del av miljøet vi lever i, og det er isolert ARB fra flere ulike dyr. Ville dyr og fugler kan være reservoar for ARB og bidra til at de spres rundt i miljøet. En undersøkelse gjort på villrein og rådyr i Norge viste at det var generelt lav forekomst av antibiotikaresistent *E. coli* (Sunde et al., 2018). Det ble påvist noe resistens mot streptomycin, og årsaken til dette var usikker. I tillegg ble det isolert *E. coli* som var resistent mot tredjegerasjons cefalosporiner som følge av genet CTX-M-1, noe som ble isolert fra både rådyr og rødrev. Undersøkelsen konkluderte med at det finnes bakterier som er resistente mot viktige antibiotikatyper, selv i områder der seleksjonspresset er lavt.

Forekomsten av ARB blant produksjonsdyr er generelt lavere i Norge enn i mange andre land (Steinbakk et al., 2014). Klima, små besetninger og begrenset import av dyr, kan være faktorer som medvirker til den lave forekomsten. Det er imidlertid påvist ESBL-produserende *E. coli* i fjørfeproduksjon og LA-MRSA (livestock associated MRSA) hos produksjonsdyr i Norge.

ARB kan spres fra mennesker og dyr til miljøet, men naturlig miljø kan også være en kilde til spredning (Allen et al., 2010). Miljøet får økt eksponering av antibiotika ved utslipp fra kloakk og gjødsel. Sammen med eksponering av antimikrobielle midler som forekommer naturlig, kan seleksjonspresset bli høyt og bakteriene kan utvikle resistens. Over hele Europa er det funnet mye antibiotika i akvatiske miljøer, noe som kan bidra til utbredelse av AR blant bakterier (Carvalho & Santos, 2016). Det har til nå vært lite kunnskap om hvor utbredt ARB er i miljøet i Norge, men studier ved NMBU har funnet ARB i prøver fra vann og jord. I Ås er det funnet multiresistente *E. coli*- og *K. Pneumoniae*-stammer som var bærere av blant annet CTX-M-15, SHV-11, TEM-1B, CMY-42 og TEM-84 (Finton et al., 2020, innsendt manuskript). Det ble også funnet ESBL-produserende G<sup>-</sup> bakterier i prøver fra jord (Støle, 2017). Tilstedeværelse av ARB i miljøet er en bekymring for videre spredning til mennesker, enten direkte via vann, eller indirekte fra dyr og planteprodukter (Carvalho & Santos, 2016).

### **2.2.8 TILTAK MOT SPREDNING AV ANTIBIOTIKARESISTENS**

Det er flere tiltak som kan redusere spredningen av AR, og det vil det være viktig å bremse utviklingen av resistens blant bakterier (Smith et al., 2015). Først og fremst er det viktig å hindre sannsynligheten for at en patogen organisme blir utsatt for resistensgener, enten ved naturlig mutasjon eller ved HGT. FHI foreslår forskrifter for bruk av antibiotika blant mennesker og at det er nødvendig å få en oversikt over hvor mye og hvilke typer antibiotika som benyttes (Steinbakk et al., 2014). CDC mener også at det bør være strengere regler for utskriving av antibiotika til pasienter, og at bevisstheten blant forbrukere bør økes (CDC, 2013). Det er ulike regler og normer for bruk av antibiotika på forskjellige steder i verden, og det bør bli en global bevissthet rundt bruken av antibiotika og spredningen av resistens.

Bruk av antibiotika i landbruket og på dyr bør reduseres for å unngå spredning av ARB blant husdyr og i miljøet (Steinbakk et al., 2014). FHI foreslår at forskriften for bruk av legemidler bør endres og at det bør utvikles nasjonale retningslinjer for bruk av antibiotika til produksjonsdyr. Veterinærer bør ha ansvar for å vurdere risikoen for resistens og bruke grundigere analyser for å finne ut hvilken bakterie dyret er smittet av, for så å kunne velge en

smalspektret antibiotikatype. Det er viktig at både veterinærer og dyreholdere tar ansvar og blir mer bevisste når det kommer til bruk av antibiotika blant dyr.

CDC mener at det er viktig å fremme utviklingen av nye typer antibiotika og diagnostiske tester som med sikkerhet kan fortelle hvilken bakterie som har forårsaket infeksjon (CDC, 2013). Det er også viktig å forbedre antibiotikatyperne som allerede eksisterer. Det vil også være viktig å utvikle vaksiner som kan motvirke sykdom, både for husdyr og mennesker (Steinbakk et al., 2014). Utviklingen av vaksiner mot pneumokokker har vært vellykket og gitt håp for utviklingen av nye vaksiner (Davies & Davies, 2010). Det er håp om å utvikle effektive vaksiner mot infeksjoner med bakterier som *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus* og *Acinetobacter*. Slike vaksiner vil være spesielt viktige for mennesker i utviklingsland der sanitære forhold er dårlig (Steinbakk et al., 2014). Å bedre sanitære forhold vil også bidra til reduksjon av infeksjoner, og vil være et viktig tiltak for å forebygge spredningen av ARB (CDC, 2013).

Andre alternative behandlinger til antibiotika kan også benyttes, men det er behov for videre forskning (Iredell et al., 2016). Bruk av lytiske bakteriofager er foreslått som et supplement til antibiotika. Det kreves vanligvis en blanding av bakteriofager for å overvinne resistens, men de er svært målspesifikke og har en synergisk effekt sammen med antibiotika. CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) er en genteknologisk metode som kort fortalt benytter bakteriofager til å angripe resistensgener og gjør at bakteriene blir sårbare for antibiotika igjen.

Det må bli mer ettertraktet å jobbe med utviklingen av antibiotika og hvordan vi kan hindre spredning av resistens (O'NEILL, 2016). Dette kan innebære bedret lønn og anerkjennelse til personer som arbeider med dette. For å få en forståelse av hvor utbredt ARB er i ulike miljøer, mener FHI at det blir viktig å kartlegge reservoar for slike bakterier (Steinbakk et al., 2014). Videre blir det viktig å eliminere disse bakteriene fra sine reservoarer. Det er viktig å kunne spore tilbake hvor bakteriene kommer fra og dermed kunne hindre spredning eller stoppe utviklingen der de er funnet (CDC, 2013).

## **2.3 SALATENS MIKROBIOLOGI**

### **2.3.1 PATOGENE, MATØDELEGGENDE OG FORDELAKTIGE BAKTERIER**

Bakterier finnes over alt og bakterier fra mat kan være sykdomsfremkallende (patogene), matødeleggende eller fordelaktige (Bhunia & Heldman, 2018, s.2). Fordelaktige bakterier er generelt trygge for mennesker og kan for eksempel benyttes til konservering av mat. Mikroorganismer kan også produsere fordelaktige enzymer som hjelper til med å bryte ned maten og gjøre den enklere å fordøye. De fordelaktige bakteriene kan benyttes til fermentering, som bidrar med blant annet smak og tekstur, og kan øke holdbarheten til enkelte produkter. Ukontrollert vekst av naturlige fermentative mikroorganismer kan imidlertid føre til at maten ødelegges. Matødeleggende bakterier fører til dårlig lukt, smak og utseende på mat. Slike bakterier har enzymer som bryter ned proteiner, karbohydrater og fett til andre komponenter som kan ødelegge maten. Patogene bakterier medfører ikke bare dårlig lukt og smak av mat, men kan også føre til sykdom hos mennesker.

Bakterier forekommer naturlig på overflaten av planter (Bhunia & Heldman, 2018, s.10). De humanpatogene bakteriene som er isolert fra jord, vanningsvann og ville dyr inkluderer blant annet *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, og *Listeria monocytogenes*. Salat kan kontamineres med patogene mikroorganismer direkte fra mennesker ved gjødsling eller ved at det benyttes vann som er forurenset med kloakkvann (Adams & Moss, 2008, s.304). I tillegg kan ville dyr og husdyr være med på spredningen av slike mikroorganismer (Bhunia & Heldman, 2018, s.10). Etter høsting kan kontaminering skje fra mennesker som arbeider med salaten eller fra konsumentene selv. Det kan også være patogene bakterier på overflater og utstyr under transport, prosessering eller pakking. Det er ekstra viktig med gode rutiner innen landbruket, ettersom salat ikke varmebehandles før konsum (Adams & Moss, 2008, s.156).

### **2.3.2 VIRULENSFAKTORER**

Mikroorganismers evne til å fremkalle sykdom kalles virulens (Klein, 2020). Det finnes flere ulike virulensfaktorer som kan medføre sykdom, inkludert bakteries evne til å feste seg til overflater og til å spre seg, samt produksjon av toksiner og evnen til å ødelegge andre celler. Den viktigste delen av en bakteries virulens er dens evne til å trenge inn i en vert og utøve skade. Graden av virulens kan måles ved enten hvor raskt infeksjonen sprer seg i kroppen og hvor

dødelig infeksjonen er, eller hvor mange i befolkningen som blir syke dersom de utsettes for mikroorganismen.

Det finnes genetiske elementer som kalles toksin-antitoksin (TA) systemer (Unterholzner et al., 2013). Slike systemer består av et toksin i form av proteiner, og et tilhørende antitoksin, som enten kan være proteiner eller ikke-kodende RNA. TA-toksiner er involvert i cellulære prosesser som translasjon, replikasjon og biosyntese av celleveggen. Noen TA-systemer kan kode for proteiner med adaptive funksjoner og blir da sett i sammenheng med utvikling av AR. Hovedfunksjonen til slike systemer er å bevare plasmider (Lobato-Márquez et al., 2016). Dersom resistensgener befinner seg på et plasmid med et TA-system vil derfor bakterien bevare plasmidet og dermed også resistensgenene. Toksinet fungerer som en slags gift og er stabilt, og antitoksinet er labilt og fungerer som en motgift. Dersom begge er tilstede vil antitoksinet nøytralisere toksinet. Plasmidet kan forsvinne fra bakterien og ta med seg motgiften, og dermed etterlate det stabile toksinet som medfører at bakterien dør.

Humanpatogene bakterier fester seg til overflaten av salat ved adheranse, ved bruk av sine fimbrier, pili og flageller (Bhunia & Heldman, 2018, s.10). De festes ekstra godt til sprekker og lignende på overflaten, der de i tillegg kan gjemme seg fra eventuell vask og behandling av salaten. Vask med rent vann har vist å redusere kontaminanter (Adams & Moss, 2008, s.156), og det er denne behandlingen ferdigvasket salat gjennomgår før den pakkes og selges kjølig. Det er imidlertid usikkert om behandlingen medfører tilstrekkelig reduksjon av mikroorganismer (Walia et al., 2013).

### **2.3.3 SYKDOMSUTBRUDD**

Antall sykdomsutbrudd som følge av patogene bakterier i salat er økende, og bakterier som *Salmonella*, shigatoksin-produserende *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* og *L. monocytogenes* er forbundet med slike utbrudd (Söderqvist, 2017). I USA har det de siste årene vært flere utbrudd av sykdom som følge av patogene bakterier som kan være ingredienser i RTE-salat (Bhunia & Heldman, 2018, s.9). I 2011 var det et utbrudd der 60 personer ble smittet med *E. coli* O157:H7 fra salat. Denne bakterien ble også funnet i spinat ved et sykdomsutbrudd i 2006 der 199 mennesker ble smittet. Kylling var også årsaken til to utbrudd av sykdom i 2002 og 2014, der henholdsvis *L. monocytogenes* og *Salmonella* ble isolert fra kyllingen. Ved utbruddet i 2002 ble 46 mennesker syke og 7 døde som følge av smitten, og i 2014 var det hele 634 personer som ble syke. I Norge var det et stort sykdomsutbrudd i 2014 der 133 ble syke

som følge av *Y. enterocolitica* som ble isolert fra salat (FHI, 2014). *Yersinia* har også ført til flere sykdomsutbrudd fra svinekjøttprodukter. *E. coli* har blitt isolert fra ulike kjøttprodukter og *Campylobacter* fra fjørfekjøtt, og alle har medført sykdomsutbrudd i Norge.

#### **2.3.4 TIDLIGERE FUNN AV ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIER I RTE-SALAT**

RTE-salat, er salat som er ferdig vasket og klar til å spises (Söderqvist, 2017). Den kan bestå av flere typer salat, og i noen tilfeller også andre ingredienser som ulike grønnsaker, kjøtt og ost eller pasta. Slike typer salater har flere kilder til kontaminering av bakterier, ettersom de består av flere ingredienser. Kjøttprodukter og pasta varmebehandles før pakking, og det er viktig at denne behandlingen, samt nedkjøling, er tilstrekkelig for å unngå overlevelse av patogene bakterier. Patogene bakterier kan overføres til både salat og andre ingredienser ved kutting og behandling av produktene, før pakking.

Flere studier har undersøkt forekomsten av patogene bakterier og ARB i RTE-salat (Walia et al., 2013). Det er gjort funn av patogene bakterier i slike produkter og navnet «ferdigvasket og spiseklar» kan derfor være misvisende. Funn av ARB i RTE-salat er en bekymring, da dette medfører en risiko for at mennesker kan bli smittet med ARB ved konsum av slike produkter.

En studie som undersøkte RTE-baby spinat fant stammer av *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Acinetobacter* og *Pseudomonas* (Walia et al., 2013). Studien påpeker at det har vært en økning i antall sykdomsutbrudd som følge av økt forbruk av denne typen salat. Bakteriene ble sensitivitetstestet for ulike typer antibiotika, og det ble funnet resistens mot alle typene det ble testet for. Kinoloner hadde laveste forekomst av resistens der 19,8% av bakteriene var resistente, mens hele 93,1% av bakteriene var resistente mot en type  $\beta$ -laktam kalt cefoxitin. Flere av bakteriene var multiresistente, da de viste resistens mot tre eller flere klasser av antibiotika.

I Spania ble det gjennomført en studie som undersøkte forekomsten av patogene bakterier i RTE-salat og om de var resistente mot antibiotika (Falomir et al., 2010). Studien viste at de fleste isolatene var resistente mot ampicillin og amoxicillin. Det var flere bakterier som var multiresistente, enn antall bakterier som var mottakelige for alle de elleve antibiotikatyperne de ble testet for. Flere av bakteriene var opportunistiske humanpatogene, som kan medføre sykdom hos mennesker.

En studie gjennomført i Portugal konkluderte med at RTE-salat generelt var av dårlig mikrobiologisk kvalitet (Campos et al., 2013). 50 prøver med ulike blandinger av RTE-salat var inkludert i studien. Det ble isolert både *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* og *Enterococcus* fra prøvene, der både *E. coli* og *Enterococcus* var antibiotikaresistente. Det ble også funnet multiresistents hos *E. coli* stammer i flere av prøvene. Disse stammene inkluderte gruppen D/ST69 som er observert ved ekstraintestinale infeksjoner. Flere resistensgener ble funnet i RTE-salaten, blant annet *bla<sub>SHV-2</sub>*.

I Italia ble det gjennomført en studie som undersøkte matvarer for *Enterococcus* arter (Pesavento et al., 2014). Studien inkluderte blant annet 214 RTE-salater, 187 prøver av skinke og 278 prøver av ost. Det ble funnet *Enterococcus* i alle matvarene som ble undersøkt, og flere ulike arter ble isolert. Isolatene ble sensitivitetstestet for ti ulike antibiotikatyper. 30% var resistente mot én type antibiotika, og 11,5% var multiresistente.

## 2.4 METODISK TEORI

### 2.4.1 FENOTYPISKE METODER

#### 2.4.1.1 HEMOLYSEAKTIVITET PÅ BLODAGAR

Blodagar er et vekstmedium som kan brukes i vanlig diagnostikk av bakterier (Tønjum, 2019). Agaren inneholder normalt 5% blod fra pattedyr og kan brukes til å se etter bakteriers hemolyseaktivitet. I denne oppgaven ble trypton soya agar (TSA) med saueblod benyttet, og agarskålene ble inkubert aerobt ved 37°C +/- 1°C i 18-24 timer. (Remel & Oxoid, 2008). Kombinasjonen mellom proteiner og karbohydrater fra soya i denne agaren medfører optimale vekstforhold for mange typer bakterier. Berikelse av mediet med blod fører til at bakterier som *Streptococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *E. coli* og *Pseudomonas* kan vokse med hemolytisk aktivitet.

Hemolyse er ødeleggelse av røde blodceller, og noen bakterier produserer enzymer som lyserer slike celler (Tille, 2015). Dette kan ses i blodagar, der det oppstår en hemningssone rundt bakteriekoloniene som vokser. Det finnes ulike typer hemolyse. Fullstendig klarning rundt koloniene som dannes kalles beta-hemolyse. Generelt er det kjent at bakterier som produserer beta-hemolyse kan være patogene (Sum et al., 2017). Andre typer hemolyse som kan dannes er alfa-hemolyse eller gamma-hemolyse (Tille, 2015). Dersom det kun er delvis lysing av blodcellene, kan det dannes en grønnaktig farge rundt koloniene, og dette kalles alfa-hemolyse.

Noen bakterier har ingen effekt på de røde blodcellene, og produserer ingen hemningssone rundt koloniene. Dette kalles gamma-hemolyse, og bakterien er ikke-hemolytisk.

#### 2.4.1.2 DETEKSJON AV ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIER

For fenotypisk deteksjon av ARB kan selektive medier benyttes (Adams & Moss, 2008, s.375). Slike medier inneholder forbindelser som inhiberer de fleste organismer. Dersom et medium inneholder antibiotika vil det vanligvis hemme veksten av bakterier. Dersom bakterien kan vokse på et slikt medium, kan det indikere at den er resistent, ettersom den vokser i et miljø som har til hensikt å stanse veksten av bakterien. Det finnes ulike typer medier for påvisning av ARB, deriblant *Brilliance*<sup>TM</sup> ESBL-, *Brilliance*<sup>TM</sup> CRE- og *MRSASelect*<sup>TM</sup> II-skåler som ble benyttet i denne studien. Resultatet fra de ulike mediene kan brukes til fargescreening, og fenotypiske resultater kan anslås.

ESBL agar benyttes for deteksjon av ESBL-produserende organismer, innen 24 timer (Oxoid, 2010). Ut ifra resultatene kan man anta om det er ESBL-produserende *E. coli* eller *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. og *Citrobacter* spp. (KESC-gruppen) tilstede. Agaren har høy grad av følsomhet for påvisning av ESBL-produserende *Enterobacteriaceae*, samtidig som det selektivt hemmer AmpC-resistensmekanismer. Skålene inkuberes ved 37°C i 18-24 timer, og negative skåler kan reinkuberes i nye 24 timer. Ved vekst av blå eller rosa kolonier kan det antas at det er *E. coli* som er tilstede i prøven, og vekst av grønne kolonier kan indikere at en bakterie fra KESC-gruppen er tilstede. Kolonier med en brun «halo» (hemningssone) kan være *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*, og fargeløse kolonier kan være *Salmonella*, *Acinetobacter* eller andre bakterier som har andre resistensmekanismer.

For deteksjon av *Enterobacteriaceae* med karbapenemresistens, benyttes CRE agar (Oxoid & Remel, 2011). Disse bakteriene inkluderer *E. coli* eller bakterier fra KESC-gruppen. Skålene inkuberes ved 37°C i 18-24 timer, og skåler uten vekst kan reinkuberes i nye 24 timer. Koloniene som vokser opp kan deles inn i CRE-positive og CRE-negative prøver. CRE-positive prøver inkluderer vekst av bleke rosa kolonier som kan indikere *E. coli* eller vekst av blå kolonier som kan være en av bakteriene fra KESC-gruppen. Ved vekst av hvite eller fargeløse kolonier er prøven CRE-negativ og det kan være *Acinetobacter* som er tilstede i prøven. Bakterier som har andre resistensmekanismer kan produsere brune kolonier med «halo» (hemningssone), og inkluderer *Proteus*, *Morganella* og *Providencia*.



For isolering og direkte identifikasjon av *S. aureus* som er meticillinresistente benyttes MRSA medium (Oxoid, 2008). Mediumet inkuberes ved 37 °C i 18-24 timer, og vekst av blå kolonier indikerer en positiv prøve og vekst av MRSA.

## 2.4.2 MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER

### 2.4.2.1 KVANTIFISERING OG RENHETSMÅLING AV DNA

NanoDrop™ 2000 Spektrofotometer ble benyttet til måling av renhet i denne oppgaven. Apparatet kan benyttes til å kvantifisere renheten av blant annet DNA, RNA og proteiner (Matlock, 2015). Nukleinsyrer har maksimum absorpsjonsrate ved 260 nanometer (nm), og NanoDrop måler absorpsjonsrate på 260 nm og 280 nm ( $A_{260/280}$ ) og raten på 260 nm og 230 nm ( $A_{260/230}$ ). Målingene er basert på nukleotidens evne til å absorbere lys. For  $A_{260/280}$  er ønsket verdi 1,8. Lavere absorpsjonsrate indikerer at prøven kan være kontaminert med proteiner, fenoler eller andre kontaminanter som kan absorbere lys ved 230 nm eller lavere. Ved  $A_{260/230}$  er det ønskelig med absorpsjonsrate mellom 2,0 og 2,2. Lavere absorpsjonsrate kan indikere at prøven er kontaminert med produkter som absorberer lys ved 230 nm eller lavere, slik som karbohydrater eller fenoler.

Qubit 2.0® Fluorometer ble benyttet i denne oppgaven for kvantifisering av DNA i prøvene. Dette er en fluoriserende metode som gir en mer nøyaktig kvantifisering av DNA, enn med UV absorpsjonsrate som NanoDrop (Life Technologies, 2014). Fluoriserende metoder kan skille mellom DNA, RNA og proteiner, i motsetning til UV absorberende metoder. Fluoriserende farge som er selektivt for dsDNA (dobbeltrådet DNA), RNA og proteiner benyttes til å kvantifisere nukleinsyrer og kan gi et nøyaktig svar på innhold av slike komponenter i prøven.

### 2.4.2.2 PCR

Polymerasekjedereaksjon (PCR) brukes til å amplifisere små mengder DNA til millioner av identiske kopier (Watson, 2014, s. 158). Templatet er den delen av genomet som skal kopieres og oppkonsentreres. Det benyttes to spesifikke primere som binder seg til motsatte sider av templat DNA, en til 5'-enden («forward») og en til 3'-enden («reverse»). Dette skjer ved komplementær baseparing. Når primerne er bundet til templatet, kan det varmemestabile enzymet *Taq* DNA polymerase syntetisere og dermed forlenge primeren, slik at det ender opp med mange kopier av sekvensen. dNTPer (dATP, dGTP, dTTP og dCTP) benyttes som byggesteiner i det nye dobbeltrådede DNAet.

Reaksjonen skjer i tre trinn. Det første trinnet innebærer denaturering av mål-DNA til ssDNA (enkeltrådet DNA), ved ca. 95°C (Tronsmo, 2016, s.319-321). Neste trinn er annealing (sammensmelting/hybridisering), der temperaturen senkes til 50-70°C, slik at primerne kan binde seg til komplementære sekvenser på det enkeltrådede mål-DNAet. Til slutt vil det skje en forlengelse (polymerisering) av DNA ved 72°C. Når temperaturen ved dette trinnet økes igjen, kan *Taq*-polymerase utvide primerne og det vil skje syntese av nye DNA-tråder (Adams & Moss, 2008, s.391-393). Disse tre trinnene gjentas i 30-40 sykluser, slik at det til slutt er mange kopier av det opprinnelige DNAet. Antall DNA molekyler dobles i hver syklus, og antall kopier vil derfor ha en eksponentiell vekst.

I denne studien ble det benyttet både singelplex- og multiplex-PCR. Ved singelplex-PCR blir ett mål amplifisert, der det benyttes én primer for deteksjon av en enkelt målsekvens (Adams & Moss, 2008, s.392). Ved multiplex-PCR kan flere primerpar amplifiseres for flere målsekvenser, i en reaksjon.

#### *2.4.2.3 AGAROSEGELELEKTROFORESE*

Gelelektroforese er en teknikk som benyttes for å separere DNA fragmenter, RNA og proteiner basert på deres størrelse og ladning (Tronsmo, 2016, s.318). Etersom alle DNA-molekyler har samme mengde ladning per masse, kan de skilles kun basert på størrelse ved bruk av elektroforese. Ved agarosegelelektroforese er gelen laget av agarose, og det er agarosemolekyler som holder gelen sammen med hydrogenbånd og danner små porer i gelen. Prøver blir plassert i brønner i enden av gelen som er i kontakt med elektrodebuffer (Watson, 2014, s.148). Når elektroforesen skrur på, vil molekyler vandre mot den positive polen. Årsaken til dette er at DNA-molekyler er negativt ladet grunnet fosfatgrupper. De minste molekylene vil vandre lengst, gjennom porene i gelen. På denne måten er det mulig å skille de ulike molekylene på størrelse. Ved bruk av fargestoffer som binder seg spesifikt til DNA/RNA-fragmenter, kan molekylene observeres som bånd på gelen under UV-lys (Tronsmo, 2016, s.318). Båndene sammenlignes med en «ladder», som inneholder DNA/RNA fragmenter med kjente lengder, og brukes som referanse.

#### *2.4.2.4 SANGER-SEKVENSERING*

Sekvensering betyr å finne rekkefølgen aminosyrer i et protein eller rekkefølgen til nukleotidene i DNA eller RNA (Tronsmo, 2016, s.321-322). Sanger-sekvensering er en førstegenerasjons DNA-sekvensering som benytter DNA-polymerase til å kopiere den

opprinnelige ssDNA-tråden. Det tilsettes også en primer, som er en ssDNA-tråd som bindes til DNA og blir startpunkt for polymerasen. Prosessen består av denaturering av templat DNA til ssDNA. Primeren bindes, temperaturen heves og DNA-polymerase kan syntetisere nytt DNA. DNA-polymerase fortsetter syntetiseringen frem til den møter på en dideoksyribonukleotid.

Dideoksybaser tilsettes for terminering av sekvenseringen, og de inkluderer adenin (ddATP), guanin (ddGTP), tymin (ddTTP) og cytosin (ddCTP) (Tronsmo, 2016, s.322). Forskjellen på de vanlige DNA nukleotidene og dideoksyribonukleotidene, er at sistnevnte har en -H gruppe i stedet for en -OH gruppe på karbonatom 3. Det vil ikke være mulig å koble på en ny base når -OH gruppen er erstattet med en -H gruppe her. Dette medfører fragmenter med ulik lengde, og det vil være mulig å skille dem ved bruk av gelelektroforese eller kapillærelektroforese.

I denne studien ble Sanger-sekvensering benyttet for 16S rRNA, som er en vanlig metode for identifisering av bakterier og karakterisering av bakteriestammer (Janda & Abbott, 2007). Etter sekvensering kan ulike gener identifiseres ved bruk av ulike databaser og isolater kan «types» med en teknikk som kalles multilocus sekvens typing (MLST) (Jolley et al., 2012). Denne teknikken kan se forhold mellom relaterte organismer og benyttes til identifisering av mikrobielle stammer.

#### 2.4.2.5 HELGENOMSEKVENSERING MED ILLUMINA MISEQ

Utviklingen innen sekvensering har vært stor de årene (Kozich et al., 2013). Tidligere var det mulig å sekvensere hundrevis av 16S rRNA genfragmenter, men nå kan nestegenerasjons sekvensering, sekvensere flere millioner fragmenter. Identifikasjon av isolatene kan gjøres med ribosomal multilocus sekvenstyping (rMLST), som bruker referansesekvenser til å identifisere ulike gener (Jolley et al., 2012). Som MLST bruker rMLST referansesekvenser til å identifisere genvarianter, men rMLST kan se variasjoner innen 53 ulike gener som koder for ribosomale protein-underenheter (*rps* gener). Slike gener er ideelle mål for universell karakterisering av bakteriearter.

Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq inkluderer forberedelse av bibliotek, klusterdannelse, sekvensering og datanalyse (Illumina Inc., 2017). Biblioteket består av tilfeldige fragmenter fra DNA-prøven, samt at spesifiserte adaptore liggeres på begge ender. Adapter-fragmentene amplifiseres ved PCR. Ved dannelse av kluster fester DNA fra biblioteket seg til komplementære oligonukleotider, ved noe som kalles «bridge»-amplifisering. Etter dette

er klusterne klare for sekvensering. Nukleotider inkorporeres i den voksende DNA-tråden og blir en del av sekvensen (Grada & Weinbrecht, 2013). For deteksjon av nukleotidsekvenser og bestemmelse av rekkefølgen på nukleotider, er MiSeq avhengig av fluorescerende merkede nukleotider.

### **2.4.3 SENSITIVITETSTESTING AV ANTIBIOTIKA**

MIC (minimum inhiberingskonsentrasjon) er den laveste konsentrasjonen av et kjemikalie, for eksempel antibiotika, som motvirker synlig vekst av bakterier (Chaitanya et al., 2014). Sensitivitetstesting med MIC er en metode som benyttes til å estimere sensitiviteten til bakterier og mikroorganismer for et legemiddel. Dersom en bakterie viser fenotypisk resistens mot tre eller flere klasser av antibiotika, defineres den som multiresistent (Magiorakos et al., 2012).

«European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST) sin oppgave er å standardisere brytningspunkter for ulike typer antibiotika (Rodloff et al., 2008). Ulike bakterier har forskjellige brytningspunkter for ulike typer antibiotika. PK-PD verdier er ikke relatert til noen spesifikk art, og kan benyttes når det ikke finnes noen spesifikk brytningsverdi for en type antibiotika for en bakterie (EUCAST, 2020). Ikke alle typer antibiotika har oppgitt et brytningspunkt for enkelte bakterier. «-» Indikerer at sensitivitetstesting ikke anbefales ettersom arten er et dårlig mål for behandling med middelet og «IE» indikerer at det ikke er tilstrekkelig bevis for at organismen eller gruppen er et godt mål for terapi med middelet.

EUCAST sine brytningspunkter brukes til å kategorisere resultater inn i tre ulike grupper (EUCAST, 2020).

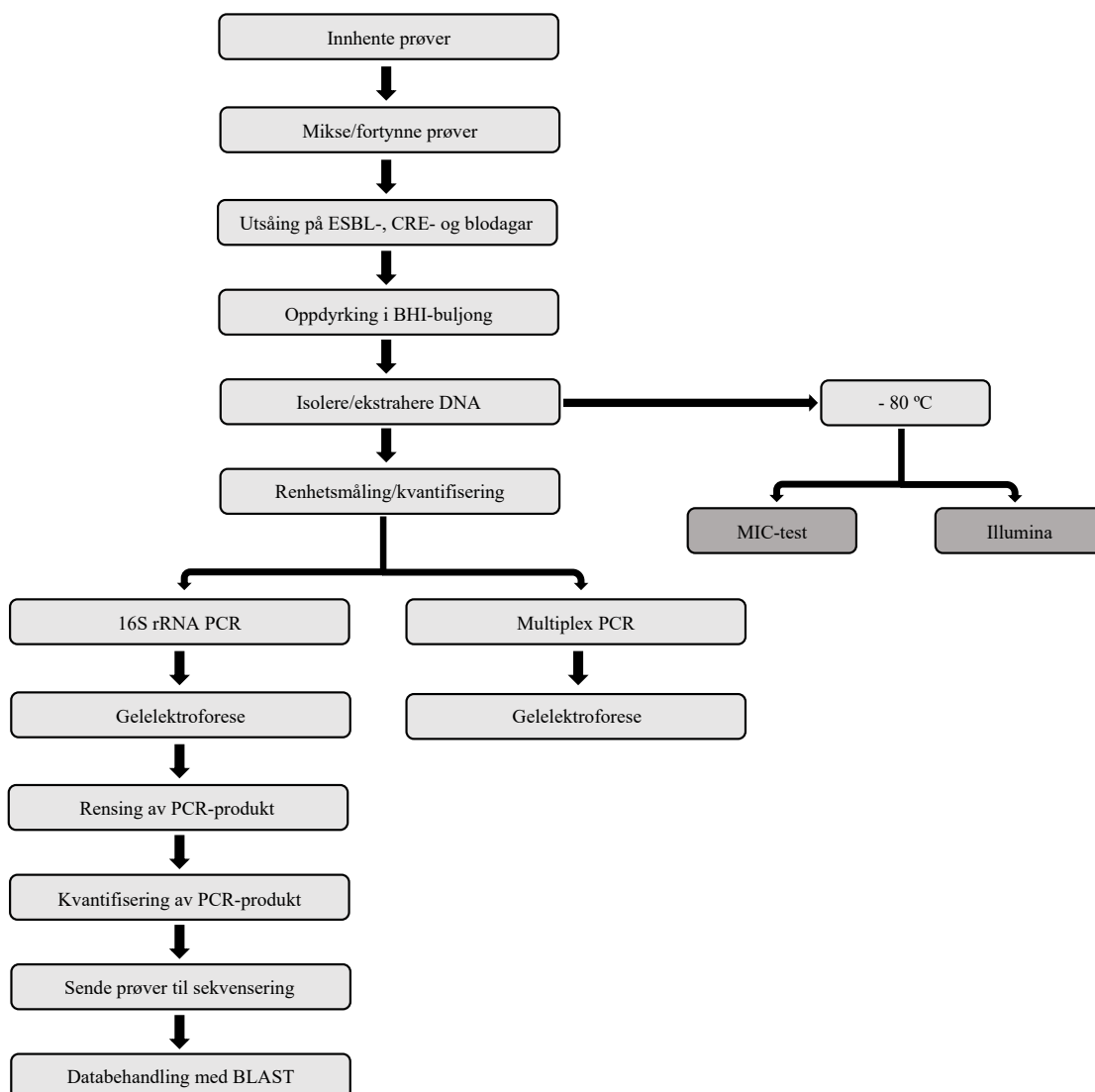
1. Sensitiv for standard dosering: Når det er stor sannsynlighet for terapeutisk suksess ved bruk av standard dosering av et middel.
2. Mottakelig for økt eksponering: Når det er stor sannsynlighet for terapeutisk suksess ved bruk av økt dosering eller konsentrasjon av et middel.
3. Resistent: Når det er stor sannsynlighet for terapeutisk svikt, selv ved økt eksponering av et middel.

For sensitivitetstesting av antibiotika er det vanlig å bruke Mueller-Hinton (MH) agar (Chaitanya et al., 2014). Noen organismer er komplekse og kan ha behov for spesiell næring for å vokse. I slike tilfeller kan Mueller Hinton Fastidious (MH-F) agar, som inneholder lysert hesteblood og beta-NAD, benyttes (EUCAST, 2020).

### 3.0 METODER OG MATERIALER

#### 3.1 OVERSIKT OVER PROSESSEN OG METODER

Figur 3.1 gir en forenklet oversikt over de ulike prosessene som ble gjennomført i denne studien. Det startet med innhenting av prøver som ble blandet og fortynnet før de ble sådd ut på ulike agar. Prøvene ble dyrket i BHI-buljong, før DNA ble isolert og ekstrahert. Det ble gjennomført renhetsmåling og kvantifisering av DNAet før PCR ble kjørt. Gelelektroforese ble gjort for alle PCR-produktene. Produktene fra 16S rRNA PCR ble videre rensset, kvantifisert og sendt til sekvensering, før det til slutt ble gjennomført databehandling av resultatene i BLAST. Alle prøvene ble fryst ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$  til langtidsoppbevaring og senere bruk. Utvalgte prøver ble sensitivitetstestet med MIC og enkelte prøver ble sendt til Illumina MiSeq for helgenomsekvensering.



Figur 3.1. Illustrasjon av prosessen og de ulike metodene som ble benyttet i oppgaven.

## 3.2 PRØVEINNSAMLING

Alle prøvene ble kjøpt inn i Norge og analysert før «best før dato», og skal derfor være av god kvalitet. Tabell 3.2 viser en oversikt over de ulike prøvene som ble benyttet i oppgaven. Prøve-ID for de ulike prøvene er inkludert i tabellen.

*Tabell 3.2. Oversikt over prøvene som er inkludert i oppgaven, med prøve-ID.*

Prøve	Prøve-ID
Bladsalat (ferdig vasket, importert fra Spania og Italia)	
Blandet salat (babyleaf)	B1
Kyllingsalat (spiseklar)	
Blandet salat (isbergsalat, fiséesalat, raddichosalat, rødkål og purre)	K1
Kylling	K2
Pasta	K3
Skinkesalat (spiseklar)	
Blandet salat (isbergsalat, mais, gulrot og rødkål)	S1
Skinke	S2
Ost	S3

## 3.3 OPPDYR KING AV BAKTERIER

### 3.3.1 FORARBEID

Alle prøvene ble veid opp i hver sin sterile plastpose med filter (VWR®), før de ble fortynnet med 100 ml autoklavert vann. Deretter ble de blandet ved bruk av Stomacher® 400 Lab Blender (Seward). Posene med de blandede prøvene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Tabell 3.3.1.1 viser en oversikt over vekten til de ulike prøvene.

*Tabell 3.3.1.1. Vekt (g) av de ulike prøvene og mengde (ml) autoklavert vann som hver prøve ble fortynnet med.*

Prøve	Vekt av prøve (g)	Autoklavert vann (ml)
B1	24,49	100
K1	32,98	100
K2	38,88	100
K3	44,74	100
S1	49,61	100
S2	38,95	100
S3	39,20	100

Videre ble det benyttet forskjellige vekstmedier for deteksjon av ulike egenskaper hos bakteriene. Dette ga opphav til endelig prøve-ID for videre bruk, som vist i tabell 3.3.1.2.

**Tabell 3.3.1.2.** Oversikt over endelig prøve-ID for de ulike prøvene.

Prøve	Blodagar	CRE	ESBL
B1	B1.B	B1.C	B1.E
K1	K1.B	K1.C	K1.E
K2	K2.B	K2.C	K2.E
K3	K3.B	K3.C	K3.E
S1	S1.B	S1.C	S1.E
S2	S2.B	S2.C	S2.E
S3	S3.B	S3.C	S3.E

### 3.3.2 BLODAGAR

For å undersøke hemolyseaktivitet hos bakterier i prøvene, ble blodagar av typen «Tryptone Soya Agar with Sheep Blood» benyttet (Thermo Scientific Inc). Hver prøve ble fortynnet med autoklavert vann til 1:100, 1:500, 1:1.000 og 1:10.000, før de ble sådd ut på blodagar. Prøvene ble inkubert ved 37 °C i 48 timer. Etter inkubering, ble en koloni med beta-hemolyse fra hver prøve podet over til en ny blodagarskål ved bruk av en steril podenål. Skålene ble inkubert ved 37°C i 24 timer, før nye kolonier igjen ble podet over til en ny blodagarskål, som igjen ble inkubert ved 37°C i nye 24 timer.

### 3.3.3 ESBL- OG CRE-AGAR

Agar som ble benyttet for deteksjon av resistente bakterier var *Brilliance<sup>TM</sup> ESBL* (Thermo Scientific Inc) og *Brilliance<sup>TM</sup> CRE* (Thermo Scientific Inc). Prøvene ble tatt direkte ut av filterposen ved bruk av pipette. 1 ml fra hver prøve ble sådd ut på en *Brilliance<sup>TM</sup> ESBL* skål og 1 ml fra hver prøve ble sådd ut på en *Brilliance<sup>TM</sup> CRE* skål. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 48 timer. Ved vekst av kolonier ble en tilfeldig koloni fra hver skål podet videre til en ny skål ved bruk av en steril podenål. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Deretter ble en ny koloni fra hver skål igjen podet videre til nye skåler, og inkubert ved 37°C i 24 timer.

Etter sekvensering ble prøve B1.B sådd ut på en ESBL-skål og prøve S3.B sådd ut på en MRSA-skål. Koloniene ble podet over til fra de opprinnelige skålene til de nye, ved bruk av en steril podenål og de ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

Koloniene som vokste på *Brilliance*<sup>TM</sup> *ESBL* (Thermo Scientific Inc), *Brilliance*<sup>TM</sup> *CRE* (Thermo Scientific Inc) og *MRSASelect*<sup>TM</sup> *II* (Thermo Scientific Inc) hadde ulike farger. Tabell 3.3.3 viser en oversikt for fargescreening av de ulike koloniene, ved bruk av tilhørende protokoller (Thermo Scientific Inc).

**Tabell 3.3.3.** Fargescreening av kolonier fra *Brilliance*<sup>TM</sup> *ESBL*, *Brilliance*<sup>TM</sup> *CRE* og *MRSASelect*<sup>TM</sup> *II*.

<b>ESBL</b>			
Blå/rosa	<i>Escherichia coli</i>		
Grønn	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobacter</i>		
Brun «halo»	<i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>		
Fargeløs	<i>Salmonella</i> , <i>Acinetobacter</i> eller andre		
<b>CRE</b>			
CRE-positiv		CRE-negativ	
Blek rosa	<i>Escherichia coli</i>	Hvit/fargeløs	<i>Acinetobacter</i>
Blå	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobacter</i>	Brun «halo»	<i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
<b>MRSA</b>			
Blå	<i>Staphylococcus aureus</i>		

### 3.3.4 OPPDYR KING I BHI-BULJONG

Fra prøvene som hadde vekst på *Brilliance*<sup>TM</sup> *ESBL* (Thermo Scientific Inc) og *Brilliance*<sup>TM</sup> *CRE* (Thermo Scientific Inc), ble det plukket en tilfeldig koloni med en steril podenål, som ble inokulert i rør med 500 µl Brain Heart Infusion (BHI) buljong (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fra blodagar ble samme metode benyttet for en koloni med beta-hemolyse fra hver skål. Rørene ble inkubert ved 37°C i 24 timer, for videre bruk til isolering og ekstraksjon av DNA.

### 3.4 ISOLERING OG EKSTRAKSJON AV DNA

For isolering og ekstraksjon av DNA ble GenElute<sup>TM</sup> Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich) benyttet. Prosedyren for G<sup>+</sup> bakterier ble gjennomført som beskrevet i bruksanvisningen, med unntak av trinnet for eluering. I stedet for tilsetning av 200 µl med tilhørende elueringsbuffer, ble 25 µl av SequalPrep<sup>TM</sup> Nominalization Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc) benyttet. Årsaken var at den opprinnelige elueringsbufferen inneholdt etylendiamintetraacetat (EDTA) som kunne hemme sekvensering.



Eluatet inneholdt til slutt rent genomisk DNA og 500 µl fra hver prøve ble overført til kryorør sammen med 500 µl 60 % glyserol. Rørene ble fryst ned til -80 °C, for senere bruk og langtidslagring.

### **3.5 RENHETSMÅLING OG KVANTIFISERING AV DNA**

Renhetsmåling av DNA ble gjennomført ved bruk av spektrofotometeret Nanodrop 2000 (Thermo Fisher scientific Inc.) og den tilhørende programvaren NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher scientific Inc.). Renhetsmålingen ble gjennomført som beskrevet i protokollen som medfølger. Først ble apparatet kalibrert ved at 2 µl destillert vann ble plassert på linsen. Videre ble 2 µl fra hver prøve plassert på linsen, og absorbans ved 260 nm og 280 nm ble avlest.

Kvantifisering av DNA ble gjennomført ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc), som anvist i bruksanvisningen for dsDNA BR. Arbeidsløsningen ble laget med Qubit™ dsDNA BR (broad range) Buffer og Qubit™ dsDNA BR Reagent. Mengden som ble tilsatt var antall prøver \* 199 µl for bufferen og antall prøver \* 1µl for reagenten. Standard 1 og standard 2 ble laget med 190 µl arbeidsløsning og 10 µl med standardløsning. Prøvene som skulle måles ble laget med 198 µl arbeidsløsning og 2 µl fra den rensede DNA-prøven. Standardene og prøvene ble laget i tilhørende prøverør etter protokollen, og avlest av Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.). De to standardene ble først avlest. Deretter ble resten av prøvene lest av og resultatene ble oppgitt i ng/µl.

### **3.6 AMPLIFISERING AV DNA MED PCR**

#### **3.6.1 16S rRNA PCR**

Det ble gjennomført singelplex PCR for 16S rRNA amplifikasjon, ved bruk av iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase kit (Bio-Rad Laboratories). Tabell 3.6.1.1 viser en oversikt over de ulike reagentene som ble tilsatt i miksen for å forberede det genomiske DNAet for reaksjonen.

**Tabell 3.6.1.1.** Miks med ulike reagenter for forberedelse av genomisk DNA for 16S rRNA PCR. Sluttkonsentrasjon og volum ( $\mu\text{l}$ ) er oppgitt.

Reagent	Sluttkonsentrasjon	Volum, $\mu\text{l}$ (1 reaksjon)
iProof HF buffer	1x	8
dNTPer	200 $\mu\text{M}$	0,8
Forward primer	0,25 $\mu\text{M}$	2
Reverse primer	0,25 $\mu\text{M}$	2
PCR grade H <sub>2</sub> O	<b>TOTALT 40 <math>\mu\text{l}</math></b>	24,8
iProof DNA polymerase	0,02 U/ $\mu\text{l}$	0,2
Templat DNA	7,5-150 ng	2
	<b>TOTALT</b>	<b>40</b>

De ulike reagentene ble tilsatt i hver sitt PCR-rør av typen MicroAmp<sup>®</sup> 8-Tube Strip (Life Technologies), og templat DNA ble tilsatt til slutt. Prøver med høy konsentrasjon (>100 ng/l) ble fortynnet 10x før bruk. Rørene ble plassert i brønner fra MicroAmp (Applied Biosystems), før lokkene av typen MicroAmp<sup>®</sup> 8-Cap Strip (Life Technologies) ble satt på rørene. PCR-maskinen som ble benyttet var SimpliAmp<sup>™</sup> Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), og PCR-programmet som ble benyttet til 16S rRNA amplifisering er vist i tabell 3.6.1.2. Hvert rør inneholdt til slutt 40  $\mu\text{l}$ , og dette ble registrert sammen med valg av PCR-program.

**Tabell 3.6.1.2.** PCR program for 16S rRNA amplifisering.

Steg	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tid (min)
<b>Syklus 1 (x1)</b>		
Aktivering av DNA-polymerase	98	00:30
<b>Syklus 2 (x35)</b>		
Denaturering	98	00:10
Annealing	55	00:30
Ekstensjon	72	00:45
<b>Syklus 3 (x1)</b>		
Endelig ekstensjon	72	10:00
Nedkjøling	4	$\infty$

Primerene (Thermo Scientific) som ble benyttet til 16S rRNA amplifisering er vist i tabell 3.6.1.3.

**Tabell 3.6.1.3.** Primere for 16S rRNA amplifisering.

Primer	Primersekvens (5'-3')	Antall basepar
Forward	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	1505
Reverse	GGTACCTTGTTACGACTT	

### 3.6.2 MULTIPLEX PCR

Multiplex PCR ble gjennomført med ulike kombinasjoner av primere (multiplex) for å undersøke om det var ESBL- eller karbapenemase-genotyper i prøvene. Qiagen® Multiplex PCR kit (Qiagen) ble benyttet, og tabell 3.6.2.1 viser en oversikt over de ulike komponentene som ble brukt.

**Tabell 3.6.2.1.** PCR miks benyttet for undersøkelse av ESBL- og karbapenemase-genotyper. Inkluderer sluttkonsentrasjon og volum ( $\mu$ l) for de ulike komponentene.

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Volum ( $\mu$ l)
<b>Reaksjonsmix</b> 2 x QIGEN Multiplex PCR master mix 10 x primer mix (2 $\mu$ M av hver primer) RNase-fritt vann	1 x 0,2 $\mu$ M av hver primer -	12,5 2,5 9
Templat DNA	$\leq$ 1 $\mu$ g DNA/reaksjon	1
<b>Totalt reaksjonsvolum</b>		25

For multiplex PCR ble samme rør, lokk og PCR-maskin som for 16S rRNA benyttet. PCR-programmene som ble benyttet er oppgitt i tabell 3.6.2.2. Rørene inneholdt til slutt 25  $\mu$ l, noe som ble registrert ved valg av PCR-program.

**Tabell 3.6.2.2.** PCR program benyttet for undersøkelse av ESBL- og karbapenemase-genotyper.

Steg	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Tid (min)
<b>Syklus 1</b>		
Aktivering av DNA-polymerase	95	15:00
<b>Syklus 2<sup>1</sup></b>		
Denaturering	94	00:30
Annealing	62	01:30
Ekstensjon	72	01:30
<b>Syklus 3</b>		
Endelig ekstensjon	72	10:00
Nedkjøling	4	$\infty$

<sup>1</sup> Syklus 2 ble gjentatt 28 ganger for ESBL og 30 ganger for karbapenemase

Primerene (Thermo Scientific) som ble benyttet til PCR for deteksjon av ESBL- og karbapenemase-genotyper er oppgitt i tabell 3.6.2.3 og tabell 3.6.2.4.

**Tabell 3.6.2.3. Primere benyttet til undersøkelse av ESBL-genotyper.**

Primer	Gen	Primersekvens (5'-3')	Antall basepar	Referanse
<b>ESBL</b>				
<b>Multiplex 1</b>				
MultiOxa48-F MultiOxa48-R	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp2-F MultiCTXMGp2-R	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (gr. 2)	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTTCCAT	404	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSOO-F MultiTSOO-R	<i>bla<sub>OXA</sub></i>	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSOS-F MultiTSOS-R	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	(Dallenne et al., 2010)
<b>Multiplex 2</b>				
MultiCTXMGp9-F MultiCTXMGp9-R	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (gr. 9)	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	561	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp1-F MultiCTXMGp1-R	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (gr. 1)	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSOT-F MultiTSOT-R	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	(Dallenne et al., 2010)
<b>Multiplex 3</b>				
NDM-F NDM-R	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	157	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
VIM-F VIM-R	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	564	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
KPC-F KPC-R	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	TCCGTTACGGCAAAAATGCG GCATAGTCATTTGCCGTGCC	460	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
<b>Multiplex 4</b>				
rpoB-F rpoB-R	<i>rpoB</i>	CAGGTCGTACACGGTAACAAG GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC	512	Universale primere
16S-F 16S-R	16S rRNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG GYTACCTTGTTACGACTT	1505	Universale primere

**Tabell 3.6.2.4.** Primere benyttet til undersøkelse av karbapenemase-genotyper.

Primer	Gen	Primersekvens (5'-3')	Antall basepar	Referanse
<b>Karbapenemase</b>				
<b>Multiplex 1</b>				
CMY2-F CMY2-R	<i>bla<sub>CMY</sub></i>	GCATCTCCCAGCCTAATCCC TTCTCCGGGACAACCTTGACG	188	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
MultiOxa48-F MultiOxa48-R	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281	(Dallenne et al., 2010)
IMP-F IMPR	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT AGCCTGTTCCCATGTACGTT	393	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
VIM-F VIM-R	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	ATAGAGCACACTCGCAGACG TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	564	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
<b>Multiplex 2</b>				
NDM-F NDM-R	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	157	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
SFC-F SFC-R	<i>bla<sub>SFC</sub></i>	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA CACTGTACTGCAGAGTGGCA	268	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)
KPC-F KPC-R	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	TCCGTTACGGCAAAAATGCG GCATAGTCATTTGCCGTGCC	460	(Finton et al., 2020, innsendt manuskript)

### 3.7 IDENTIFISERING AV DNA/RNA-FRAGMENTER VED

#### AGAROSEGELELEKTROFORESE

Agarosegelelektroforese ble gjennomført for påvisning av PCR-produkter. Det ble benyttet en 0,8% agarosegel som ble laget av SeaKem® LE Agarosepulver (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.), 1X TAE (Tris-acetat-EDTA) buffer og GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium). 50X TAE buffer ble laget av 50 mM EDTA disodium salt, 2 M tris og 1 M glacial/acetic acid som videre ble fortynnet til 1X TAE. Først ble agarosepulveret og 1X TAE blandet og kokt i mikrobølgeovn. Deretter ble blandingen nedkjølt før tilsetting av farge (5 µl farge/100 ml væske). Gelen ble støpt i form med kammer for forming av brønner.

Ladder som ble benyttet ble laget av 1 µl 100 bp (basepar) DNA Ladder (BioLabs Inc.), 4 µl Gel Loading Dye Purple, 6X (BioLabs Inc.) og 20 µl 1X TAE. 6 µl av ladder ble applisert i hver brønn der det skulle være en ladder. Resten av prøvene som skulle appliseres i brønner,

ble blandet med 3 µl fra hver prøve med DNA, 3 µl Agarose gel loading dye, 6X (VWR Life Science) og 4 µl MilliQ vann. 10 µl av hver prøve ble tilsatt i hver sin brønn.

Gelen ble kjørt på PowerPac™ Basic 300V (Bio-Rad Laboratories, Inc.), ved mellom 80-120V. Bilder av gelen ble tatt med maskinen GelDoc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc.), og det tilhørende dataprogrammet Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ble benyttet.

### 3.8 SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT

#### 3.8.1 RENSING AV PCR-PRODUKT

For rensing av PCR-produkt ble GenElute™ PCR Clean-Up kit (Sigma-Aldrich) benyttet som beskrevet i protokollen. Etter rensing ble konsentrasjonen målt ved bruk av Qubit, som forklart i avsnitt «3.5 Renhetsmåling og kvantifisering av DNA».

#### 3.8.2 SANGER-SEKVENSERING

For sanger-sekvensering ble prøvene sendt til GATC Biotech/Eurofins, Tyskland. For sending ble prøvene tilsatt i 1,5 ml microtubes (Axygen) sammen med primer. Hver prøve ble tilsatt i ett rør med forward primer og i ett rør med reverse primer. Mengde prøve og mengde primer som ble tilsatt var avhengig av målt konsentrasjon. Tabell 3.8.2 viser en oversikt over forholdet mellom prøve og primer som ble tilsatt i rørene som skulle sendes.

*Tabell 3.8.2. Mengde prøve og mengde primer som ble tilsatt for sending til sekvensering.*

Konsentrasjon i prøve	Prøve (µl)	Primer (µl)
< 20 ng/µl	7	3
20-80 ng/µl	5	5
> 80 ng/µl	3	7

#### 3.8.3 DATA-ANALYSE

Resultatene fra sanger-sekvensering ble mottatt som rådata, med resultater fra forward og reverse hver for seg. Programmet BioEdit ble benyttet til å kutte bort dårlige og ujevne deler av sekvensene. Deretter ble sekvensene fra forward og reverse slått sammen til en lengre sekvens (contig-sekvens) i fasta fil, som kunne benyttes til videre analyser. Contig-sekvensene ble brukt videre i Nucleotid BLAST (nBLAST), og databasen som ble valgt var «Reference RNA sequences (refseq\_rna)». Resultatene fra nBLAST ble oppgitt som bakteriestammer med en identitetsscore og query cover.

### **3.9 SENSITIVITETSTESTING AV ANTIBIOTIKA**

For å teste bakterienes sensitivitet for antibiotika ble MIC-testing benyttet for uvalgte prøver (B1.1, B1.2, K1.3, K3.1, S1.2 og S3.1). Prøvene som var oppbevart ved -80 °C ble benyttet, og strøket ut på MH agar (Thermo Scientific) ved bruk av sterile podenåler. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Kolonier fra MH agar ble plukket ved bruk av sterile Q-tips og ble inokulert i steril saltløsning (0,85% NaCl i vann). Prøvenes ble sammenlignet med standarden fra McFarland (Dalynn biologicals). Når riktig turbiditet i prøven var oppnådd, ble prøvene sådd ut på ny MH agar ved bruk av sterile Q-tips. Ved dårlig vekst på vanlig MH-agar skulle MH-F agar benyttes, men som følge av Coronaviruset var laboratoriet stengt og analysene ble ikke gjennomført.

Videre ble ulike strips fra ETEST® (bioMérieux) og MIC (Liofilchem) benyttet. Testingen foregikk som beskrevet fra produsenten. De ulike typene antibiotika som bakteriene ble testet for, samt konsentrasjonen av de ulike typene, er oppgitt i tabell 3.9.

**Tabell 3.9.** *Typer av antibiotika som ble sensitivitetstestet. Type antibiotika og konsentrasjonen ( $\mu\text{g/ml}$ ) som prøvene ble utsatt for er oppgitt.*

<b>Antibiotikatype</b>	<b>Konsentrasjon (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>Penicilliner (<math>\beta</math>-laktam)</b>	
Ampicillin (AM)	0,16-256
Amoxicillin (AMC)	
<b>Cefalosporiner (<math>\beta</math>-laktam)</b>	
Cefotaxim (CT)	0,002-32
Cefepim (FEP)	0,016-256
<b>Karbapenemer (<math>\beta</math>-laktam)</b>	
Imipenem (IP)	0,002-32
Meropenem (MP)	
<b>Fluorokinoloner</b>	
Ciprofloxacin (CI)	0,002-32
<b>Aminoglykosider</b>	
Amikacin (AK)	0,016-256
Gentamicin (GM)	
Streptomycin (S)	0,064-1024
<b>Pyrimidiner</b>	
Trimetoprim (TM)	0,002-32
<b>Makrolider</b>	
Erytromycin (EM)	0,016-256

MIC kliniske brytningspunkt fra EUCAST ble benyttet til å bestemme resistens eller toleranse av antibiotika for de ulike bakteriene.



### **3.10 ILLUMINA MiSEQ SEKVENSERING**

For Illumina sekvensering ble prøvene sendt til norsk sekvenseringscenter (UiO, Oslo). Prøvene ble forberedt med Nextera<sup>TM</sup> 200 DNA Flex Tagmentation (Illumina Inc.) og sekvensert på en Illumina MiSeq plattform. Det ble tilsatt 200 ng DNA-ekstrakt til 20 µl sterilt vann, i et 1,5 ml eppendorfrør. Sammen med prøvene ble det sendt med en gel som viste at det var DNA til stede i prøvene.

Resultatet (reads) ble sendt i komprimert format (.tar fil) til veileder Bjørn-Arne Lindstedt, og ble pakket ut ved hjelp av programmet 7-zip. «Reads»-filene ble videre lastet opp på en Galaxy-plattform der de ble renset med programmet «Trimmomatic». Galaxy benytter programmet PROKKA for annotering (sammensetting) av contig-sekvensene fra Shovill/SPades. For å finne resistensgener ble filene skannet med The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) og The Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (ved NCBI). The virulence factor database (VFDB) ble benyttet for skanning av virulensgener. Isolater ble typet med MLST og Serotyping ved Center for Genomic Epidemiology, og identifikasjon av isolatene ble gjort med rMLST.

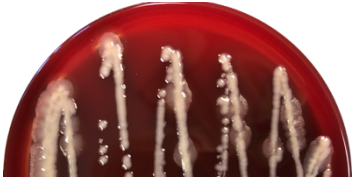
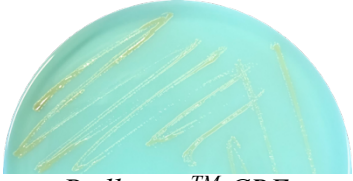

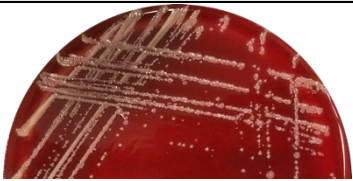
## 4.0 RESULTATER

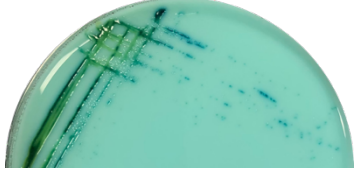

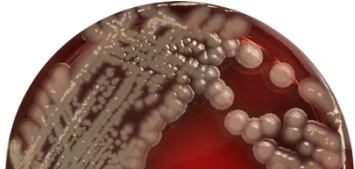
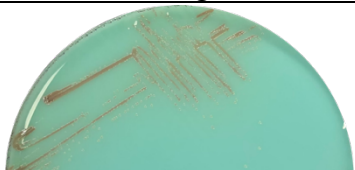

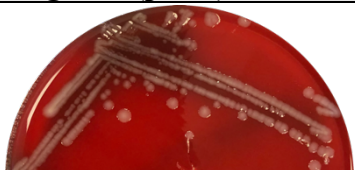
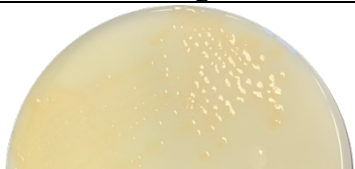
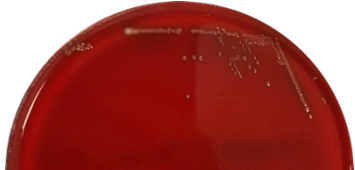
### 4.1 FENOTYPISKE RESULTATER




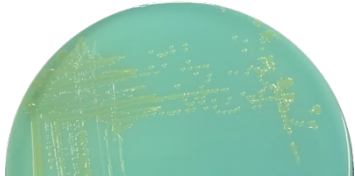

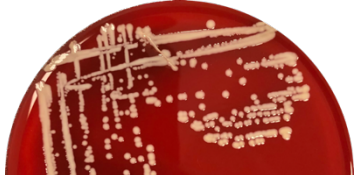
#### 4.1.1 PÅVISNING AV KOLONIER PÅ SELEKTIVE SKÅLER

Det ble benyttet ulike selektive skåler for påvisning av fenotypiske resultater. Skålene inkluderte blodagar av typen «Tryptone Soya Agar with Sheep Blood», *Brilliance<sup>TM</sup> CRE* og *Brilliance<sup>TM</sup> ESBL*. På blodagar ble koloniene og hemolyseaktivitet vurdert og tolket. For de to siste skålene ble det gjennomført en fargescreening og deretter en tolkning av hvilke bakterier som kunne være tilstede i prøven. Resultatene fra de selektive skålene, med bilder, beskrivelse av utseende og tolkning, er vist i tabell 4.1.1.

*Tabell 4.1.1. Påvisning av kolonier på blodagar, Brilliance<sup>TM</sup> CRE- og Brilliance<sup>TM</sup> ESBL-skåler, samt fargescreening for kolonier på Brilliance<sup>TM</sup> CRE- og Brilliance<sup>TM</sup> ESBL-agar. Beskrivelse av utseende samt tolkning av resultatet er inkludert.*

	Selektiv agar	Utseende	Tolkning
<b>B1 – Blandet salat</b>			
<b>B1.B</b>	 Blodagar	β-hemolytisk	Mulig patogen
<b>B1.C</b>	 <i>Brilliance<sup>TM</sup> CRE</i>	Hvit/lys gul	<b>CRE-negativ</b> <i>Acinetobacter</i>
<b>B1.E</b>	 <i>Brilliance<sup>TM</sup> ESBL</i>	Gul/brun	<i>Proteus, Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
<b>K1 – Kyllingsalat (blandet salat)</b>			
<b>K1.B</b>	 Blodagar	β-hemolytisk	Mulig patogen

<b>K1.C</b>	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Blå/grønn	<b>CRE-positiv</b> <i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> eller <i>Citrobacter</i>
<b>K1.E</b>	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Gul/brun	<i>Proteus, Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
<b>K2 – Kyllingsalat (kylling)</b>			
<b>K2.B</b>	 Blodagar	β-hemolytisk	Mulig patogen
<b>K2.C</b>	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Rosa	<b>CRE-positiv</b> <i>E. coli</i>
<b>K2.E</b>	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Gul/brun	<i>Proteus, Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
<b>K3 – Kyllingsalat (pasta)</b>			
<b>K3.B</b>	 Blodagar	β-hemolytisk	Mulig patogen
<b>K3.E</b>	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Fargeløs	<i>Salmonella, Acinetobacter</i> eller andre
<b>S1 – Skinkesalat (blandet salat)</b>			
<b>S1.B</b>	 Blodagar	β-hemolytisk	Mulig patogen

<b>S1.C</b>	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Hvit/lys gul	<b>CRE-negativ</b> <i>Acinetobacter</i>
<b>S1.E</b>	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Gul/brun	<i>Proteus, Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
<b>S2 – Skinkesalat (skinke)</b>			
<b>S2.B</b>	 Blodagar	β-hemolytisk	Mulig patogen
<b>S2.C</b>	 <i>Brilliance™ CRE</i>	Hvit/lys gul	<b>CRE-negativ</b> <i>Acinetobacter</i>
<b>S2.E</b>	 <i>Brilliance™ ESBL</i>	Gul/brun	<i>Proteus, Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
<b>S3 – Skinkesalat (ost)</b>			
<b>S3.B</b>	 Blodagar	Ingen hemolyse	Ikke-hemolyserende bakterie

Tabell 4.1.1 viser at det ble observert vekst av kolonier på alle skåler med unntak av prøve K3.C, S3.C og S3.E. Disse prøvene ble derfor ikke inkludert videre i studien. På alle skålene med blodagar, med unntak av S3.B, var det vekst av kolonier med beta-hemolyse, og tolkningen av dette var at bakteriene kunne være patogener. Prøve S3.B hadde vekst av kolonier uten hemolyse, noe som indikerte at det var en ikke-hemolyserende bakterie.

Prøve B1.C, S1.C og S2.C hadde vekst av hvite eller lyse gule kolonier på *Brilliance<sup>TM</sup> CRE*, noe som ble tolket til at bakteriene var CRE-negative og kunne være *Acinetobacter*. Prøve K1.C vokste med blå og grønne kolonier på *Brilliance<sup>TM</sup> CRE* og ble tolket til å være CRE-positiv og at det kunne være *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* som vokste. Prøve K2.C vokste med rosa kolonier på *Brilliance<sup>TM</sup> CRE* og ble tolket til at det kunne være *E. coli* som vokste opp på skålen.

På *Brilliance<sup>TM</sup> ESBL* skålene vokste det gule og brune kolonier fra prøve B1.E, K1.E, K2.E, S1.E og S2.E. Resultatene ble tolket til at bakteriene som vokste på disse skålene kunne være *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*. Prøve K3.E hadde fargeløse kolonier på *Brilliance<sup>TM</sup> ESBL*, noe som ble tolket til at det kunne være *Salmonella*, *Acinetobacter* eller andre bakterier som vokste der.

## **4.2 GENOTYPISKE RESULTATER**

### **4.2.1 RENHETSMÅLING OG KVANTIFISERING**

Etter ekstraksjon og isolasjon av DNA fra de ulike prøvene ble konsentrasjon (ng/μl) målt ved bruk av Qubit. I tillegg ble prøvenes renhet målt i absorbans ( $A_{260/280}$  og  $A_{260/230}$ ) ved bruk av NanoDrop. Konsentrasjonen for de ulike prøvene var mellom 5,85 og 448 ng/μl etter ekstraksjon av DNA. Prøver med konsentrasjon >100 ng/μl ble fortynnet 10 ganger før videre bruk. Etter 16S rRNA PCR var konsentrasjonen for de ulike prøvene mellom 18,5 og 166 ng/μl. For måling av renhet ved bruk av absorbans, var det ønskelig at  $A_{260/280}$  var 1,8 og at  $A_{260/230}$  var mellom 2,0-2,2. Enkelte av prøvene målte for høy eller for lav absorbans, og oppnådde ikke ønsket renhet. Fullstendige resultater er oppgitt i vedlegg A.

### **4.2.2 PÅVISNING VED GELELEKTROFORESE**

Det ble gjennomført gelelektroforese av alle prøvene med ulike primere. Først med 16S rRNA for påvisning av bakterier i prøven. Deretter ble det benyttet ulike multiplexer for deteksjon av resistensgener for ESBL (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* (gr.1, gr.2 og gr.9), *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*) og for karbapenem (*bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>SFC</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*). Resultatene er vist i tabell 4.2.2.

*Tabell 4.2.2. Tolkning av resultater fra gelelektroforese med ulike primere.*

Gen	16S	ESBL1	ESBL2	ESBL3	CRE1	CRE2
Prøve	16S rRNA	<i>OXA-48, CTX-M (gr.2), OXA, SHV</i>	<i>CTX-M (gr.9), CTX-M (gr.1), TEM</i>	<i>NDM, VIM, KPC</i>	<i>CMY, OXA-48, IMP, VIM</i>	<i>NDM, SFC, KPC</i>
<b>B1.B</b>	+	-	-	-	-	-
<b>B1.C</b>	+	-	-	-	-	-
<b>B1.E</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K1.B</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K1.C</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K1.E</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K2.B</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K2.C</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K2.E</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K3.B</b>	+	-	-	-	-	-
<b>K3.E</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S1.B</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S1.C</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S1.E</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S2.B</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S2.C</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S2.E</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S3.B</b>	+	-	-	-	-	-

Tabell 4.2.2 viser at gelen ga positivt utslag for alle prøvene med 16S rRNA primer. De ulike mastermixene ga ingen utslag, hverken for ESBL eller karbapenem.

### 4.2.3 SEKVENSERING

#### 4.2.3.1 SANGER-SEKVENSERING

Det ble gjennomført sanger-sekvensering for alle prøvene ved bruk av ekstrahert og isolert DNA. Sekvensene ble behandlet i BioEdit, og contig-sekvensene er oppgitt i vedlegg B. Contig-sekvensene ble vurdert videre i nBLAST. Overordnede resultater er oppgitt i tabell 4.2.3.1, og resultatene fra hele sekvenseringen er oppgitt i vedlegg C.

**Tabell 4.2.3.1.** Resultater fra sanger-sekvensering av de ulike prøvene. Bakterieidentitet, query cover og identitetsscore er oppgitt.

Prøve	Bakterieidentitet	Query cover	Identitetsscore
B1.B	<i>Raoultella</i> spp.	99 %	99,19 %
B1.C	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	100%	98,00%
B1.E	<i>Pseudomonas</i> spp.	99%	98,96%
K1.B	<i>Pseudomonas</i> spp.	99%	99,56%
K1.E	<i>Lactobacillus</i> spp.	99%	99.50%
K2.B	<i>Rahnella</i> spp.	99%	98.45%
	<i>Serratia</i> spp.	99%	97.76%
K2.E	<i>Herbaspirillum</i> spp.	99%	99.04%
K3.B	<i>Bacillus</i> spp.	100%	99.80%
S1.B	<i>Pseudomonas</i> spp.	99%	99.34%
S1.C	<i>Lactobacillus</i> spp.	99%	99.23%
S1.E	<i>Burkholderia</i> spp.	99%	98.73%
S2.B	<i>Rahnella</i> spp.	99%	98.76%
	<i>Serratia</i> spp.	99%	97.59%
S2.E	<i>Pseudomonas</i> spp.	100%	99.63%
S3.B	<i>Staphylococcus</i> spp.	99%	99.42%

Tabell 4.2.3.1 viser at query cover var mellom 99-100% og at identitetsscoren var fra 97,59-99,80% for alle prøvene. Prøve K2.B og S2.B fikk begge utslag for to ulike bakterier med høy identitetsscore, og det er derfor vanskelig å si sikkert hvilken bakterie det er i prøven. Prøve K1.C, K2.C, K3.E og S2.C hadde dårlige sekvenser og fikk ingen klare utslag ved sekvensering. Disse prøvene ble derfor ikke videre inkludert i studien.

#### 4.2.3.2 HELGENOMSEKVENSERING MED ILLUMINA MISEQ

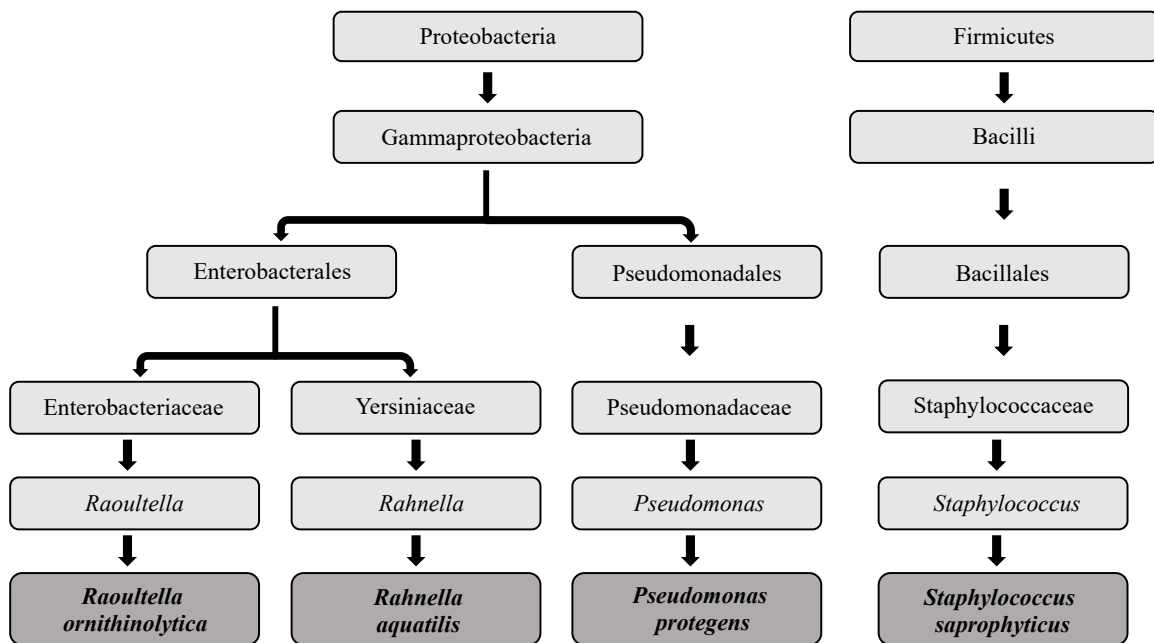
Det ble gjennomført helgenomsekvensering med Illumina MiSeq for utvalgte bakterier fra prøve B1.B, K1.E, K3.B og S3.B. Resultatene av sekvenseringen er oppgitt i tabell 4.2.3.2.1.

**Tabell 4.2.3.2.1.** Resultater fra helgenomsekvensering med Illumina MiSeq for prøve B1.B, K1.E, K3.B og S3.B.

Prøve	Art	
B1.B	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	100%
K1.E	<i>Pseudomonas protegens</i>	100%
K3.B	<i>Rahnella aquatilis</i>	100%
S3.B	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	96%

Tabell 4.2.3.2.1 viser at tre av prøvene ga 100% utslag for hver sin bakterieart, der prøve B1.B var *Raoultella ornithinolytica*, prøve K1.E var *Pseudomonas protegens* og prøve K3.B var *Rahnella aquatilis*. Prøve S3.B ga 96% utslag for *Staphylococcus saprophyticus*.

En oversikt over bakteriestammene som ble funnet i de ulike prøvene er vist i figur 4.2.3.2.



Figur 4.2.3.2. Oversikt over bakteriestammene som ble funnet i de ulike prøvene.

Figur 4.2.3.2 viser at *R. ornithinolytica* og *R. aquatilis* stammer fra Enterobacteriales, og sammen med *P. protegens* som stammer fra Pseudomonadaceae og Pseudomonadales, stammer de alle fra Gammaproteobacteria og Proteobacteria. *R. ornithinolytica* stammer fra Enterobacteriaceae og *R. aquatilis* stammer fra Yersiniaceae. *S. saprophyticus* stammer fra Firmicutes, Bacilli, Bacillales og Staphylococcaceae.

Helgenomsekvenseringen ga også utslag for ulike gener. Det ble gjort søk etter virulensgener i resultatene fra helgenomsekvenseringen, samt gener for toksiner og hemolysiner. Interessante funn er oppgitt i tabell 4.2.3.2.2, og en fullstendig oversikt over funnene er oppgitt i vedlegg D.



**Tabell 4.2.3.2.2.** Oversikt over ulike gener som ble påvist ved søk etter virulens, toksin og hemolysin etter helgenomsekvensering for prøvene som ble sendt til Illumina MiSeq.

	<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> <i>ornithinolytica</i>	<b>K1.E</b> <i>Pseudomonas</i> <i>protegens</i>	<b>K3.B</b> <i>Rahnella</i> <i>aquatilis</i>	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i>
<b>Virulens</b>	<i>ompA</i> <i>phoP/phoQ</i> <i>ybtA/ybtP/</i> <i>ybtQ/ybtX</i>	<i>algR/algU</i> <i>flgB</i> <i>fliG</i> <i>motA/motC</i> <i>phoQ/phoP</i> <i>pilH</i>	<i>bvgA/bvgS</i> <i>cheY</i> <i>flgG</i> <i>flhA</i> <i>fliA/fliG</i> <i>ompA</i> <i>phoP/phoQ</i>	<i>clpP</i>
<b>Toksin</b>	<i>higA/higB</i> <i>hipA/hipB</i>	<i>higA/higB</i> <i>mqsR</i> <i>ratA</i>	<i>higA/higB</i> <i>hipA/hipB</i> <i>mazE/mazF</i> <i>prlF/yhaV</i> <i>relE</i>	<i>mazE/mazF</i> <i>rot</i>
<b>Hemolysin</b>	<i>hha</i> <i>hlyB</i>	<i>hlyB</i> <i>shlA/shlB</i>	<i>shlA/shlB</i>	

Tabell 4.2.3.2.2 viser at det ble gjort funn av ulike virulensgener hos alle bakteriene. Det ble også funnet ulike toksiner. Ved søk etter hemolysiner ble det funnet gener av interesse hos alle bakteriene med unntak av *S. saprophyticus*.

Det ble også gjort søk etter resistensgener i resultatene fra helgenomsekvenseringen. Interessante resistensgener er oppgitt i tabell 4.2.3.2.3, og fullstendig oversikt over funnene er oppgitt i vedlegg E.

**Tabell 4.2.3.2.3.** Funn av ulike gener for antibiotikaresistens i prøvene som ble sendt til Illumina MiSeq.

Antibiotika	B1.B <i>Raoultella ornithinolytica</i>	K1.E <i>Pseudomonas protegens</i>	K3.B <i>Rahnella aquatilis</i>	S3.B <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	Resistensgener			
<b>β-laktam</b>	<i>bla<sub>ORN-1</sub></i>	<i>ampC</i>	<i>ampC</i> <i>bla<sub>RAHN-2</sub></i>	<i>blaZ</i>
<b>Fluorokinoloner</b>	<i>abaQ</i> <i>norB</i>	<i>abaQ</i>		
<b>Fosfomycin</b>	<i>abaF</i> <i>FosA5</i>	<i>abaF</i>	<i>abaF</i>	<i>FosB5</i> <i>FosD</i>
<b>Multiresistens</b>	<i>emrA/emrB</i> <i>marA/marR</i> <i>mexA/mexB</i> <i>oqxA/ oqxB</i>	<i>emrA/emrB</i> <i>mexA/mexB/ oprM</i> <i>mexE/mexF/oprN</i> <i>mexJ/mexK/opmH</i>	<i>emrA/emrB</i> <i>mexA/mexB</i> <i>oqxB</i>	<i>emrA/emrB</i>

Tabell 4.2.3.2.3 viser at det ble påvist resistensgener for β-laktam antibiotika og fosfomycin i alle de fire prøvene. Resistensgener for fluorokinoloner ble påvist fra *R. ornithinolytica* og *P. protegens*. Gener som kodet for resistent mot flere enn tre klasser antibiotika, og dermed karakteriseres som multiresistens-gener, ble funnet hos alle de fire bakteriene.

Ved søk etter resistensgener ble det også gjort funn av gener som koder for resistens mot desinfeksjonsmidler og ulike metaller. Resultatene er vist i tabell 4.2.3.2.4.

**Tabell 4.2.3.2.4.** Gener som koder for desinfeksjonsmidler og metaller for de ulike prøvene som ble sendt til Illumina MiSeq.

	B1.B <i>Raoultella ornithinolytica</i>	K1.E <i>Pseudomonas protegens</i>	K3.B <i>Rahnella aquatilis</i>	S3.B <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<b>Desinfeksjon</b>	<i>yaaA</i>	<i>ohrB/ohrR</i> <i>yaaA</i>	<i>ohrB/ohrR</i> <i>yaaA</i>	<i>ohr</i>
<b>Metaller</b>	<i>bhsA</i> <i>cnrA</i> <i>copA/copB/copD</i>	<i>bhsA</i> <i>czcA/czcC</i>	<i>copB/copC/copD</i> <i>czcA/czcB/czcC</i> <i>merR1</i> <i>pcoC</i>	

Tabell 4.2.3.2.4 viser at det ble gjort funn av tre ulike gener som alle koder for resistens mot desinfeksjonsmidler, inkludert hydrogenperoksid. Slike gener ble funnet i alle de fire bakteriene. Det ble også funnet gener som koder for resistens mot ulike metaller i alle prøvene, med unntak av *S. saprophyticus*. Genene som ble funnet koder for resistens mot blant annet kobber, nikkel, kobolt, sink og kadmium.

#### 4.2.4 SENSITIVITETSTESTING AV ANTIBIOTIKA

Det ble gjennomført MIC-testing av bakterier fra prøve B1.B (*R. ornithinolytica*), B1.C (*Stenotrophomonas* spp.), K1.E (*P. protegens*), K3.B (*R. aquatilis*), S1.C (*Lactobacillus* spp.) og S3.B (*S. saprophyticus*) for å identifisere resistens mot ulike typer antibiotika. Det ble testet for 12 ulike antibiotikatyper fordelt i 7 klasser. Gjennomsnittlig MIC-verdi av to paralleller er vist i tabell 4.3.4, sammen med EUCAST brytningspunkt for MIC (EUCAST, 2020). PK-PD-verdier ble benyttet for alle bakteriene, med unntak av for *Streptococcus* spp. som har egne verdier for enkelte antibiotikatyper. Resistensnivå deles inn i mottakelig ved standard dosering, mottakelig ved økt eksponering og resistent. Bilder og utdypende informasjon om de ulike testene er oppgitt i vedlegg F. Streptomycin har ingen brytningspunkt og årsaken er i følge EUCAST at sensitivitetstesting ikke anbefales ettersom artene er et dårlig mål for behandling med middelet. For alle de testede bakteriene, med unntak av *Streptococcus* spp. har EUCAST oppgitt «IE» som brytningspunkt for trimetoprim og erytromycin. Årsaken er at det ikke er tilstrekkelig bevis for at organismene er gode mål for behandling med disse midlene. Bakterier som vokste fritt i nærvær av midler som ikke hadde brytningspunkt, ble vurdert til å være resistente ettersom de ikke ble inhibert av antibiotikumet.

**Tabell 4.3.4.** Gjennomsnittlig MIC-verdi (mg/L) av to paralleller for de utvalgte prøvene, samt brytningspunkt for ulike antibiotika i henhold til EUCAST-verdier.

	EUCAST brytnings- punkt for MIC (mg/L)	Prøver (mg/L)				
		<b>B1.B</b> <i>Raoultella ornithinolytica</i>	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas spp.</i>	<b>K1.E</b> <i>Pseudomonas protegens</i>	<b>K3.B</b> <i>Rahnella aquatilis</i>	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<b>Penicilliner</b>						
AM	8	<b>16<sup>2</sup></b>	<b>≥256<sup>2</sup></b>	<b>≥256<sup>2</sup></b>	<b>56<sup>2</sup></b>	0,19
AMC	8	0,625	<b>≥256<sup>2</sup></b>	<b>≥256<sup>2</sup></b>	0,75	0,22
<b>Cefalosporiner</b>						
CT	2	0,012	<b>≥32<sup>2</sup></b>	<b>≥32<sup>2</sup></b>	1,75 <sup>3</sup>	<b>6<sup>2</sup></b>
FEP	8	0,0195	<b>≥256<sup>2</sup></b>	3	0,1575	2,5
<b>Karbapenemer</b>						
IP	4	0,19	<b>≥32<sup>2</sup></b>	1,5	0,125	0,047
MP	8	0,064	<b>≥32<sup>2</sup></b>	1,5	0,064	0,125
<b>Fluorokinoloner</b>						
CI	0,5 1 <sup>1</sup>	0,007	0,394 <sup>3</sup>	0,094	0,064	0,22 <sup>3</sup>
<b>Aminoglykosider</b>						
AK	1 8 <sup>1</sup>	<b>1,25<sup>2</sup></b>	<b>5<sup>2</sup></b>	0,75	<b>1<sup>2</sup></b>	0,19
GM	0,5 1 <sup>1</sup>	<b>1<sup>2</sup></b>	<b>1,74<sup>2</sup></b>	<b>0,625<sup>2</sup></b>	0,44	0,016
S	- <sup>4</sup>	2	20	10	0,875	0,625
<b>Pyrimidiner</b>						
TM	IE <sup>5</sup> 4 <sup>1</sup>	0,25	<b>≥32<sup>2</sup></b>	<b>≥32<sup>2</sup></b>	1,25	0,365
<b>Makrolider</b>						
EM	IE <sup>5</sup> 2 <sup>1</sup>	<b>≥256<sup>2</sup></b>	<b>≥256<sup>2</sup></b>	<b>≥256<sup>2</sup></b>	24	1,75 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Verdier for Staphylococcus spp.

<sup>2</sup> Resistent

<sup>3</sup> Mottakelig ved økt eksponering

<sup>4</sup> «-» indikerer at sensitivitetstesting ikke anbefales ettersom arten er et dårlig mål for behandling med middelet

<sup>5</sup> «IE» indikerer at det ikke er tilstrekkelig bevis for at organismen er et godt mål for behandling med middelet

Tabell 4.2.4 viser at prøve B1.B (*R. ornithinolytica*) var resistent mot ampicillin, amikacin, gentamicin og erytromycin. Prøve B1.C (*Stenotrophomonas* spp.) var resistent mot alle typer penicillin, cefalosporiner, trimetoprim, makrolider og karbapenemer den ble testet for. I tillegg var den resistent mot amikacin og gentamicin fra gruppen aminoglykosider. Prøven var mottakelig ved økt eksponering av ciprofloxacin. I tillegg skilte den seg ut med høy toleranse for streptomycin. Prøve K1.E (*P. protegens*) viste resistens mot alle typer penicillin, trimetoprim og makrolider. Den viste i tillegg resistens mot cefotaxim og gentamicin. Prøve K3.B (*R. aquatilis*) viste resistens mot ampicillin og amikacin og var mottakelig ved økt eksponering av cefotaxim. Prøve S3.B (*S. saprophyticus*) var resistent mot cefotaxim og mottakelig ved økt eksponering av ciprofloxacin og erytromycin.

Prøve S1.C (*Lactobacillus* spp.) vokste dårlig på MH agar og resultatene er derfor uklare. Ny analyse ble ikke gjennomført grunnet stengt laboratorium som følge av Coronaviruset.

## 5.0 DISKUSJON

### 5.1 FUNN AV BAKTERIER VED SEKVENSERING OG TIDLIGERE FUNN I MAT

Kolonier som vokste opp på de tre ulike agarskålene med blodagar, *Brilliance*<sup>TM</sup> *CRE* og *Brilliance*<sup>TM</sup> *ESBL*, ble benyttet til videre analyser. Fenotypiske resultater ble bestemt og prøvene ble sekvensert med sanger og helgenom. For prøvene som ble helgenomsekvensert vil bakteriestammen fra rMLST bli benyttet i diskusjonen, ettersom identifikasjon basert på helgenom er mest nøyaktig. Prøve K1.E og prøve K3.B fikk utslag for ulike bakterier fra sanger-sekvensering og helgenomsekvensering, men sistnevnte resultat vil bli benyttet videre i diskusjonen. Prøvene kan ha blitt byttet om ved forberedelse og innsending, noe som ikke kan sies med sikkerhet da det ble utført av noen andre enn meg. Det er imidlertid mulig at 16S-sekvensering og identifikasjon basert på helgenomsekvensering gir ulike resultater, spesielt for bakterier hvor det er få sekvenser i sekvensdatabasene (Lindstedt, 2020). I denne studien ble det benyttet en metode som medførte at det ikke var mulig å beregne antall kolonidannende enheter (kde) per gram matvare. Det er derfor umulig å si om innholdet av bakterier var høyt eller lavt, og om det kunne ha medført sykdom hos mennesker.

Prøve B1.B var en bakterie fra ferdigvasket bladsalat og kolonien ble plukket fra blodagar. Sanger-sekvensering viste at bakterien var *Raoultella* spp. Sekvensene fra helgenomsekvensering ble benyttet til å identifisere bakteriene ved hjelp av rMLST, og bekreftet at det var *R. ornithinolytica* som var tilstede i prøven. Denne bakterien hører til *Enterobacteriaceae* familien og er en G<sup>-</sup> aerob bakterie (Seng et al., 2016). Tidligere ble den klassifisert som *Klebsiella ornithinolytica*, men ble reklassifisert grunnet nye genetiske tilnærminger. *R. ornithinolytica* trives i akvatiske miljøer, men har også blitt funnet i sykehusmiljøer. Bakterien er tidligere isolert fra RTE-salat, sammen med flere andre *Enterobacteriaceae* (Manhique et al., 2020). Flere bakterier tilhørende *Enterobacteriaceae* familien er funnet i tarm hos mennesker og dyr, og funn i mat kan derfor indikere dårlig hygiene under prosessering.

Prøve K1.E vokste opp på ESBL agar og bakterien ble hentet fra blandet salat som tilhørte spiseklar kyllingsalat. Sanger-sekvensering viste at bakterien var en stamme av *Lactobacillus*, men helgenomsekvensering viste at bakterien var *P. protegens*. Videre i diskusjonen vil derfor bakterien omtales som *P. protegens*. Bakterien er G<sup>-</sup> og kjent for å være en utbredt plante-

beskytter, og er ofte isolert fra planterøtter (Ramette et al., 2011). Ettersom bakterien er utbredt blant planter kan dette være årsaken til at den ble funnet i salat i denne studien. *Pseudomonas* spp. er tidligere isolert fra RTE-salat i en annen studie, men det var ikke definert hvilken stamme av *Pseudomonas* som var tilstede i prøven (Tsironi et al., 2017).

Prøve K3.B var en bakterie fra pasta som var inkludert i spiseklar kyllingsalat. Kolonien ble hentet fra blodagar og sanger-sekvensering viste at bakterien var en stamme av *Bacillus* spp. Helgenomsekvensering viste imidlertid at bakterien var *R. aquatilis*, og det er denne det blir tatt utgangspunkt i, gjennom diskusjonen. Det var overraskende å finne *R. aquatilis* i pasta, ettersom det er et lite kjent tilfelle. Det er imidlertid kjent at *Bacillus* trives i pasta, og spesielt den patogene *Bacillus cereus* er mye isolert fra matvaren og har ført til flere sykdomsutbrudd (Granum, 2017, s.162). *R. aquatilis* tilhører *Enterobacteriaceae* familien, og er en sjeldent isolert bakterie (Koczura et al., 2016). Bakterien er mest funnet i ferskvann, men det har vært tilfeller der den har blitt funnet i mat. Den er funnet i flere prøver fra RTE-salat tidligere, samt i frukt og grønnsaker (Miralles et al., 2019). I tillegg er den vist å fungere som en matødeleggende bakterie i mat oppbevart i kjøleskap, deriblant kjøttprodukter.

Prøve S3.B vokste opp på blodagar og var fra ost som tilhørte spiseklar skinkesalat. Sanger-sekvensering viste at kolonien var fra *Staphylococcus* spp. og helgenomsekvensering bekreftet at bakterien var *S. saprophyticus*. Bakterien er en G<sup>+</sup>, ikke-hemolytisk kokk som er kjent for å være tilstede på menneskelig hud og slimhinner (Widerström et al., 2012). Bakterien har tidligere blitt funnet i ost, kjøtt og grønnsaker, samt hos dyr og i prøver fra miljøet.

Prøve B1.C ble kun sanger-sekvensert, noe som viste *Stenotrophomonas* spp. Bakterien ble funnet i bladsalat, og kolonien var fra CRE-agar. *Stenotrophomonas* spp. er mye funnet i miljøet og kan beskytte og fremme veksten av planter (Ryan et al., 2009). *Stenotrophomonas* spp. er en opportunistisk patogen bakterie som har mange virulensfaktorer og er forbudt med infeksjoner på sykehus (Kalidasan et al., 2018). Bakterien er utbredt globalt, og det finnes åtte ulike arter av bakterien. *Stenotrophomonas maltophilia* er den eneste arten av *Stenotrophomonas* spp. som er forbundet med sykdom hos mennesker, spesielt hos pasienter med nedsatt immunforsvar (Ryan et al., 2009). *S. maltophilia* har et signalsystem mellom celler som er relatert til produksjon av proteaser, virulensfaktorer og dannelse av biofilm. Det er tidligere gjort funn av *S. maltophilia* i RTE-salat, der bakteriens evne til å danne biofilm ble foreslått som en av årsakene (Qureshi et al., 2005). Det antas at vanlig vask av salaten før salg

ikke er tilstrekkelig for fjerning av bakterien, ettersom den kan danne biofilm på en rekke overflater.

## 5.2 VIRULENS

### 5.2.1 BAKTERIENES VIRULENS OG PATOGENITET

Det er vist at *R. ornithinolytica* har ført til flere ulike sykdommer, inkludert sykdom som har krevd sykehusinnleggelse (Seng et al., 2016). Faktorer som er involvert i bakteriens patogenitet inkluderer blant annet dens evne til å adhere til humant vev. I tillegg kan den omgjøre histidin til histamin, noe som kan medføre rødhet og muligens gi «diabetes fot». Studier har vist at *R. ornithinolytica* kan danne biofilm rundt blant annet urinkateter, noe som kan medføre urinveisinfeksjon (UVI). Det er registrert få tilfeller av sykdomsutbrudd med denne bakterien, men det antas å være underrapportert.

*Pseudomonas* bakterier er kjent for å tilpasse seg ulike miljøer og interagere med et utvalg organismer (Kupferschmied et al., 2014). *P. protegens* kan være patogen for insekter ved at den produserer toksiner som er giftige for insektene. Toksinene opptrer som sensorproteiner og er en viktig del av bakteriens patogenitet. Ved utskillelse av toksiner som dreper insekter kan bakterien fungere som en platebeskytter, noe den er mest kjent for. *P. protegens* ble i denne studien isolert fra ESBL-agar, og det er derfor ingen dokumentasjon på hemolyse på blodagar fra bakterien. Tidligere studier har heller ikke funnet at denne bakterien er hemolyserende eller humanpatogen.

*R. aquatilis* er en opportunistisk patogen bakterie som er detektert ved flere ulike infeksjoner (Miralles et al., 2019). Bakteriestammen kan medføre infeksjoner hos mennesker, spesielt hos personer med nedsatt immunforsvar og underliggende sykdom (Koczura et al., 2016). Det er også dokumentert tilfeller av sepsis som følge av bakterien. *R. aquatilis* har flere faktorer som gjør at den kan regnes som patogen (Tash, 2005). Blant annet har den et membranprotein som brukes til adhesjon på epitelceller, på samme måte som andre patogener har fimbrier. *R. aquatilis* har et lipopolysakkarid-endotoksin som kan være giftig. I tillegg er det vist at bakterien har et signalmolekyl som benyttes til quorum sensing, som er en form for kommunikasjon med andre celler. Slike signalmolekyler har vist å være viktig ved dannelse av biofilm og spiller sannsynligvis en viktig rolle for bakteriens patogenitet.



*S. saprophyticus* har reservoar gjennom hele mage-tarm kanalen hos mennesker (Raz et al., 2005). Bakterien er forbundet med ukomplisert UVI, spesielt hos unge kvinner, og er den nest vanligste årsaken til UVI etter *E. coli*. En ubehandlet infeksjon som følge av *S. saprophyticus* kan føre til nyrebekkenbetennelse eller nyrestein, og andre komplikasjoner som endokarditt eller sepsis er også dokumentert.

### 5.2.2 FUNN AV VIRULENSGENER FRA BAKTERIENE

OmpA er et multifunksjonelt protein som sitter i yttermembranen til flere bakterier tilhørende *Enterobacteriaceae* familien (Krishnan & Prasadarao, 2012). Proteinet har en strukturell rolle, samt at det fungerer som reseptor for flere bakteriociner og bakteriofager. OmpA interagerer med spesifikke reseptorer som initierer sykdom ved bakterieinfeksjoner som følge av G<sup>-</sup> bakterier. Proteinet kan interagere med F-plasmider ved konjugasjon og kan derfor også være involvert i HGT. Genet *OmpA* ble i denne studien påvist hos *R. ornithinolytica* og *R. aquatilis*, og koder for proteinet OmpA.

Fra *R. ornithinolytica* og *R. aquatilis* ble også genene *phoP* og *phoQ* påvist, i tillegg til fra *P. protegens*. PhoP-phoQ er et to-komponent system som er involvert i flere prosesser og aktiviteter hos G<sup>-</sup> bakterier (Groisman, 2001). PhoQ fungerer som en sensor på innermembranen og PhoP fungerer som en cytoplasmatiske regulator. Systemet bidrar til å styre bakteriers virulens, tilpasning til miljøer med begrenset magnesium og regulerer andre cellulære aktiviteter. Bakterier med phoP-phoQ-systemet kan være tilpasningsdyktige og genet *phoP* har vært forbundet med AR hos blant annet *Salmonella*. Genene *bvgA* og *bvgS* ble identifisert fra *R. aquatilis* og tilhører et annet to-komponentsystem, BvgS/BvgA (Beier & Gross, 2008). *BvgS* koder for virulens-sensorproteinet BvgS, og *bvgA* koder for transkripsjonsregulatoren BvgA. Systemet kontrollerer flere virulensfaktorer, inkludert flere toksiner, adhesjon og kolonisering.

Fra *P. protegens* og *R. aquatilis* ble det funnet ulike gener som har tilknytning til bakteriers bevegelse og flageller. Flageller er festet til bakterienes overflate og fungerer som et bevegelsesorgan (Tronsmo, 2016, s.47). Fimbrier og pilier er også festet til bakteriens overflate. Fimbrier bidrar til at bakteriene kan feste seg til overflater eller til hverandre og danne biofilm. Pilier er involvert i HGT ved overføring av DNA mellom G<sup>-</sup> bakterier. *PilH* koder for en type pili og ble påvist fra *P. protegens*. Proteinet likner på *cheY* (Jansari et al., 2016), som ble funnet hos *R. aquatilis*, og koder for et protein som er en del av en flagell som styrer bakteriens

kjemotakse. Begge genene er derfor involvert i regulering av bakteriens bevegelse. Flere gener som koder for proteiner som er deler av flageller, ble funnet hos *P. protegens* og *R. aquatilis*, deriblant *flgB* og *flgG*, *fliA* og *fliG*, *flhA*, samt *motA* og *motC*. Genene er relatert til flageller og er derfor involvert i bakterienes bevegelse.

Fra *S. saprophyticus* ble genet *clpP* påvist. Genet koder for en ATP-avhengig protease og er viktig for nedbrytning av proteiner i både eukaryote og prokaryote celler (Culp & Wright, 2017). ClpP har en rolle i celledeling, stresstoleranse, virulens og i utvikling av AR. Det er vist at ClpP-komplekser er viktige for G<sup>+</sup> bakteriers overlevelse under stress (Frees et al., 2003). I tillegg er ClpP en viktig virulensfaktor for flere patogene bakterier som *L. monocytogenes* og *Salmonella typhimurium*. Inaktivering av ClpP har vist å gi en reduksjon av hemolyse fra disse bakteriene.

Hos *R. ornithinolytica* ble det funnet fire ulike *ybt*-gener; *ybtA*, *ybtP*, *ybtQ* og *ybtX*. Slike gener koder for yersiniabactin som er en siderofore som fanger opp jern (Lam et al., 2018). Jern er essensielt for bakteriers overlevelse, og denne mekanismen gjør at de kan overleve og replikeres. Genet *ybt* blir ansett som en viktig virulensfaktor for *K. pneumoniae*, og slike gener er lokalisert på MGE, noe som gjør at de lett kan spres. *Ybt* er også funnet hos andre bakterier innen *Enterobacteriaceae* familien. *YbtP* og *ybtQ* er ABC-transportører på den indre cellemembranen, og er nødvendige for cellulær bruk av jernet som er bundet til *ybt* (Robinson et al., 2018). Det antas at *ybtX* er involvert i transport av sink, og at *ybtA* er en viktig transkripsjonsfaktor.

Genene *algR* og *algU* ble funnet hos *P. protegens*, og er proteiner forbundet med biosyntese av alginat (Ahmed, 2007). Alginatgener hos bakterier er plassert på kromosomer og det er kun *Pseudomonas* og *Azotobacter* som er kjent for å produsere alginat. Det er vist at alginat produsert av *P. aeruginosa* fungerer som en ekstracellulær matriks, som medfører dannelse av biofilm som kan beskytte bakterien mot blant annet antibiotika og humane forsvarsmekanismer. Fytopatogeniske *Pseudomonas*, inkludert plantebeskytteren *P. protegens*, produserer alginat som innkapsler og beskytter bakterien.

### 5.2.3 FENOTYPISK HEMOLYSE OG HEMOLYSINER

På blodagar vokste flere bakterier med beta-hemolyse, noe som kunne indikere at bakterien var patogen. Hemolysin er et stoff som ødelegger røde blodceller og gir hemolyse (Kierulf, 2019). Det ble observert beta-hemolyse på alle blodagarskålene, med unntak av fra prøve S3.B. Her

ble det observert kolonier uten hemolyse (gamma-hemolyse), noe som viste veksten av en ikke-hemolyserende bakterie. Sanger-sekvensering viste at det var stor sannsynlighet for at bakterien var *Staphylococcus* og rMLST viste at det med 96% sannsynlighet var *S. saprophyticus* som var isolert fra denne prøven. Resultatene stemmer dermed overens med funnene som ble gjort på blodagar, ettersom *S. saprophyticus* er en ikke-hemolyserende bakterie (Widerström et al., 2012). Det ble ikke funnet noen gener for hemolysiner ved helgenomsekvenseringen, noe som også stemmer overens med de fenotypiske resultatene og bakteriens egenskaper.

Ved søk etter hemolysin-gener ble *hha* påvist fra *R. ornithinolytica*. Genet *hha* koder for proteinet Hha, som er identifisert hos blant annet *E. coli* (Nieto et al., 2002). Hha er sammen med proteinet H-NS involvert i reguleringen av ekspresjonen av toksinet alfa-hemolysin, som en respons på osmolaritet og temperatur. Hha er derfor med på å styre og kontrollere hvor mye av alfa-hemolysin som blir dannet.

Genet *hlyB* ble identifisert fra *R. ornithinolytica* og *P. protegens*. Genet koder for proteinet hlyB og fungerer som et translokator sammen med hlyD (Koronakis et al., 1992). Sammen er de viktige for eksport av flere substrater i eukaryote- og prokaryote celler. De to proteinene er lokalisert i cellemembranen og eksporterer hemolysin ut av cellen. Det er vist at når hlyA og hlyB proteiner var tilstede samtidig, ble det økt hemolytisk aktivitet på blodagar, fra en ikke-hemolytisk stamme av *E. coli* (Robertson et al., 2006). Både *R. ornithinolytica* og *P. protegens* hadde i denne studien beta-hemolyse på blodagar, og genet *hlyB* kan ha vært involvert i bakterienes hemolyse-aktivitet.

Fra *P. protegens* og *R. aquatilis* ble genene *shlA* og *shlB* påvist. *R. aquatilis* hadde også genet *shlB*. De to genene er vist å være med på å bestemme hemolyseaktiviteten til *Serratia marcescens* (Könninger et al., 1999). *ShlA* koder for selve hemolysinet og *shlB* koder for et protein som er nødvendig for sekresjon av *shlA* ut av cellen. Genene kan ha vært involvert i beta-hemolysen på blodagar for bakteriene i denne studien.

#### 5.2.4 TOKSINER

TA-systemene kan deles i fem klasser, etter genetisk struktur og regulering (Unterholzner et al., 2013). TA-system type II er den mest studerte klassen, og her er både toksinet og antitoksinet små proteiner. Genene *higA* og *higB* ble funnet hos både *R. ornithinolytica*, *P. protegens* og *R. aquatilis*, og de tilhører denne klassen. *HigB* er toksin og *higA* er antitoksin. Disse genene koder

for HigB/HigA systemet som opprinnelig ble funnet på et plasmid (Wood & Wood, 2016). Senere har systemet også blitt funnet på kromosomer hos flere ulike patogene bakterier. Det er vist at dette systemet er involvert i patogenitet og at det kan påvirke bakteriens virulensfaktorer som swarming og formasjon av biofilm.

*HipA* og *hipB* ble funnet hos *R. ornithinolytica* og *R. aquatilis*. HipA er et toksin i form av en protein-kinase, og *hipB* er tilhørende antitoksin i form av et protein (Unterholzner et al., 2013). Dette TA-systemet er også en del av type II-klassen. HipA fosforylerer elongeringsfaktoren EF-Tu og forhindrer dens interaksjon med tRNA, noe som medfører hemming av translasjonen. Det er vist at overekspressjon av proteinet HipA har ført til multiresistens (MDR) hos *E. coli* (Schumacher et al., 2009).

Hos *R. aquatilis* og *S. saprophyticus* ble genene *mazE* og *mazF* påvist. Disse genene tilhører også TA-system type II, der *mazF* koder for toksinet MazF og *mazE* koder for antitoksinet MazE (Simanshu et al., 2013). MazF er kjent som en mRNA interferase, som spalter mRNA på en sekvensspesifikk og ribosom-uavhengig måte. Toksinet utøver sin virkning under stressende forhold, noe som medfører at celleveksten stanser. Under normale forhold inaktiveres toksinet MazF av antitoksinet MazE.

Fra *R. aquatilis* ble også genene *prlF* og *yhaV* påvist. Disse genene koder for et TA-system som består av proteinene PrlF og YhaV (Schmidt et al., 2007). *PrlF-yhaV* systemet anses som et nytt kromosomalt TA-system funnet i *E. coli* og det har flere likheter med tidligere karakteriserte TA-systemer. PrlF og YhaV er homologer av henholdsvis MazE og RelE, noe som viser en evolusjonær forbindelse mellom de mest studerte TA-systemene i *E. coli*. PrlF tilhører AbRB superfamilien av bakterielle transkripsjonsfaktorer sammen med antitoksiner fra blant annet TA-systemet *mazEF*. YhaV tilhører RelE superfamilien, som består av flere ulike toksiner fra andre TA-systemer, blant annet *relEB*.

Genet *relE* ble påvist hos *R. aquatilis*, men genet *relB* kunne ikke påvises i denne studien. Det betyr ikke nødvendigvis at genet ikke var tilstede, da gener kan ha ulike navn ved søk i PROKKA (Lindstedt, 2020). Sammen utgjør de to genene TA-systemet *relEB*, der *relE* fungerer som toksin og *relB* er et antitoksin (Pedersen et al., 2003). RelE fungerer som en interferase som vanligvis kutter mRNA mellom andre og tredje base når mRNA er bundet til

A-site på ribosomet. Dette medfører at translasjonen inhiberes. RelB kan nøytralisere RelE, slik at proteinsyntesen kan fortsette.

*RatA* ble funnet hos *P. protegens* og tilhører et type II TA-system sammen med *ratB* (Unterholzner et al., 2013). Sistnevnte gen ble ikke identifisert i denne studien. Toksinet *RatA* binder til 50S-underheten av ribosomer og forhindrer assosiering med 30S-underenheten slik at 70S ribosomer ikke kan dannes. Dette forhindrer elongering og hemmer dermed også translasjonen.

Genet *mqsR* ble påvist fra *P. protegens*, og er forbundet med dannelse av biofilm som følge av quorum sensing (Yamaguchi et al., 2009). Det er vist at *mqsR* aktiverer et to-komponentsystem, operonet *qseB-qseC*, som er kjent for å spille en rolle i dannelsen av biofilm. En studie har vist at *mqsR* danner et nytt TA-system sammen med genet *ygiT*. Sistnevnte gen ble ikke identifisert i denne studien, men det kan ha vært til stedet allikevel. *MqsR* fungerer alene som en mRNA interferase, men *YgiT* kan inhibere interferaseaktiviteten. I TA-systemet fungerer derfor *mqsR* som toksin og *ygiT* som et antitoksin.

Genet *rot* ble funnet hos *S. saprophyticus*. Genet er også funnet hos *S. aureus* der det fungerer som en transkripsjonsfaktor ved at det er en repressor for toksinet *Rot* (Killikelly et al., 2015). *Rot* har en viktig rolle i å regulere virulens, ved at det kan aktivere eller undertrykke promotorer som kontrollerer ekspresjonen av flere ulike virulensfaktorer.

## 5.3 ANTIBIOTIKARESISTENS

### 5.3.1 RESISTENS MOT $\beta$ -LAKTAM

Genet *ampC* koder for AmpC  $\beta$ -laktamase og ble påvist hos *P. protegens* og *R. aquatilis*. Enzymet AmpC medfører resistens mot  $\beta$ -laktam antibiotika (Philippon et al., 2002). Ved sensitivitetstesting viste både *P. protegens* og *R. aquatilis* resistens mot ampicillin, og *P. protegens* var i tillegg resistent mot amoxicillin. AmpC  $\beta$ -laktamaser er viktige cefalosporinaser, og fungerer ved enzymatisk inaktivering av cefalosporin-antibiotika (Jacoby, 2009). Genet er funnet på kromosomer til mange bakterier tilhørende *Enterobacteriaceae* familien. Bakterier som produserer AmpC er som regel resistente mot cefalosporiner, men hydrolyserer ikke cefepim like effektivt som andre antibiotikatyper innen denne klassen (Rodríguez-Baño et al., 2018). Dette stemmer overens med resultatene fra sensitivitetstesting av antibiotika, der hverken *P. protegens* eller *R. aquatilis* var resistente mot cefepim. *P. protegens* var derimot

resistent mot cefotaxim og *R. aquatilis* var mottakelig ved økt eksponering av denne antibiotikatypen.

Fra *S. saprophyticus* ble genet *blaZ* påvist. Dette genet fungerer også ved enzymatisk inaktivering av antibiotika (Ferreira et al., 2017). Genet koder for enzymet penicillinase som hydrolyserer  $\beta$ -laktamringen og inaktiverer penicillin. Det er vist at *blaZ* og denne mekanismen medfører resistens mot penicillin hos ulike stafylokokker. En studie som undersøkte isolater fra *S. saprophyticus* viste at alle isolatene som var resistente mot penicillin hadde også påvist genet *blaZ*. I denne studien var derimot *S. saprophyticus* stammen ikke resistent mot penicillin ved sensitivitetstesting med MIC.

Fra *R. ornithinolytica* ble genet *bla<sub>ORN-1</sub>* påvist, noe som koder for en bredspektret klasse A  $\beta$ -laktamase. Denne klassen av enzymer har tidligere vist at bakteriene blir resistente mot penicillin og de fleste typer cefalosporiner (FHI, 2019). Ved sensitivitetstesting i denne studien viste *R. ornithinolytica* resistens kun mot ampicillin fra klassen  $\beta$ -laktam. Andre studier har også funnet at *R. ornithinolytica* var resistent mot ampicillin, men også amoxicillin, tredjegerasjons cefalosporiner og karbapenem (Seng et al., 2016). Tidligere studier påpeker at tilstedeværelse av kromosomale *bla* gener er viktig for mekanismer som medfører resistens mot  $\beta$ -laktam hos *R. ornithinolytica*. En annen studie har også funnet *bla<sub>ORN-1</sub>* hos *R. ornithinolytica* og sammenlignet det med andre resistensgener (Walckenaer et al., 2004). Det ble observert flere likheter mellom dette genet og gener fra andre bakterier som koder for  $\beta$ -laktamaser. Studien foreslår derfor at *bla<sub>ORN-1</sub>* fra *R. ornithinolytica* kan være et resultat av HGT mellom bakterier på et tidligere tidspunkt.

Genet *bla<sub>RAHN-2</sub>* koder også for en bredspektret klasse A  $\beta$ -laktamase (Ruimy et al., 2010), og ble påvist fra *R. aquatilis*. Ettersom enzymer i denne klassen tidligere har vist å gi resistens mot penicillin og de fleste typer cefalosporiner (FHI, 2019), var dette forventet for bakterien i denne studien også. *R. aquatilis* stammen viste derimot kun resistent mot ampicillin, og i tillegg var den mottakelig ved økt eksponering av cefotaxim. En annen studie som undersøkte flere *Rahnella*-stammer viste at bakteriene var resistente, eller mottakelige ved økt eksponering, mot alle typer  $\beta$ -laktam de ble testet for, inkludert penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer.

### 5.3.2 RESISTENS MOT FLUOROKINOLONER

*AbaQ* ble påvist fra *R. ornithinolytica* og *P. protegens*, og koder for en resistens-transportør kalt *AbaQ* (Pérez-Varela et al., 2018). Transportøren er involvert i bevegelse av bakterier og virulens, men er også forbundet med resistens mot kinoloner. En studie har vist at genprodukter av *abaQ* koder for en aktiv efflux transportør, og medfører at bakterien blir resistent mot kinoloner. Genet *norB* koder også for en resistens-transportør, kalt *NorB* (Hooper & Jacoby, 2015), og ble i denne studien påvist fra *R. ornithinolytica*. Tidligere er genet funnet i *S. aureus*, der *NorB* var en viktig efflux pumpe. Ingen av bakteriene viste resistens mot kinoloner ved sensitivitetstesting i denne studien, men det er tidligere vist at *R. ornithinolytica* er resistent mot denne antibiotikaklassen (Seng et al., 2016). Det er også vist at flere *Pseudomonas* arter er resistente mot kinoloner (Luczkiewicz et al., 2015), men det er usikkert om *P. protegens* tidligere har vist resistens mot antibiotikaklassen.

### 5.3.3 RESISTENS MOT FOSFOMYCIN

Genet *abaF* ble påvist fra *R. ornithinolytica*, *P. protegens* og *R. aquatilis*, og koder for efflux-proteiner som pumper antibiotika ut av bakteriecellen (Sharma et al., 2016). En studie har vist at ekspresjon av genet medførte økt resistens mot fosfomycin. Ved forstyrrelser av *abaF* viste studien at bakterien ble mer mottakelig for fosfomycin, i tillegg til at bakterien fikk redusert dannelse av biofilm. Celler som tidligere har vært utsatt for fosfomycin hadde høyere sannsynlighet for ekspresjon av genet *abaF*. Dette kan tyde på at bakteriene som fikk påvist dette genet i denne studien, tidligere har blitt utsatt for fosfomycin.

*FosA5* ble påvist fra *R. ornithinolytica* og *fosB5* og *fosD* ble påvist fra *S. saprophyticus*. Alle de tre genene medfører enzymatisk inaktivering av antibiotikaklassen fosfomycin og gir resistens (Fu et al., 2016; Liu et al., 2017; Ma et al., 2015). Genet *fosA5* er en subtype av *fosA*, det er plasmid-mediert og stammer sannsynligvis fra *K. pneumoniae* (Ma et al., 2015). *FosA5* deler 80% identitet med *FosA* og 25% identitet *FosB*. Dette er enzymer som begge har blitt rapportert fra fosfomycin-resistent *Enterobacteriaceae*. *FosB* er også funnet hos MRSA, og en studie viste høy resistens mot fosfomycin hos disse bakteriene (Fu et al., 2016). Det er usikkert om *fosB5* er lokalisert på plasmid eller kromosom. *FosD* ble i denne studien påvist fra *S. saprophyticus* og tidligere er den rapportert fra andre *Staphylococcus* arter, inkludert den patogene *S. aureus* (Liu et al., 2017). En studie viste at *fosD* var plassert på et plasmid i *Staphylococcus arlette*, sammen med flere andre resistensgener.

#### 5.3.4 PÅVISNING AV MULTIRESISTENS VED SENSITIVITETSTESTING

Ved sensitivitetstesting med MIC ble flere av bakteriene som ble testet definert som multiresistente, da de var resistente mot tre eller flere klasser av antibiotika (Magiorakos et al., 2012). Sensitivitetstesting viste at *R. ornithinolytica* var multiresistent, da den var resistent mot tre klasser antibiotika, inkludert penicillin, aminoglykosider og makrolider. Andre studier har også funnet at denne bakterien var multiresistent (Seng et al., 2016). Penicilliner og aminoglykosider er inkludert i tidligere funn av resistens hos *R. ornithinolytica*, samt kinoloner og karbapenem.

*P. protegens* viste resistens mot penicillin, cefalosporiner, aminoglykosider, pyrimidiner og makrolider ved sensitivitetstesting med MIC. Tidligere studier har vist at bakteriestammen var resistent mot tre klasser antibiotika og den ble derfor definert som multiresistent (Luczkiewicz et al., 2015). Det ble undersøkt for andre typer antibiotika enn i denne studien, men cefalosporiner var inkludert som en av klassene som *P. protegens* var resistent mot i den tidligere studien.

*R. aquatilis* viste lavest resistens av bakteriene som ble sensitivitetstestet med MIC i denne studien. Bakteriestammen var resistent mot penicillin og aminoglykosider, og var mottakelig ved økt eksponering av amikacin fra klassen aminoglykosider. Bakterien var derfor ikke multiresistent, ettersom den kun viste resistens for to klasser antibiotika. Tidligere studier har også funnet at *R. aquatilis* var resistent mot flere typer penicillin, aminoglykosider og cefalosporiner (Koczura et al., 2016). I tillegg var bakterien resistent mot flere andre klasser antibiotika, inkludert pyrimidiner, og den ble derfor definert som multiresistent.

*S. saprophyticus* var også resistent mot cefalosporiner og mottakelig ved økt eksponering mot fluorokinoloner og makrolider, ved sensitivitetstesting med MIC. Bakterien kunne derfor ikke defineres som multiresistent. Tidligere studier har vist at bakteriestammen var resistent mot ampicillin, som er en type penicillin, og at den var resistent mot en type av cefalosporiner, kalt cefadroxil (Söderquist & Berglund, 2009). I tillegg var den resistent mot meticillin. I denne studien ble en koloni fra *S. saprophyticus* som vokste på blodagar sådd ut på MRSA-agar. Prøven viste ingen vekst av kolonier og var derfor negativ for vekst av MRSA. Den tidligere studien fant et genkompleks hos *S. saprophyticus* som lignet et kompleks i MRSA, og foreslår derfor at de to kan ha samme opprinnelse (Söderquist & Berglund, 2009). Meticillin inngår som en type penicillin og denne studien viste derfor at bakterien ikke var multiresistent. I tillegg



benyttes ikke lenger denne antibiotikaklassen, grunnet høy resistens blant bakterier, spesielt hos *S. aureus* (Stapleton & Taylor, 2002).

Prøven med *Stenotrophomonas* spp. ble ikke helgenomsekvensert, men ble sensitivitetstestet med MIC. Resultatene viste at bakterien var resistent mot alle antibiotikaklassene den ble testet for, med unntak av to. *Stenotrophomonas* spp. var mottakelig ved økt eksponering av ciprofloxacin og skilte seg fra de andre bakteriene med høy toleranse for streptomycin. Det var ingen brytningspunkt for streptomycin, men *Stenotrophomonas* spp. vokste tross høye konsentrasjoner av denne antibiotikaklassen, noe som tyder på økt resistens. Bakterien er tidligere definert som en MDR patogen bakterie (Kalidasan et al., 2018), noe den også ble i denne studien.

### 5.3.5 PÅVISNING AV MULTIRESISTENSGENER

Ved helgenomsekvensering ble det funnet flere gener som kodet for proteiner som er forbundet med multiresistens. Det ble ikke funnet gener som kodet for resistens mot alle antibiotikaklassene som bakteriene ble sensitivitetstestet for, men det betyr ikke nødvendigvis at bakteriene ikke hadde slike gener (Andersen et al., 2015). Gener som er knyttet til multiresistens er ofte forbundet med effluxpumper som transporterer antibiotika ut igjen av bakteriecellen og hindrer akkumulering inne i cellen. En slik pumpe har to bindingssteder, et for antibiotika som vender utover mot periplasma, og et bindingssted for H<sup>+</sup> ioner som vender innover mot cytoplasma. Når H<sup>+</sup> bindes til sitt bindingssted på den tomme effluxpumpen, øker pumpens bindingsaffinitet for antibiotika på den cytoplasmatiske siden og antibiotika binder på innsiden av pumpen. Deretter skjer det en konformasjonsendring, noe som medfører at bindingsstedene for antibiotika og H<sup>+</sup> skifter side. Det skjer en translokasjon av bindingsstedene gjennom pumpen og de ender med å vende i hver sin retning, der bindingsstedet for antibiotika nå vender utover mot periplasma og bindingsstedet for H<sup>+</sup> vender innover mot cytoplasma. Dette medfører at H<sup>+</sup> frigjøres inn i cellen, og antibiotika frigjøres ut av cellen. Til slutt reorienterer effluxpumpen seg, bindingsstedene er tilbake på sine opprinnelige plasser og pumpen er klar til å gjennomføre det samme igjen. Basert på aminosyresekvens og energikilde, så kan disse pumpene klassifiseres i fem grupper.

*EmrA* og *emrB* ble påvist fra alle de fire bakteriene under helgenomsekvensering, og koder for proteiner som eksporterer flere typer antibiotika ut av cellen (Lomovskaya et al., 1995). EmrAB er plassert på kromosomer, spesielt funnet i *E. coli* og koder for en MDR pumpe. Pumpen beskytter cellen fra blant annet antibiotika. I tillegg er den en av flere kjente effluxpumper fra

*S. enterica* (Andersen et al., 2015). EmrA er et membranprotein som bidrar til å frakte substrater over inner- og yttermembranen. EmrAB genene er regulert av et EmrR protein, som fungerer som en transkripsjonsregulator.

I denne studien ble genene *oqxA* og *oqxB* påvist fra *R. ornithinolytica* og *oqxB* ble påvist fra *R. aquatilis*. Tidligere studier har vist at genene kan være plassert på konjugative plasmider og sammen danne effluxpumpen OqxAB (Li et al., 2019). Overekspresjon av denne pumpen er forbundet med resistens mot flere klasser av antibiotika, inkludert kinoloner og pyrimidiner. I tillegg er det observert at pumpen er involvert i resistens mot flere typer desinfeksjonsmidler.

Genene *marA* og *marR* ble påvist fra *R. ornithinolytica*. Multipl antibiotikaresistens (*mar*) locus er funnet i blant annet *E. coli* og *Salmonella* og koder for et kromosomalt MDR system (Randall & Woodward, 2002). Dette systemet er sett i sammenheng med resistens mot en rekke antibiotikatyper, inkludert penicillin, tetrasyklin og kloramfenikol. I tillegg er det vist at *mar* locus er involvert i resistens mot ulike desinfeksjonsmidler. *Mar* locus består av to transkripsjonsenheter, der det ene kalles *marRAB*. MarA fungerer som aktivator, MarR fungerer som repressor og MarB har en ukjent funksjon. MarA oppregulerer flere gener, inkludert TolC, som er komponenter i AcrAB effluxpumpen som pumper antibiotika ut av cellen.

Effluxpumpen MexAB-OprM er forbundet med MDR hos blant annet *P. aeruginosa* (Ohene-Agyei et al., 2012). MexA er et membranfusjonsprotein, MexB er et protein plassert på den indre membranen som er medlem av RND og OprM er et yttermembranprotein. I denne studien ble genene *mexA* og *mexB* påvist fra *R. ornithinolytica*, *P. protegens* og *R. aquatilis*, og *oprM* ble påvist fra *P. protegens*. Yttermembranproteinet MexB gjenkjenner en rekke kjemiske komponenter, inkludert antibiotika, og kan funksjonelt være en substitutt for AcrB i AcrAB-TolC komplekset. MexB er sentral i pumpefunksjonen, der den velger antibiotika som skal pumpes ut av cellen (Akama et al., 2004). MexA er bundet til innermembranen via fettsyrer, og fungerer som et bindeledd mellom MexB og OprM.

*MexJ* og *mexK* ble påvist fra *P. protegens*, og sammen med *oprM* danner de MDR effluxproteinet MexJK-OprM (Chuanchuen et al., 2005). MexJ er et membranfusjonsprotein, MexK er innermembran RND transportør og OprM fungerer som et yttermembranprotein. Efflux-proteinet er forbundet med resistens mot makrolider og tetrasyklin. I denne studien ble også genet *opmH* påvist fra *P. protegens* og sammen med *mexJ* og *mexK* danner de efflux-

proteinet MexJK-OpmH. MexJ og MexK har samme funksjon som i MexJK-OprM, og OpmH fungerer som yttermembran-efflux-protein. MexJK-OpmH er forbundet med resistens mot triclosan. Fra *P. protegens* ble også genene *mexE*, *mexF* og *oprN* påvist. Disse genene er forbundet med MDR efflux-systemet MexEF-OprN, som også er identifisert hos *P. aeruginosa* (Köhler et al., 1999). MexE er et membranfusjonsprotein, MexF er en innermembran transportør og OprN fungerer som en yttermembran-kanal. MexEF-OprN er forbundet med resistens mot fluorokinoloner, kloramfenikol og trimetoprim.

## 5.4 ANNEN RESISTENS

### 5.4.1 DESINFEKSJON

Det er interessant å undersøke om bakterier har resistensgener for desinfeksjonsmidler, da det er sett i sammenheng med AR (Chapman, 2003). Når genene som utvikler resistens mot antibiotika eller desinfeksjon er plassert sammen på et MGE i form av et plasmid, transposon eller integron, oppstår ko-resistens. Kryss-resistens kan oppstå mellom ulike antimikrobielle midler som angriper samme mål. Når bakterier utsettes for en lavere konsentrasjon av desinfeksjonsmidler enn letal dose over tid, kan de utvikle resistens. Resistensgener kan oppstå ved mutasjoner, eller de kan overføres ved HGT. Bakterier som vokser i en biofilm er beskyttet og utsettes for lavere konsentrasjoner av middelet som påføres, og kan dermed utvikle resistens. Eksempler på desinfeksjonsmidler der det tidligere er påvist resistens, er kvartære ammoniumforbindelser (QAC) eller hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Oksidativt stress er en naturlig konsekvens av aerob metabolisme og bakterier har flere regulatorer som aktiveres under oksidativt stress (Chiang & Schellhorn, 2012). En av disse reguletoene er OxyR, som innvirker ved resistens mot H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Genet *yaaA* er et konservert protein som fungerer som et operon og reguleres av oxyR. Genet ble funnet i *R. ornithinolytica*, *P. protegens* og *R. aquatilis* i denne studien.

*Ohr* genet er også forbundet med oksidativt stress og står for «organisk hydroperoksid resistens» (Fuangthong et al., 2001). Genet koder for Ohr proteinet som er forbundet med stress induisert av organiske hydroperoksider, og beskytter celler mot hydroperoksider. Genet *ohr* ble påvist i *S. saprophyticus*, og fra *P. protegens* og *R. aquatilis* ble genene *ohrB* og *ohrR* påvist. Det er vist at *ohrB*, samt *ohrA*, bidrar til resistens mot organisk peroksid hos *Bacillus subtilis*. *OhrR* er med på å regulere *ohrA* og fungerer som en repressor som undertrykker funksjonen til *ohrA*. *OhrB* blir derimot ikke påvirket av *ohrR*.

#### 5.4.2 METALLER

Det er også sett en sammenheng mellom resistent mot ulike metaller og resistens mot antibiotika (Baker-Austin et al., 2006). Langvarig eksponering av metaller gir et økt seleksjonspress på bakterier, noe som potensielt kan bidra til AR. Det er funnet en sammenheng mellom resistens mot ulike metallioner og resistens mot ulike typer antibiotika. Resistens mot blant annet kobber er forbundet med redusert permeabilitet i cellemembranen og resistens mot  $\beta$ -laktam og ciprofloxacin. Gener som koder for slik resistens inkluderer *bhsA* som ble påvist fra *R. ornithinolytica* og *P. protegens*, *cnrA* som ble påvist fra *R. ornithinolytica* og *pcoC* som ble påvist fra *R. aquatilis*. Geneene *copA*, *copB* og *copD* koder også for kobberresistensproteiner, og ble funnet fra *R. ornithinolytica* og *R. aquatilis*.

$\beta$ -laktam resistens er også sett i sammenheng med resistens mot kobber, sink og kadmium, der resistensmekanismen inkluderer effluxpumper (Baker-Austin et al., 2006). Geneene *czcA*, *czcB* og *czcC* koder for slik resistens og ble påvist fra *R. aquatilis*. Resistens mot kvikksølv kan ses i sammenheng med genet *merRI* som også ble funnet hos *R. aquatilis*. Slik resistens kan forårsakes av endring av målsted og føre til resistens mot  $\beta$ -laktam eller ciprofloxacin.

#### 5.5 ØVRIGE FUNN

De resterende prøvene ble kun sekvensert ved bruk av sanger-metoden, og vil derfor omtales videre som stammen de ble identifisert som ved bruk av denne metoden. *Pseudomonas* spp. ble funnet i både prøve B1.E og S2.E fra ESBL-skåler og K1.B og S1.B fra blodagar. Prøvene var fra henholdsvis bladsalat, skinke, salat fra kyllingsalat og salat fra skinkesalat. Det er gjort tidligere funn av *Pseudomonas* i salat, og bakterien har blitt omtalt som den slekten det forekommer mest av i bladsalat (Tsironi et al., 2017). Slekten blir ansett som en matødelegger som bidrar til brun farge på salaten. Bakterien er også kjent som en matødelegger i blant annet RTE-kjøtt, inkludert skinke, spesielt oppbevart ved lave temperaturer (Caldera et al., 2016). *Pseudomonas* produserer varmem stabile lipaser og proteaser som bryter ned henholdsvis fett og proteiner til andre komponenter som ødelegger maten. Fra tidligere er det registrert resistens mot flere typer antibiotika blant flere stammer av *Pseudomonas* (Luczkiewicz et al., 2015). Sykdom som følge av bakterien er mest utbredt blant planter, men noen medlemmer av *Pseudomonas* spp. blir ansett som patogener eller opportunistiske patogener. De er spesielt en bekymring blant personer med nedsatt immunforsvar, spesielt dersom bakteriene har utviklet resistens.

Prøve K2.B fra kylling og S2.B fra skinke, begge isolert fra blodagar, viste ved sanger-sekvensering at det kunne være både *Rahnella* spp. og *Serratia* spp. som vokste. Begge artene er *Enterobacteriales* som blir ansett som matødeleggere (Geeraerts et al., 2019b). Tidligere er det funnet både stammer av *Rahnella* og *Serratia* i RTE-kylling som var pakket i modifisert atmosfære (MAP) og oppbevart ved kjølige temperaturer. Slik pakking inkluderer nitrogengass som benyttes som en fyllgass, samt karbondioksid som har en antimikrobiell effekt (Geeraerts et al., 2019a). Under slike forhold er det også observert tilfeller av de to bakteriestammene i skinke. *S. marcescens* er den vanligste stammen av *Serratia* spp. og er assosiert med infeksjoner hos mennesker (Iguchi et al., 2014). *S. marcescens* blir ansett som en opportunistisk patogen bakterie. Det er funnet gener som koder for resistenszymer som er ansvarlige for høye nivåer av multiresistens hos denne stammen. Ved søk i litteraturen etter *Rahnella* er det flest treff for *R. aquatilis*, noe som tyder på at det er den mest kjente stammen. Som tidligere diskutert er bakterien forbundet med infeksjoner hos mennesker og den har ved flere tilfeller vist resistens mot flere typer antibiotika.

Fra salat fra skinkesalaten viste sanger-sekvensering at det var *Lactobacillus* spp. som vokste i prøve S1.C på CRE-skål og at *Burkholderia* spp. vokste i prøve S1.E på ESBL-skål. *Lactobacillus* spp. inkluderes i gruppen melkesyrebakterier (LAB), og slike bakterier er tidligere isolert fra salat og andre grønnsaker (Bamidele et al., 2013). LAB isolert fra slike matvarer har vist å ha en inhiberende effekt på MRSA, spesielt når de vokser sammen med patogene mikroorganismer. En annen studie har vist at stammer av *Lactobacillus* har en antimikrobiell aktivitet mot CRE (Chen et al., 2019). Studien foreslår derfor at *Lactobacillus*-stammer kan benyttes til matkonservering eller til å kontrollere og hindre infeksjoner med CRE. I denne studien vokste *Lactobacillus* spp. opp på en CRE-skål, som vil si at bakterien viste resistens mot karbapenem. En annen studie har vist at *Lactobacillus* isolert fra salat og andre grønnsaker var resistent mot flere typer antibiotika, inkludert flere ulike karbapenem (Nipa et al., 2011). Noen av bakteriene var også multiresistente.

*Burkholderia* spp. er forbundet med infeksjoner hos mennesker og dyr, og flere av stammene er forbundet med livstruende sykdommer (Schmooock et al., 2009). Noen *Burkholderia* kan forårsake lungebetennelse og sepsis, og andre er assosiert med luftveissykdom hos personer med cystisk fibrose. Det er lite forskning på om stammer av denne bakterien er funnet i mat, men både dyr og mennesker kan smittes av bakterien gjennom for eksempel vann eller i kontakt med kontaminert jord. Det er derfor trolig at bakterien kan ha fulgt med salaten, etter

kontaminering fra jord eller vann. I denne studien ble *Burkholderia* spp. isolert fra en ESBL-skål, noe som indikerte at den hadde produksjon av  $\beta$ -laktamaser. Tidligere studier har også påvist  $\beta$ -laktamaser fra ulike *Burkholderia*-stammer (Rhodes & Schweizer, 2016). Bakterien har blitt definert som multiresistent, da den har vist resistens mot blant annet  $\beta$ -laktam, fluorokinoloner og trimetoprim.

Sanger-sekvensering viste at *Herbaspirillum* spp. vokste i prøve K2.E på ESBL-skål fra kylling. Bakterie-slekten er assosiert med planter, men er også isolert fra akvatiske miljøer og jord (Marques et al., 2015). *Herbaspirillum* spp. er sjelden assosiert med infeksjoner hos mennesker, men det er vist at den kan ha en rolle som humanpatogen. Bakterien har blitt isolert fra blod hos mennesker som har blant annet cystisk fibrose og leukemi. Det er ikke vist at den kan produsere toksiner som fører til hemolyse av eukaryote celler, og *Herbaspirillum* stammer defineres derfor som opportunistiske humanpatogener. I denne studien vokste bakterien på en ESBL-skål, noe som indikerte at den hadde produksjon av  $\beta$ -laktamaser. Tidligere er det vist at bakterien var resistent mot blant annet polymyxin B (Marques et al., 2015).

## 5.6 FORSLAG TIL VIDERE FORSKNING

Etter funn av både hemolyse- og  $\beta$ -laktamase-produserende bakterier i denne studien, er det behov for videre forskning. En del av den videre forskningen vil inkludere tilstedeværelsen av mulige patogene mikroorganismer i spiseklar mat, der salat er et viktig produkt på markedet. Det vil være viktig å kartlegge mangfoldet av bakterier i slike matvarer og hvor mye som er tilstede i maten. Er bakteriene patogene og er det nok tilstede i maten til å forårsake sykdom? Videre kan hygiene undersøkes i alle ledd av produksjonen av spiseklar salat, fra jord til bord. Hvordan er rutinene ved høsting og distribusjon av salaten, og hvordan behandles den før pakking? Både arbeidere og utstyr kan undersøkes. I tillegg kan det undersøkes om salaten har behov for mer behandling enn kun skylning med vann for at den kan kalles spiseklar. Andre ingredienser som inkluderes i RTE-salat kan også undersøkes, da det er gjort funn av bakterier her også. Dette inkluderer tilstrekkelig varmebehandling av kjøttprodukter, pakkemetoder og generell hygiene under produksjonen.

Ettersom det er gjort funn av ARB i både miljø og mat, vil det være viktig å undersøke dette videre. Spredning til mennesker er en bekymring og det er behov for å kartlegge tilstedeværelsen av slike bakterier i matvarer. Det vil være interessant å undersøke salat som både er produsert i Norge og som er importert, og undersøke om bakteriene er resistente mot

antibiotika. Kanskje er det en sammenheng mellom hvor salaten kommer fra og forekomsten av resistens. Det kan også være en sammenheng mellom bakteriestammene som detekteres og forekomst av AR.

Det er viktig at mat som kalles spiseklar faktisk kan spises direkte uten at konsumenten trenger å vaske eller varmebehandle den. Derfor vil det være viktig å kartlegge type bakterier, hvor mye bakterier og utbredelsen av AR blant bakteriene. Det kan benyttes både fenotypiske og genotypiske metoder, som gjennomført i denne studien. For videre forskning kan imidlertid et større utvalg av salater undersøkes for at utvalget skal være representativt. I tillegg vil det være viktig å benytte metoder som kan bestemme mengden bakterier som detekteres fra prøvene, for å vite om konsumenten kan bli syk etter konsum.

## KONKLUSJON

I denne studien ble det funnet mange ulike bakteriestammer fra RTE-salat, både fra salat og tilbehøret. Flere av bakteriene vokste med beta-hemolyse på blodagar, noe som indikerte at de kunne være patogene. Ved helgenomsekvensering ble det påvist gener for ulike virulensfaktorer, inkludert hemolysiner og toksiner, noe som kunne indikere at bakterien kan medføre sykdom hos mennesker. *R. ornithinolytica*, *R. aquatilis* og *S. saprophyticus* har tidligere vist at de kan medføre infeksjoner hos mennesker, og *P. protegens* er mest kjent som toksisk for insekter.

Det ble observert fenotypisk vekst av kolonier på selektiv agar, noe som tilsa at bakteriene var resistente mot antibiotikaklassen som var til stede i vekstmediet. Det ble påvist resistensgener for flere ulike typer antibiotika hos bakteriene som ble helgenomsekvensert. Genene kodet blant annet for resistens mot  $\beta$ -laktam, fluorokinoloner og fosfomycin. Flere av bakteriene hadde også gener som kodet for multiresistens. Ved sensitivitetstesting ble *R. ornithinolytica*, *P. protegens* og *Stenotrophomonas* spp. definert som multiresistente, noe tidligere studier også har konkludert med. Det ble i tillegg oppdaget gener som koder for resistens mot desinfeksjonsmidler og ulike metaller, noe som kan ha en sammenheng med AR.



## REFERANSER

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology*. 3. utg. University of Surrey, Guildford, UK: RSC Publishing.
- Ahmed, N. (2007). Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Current genomics*, 8 (3): 191-202.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S.-i., Tsukihara, T., Nakagawa, A. & Nakae, T. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (25): 25939-25942.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (4): 251-259.
- Andersen, J. L., He, G.-X., Kakarla, P., KC, R., Kumar, S., Lakra, W. S., Mukherjee, M. M., Ranaweera, I., Shrestha, U. & Tran, T. (2015). Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *International journal of environmental research and public health*, 12 (2): 1487-1547.
- Bajaj, P., Singh, N. S. & Viridi, J. S. (2016). Escherichia coli  $\beta$ -lactamases: what really matters. *Frontiers in microbiology*, 7: 417.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in microbiology*, 14 (4): 176-182.
- Bamidele, T., Adeniyi, B., Ayeni, F., Fowora, M. & Smith, S. (2013). The antagonistic activities of Lactic acid bacteria isolated from Nigerian salad vegetables against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Global Research Journal of Microbiology*, 3 (1): 18-23.
- Beier, D. & Gross, R. (2008). The BvgS/BvgA phosphorelay system of pathogenic *Bordetellae*. I: *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*, s. 149-160: Springer.
- Bhunia, A. K. & Heldman, D. R. (2018). *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. 2nd ed. 2018 utg. Food Science Text Series. New York, NY: New York, NY: Springer New York.
- Bush, K. & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54 (3): 969-976.

- Caldera, L., Franzetti, L. v., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food microbiology*, 54: 142-153.
- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C. & Antunes, P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International journal of food microbiology*, 166 (3): 464-470.
- Carvalho, I. T. & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment International*, 94: 736-757.
- CDC. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. U.S. Department of Health and Human Services: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (lest 15.04.20).
- Chaitanya, P. J., Chandrashekar, R., Bhavani, N. L. & Kudle, K. R. (2014). A comparative study of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents- Cephalosporin, Cloxacillin and Sulbactam on gram-negative and gram-positive bacterial organisms *Salmonella typhi* and *Staphylococci*. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3 (1): 43-48.
- Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International biodeterioration & biodegradation*, 51 (4): 271-276.
- Chen, C.-C., Lai, C.-C., Huang, H.-L., Huang, W.-Y., Toh, H.-S., Weng, T.-C., Chuang, Y.-C., Lu, Y.-C. & Tang, H.-J. (2019). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in microbiology*, 10: 789.
- Chiang, S. M. & Schellhorn, H. E. (2012). Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 525 (2): 161-169.
- Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D. & Horng, H. (2019). Global contributors to antibiotic resistance. *Journal of global infectious diseases*, 11 (1): 36.
- Chowdhury, R., Haque, M., Islam, K. & Khaleduzzaman, A. (2009). A review on antibiotics in an animal feed. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 38 (1-2): 22-32.
- Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N. & Schweizer, H. P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (5): 2133-2136.

- Codjoe, F. S. & Donkor, E. S. (2018). Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, 6 (1): 1.
- Culp, E. & Wright, G. D. (2017). Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of antibiotics*, 70 (4): 366-377.
- Dallenne, C., Da Costa, A., 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 (3): 490-495.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74 (3): 417-433.
- EUCAST. (2020). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0*: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Tilgjengelig fra: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10\\_0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10_0_Breakpoint_Tables.pdf) (lest 17.03.2020).
- Falomir, M. P., Gozalbo, D. & Rico, H. (2010). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2: 1175-1181.
- Ferreira, A. M., Martins, K. B., Silva, V. R. d., Mondelli, A. L. & Cunha, M. d. L. R. d. (2017). Correlation of phenotypic tests with the presence of the bla<sub>Z</sub> gene for detection of beta-lactamase. *brazilian journal of microbiology*, 48 (1): 159-166.
- FHI. (2014). *Mat- og vannbårne infeksjoner i Norge*: Folkehelseintituttet. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/mat-og-vannbarne-infek/> (lest 04.05.2020).
- FHI. (2019). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell*: Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/#om-esbl> (lest 23.04.2020).
- Frees, D., Qazi, S. N., Hill, P. J. & Ingmer, H. (2003). Alternative roles of ClpX and ClpP in Staphylococcus aureus stress tolerance and virulence. *Molecular microbiology*, 48 (6): 1565-1578.
- Fu, Z., Liu, Y., Chen, C., Guo, Y., Ma, Y., Yang, Y., Hu, F., Xu, X. & Wang, M. (2016). Characterization of fosfomycin resistance gene, fosB, in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *PloS one*, 11 (5).

- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. & Helmann, J. D. (2001). OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 183 (14): 4134-4141.
- Furuya, E. Y. & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4 (1): 36-45.
- Geeraerts, W., Borremans, W., De Vuyst, L., Leroy, F. & Van Kerrebroeck, S. (2019a). The application of selected ion flow tube-mass spectrometry to follow volatile formation in modified-atmosphere-packaged cooked ham. *Food Research International*, 123: 601-611.
- Geeraerts, W., De Vuyst, L., Leroy, F. & Van Kerrebroeck, S. (2019b). Monitoring of volatile production in cooked poultry products using selected ion flow tube-mass spectrometry. *Food research international*, 119: 196-206.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Canton, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1): 1-4.
- Grada, A. & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology*, 133 (8): e11.
- Granum, P. E. (2017). *Matforgiftning: smitte gjennom mat og vann*. 4. utg. utg. Oslo: Cappelen Damm akademisk.
- Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of bacteriology*, 183 (6): 1835-1842.
- Gullberg, E. (2014). *Selection of Resistance at very low Antibiotic Concentrations*: Uppsala University.
- Gustafson, R. H. & Bowen, R. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of applied microbiology*, 83 (5): 531-541.
- Hooper, D. C. & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York academy of sciences*, 1354 (1): 12.
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Kurokawa, K., Oshima, K., Hattori, M. & Parkhill, J. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome biology and evolution*, 6 (8): 2096-2110.
- Illumina Inc. (2017). *An introduction to next-generation sequencing technology*.
- Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *Bmj*, 352: h6420.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22 (1): 161-182.

- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9): 2761. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- Jansari, V. H., Potharla, V. Y., Riddell, G. T. & Bardy, S. L. (2016). Twitching motility and cAMP levels: signal transduction through a single methyl-accepting chemotaxis protein. *FEMS microbiology letters*, 363 (12).
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalarathna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K. & Cody, A. J. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, 158 (Pt 4): 1005.
- 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.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians.(Review Article). *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33 (3): 300. doi: 10.4103/joacp.JOACP\_349\_15.
- Kierulf, P. (2019). *Hemolysin*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/hemolysin> (lest 06.05.2020).
- Killikelly, A., Benson, M. A., Ohneck, E. A., Sampson, J. M., Jakoncic, J., Spurrier, B., Torres, V. J. & Kong, X.-P. (2015). Structure-based functional characterization of repressor of toxin (Rot), a central regulator of *Staphylococcus aureus* virulence. *Journal of bacteriology*, 197 (1): 188-200.
- Klein, J. (2020). *Virulens*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/virulens> (lest 11.05.2020).
- Koczura, R., Mokracka, J. & Makowska, N. (2016). Environmental Isolate of *Rahnella aquatilis* Harbors Class 1 Integron. *Current microbiology*, 72 (1): 64-67.
- Koronakis, V., Stanley, P., Koronakis, E. & Hughes, C. (1992). The HlyB/HlyD-dependent secretion of toxins by Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology immunology*, 5 (1-3): 44-53.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (17): 5112-5120.

- Krishnan, S. & Prasadarao, N. V. (2012). Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *The FEBS journal*, 279 (6): 919-931.
- Kupferschmied, P., Pechy-Tarr, M., Imperiali, N., Maurhofer, M. & Keel, C. (2014). Domain shuffling in a sensor protein contributed to the evolution of insect pathogenicity in plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. *PLoS pathogens*, 10 (2).
- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K. & Pechère, J.-C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 181 (20): 6300-6305.
- Könninger, U. W., Hobbie, S., Benz, R. & Braun, V. (1999). The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Molecular microbiology*, 32 (6): 1212-1225.
- Lam, M. M., Wick, R. R., Wyres, K. L., Gorrie, C. L., Judd, L. M., Jenney, A. W., Brisse, S. & Holt, K. E. (2018). Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microbial genomics*, 4 (9).
- 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.
- Life Technologies. (2014). *Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements*: Thermo Fisher Scientific Inc. . Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory%20Instruments/Files/1014/Qubit-fluorometric-quantitation-vs-spectrophotometer-measurements.pdf> (lest 07.04.2020).
- Lindstedt, B.-A. (2020). *Personlig kommunikasjon*. Ås: NMBU: (Våren 2020).
- Liu, B.-H., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y., Pan, Y., Kong, L.-H., Xiang, R., Wang, Y.-X., Yang, Y.-X. & Wang, H.-N. (2017). Colocation of the multiresistance gene *cfp* and the fosfomycin resistance gene *fosD* on a novel plasmid in *Staphylococcus arlettae* from a chicken farm. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61 (12): e01388-17.
- Livermore, D. M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J., Norrby, R., Tillotson, G., et al. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (9): 1941-1944. 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.
- Lomovskaya, O., Lewis, K. & Matin, A. (1995). EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *Journal of bacteriology*, 177 (9): 2328-2334.
- Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K. & Fudala-Ksiazek, S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (24): 19823-19834.
- Ma, Y., Xu, X., Guo, Q., Wang, P., Wang, W. & Wang, M. (2015). Characterization of fosA5, a new plasmid-mediated fosfomycin resistance gene in *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, 60 (3): 259-264.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G. & Olsson-Liljequist, B. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18 (3): 268-281.
- Manhique, G. A., Hessel, C. T., Plessis, E. M. D., Lopes, S. M., de Oliveira Elias, S., Tondo, E. C. & Korten, L. (2020). Prevalence of Enterobacteriaceae on Ready to Eat Salads, Drinking Water and Surfaces in Food Markets of Maputo, Mozambique. *Journal of Food and Nutrition Research*, 8 (1): 63-73.
- Marques, A. C., Paludo, K. S., Dallagassa, C. B., Surek, M., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Cruz, L. M., LiPuma, J. J., Zanata, S. M. & Rego, F. G. (2015). Biochemical characteristics, adhesion, and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum* spp. *Journal of clinical microbiology*, 53 (1): 302-308.
- Martínez, J. L. & Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala journal of medical sciences*, 119 (2): 68-77.
- Matlock, B. (2015). *Assessment of Nucleic Acid Purity*. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2FProduct-Bulletins%2FTN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf&title=QXNzZXNzbWVudCBvZiBOdWNsZWljIEFjaWQgUHVyaXR5> (lest 07.04.2020).

- Medina, E. & Pieper, D. H. (2016). Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. I: *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, s. 3-33: Springer.
- Miralles, M. M., Maestre-Carballa, L., Lluesma-Gomez, M. & Martinez-Garcia, M. (2019). High-Throughput 16S rRNA Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria and Foodborne Pathogens: A Case Example in Ready-to-Eat Food. *Foods*, 8 (10): 480.
- Nieto, J., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J., Rodriguez, S. & Juarez, A. (2002). Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *Journal of bacteriology*, 184 (3): 629-635.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78: 119-146.
- Nipa, M. N., Mazumdar, R. M., Hasan, M. M., Fakruddin, M., Islam, S., Bhuiyan, H. R. & Iqbal, A. (2011). Prevalence of multi drug resistant bacteria on raw salad vegetables sold in major markets of Chittagong city, Bangladesh. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 10 (1): 70-77.
- NORM/NORM-VET. (2018). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø/Oslo.
- Norman, A., Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364 (1527): 2275-2289.
- O'NEILL, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. Review on Antimicrobial Resistance.
- Ohene-Agyei, T., Lea, J. D. & Venter, H. (2012). Mutations in MexB that affect the efflux of antibiotics with cytoplasmic targets. *FEMS microbiology letters*, 333 (1): 20-27.
- Okamoto, M. P., Nakahiro, R. K., Chin, A., Bedikian, A. & Gill, M. A. (1994). Cefepime: a new fourth-generation cephalosporin. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 51 (4): 463-477.
- Oxoid. (2008). *Brilliance™ MRSA*. Thermo Fisher Scientific. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/mrsa/27659-Data-MRSA.pdf> (lest 20.03.2020).
- Oxoid. (2010). *Brilliance™ ESBL*. Thermo Fisher Scientific. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/oxoid-Brilliance-ESBL.pdf> (lest 13.03.2020).
- Oxoid & Remel. (2011). *Brilliance CRE*. Thermo Fisher Scientific Tilgjengelig fra: <http://ams.ro/wp-content/uploads/2012/09/Brilliance-CRE.pdf> (lest 13.03.2020).



- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31 (4): e00088-17.
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K. & Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, 112 (1): 131-140.
- Percival, S. L., Williams, D., Cooper, T. & Randle, J. (2014). *Biofilms in infection prevention and control: A healthcare handbook*: Academic Press.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J. & Barbé, J. (2018). Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62 (9): e00906-18.
- Pesavento, G., Calónico, C., Ducci, B., Magnanini, A. & Nostro, A. L. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food microbiology*, 41: 1-7.
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (1): 1-11.
- Poirel, L., Naas, T. & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54 (1): 24-38.
- Qureshi, A., Mooney, L., Denton, M. & Kerr, K. G. (2005). *Stenotrophomonas maltophilia* in salad. *Emerging infectious diseases*, 11 (7): 1157.
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J.-M., Défago, G., Sutra, L. & Moëgne-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and applied microbiology*, 34 (3): 180-188.
- Randall, L. & Woodward, M. J. (2002). The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Research in veterinary science*, 72 (2): 87-93.
- Raz, R., Colodner, R. & Kunin, C. M. (2005). Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*? *Clinical infectious diseases*, 40 (6): 896-898.
- Redondo, L. M., Chacana, P. A., Dominguez, J. E. & Fernandez Miyakawa, M. E. D. (2014). Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in microbiology*, 5: 118.
- Remel & Oxoid. (2008). *Blood Agar (TSA with Sheep Blood) Medium*: ThermoFisher Scientific. Tilgjengelig fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PB5012A?SID=srch-hj-PB5012A#/PB5012A?SID=srch-hj-PB5012A> (lest 06.04.2020).

- Rhodes, K. A. & Schweizer, H. P. (2016). Antibiotic resistance in Burkholderia species. *Drug Resistance Updates*, 28: 82-90.
- Robertson, K. P., Smith, C. J., Gough, A. M. & Rocha, E. R. (2006). Characterization of Bacteroides fragilis hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. *Infection and immunity*, 74 (4): 2304-2316.
- Robinson, A. E., Lowe, J. E., Koh, E.-I. & Henderson, J. P. (2018). Uropathogenic enterobacteria use the yersiniabactin metallophore system to acquire nickel. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (39): 14953-14961.
- Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P. & Müller, E. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant—the intensity of antibiotic action. *Deutsches Ärzteblatt International*, 105 (39): 657.
- Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I. & Pascual, A. (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, 31 (2): e00079-17.
- Ruimy, R., Meziane-Cherif, D., Momcilovic, S., Arlet, G., Andremont, A. & Courvalin, P. (2010). RAHN-2, a chromosomal extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from Rahnella aquatilis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 (8): 1619-1623.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., Van Der Lelie, D. & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus Stenotrophomonas. *Nature Reviews Microbiology*, 7 (7): 514-525.
- Schmidt, O., Schuenemann, V. J., Hand, N. J., Silhavy, T. J., Martin, J., Lupas, A. N. & Djuranovic, S. (2007). prIF and yhaV encode a new toxin–antitoxin system in Escherichia coli. *Journal of molecular biology*, 372 (4): 894-905.
- Schmoock, G., Ehricht, R., Melzer, F., Rassbach, A., Scholz, H. C., Neubauer, H., Sachse, K., Mota, R. A., Saqib, M. & Elschner, M. (2009). DNA microarray-based detection and identification of Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei and Burkholderia spp. *Molecular and cellular probes*, 23 (3-4): 178-187.
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K. & Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science*, 323 (5912): 396-401.
- Seng, P., Boushab, B. M., Romain, F., Gouriet, F., Bruder, N., Martin, C., Paganelli, F., Bernit, E., Le Treut, Y. P. & Thomas, P. (2016). Emerging role of Raoultella

- ornithinolytica in human infections: a series of cases and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 45: 65-71.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 22 (1): 90-101.
- Sharma, A., Sharma, R., Bhattacharyya, T., Bhandu, T. & Pathania, R. (2016). Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (1): 68-74.
- Simanshu, D. K., Yamaguchi, Y., Park, J.-H., Inouye, M. & Patel, D. J. (2013). Structural basis of mRNA recognition and cleavage by toxin MazF and its regulation by antitoxin MazE in *Bacillus subtilis*. *Molecular cell*, 52 (3): 447-458.
- Smith, R. A., M'Ikanatha, N. M. & Read, A. F. (2015). Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Communication*, 30 (3): 309-314. doi: 10.1080/10410236.2014.943634.
- Stapleton, P. D. & Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*, 85 (1): 57-72.
- Steinbakk, M., Sunde, M., Urdahl, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B.-T., Bonhorst, J. Ø., Nielsen, K. M., Lindbæk, M. & Bjørnholt, J. V. (2014). *Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak*. Folkehelseinstituttet.
- Støle, M. (2017). *Screening av miljøprøver for bredspektrede  $\beta$ -laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser*. Masteroppgave. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.
- 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 (10): 1441-1451.
- Sunde, M., Urdahl, A. M., Norström, M., Madslie, K., Danielsen, A. V., Barstad, A. S., Welde, H., Slette-meås, J. S. & das Neves, C. G. (2018). *Antibiotic resistance in terrestrial wild mammal species in Norway*. Norwegian Veterinary Institute.
- Söderquist, B. & Berglund, C. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Clinical microbiology and infection*, 15 (12): 1176-1178.

- Söderqvist, K. (2017). Is your lunch salad safe to eat? Occurrence of bacterial pathogens and potential for pathogen growth in pre-packed ready-to-eat mixed-ingredient salads. *Infection ecology & epidemiology*, 7 (1): 1407216.
- Tash, K. (2005). *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. *Journal of clinical microbiology*, 43 (5): 2526-2528.
- Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 4 (1): 35.
- Tille, P. (2015). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*: Elsevier Health Sciences.
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforlaget.
- Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Giannoglou, M., Gogou, E., Katsaros, G. & Taoukis, P. (2017). Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain. *International journal of food microbiology*, 240: 131-140.
- Tønjum, T. (2019). *Blodagar*. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/blodagar> (lest 06.04.2020).
- Tønjum, T. & Otterholt, E. (2020). *Antibiotikaresistens*. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antibiotikaresistens> (lest 16.04.2020).
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, 3 (5): e26219.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40 (4): 277.
- Walckenaer, E., Poirel, L., Leflon-Guibout, V., Nordmann, P. & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2004). Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A  $\beta$ -lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (1): 305-312.
- Walia, S., Rana, S. W., Maue, D., Rana, J., Kumar, A. & Walia, S. K. (2013). Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged, ready-to-eat baby spinach. *International journal of environmental health research*, 23 (2): 108-118.
- Watson, J. D. (2014). *Molecular biology of the gene*. 7. utg. Boston: Pearson.
- WHO. (2019). *Ten threats to global health in 2019*: World Health Organization. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019> (lest 15.04.20).
- Widerström, M., Wiström, J., Sjöstedt, A. & Monsen, T. (2012). Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a

- focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31 (1): 7-20.
- 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.
- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology*, 13 (5): 589-594.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H. & Inouye, M. (2009). MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (42): 28746-28753.
- Yoneyama, H. & Katsumata, R. (2006). Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (5): 1060-1075.
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T. & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9 (6).
- Zarb, P. & Goossens, H. (2011). European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC). *Drugs*, 71 (6): 745-755.
- Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J. & Nation, R. L. (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60 (6): 1206-1215.
- Zhanel, G. G., Sniezek, G., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagace-Wiens, P. R., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J. & Karlowsky, J. A. (2009). Ceftaroline. *Drugs*, 69 (7): 809-831.
- Aarnes, H. (2017). *Transposon*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/transposon> (lest 20.04.2020).

## VEDLEGG

### VEDLEGG A

*Tabell A. Konsentrasjon (ng/ $\mu$ l) og absorbans ved  $A_{260/280}$  og  $A_{260/230}$  etter ekstraksjon av DNA for de ulike prøvene, samt konsentrasjon etter 16S rRNA PCR.*

<b>Prøve</b>	<b>Konsentrasjon (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b><math>A_{260/280}</math></b>	<b><math>A_{260/230}</math></b>	<b>Konsentrasjon (ng/<math>\mu</math>l) etter 16S rRNA PCR</b>
<b>B1.B</b>	129,0	1,93	2,11	34,2
<b>B1.C</b>	84,6	1,85	1,67	29,6
<b>B1.E</b>	186,0	1,88	1,91	46,9
<b>K1.B</b>	72,6	1,97	1,81	38,1
<b>K1.C</b>	5,85	1,85	0,69	42,1
<b>K1.E</b>	100,0	2,19	2,41	44,4
<b>K2.B</b>	171,0	2,18	2,38	135,0
<b>K2.C</b>	161,0	1,89	1,80	18,5
<b>K2.E</b>	448,0	2,19	2,38	166,0
<b>K3.B</b>	125,0	1,85	1,66	24,2
<b>K3.E</b>	132,0	1,88	1,80	131,0
<b>S1.B</b>	24,9	1,93	1,61	36,8
<b>S1.C</b>	122,0	1,92	1,94	44,6
<b>S1.E</b>	16,0	1,86	1,10	37,5
<b>S2.B</b>	136,0	1,90	2,01	115,0
<b>S2.C</b>	177,0	1,86	1,46	147,0
<b>S2.E</b>	154,0	2,02	2,08	55,2
<b>S3.B</b>	27,9	1,58	1,02	68,0

## VEDLEGG B

**Tabell B.** Contig-sekvenser for de ulike prøvene. To av sekvensene var ikke mulig å slå sammen (K2.C og S2.C), og resultatet er derfor oppgitt med forward og reverse separat.

Prøve	Sekvens
<b>B1.B</b>	CTACACATACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACC GTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAC ATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCCTAC TCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCG ACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACCATTTACAACACGAGCT GACGACAGCCATGCAAGCACCTGTCTCAGAGTTCGCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGATAAGTTCTCTGGATGTC AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC ATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGTACTCCCAGGCGTGCAGTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCCAAG GGAACAACCTCCAAGTCGGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTT CGCACATGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACC GCTACACCTGGAATTTACCCCTCTACAAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCG GGGATTTACATCTGACTTAACAGACCCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGTTGCACCCTC CGACATACCGCGGCTGCTGGCACGGATTAGCCGTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATCAAGTTTAAAGCTTAAAC CTTAACGCCTTCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTCATAACGCGGCATGGCTGCATCAG GCTTGCGCCCATTTGTCAATATTTCCCACTGCTGCCTTCCCGTAGGAATCTGGAACGTGTCTCAGTCCAGTGTGG CTGGTCATCTCTCAGACCAGTAGGGATCGTGCCTAGGTGAGCCATTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTG CGACATCTGATGGCATGAGGCCGGAAGGTCGCCACTTTGGTCTTGGCAGCTTATGCGGTTAAGCTACCGTTTC CAGTAGTTATGCCCCCTCCATCAGGCAGTTTACCAGACATACTACCCGTCGCGCTCGTCAACCGAGAGCAA GCTTCGG
<b>B1.C</b>	CGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCGCTCACACTGTAAGTGTGACACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG TAAAGCCCTTTTGTGGGAAAAGAAATCCAGCCCGGTAATACCTGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCA CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTAAGGGCGTAAAGCG TGCGTAGGTGGGTTGTTAAGTCTGTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGAAACTGGACAAC TAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGG CGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTG GGTAGTCCACGGCCCTAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTT AAGTTCGCGCCCTGGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTG GAAATATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTGAGAACTTTCCAGAGATG GATTTGTGCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGTGTGTCAGTCTGTCGAGATGTTGGGTTAA GTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGA CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTAATAATG GTGGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGGACGGTAAGCCAATCCAGAAACCCCATCTCAGTCCGGATTGGAGTCT GCAACTGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGACCAGAAGCAGCTTAGACTTAACTTCGGGAGGGGCGC TTG
<b>B1.E</b>	TTGGGTACCGCTCGCTCCCAGGCTTAGACTAAACTACTTCTGGTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG TGTTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTC GAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGCAACCCCTGTA CCGACCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGT TTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGG GACTTAACCCAACATCTCAGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCA ATCCATCTCGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACACATGCT TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTTTCAATTTGAGTTTTTAACTTTCGCGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACT TAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA GGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCAC TGGTGTCTTCCCTATATCTACGCAATTCACCGCTACACAGGAAATCCACCACCCTTACCGTACTCTAGCTCGCC AGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTACG CCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCT GTCGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCTCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGA CCTTCTCACACACGCGGCAAGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGCT AGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCTTTAGA

<b>K1.B</b>	<p>TTAGTCTAGCTACTTCTGGTGCAACCCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTC  ACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTACGCGAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTA  CGATCCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTGGCAACCCTTGTACCACCATTTGTAGCACGTGTGTAGC  CCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCACTTCTCCGGTTTGTACCGGCACTCTCCTTAGAGT  GCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAAACCAACATCTCAGCAC  GAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGGA  TGCAAGGCCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTAACCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCGCTCA  ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGCTACTCCCAAGCGGCTAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCT  CAAGGGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCAC  GCTTTCGCACCTCAGTGTACGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCTATATCTACGCATT  CACCCTACACAGGAAATCCACCCACCCTTACCATACTTAGCTTGGCAGTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGA  GCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAAACCCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCA  CCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGTAACGTCAAAAATGCAGAGTA  TTAATCTACAACCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGG  ATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGT  GTGACTGATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCACTCAATCCGA  CCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTC  TTTGAACGTTGTCCCCACTACCAGGACAGATTCTTAGGCATTACTACCCGTCCGCCGTGAATCCAGGAGCA  AGCTCGGCTAC</p>
<b>K1.C</b>	<p>TCGCTGCGTCCATGCTCTCCGAGGCCGCGCGCACCTTCTCTCGCCCCGATGGGCACCCACTGCTCTGCGTGGC  TCGCGTGGCGCTGTTGCGCTGTTGCGCCGCTGCTGCTGCTGTTGCTGCTACTGTGCCACCAGGCGCTGGTGC  CCAGGACGAGGATGAGATTATGAAGAGCTGATGCTCGCCCTCCCGTCCAGGAGGATGGCTGGCTGATGAGG  CCGCACATGTGGCCACCGCCACCTTCCGCGTGTGCTCAAGGTATGGGTGCCAGGCAACGCGCTTGTCTGGGGT  TGGGGTGTGCTCTTCGGGGTCTTCTGCTCATCTAGCCGTCTGGTGGTCTCTAAGTGCAGCCCTGAGGTGCGG  GAGGCGAGGCAAGACTTAGTGCTACGCTGCACCTTGTGGCACAGAGTATGGGGGAGGCCACGTCTAAAGGC  ACTCGGGGCTTGGTTCCAAGGGA</p>
<b>K1.E</b>	<p>TACCCAAGCGACTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA  CCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACCTGA  GAACGGTTTTAAGAGATTGCTTGCCTCGCGAGTTCGCGACTCTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC  CAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCACTCTACTAGAGTG  CCCACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCAGCACAGG  CTGACGACGACCATGCACCACCTGTCTTGGCTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTTAGGGTTGGCGCAAGATGT  CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGTCAAT  TCCTTTGAGTTTCAACCTTGGCGTACTCCCCAGGCGGAGTCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTAAGGGCG  GAAACCCTTCAACCACCTAGCACTCATCGTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCAT  GCTTTCGAGTCTCAGGTCAGTTGCAGACAGGAGTACCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATT  CCACCGCTACACATGGAGTTCCACTACCCTTCTGCACTCAAGTTATCCAGTTTCCGATGCACCTTCTCCGGTTAA  GCCGAGGCTTTCACATCAGACTTAGAAAACCGCCTGCACTCTTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGTTG  CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTGGTTAAATACCGTCAACGTATGAACAG  TTACTCTCATACTGTTCTTCTTAAACAACAGAGCTTACGAGCGGAAACCCTTCTTCACTCAGCGGTGTTGCTCC  ATCAGGCTTGGCCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGCTCAGTCCATT  GTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCTTGGTAGGCCATTACCCCAACAAGCTAATGCAC  CGCAGGTCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTAAGCGTTGTTATGCGAACAACGTTGTTATGCGGT  ATTAGCATCTGTTTCCAATGTTGTCGCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCCGCCACTCGT  TGGCGACCAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCTGCTAC</p>
<b>K2.B</b>	<p>ACTGCAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGCAGACCGTCCAGACTCATACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTCA  GCGAGGAGGAAGGCATCATACTTAATACGTGTGGTATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT  GCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGTT  TGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTGTAGA  GGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC  TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGT  AAACGATGTCGACTGGGAGGTTGTGCCCTTGGGCGTGGCTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTGCAGCCCTGGG  GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT  TCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCTACTTGCATCCACGGAATTCGCCAGAGATGGCTTAGTGCCTTCGGGA  ACCGTGAGACAGGTGCTTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  CAACCCTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGAACTCAAAGGAAACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAAG  GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAAGTAAGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGA  GAAGCGAACTCGGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA  TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  GTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGAGATTA</p>



<b>K2.C</b>	<b>F:</b> CGCTGCCAATGCCACGTGGTG <b>R:</b> GTCGCTGAGCCAGGATCAAACATAAAG
<b>K2.E</b>	CACAGCCACTTCTGGTAAACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAACGTATTCACCGC GACATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGGAGTCGAGTTGCAACTCCAATCCGGACTACGATA CACTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCGGCCCTCTGTATGTACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTAC CCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCT TTCGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA GCCATGCAGCACCTGTGTGATGGTTCTCTTTCGAGCACTCCCAAATCTCTCAGGATTCCATCCATGCAAGGGTA GGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATTCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGA GTTTTAATCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTCACGCGTTAGCTGCGTTACCAAGTCAATTAAGACCCG ACAACCTAGTAGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGTGCATG AGCGTCAGTGTATCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTCCACATATCTACGATTTCACTGCTACACG TGGAATTTACCCCCCTCTGACACACTCTAGCCGTGCAGTCTCAAATGCAATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTC ACATCTGACTTACACAACCGCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTACGTATTAC CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTATTCTTCAGGTACCGTATTAGTAGTAGATATTAGCTACTACCG TTTTTCCCTGACAAAAGACTTTACACCCGAAGGCCCTTCTACTACGAGACATTGACATCCAGGTTGCC CCCATTGTCCAAAATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAAAGAACTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCTG CCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTTGCCTTGGTAGGCTTCTACCCACCAACTAGCTAATCAGATATCGGCCGCTC CAGGAGCATGAGGTCTTGCATCCCCACTGTCATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAGCTAGTCTTTCGACTAGTT ATCCCCACTCTAGGGCACGTTCCGATATATTACTACCCGTTCCGACACTGCCATCAGGAGCAAGCTCTTC
<b>K3.B</b>	TGCATCTTATGCAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGG GAAACCCGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGCTACTTA TGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG ATGGGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGTAGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGA AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA GTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGGAAAA GTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACTTCTGGTCT GTAACCTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGA TGAGTGTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTGAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGC AACGCAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCTTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTGCTGTCG
<b>K3.E</b>	CATCATAAAGCGTGCTTGTAGACCCATATGAGAGTCACCCATCTCACCTTCGATTTCTGCTTTAGGGGTAAGTGCA GCTACCGAGTCCACAACGATTAATCAATTGCGCCTGAACGGACAAGCATGTACAGCAATTTCAAGTGCTTGCTCA CCATTTGCGGGTTGTGAAACAAGTAGGTTATCAATATCTACACCAAGTTTTCGCGTGCATATTGAGGGTCTAGGGCG TGCTACGATCAATGAAAGCATGTACCACCAGATTTTGGACATTGAGCAATTGCTTGAATGTCATTGTAGTTT TACGAGAAAAA
<b>S1.B</b>	AGGATACTGTACCTGGTGGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATA ACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGCTCCTACGGAAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTA GATGAGCCTAGGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTGTGAGAG GATGATCAGTCAACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG AAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTTG GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGGAACCTGCAACAAAACCTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTG GAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGA TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTACATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATG TCAACTAGCCGGTGGGAGCCTTGAGCTCTAATGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC AGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTGTCTCT TAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAGTCACTAGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAAGGGTTGCCAAGCCGCGA GGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCCGAATCGC TAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG TGTGGTTGCACCAGATAGTAGTGTAGT

<b>S1.C</b>	<p>AGCCAAATTGATTGACGGTGTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  AGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAACAATAATGCTAATACCCGATAACAGCGTTGTTGCGATG  AACACCGCTAAAAAGATGGCTTCTCGTATCACTTCTGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTTGTTGGGGGTAAC  GGCCTACCAAGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGTATGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATA  CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAAGTAA  GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTATACGTTGACGGTA  TTTAAACCAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATT  ATTGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGGAGAAGTGCATC  GGAACTGGATAACTTGTAGTGCAGAAAGAGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGG  AAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAG  GATTAGTACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGGTTGGAAGGGTTTCCGCCCTTCACTGACC  GGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCC  CGCACAAGCGGTGGAAGCATGTGGTTTAAATTGGAAGCTACGCGAAGACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGGCC  AACCTAGAGATAGGGCGTTTCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGCTGA  GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAGTGA  AGTCCCGGTAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTAGTATCATGATGCCCTTATGCCCTTACACATACAC  GTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTGCAGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCCTTTTCACTGTCG  ACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAG</p>
<b>S1.E</b>	<p>ATGAGTAATACATCCGAACGTGCTGCACTGAGGGATAGCCCGGGAATGCCGGATTAATACCCGATACGATCT  ATGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCTCGCGTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTACATAGTTGGTGGGGTA  AAGGCTACCAAGCGCAGATCAGTAGCTGAGGACGACGACCCACACTGGGACTGAGCATGAGACGGGCCA  GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTG  AAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCCGGGGATGACGG  TACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTAATCCGA  ATTACTGGGCTAAAGCGTGCAGGCGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGAACTGC  ATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATG  TGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAA  CAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGATTCATTTCTTAGTAACGT  AGCTAACCGCTGAGTGGTACCCTGGGAGTACGCTGCAAGGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG  CACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAATAACCTTACCTACCCTTACATGGTGGAAATCC  TGAAGAGATTCCGGGAGTGTGCTGAAAGAGAACCAGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGA  AATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCTCTAGTTGCTACCCAAGAGCACTTAAAGGAGACTGC  CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTATGCCCTTATGGCCCTTATGGCCCTTACACGCTATA  CAATGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCTGTAGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGC  ACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATTACGCTGTGA</p>
<b>S2.B</b>	<p>GTCAGGCACGAGTAGCTTGTACTTTGCCGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGG  AGGGGGATAACTACTGGAACCGTAGCTAATACCCGATGACCTCGAAAGAGCAAAGTGGGGATCTTCGGACCT  CACGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT  GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACAGGTCAGACTCATAACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTC  AGCGAGGAGGAAGGCATCATACTTAATACGTGTGGTATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC  GTGCCAGACGCCGCGTAATACGGAAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACAGCGGCG  TTTGTAAAGTACAGTGTGAAATCCCGCGCTTAACTGCGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTGA  GAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  CCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCT  GTAACGATGTGACTTGGGAGGTTGTGCCCTTAGGCGTGGCTTCCGGAGTAAAGCGTAAAGCTGACCGGCTG  GGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAACATGGTGGTT  TAATTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCTACTCTTACATCCACGGAATTCGCCAGAGATGGCTTAGTGCCTTC  GGGAACCGTGAGACAGGTGCTTGCATGGCTGTGTCAGCTCGGGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  GCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCAGTAATGGTGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGA  AGGTGGGATGACGTCAAGTCAATGAGCCCTTACGATAGGCTACACAGTGTACACAGTGTACATGCAATGCAAAAG  AGAAGCGAACTCGGAGAGCAAGCGGACCTATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCC  ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCC  CGTACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAAGAAGTAGCGTAGA</p>
<b>S2.C</b>	<p><b>F:</b> GGGTTTTTTTTAAACCAAATTTGAAA  <b>R:</b> ACGTGTGCTCCCTCTC</p>
<b>S2.E</b>	<p>GTGCAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGGCACATTCTGATTC  GCGATTACTAGCGATTCCGACTTACGCGAGTTCGAGTTCGACTGCGATCCGGACTACCGATCGGTTTATGGGATT  AGCTCAAACCTCGCGCTTGGCAACCCCTTTGTACCGACCTTGTAGCAGTGTGTAGCTACCCAGGCCGTAAGGGCCAT  GATGACTGACGTCATCCCACTTCTCCGGTTTGTACCGGCGAGTCTCCTTAGAGTGGCCACCATAACCGTGTG  GTAATAAGGACAAGGGTTGCGTCTGTTACGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATG  CAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTTAGAAAGTTTATTGGATGTCAGGCGCTGGTAAGG  TTCTCGCGTTGCTTCAATTAACCAATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTGAGTTTTAACCT  TTGCGGCGTACTCCCAAGCGGTAACCTAATGCTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACCGGCTA  GTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCAAGCTTTCGACCTCAGTGTCA  GTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCTATATCTACGCATTCACCGCTACACAGGAAAT  CCACCCACCTTACCACTACTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCC  AACTTAAACAAACCCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCCTGTATTACCGCGGC  TGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTTATCTGTGCGTAAACGTCAAAACAATCACGTATTAGGTAACCTGCCCTTCT  CCCAACTAAAGTGCTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATG  TCCAATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGACCGGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCA  GACCGTACCGGATCGTCCCTTGGTGGCAATTAACCTCAACCACTAGCTAATCCGACTAGGCTCATCTAATAGC  GTGAGGTCGGAAGATCCCACTTTCTTCCGTAGGACGTATGCGGATTAGCGCCGTTTCCGGACGTTATCCCA  ACTACTAGGACGATTCTAGGCACTACTACCCGTCGCGGCTCGCCACC</p>

**S3.B**

GGTAGAAGAGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACT  
GGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTT  
TGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGTTACCAAGGCGACGATACGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG  
GAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACT  
CTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACGCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG  
CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCA  
GAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
ACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGGTTAAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC  
GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAACATGGTG  
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCC  
CTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAA  
GGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCATAAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTA  
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGC  
CCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCTGAAGTCCGGTGTAGTA

## VEDLEGG C

**Tabell C.** Resultater fra sekvensering i nBLAST. Prøve K1.C, K2.C, K3.E og S2.C ble ikke detektert, og er derfor ikke oppgitt i tabellen.

Bakterieidentitet	Maks score	Total score	Query cover	E-verdi	Identitets-score
<b>B1.B</b>					
<i>Raoultella ornithinolytica</i> stamme	2449	2449	99%	0.0	99.19%
<i>Raoultella ornithinolytica</i> stamme	2446	2446	99%	0.0	99.19%
<i>Raoultella ornithinolytica</i> stamme	2440	2440	99%	0.0	98.97%
<i>Raoultella planticola</i> stamme	2422	2422	99%	0.0	98.83%
<b>B1.2C</b>					
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2071	2071	100%	0.0	98.00%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2067	2067	100%	0.0	97.91%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2067	2067	100%	0.0	97.91%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2067	2067	100%	0.0	97.91%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2065	2065	100%	0.0	97.91%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stamme	2065	2065	100%	0.0	97.91%
<b>B1.E</b>					
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> stamme	2065	2065	99%	0.0	98.96%
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> stamme	2065	2065	99%	0.0	98.96%
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> stamme	2060	2060	99%	0.0	98.88%
<i>Pseudomonas guariconensis</i> stamme	2054	2054	99%	0.0	98.79%
<i>Pseudomonas monteilii</i> stamme	2054	2054	99%	0.0	98.79%
<b>K1.B</b>					
<i>Pseudomonas koreensis</i> stamme	2492	2492	99%	0.0	99.56%
<i>Pseudomonas moraviensis</i> stamme	2488	2488	99%	0.0	99.49%
<i>Pseudomonas reinekei</i> stamme	2471	2471	99%	0.0	99.27%
<b>K1.E</b>					
<i>Lactobacillus fermentum</i> stamme	2556	2556	99%	0.0	99.50%
<i>Lactobacillus fermentum</i> stamme	2555	2555	99%	0.0	99.50%
<i>Lactobacillus gorillae</i> stamme	2433	2433	98%	0.0	98.14%
<b>K2.B</b>					
<i>Rahnella aquatilis</i> stamme	2036	2036	99%	0.0	98.45%
<i>Serratia oryzae</i> stamme	1989	1989	99%	0.0	97.76%
<i>Rahnella inusitata</i> stamme	1978	1978	99%	0.0	97.59%
<i>Yersinia enterocolitica</i> stamme	1975	1975	99%	0.0	97.50%

<b>K2.E</b>					
<i>Herbaspirillum huttiense subsp. putei</i> stamme	2425	2425	99%	0.0	99.04%
<i>Herbaspirillum huttiense subsp. putei</i> stamme	2425	2425	99%	0.0	99.04%
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> stamme	2422	2422	99%	0.0	98.97%
<i>Herbaspirillum huttiense</i> stamme	2420	2420	99%	0.0	98.97%
<i>Herbaspirillum huttiense</i> stamme	2420	2420	99%	0.0	98.97%
<b>K3.B</b>					
<i>Bacillus paramycooides</i> stamme	1844	1844	100%	0.0	99.80%
<i>Bacillus albus</i> stamme	1844	1844	100%	0.0	99.80%
<i>Bacillus anthracis</i> stamme	1844	1844	100%	0.0	99.80%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<i>Bacillus cereus</i> stamme	1838	1838	100%	0.0	99.70%
<b>S1.B</b>					
<i>Pseudomonas protegens</i> stamme	2466	2466	99%	0.0	99.34%
<i>Pseudomonas sesami</i> stamme	2416	2416	99%	0.0	98.68%
<i>Pseudomonas saponiphila</i> stamme	2381	2381	99%	0.0	98.24%
<i>Pseudomonas tremae</i> stamme	2366	2366	99%	0.0	98.02%
<b>S1.C</b>					
<i>Lactobacillus fermentum</i> stamme	2327	2327	99%	0.0	99.23%
<i>Lactobacillus fermentum</i> stamme	2324	2324	99%	0.0	99.15%
<i>Lactobacillus gorillae</i> stamme	2196	2196	98%	0.0	97.73%
<b>S1.E</b>					
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> stamme	2231	2231	99%	0.0	98.73%
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> stamme	2224	2224	99%	0.0	98.65%
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> stamme	2220	2220	99%	0.0	98.57%
<b>S2.B</b>					
<i>Rahnella aquatilis</i> stamme	2435	2435	99%	0.0	98.76%
<i>Serratia oryzae</i> stamme	2344	2344	99%	0.0	97.59%
<i>Rahnella inusitata</i> stamme	2322	2322	99%	0.0	97.24%
<i>Yersinia nurmii</i> stamme	2316	2316	99%	0.0	97.23%
<i>Yersinia massiliensis</i> stamme	2316	2316	99%	0.0	97.23%
<i>Yersinia rohdei</i> stamme	2316	2316	99%	0.0	97.24%
<i>Yersinia intermedia</i> stamme	2311	2311	99%	0.0	97.16%
<i>Yersinia enterocolitica</i> stamme	2305	2305	99%	0.0	97.09%

<b>S2.E</b>					
<i>Pseudomonas protegens</i> stamme	2442	2442	100%	0.0	99.63%
<i>Pseudomonas sesami</i> stamme	2392	2392	100%	0.0	98.95%
<i>Pseudomonas saponiphila</i> stamme	2359	2359	100%	0.0	98.51%
<b>S3.B</b>					
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	2508	2508	99%	0.0	99.42%
<i>Staphylococcus edaphicus</i> stamme	2503	2503	99%	0.0	99.35%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	2503	2503	99%	0.0	99.35%

## VEDLEGG D

**Tabell D.** Gener for virulens, toksin og hemolysin som ble funnet med Illumina MiSeq fra de utvalgte prøvene.

<b>Gen</b>	<b>B1.B</b> <i>Raoultella ornithinolytica</i>	<b>K1.E</b> <i>Pseudomonas protegens</i>	<b>K3.B</b> <i>Rahnella aquatilis</i>	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<b>Virulens</b>				
<i>algR/algU</i>		x		
<i>bvgA/bvgS</i>			x	
<i>cheY</i>			x	
<i>clpP</i>				x
<i>flgB</i>		x		
<i>flgG</i>			x	
<i>flhA</i>			x	
<i>fliA</i>			x	
<i>fliG</i>		x	x	
<i>motA/motC</i>		x		
<i>ompA</i>	x		x	
<i>phoP/phoQ</i>	x	x	x	
<i>pilH</i>		x		
<i>ybtA/ybtP/ybtQ/ybtX</i>	x			
<b>Toksin</b>				
<i>higA/ higB</i>	x	x	x	
<i>hipA/hipB</i>	x		x	
<i>maze/mazF</i>			x	x
<i>mqsR</i>		x		
<i>prlF</i>			x	
<i>ratA</i>		x		
<i>relE</i>			x	
<i>rot</i>				x
<i>vapB</i>			x	
<i>yhaV</i>			x	
<b>Hemolysin</b>				
<i>hha</i>	x			
<i>hlyB</i>	x	x		
<i>shlA/shlB</i>		x	x	

## VEDLEGG E

**Tabell E.** Resistensgener som ble påvist med Illumina MiSeq i de utvalgte prøvene.

<b>Gen</b>	<b>Antibiotikaresistens</b>	<b>B1.B</b> <i>Raoultella ornithinolytica</i>	<b>K1.E</b> <i>Pseudomonas protegens</i>	<b>K3.B</b> <i>Rahnella aquatilis</i>	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>abaF</i>	Fosfomycin	x	x	x	
<i>abaQ</i>	Fluorokinoloner	x	x		
<i>ampC</i>	β-laktam		x	x	
<i>arlR</i>	Fluorokinoloner				x
<i>arnA</i>	Polymyxin	x	x	x	
<i>bcr</i>	Sulfonamid	x	x	x	
<i>blaORN-1</i>	β-laktam	x			
<i>blaRAHN-2</i>	β-laktam			x	
<i>blaZ</i>	β-laktam				x
<i>ble</i>	Bleomycin		x		
<i>bmr</i>	Fluorokinoloner Kloramfenikol	x	x	x	
<i>catB1</i>	Kloramfenikol		x		
<i>emrA</i> <i>emrB</i>	Fluorokinoloner	x	x	x	x
<i>emrK</i>	Tetrasyklin		x		
<i>emrY</i>	Tetrasyklin		x	x	
<i>FosA5</i>	Fosfomycin	x			
<i>FosB5</i>	Fosfomycin				x
<i>FosD</i>	Fosfomycin				x
<i>FusD</i>	Fucidin				x
<i>fsr</i>	Fosmidomycin	x	x	x	
<i>lnrL</i>	Linearmycin			x	
<i>marA</i> <i>marR</i>	β-laktam Fluorokinoloner Kloramfenikol Tetracyklin Rifamycin	x			
<i>mdtA</i> <i>mdtB</i> <i>mdtC</i>	Aminocoumarin	x	x	x	
<i>mdtH</i> <i>mdtK</i>	Fluorokinoloner	x	x	x	
<i>mdtL</i>	Kloramfenikol	x	x	x	


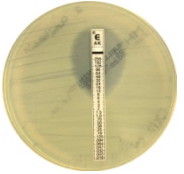
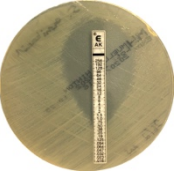
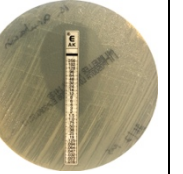
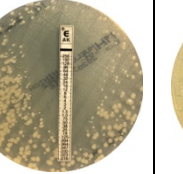
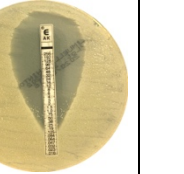

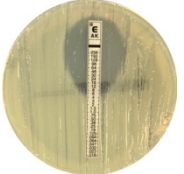
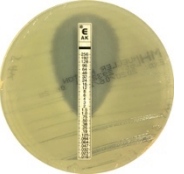
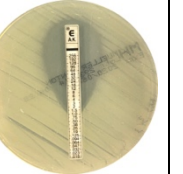
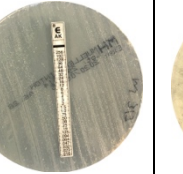
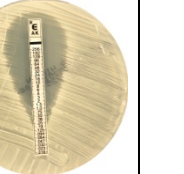

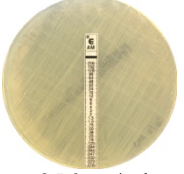
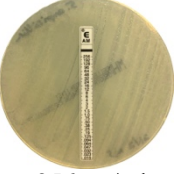
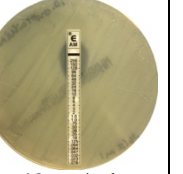
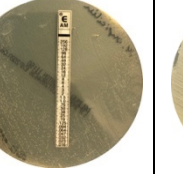
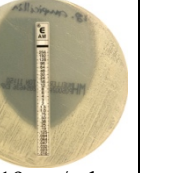
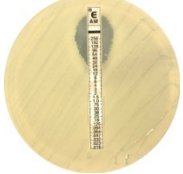
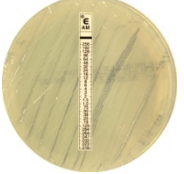
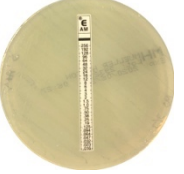
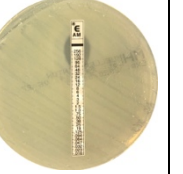
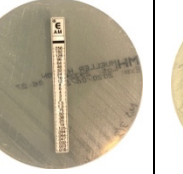



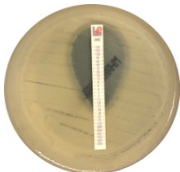
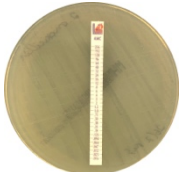
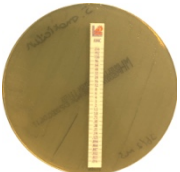
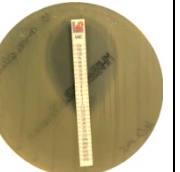
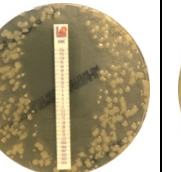
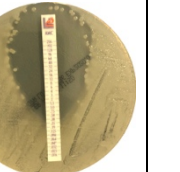
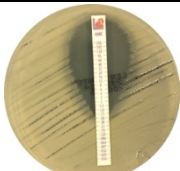
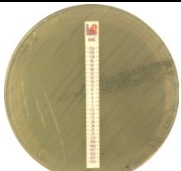
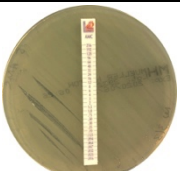
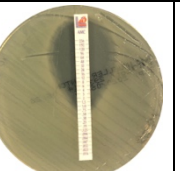
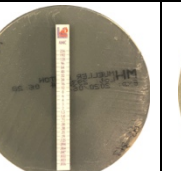
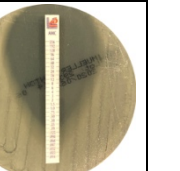
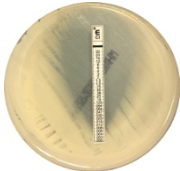
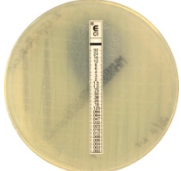
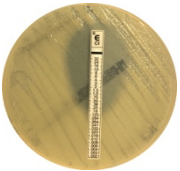
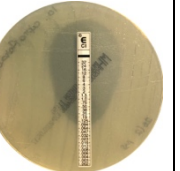
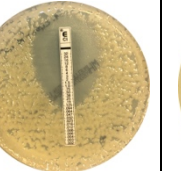
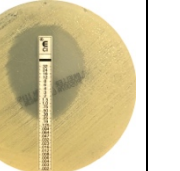
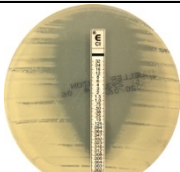
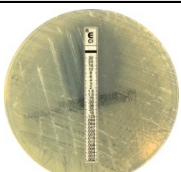
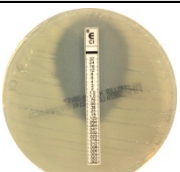
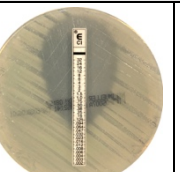
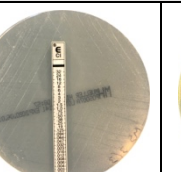
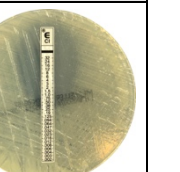
<b>Gen</b>	<b>Antibiotikaresistens</b>	<b>B1.B</b> <i>Raoultella ornithinolytica</i>	<b>K1.E</b> <i>Pseudomonas protegens</i>	<b>K3.B</b> <i>Rahnella aquatilis</i>	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>mexA</i> <i>mexB</i>	β-laktam Pyrimidiner Fluorokinoloner Makrolider Polymyxin Kloramfenikol Tetracyklin Sulfonamid Aminocoumarin	x	x	x	
<i>mexF</i>	Fluorokinoloner Pyrimidiner Kloramfenikol		x		
<i>mexK</i>	Makrolider Tetracyklin Triclosan		x		
<i>msbA</i>	Nitroimidazole	x		x	
<i>norB</i>	Fluorokinoloner	x			
<i>oqxA</i>	Pyrimidiner Fluorokinoloner Tetrasyklin Nitrofurant	x			
<i>oqxB</i>	Pyrimidiner Fluorokinoloner Tetrasyklin Nitrofurant	x		x	
<i>sepA</i>	Spectinomycin Tetrasyklin				x
<i>stp</i>	Spectinomycin Tetrasyklin	x	x	x	
<i>tcaR</i>	Teicoplanin				x
<i>tetA</i>	Tetrasyklin			x	

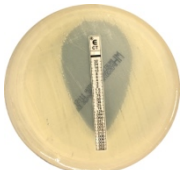
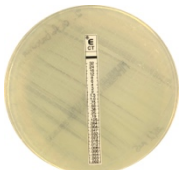
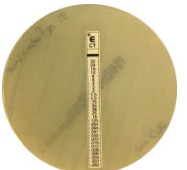
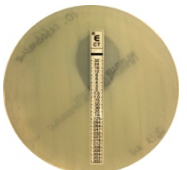
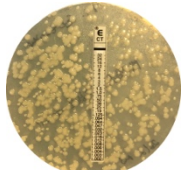

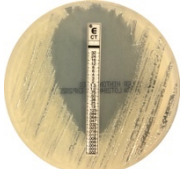
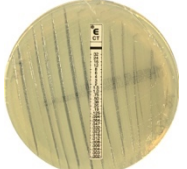
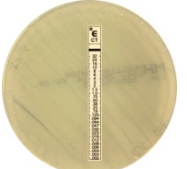
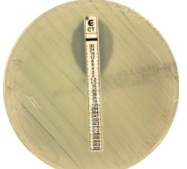
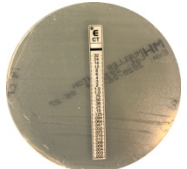
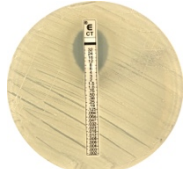

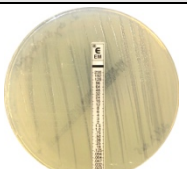
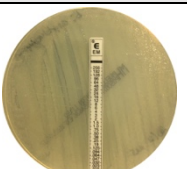
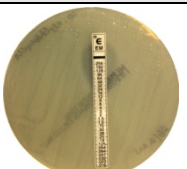
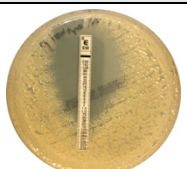
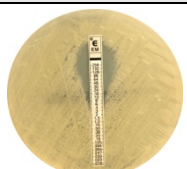

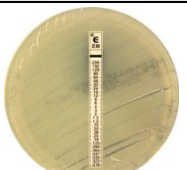
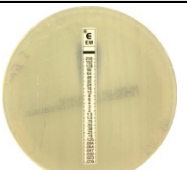
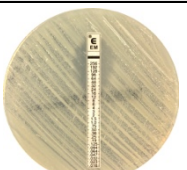
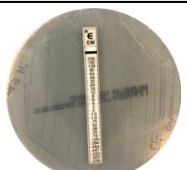
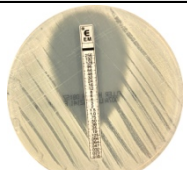
## VEDLEGG F

**Tabell F.** Resultater fra sensitivitetstesting med MIC med bilder fra testrunde 1 og 2 for de ulike prøvene.

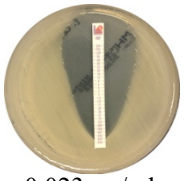
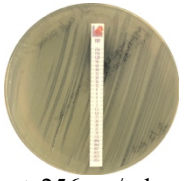
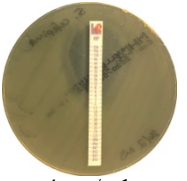
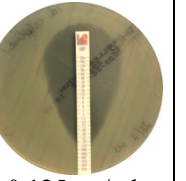
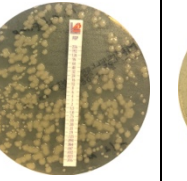
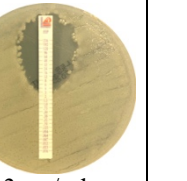
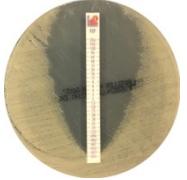
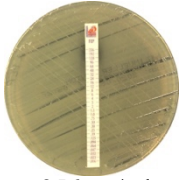
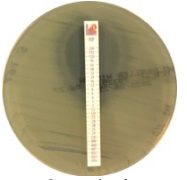
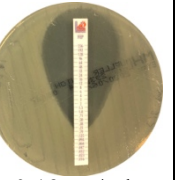
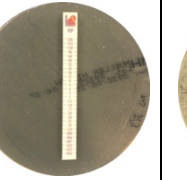
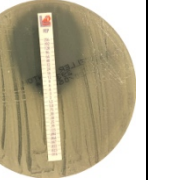

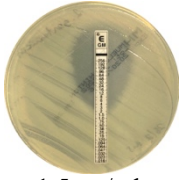
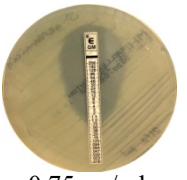
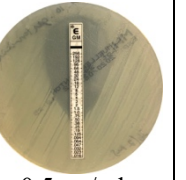
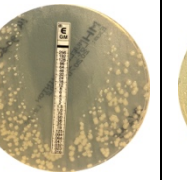


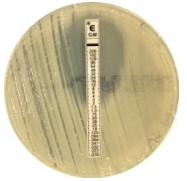
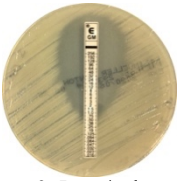
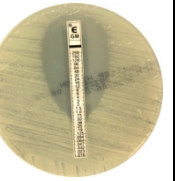
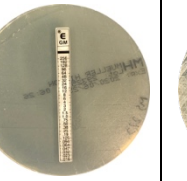

Resistensverdier og gjennomsnittlig verdi for ulike antibiotikatyper er inkludert.


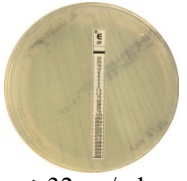
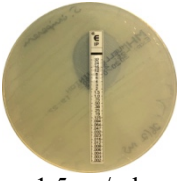
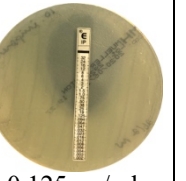
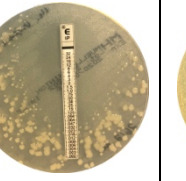
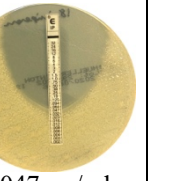
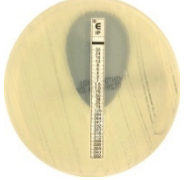
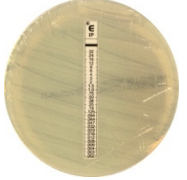
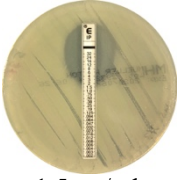

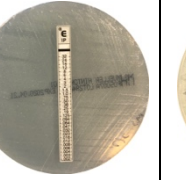
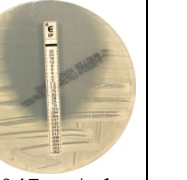

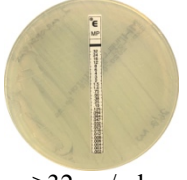
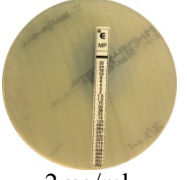

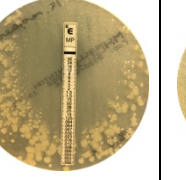
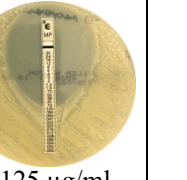

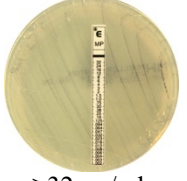
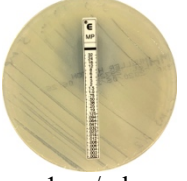
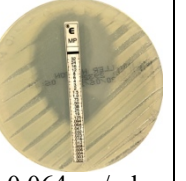
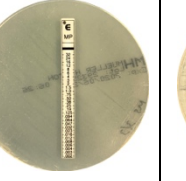

<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> spp.	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas</i> spp.	<b>K1.E</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>K3.B</b> <i>Bacillus</i> spp.	<b>S1.C</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Amikacin (AK)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 1,5 µg/ml	 6 µg/ml	 0,75 µg/ml	 1 µg/ml	 -	 0,19 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 1 µg/ml	 4 µg/ml	 0,75 µg/ml	 1 µg/ml	 -	 0,19 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
1,25 µg/ml	5 µg/ml	0,75 µg/ml	1 µg/ml	-	0,19 µg/ml
<b>Ampicillin (AM)</b>					
 8 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 48 µg/ml	 -	 0,19 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 24 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 64 µg/ml	 -	 0,19 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
16 µg/ml	≥256 µg/ml	≥256 µg/ml	56 µg/ml	-	0,19 µg/ml


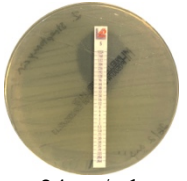
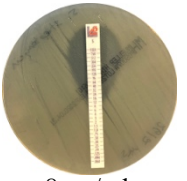
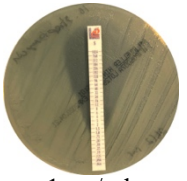
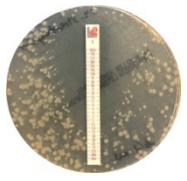
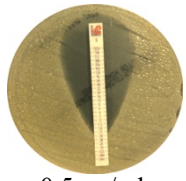
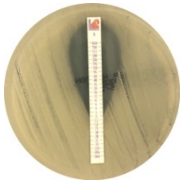
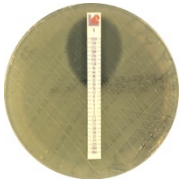
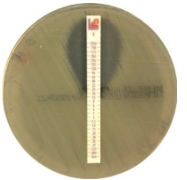
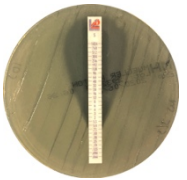
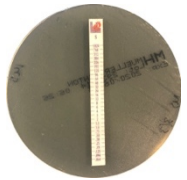

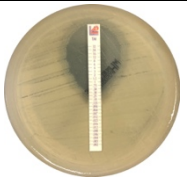
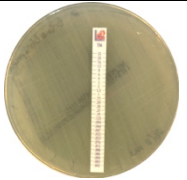
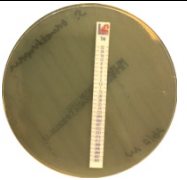
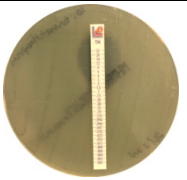
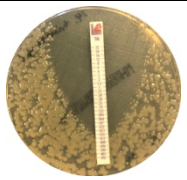
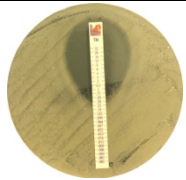
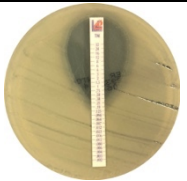
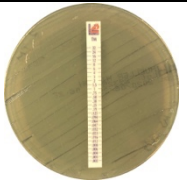
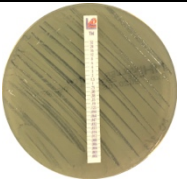
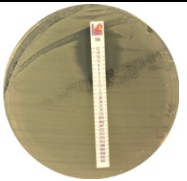
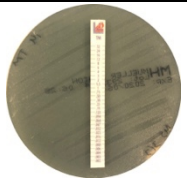
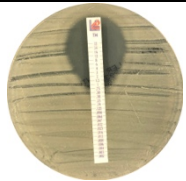
<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> spp.	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas</i> spp.	<b>K1.E</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>K3.B</b> <i>Bacillus</i> spp.	<b>S1.C</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Amoxicillin (AMC)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,5 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 0,75 µg/ml	 -	 0,25 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,75 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 0,75 µg/ml	 -	 0,19 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,625 µg/ml	≥256 µg/ml	≥256 µg/ml	0,75 µg/ml	-	0,22 µg/ml
<b>Ciprofloxacin (CI)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,06 µg/ml	 0,75 µg/ml	 0,094 µg/ml	 0,064 µg/ml	 -	 0,19 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,08 µg/ml	 0,038 µg/ml	 0,094 µg/ml	 0,064 µg/ml	 -	 0,25 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,07 µg/ml	0,394 µg/ml	0,094 µg/ml	0,064 µg/ml	-	0,22 µg/ml

<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> spp.	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas</i> spp.	<b>K1.E</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>K3.B</b> <i>Bacillus</i> spp.	<b>S1.C</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Cefotaxim (CT)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,012 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 1,5 µg/ml	 -	 8 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,012 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 2 µg/ml	 -	 4 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,012 µg/ml	≥32 µg/ml	≥32 µg/ml	1,75 µg/ml	-	6 µg/ml
<b>Erytromycin (EM)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 24 µg/ml	 -	 3 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 24 µg/ml	 -	 0,5 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
≥256 µg/ml	≥256 µg/ml	≥256 µg/ml	24 µg/ml	-	1,75 µg/ml



<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> spp.	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas</i> spp.	<b>K1.E</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>K3.B</b> <i>Bacillus</i> spp.	<b>S1.C</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Cefepim (FEP)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,023 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 4 µg/ml	 0,125 µg/ml	 -	 3 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,016 µg/ml	 ≥256 µg/ml	 2 µg/ml	 0,19 µg/ml	 -	 2 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,0195 µg/ml	≥256 µg/ml	3 µg/ml	0,1575 µg/ml	-	2,5 µg/ml
<b>Gentamicin (GM)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 1 µg/ml	 1,5 µg/ml	 0,75 µg/ml	 0,5 µg/ml	 -	 0,016 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 1 µg/ml	 2 µg/ml	 0,5 µg/ml	 0,38 µg/ml	 -	 0,016 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
1 µg/ml	1,75 µg/ml	0,625 µg/ml	0,44 µg/ml	-	0,016 µg/ml

<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> spp.	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas</i> spp.	<b>K1.E</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>K3.B</b> <i>Bacillus</i> spp.	<b>S1.C</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Imipenem (IP)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,019 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 1,5 µg/ml	 0,125 µg/ml	 -	 0,047 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,019 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 1,5 µg/ml	 0,125 µg/ml	 -	 0,047 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,019 µg/ml	≥32 µg/ml	1,5 µg/ml	0,125 µg/ml	-	0,047 µg/ml
<b>Meropenem (MP)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,064 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 2 µg/ml	 0,064 µg/ml	 -	 0,125 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,064 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 1 µg/ml	 0,064 µg/ml	 -	 0,125 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,064 µg/ml	≥32 µg/ml	1,5 µg/ml	0,064 µg/ml	-	0,125 µg/ml

<b>B1.B</b> <i>Raoultella</i> spp.	<b>B1.C</b> <i>Stenotrophomonas</i> spp.	<b>K1.E</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>K3.B</b> <i>Bacillus</i> spp.	<b>S1.C</b> <i>Lactobacillus</i> spp.	<b>S3.B</b> <i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Streptomycin (S)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 2 µg/ml	 24 µg/ml	 8 µg/ml	 1 µg/ml	 -	 0,5 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 2 µg/ml	 16 µg/ml	 12 µg/ml	 0,75 µg/ml	 -	 0,75 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
2 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml	0,875 µg/ml	-	0,625 µg/ml
<b>Trimetoprim (TM)</b>					
<b>Runde 1</b>					
 0,25 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 1 µg/ml	 -	 0,38 µg/ml
<b>Runde 2</b>					
 0,25 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 ≥32 µg/ml	 1,5 µg/ml	 -	 0,35 µg/ml
<b>Gjennomsnitt</b>					
0,25 µg/ml	≥32 µg/ml	≥32 µg/ml	1,25 µg/ml	-	0,365 µg/ml



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway