



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Påvisning av antibiotikaresistente bakterier i melkeprøver fra norske kyr ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder

Detection of antibiotic resistant bacteria in milk samples from Norwegian cows using phenotypic and genotypic methods

Stina Cathrin Nautnes

Mastergrad i matvitenskap

Fordord

Denne oppgaven markerer slutten på mastergradstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved fakultet for kjemi, biovitenskap og matvitenskap (KBM). Oppgaven er på 30 studiepoeng, og er en del av forskningsprosjektet «Jurfrisk».

Underveis i masteroppgaven erklærte verdens helseorganisasjon en global pandemi av viruset COVID-19. En uvirkelig situasjon som rammet oss alle, men det var en tid for å vise solidaritet og samarbeid for å bidra i den nasjonale dugnaden. Den ekstraordinære situasjonen har i tillegg belyst hvor viktig bekjempelsen av antibiotikaresistens er på verdensbasis. Det å få jobbe med dette temaet har vært en lærerik prosess, og det føles givende å kunne bidra med kunnskap for å bekjempe framtidens utfordring.

Det å skrive en masteroppgave er et omfattende arbeid som til tider har vært veldig krevende. Men nå som oppgaven er ferdigstilt er det flere som fortjener en stor takk. Jeg vil rette en spesiell takk til stipendiat Alberto Bombelli for all laboratorierelatert hjelp, og ikke minst hans oppmuntrende italienske ord. I tillegg fortjener stipendiat Misti Dawn Finton en stor takk for sine kyndige råd og veiledning på lab. Avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani har virkelig vært til verdifull hjelp med sine gode tips og triks for å gjøre laboratoriehverdagen litt enklere. Ikke minst en stor takk til dere andre på laboratoriet som hjalp meg med praktiske ting, og bidro med gode samtaler og nytraktet kaffe.

Min hovedveileder, professor Bjørn-Arne Lindstedt har vært til uvurderlig hjelp gjennom prosessen med sin entusiasme, positive ord og gode historier. Og jeg vil takke han for at han engasjerte meg i temaet, og for at jeg fikk involvere meg i jurfrisk-prosjektet. Videre vil jeg også takke professor Judith Narvhus for korrekturlesing. Og sist men ikke minst, takk til mine medstudenter og venninner, Hilde skår og Martine Skaare som har vært svært behjelpelig og oppmuntrende under hele prosessen.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Oslo, juni, 2020

Stina Cathrin Nautnes

Abstract

Background: Worldwide, antimicrobial resistance is a growing health problem. The lack of monitoring in livestock and food is limited to understanding the scope. The presence of antibiotic-resistant bacteria in food-producing animals increases the likelihood of contamination of animal food, which in turn can represent and contaminate humans and the environment. Research of antimicrobial resistance in the Norwegian food chain is limited, including milk from dairy cows.

Purpose: The purpose of this master's thesis is to investigate the presence of antimicrobial resistance among bacterial isolates in milk samples from healthy cows, and also cows with mastitis disease. In addition, the samples were screened for metal and disinfectant resistance.

Materials and methods: Milk samples (n = 76) from ten healthy cows with no evidence of clinical mastitis were examined. The samples were obtained from Ås-farm at the Norwegian University of Life Sciences (NMBU) and analyzed on Oxoid Brilliance™ CRE, Brilliance™ ESBL and MRSAselectII agar. In addition, bacteria from cows with proven mastitis (n = 5) and isolates from healthy cows without signs of mastitis (n = 31) were examined. The bacterial isolates were identified by 16S rRNA sanger sequencing. For screening of the most prevalent ESBL, carbapenems and MRSA genes, multiplex primers were used. A total of three samples were included for whole-genome sequencing with Illumina MiSeq. Phenotypic resistance was decided by antibiotic sensitivity testing.

Results: Of a total of 76 milk samples from healthy cows, none grew on the selective agar plates. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance was detected in both healthy and cows with proven mastitis. By phenotypic screening on selective agar, 2 of 31 (6.5 %) bacterial strains from healthy cows grew on Oxoid Brilliance™ CRE. The isolates were identified as *Enterococcus faecalis*. The bacterial strain showed phenotypic resistance to cefotaxime, cefepime, amikacin, gentamicin and streptomycin. In addition, the gene *tetM* encoding tetracyclineresistance was detected. Bacteria isolates from mastitis samples grew on ESBL plates and were identified as *Pseudomonas* spp. Two of them showed resistance to cefotaxime and streptomycin. One of the isolates contained mobile genetic elements (*aph (6) -Id* and *aph (3'') -Ib*) encoding resistance to aminoglycosides, and the gene *AmpC* for β-lactam.

Conclusion: The main findings of this study show a low incidence of antibiotic resistance in milk isolates from healthy dairy cows. Detection of resistant bacterial isolates shows a need for further research into its role in the spread of antibiotic resistance in the Norwegian food chain.

Sammendrag

Bakgrunn: Verden over er antimikrobiell resistens et økende helseproblem. Mangelen på overvåkning hos husdyr og matvarer er en begrensning på å forstå omfanget. Forekomst av antibiotikaresistente bakterier hos matproduserende dyr øker sannsynligheten for kontaminering av animalske næringsmidler, som igjen kan representere en smittekilde til mennesker og miljøet. Kartlegging av resistens i næringsmidler er begrenset, inkludert melk fra norske kyr.

Hensikt: Formålet med denne masteroppgaven er å undersøke forekomsten av antimikrobiell resistens blant bakterieisolater i melkeprøver fra friske, og syke kyr med klinisk mastitt. I tillegg ble prøvene screenet for metall -og desinfeksjonsresistens.

Materialer og metoder: Melkeprøver (n = 76) fra ti friske kyr uten tegn på klinisk mastitt ble undersøkt ved to ulike prøveuttak. Prøvene ble innhentet fra Ås gård ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU), og analysert på Oxoid Brilliance™ CRE, Brilliance™ ESBL og MRSAselectII agar. I tillegg ble prøver fra kyr med påvist mastitt (n = 5) og isolater fra friske kyr uten tegn til mastitt (n = 31) undersøkt. Bakterieisolatene ble deretter identifisert med 16S rRNA sangersekvensering. For screening av de mest utbredte ESBL, karbapenemer og MRSA-gener ble multipleks-PCR anvendt. Totalt tre prøver ble inkludert til helgenomsekvensering med Illumina MiSeq. Antibiotika sensitivitetstesting ble benyttet for fenotypisk resistensbestemmelse.

Resultater: Av totalt 76 melkeprøver fra friske kyr vokste ingen bakterier på selektive skåler. Det ble påvist fenotypisk og genotypisk antibiotikaresistens i melkeprøver fra friske og kyr med påvist mastitt. Ved fenotypisk screening på selektive skåler, vokste 2 av 31 (6,5 %) melkeisolater fra friske kyr på Oxoid Brilliance™ CRE agar. Isolatene ble identifisert som *Enterococcus faecalis*. Bakteriestammen viste fenotypisk resistens mot cefotaksim, cefepim, amikacin, gentamicin og streptomycin. I tillegg ble det gjort funn av genet *tetM* som koder for tetracyklinresistens. Bakterierisolater som vokste på ESBL-skåler ble identifisert som *Pseudomonas* spp., og to av disse viste fenotypisk resistens mot cefotaksim og streptomycin. Hvorav det ene isolatet hadde mobile gener (*aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*) som koder for resistens mot aminoglykosider, og *AmpC* for β-laktam antibiotika.

Konklusjon: Hovedfunn i denne studien viser lav forekomst av antibiotikaresistens i melkeisolater fra friske melkekyr. Påvisning av resistente bakterieisolater illustrerer et behov for ytterligere forskning i dens rolle i spredning av antibiotikaresistens i den norske matkjeden.

Forkortelser

ABC	ATP binding cassette
AmpC	Ampicillinase C
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basepar
CFU	Colony forming units
CRE	Karbapenemresistente <i>Enterobacteriaceae</i>
CTX-M	Cefotaksim
ddNTP	dideoksynukleotidtrifosfat
DNA	Deoksyribunokleinsyre
dNTP	Deoksyribonukleosidtrifosfat
dsDNA	Double stranded DNA
DMT	Drug/metabolite transporters
ECOFF	Ecological Cut-OFF
EDTA	Etylen Diamin Tetra Acetat
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
ESBL _A	Klasse A ESBL (ambler)
ESBL _M	Miscellaneous ESBL
ESBL _{KARBA}	ESBL karbapenemer
ESCMID	The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EURL	European Union Reference Laboratories
Gram+	Gram-positive bakterier
Gram-	Gram-negative bakterier
HGT	Horizontal Gene transfer
KESC	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LA-MRSA	Livestock associated-MRSA
LPS	Lipopolysakkarid
MATE	Multidrug and Toxic compound Extrusion
MFS	The Main Facilitator superfamily
MH	Mueller hinton
MIC	Minimum Inhibitory Concentration

MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	N-acetylglukosamin
NAM	N-acetylmuraminsyre
nBLAST	Nucleotid Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National center for Biotechnology Information
NDM	New Dehli metallo- β -laktamase
NGS	Neste generasjonssekvensering
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NORM	Norsk overvåking for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	NORM – Veterinærinstituttet
OXA	Oxacillinace
PBP	Penicillin bindende proteiner
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PDR	Pandrug-resistance
Pk/pd	Pharmacokinetic/Pharmacodynamic
QAC	Kvartære ammoniumforbindelser
RND	Resistance-nodulation-division
rMLST	Ribosomal multilocus sequence typing
rRNA	Ribosomalt RNA
SHF	Senter for husdyrforsøk
SHV	Sulfhydryl variable β -laktamase
SMR	Small multidrug resistance
TA	Toksin-antitoksin
TAE	Tric-acetat-EDTA
TEM	Temoneira β -laktamase
tRNA	Transfer-RNA
TopiIV	Topoisomerase IV
T4P	Type IV pili
T6SS	Type VI sekresjonssystem
UVI	Urinveisinfeksjon
VIM	Verona integron-encoded metallo β -laktamase
WHO	World Health Organization

Innholdsfortegnelse

ABSTRACT	II
SAMMENDRAG	III
FORKORTELSER	IV
1. INTRODUKSJON	1
2. BAKGRUNN	3
2.1 ANTIBIOTIKA	3
2.1.1 Antibakterielle virkningsmekanismer.....	5
2.2 ANTIBIOTIKARESISTENS	8
2.2.1 Intrinsisk og ervervet resistens	10
2.2.2 Mobile genetiske elementer.....	10
2.2.3 Horisontal genoverføring.....	11
2.2.4 Antibakterielle resistensmekanismer.....	13
2.3 ANTIBIOTIKAFORBRUK OG RESISTENSFOREKOMST	18
2.4 UTVIKLING OG SPREDNING AV RESISTENS	19
2.5 JURMIKROBIOTA OG RESISTENSFOREKOMST HOS MELKEKYR	21
2.5.1 Forekomst av resistente mikrober hos melkekyr.....	21
2.5.2 Jurmikrobiota.....	22
2.5.3 Mastitt	23
2.6 BEKJEMPELSE AV ANTIBIOTIKARESISTENS	24
3. METODISK TEORI	25
3.1 DYRKNINGSBASERT FENOTYPISK SCREENING PÅ SELEKTIVE KROMOGENE MEDIER	25
3.2 MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER	26
3.2.1 Polymerasekjedereaksjon.....	26
3.2.2 Renhetsmåling og kvantifisering av DNA	27
3.2.3 Agarose gelektroforese	28
3.2.4 Sekvensering.....	29
3.2.5 16S rRNA.....	29
3.3 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	32
4. MATERIALER OG METODE	33
4.1 METODEOVERSIKT	33
4.2 INNHENTING AV FORSØKSMATERIALE	34
4.3 SCREENING AV ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIER	35
4.3.1 Fenotypisk deteksjon på selektive medier	35
4.3.2 Screening etter ampicillin -og penicillinresistens.....	36
4.4 FENOTYPISK KARAKTERISERING AV BAKTERIEISOLATER FRA JURSPENE	37
4.5 ISOLERING OG NEDFRYSNING AV BAKTERIEKULTUR	37
4.5.1 Tillaging av medier	37
4.5.2 Isolering av genomisk DNA	37
4.6 DNA-EKSTRAKSJON	38
4.7 KVANTIFISERING OG RENHETSMÅLING	38
4.8 POLYMERASE KJEDEREAKSJON	40
4.8.1 Amplifisering av 16S rRNA	40
4.8.2 Multipleks – Screening etter resistensgener	41
4.9 GELELEKTROFORESE	45

4.10 RENSING AV 16S PCR PRODUKT OG SENDING AV PRØVER TIL SEKVENSERING	46
4.11 SEKVENSANALYSE AV 16S rRNA	46
4.12 HELGENOMSEKVENSERING MED ILLUMINA MiSEQ	47
4.13 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	47
5. RESULTAT.....	49
5.1 FENOTYPISKE RESISTENS PÅ SELEKTIVE KROMOGENE SKÅLER	49
5.2 SCREENING AV UTVALGTE RESISTENSGENER FOR ESBL, KARBAPENEM OG MRSA	50
5.3 BAKTERIESCREENING VED SANGERSEKVENSERING AV 16S rRNA	50
5.4 HELGENOMSEKVENSERING	52
5.5 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	54
5.6 SCREENING ETTER AMPICILLIN -OG PENICILLINRESISTENTE BAKTERIER	55
6. DISKUSJON	57
6.1 FENOTYPISK RESISTENSBESTEMMELSE	57
6.2 MOLEKYLÆR KARAKTERISERING AV BAKTERIER MED FENOTYPISK RESISTENS	58
6.3 PATOGENESE OG VIRULENSFAKTORER	59
6.3.1 Virulensfaktorer hos <i>E.faecalis</i>	59
6.3.2 Virulensfaktorer hos <i>Pseudomonas spp.</i>	60
6.4 GENOTYPISK PÅVISNING AV RESISTENS	63
6.4.1 Antibiotikaresistens hos <i>E.faecalis</i>	63
6.4.2 Antibiotikaresistens hos <i>Pseudomonas spp.</i>	66
6.4.3 Annen resistens	70
6.5 RELEVANS AV FUNN.....	72
6.6 FORSLAG TIL VEIEN VIDERE	73
7. KONKLUSJON.....	75
LITTERATURLISTE	76
VEDLEGG.....	I
VEDLEGG A. PROTOKOLL FOR UTTAK AV MELKEPRØVER	I
VEDLEGG B. KVANTIFISERING OG RENHETSMÅLING AV DNA	II
VEDLEGG C. ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	III
VEDLEGG D. SEKVENSRRESULTAT FOR 16S rRNA.....	VIII
VEDLEGG E. BLAST-SEKVENSRRESULTAT	XII
VEDLEGG F. MLST-SEKVENSRRESULTAT	XIII
VEDLEGG G. HELGENOMSEKVENSERING MED ILLUMINA MiSEQ.....	XIV

1. Introduksjon

Antibiotikaresistens er et økende helseproblem som utgjør en alvorlig trussel mot global helse. Verdens helseorganisasjon (WHO) mener at det er en av de største helserelaterte problemene vi står ovenfor i dag (WHO, 2019c). På verdensbasis er det estimert at motstandsdyktige bakterier forårsaker 700.000 årlige dødsfall (IACG, 2019). Etter 60 års ubegrenset forbruk av antibiotika står vi nå ovenfor en langsomt voksende pandemi, som medfører en stor belastning på helsevesenet verden over. Utvikling av nye antibiotika har tilnærmet stoppet opp, og det gjør at vi er på vei tilbake til tiden før antibiotika kom på markedet.

Bruken av antimikrobielle midler i human -og veterinærmedisin bidrar til selektiv fremvekst og spredning av resistens mellom ulike økologiske nisjer (Angulo et al., 2004). Horisontal genoverføring (HGT) kan bidra til spredning av resistensgener lokalisert på mobile elementer mellom bakterier som ikke nødvendig er nært beslektet. Fremveksten av multiresistente bakterier blant Gram-negative bakterier (Gram-) eskalerer i mange land, og utgjør en særlig stor bekymring (Davies & Davies, 2010). De mest utbredte er *Escherichia coli*, *Salmonella* og *Klebsiella* som forårsaker en rekke sykdommer hos både mennesker og dyr. Bakteriens virulenssegenskaper sørger ofte for kolonisering og overføring av genetisk materiale (Schroeder et al., 2017). Kobling mellom resistens og spesifikke virulensmekanismer er ansett som et potensiale for overføring av genmateriale (Harada & Asai, 2010).

Økende bakteriell resistens mot antimikrobielle midler har gitt et globalt fokus på å redusere antibiotikabruk. Kampen mot resistensutvikling har hovedsakelig fått størst fokus i kliniske sammenhenger, men de siste årene har et mer helhetlig perspektiv som inkluderer mennesker, dyr, planter og miljøet fått oppmerksomhet (Bengtsson-Palme et al., 2018). Spredning av antibiotikaresistens er en kompleks prosess å forstå, og krever vitenskapelig kunnskap på tvers av fagfelt. For bekjempelsen av resistens er det viktig å se på det som driver og øker forekomsten i miljøet, hos mennesker og dyr. Dermed er det ønskelig å se alle perspektiv og gå gjennom «En helse» tilnærming for å oppnå en helhetsforståelse for spredningen (Robinson et al., 2016). En helsetilnærming og strategi som ønsker å oppnå optimal helse for mennesker, dyreliv, planter og miljøet.

Husdyrnæringens felles handlingsplan for bekjempelse av antibiotikaresistente bakterier peker fram Norge som et landene som anvender minst antibiotika til matproduserende dyr (Animalia, 2017). Derimot er det mangel på forskningsbasert kunnskap relatert til resistensforekomst i næringsmidler i Norge. Melk fra kyr med frisk jurmikrobiota er lite studert, og ettersom melkesystemet i Norge er annerledes enn andre land vil det være nyttig å studere forekomsten av antibiotikaresistens i melkeprøver fra norske melkekyr. Det vil primært kunne bidra til økt kunnskap om resistensforekomst hos matproduserende dyr for å kunne redusere bruken av antimikrobielle midler som igjen vil gi økt melke kvalitet og redusert svinn. Et annet bekymringsmoment som kan skape problemer innen medisinsk behandling, og i næringsmiddelindustrien er resistens mot desinfeksjonsmidler. Det er bekymringsverdig med tanke på samsелеksjon og kryssresistens mot andre viktige klinisk antibiotika (Pal et al., 2015). Metaller har også en betydelig rolle i koresistens mot antibiotika (Baker-Austin et al., 2006).

Formålet med denne studien er å undersøke forekomsten av antimikrobiell resistens og virulensmekanismer blant isolater fra melkeprøver som stammer fra friske kyr, samt jur med påvist mastitt. Mangelen på overvåking av antibiotikaresistens hos matproduserende dyr og næringsmidler er en begrensning på å forstå omfanget. Samtidig vil det være interessant å screene for andre resistensassosierte gener mot metall -og desinfeksjon. Kartlegging av resistensgrad, resistensmekanismer og spredningspotensialet vil være informativt for bekjempelsen av antibiotikaresistente bakterier i matkjeden.

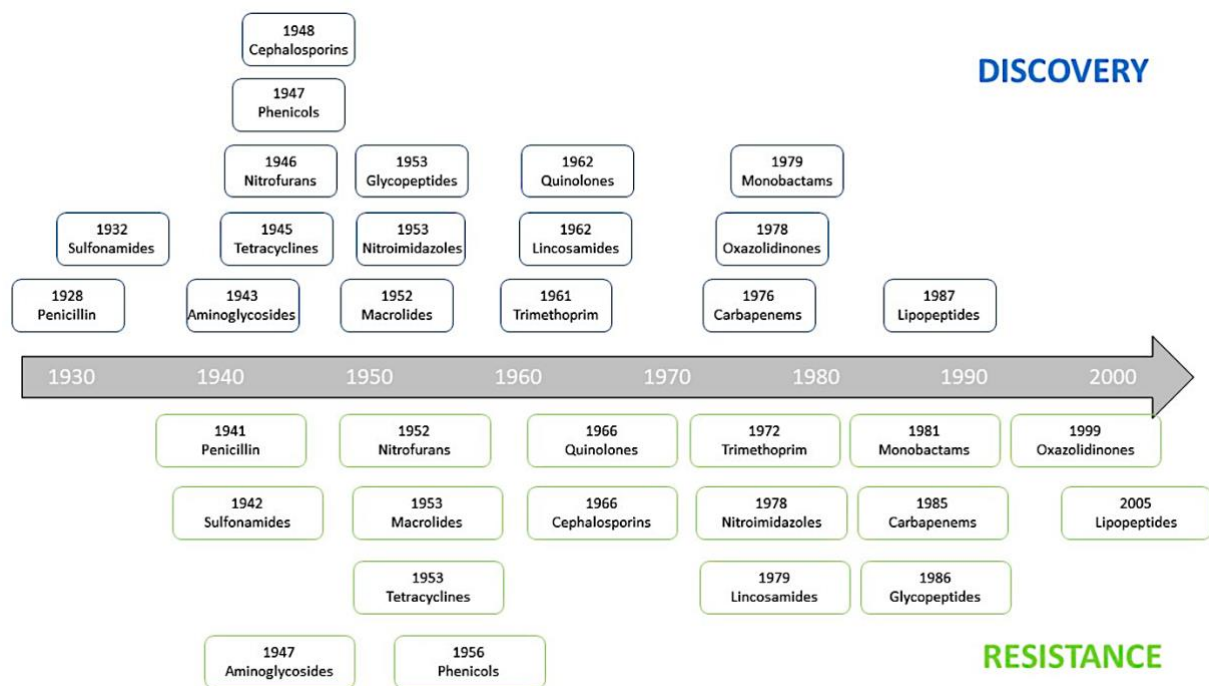
2. Bakgrunn

2.1 Antibiotika

Antimikrobielle midler er kjemiske forbindelser som har en bakteriedrepende (Bakteriocid) eller veksthemmende effekt (Bakteriostatisk) på hvilken som helst mikroorganisme (Tronsmo, 2016, s. 250). Det kan være midler som har effekt på spesifikke bakterier (antibiotika), sopp (antimykotika), virus (antivirale), parasitter (antiparasittære) eller på de fleste mikroorganismer ved bruk av antiseptika eller desinfiseringsmiddel (WHO, 2019a). Antibakterielle stoffer, også kjent som antibiotika er den mest studerte klassen av antimikrobielle midler. Antibiotika kan klassifiseres ut i fra handling (bakteriostatisk/bakteriocid), opprinnelse (naturlig, semisyntetisk, syntetisk), kjemisk struktur, aktivitetsspekter (smal -og bredspektret) og effekt den har på målorganismen (Ullah & Ali, 2017). I medisinsk sammenheng benyttes antibiotika mot mikrober for å forebygge (profylaktisk) eller behandle infeksjoner (terapeutisk) (Aukrust et al., 2016). Antimikrobielle midler ble opprinnelig kjent etter oppdagelsen av mikrobenes naturlige produksjon. Et kjent fenomen som gir organismene en fordel i konkurransen om næringsstoffer og rom i naturen (Hibbing et al., 2010). Naturlige mikrobielle substanser ble etterhvert utnyttet i den industrielle verden, og fremstilt syntetisk for behandling av bakterielle infeksjoner hos mennesker.

Starten på den medisinske revolusjon fant sted i 1909 når Paul Ehrlich tegnet begrepet «den magiske kule» (Aminov, 2010). En idé om at et hypotetisk stoff kunne invadere spesifikke patogene mikrober uten å gjøre skade på den infiserte organismen. Ideen førte til utvikling av den første effektive behandling av syfilis, som på den tid var en uhelbredelig sykdom. Hjørnesteinen i legemiddeloppdagelsen førte til oppdagelsen av den første klassen av sulfonamider. Penicillinoppdagelsen i 1928 var starten på den gyldne epoken for utvikling av andre antibiotikaklasser. Alexander Fleming, en britisk forsker var den første til å observere penicillinets antibakterielle egenskaper. Han observerte bakteriefrie soner i området på en dyrkningsskål som hadde blitt forurenset med muggsoppen, *Penicillium notatum*. Det antibakterielle molekylet som ble produsert fikk derved navnet penicillin. Grunnet manglende kompetanse innen isolering og rensing av virkestoffet, tok det ti år før andre forskere ble interessert i Flemings observasjoner. To av de var kjemikerne Ernst Chain og Howard Florey som utviklet en protokoll for rensing av penicillin. Det medførte distribusjon av det antibakterielle midlet på markedet i 1945 som ble benyttet til å bekjempe sårede soldater under verdenskrigen. Like før dette oppdaget Selman Waksman streptomycin, et antibiotikum isolert

fra jordbakterien *Streptomyces griseus* som var effektive mot Gram-positive bakterier (Gram+) (Saga & Yamaguchi, 2009). Han var også den første til å definere antibiotikum som «*et kjemisk stoff produsert av en mikrobe som dreper eller hemmer vekst av en annen mikrobe*» (Davies & Davies, 2010). De påfølgende årene ble det stadfestet at mikrober fra jordsmonnet hadde egenskaper til å produsere virkestoffer med antibakteriell aktivitet. Det førte til at den farmasøytiske industrien satte i gang screening av mikrober for tilvirkning av andre antibiotikum. De viktigste antibiotikaklassene ble oppdaget i tidsrommet fra 1940 fram til 1980-tallet, som er illustrert i *figur 2.1*.



Figur 2.1. Tidslinje for introduksjonen av nye antibiotikaklasser i tidsrommet fra 1930 til 2000-tallet, samt oppdagelsen av antibiotikaresistens (Duval et al., 2019).

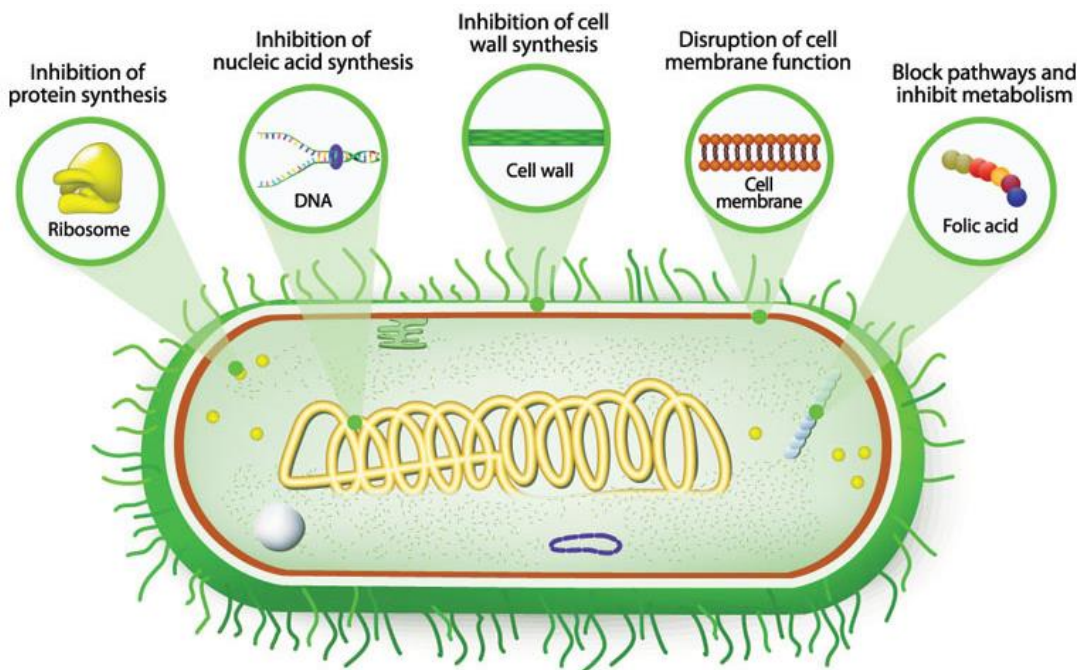
Fremveksten av resistens mot antibiotika har vært et økende problem helt siden det kom på markedet i 1945 (Aminov, 2010). Blant de første til å advare mot resistens mot penicillin ved høyt forbruk var oppfinneren selv. Men selv før det omfattende bruket av penicillin begynte har det blitt observert enzymatisk ødeleggelse av antibiotika. Det er mye diskuterte om det var antibiotika eller resistens som oppstod først. Allerede i 1944 var det observert bakteriestammer som var resistente for behandling av tuberkulose (Davies & Davies, 2010). Etterhvert som bakteriene har utviklet resistens mot antibiotika, har det blitt utviklet nye generasjoner av samme klasse. Eksempelvis, er tredjegenerasjons cefalosporiner ansett for å være mer effektiv mot bakterieinfeksjoner forårsaket av Gram- mikroorganismer, sammenlignet med første generasjon (Powers, 2004). Fram til 1990 ble det stadig oppdaget nye antimikrobielle stoffer,

men de siste 30 årene har tilførselen av nye antibiotikum stagnert betydelig (Livermore et al., 2011). Det er flere faktorer som spiller inn, men i stor grad skyldes dette regulatoriske og kommersielle utfordringer knyttet til innovasjon for utvikling av nye antibiotika. Hovedproblemet er at mikroben vil på et eller annet tidspunkt utvikle antimikrobielle resistensmekanismer, som medfører at stadig flere klasser av antibiotika ikke fungerer. Det er vanskelig å forutsi hvilke virkningsmekanismer mikroben vil etablere, og det øker utfordringene rundt utvikling av nye midler. Kostnaden og kunnskapen som kreves for å forske og bringe fram nye virkestoffer på markedet som likevel ikke fungerer etter kort tid er ikke økonomisk lønnsomt for legemiddelindustrien. De økonomiske utfordringene som er tilstede ved å utvikle nye antimikrobielle midler, har stor skyld i den synkende andelen godkjenninger av medikamenter på markedet i dag. Derimot er det heller ingen effektiv løsning på resistensproblemet. Den økende resistensutviklingen kombinert med at det ikke utvikles nye antibiotika er en stor global utfordring.

2.1.1 Antibakterielle virkningsmekanismer

Antibiotika kan klassifiseres etter hvilke bakterietyper virkestoffet er effektivt i mot, og kan skilles mellom smal- og bredspektret (Regjeringen, 2015). Bredspektret antibiotika betegnes for antibakterielle midler som har en effekt på flere ulike bakteriearter. Cefalosporiner og karbapenemer klassifiseres som bredspektrede antibiotika (WHO, 2018b). Smalspektrede er effektiv mot enkelte bakteriearter, og vil derfor være mindre resistensdrivende (Regjeringen, 2015). Det er fordelaktig for den naturlige bakteriefloraen å behandle med smalspektret antibiotika som kun dreper infeksjonsbakteriene. Bredspektret antibiotika benyttes når det er usikkerhet om infeksjonen skyldes Gram+ eller Gram- bakterier (Tronsmo, 2016, s.152). En slik antibiotikakur vil dermed medføre ubalanse i tarmfloraen ettersom den tar knekken på de fleste bakterier tilstede i tarmen. Hvis bakteriene overlever behandlingen kan det skyldes at de har utviklet motstand, og dermed bør bredspektret antibiotikum benyttes (Regjeringen, 2015). Variasjonen i virkningsspekteret til antibiotika skyldes ulik oppbygning av cellestrukturen til Gram+ og Gram- mikroorganismer. Celleveggen til bakterier er bygd opp av en tykt lag med lange sukkerpolymerer med N-acetylglukosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM) knyttet sammen med aminosyrer (Kapoor et al., 2017). Denne strukturen er å finne hos både Gram+ og Gram-. Førstnevnte har en tykkere lag, sammenlignet med Gram- som består av ett tynnere lag beskyttet med en ytre membran. I den ytre delen hos Gram- bakterier består celleveggen av poriner som tillate strømming av molekyler, eller enzymer.

De ulike antibiotikaklassene kan klassifiseres etter hvilke mekanismer de har på målcellen, og Tronsmo et al., 2016 oppsummerer fem virkningsmekanismer for mikrobiell resistens; Inhibering av proteinsyntese; Inhibering av nukleinsyresyntese; Inhibering av biosyntese av celleveggen; Membranforstyrrelse og Inhibering av folatmetabolisme. Disse er illustrert i figur 2.2.



Figur 2.2. Ulike virkningsmekanismer for resistens mot antibiotika i en bakteriecelle (CBD, 2019).

2.1.1.1 Inhibering av celleveggsyntese

β -laktamantibiotika består av β -laktamring, en kjemisk struktur som angriper celleveggen hos prokaryote mikroorganismer (Lobanovska & Pilla, 2017). Antibiotikumet β -laktam benyttes for penicilliner og andre tilsvarende antibakterielle klasser med lik effekt. Det gjelder cefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer (Haldorsen & Samuelsen, 2012). Penicilliner inndeles i smalspektrede og bredspektrede antibiotika, mens cefalosporiner deles inn i generasjoner (1-5). Ampicillin og amoksisillin er eksempler på subgrupper av penicilliner (Lobanovska & Pilla, 2017).

Celleveggen hos bakterier er bygd opp av peptidoglykan bestående av mange sammensatte monomerer av N-acetylglukosaminer og N-acetylmuraminsyrer, bundet med korte peptidkjeder (Lobanovska & Pilla, 2017). Membranen har som hovedfunksjon å beskytte og danne cellestrukturen. Enzymet transpeptidase sørger for å katalysere peptidene som binder de to

polymerkjedene sammen i en nettlignende struktur. Det primære målet til β -laktamringen er enzymet transpeptidase, også kalt penicillinbindende proteiner. Penicilliner etterligner D-alanin i den korte peptiden, og dermed hemmer ved å irreversibelt binde seg til det aktive setet på transpeptidasen (Kohanski et al., 2010; Lobanovska & Pilla, 2017) Det hindrer kryssbindingen mellom de to peptidoglykankjedene, som følgelig vil hindre syntetisering av cellemembranen. Det osmotiske trykket som oppstår i bakteriecellen fører til lysis og celledød.

2.1.1.2 Inhibering av proteinsyntesen

Aminoglykosider, makrolider og tetracykliner er klasser av antibiotika som angriper ribosomer, og hindrer syntetisering av proteiner (Wilson, 2014). Ribosomet befinner seg i bakteriecellens cytoplasma og består av små og store subenheter. Prokaryote mikroorganismer har 70S rRNA bestående av en stor subenhet kalt 50S, som igjen består av 23S rRNA og 5S rRNA. Den lille subenheten, 30S består av 16S rRNA bundet til 21 proteiner. Antibiotikumet angriper enten på peptidyltransferase senteret på den store subenheter (50S), eller på avkodingsstedet på den lille subenheten (30S). Tetracykliner og streptomyciner hemmer translasjonsforlengelsen ved å blokkere binding av transfer-RNA (tRNA), som transporterer aminosyrer til bindingsstedet i ribosomet. Erytromycin (makrolid) vil derimot binde seg til peptidyltransferasesenteret på 50S-ribosomdelen, og følgelig forhindre forlengelse av proteinet som stopper translasjonsprosessen.

2.1.1.3 DNA-replikasjon inhibering

Fluorokinoloner, er en gruppe antibiotika som forhindrer DNA-replikasjon av bakteriegenomet ved å forstyrre topologien til kromosomalt DNA (Kohanski et al., 2010). Ved replikasjon kopieres genomet, slik at det oppstår to helt komplette DNA-tråder. For at replikasjonen skal foregå må superkveilet DNA tvinnes opp av enzymet DNA gyrase (Topoisomerase II) og TopoIV (Topoisomerase IV) som befinner seg hos den prokaryote organismen. Derimot vil fluorokinoloner forhindre tvinning av DNA-tråden ved å danne kinolon-topoisomerase-kompleks. Replikasjonsgaffelen blir dermed blokkert som følgelig hindrer syntetisering av ny DNA-tråd som følgelig induserer til stressrespons og gir celledød.

2.1.1.4 Inhibering av folsyremetabolisme

Trimetoprim og sulfonamid er klasser av antibiotika som forstyrrer ulike deler av metabolismeprosessen for syntetisering av folsyre (Yoneyama & Katsumata, 2006). Enzymet dihydrofolatreduktase omdanner dihydrofolat til den aktive formen for folsyre, tetrahydrofolat. Trimetoprim inhiberer enzymet som følgelig hemmer syntetisering av nukleotider og

aminosyrer. Sulfonamid erstatter et essensielt koenzym, og følgelig binder til enzymet dihydropteroatsyntase i dannelsen av puriner og pyrimidiner som er nødvendige i oppbygning av nukleotider (Tronsmo, 2016, s. 153; Yoneyama & Katsumata, 2006). Dette preparatet har kun effekt mot bakterier som selv syntetiseres folsyre, da mennesker mangler enzymet. Det gir derved høy selektivitet for bakterier ved klinisk behandling av infeksjoner hos mennesker.

2.1.1.5 Forstyrrelse av cellemembranfunksjon

Polymyxiner er kjent som nonribosomale peptider med antibakteriell aktivitet og deles inn i to subgrupper; polymyxin B og polymyxin E, også kjent som kolistin (Velkov et al., 2010). Polymyxiner benyttes i dag som siste linje antibiotika mot infeksjon forårsaket av Gram-bakterier. Antibiotikumet angriper LPS laget på den ytre cellemembranen hos gram-, og den cytoplasmatiske membranen hos gram+. Polymyxiner består av to hydrofobe elementer som danner elektrostatiske interaksjoner med lipid A på LPS, som er inkorporert i cellemembranen. Den elektrostatiske og amfifile interaksjonen sørger for å forstyrre fosfolipidlaget ved å danne porelignende aggregater som øker permeabiliteten til cellemembranen. Den osmotiske trykket kan føre til celledød.

2.2 Antibiotikaresistens

Antimikrobiell resistens er en bredt begrep for resistens som kan oppstå hos alle mikroorganismer som virus, sopp, parasitter og bakterier som blir utsatt for antimikrobielle medikamenter (WHO, 2019a). Når mikrober blir motstandsdyktige mot antibiotika oppstår det reduserte behandlingsmuligheter ved bakterielle infeksjoner. Resistensutvikling er et økende samfunnsproblem både i Norge og internasjonalt. For samfunnet kan konsekvensen av antibiotikaresistens bli store, og selv de enkleste behandlinger kan bli relativt kompliserte. Manglende evne til å forhindre og behandle infeksjoner vil kunne medføre økt dødelighet, lengre sykehusopphold, svekke kirurgiske inngrep og øke medisinske kostnader (WHO, 2015).

Kombinasjonen av overforbruk i human- og veterinærmedisin, feil forskrivning av antibiotika og redusert utvikling av nye er vesentlige grunner til økt forekomst av resistente bakterier (Davies & Davies, 2010). De antimikrobielle substansene som blir anvendt utgjør en miljøbelastning og øker seleksjonspress av resistente bakterier (Kolář et al., 2001). Seleksjonspresset oppstår når motstandsdyktige mikrober får gode vekstforhold fordi resten av bakteriepopulasjonen blir drept av antibiotikabehandling. Det gir resistente bakterier mulighet

til å reprodusere seg, og bli dominerende i den mikrobielle populasjonen. Disse bakteriene kan potensielt danne reservoarer i tarmen hos både mennesker og dyr, og videre kan friske bærere være en stor spredningsrisiko i samfunnet (Van Den Bogaard & Stobberingh, 2000).

WHO har gruppert bakteriepatogener i tre prioriteringsnivåer (Middels, høyt og kritisk), basert på deres resistensgrad (WHO, 2017). Av kritisk viktig antibiotikaresistente bakterier, trekker WHO fram karbapenam resistente *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* samt karbapenam og tredje generasjons cefalosporin resistente *Enterobacteriaceae*. Antimikrobielle klassene cefalosporiner (3, 4 og 5. generasjon), glykopeptider, makrolider, ketolider, polymyxiner og kinoloner er beskrevet som de mest kritisk viktige innenfor humanmedisin (WHO, 2019a).

Fremveksten av bakterier som er resistente mot flere antibiotikaklasser er en økende trussel for behandling av bakterielle infeksjoner (Alekhun & Levy, 2007). Det skjer når bakterien tilegner seg forskjellige resistensgener kombinert med mutasjoner forårsaket av økt seleksjonspress (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). Ervervet resistens eller mutasjoner som oppstår hos en organisme kan påvirke flere typer antibiotika i samme klasse, dette fenomenet kalles kryssresistens. Begrepet koresistens benyttes når bakterier har genetiske elementer som utøver resistens mot flere ulike klasser. Akkumulering av resistensgener og mutasjoner fører til overlevelse av flere antimikrobielle midler, også anerkjent som multiresistente bakterier. Disse defineres som «ervert resistens for minst en agens i tre eller flere antibiotikaklasser (Magiorakos et al., 2012). Ekstensiv resistens (XDR) refererer til bakterier som er resistente mot alle klasser av antibiotika foruten to eller færre. Noen bakteriestammer har blitt resistente mot alle tilgjengelig antibiotika, og disse kalles PAN-resistente (PDR). Det skyldes enten genetiske forandringer forårsaket av mutasjoner i genomet eller ervert resistens fra omgivelsene ved HGT av mobile genetiske elementer (Alekhun & Levy, 2007). Når multiresistente bakterier etablerer seg i helsetjenesten elimineres behandlingsmuligheter ved infeksjoner. Et kjent tilfelle er *Staphylococcus aureus*, som er resistent mot de fleste β -laktamantibiotika, og en rekke andre klasser som aminoglykosider, makrolider, tetracykliner, kloramfenikol og linkosamider (Nikaido, 2009).

2.2.1 Intrinsisk og ervervet resistens

Bakterien kan ha oppnådd resistens via iboende gener (intrinsisk) eller genetiske forandringer (ervervet) (Alekshun & Levy, 2007). Intrinsisk resistens er en egenskap som deles med en bakterieart, uavhengig av eksponering av antibiotika (Reygaert, 2018). En organisme kan ha intrinsisk resistensmekanismer som alltid blir uttrykt, eller gener som kun uttrykkes ved eksponering av et bestemt antibiotika. Flere faktorer kan være årsaken til iboende resistens hos en mikrobe, og det inkluderer redusert affinitet til antibiotika på bakteriecellen, efflukspumper som pumper ut virkestoffet eller enzymatisk inaktivering av antibiotika. Typiske detekterte intrinsiske mekanismer er multiresistente efflukspumper og AmpC β -laktamase hos Gram-bakterier (Alekshun & Levy, 2007).

Når bakterier som vanligvis er følsomme mot antibiotika blir resistente skyldes dette genetiske forandringer som har blitt overført fra omgivelsene (Reygaert, 2018). Resistensnivået avhenger av bakteriearten og hvilke gener som har blitt ervervet. Ervervede mekanismer kan skyldes mutasjoner i arvestoffet som koder for antibiotikaresistens eller overføring av genetiske resistensegenskaper. Sistnevnte kan skje ved horisontal genoverføring mellom organismer via genetiske elementer som plasmider, transposoner eller integroner. Ervervet resistens via overføring av mobile elementer er ofte å se hos bakterier i samme slekt (Courvalin, 1994). Horisontal overføring mellom ulike slekter, og mellom Gram+ og Gram- bakterier er også mulig.

2.2.2 Mobile genetiske elementer

2.2.2.1 Plasmider

Plasmider er små sirkulære DNA-elementer som befinner seg utenfor kromosomet hos prokaryote mikroorganismer, ofte i flere kopier per celle (Watson et al., 2014). Plasmider inneholder genetisk materiale som koder for bakteriens egenskaper, eksempelvis resistens mot antibiotika eller desinfeksjonsmidler. Opprinnelig betegnes resistensgener som befinner seg på plasmider som R-faktorer. Plasmider som inneholder resistensgener kan gjøre bakterien motstandsdyktig mot antibiotika, UV-lys eller metaller (Tronsmo, 2016, s.148). Om plasmidet har konjugasjonsegenskaper i tillegg til gener som koder for antibiotikaresistens kan plasmidene overføres effektivt mellom bakterieceller. Når plasmidet integreres inn i bakteriens vertskromosom vil den få nye egenskaper. Det er tidligere vist at konjugative plasmider kan overføres mellom ulike bakteriepopulasjoner, og som følge vil øke spredningspotensiale

(Tronsmo, 2016, s. 148). Når et plasmid inneholder flere ulike resistensgener, vil bakterien mest sannsynlig være motstandsdyktig mot flere antibiotika.

2.2.2.2 Transposoner

Transposoner er genetiske elementer bestående av korte DNA-kjeder med mobile egenskaper (Watson et al., 2014, s.398). Disse DNA-bitene kan eksistere på plasmider eller inkorporeres på andre steder på kromosomet. Et viktig overføringselement for antibiotikaresistente gener er konjugative transposoner (Scott & Churchward, 1995). De kan konjugere endogene gener fra en organisme til en annen, uavhengig av slekt og art. Overføring kan skje via rekombinasjon, hvor transposonet flyttes mellom DNA-sekvensen i vertscellen (Watson et al., 2014, s. 398). Transposoner har egenskapen til å integreres i andre gener, som medfører endret genekspressjon.

2.2.2.3 Integroner

Et annet viktig element for spredning av resistens er integroner. Den inneholder en samling av immobile genetiske elementer som må transporteres via transposoner eller plasmider (Stalder et al., 2012). Integroner består av integrase gen som sørger for å sette inn resistensgener inn i vertscellens genom (Nikaido, 2009). Den har egenskapen til å adaptere, overføre og uttrykke genene som befinner seg i en genkassett. En genkassett inkluderer gener og stedsspesifikk rekombinasjon (Recchia & Hall, 1997). De aller fleste har evnen til å uttrykke resistensgener mot antibiotikum. Disse overførbare genetiske elementene er spesielt utbredt hos Gram-mikroorganismer.

2.2.3 Horisontal genoverføring

Overføring av genetisk mobile elementer mellom organismer kan skje via transduksjon, transformasjon, og konjugering som går under begrepet horisontal genoverføring (HGT) (Reygaert, 2018). I motsetning til vertikal overføring til organismens etterkommere, er HGT utbredte mekanismer for lateral overføring av gener mellom ulike stammer, arter og fjernt beslektede mikrober (von Wintersdorff et al., 2016). HGT en stor årsak til at mikrober har ervervet resistens mot klinisk viktige antibiotika.

2.2.3.1 Transduksjon

Ved transduksjon blir genetisk materiale (DNA) overført fra en bakteriecelle til en annen av virus, også kjent som bakteriofager (Watson et al., 2014). Virus, som består av DNA eller RNA omgitt av en proteinkappe kan feste seg reseptorer i overflaten av en bakterie hvor den injiserer arvematerialet direkte inni cellen (Tronsmo, 2016, s.153). Det skilles mellom generell -og spesialisert transduksjon (Watson et al., 2014). Ved generell transduksjon inkorporeres en tilfeldig bit av kromosomalt DNA fra vertscellen. Ved neste virusangrep vil bakterien derfor et tilfeldig bit fra vertens arvestoff rekombineres med den nye mottakeren (Tronsmo, 2016, s.153). Ved spesiell transduksjon vil temperate bakteriofager integrere sine spesifikke gener i bakterieverten, og når den kuttes fra kromosomet ved deling så vil viruset bringe med seg deler av genomet til en et nytt bakteriekromosomet.

2.2.3.2 Transformasjon

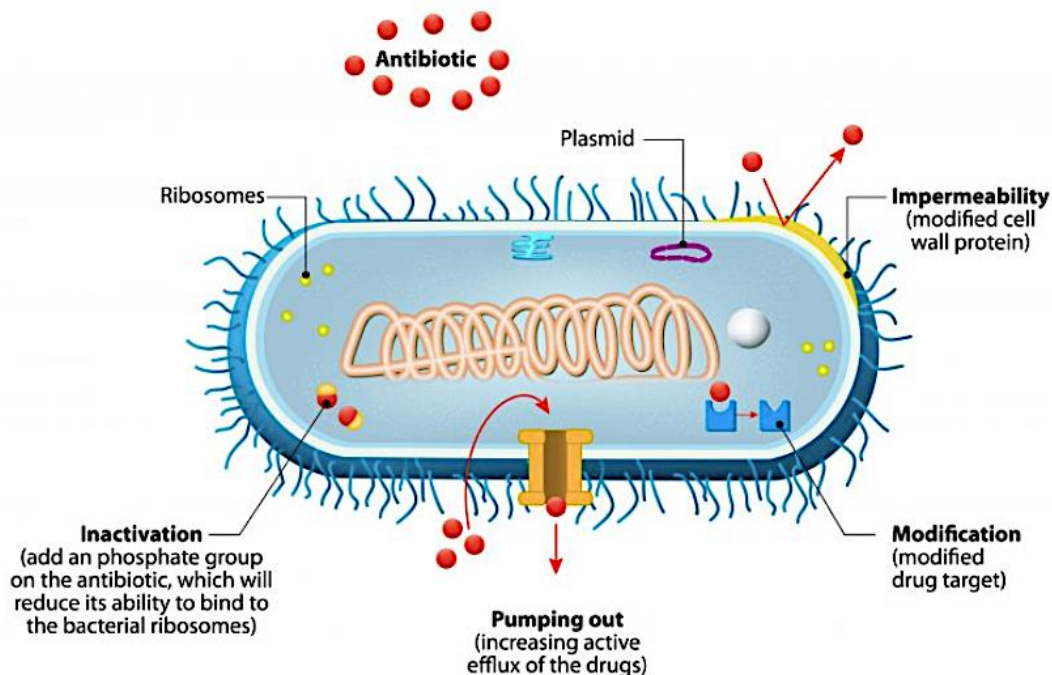
En annen mekanisme for genetisk overføring av DNA fra en organisme til en annen, er transformasjon. I dette tilfellet vil bakterien ta opp fritt DNA fra miljøet (Chen & Dubnau, 2004). Det er en kompleks prosess som er avhengig av spesifikke proteiner for å integrere DNA fra overflaten, og inn i cytoplasma hos målcellen. Det krever kompetente celler, som har egenskapen til å ta opp fremmed DNA, og inkorporere det i kromosomet. Det er kun et fåtall av kliniske bakteriearter som ta opp naturlig fritt DNA fra omgivelsene (Munita & Arias, 2016). Det gjelder slektene *Bacillus*, *Neisseria*, *Streptococcus* og *Staphylococcus* (Tronsmo, 2016, s.151). Ved opptak fra DNA fragmenter fra lyserte celler vil DNA fra donorcelle integreres i kromosomet til målverten via rekombinasjon. Transformasjon kan skje hos både Gram+ og Gram- mikroorganismer (Chen & Dubnau, 2004).

2.2.3.3 Konjugasjon

Ved konjugering vil det være direkte kontakt med mellom giver- og mottakerbakterie ved utveksling av genmaterialet (Tronsmo, 2016, s. 152). Overføringen av gener vi skje enten via pilier eller ved adhesjon mellom to ulike celler. Integrering av DNA hos Gram- bakterier skjer via pilier, en rørformet utvekst som tillater cellebakteriene å koble seg til hverandre. De Gram+ bakteriene har en klebrig celleoverflate som tillater cellemembranen å feste seg direkte til hverandre. Her blir arvematerialet videre overført til mottakercelle ved kopiering av det opprinnelige plasmidet, kjent som replikasjon.

2.2.4 Antibakterielle resistensmekanismer

For at et antibiotikum skal ha en effekt på målcellen, må antibakterielle stoffet gjenkjenne målet med en tilstrekkelig konsentrasjonen for å oppnå virkning (Martínez & Baquero, 2014). Bakteriene har over tid utviklet resistensmekanismer som enten er forårsaket av endret målcelle, eller lavere konsentrasjon av antibiotika i cellen. Resistensmekanismene som er oppdaget er illustrert i figur 2.3.



Figur 2.3. Kjente resistensmekanismer mot antibakterielle stoffer inkluderer; enzymatisk inaktivering, efflukspumpe, modifisering av målsetet og svekking av membranpermeabilitet (Almeida, 2017)

2.2.4.1 Enzymatisk inaktivering

β -laktamantibiotika, som inkluderer penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer er utsatt for enzymatisk inaktivering av β -laktamaser (Lobanovska & Pilla, 2017). Takket være evnen β -laktamaser har til å inaktivere cellevegg syntesen har det vært den viktigste første linjebehandling for bakterieinfeksjoner gjennom tidene. Enzymene er den største årsaken til antibiotikaresistens mot β -laktamantibiotika hos Gram- mikroorganismer (Bradford, 2001). Opprinnelig ble β -laktamase definert som enzymer som er utviklet fra smalt spektrum, men som har utviklet et bredspektrert inaktivering av de fleste β -laktamantibiotika (Bonnet, 2004). Det gjelder tredjegerasjons cefalosporiner, penicilliner og aztreonam. I tillegg er bakterier som produserer ESBL-enzymene ofte resistente mot fluorokinoloner og aminoglykosider (Folkehelseinstituttet, 2019). ESBL er forkortelse for «Extended spectrum β -lactamase», eller « β -laktamaser med utvidet spektrum» på norsk (Folkehelseinstituttet, 2019). Dette vil i

hovedsak si at bakteriene er multiresistente mot de fleste antibiotika, og disse er en viktig kilde til global bekymring.

β -laktamaser klassifiseres ofte etter to generelle klassifiseringssystemer, Bush-Jacoby-Medeiros og Ambler (Shaikh et al., 2015). Førstnevnte klassifiseres etter funksjonelle egenskapene til enzymet, og Ambler klassifiserer β -laktamaser etter strukturelle egenskaper (Ambler, 1980; Medeiros, 1997). Det er i dag ingen global betegnelse for de ulike ESBL-gruppene, og det har ført til en kompleks inndeling som kan være noe forvirrende. Giske et al., 2008 foreslo et nytt forenklet klassifiseringssystem som skulle være et rammeverk for forståelse og bekjempelsen av spredning av resistens for fagfolk i helsevesenet (Giske et al., 2009). Norge anvender denne tredelte klassifiseringen som deles inn i 3 undergrupper, ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA} (Folkehelseinstituttet, 2019). De klassiske enzymene som hemmer cefalosporiner og penicilliner er inndelt i ESBL_A, også kjent som klasse-A ESBLer. De viktigste genene isolert fra denne klassen er CTX-M, SHV og TEM. ESBL_M kan kategoriseres videre som ESBL_{M-C} og ESBL_{M-D}. Førstnevnte inkluderer plasmidmedierte *AmpC* med mobile egenskaper (Philippon et al., 2002). Gener som er resistente mot oksyimino-cefalosporiner betegnes som ESBL_{M-D} (OXA-klasse D) (Giske et al., 2009). Den siste subgruppen, ESBL_{KARBA} hydrolyserer alle β -laktamantibiotika, inkludert karbapenemer (Folkehelseinstituttet, 2019). Den inndeles i 3 underkategorier; ESBL_{KARBA-A} ESBL_{KARBA-B} og ESBL_{KARBA-D} (Giske et al., 2009). β -laktamaser som ble benyttet til screening i denne oppgaven, inndelt etter klassifiseringssystemet til Giske et al., 2009 er vist i *tabell 2.1*.

Tabell 2.1. β -laktamaser screenet for i denne oppgaven, inndelt etter klassifiseringssystemet til Giske et al., 2009.

ESBL _A	ESBL _M		ESBL _{KARBA}		
	ESBL _{M-C}	ESBL _{M-D}	ESBL _{KARBA-A}	ESBL _{KARBA-B}	ESBL _{KARBA-D}
CTX-M	CMY		KPC	IMP	OXA-48
TEM				VIM	
SHV				NDM	

Plasmidmedierte β -laktamaser inkluderer oftest TEM, SHV og CTX-M som betegnes som ESBL_A, som er oppsummert i *tabell 2.1*. Fremveksten av resistensgener fra ESBL ble detektert i *E.coli* allerede før penicillin ble anvendt i kliniske sammenheng (Bradford, 2001). Den første plasmid-medierte β -laktamasen ble isolert 1960-tallet kort tid etter penicilliner ble introdusert

til markedet og brukt i klinisk sammenheng (Aminov, 2010). Genvarianten TEM-1 er den vanligste detekterte β -laktamasen hos Gram- bakterier. En annen plasmid-mediert β -laktamase isolert fra *E. coli* og *Klebsiella pneumoniae* er SHV-1. Det referer til sulfyldryl-variabel, som beskriver den biokjemiske egenskapen til denne β -laktamasen (Heritage et al., 1999). SHV-1 er også tranposonbundet på lik linje som TEM-1 som ofte relatert til kliniske isolater. Få år etter introduksjon av cefotaksim i klinisk bruk, ble det oppdaget klinisk resistens mot dette antibiotikumet (Bonnet, 2004). CTX enzymet oppstod opprinnelig fra TEM β -laktamase, etter punktmutasjoner i genet. Opprinnelig var CTX-M-1 resistens mot cefotaksim, men i senere tid har det utviklet andre derivater som har utviklet hydrolytiske egenskaper mot flere generasjoner av cefalosporiner.

I gruppen ESBL_M har det videre blitt delt inn i plasmid-mediert Amp^C (ESBL_{M-C}) og klasse D (ESBL_{M-D}) enzymer som er tidligere oppgitt. En av de typiske plasmidmedierte genene som er detektert verden over er CMY (Jacoby, 2009). En studie identifiserte plasmidbårne CMY fra samtlige *Salmonella* isolater fra dyr og mennesker, noe som tyder på at det har skjedd genoverføring mellom mennesker og matproduserende dyr (Winokur et al., 2001). I Norge er det tidligere gjort funn av bla_{CMY-2}-genet isolert fra *E. coli* i kylling som viste resistens mot β -laktamantibiotika (NORM/NORM-VET, 2018).

I gruppen ESBL_{KARBA-A} inkluderer *K. pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (Gupta et al., 2011). KPC ble først oppdaget i 2001 i USA, og videre spredde genet seg rundt i statene. ESBL_{KARBA-B} inkluderer Metallo- β -laktamaser (MBL) (Walsh et al., 2005). Resistens mot karbapenemer er nå identifisert hos *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. og *P. aeruginosa*. Metallo- β -laktamaser hydrolyserer hovedsakelig imipenem (karbapenemer). I 2009 ble det oppdaget en ny MBL, kalt New Dehli MBL (NDM). Kort tid etter NDM ble oppdaget, ble også IMP (imipenem) og VIM (verona integron-encoded MBLs) detektert (Walsh et al., 2005). OXA, som er en type ESBL_{KARBA-D} er navngitt etter dens evne til å hydrolysere oksacillin (Paterson & Bonomo, 2005). Denne genvarianten forekommer ofte hos *P. aeruginosa*, men har i tillegg blitt påvist hos andre Gram- bakteriearter. OXA hydrolyserer cefotaksim (cefelasporin), ceftazidim (cefelasporin) og aztreonam (monobakter). I kliniske stammer befinner OXA-genene vanligvis i plasmider integrert på genkasseter (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006). OXA-48 er den mest utbredte varianten som er identifisert verden over (Poirel et al., 2012).

2.2.4.2 Efflukspumpe

For å unngå oppsamling av toksiske forbindelser i bakteriecellen har organismen utviklet pumpesystemer som eksporterer stoffer ut av cellen (Fernández & Hancock, 2012). Det er en energiavhengig prosess som kan pumpe ut antimikrobielle midler og derved regulere konsentrasjonen i cellen for å unngå store ansamlinger av antibiotika (Munita & Arias, 2016). I tillegg til å pumpe ut antibiotika, så kan andre skadelige stoffer pumpes ut for å begrense de skadelige innvirkningene de har på cellen (Poole, 2001). De fleste efflukspumpene som eksporterer ut antibakterielle midler fra cellen har evnen til å pumpe ut et bredt utvalg av antibiotika (Kapoor et al., 2017). Eksempelvis makrolider, fluorokinoloner og tetracykliner. Pumpen befinner seg i den cytoplasmatiske membranen, og dersom pumpen oppnår en høyere affinitet for antibiotika kan efflukspumpen portere medikamentet ut av cellen før den binder seg til den opprinnelige målstedet (Munita & Arias, 2016). En av de klassiske eksemplene på effluksmediert resistens er mot tetracykliner. Det er en membranassosiert efflukspumpe som er assosiert med proteinet *tet*, som består av ulike (Tet)-genklasser (Fernández & Hancock, 2012). Flere pumpesystem er registrert hos både Gram- og gram+ mikroorganismer.

Ulike efflukspumper som er klassifisert etter energisystem som benyttes for å pumpe ut stoffer fra intracellulær celle (Kumar & Schweizer, 2005). Disse er kjent som «The Main facilitator superfamily (MFS)», «ATP-binding cassette (ABC)», «Small multidrug resistance (SMR)», «Resistance-nodulation-division (RND)», «Drug/metabolite transporters (DMT), og «Multidrug and toxic compound Extrusion (MATE)». Hos Gram- bakterier er RND-pumper ansett som den mest kjente efflukspumpesystemet, og er kvalifisert til å ekstrudere ut mangfoldige antimikrobielle midler. Gram+ har en mindre komplisert mekanisme grunnet fravær av membrandiffusjonsbarriere (Kumar & Schweizer, 2005). Så og si alle pumpesystem fremmer resistens mot kliniske antimikrobielle midler i ulik grad (Poole, 2001). Men det er fortsatt usikkert om det er selve hensikten med efflukspumpen.

2.2.4.3 Nedsatt membranpermeabilitet

Cellemembranen en beskyttende barriere som kan svekkes når bakterien har naturlige resistensmekanismer som påvirker membranpermeabiliteten (Doyle et al., 2006). Nedsatt membranpermeabilitet er en mekanisme utviklet av bakterier som forhindrer at antibiotika og andre legemidler når den intracellulære delen av cellen (Munita & Arias, 2016). I praksis vil den ytre membranen for Gram- bakterier ha porinproteiner slik at stoffer kan passere cellemembranen. Antibiotikaresistens som skyldes redusert permeabilitet er vist hos flere

kliniske isolater (Kumar & Schweizer, 2005). En av de viktigste eksemplene er vankomycin, som ikke lenger er effektivt mot Gram- mikroorganismer (Munita & Arias, 2016). Et annet eksempel er porinmedierte gener som har utøvd resistens hos *P. aeruginosa*.

2.2.4.4 Modifisering av målsetet

Vanligvis binder antibiotika seg til målstedet med høy affinitet som forhindrer bakteriens funksjon (Blair et al., 2015). Antibiotika og målmolekylet danner en spesifikk interaksjon, og endringer i setet medfører at stoffet ikke har en effekt på målcellen (Kapoor et al., 2017). Bakterien har utviklet mekanismer som enten beskytter målet eller modifiserer målstedet som sørger for redusert affinitet (Munita & Arias, 2016). Genene som er assosiert med målbeskyttelse er ofte kodet på mobile genetiske elementer, og en av de mest klassiske genene som er involvert som koder for resistens mot tetracykliner og kinoloner. Modifisering av målsetet er den vanligste knyttet til antibiotikaresistens. Det skyldes som oftest enzymatisk endringer, mutasjoner eller utskiftning av målsetet. Antibiotikaresistens som oppstår grunnet mutasjonsendringer er typisk for linezolidresistens, og skyldes genetiske endringer i ribosomale proteiner (Blair et al., 2015). Fullstendig utskiftning av målsetet er ofte å se hos *S.aureus*, og bakterien bærer ofte resistensgenet *MecA* som koder for PBP2a.

2.2.4.4.1 Meticillinresistente *S. aureus* (MRSA)

Gule stafylokokker, også kjent som bakterien *S. aureus* befinner seg normalfloraen på hud og slimhinner hos dyr og mennesker (Folkehelseinstituttet, 2014). Når bakterien forårsaker alvorlige bakterielle infeksjoner i hud eller såroverflater, kan det medføre behov for antibiotikabehandling. Fra tidlig av ble betegnelsen «meticillinresistente *S. aureus*» (MRSA), benyttet for bakteriens egenskap til å utøve resistens mot en type smalspektret β -laktam, kalt meticillin. Det er et syntetisk antibiotika som ikke lenger i bruk, men betegnelsen meticillinresistente *S.aureus* er beholdt. Begrepet MRSA benyttes hovedsakelig for å betegne multiresistente *S.aureus*. Resistens skyldes penicillin-bindene proteiner 2 (PBP2), som viser lavere affinitet for β -laktama slik at syntetisering av celleveggen til den uønskede bakterien kan fortsette som normalt. Gullstandarden for å påvise MRSA, er PCR av resistensgenet *MecA* (Paterson et al., 2014). Genet er plassert i kromosomkasseter (SCCmec) hos den resistente bakterien. PBP2 er kodet av *MecA*-genet som er derivater av PBP med lavere affinitet for β -laktam antibiotika (Blair et al., 2015). I 2007 ble det oppdaget en ny genvariant av melkeprøver fra kyr i England, og fikk i senere tid navnet *MecC* (Paterson et al., 2014). Forekomsten av dette

genet er sjeldent, sammenlignet med *MecA* (Peacock & Paterson, 2015). For påvisning av *S.aureus* kan det spesifikke genet *spa* benyttes til PCR-screening.

Dyr-assosierte MRSA (LA-MRSA), er en annen variant som har hatt en økende forekomst hos produksjonsdyr, hovedsakelig i grisebesetninger (Folkehelseinstituttet, 2014). MRSA kan overføres mellom dyr og mennesker, og gi alvorlige infeksjoner som vil være vanskelig å behandle. I Norge er forekomsten av alvorlige MRSA-infeksjoner lavt, og antall registrerte tilfeller har holdt seg stabilt de siste årene. I norske dyrebesetninger er det meldt inn svært få tilfeller, og i 2018 var det ingen positive funn i NORM-VET undersøkelsen (NORM/NORM-VET, 2018).

2.3 Antibiotikaforbruk og resistensforekomst

I 2015 ble det estimert at 672.000 infeksjoner som oppstod hos mennesker var forårsaket av resistente bakterier i Europa, hvorav omtrentlig 33 000 førte til dødsfall (Cassini et al., 2019). Av europeiske land var det Hellas og Italia som hadde den største belastningen. Landene som hadde færrest tilfeller var Nederland, Estland og de nordiske landene. I 1999 ble det etablert et overvåkningsprogram for antimikrobiell resistens i Norge (NORM/NORM-VET, 2018). Systemet ble opprettet av Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM). Bare ett år senere ble det opprettet et overvåkningsprogram for mat, dyr og fôr kalt NORM-VET. Årlig presenterer NORM-VET og NORM resultatene i en rapport om forbruksmønsteret av antimikrobielle midler i mat dyr, mennesker, samt resistensforekomst (NORM/NORM-VET, 2018). Rapporten som kom ut i 2018 viste at forbruket av antibiotika hadde blitt redusert med 24 % for humant forbruk i primærhelsetjenesten og institusjoner siden 2012. Penicilliner og cefalosporiner er de mest brukte preparatene. Utbredelsen av antibiotikaresistente bakterier fra humane isolater var lavt i 2018. Men det ble påvist gentamicin- og linezolidresistens hos både *Enterococcus faecalis* og *Enterococcus faecium*. For sistnevnte ble det i tillegg observert resistens mot vankomycin, ampicillin, og linezolid.

Globalt sett er forbruket av antibiotika hos matproduserende dyr knyttet til forebygging og behandling av infeksjonssykdommer (Van Boeckel et al., 2015). Tidligere ble antibiotika benyttet som vekstfremmere i husdyrnæringen i flere skandinaviske land (Bengtsson & Wierup, 2006). Norge innførte et selvpålagt forbud for bruk av antibakterielle vekstfremmere i husdyrnæringen i 1995, og bare tre år senere ble det forbudt i EU (Bengtsson & Wierup, 2006; Casewell et al., 2003). WHO rapporterte i 2018 at omtrent 40% av verdensland har redusert

forbruket av antimikrobielle midler som vekstfremmer i landbruket, hvorav Europa bidrar til den største reduksjonen (WHO, 2018a). Det har vist en høy korrelasjon mellom forbruket av antibiotika og forekomst av antimikrobiell resistens hos matproduserende dyr (Chantziaras et al., 2014). Forbruket i Norge er relativt lavt, og den restriktive bruken reflekterer også den lave forekomsten av antibiotikaresistens hos både mennesker og dyr (Animalia, 2017). Nasjonal strategi mot antibiotikaresistens 2015-2020 ønsket å redusere forbruket for matproduserende dyr med 10 % (Regjeringen, 2015). I husdyrnæringen reduserte forbruket av antimikrobielle midler i husdyrnæringen med 17 % fra 2013 til 2018 (NORM/NORM-VET, 2018). Det gjelder de vanligste matproduserende dyrene i Norge; Storfe, gris, sau, geit og fjørfe. Av 5167 kg aktivt stoff som ble solgt i 2018, utgjorde benzylpenicilliner (Penicillin G) den største andelen av preparatene. Ifølge NORM-VET er forekomsten av antimikrobiell resistens lavt i norske dyrebesetninger og Norge går i en positiv retning når det kommer til å redusere forbruket i denne sektoren.

I andre deler av verden øker derimot antibiotikaforbruket (FDA, 2018). I USA økte forbruket til matproduserende dyr med 9 % fra 2017 til 2018. Det anslås at 80 % av forbruket i USA er knyttet til matproduserende dyr, hvor den største andelen benyttes på storfe (Van Boeckel et al., 2015). Til sammenlikning blir omtrent 10% av alle antibiotika benyttet hos husdyr i Norge, og resterende 90% til humant forbruk (Animalia, 2017). I 2010 var Kina, USA, Brasil, India og Tyskland landene som hadde det høyeste forbruket til matdyrproduksjon (Van Boeckel et al., 2015). Van Boeckel et al., 2015 forventer en økning av antimikrobiell midler med 67 % innen 2030, hvor forbruket vil fordobles i flere av disse landene. Det er bevist at antimikrobielle mikrober som har oppstått i dyr via behandling av antibiotika, kan overføres til mennesker (Angulo et al., 2004). Resistensgener lokalisert på genetiske elementer har potensiale for horisontal spredning som kan overføres mellom bakteriepopulasjoner i naturlige omgivelser eller i klinisk sammenheng (Davies & Davies, 2010). Den utbredte bruken av antimikrobielle stoffer verden over kan øke fremveksten av resistens som potensielt overføres til matprodukter, til miljøet og til landbruksarbeidere (Van Boeckel et al., 2015).

2.4 Utvikling og spredning av resistens

Spredning av antibiotikaresistens er et komplekst og sammensatt fagfelt, som har blitt forsket mye på de siste 20 årene. Fra tidlig av har det blitt konkludert med at antibiotikaresistens har vært tilstede og utviklet seg lenge før det første antibiotikumet kom på markedet på 1940-tallet

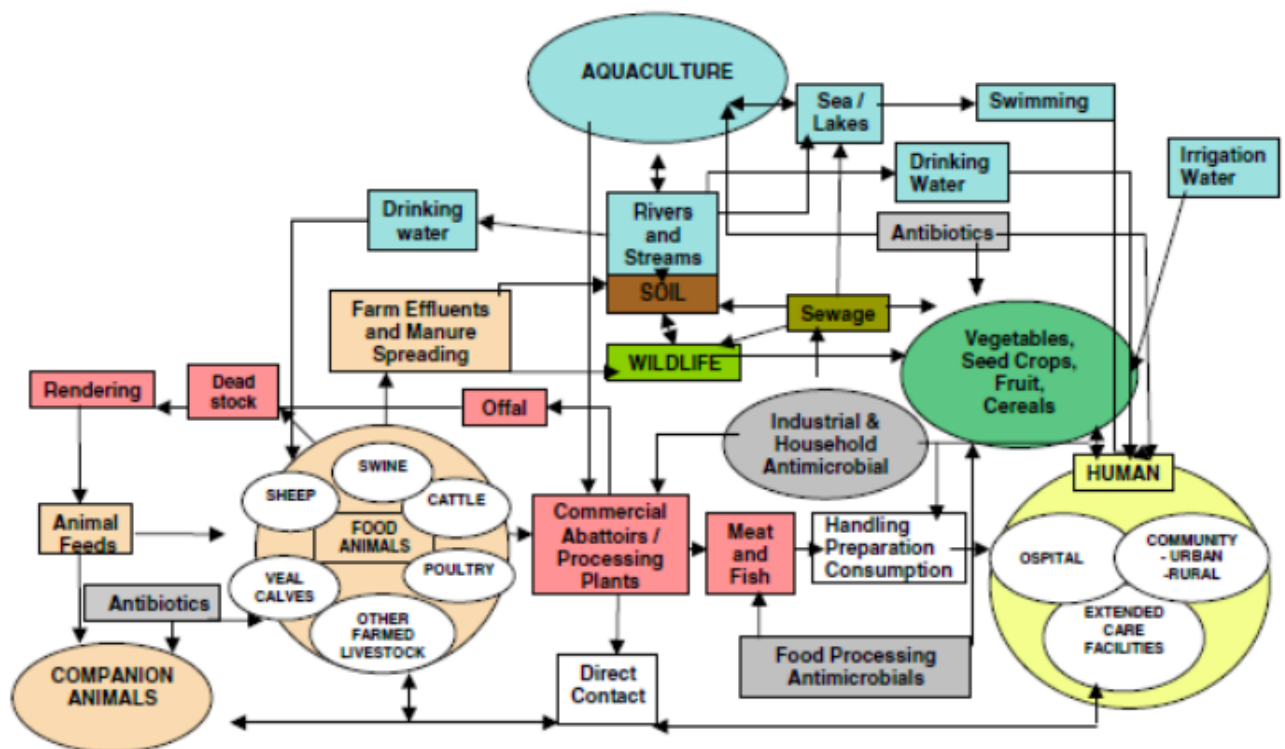
(Nguyen et al., 2019). Det antas at det naturlige mikrobielle miljøet produserer antibiotika for beskyttelse og konkurranse mot næringsstoffer og overlevelse i miljøet mot andre mikrober. Bakterieisolater med resistensegenskaper mot flere moderne antibiotika har blitt oppdaget i berggrunnsprøver fra mange millioner år tilbake (Ponder et al., 2005). Derimot anses antibiotika forbruket hos mennesker og dyr for å være den største faktoren til seleksjonsspredning av resistensgener i dag (Levy & Marshall, 2004).

En stor andel av antibiotikaforbruket i verden går til dyreavl (Van Boeckel et al., 2015). Et forbruksmønster som framprovoserer spredning og økt grad av resistente bakterier i husdyrnæringen, som igjen utgjør en folkehelsestrussel ved zoonotisk overføringspotensiale til mennesker. Resistente bakterier med animalsk opprinnelse kan overføres til mennesker ved direkte kontakt, eller via matproduksjon og miljø (Angulo et al., 2004). Husdyrgjødsel fra dyr som har gjennomgått antibiotikabehandling, kan spres over jordsmonn hvor grønnsaker vokser (Bengtsson-Palme et al., 2018). Det er tidligere vist at resistensgener observert hos gårdsdyr, er lik de som er gjort funn av hos bakterieisolater fra svelg og nese hos mennesker (Smith et al., 2013; Spohr et al., 2011). Resistensgener plassert på mobile genetiske elementer som utgjør risiko for spredning mellom landbruket og humane bakterier for mennesker som jobbet tett med dyr.

Det hevdes at spredning av resistensgener er forårsaket av menneskelig aktiviteter (Kristiansson et al., 2011; Rizzo et al., 2013; Singer et al., 2003). Kloakk- og avløpsrensaneanlegg er viktige kilder til utslipp i miljøet forårsaket av humantforbruk. I mikrobielle miljøer i nærheten av store utslippsområder i India er det observert høye nivåer av resistente mikrober. I tillegg er det vist at avløpet fra sykehus har en del antibiorikaresistente mikrober sammenlignet med kommunale anlegg (Reinthal et al., 2003). Slike anlegg vil være et fundament for deling av resistensgener på tvers av ulike mikrobielle populasjoner. Alle antibiotika resistensmekanismer er representert i avløpsrensaneanlegg, noe som belyser antydninger til resistensreservoar (Rizzo et al., 2013). Samtidig kan et høyt forbruk av forebygging av sykdom hos akvatiske organismer skape økt seleksjonspress i vann, samt endring i mikrobiotisk mangfold i akvatiske organismer som skalldyr og fisk (Baquero et al., 2008; Cabello, 2006).

I tillegg til utslipp av antibiotika i vannholdige miljøer, så kontamineres vannet med andre komponenter som desinfeksjonsmidler og tungmetaller (Baker-Austin et al., 2006; Baquero et al., 2008). Metaller vurderes som potensielle agenser for koresistens mot antibiotika, når

resistensgener er lokalisert på genetiske elementer. Flere av de samme resistensmekanismene er observert for resistens mot antibiotika og metaller (Baker-Austin et al., 2006). Dette er spesielt bekymringsfullt ettersom metaller degraderes svært sakte, og kan være positive for seleksjonspress for utvikling av resistensgener hos flere mikrober i miljøet. Antibiotika substanser har også en forsinket nedbrytningsprosess, når den bindes til jordpartikler (Baquero et al., 2008). Hvor komplekst systemet og spredningspotensialet for gener som koder for antibiotikaresistens er mellom landbruket, matproduserende dyr, mennesker og næringsmidler er illustrert i figur 2.4.



Figur 2.4. Kompleksiteten i spredning av resistens mellom ulike miljø (Doyle et al., 2006).

2.5 Jurmikrobiota og resistensforekomst hos melkekyr

2.5.1 Forekomst av resistente mikrober hos melkekyr

De fleste studier har kartlagt resistens i bakterieisolater fra mastittmelk eller tarmfloraen hos storfe. Hovedsakelig er forskning basert på resistens hos mastittisolater fra slekten *Staphylococcus* (Animalia, 2017). Penicillinresistens hos *S.aureus* har lenge vært et problem ved mastittinfeksjoner. Østeras et al., 2006 viste at denne bakterien var resistent mot penicillin G, streptomycin og tetracyklin. I 2010 ble det gjort funn av penicillinresistens hos *S.aureus* fra subkliniske isolater både ved konvensjonelt, og økologisk jordbruk (Garmo et al., 2010).

Forekomsten av denne resistente bakterien har derimot blitt redusert med 60% fra 1994 til 2015 ved klinisk og subkliniske mastittinfeksjoner (Animalia, 2017).

Ettersom antibiotika benyttes regelmessig til behandling av infeksjoner hos melkekyr, er rutinemessig overvåkning av antimikrobiell sensitivitet viktig for å se sammenhengen mellom forbruket. NORM-VET undersøkte forekomsten av resistens i bakterieisolater fra meieriprodukter (NORM/NORM-VET, 2018). *E. coli* var følsom for nesten alle antibiotika det ble testet for, foruten ampicillin. Prøvene viste heller ikke tegn til resistens mot kliniske viktige antibiotika som cefalosporiner, kinoloner eller kolistin eller karbapenemer. En finsk studie viste at enterokokker isolert fra mastittprøver var de mest resistente av alle organismene det ble testet for (Pitkälä et al., 2004). Isolatene viste sannsynligvis en ervervet resistens mot tetracykliner, makrolider og aminoglykosider, men de var følsomme for både penicillin og ampicillin. Svensk overvåkning av antimikrobiell resistens isolerte *E. coli* fra mage-tarmkanalen til kalver, som viste resistens mot ampicilliner, streptomyciner og tetracykliner (Sweders-Swarm, 2018). Samme resistensegenskaper ble observert hos *E. coli* isolert fra melk.

2.5.2 Jurmikrobiota

Juret, melkeorganet hos kyr består av fire separate spener (Blowey & Edmondson, 2010). Hver jurspene består et eget melkesekretorisk system hovedsakelig av alveoler og melkekanaler. Dypt inn i spenen er sekretoriske alveolene som er omringet av melkekjertler. Ved stimuli vil melken sekreteres ut av alveolene, og slippes ned via kanaler før den presses ut i enden av jurspenen. Opp til 400 liter blod strømmer gjennom juret ved melking. Melken er en kompleks væske som skal tilfredsstille avkommets ernæringsbehov (Addis et al., 2016). Fra tidligere av var den viktigste funksjonen til spenen var å melke kalver, men i dag er melken et viktig næringsmiddel i det norske kostholdet.

Mikrobiota i juret hos friske kyr ble tidligere antatt for å være tilnærmet sterile, og tilstedeværelse av bakterier hadde en ubetydelig rolle eller skyldtes eksterne forurensninger (Addis et al., 2016). Det er midlertidig få studier som har identifisert mikrobiota i det friske juret. Og det er fortsatt usikkerhet i hva som skyldes mangfoldet i melkens mikrobiota i forhold til jurnhelse og potensielle sykdommer. En studie klassifiserte *Faecalibacterium*, *Lachnospiracaeae* og *Propionibacterium* som en del av den friske mikrobiota til jurkjertelene (Oikonomou et al., 2012). En systematisk oversiktsstudie oppsummerte de meste identifiserte bakterieslektene som er utforsket i jurspenen, og de inkluderte *Acinetobacter*, *Aerococcus*,

Corynebacterium, *Enterobacter*, *Facklamia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Propionbacterium*, *Staphylococcus* og *Streptococcus* (Derakhshani et al., 2018). Bakterier som inkluderer i den melk fra sunne melkemikrobiota kan være potensielle mastittpatogener (Rainard, 2017). Det gjelder hovedsakelig *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Burkholderia*, *Streptococcus* og *Staphylococcus*.

Det antas at jurspenen ikke kan baktraktet som eneste reservoar for bakterier som finnes i melken (Addis et al., 2016). Inntrengning av bakterier i spenekanelen skjer enten via kontaminering fra omgivelsene eller ved kolonisering av bakterier som allerede er tilstede (Blowey & Edmondson, 2010). Det oppstår ulikheter i en bakteriepopulasjon i rå melk, og det kan skyldes de miljømessige ulikhetene som er hos forskjellige gårder. Det er vist sesongvariasjon i melkens mikrobiota, og prøver innsamlet ved beitesesong viste en høyere andel av *Pseudomonas*, og *Acinetobacter* (Derakhshani et al., 2018). En høyere andel tarmbakteriene var assosiert ved innesesong. Dette kan illustrere påvirkning av miljøomgivelser på den mikrobielle floraen i jurspenen.

2.5.3 Mastitt

Jurbetennelse, eller mastitt, er en svært utbredt infeksjonssykdom hos melkekyr, og forårsaker store økonomiske tap i meieriindustrien. I tillegg er mastittinfeksjoner kjent for å gi dyrevelferdsmessige konsekvenser som smerter og atferdsendringer hos de berørte kyrene (Addis et al., 2016; Blowey & Edmondson, 2010). De fleste tilfeller skyldes bakterielle infeksjoner, og de alvorlige tilfeller av mastitt krever veterinær behandling med antibiotika. Jurbetennelse kan deles inn i klinisk og subklinisk mastitt (Addis et al., 2016). Klinisk mastitt kan påvises med tydelige sykdomstegn som rødhet eller hevelse. Klinisk oppstår enten akutt eller i kronisk form. Ved subkliniske tilfeller er det ikke observert kliniske symptomer som indikerer infeksjonstilstedeværelsen, men ofte et høyt somatisk celletall og redusert melkeproduksjon.

I melkeproduksjonen er jurbetennelse den vanligste årsaken til forbruk av antibiotika, og utgjør 1/3 av alle registrerte sykdommer hos melkekyr (Tine Rådgivning, 2019). Hos storfe benyttes hovedsakelig penicilliner til behandling av mastitt, og andre bakterielle infeksjoner (Statens legemiddelverk, 2012). Dersom mastittinfeksjonen ikke skyldes en penicillinresistent mikrobe, benyttes benzylpenicillin. Hvis infeksjonen skyldes en penicillinresistent mikrobe benyttes penicillin kombinert med aminoglykosider. Selv om mastittinfeksjoner bidrar til den største

andelen av antibiotikaforbruket hos melkekyr i dag, har behandling av klinisk mastitt redusert med 70 % fra 1994 fram til 2019 (Tine Rådgivning, 2019). Likevel utgjør det en stor økonomisk belastning hos meieriindustrien.

2.6 Bekjempelse av antibiotikaresistens

For at kommende generasjoner skal få mulighet til å benytte seg av antibakterielle midler, bør det settes konkrete og effektive mål internasjonalt (Regjeringen, 2015). Forbruket av antibiotika er lavt i Norge sammenlignet med andre europeiske land. Selv om Norge er i en gunstig situasjon, bør det være fokus på kontinuerlig forebygging. I 2015 la regjeringen fram en nasjonal strategi mot antibiotikaresistens (Regjeringen, 2015). Handlingsplanen krever innsats i alle sektorer, hvor de overordnede målene for Norge er å begrense forbruket av antibiotika, øke kunnskapsnivået og være en drivende kraft i et internasjonalt perspektiv.

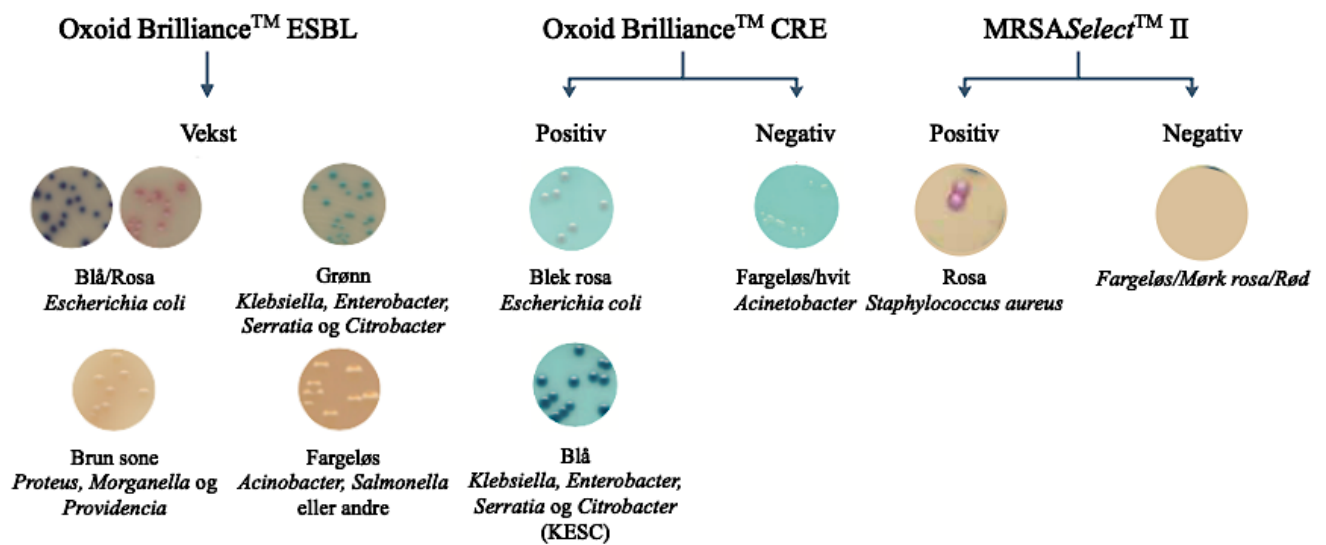
Mange av forslagene som kommer fram i ulike rapporter er å gjennomføre streng kontroll av forbruket hos mennesker (Regjeringen, 2015; WHO, 2018b). Aminov et al., 2010 hevder at kunnskapsmangelen rundt antibiotikaresistens korrelerer med høy forekomst av resistente mikrober (Aminov, 2010). Det bør være generelle globale retningslinjer for leger som skal forskrive resepter på antibiotika til pasienter i helsetjenesten (Davies & Davies, 2010). All unødvendig bruk av antimikrobielle midler bør reduseres ved at resepter ikke blir forskrevet til pasienter med forkjølelse eller virusinfeksjoner. Leger bør forskrive antibiotika som er spesifikk for den aktuelle infeksjonen. Hvis bakteriene er dyrket fram bør passende antibiotikum forskrives, og helst smalspektret som dreper den spesifikke infeksjonsbakterien.

Selv om Skandinaviske land har strenge reguleringer for bruk av antibiotika, så vil økende import og reisevirksomhet bidra til spredning av resistente mikrober på tvers av landegrensene. I mange utviklingsland der antibiotika er lett tilgjengelig uten resept, er forbruket av antibiotika i større grad ukontrollert. India slipper ut store mengder ciprofloksacin i elver langs industrianleggene (Davies & Davies, 2010). Menneskelig forurensning av antibiotikum i miljøet kan ha vært en stor bidragsyter til spredning av resistens globalt.

3. Metodisk teori

3.1 Dyrkningsbasert fenotypisk screening på selektive kromogene medier

For fenotypisk bestemmelse av antibiotikaresistens kan dyrkningsbaserte metoder på selektive medier benyttes. Kromogene medier som inneholder antibiotikum kan selektere for resistensegenskaper og identifisering av bakterieart som er tilstede (Rank, 2012). Metoden er tidsbesparende og hyppig brukt for screening av antibiotikaresistens. Resultatene er tilgjengelige innen 24 timer for in vitro-analysering av kliniske prøver som urin, blod og avføring (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a; Thermo Fisher Scientific Inc, 2010b). Kromogene medier gir en god diagnostikk for påvisning av kliniske isolater fra menneskelig opprinnelse, sammenlignet med prøver fra mat (Ariza-Miguel et al., 2015). I denne studien ble tre ulike skåler med bestemte seleksjonsmedier benyttet. Følgende skåler ble anvendt; Oxoid Brilliance™ ESBL, Oxoid Brilliance™ CRE og MRSASelect™ II. Fargeendring som kan oppstå ved vekst på de ulike mediene kan gi en indikasjon på hvilken bakterie som befinner seg i prøven som er illustrert i figur 3.1.



Figur 3.1. Fargescreening på Oxoid Brilliance™ ESBL agar, Oxoid Brilliance™ CRE og MRSAselectII.

Oxoid Brilliance™ ESBL agar er et kromogent vekstmedium som er selektiv for bredspektret β -laktamase produserende mikroorganismer (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010b). Det er hovedsakelig ESBL-produserende *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, og *Citrobacter* gruppen (KESC) som kan identifiseres ved bruk av Oxoid Brilliance™ ESBL agar. Mediet består av Cefpodoxime, et 3. generasjons cefalosporin som i kombinasjon med andre antibakterielle stoffer hemmer veksten av de fleste *Enterobacteriaceae* som ikke produserer

ESBL eller AmpC. På de opake ESBL-skålene kan *E.coli* utrykke galaktosidase og glukuronidase som produserer blå kolonier for galaktosidase, som er visuelt framstilt i figur 3.1. Men for *E. coli* som er β -galaktosidase negative, blir koloniene rosa. *Proteus*, *Morganella* og *Providencia* har egenskapen til å bryte ned tryptofan noe som følgelig gir brune kolonier med brun glorie.

Oxoid Brilliance™ CRE agar består av antibakterielle stoffer fra karbapenem-klassen (imipenem, meropenem, ertapenem og doripenem) som detekterer for *Enterobacteriaceae*-familien (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a). En CRE-positiv prøve vil gi rosa kolonier, noe som antyder tilstedeværelse av *E. coli*. Fargeendringen gjør det enkelt å skille *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* og *Citrobacter* (KESC-gruppen) som får blå kolonier. I tillegg vil det være enkelt å observere en CRE-negativ prøve, hvor den pigmenterte agaren, gjør de fargeløse/hvite koloniene mer tydelige. En negativ prøve kan indikere tilstedeværelse av *Acinetobacter* spp.

Ved screening av Meticillresistente *S.aureus* ble selektiv medium av MRSASelect™ II agar benyttet (Bio-Rad, 2016). Det er et opakt kromogent medium som oppnår fargeendring ved enzymatisk aktivitet som produseres spesifikt fra *S. aureus*. Dersom det vokser MRSA på skålen, vil det dannes rosa kolonier. Ved vekst av røde/mørke rosa kolonier betraktes resultatet som MRSA-negativ. Dersom det dannes ikke-rosa kolonier eller det er ingen vekst på skål er isolatet trolig MRSA-negativ. Hvis det vokser på de ulike selektive mediene bør koloniene selekteres og undersøkes videre for konfirmasjon og resistenstesting.

3.2 Molekylærbiologiske metoder

3.2.1 Polymerasekjedereaksjon

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en molekylærbiologisk metode som benyttes for oppformering (amplifisering) av et spesifikt mål-DNA, fra et templat som er ekstrahert fra organismen (Garibyan & Avashia, 2013). Kun små mengder av DNA er nødvendig for amplifisering av tilstrekkelig mengde kopier som kan analyseres videre. Ved enhver PCR-prosess kreves tilstedeværelse av primere («Forward» og «Reverse»), DNA-polymerase, deoksynukleotid trifosfater (dNTP), og DNA-templat. Primeren, en kort enkeltrådet nukleotidsekvens bestemmer startpunktet for syntetisering av den nye komplementære DNA-tråden. Når primeren er bundet til DNA-templatet, kan polymerasen bindes for å starte elongeringsprosessen. Polymerasen sørger for syntetisering av mål-DNA fra dNTP, slik at det oppstår to nye DNA-tråder. Taq DNA-polymerase, isolert fra *Thermus aquaticus* er i dag den

vanligste reagensen benyttet i en PCR-prosess, grunnet dens varmestabile egenskaper (Innis et al., 1988). Nukleotidene som inkluderer adenin, tymin, cytosin og guanin fungerer som byggesteiner, og danner molekylene DNA og RNA (Garibyan & Avashia, 2013).

Selve amplifiseringen av DNA foregår in vitro i en PCR-maskin bestående av termiske blokker (Garibyan & Avashia, 2013). Prøverørene med reaksjonsblandingen er plassert i varmeblokkene og temperaturen justeres automatisk ved et forhåndsinnstilt temperatur- og tidsprogram. I første trinn av tretrinnsyklusen gjennomgår dobbeltrådet DNA-tråden en denaturering, hvor enkeltrådene (ssDNA) brytes fra hverandre ved 94-95 °C. I neste trinn senkes temperaturen til primeren spesifikke smeltetemperatur for binding til DNA molekylet, også kjent som annealing. I siste trinn av syklusen reguleres optimaltemperaturen (72 °C) til Taq-polymerase, hvor replikasjonen starter i 5'-3'-retning fra primeren. De enkelte nukleotidbasene adenin, tymin, cytosin og guanin blir plassert til sin komplementære deoksynukleotid trifosfat (dNTP). Tretrinnsyklusen fortsetter fram til ønskede antall DNA er amplifisert.

Det finnes flere ulike amplifiseringsteknikker, deriblant multipleks og singelpleks. I denne oppgaven ble multipleks benyttet for undersøkelse av resistensgener hos aktuelle bakterieisolater. Multipleks referer til amplifisering av flere separate DNA fragmenter i samme PCR reaksjon (Henegariu et al., 1997). Reaksjonsblandingen består av to eller flere primerpar som er spesifikk for ulike målgener av DNAet. For bekreftelse av eventuelle positive utslag fra multipleks kan resultatet kontrolleres ved bruk av singelpleks PCR. Denne reaksjonen benytter kun ett primerpar for ekspresjonen av et enkelt målgen. Metoden er effektiv for å undersøke tilstedeværelsen av eventuelle resistensgener hos bakterier.

3.2.2 Renhetsmåling og kvantifisering av DNA

Absorpsjonsegenskapene til et DNA kan brukes til påvisning, kvantifisering og vurdering av renhet (Thermo Fisher Scientific inc, 2009). For kvantifisering og renhetsmåling av DNA, RNA og protein kan spektrofotometeret «Thermo Scientific NanoDrop™ 2000», med tilhørende software «Thermo Software IQ» benyttes.

Ultrafiolett-synlig (UV-Vis) spektroskopi måler absorpsjonen av lys som overføres gjennom prøvematerialet, sammenlignet med referanseprøve (Nullprøve) (Thermo Fisher Scientific inc, 2009). DNA består av nukleotider med heterocykliske forbindelser som absorberer UV-lys.

Maskinen måler molekyler ved en spesifikk bølgelengde. Ved A_{260}/A_{280} nm benyttes til vurdering av renhet til nukleinsyrene fra DNA. Hvis resultatet har en ratio på $\sim 1,8$, er DNA molekylet rent, og $\sim 2,0$ aksepteres som rent for RNA (NanoDrop Technologies, 2007). En lavere ratio kan indikere forurensning av fenoler, karbohydrater eller proteiner. $A_{260}/230$ har noe høyere verdi, og befinner seg i området 2,0-2,2 (NanoDrop Technologies, 2007). Et betydelig lavere nivå kan indikere tilstedeværelsen av kontaminanter som absorberes ved A_{230} , eksempelvis karbohydrater eller fenoler.

For en mer nøyaktig kvantifisering av DNA, RNA eller protein kan Qubit® 2.0 fluorometer benyttes (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010c). Preparatet anvender fargestoffer som binder seg spesifikt til nukleinsyrer og proteiner som er av interesse. Disse fargestoffene blir kun detektert av maskin når de er bundet til DNA, RNA eller proteiner. Det gjør metoden svært nøyaktig, da forurensninger ikke vil bli detektert ved analysering i Qubit fluorometeret.

3.2.3 Agarose gelektroforese

Den vanligste måten for å analysere PCR-produkter er å skille DNA-fragmenter fra hverandre ved bruk av gelektroforese (Lee et al., 2012). Det er en effektiv metode for å identifisere at korrekt Mål-DNA har blitt amplifisert. Polysakkaridet agarose benyttes ofte til tillaging av gel for anvendelse til DNA-separasjon. Konsentrasjonen på agarosegel kan tilpasses DNA-fragmentene som er tilstede, men den tradisjonelle 1% kan benyttes til separering mellom 100 bp og 25 kb

Gelblanding bestående av agarose og saltløsning varmes opp for en homogen løsning. Etter avkjøling av gel tilsettes «Gel Loading Dye» (Lee et al., 2012). Gel Loading Dye er vesentlig for å at DNA-prøven synker tilstrekkelig i brønnen, og for lokalisering ved kjøring av gel. Etter applisering av DNA-fragmenter i brønn, kobles elektroforese-apparatet til en strømkilde. Dermed vil DNA strømme langs porene i gelen fra negativ til positiv pol (Yilmaz et al., 2012). Den negative ladningen til DNA-molekylet skyldes fosfatgruppene i sukkerfosfat-ryggraden. Kjøring av gel vil medføre fragmentseparasjon ettersom DNA har ulike størrelser hvor de små fragmenter vandrer raskere i gelen en store.

Etter fullført elektroforese kan gelen enten analyseres visuelt, eller så kan fragmentet renses fra gelen for videre analysering (Yilmaz et al., 2012). Gelen er tilsatt Gel-loading DYE som er fargestoffet som bindes til DNA-fragmentet, og viser veldefinerte bånd som fremtrer under UV-

lys. Fragmentet som befinner seg i båndet kan sammenliknes med båndstørrelsen på en ladder, som er blitt applisert i brønn før kjøring av gelelektroforese. En ladder benyttes som en referanse for kjente DNA-fragmenter med ulikt størrelsesområde, og bør dekke forventede fragmenter som framkommer i prøven.

3.2.4 Sekvensering

Sanger sekvensering, eller kjedetermineringsmetoden er en effektiv molekylærbiologisk teknikk for bestemmelse av sekvensrekkefølge av nukleotider i et DNA (Watson et al., 2014, s.162). Metoden ble utviklet av en britisk biokjemiker, Frederick Sanger på 1970-tallet (Bisht & Panda, 2013, s.14). Metoden går ut på å syntetisere DNA fram til et nukleotid blir inkorporert og stopper elongeringsprosessen, slik at man vet eksakt hvilken base som befinner seg på hvilket sted i DNA-tråden. Gjennom temperaturbehandling vil DNA dobbeltheliks denaturere, og danne to enkeltrådede DNA tråder (templat). DNA-Polymerasen sørger for binding av deoksyribonukleosidtrifosfater (dNTPs) til sitt komplementære nukleotid, fram til inkorporering av dideoksynukleotidtrifosfater (ddNTP's). Disse nukleotidene mangler hydroksylgruppen på 3`enden som hindrer polymerasen å binde andre nukleotider på templatet, og det skjer en terminering i elongeringsprosessen. Reaksjonen gjentas i flere sykluser, og til slutt genereres ett sett med nukleotidfragmenter med ulike størrelse.

De fire ulike ddNTP's har sine unike fluoriserende fargestoff festet til seg, som kan identifiseres ved bruk av polyakrylamidgel (Watson et al., 2014, s.161). Fragmentstørrelsen bestemmes ved at nukleotidene skilles fra hverandre i en gel ved bruk av standard elektroforese, eller en polymerløsning ved kapillærelektroforese hvor fragmentene vil vandre mot en positiv pol med ulik hastighet. Farge og størrelse på fragmentet for de ulike ddNTPs genereres automatisk sammen når produktet blir scannet ved en optisk linse som leser av den fluoriserende fargen. Informasjonen for hvert fragment kan avleses som en topp med den fluoriserende farge som representerer en nukleotidbase.

3.2.5 16S rRNA

Sekvensering av 16S ribosomalt RNA (rRNA) er den vanligste metodene for å bestemme fylogenetisk forhold mellom bakterier, men samtidig nyttig verktøy for mikrobiell identifisering (Janda & Abbott, 2007). Ribosomer sørger for proteinsyntese, og hos de prokaryote organismene er ribosomene kalt 70S rRNA bygd opp av små og stor subenheter

med proteiner og rRNA (Wilson et al., 1986). rRNA genet koder for den lille subenhet på det bakterielle ribosomet som er presentert hos alle bakteriearter. Genet har en størrelse på omtrent 1500 bp, og det vil gi en håndterbar men pålitelig sekvensinformasjon (Janda & Abbott, 2007). Informasjonen som innhentes ved sekvensering av genet kan sammenlignes med andre sekvenser i en offentlig database for gener.

For sammenligning av ukjent sekvenser i en database benyttes ofte søkeverktøyet Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Madden, 2013). Programmet har vært en av de mest brukte verktøyene for bioinformatikk siden 1990-tallet, og ble på den tiden utviklet av «National Center for Biotechnology Information» (NCBI). En sekvens fra ukjent organisme kan undersøkes i BLAST, hvor programmet vil sammenlikne sekvensinformasjonen fra enten nukleotid- eller aminosyresekvenser med en database. Sekvenssammenstillingen vil få oppgitt en prosentvis likhet som er basert statistisk på hvor stor andel av de ulike sekvensene er homologe.

3.2.6 Neste generasjonssekvensering med illumina MiSeq

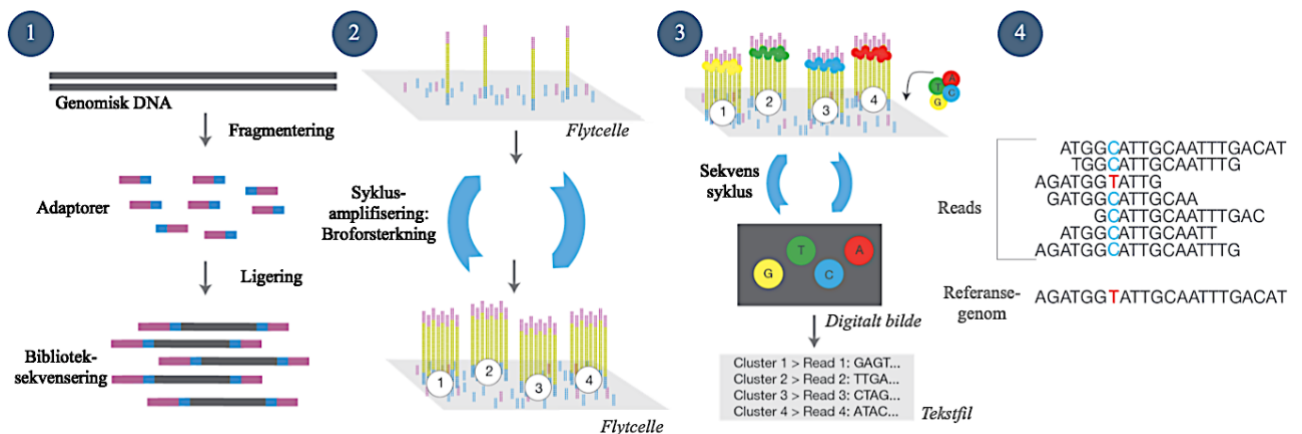
Ved helgenomsekvensering vil hele arvematerialet kartlegges, og følgelig gi full informasjon om egenskaper og identifikasjon av organismen. Neste generasjonssekvensering (NGS) er en effektiv og presis metode for å kunne stadfeste med høy sikkerhet hva som befinner seg i den isolerte bakterieprøven (Buermans & Den Dunnen, 2014). I tillegg vil metoden kunne kartlegge eventuelle virulens -og resistensgener, samt spredningsmekanismer.

Illumina MiSeq foregår via 4 hovedtrinn (Illumina Inc, 2017), og er illustrert i *figur 3.2*.

- 1. Forberedelse av sekvensbibliotek:** Forbehandling av DNA er nødvendig for å danne et bibliotek som er egnet for sekvensering (Illumina Inc, 2017). Genomisk DNA går gjennom en fragmentering (splitting), etterfulgt av limering av adaptorer i begge ender (3' og 5' enden). Disse adaptorene er komplementære til oligoene som er festet i overflaten av flytcellen.
- 2. Cluster pre-amplifisering:** Når sekvensbiblioteket er denaturert, så lastes det inn i en flytcelle (Illumina Inc, 2017). Enkelstrengede fragmenter vil dermed bli fanget opp av to ulike overflatebundne oligonukleotider, en som er komplementær til 3'-regionen, og en til 5'enden på regionene på det genomisk DNA fra sekvensbiblioteket (Buermans & Den Dunnen, 2014). Videre bøyes fragmentet, og danner en bro over til en annen komplementær oligonukleotid som er bundet i overflaten av flytcellen, hvor

polymerasen sørger for syntetisering av dobbeltrådet DNA. Ved gjentatte sykluser vil det skje en amplifisering av fragmentet via broforsterkning, og til slutt er det dannet en klonal klynger som er klare til sekvensering (Illumina Inc, 2017).

3. **Sekvensering:** Ved sekvensering leses hvert nukleotid om gangen fra flytcellen i repeterende sykluser (Buermans & Den Dunnen, 2014). Sekvensering skjer ved syntese og sekvens-instrumentet vil dermed lese av klyngene på flytcellen, og samtidig vil det fluoriserende merket dNTP inkorporeres. De fire nukleotidene som er fluorescensmerket, blir dermed avbildet før det spaltes av.
4. **Dataanalyse:** Data fra illumina sekvensering består av mange korte avlesninger, også kalt «reads» som kan overføres til bioinformatikkverktøy for generering av lengre sekvensfragmenter (Illumina Inc, 2017). Fragmentene blir deretter sammenlignet med referansesekvens, og generert til en kontinuerlig sekvens kalt contig. Videre kan sekvensene sammenlignes med databaser med kjente sekvenser, som gir genetisk informasjon om organismen.



Figur 3.2. Oversikt over 4 steg i Neste-generasjonssekvensering (Illumina MiSeq);
 1. Forberedelse av sekvensbibliotek: 2. Generering av cluster: 3. Sekvensering: 4.
 Dataanalyse (Illumina Inc, 2017).

For å stadfeste hvilken organisme som er tilstede, er «Ribosomal Multilocus Sequence Typing» (rMLST) en nøyaktig metode for fylogenetisk karakterisering (Jolley et al., 2012). 16S sanger sekvensering er generelt en effektiv metode for å bakterieidentifikasjon av et enkelt gen, men rMLST ser på variasjonen i alle de 53 genene som koder for subenheter i bakterielle ribosomer. Det gjør det til en mer pålitelig identifikasjonsmetode for mikrobielle arter. Derimot kan det være vanskelig å skille nært beslektede bakteriearter fra hverandre.

3.3 Antimikrobiell sensitivitetstesting

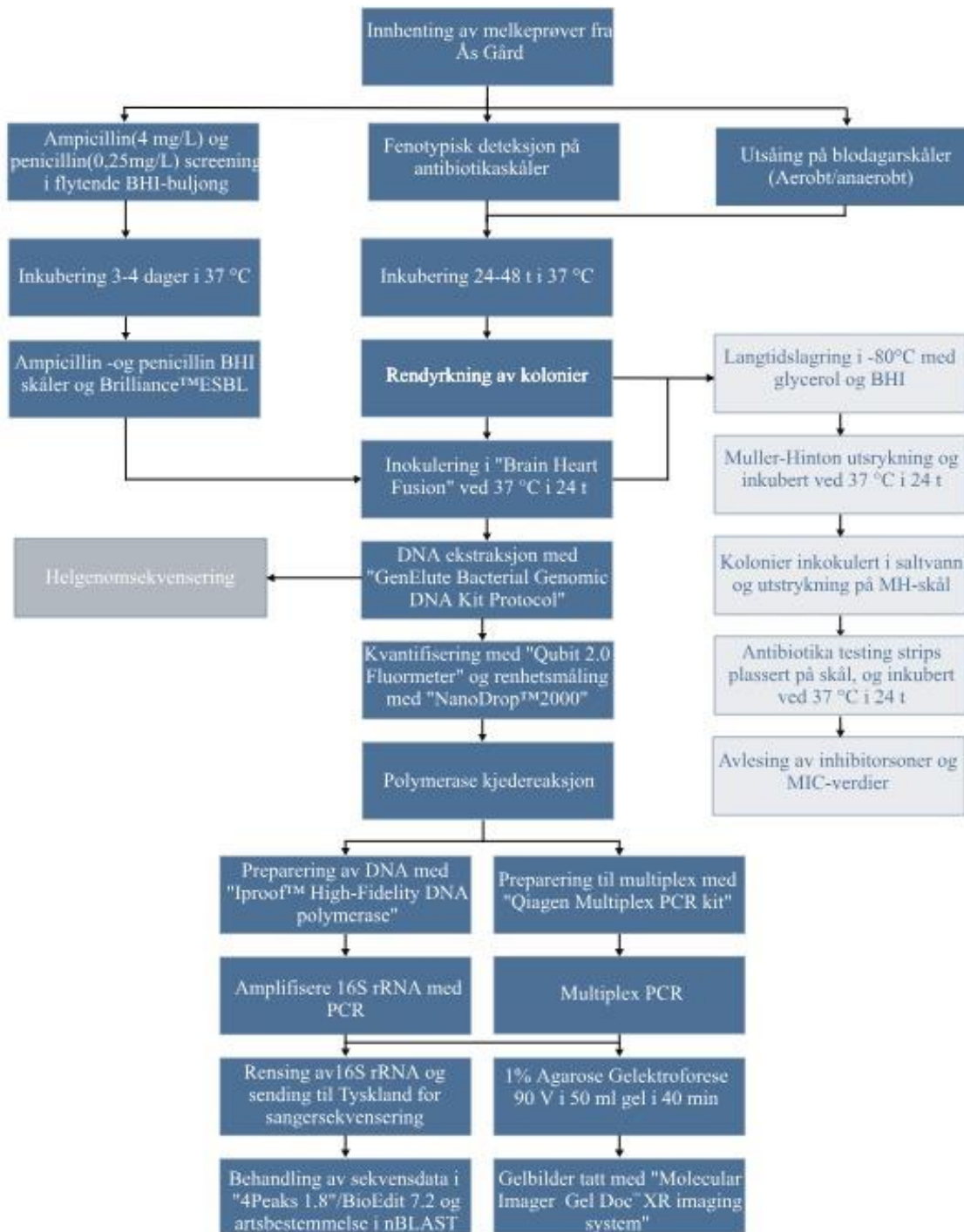
En av de vanligste metodene for fenotypisk diagnostikk av antimikrobiell sensitivitetstesting er agar gradientdiffusjonsmetoden (Matuschek et al., 2014a). En enkel og reproducerbar metode som krever lite utstyr. Den ble utviklet av «Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)» i samarbeid med «The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).

Metoden inkluderer et inokulum med 0,85 % sterilt saltvann med en celletetthet justert etter McFarland 0,5 turbiditetsstandard for å oppnå en bakteriekultur på $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (Matuschek et al., 2014b). Agarmediet Mueller-Hinton (MH) er et kjent og kommersielt medium for antimikrobiell sensitivitetstesting. Selve inokulumet strykes over agarplaten med en steril tamponpinne. Metoden benytter teststrimler med predefinerte antibiotikagradianter som plasseres på skålen, hvor antibiotikumet vil diffundere ut i MH-agar. Etter inkubering av skålene ved 35 °C i 16-20 timer kan det dannes hemningssone som avleses direkte fra teststrimmelen oppgitt i mg/L av som er MIC-verdi (minimum inhibitory concentration) for den aktuelle bakterien. Det tilsier den minste konsentrasjonen som er nødvendig av et antibiotikum for å stoppe vekst av bakterien. Og gradientdiffusjonsmetoden kan angi bakterienes følsomhet for antibiotika i kliniske brytningspunkter oppgitt som $S \geq x$ mg/L (Følsom), $I > x$ (Intermediær følsom) og $R > mg/L$ (Resistent). Kategoriseringen tar utgangspunkt i kliniske data av det aktuelle antibiotikumet og mikroben (Aukrust et al., 2016).

4. Materialer og metode

4.1 Metodeoversikt

Metoder som er anvendt i denne studien er skjematisk framstilt i et overordnet flytskjema, vist i figur 4.1. Figuren viser trinnene i metodene som ble anvendt fra prøvetakning til behandling av sekvensdata, samt prosessen i antimikrobiell sensitivitetstesting og helgenomsekvensering.



Figur 4.1. Skjematiske framstilling av metodene anvendt for screening av antibiotikaresistens hos bakterieisolater fra melk.

4.2 Innhenting av forsøksmateriale

Melk ble innhentet fra Ås gård ved Senter for husdyrforsøk (SHF) i Ås kommune (Viken, Akershus). Prøvetakningen ble utført i februar 2020, og totalt 40 prøver av rå melk fra 10 friske kyr ble innhentet i 2 omganger som utgjorde totalt 80 prøver. Fire prøver ble ekskludert på grunn av problemer med prøveuttaket eller spener som viste tegn til infeksjon. Stipendiat Alberto Bombelli leverte sterile 500 ml Scott Duran® borosilikatglassflasker (DWK Life science) til gården, hvor bonden manuelt utførte uttaket etter «prosedyre for innsamling av melk» (Vedlegg A). Hver jurspene ble melket over i glassflasker merket med spene og ku-id. Speneprøvene ble markert med venstre foran (VF), høyre foran (HF), venstre bak (VB) og høyre bak (HB) for å skille de ulike prøvene. Melkeprøvene ble fraktet til laboratoriet og plassert i et mørkt kjølerom (4 °C) i henholdsvis kort tid før videre analysering.

Ved tidligere uttak av melkeprøver fra kyr på Ås gård har det blitt gjennomført isolering og nedfrysning av bakteriekultur ved -80°C for langtidslagring i en «Thermo Electron Corporation» (Thermo Fisher Scientific Ink.) fryser ved NMBU. Dette ble tidligere gjennomført av Roger Meisal og Alberto Bombelli i forbindelse med Jurfrisk-prosjektet. I denne oppgaven ble det gjennomført en screening av totalt 31 bakterieisolater fra melk hos friske kyr hentet fra fryseren. I tillegg ble 5 bakterieprøver som var isolert fra ESBL-skåler inkludert, disse var tidligere identifisert i melk fra kyr med påvist mastittinfeksjon. Melkeprøvene har tidligere blitt isolert fra enten *lactobacillus* agar (De Man, Rogosa and Sharpe – MRS), melk eller blodagar (O₂/CO₂), og videre inokulert i 2 ml mikrorør (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) med 30% glycerol og BHI.

Forsøksmaterialet innhentet fra kyr med friske jur bestod av totalt 76 melkeprøver. Fra frysede isolater som ble oppbevart i en fryser (-80°C) ble totalt 31 bakterieisolater fra friske kyr undersøkt, hvorav 2 ble benyttet for videre identifisering. I tillegg ble 5 bakterieisolater fra kyr med mastitt analysert. Oversikt over forsøksmaterialet som ble benyttet i denne masteroppgaven er vist i *tabell 4.1*.

Tabell 4.1. Forsøksmaterialer som ble valgt videre til screening av antibiotikaresistens, med oversikt over hvor melkeprøven er innhentet fra, kilden til anvendte bakterieisolater og kyrenes helsetilstand.

Prøvenavn	Forsøksmateriale (Medium ₁ , medium ₂ , Ku-id)	Uttakssted	Kilde	Helsetilstand F = Friske M = Mastitt
M274	CRE – M274	Ås-gård	Isolater fra fryser	F
B38	CRE – B38	Ås-gård	Isolater fra fryser	F
M40A	ESBL – M40A	Ås-gård	Isolater fra fryser	M
M40B	ESBL – M40B	Ås-gård	Isolater fra fryser	M
M40C	ESBL – M40C	Ås-gård	Isolater fra fryser	M
M40M	ESBL – M40M	Ås-gård	Isolater fra fryser	M
M39-A	ESBL – M39A	Ås-gård	Isolater fra fryser	M
522-amp	AMP – BU522	Ås-gård	Ferske melkeprøver	F
522-pen	PEN – BU522	Ås-gård	Ferske melkeprøver	F
510-pen	PEN – BU510	Ås-gård	Ferske melkeprøver	F
551-pen	PEN – BU551	Ås-gård	Ferske melkeprøver	F
534-pen	PEN – BU534	Ås-gård	Ferske melkeprøver	F

¹ Vekst på selektive antibiotikaskåler

² Vekst på næringsmedier

Prøvenavnet som er oppgitt i tabell 4.1 gir informasjon om hvilket medium stammene ble isolert fra, og prøve-id som identifiserer fra hvilken ku prøven stammer i fra. Mediet stammene ble rendyrket på kan vises til B (Blodagar - Anaerobt), M17-agar (M) og BU (BHI-buljong). Bakterieisolatene som ble innhentet fra fryseren ble videre strøket ut på antibiotikaskåler som står oppført som CRE, ESBL eller inokulert i buljong med ampicillin (AMP) og penicillin (PEN).

4.3 Screening av antibiotikaresistente bakterier

4.3.1 Fenotypisk deteksjon på selektive medier

For fenotypisk deteksjon av antibiotikaresistente bakterier ble selektiv dyrkningsmetode benyttet. I denne oppgaven ble det screenet etter ESBL, karbapenem og oxacillin-resistente bakterier. Det ble benyttet innkjøpte skåler av Oxoid Brilliance™ ESBL agar (Thermo Fisher Scientific Ink, Basingestoke, Storbritannia), Oxoid Brilliance™ CRE agar (Thermo Fisher Scientific Ink.) og MRSASelect™ II agar (Bio-Rad, Frankrike).

Av melkeprøvene som ble innhentet fra Ås gård, ble 50 ml av prøvematerialet overført i et Falcon® sentrifugerør (Greiner Bio-One) ved bruk av en 25 ml serologiske pipetter (Sarstedt, Frankrike). 2,5 ml av speneprøvene fra samme ku ble pipettert over i en steril 15 ml Falcon® sentrifugerør (Greiner, Bio-One), hvor prøvematerialet utgjorde totalt 10 ml. Deretter ble

prøven sentrifugert i en «Thermo Scientific Haraeus 75004514 Multifuge X3R refrigerated centrifuge, 230 vac» (Thermo Fisher Scientific Ink.) ved 4500 rpm i 15 minutter ved 4°C. Fettlag som hadde samlet seg i toppen av prøven ble fjernet med en tamponpinne (VWR International, USA), og melkerester ble helt ut. Pelleten ble resuspendert i 1 ml sitronvann, som var laget på forhånd av laboratorieingeniør May Helene Aalberg. Deretter ble prøven vortexet før 100 µl prøve ble pipettert over på CRE, ESBL og MRSA-skåler, og strøket jevnt utover med en steril engangs utstryksspatel (L-form) (VWR International, Leuven, Belgia). Antibiotikaskålene ble inkubert i 2-4 døgn ved 37 °C.

4.3.2 Screening etter ampicillin -og penicillinresistens

En alternativ metode ble benyttet for å undersøke tilstedeværelse av ampicillin -og penicillinresistente bakterier i melkeprøver friske kyr innhentet fra Ås gård i februar. Totalt 76 melkeprøver ble inkludert for å teste om bakterien vokser i BHI-buljong supplert med ampicillin og penicillin G. Førstnevnte antibiotikum ble tillaget fra «Roamp Ampicillin 5 g» (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) i pulverform, og fortynnet i 10 ml vann fra Milli-Q® Advantage A10 vannrensningssystem (Merck KGaA, Billerica, USA) for å oppnå en stamkonsentrasjon på 100 mg/ml. Deretter ble løsningen trukket opp med en 10 ml SOFT-JECT® sprøyte (Henke-Sass Wolf, Tyskland) og filtrert med Millex® porestørrelse 0,22 µm (Merck Millipore Ltd, Irland) over i et eppendorfrør (Gemü GmbH, Rotkreuz, Sveits). Samme prosedyre ble fulgt for antibiotikumet penicillin G (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) med ønsket stamkonsentrasjon på 10 mg/ml som er oppsummert i *tabell 4.2*.

Tabell 4.2. Antibiotikum med konsentrasjon på stamløsning, og volum tilsatt i BHI for å oppnå ønsket sluttkonsentrasjon.

Antibiotikum	Konsentrasjon Stamløsning (mg/ml)	Volum tilsatt BHI (µl)	Totalvolum BHI (ml)	Sluttkonsentrasjon (mg/L)
Ampicillin	100	20	500	4
Ampicillin	100	40	500	8
Penicillin G	10	12,5	500	0,25

Ampicillin stamløsning ble pipettert over i 500 ml autoklavert og romtemperert BHI agar -og buljong for å oppnå en konsentrasjon på 4 og 8 mg/L, som er oppgitt i *tabell 4.2*. For penicillin G ble samme prosedyre fulgt, med en ønsket sluttkonsentrasjon på 0,25 mg/L. Totalt 10 ml av løsningen ble overført med 10 ml serologiske pipetter (Sarstedt, Frankrike) i et reagensrør med

skrukork. Totalt 100 µl av melkeprøven ble pipettert i markerte reagensrør og inkubert i 3-4 døgn ved 37 °C. Etter endt inkuberingsstid ble rør med tydelig pellet vortexet, og pipettert over på BHI-skåler med ampicillin (4 mg/L) og Penicillin (0,25 mg/L) samt Brilliance™ ESBL-skåler.

4.4 Fenotypisk karakterisering av bakterieisolater fra jurspene

For hver enkel speneprøve ble 100 µl pipettert over på to stk blodagar skåler (TSA 5% Sheep Blood) (Thermo Fisher Scientific Ink, Tyskland). Mediet ble anvendt for fenotypisk karakterisering av kolonimorfologi av hemolytisk aktivitet. Prøven ble strøket ut med en steril engangsspreder. Skålene som ble inkubert anaerobt ble plassert i en «BD GasPak™ 150 Anaerobic System large» (Becton Dickinson, New Jersey, USA). For den store BD GasPak ble to stk «AnaeroGen™ 3,5 L» (Thermo Fisher Scientific Ink, Basingestoke, Storbritannia) plassert i beholderen, og en indikatorstrips «Merck™ Anaerotest™ strips» (Merck, Darmstadt, Tyskland). Stripsen ble hvit ved tilstedeværelse av aerob atmosfære. Skålene ble inkubert anaerobt og aerobt ved 37 °C i 2 døgn. Etter endt inkuberingsstid ble kolonimorfologi på skålene visuelt vurdert, og talt opp.

4.5 Isolering og nedfrysning av bakteriekultur

4.5.1 Tillaging av medier

For produksjon av BHI-agar og BHI-buljong ble produsentens anvisning fulgt. Ved tillaging av BHI-agar, ble 37 g /liter BHI (Oxoid, Basingestoke, Storbritannia) veid opp og tilsatt i en 1000 ml Scott Duran® borosilikatglassflaske (DWK Life science) sammen med 15 g agar/liter (VWR International, Leuven, Belgia). Næringsmiddelet BHI og agar ble tilsatt Milli-Q vann, og ristet til en homogen løsning. Media ble sterilisert i en autoklav ved 121°C i cirka 1 ½ time. Agaren ble avkjølt i vannbad til 48 °C før blandingen ble helt over i sterile petriskåler. For tillaging av flytende BHI-buljong ble 37 g/liter veid opp og tilsatt Milli-Q-vann i en 1000 ml reagensflaske før sterilisering.

4.5.2 Isolering av genomisk DNA

Etter endt inkuberingsstid av antibiotika -og blodagarskåler ble frittliggende kolonier berørt med en steril podeøse (Sarstedt, Tyskland) og strøket over på nye skåler med samme medium. Skålene ble inkubert ved 37 °C, og inspisert etter 2-3 dager. Ved vekst av bakteriekolonier på skålene etter førsteutstrykning, ble det gjennomført en andre- og eventuelt en tredjegangsutstrykning for å sikre en renkultur ved videre identifisering. Fra skålene det ble

opnådd en renkultur, ble enkeltkolonier podet over med en steril podeøse i et 10 ml reagensrør med kork som var tilsatt 500 µl romtemperert BHI-buljong. Kulturen ble inkubert over natten ved 37 °C, for bruk til DNA-ekstraksjon.

For nedfrysning av bakterieisolatene som vokste opp på antibiotika -og blodagarskåler ble utvalgte bakteriekolonier podet over i et 2 ml mikrorør (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) tilsatt 500 µl glyserol (30%) og 500 µl BHI-buljong. For prøvene som skulle DNA ekstraheres ble 500 µl av overnattkultur som inneholdt bakterieisolatet og BHI pipettert over i et mikrorør med 500 µl glycerol. Rørene ble plassert i en «Thermo Electron Corporation» fryser (-80 °C) i meieribygningen på NMBU for langtidslagring. Bakterieisolatene fra blodagarskålene ble ikke undersøkt videre i denne studien, men de nedfryste kulturene kan eventuelt benyttes for fremtidige analysering.

4.6 DNA-ekstraksjon

Bakterieisolatenes genomiske DNA ble ekstrahert fra overnattkulturen ved hjelp av «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), i henhold til kittets protokoll med noen endringer. Protokollen for Gram+ bakterier ble anvendt, ettersom det var uvitende hvilke bakterier som var tilstede i prøven. Derfor var det nødvendig med tillaging av lysesbuffer fra lysosym «Chicken egg white» (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland). Noe som var avvikende fra protokollen var kittets elueringsbuffer, som ble byttet ut med Invitrogen Sequalpreptm Normalization Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). Det ble tilsatt totalt 25 µl av elueringsbuffer i kolonnen, framfor 200 µl for å kunne oppnå en høyere DNA-konsentrasjon. Etter første elueringssteg ble prøven inkubert ved romtemperatur i 5 min, etterfulgt av sentrifugering i 1 min ved 6500 x g for å eluere DNA fra kolonnen. Et andre elueringssteg, ble samme prosedyre gjentatt. Prøvematerialet ble korttidslagret ved 4 °C før renhetsmåling og kvantifisering av DNA ekstraktet. Eppendorfrør med DNA fra bakterieisolatene ble fryst ned til -20 °C, og tint opp etter behov.

4.7 Kvantifisering og renhetsmåling

Spektrofotometeret «Thermo Scientific NanoDrop™ 2000» (Thermo Fisher Scientific Ink) og tilhørende programvare ble brukt til kvantifisering og renhetsmåling av prøvematerialet. For måling av DNA ble «Nucleic Acid» valgt i programvaren. For kalibrering av apparatet ble 2 µl destillert vann (dH₂O) plassert på overflaten av den optiske linsen. Vann ble tørket bort fra øvre og nedre linse med en tørr «Kimtech Science Precision» papir (Kimberly-Clark Professional).

Deretter ble 2 µl av referanseløsning (elueringsbuffer) pipetert på overflaten av linsen, og trykket «blank» i programvaren NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc). Prøvemateriale ble pipetert over ved med likt volum som tidligere og lest av ved konsentrasjon (ng/µl), A_{260/280} og A_{260/230}. Mellom hver prøve ble linsen tørket med papir.

I tillegg ble det benyttet en Qubit® 2.0 Fluorometer for kvantifisering av DNA-prøvene. Protokollen for Qubit® 2.0 Fluorometer protokoll ble fulgt og «Qubit® dsDNA Broad Range assay kit» (Thermo Fisher Scientific Inc, Eugene, USA) ble benyttet. For tillaging av «Qubit™ Working Solution» ble 1 µl Qubit™ reagens/prøve ganger antall prøver pipetert i 199 µl Qubit™ buffer/prøve ganget opp med antall prøver i et eppendorfrør. Denne arbeidsløsningen ble vortexet i 2-3 sekunder, og videre pipetert over i 0,5 ml «Qubit™ Assay rør» (Thermo Fisher Scientific Inc, Eugene, USA). Analyserørene ble tillaget i henhold til *tabell 4.3*.

Tabell 4.3. Reagenser og volum for tillaging av Qubit standard -og bruksprøve.

Reagenser	Standardprøve (µl)	Bruksprøve (µl)
Qubit™ Working Solution	190	198
dsDNA Broad Range Reagens	10	-
DNA-prøve	-	2
Totalt volum i hvert rør	200	200

190 µl arbeidsløsning og 10 µl dsDNA Broad Range reagens ble applisert i to rør for tillaging av standard 1 og 2, som er vist i *tabell 4.3*. Samtidig ble 198 µl av arbeidsløsningen og 2 µl av DNA-ekstraktet applisert over i markerte prøverør. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 2 minutter, før rørene ble plassert i en Qubit® 2.0 Fluorometer. Kvantifiseringsresultatet av DNA ble avlest i ng/µl.

4.8 Polymerase kjedereaksjon

4.8.1 Amplifisering av 16S rRNA

For amplifisering av 16S rRNA ble universelle primere benyttet for oppformering av begge ender av målsekvensen. Primersekvensene som ble benyttet for amplifisering er vist i *tabell 4.4*.

Tabell 4.4. Primersekvens som ble benyttet for amplifisering av 16S rRNA genen ved PCR.

Primer	Sekvens (5' - 3')	Målgen	Størrelse (bp)
Forward	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1505
Reverse	GGTACCTTGTTACGACTT		

For amplifisering av 16S rRNA gen ble kittet «Iproof™ High-Fidelity DNA polymerase» (Bio-Rad Laboratories Ink, Litauen) benyttet. Reagensene som ble anvendt i tillaging av mastermikser er vist i *tabell 4.5*.

Tabell 4.5. Reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet til PCR amplifisering 16S rRNA.

Reagenser	Start-konsentrasjon	Slutt-konsentrasjon	Volum (µl) i en reaksjon (xN ₁)
Iproof HF buffer	5x	1x	8
dNTPs	10 mM	200 µM	0,8
Primer (Forward)	10 µM	0,25 µM	1
Primer (Reverse)	10 µM	0,25 µM	1
PCR grade H ₂ O	-	40 µl	26,8
Iproof™ High fidelity DNA Polymerase	2 u/µl	0,02 u/ µl	3,6
Templat (DNA-fragment)	5-100 ng/µl	7,5-150 ng	2
Totalt volum i hvert PCR-rør			40

*1*Antall prøver

Alle reagensene (utenom templatet) som er vist i *tabell 4.5* ble ganget opp med antall prøver og løsningen ble pipettert over i et 2.0 ml snaplock mikrorør (Axygen). Følgelig ble løsningen vortexet, og deretter ble 38 µl pipettert over i et MicroAmp™ 8-tube strip (VWR, Leuven, Tyskland). Til slutt ble 2 µl av templatet overført i hvert enkelt rør før lokk ble plassert på rørene. Prøvene ble plassert i en SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Ink.) for amplifisering av 16S genen. Temperatur -og tidsprotokoll, samt antall sykluser for hvert PCR-trinn er vist i *tabell 4.6*.

Tabell 4.6. Temperatur -og tidsprotokoll samt antall sykluser for hvert steg for 16S rRNA amplifisering.

PCR-trinn	Temperatur (°C)	Tid (Min)	Antall sykluser
DNA-polymerase aktivering	98	00:30	1
1. Denaturering	98	00:10	
2. Primer annealing	55	00:30	45
3. Primer ekstensjon	72	00:45	
Endelig ekstensjon	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

Reaksjonen for 16S rRNA amplifisering ble utført med følgende betingelser som er vist i tabell 4.6. Polymeraseaktivering i 30 sekunder, etterfulgt av tretrinnsprosess med 45 sykluser bestående av denaturering ved 98 °C i 10 sekunder, etterfulgt av 55 °C i 30 sekunder for primer annealing og 45 sekunder ved 72 °C for primer ekstensjon. Før endelig avkjøling av PCR-produktet til 4 °C gjennomføres en siste ekstensjon i 10 minutter ved 72 °C.

4.8.2 Multipleks – Screening etter resistensgener

4.8.2.1 Primere

For screening av eventuelle resistensgener for ESBL, karbapenemase og MRSA ble multipleks-PCR benyttet. Det ble benyttet spesifikke «forward» og «reverse» primere for å studere ønsket genområde hos bakterien. For amplifisering av resistensgener fra ESBL ble det benyttet tre multiplekse primermiksere (M1-M3). Multipleks 4 (M4) bestående av genene *rpoB* og *16s rRNA* ble anvendt som positiv kontrollprøve, som er vist i tabell 4.7. For karbapenemer ble to primermikser benyttet (CAR1 og CAR2). Ved screening etter methicillinresistens ble primere benyttet for målgenet *MecA*, *MecC* og *Spa* (tabell 4.9). Hver multipleks bestående av 3-4 primerpar var spesifikk for ulike målgen, som er illustrert i tabell 4.7-4.9. Alle primermikser var preparert på forhånd av stipendiat Misti Dawn Finton.

Tabell 4.7. Primere valgt til screening av resistensgener for ESBL, og oversikt over primernavn, målgen og amplikonstørrelse (bp).

Primernavn	Primersekvens (5´-3´)	Målgen	Størrelse (bp)	Referanse
Multipleks 1 (M1)				
MultiOXA-48F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla</i> _{OXA-48}	281	(Dallenne et al., 2010)
MultiOXA-48R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA			
MutliCTXMGp2F	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> _{CTX-M}	404	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp12R	CGATATCGTTGGTGGTTCCAT	(gr.2)		

MultiTSO-OF	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>bla_{OXA}</i>	564	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSO-OR	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG			
MultiTSO-SF	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>bla_{SHV}</i>	713	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSO-SR	ATCCCGCAGATAAATCACCAC			
Multipleks 2 (M2)				
MultiCTXMGp9F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla_{CTX-M}</i>	561	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp9R	TGATTCTCGCCGCTGAAG	(gr. 9)		
MultiCTXMGp1F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	<i>bla_{CTX-M}</i>	688	(Dallenne et al., 2010)
MultiCTXMGp1R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	(gr. 1)		
MultiTSO-TF	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla_{TEM}</i>	800	(Dallenne et al., 2010)
MultiTSO-TR	CGTTCATCCATAGTTGCCCTGAC			
Multipleks 3 (M3)				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla_{NDM}</i>	157	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCCGGCAT			
VIM-F	ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT	<i>bla_{VIM}</i>	564	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT			
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla_{KPC}</i>	460	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			
Multipleks 4 (M4)				
rboB-F	CAGGTCGTCACACGGTAACAAG	<i>rpoB</i>	512	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
rboB-R	GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC			
16S-R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	<i>16S</i>	1505	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
16S-F	GYTACCTTGTTACGACTT	<i>rRNA</i>		

iF = forward; *R* = reverse

Tabell 4.8. Primere benyttet for screening av karbapenemresistens, med oversikt over primernavn, sekvens, målgen og amplikonstørrelse.

Primernavn	Primersekvens (5' - 3')	Målgen	Størrelse (bp)	Referanse
CAR 1				
CMY-F	GCATCTCCCAGCCTAATCCC	<i>bla_{CMY}</i>	188	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
CMY-R	TTCTCCGGGACAACCTTGACC			
MultiOXA-48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	<i>bla_{OXA-48}</i>	281	(Dallenne et al., 2010)
MultiOXA-48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA			
IMP-F	ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	<i>bla_{IMP}</i>	393	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
IMP-R	AGCCTGTTCCCATGTACGTT			
VIM-F	ATAGAGCACACTCGCAGACG	<i>bla_{VIM}</i>	564	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
VIM-R	TTATTGGTCTATTTGACCGCGT			
CAR 2				
NDM-F	TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	<i>bla_{NDM}</i>	157	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
NDM-R	GTAGTGCTCAGTGTCCGGCAT			
SCE-F	GGAGGGCGAATTGGGGTTTA	<i>bla_{SCF}</i>	268	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
SCE-R	CACTGTACTGCAGAGTGGCA			
KPC-F	TCCGTTACGGCAAAAATGCG	<i>bla_{KPC}</i>	460	(Finton, 2020, Innsendt manuskript)
KPC-R	GCATAGTCATTTGCCGTGCC			

iF = forward; *R* = reverse

Tabell 4.9. Primers benyttet til screening av eventuelle *mecA*, *mecC* og *spa* gener, med oversikt over primernavn, målgen og amplikonstørrelse (bp).

Primernavn	Sekvens (5'– 3')	Målgen	Størrelse (bp)	Referanse
MecA-P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	<i>MecA</i>	162	(EURL-AR, 2012)
MecA-P7	CCACTTCATATCTTGTAACG			
MecC-F	GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC	<i>MecC</i>	138	(EURL-AR, 2012)
MecC-R	GAAGATCTTTCCGTTTTTCAGC			
Spa-1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	<i>Spa</i>	180-600	(EURL-AR, 2012)
Spa-1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT			

F = forward; *R* = reverse

4.8.2.2 Mastermiks og PCR protokoll

For tillaging av PCR-mastermiks reaksjonsløsning for multipleks ble «Qiagen® Multiplex PCR kit (100)» (Qiagen gmbH, Hilden, Tyskland) anvendt, og produsentenes protokoll ble fulgt. Volumet som ble benyttet for hver reagens ble halvert i forhold til anvisningen, grunnet økonomisk besparelse. Reagensene og volumet som ble benyttet for tillaging av mastermiks for screening av ESBL, karbapenem, og MRSA er vist i tabell 4.10.

Tabell 4.10. Reagenser, konsentrasjoner og volum til en reaksjon for multipleks for ESBL og karbapenem

Reagenser	Start-konsentrasjon	Slutt-konsentrasjon	Volum (µl) til 1 reaksjon (xN ₁)
ESBL og Karbapenem			
Qiagen Multiplex PCR mastermiks	2x	1x	12,5
Primermiks	10x	0,2 µM	2,5
RNAse-free water		-	9
Templat (DNA-fragment)		1 uq	1
		DNA/reaksjon	

Totalt			25
MRSA			
Qiagen Multiplex PCR mastermiks	2x	1x	12,5
Primermiks1 «Forward»	10x	0,2 µM	2
Primermiks2 «Reverse»	10x	0,2 µM	2
RNAse-free water		-	6,5
Templat (DNA-fragment)		2 uq	2
		DNA/reaksjon	

Totalt			25

N = Antall prøver

Reagensene som er vist i *tabell 4.10* ble pipettert over i eppendorfrør med de ulike primermiksene M1, M2, M3, M4 (+), CAR1 og CAR2 for screening av ESBL og karbapenemer. Av løsningen ble 24 µl pipettert over i MicroAmp™ 8-tube strip (VWR, Leuven, Tyskland). For tillaging av mastermiks for PCR amplifisering av *MecA*, *MecC* og *spa*-gen ble protokollen for DTU Food (anbefaling for EURL-AR) fulgt. Samme reagenser ble benyttet i mastermiks som nevnt for ESBL og karbapenem, men 23 µl ble pipettert i MicroAmp™ 8-tube, etterfulgt av 2 µl av DNA-fragmentet. Det ble kjørt positive kontroller for *MecA* og *MecC* gen.

Når DNA-fragmentet hadde blitt suspendert i mastermiksløsningen, ble MicroAmp™ 8-cap strip plassert over rørene før de ble plassert i SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific Ink). Temperatur -og tidsprotokoll for hvert PCR-trinn for ESBL, karbapenem og MRSA multipleks er vist i *tabell 4.11*.

Tabell 4.11. Tid -og temperaturprotokoll med antall sykluser for de ulike trinnene i et ESBL, karbapenem -og MRSA-multipleks PCR-program.

PCR-trinn	Temperatur (°C)	Tid (Min)	Antall sykluser
ESBL			
Aktivering	95	15:00	1
1. Denaturering	94	00:30	
2. Primer annealing	62	01:30	28
3. Primer ekstensjon	72	01:30	
Endelig ekstensjon	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	
Karbapenem			
Aktivering	95	15:00	1
1. Denaturering	94	00:30	
2. Primer annealing	60	01:30	30
3. Primer ekstensjon	72	01:30	
Endelig ekstensjon	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	
MRSA			
Aktivering	94	05:00	1
1. Denaturering	94	00:30	
2. Primer annealing	59	01:00	30
3. Primer ekstensjon	72	01:00	
Endelig ekstensjon	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

4.9 Gelelektroforese

I etterkant av PCR-reaksjonen ble DNA-fragmentet identifisert ved bruk av gelelektroforese. For tillaging av liten agarosegel (1%) ble 50 ml av Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer (Thermo Fisher Scientific Ink, Vilnius, Litauen) og 0,5 g (1%) agarose SeaKem® LE Agarose (Lonza, Rockland, USA) tilsatt i en 500 ml reagensflaske (Blåtopp flaske). Flasken ble plassert i en mikrobølgeovn på maksimum styrke (900W) i 1-2 minutter til oppkok. Deretter ble mikrobølgeovnen justert til 90W fram til alle partikler ble løst opp. Etter oppvarming ble flasken satt på benken for nedkjøling. 2,5 µl Gelred® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Ink, Fremont, USA) ble tilsatt agaroseløsningen, før blandingen ble helt ned i et utstøpningskar med tilhørende brønnekam. Samme prosedyre ble fulgt for tillaging av stor agarosegel, med henholdsvis 200 ml TAE-buffer, 2,0 g agarose og 10 µl Gelred. Etter 20-30 min når gelen var fast og opak, ble gelen forsiktig plassert i en Mini-Sub cell GT system (Bio-Rad Laboratories Ink) fylt med TAE-buffer. Brønnekammen ble forsiktig fjernet fra gelen, og brønnene var klare for applisering av ladder og prøvematerialet.

Før applisering av prøvematerialet ble 3 µl av fargestoffet Agarose Loading Dye (6X), 4 µl av destillert H₂O og 2 µl av DNA-fragmenter pipettert i en 96-well mikrotiterplate (Greiner Bio-One). Komponentene ble pipettert opp og ned for å oppnå en homogen blanding. Totalt 5 µl av blandingen ble applisert i de små brønnene, og 10 µl i de store.

Etter å ha tilsatt alle prøvene til de i ulike brønnene, ble totalt 6 µl av ladder overført i brønn. Ladder ble tillaget etter senioringeniør Ahmed Abdelghani sine anbefalinger, med 1 µl av Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), 4 µl av gel loading Dye lilla (6x) (New England Biolabs) og 20 µl av TAE-buffer. Ladderens størrelsesrangering fra 100 til 1,517 bp.

Fargemerkede elektroder Mini-Sub cell GT system ble plassert på sokkelen. Videre ble elektrodene plassert i en strømkilde, en «Biorad PowerPac 300 Electrophoresis Power Supply» (Bio-Rad Laboratories Ink). Gelen ble kjørt på 80 volt i 40 minutter for liten gel, og 1-1 ½ time for stor. For bekreftelse og visuell vurdering av DNA-bånd ble gelen visualisert med UVP Dual-intensity transilluminator (Thermo Fisher Scientific Ink). For bestemmelse av fragmentstørrelse ble DNA-bånd sammenlignet med størrelsesmarkøren på ladder. Gelbilder ble tatt med en Molecular Imager® Gel DOCTM XR System (Bio-Rad Laboratories ink.) med tilhørende programvare «Quantity One Software» (Bio-Rad Laboratories Ink).

4.10 Rensing av 16S PCR produkt og sending av prøver til sekvensering

Etter påvisning av 16S rRNA ved bruk av gelelektroforese, ble prøven rensset med «GelElute™ PCR Clean-Up Kit» (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Protokollen ble hovedsakelig fulgt, men ved siste steg ble 30 µl med Elution Solution tilsatt for å oppnå en høyere DNA-konsentrasjon. Deretter ble DNA kvantifisert ved hjelp av nanodrop og Qubit.

Etter fullført rensning av PCR-produkt, ble prøvene klargjort for å bli sendt til sekvensering. Samme dag ble 5 µl av rensset PCR-produkt med en konsentrasjon mellom 20-80 ng/µl pipettert over i 1,5 ml eppendorfrør. I samme rør ble 2,5 µl av primer tilsatt med konsentrasjon 10 µM (10pmol/µl). Totalt to rør per prøve ble sendt til sekvensering, en for «Forward» og en for «Reverse» primer. Merkede rør med LIGHTrun strekkode og nummer, ble plassert i en «GATC Collection» Boks i Bioteknologibygningen på NMBU. Prøvene ble sendt til GATC Biotech AG i Tyskland for sangersekvensering.

4.11 Sekvensanalyse av 16S rRNA

Sekvensresultatene som ble tilbakesendt fra Tyskland ble analysert i redigeringsprogrammet «4Peaks versjon 1.8». Sekvensinformasjonen ble åpnet i 4Peaks av filtype «AB1», som tillot programmet å se sekvenskvaliteten i kromatogrammene. Sekvensområder av dårlig kvalitet ble fjernet, hovedsakelig i nær primerområdet, i oppstrøms og nedstrøms av sekvensen. Dette gjelder de prøvene som kun ble sendt inn til sekvensering med én primer. For prøver som ble sendt inn med både «forward» og «reverse» primere, ble sekvensene satt sammen til ett alignment i dataprogrammet BioEdit versjon 7.0.5.3. Sekvensen ble sammenstilt ved bruk av funksjonen «Contig Assembly Program (CAP)».

Komplette sekvenser i FASTA-format ble deretter lagt rett inn i søkefeltet for Nucleotide BLAST (nBLAST) (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA), med valgfunksjonene «Standard databases», «Nucleotide collection (nr/nt)» og «Highly similiar sequences (megablast)». Den aktuelle sekvensen ble sammenlignet med eksisterende sekvenser i databasen (GenBank). Selv om prøvene fikk høy likhetsscore i BLAST var det nødvendig å dobbeltsjekke resultatene opp imot helgenomsekvensering.

4.12 Helgenomsekvensering med illumina MiSeq

For fullstendig oversikt over arvematerialet hos bakterieisolatet i «274», ble prøven helgenomsekvensert med en 201 Illumina MiSeq-plattform. Preparering og innsending av prøvematerialet ble utført av stipendiat Misti Dawn Finton. Sekvenseringen ble gjennomført av det norske sekvenseringsenter (Oslo, Norge).

Analysering av sekvensresultatet fra helgenomsekvenseringen med Illumina MiSeq (NGS) ble behandlet av professor Bjørn-Arne Lindstedt. Sekvensene ble opplastet i Galaxy Web plattform (Galaxy, Europe). Korte adaptersekvenser, som oppstår i enden av avlesningene ble rensert av programmet «Trimmomatic». Videre ble filen «R1-paired» og «R2-paired» overført i programmet Shovill for å generere bakteriegenene fra parvise avlesninger, til lengre fragmenter (Contigs). Fra Shovill ble det generert en fil, kalt Contigs som ble benyttet til søk i databaser. Søket etter virulens og resistens ble utført av professor Bjørn-Arne Lindstedt. Søket etter resistensgener ble utført i «Antimicrobial Resistance Reference Gene Database» ved NCBI og «The Comprehensive Antibiotic Resistance Database» (CARD). Virulensgener ble skannet med «The Virulence Factor Database» (VFDB). For screening av hvilken bakterie som var tilstede ble «Ribosomal Multilocus Sequence Typing» (rMLST) benyttet. Serotyping ble utført ved «Center for Genomic Epidemiology». For å oversette nukleotidsekvenser til gener, ble en fil i FASTA-format bestående av millioner av nukleotider ble Galaxy med verktøyet «PROKKA» anvendt. Søkefunksjonen i resultatfilen ble anvendt for søk etter aktuelle gener i denne studien.

4.13 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Antibiotikaresistensbestemmelse ble utført ved bruk av disk diffusjonstesting. Rendyrket bakteriekultur ble strøket over med en podeøse på Mueller-Hinton Agar (M-H) (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), før de ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Etter endt inkuberingstid ble vekst inokulert ved bruk av en tamponpinne i saltløsning (0,85% NaCl i vann). Turbiditeten til saltløsningen ble visuelt justert etter McFarland standard 0,5 (Pro-Lab Diagnostics, Bromborough, Storbritannia) ved å holde suspensjonen foran et lys mot en hvit bakgrunn med sorte streker. Dette er for å oppnå en ønsket tetthet på bakteriesuspensjon for antimikrobiell sensitivitetstesting. Suspensjonen ble strøket over hele overflaten på ferdigstøpte M-H agarskåler ved bruk av en steril bomullspinne i tre retninger. Videre ble romtemperert teststrimmel manuelt applisert på den pre-inokulerte agaren med en steril pinsett, før prøvene

ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Etter endt inkuberingstid ble eventuelle hemningssoner avlest ved bruk av den graderte MIC-skalaen. Samme prosedyre ble gjennomført i to omganger for validering av resultatene.

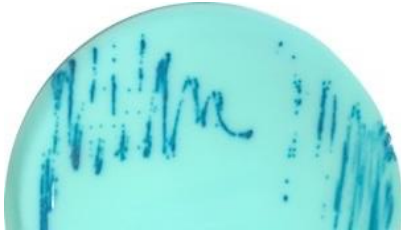

For evaluering av antimikrobiell sensitivitetstesting ble M.I.C.Evaluator™ (Oxoid) ETEST (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrike) og MIC test strip (Abruzzi, Italia) benyttet. Totalt 12 antibiotikastrips fordelt på 7 grupper ble benyttet; Ampicillin og amoksisillin (penicilliner); cefotaksim og cefepim (cefalosporiner); ciprofloksacin (fluorokinoloner); amikacin, gentamicin og streptomycin (aminoglykosider); trimetoprim (trimetoprim); erytromycin (makrolider); imipinem og meropenem (karbapenemer).

5. Resultat

5.1 Fenotypiske resistens på selektive kromogene skåler

For screening etter antibiotikaresistente bakterier ble melkeprøver (n = 76) fra friske kyr detektert på Oxoid Brilliance™ CRE agar, Brilliance™ ESB� agar og MRSAselectII agar. I tillegg ble fryste bakterieisolater (n = 31) undersøkt på Brilliance™ ESB� agar og Oxoid Brilliance™ CRE agar. Bakterierprøver fra melkekyr med påvist mastitt (M40A, M40B, M40C, M40M M39A) var på forhånd var isolert, og fenotypisk deteksjon av skålbilde er derfor ikke inkludert i oppgaven. Skålbilde med fenotypiske resultater for B38 og M274 er illustrert i tabell 5.1.

Tabell 5.1. Fenotypiske resultater med skålbilde, og beskrivelse av kolonifarge samt tolkning av resultatene.

Prøve1	Skålbilde	Koloni-farge	Tolkning
M274		Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia eller citrobacter (KESC)</i>
B38		Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia eller citrobacter (KESC)</i>

¹Skålbilder fra mastittprøvene uteble da de var isolert på forhånd av stipendiat Alberto Bombelli.

Alle prøver fra friske melkekyr viste ingen vekst (n = 76) på ESB�, karbapenem eller MRSA-skål. Bakterieisolat fra prøve M274 og B38 gav to positive funn på Oxoid Brilliance™ CRE agar. Begge isolatene gav blå kolonier, og ble tolket som en bakterieart fra enten *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *citrobacter* (KESC). Alle fem mastittprøver vokste på Brilliance™ ESB� agar.

5.2 Screening av utvalgte resistensgener for ESBL, karbapenem og MRSA

For screening etter kliniske resistensgener ble det kjørt en multipleks PCR for alle prøvene som vokste på antibiotikaskål. PCR-primere rettet mot ESBL-gener ble kombinert i fire multipleksreaksjonsblandinger. M1 (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} og *bla*_{SHV}), M2 (*bla*_{CTX-M Gr.9}, *bla*_{CTX-M Gr.9}, *bla*_{TEM}), M3 (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} og *bla*_{KPC}) og M4 (*rpoB* og *16S rRNA*) som bestod av positive kontrollprøver. Primere anvendt for screening av karbapenemresistente gener bestod av to ulike multipleksreaksjoner, CAR1 (*bla*_{CMY}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP} og *bla*_{VIM}) og CAR2 (*bla*_{NDM}, *bla*_{SCF} og *bla*_{KPC}) I tillegg ble prøvene screenet for oxacillinresistens (MRSA) med målgenet *MecA* og *MecC*, samt *Spa*-genet for *S. aureus* identifikasjon. Tolkning av resultatet fra gelelektroforesen er illustrert i tabell 5.2.

Tabell 5.2 Screening etter aktuelle resistensgener for ESBL, karbapenem -og oxacillin med multipleks-PCR.

Multipleks	M1	M2	M3	M4	CAR1	CAR2	MRSA	MRSA ₊₁
Målgen	<i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{OXA} <i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{KPC}	<i>RpoB</i> 16s rRNA	<i>bla</i> _{CMY} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{IMP} <i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{SCF} <i>bla</i> _{KPC}	<i>Spa2</i> <i>MecA</i> <i>MecC</i>	<i>MecA</i> <i>MecC</i>
M274	-	-	-	+	+	-	-	+
B38	-	-	-	+	+	-	-	+
M40A	-	-	-	+	+	-	-	+
M40B	-	-	-	+	+	-	-	+
M40C	-	-	-	+	+	-	-	+
M40M	-	-	-	+	+	-	-	+
M39A	-	-	-	+	+	-	-	+

¹Positiv kontrollprøve for *MecA* og *MecC*.

²*S. aureus* typing

Resultatet fra multipleks PCR som ble applisert på en agarose gelelektroforese, er vist i tabell 5.2. Kontrollprøve M4 (*RpoB* og 16s rRNA) og *MecA* og *MecC* var positive. Prøvene som ble screenet for kliniske resistensgener av ESBL, karbapenem og oxacillin (MRSA) hadde ingen positive utslag på gel.

5.3 Bakteriescreening ved sangersekvensering av 16S rRNA

Positive utslag på antibiotikaskål ble videre sekvensert med 16S rRNA for artsidentifisering av bakterier som var tilstede i prøven. Før innsending av prøvene til sekvensering ble det gjennomført renhetsmåling og kvantifisering (se vedlegg B). Sekvensresultatet som ble søkt i nBLAST er illustrert i vedlegg D. BLAST-resultat viste hvilken bakterie som mest sannsynlig befant seg i prøven, med tilhørende Covery (%), og identitet (%) (vedlegg E). Resultatet er oppgitt i tabell 5.3.

Tabell 5.3 Bakterieidentitet for nBLAST-søk med oppgitt Covery (%) og identitetsscore (%).

Prøve	Bakterieidentitet	% Covery	% identitet
M274	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	> 99	> 99
B38	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	> 99	> 99
M40A	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ²	100	100
M40B	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ²	100	100
M40C	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ²	100	100
M40M	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ²	100	> 99
M39A	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ²	100	100

¹ Forward og Reverse

² Forward

Sekvensresultatet fra nBLAST som er illustrert i *tabell 5.3* antyder at bakterien *E. faecalis* befant seg i prøve M274 og B38. Prøve M40A, M40B, M40C, M40M og M39A ble identifisert som slekten *Pseudomonas* spp. M40M var den eneste som skilte seg fra de andre prøvene, da den ble identifisert som *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Alle prøvene hadde en prosentvis covery og identitet > 99 %.

5.4 Helgenomsekvensering

Bakterieisolat (prøve B38) fra friske melkekyr og to (M40A og M40C) fra kyr med klinisk mastitt ble valgt ut til helgenomsekvensering med illumina MiSeq. rMLST ble benyttet for karakterisering av bakterieartene. Prøve B38 ble bekreftet *E.faecalis*, og M40A var mest sannsynlig *P. oleovarans*. M40C ble identifisert som en ukjent *Pseudomonas* spp. (Vedlegg F). Prøvene ble screenet for gener som koder for resistens mot antibiotika, metaller og desinfeksjon. Resistensassosierte gener er hentet fra vedlegg G, og resultatet er oppsummert i tabell 5.4.

Tabell 5.4 Utvalgte resistensassosierte gener mot antibiotika, metaller og desinfeksjon detektert i prøve M40A, M40C og B38.

	M40A <i>P. oleovarans</i> ¹	M40C <i>Pseudomonas</i> spp. ¹	B38 <i>E. faecalis</i> ¹
Aminoglykosid		<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>ant(6)-Ia, spw</i>
β-laktam		<i>ampC</i>	
Tetracyklin	<i>tetO</i>		<i>tetM</i>
Andre ²	<i>ble, bcr</i>	<i>ble, bcr, lnrL, fsr</i>	<i>dfrE, azlC, tmrB, lsaA</i>
Efflukspumpe	<i>oprM, oprN, mexA, mexB, mexE, mexF, mexK mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mdtK, oprH, muxB, cpxR, pmpM, emrB</i>	<i>mdtA, mdtB, mdtC, mdtH, mdtK, oprN, oprM, mexA, mexB, mexE, mexD, mexJ, mexK, mexE, mexD. oprH, cpxR, pmpM, emrA, emrB</i>	<i>efrA, efrB, emeA, mdtL</i>
Metall	<i>acr3, copA, copB, czcA, czcB, MerR1</i>	<i>arsR1, copA, copB, czcA, czcC</i>	<i>acr3, arsD, yycJ</i>
Desinfeksjon	<i>ohrB, ohrR, yaaA,</i>	<i>ohrB, ohrR, yaaA, qacG</i>	

**uthevet skrift markerer felles gener detektert mellom bakteriestammene*

¹ *MLST-resultat (Se vedlegg F).*

² *Andre klasser av antibiotika med mindre klinisk relevans*

Tabell 5.4 viser at flere resistensgener ble detektert hos alle bakterieisolatene med illumina Miseq. I prøve B38 ble det påvist resistensgener for tetracyklin (*tetM*) og aminoglykosider (*Ant(6)-Ia, spw*). Bakterien hadde også en rekke multiresistente efflukspumper. M40A og

M40C hadde en del i like resistensassosierte gener. Hos M40A ble det gjort funn av genet *TetO* som koder for tetracyklinresistens. M40C skiller seg ut med *ampC* som koder for resistens mot β -laktam. I tillegg hadde bakteriestammen, mobile gener *aph(6)-Id* og *aph(3'')-Ib* som koder for aminoglykosidresistens. I tillegg til funn av gener som koder for antibiotikaresistens, ble det identifisert gener assosiert med metallresistens hos alle tre bakterieisolatene, samt gener som koder for resistens mot desinfeksjonsmidler hos M40 og M40C.

Bakterieisolatene ble samtidig screenet for virulens, toksiner og hemolysiner. Resultatet for utvalgte gener for M40, M40C og B38 er oppsummert i tabell 5.5.

Tabell 5.5. Virulens, toksin -og hemolysinerelaterte gener i prøve B38, M40A og M40C.

	M40A <i>P. oleovarans</i> ¹	M40C <i>Pseudomonas</i> spp. ¹	B38 <i>E. faecalis</i> ¹
Virulens	<i>Type IV pilus: pil</i> lokus <i>Flagell: fle</i> lokus, <i>fli</i> lokus, <i>flg</i> lokus, <i>flh</i> lokus, <i>mot</i> lokus <i>Alginat: muc</i> lokus, <i>alg</i> lokus	<i>Type IV pilus: pil</i> lokus <i>Type VI (T6SS): hsi</i> lokus, <i>clpVI</i> , <i>hcp1</i> , <i>fha1</i> , <i>dotU1</i> , <i>cmF1/tssM1</i> , <i>vgrG1a</i> , <i>tagR</i> , <i>hsi/vip</i> <i>Flagell: fle</i> lokus, <i>fli</i> lokus, <i>flg</i> lokus, <i>flh</i> lokus, <i>mot</i> lokus <i>Alginat: muc</i> lokus, <i>alg</i> lokus,	<i>Endokarditt og biofilm: efaA</i> , <i>ebpABC</i> , <i>srtC</i> , <i>ace</i> , <i>fsrABC</i> , <i>gelE</i> , <i>spreE</i>
Toksiner	<i>RelE2</i> , <i>RelB</i> , <i>RelE</i> , <i>RatA</i> , <i>HigA</i> , <i>FitB</i> , <i>YhaV</i> , <i>PrlF</i> , <i>apxIB</i> , <i>chpB</i>	<i>RelE2</i> , <i>RatA</i> , <i>VgrG1</i> , <i>HigA</i> , <i>chpB</i>	
Hemolysin			<i>TlyA</i>

¹ MLST-resultat (Se vedlegg F).

Som vist i tabell 5.5 er det observert flere gener relatert til virulens og toksin hos alle bakteriestammene. Bakteriestamme *E.faecalis* bestod av virulensgenene *ebpABC*, *srtC*, *ace* som koder for endokarditt og biofilmassosiert pilus. Samtidig viste bakterien genene *fsrABC*, *spreE* og *gelE*. Det ble gjort funn av en rekke virulensgener for M40A og M40C. Begge bakteriestammene hadde virulensgener som kodet for alginatproduksjon, flageller og pili av type IV. M40C hadde i tillegg gener som er inkludert i type-VI sekresjonssystem (T6SS). En rekke toksinrelaterte gener ble observert i M40A og M40C. Ett gen som koder for hemolysin ble identifisert i prøve B38.

5.5 Antimikrobiell sensitivitetstesting

For resistensbestemmelse av prøve B38 og M274 ble det benyttet syv ulike antibiotikaklasser; Penicilliner, cefalosporiner, fluorokinoloner, aminoglykosider, trimetoprim, makrolider og karbapenemer. Prøve M40A, M40B, M40C, M39A og M40M ble undersøkt med antibiotikastrips fra klassen cefalosporiner (cefotaksim og cefepim) og aminoglykosider (streptomycin). Gjennomsnittlig MIC-verdi (Mg/L) fra to paralleller er hentet fra vedlegg C. Resultatet er med tilhørende MIC verdi for klinisk brytningspunkt er presentert i *tabell 5.6*.

Tabell 5.6 Gjennomsnittlig MIC-verdi (mg/L) for prøve B38, M274 og M40A, M40B, M40C, M40M og M39A med EUCAST sine kliniske brytningspunkter. (E referer til *Enterococcus* spp. og P for *Pseudomonas* spp.)

	EUCAST - MIC Klinisk brytningspunkt (mg/L)		B38 (mg/L)	M274 (mg/L)	M40A (mg/L)	M40B (mg/L)	M40C (mg/L)	M40M (mg/L)	M39A (mg/L)
	(S _≤)	(R >) ²	<i>Enterococcus</i> spp.		<i>Pseudomonas</i> spp.				
<i>Antibiotikum</i>									
Penicillin – β-laktam, Inhibering av celleveggsyntese									
AMP	4	8	0,44	0,44	-	-	-	-	-
AMC	4	8	0,38	0,44	-	-	-	-	-
Cefalosporin – β-laktam, Inhibering av celleveggsyntese									
CT	<i>E</i> = 1 ₃ <i>P</i> = 1	<i>E</i> = 2 ₃ <i>P</i> = 2	≥ 32	≥ 32	0,88	1,0	≥ 32	≥ 32	1
FEP	<i>E</i> = 4 ₃ <i>P</i> = 0.001	<i>E</i> = 8 ₃ <i>P</i> = 8	28	28	0,157	0,32	4	6	0,125
Karbapenem – β-laktam, Inhibering av celleveggsyntese									
IP	0.001	4	0,50	0,50	-	-	-	-	-
MP	2 ₃	8 ₃	1,00	1,75	-	-	-	-	-
Fluorokinolon – Inhibering av DNA-syntese									
CI	4	4	1,25	0,88	-	-	-	-	-
Aminoglykosid – Angriper 30S subenhet på ribosomet									
AK	1	1	≥ 256	≥ 256	-	-	-	-	-
GM	0.5	0.5 (64)	12	14	-	-	-	-	-
S	<i>E</i> = - <i>P</i> = IE	<i>E</i> = (512) <i>P</i> = IE	786	558	4	8	≥ 1024	≥ 1024	3
Trimetoprim – Inhiberer syntese av folsyre									
TM	IE	IE	0,22	0,119	-	-	-	-	-
Makrolid – Angriper ned 50S subenhet på ribosomet									
EM	IE	(4)	3,5	4	-	-	-	-	-

¹ AMP = Ampicillin; AMC = Amokisicillin m. klauvansyre; CT = Cefotaksim; FEP = Cefepim; IP = Imipenem; MP = Meropenem; CI = Ciprofloksacin; AK = Amikacin; GM = Gentamicin; S = Streptomycin; TM = Trimetoprim; EM = Erytromycin.

² ECOFF-verdi er illustrert med MIC-verdi i parentes (..)

³ ikke anbefalt testing, da midlet ikke egner seg som behandling for følgende bakterie

Pk/pd: Non species related breakpoints (Markert med tykk skrift)

IE = Ikke tilstrekkelig bevis for behandling av oppgitte middel

Prøve B38 og M274 hadde forholdsvis like MIC-verdier ved alle antibiotika som det ble testet for, som er vist i *tabell 5.6*. Begge bakteriestammene viste klinisk resistens mot cefotaksim (cefalosporin), amikacin og streptomycin (Aminoglykosider). Videre ble det påvist forhøyede MIC-verdier av erytromycin, som har en anbefalt ECOFF-verdi på 4 mg/l. I tillegg viste begge prøvene MIC over pk/pd-verdi mot gentamicin og cefepim. Prøve M40C og M40M viste resistens mot to (cefotaksim og streptomycin) av tre antibiotika som prøvene ble analysert for. Begge bakteriestammene viste i tillegg forhøyede MIC-verdier mot cefepim.

5.6 Screening etter ampicillin -og penicillinresistente bakterier

Melkeprøve innhentet fra friske kyr ble screenet for ampicillin og penicillin G i BHI-buljong. Penicillin G ble tillaget med konsentrasjon 0,25 mg/L, og ampicillin ved 4 og 8 mg/L. Prøvene som hadde synlig bakteriepellet ble visuelt vurdert etter vekst (+) og mye vekst (++), og resultatet er vist i *tabell 5.7*.

Tabell 5.7. Screeningresultat for melkeprøve 500-580 inokulert i BHI-buljong med ampicillin (4 mg/L / 8 mg/L) eller penicillin (0,25 mg/L).

	Penicillin G 0,25 mg/L Positive (%)	Ampicillin 4 mg/L Positive (%)	Ampicillin 8 mg/L Positive (%)
500-580			
Vekst (+)	40 (52.6)	46 (60.5)	32 (82.1) ¹
Mye vekst (++)	6 (7.9) ²	1 (1.32) ²	0 (0.0)

¹Kun analysert 50% av prøvene

²Beregnet ut ifra antall prøver analysert (n =67)

Ut ifra *tabell 5.7* ble det observert vekst i penicillin, og ampicillin ved alle konsentrasjoner. For penicillin G gav 52.6 % utslag for vekst, hvorav 7,9 % av alle prøvene hadde mye vekst. Ved sammenligning av ampicillin ved de to konsentrasjonene som ble satt, var andel positive prosentvis høyere ved høyeste konsentrasjon (8 mg/L). Derimot var andel analyser halvert ved denne konsentrasjonen. Ampicillin (8 mg/L) hadde ingen prøver med betydelig vekst, sammenlignet med ved lavere konsentrasjon som hadde en.

Videre ble de prøvene med mye vekst (n = 7) valgt videre for deteksjon på penicillin G- og ampicillin agar, samt Brilliance™ ESBL. Andelen vekst ble visuelt vurdert på skål etter ingen vekst (-), vekst (+) og overgrodd (++) . Resultatet for prøvene er oppgitt i *tabell 5.8*.

Tabell 5.8. Vekst ved inokulering på penicillin G -og ampicillin agar, samt Brilliance™ESBL agar. Ingen vekst (-), Vekst (+) og overgrodd (++)

	Penicillin G	Ampicillin		Brilliance™ESBL
	0,25 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	
510-Pen	+	+	+	-
531-Pen	-	-	-	-
522-Amp	+	+	+	-
522-Pen	+	+	+	-
551-Pen	++	++	+	-
505-Pen	+	-	-	-
534-Pen	+	+	+	-

Ifølge tabell 5.8 var det prøve 551-pen som skilte seg fra de andre, ettersom petriskålene var overgrodd på både penicillin G og ampicillin ved laveste konsentrasjon (4 mg/L). Videre ble det observert vekst ved alle ampicillin -og penicillinskåler for 510-Pen, 522-Amp, 522-Pen og 534-Pen. Av alle prøver som ble analysert var det ingen vekst observert på ESBL-skåler.

6. Diskusjon

6.1 Fenotypisk resistensbestemmelse

For å undersøke forekomst av antibiotikaresistente bakterier i melk, ble prøver innhentet fra Ås-gård. Første del av prosjektet var å kartlegge resistensforekomsten i melk fra friske kyr. Speneprøver ble screenet for fenotypisk resistens mot β -laktam, karbapenem og oxacillin (MRSA) ved bruk av selektive kromogene medier. Vanligvis benyttes skålene i helsesektoren for å screene etter sykdomsfremkallende mikrober fra kliniske prøver (Thermo Fisher Scientific Inc, 2010a; Thermo Fisher Scientific Inc, 2010b). Ingen av prøvene viste fenotypisk resistens ved utsåing på selektive skåler. Ved bruk av samme metode ble det bekreftet ingen positive funn for ytterligere 40 melkeprøver gjennomført av masterstudent Oda Mamen. Selv om det ikke ble detektert for klinisk resistente bakterier ved bruk av selektive medier kan melkeprøvene inkludere bakterier som er motstandsdyktige for andre antibiotikum.

I forbindelse med prosjektet jurfrisk ble bakterieisolater fra tidligere melkeuttak isolert av andre prosjektdeltakere. Av disse ble et utvalg av bestemte melkeisolater fra både friske kyr, og kyr med påvist mastitt screenet for resistens i denne oppgaven. Et utvalg av bakterieisolater fra melkekyr med påvist mastitt som hadde vokst på ESBL-skåler ble valgt ut for identifisering og screening etter genotypisk resistens. Bakterieisolater fra friske kyr ble valgt ut på bakgrunn av karbapenem-funn fra *E.faecalis* isolater i en studie gjennomført parallelt av Oda Mamen. Det var derfor interessant å undersøke om det var mulig å finne tilsvarende resultat for denne studien. Utvalgte isolater fra samme batch ble screenet for resistens mot karbapenem og ESBL i denne oppgaven. To bakterieisolater vokste på Oxoid Brilliance™ CRE agar med blå kolonier. Det indikerte resistensmekanismer som utøver motstand mot karbapenemer. Blå kolonier indikerte bakterievekst av enten *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* (KESC). For å undersøke fenotypisk tilstedeværelse av resistente bakterier er selektive antibiotikaskåler en effektiv metode. Skålene er hovedsakelig tiltenkt til undersøkelse av kliniske isolater fra mennesker. Dermed vil det være usikkerheter rundt fenotypisk deteksjon av bakterieprøver da ikke alle isolater har blitt utprøvd på skål. Vekst på Oxoid Brilliance™ CRE gir derimot en indikasjon på tilstedeværelse av bakterier som har resistensmekanismer mot karbapenemer.

Ettersom screening etter klinisk resistens i bakterieisolater fra melkeprøver fra friske kyr gav ingen vekst på selektive kromogene medier, var det interessant å undersøke for resistens mot antibiotikum som er relevante for behandling av mastittinfeksjoner hos melkekyr. De samme

prøvene fra først del av prosjektet ble screenet for resistens mot ampicillin og penicillin G. I Norge benyttes penicilliner hovedsakelig for behandling av bakterielle infeksjoner hos storfe (Statens legemiddelverk, 2012). Konsentrasjonen som ble benyttet i denne studien ble valgt på bakgrunn av tidligere forskningsstudier. Det ble benyttet konsentrasjoner basert på funn fra tidligere studier. En studie har vist at *S.aureus* isolert fra mastittkyr hadde brytningspunkt på 0,25 mg/ mot penicillin G (Chandrasekaran et al., 2014). Samme ble observert for *Streptococcus uberis* (Käppeli et al., 2019). For å selektere for ampicillinresistente mikrober i melkeprøvene, ble det benyttet en konsentrasjon på 4 mg/l og 8 mg/l. Ampicillinresistens for enterokokker forekommer ofte med en MIC-verdi i området 8-64 mg/l (Joste et al., 2019). Disse studiene er basert på forskning på bakterieisolater fra mastittprøver, mens i denne studien ble det screenet for ampicillin og penicillinresistens hos melkeisolater fra friske kyr.

Stammer som vokste i buljong inokulert med penicilliner, ble videre undersøkt på antibiotikaskåler. Ved vekst ble det antatt at bakterier som var tilstede i prøven var resistente mot ampicillin eller penicillin G, eller forøvrig begge. Metoden har derimot en del svakheter, og det kan ikke bekreftes at vekst i buljong eller på skål skyldes resistente bakterier. Tydelig vekst ble først oppdaget 3-4 dager etter inkubering. Det kan tenkes at vekst i buljong oppstod etter noen dager på grunn av degradering av antibiotikumet. I utgangspunktet var det tiltenkt å gjennomføre sangersekvensering som kunne gi en indikasjon på hvilken bakterie som var på skålene. Det kunne i tillegg vært interessant og gjennomført sekvensering av hele genomet for prøve 522-amp/522-pen, da prøven indikerte resistens mot både ampicillin og penicillin G.

6.2 Molekylær karakterisering av bakterier med fenotypisk resistens

For identifisering av hvilken bakterie som vokste på de selektive kromogene skålene, ble sangersekvensering av 16S rRNA benyttet for effektiv bakterieidentifikasjon. Sekvenseringen indikerte tilstedeværelse av *E.faecalis* i prøve B38 og M274 som stammet fra friske melkekyr. rMLST, en mer pålitelig identifikasjonsmetode bekreftet funn av denne organismen. Bakterien stammer fra enterokokkslekten, som består av Gram+ bakterier som ofte befinner seg i mage-tarmkanalen hos dyr og mennesker (Lee et al., 2003b). Tilstedeværelse av bakterien *E.faecalis* kan skyldes fekale forurensinger fra kuas egen tarmkanal (Jackson et al., 2011). Derimot kan det ikke konstateres at bakterien som ble isolert fra melken skyldes infiserte melkekjertler i denne studien. Andre studier har vist at bakterien dominerte i rå melk fra friske jurkjertler (Citak et al., 2005; McAuley et al., 2015), samtidig som annen studie bekreftet at mastittinfeksjoner

hovedsakelig var forårsaket av *E.faecalis* (Róžańska et al., 2019). En studie viste tilstedeværelsen av enterokokker i melk fra medikamentbehandlet kyr samt friske uten tegn til klinisk mastitt (Zdolec et al., 2016).

Sangersekvensering av bakterieisolater fra mastittkyr indikerte tilstedeværelsen av slekten *Pseudomonas* i samtlige prøver. Dette ble bekreftet med helgenomsekvensering for prøve M40A og M40C. Det må nevnes at bakterien som ble identifisert med 16S rRNA og rMLST stammer fra samme bakterieisolat, men er strøket over på BHI-medium og DNA-ekstrahert av ulike forsøkspersoner. Ved bruk av rMLST ble det antatt at M40A er mest sannsynlig *P. oleovarans*, men på grunn av lav identitetsscore kan det ikke bekreftes at det er den som er tilstede. For M40C ble det observert tre ulike *Pseudomonas* arter med lik identitetsscore; *P. oleovorans*, *Pseudomonas alcaliphila* og *Pseudomonas indoloxydans*. Det kan trolig skyldes tilstedeværelse av en ny bakterieart som tidligere ikke er blitt identifisert. Men ytterligere undersøkelser må gjennomføres for å bekrefte dette. Bakterien som trolig er tilstede i prøve M40C er av en ukjent *Pseudomonas* art, og blir videre omtalt i oppgaven som *Pseudomonas* spp.

6.3 Patogenese og virulensfaktorer

6.3.1 Virulensfaktorer hos *E.faecalis*

Enterokokkene *E. faecalis* og *E. faecium* er ofte assosiert som nosokomiale patogener som forårsaker infeksjonssykdommer som endokarditt, urinveisinfeksjon og bakteriemi (Lee et al., 2003a). Bakterien er ofte sykdomsfremkallende når virulensgener assosiert med vedheft, translokasjon og kolonisering er tilstede (Franz et al., 2001). Ut ifra virulens som ble detektert i prøve B38 ble det gjort funn av flere kjente gener som koder for virulensmekanismer for denne bakterien. Det gjelder blant annet *EbpABC*, *srtC*, *ace* og *efaA* som er forbundet med overflate adhesjon, biofilmdannelse og endokarditt (Chen et al., 2018; Kemp et al., 2007). *EbpABC* koder for pilusassosierte enheter med funksjonen til å feste seg til overflater og dannelsen av biofilm (La Rosa et al., 2016). Genet *efaA* er ofte identifisert hos pasienter med endokarditt infeksjon forårsaket av bakterien *E. faecalis* (La Rosa et al., 2016; Preethee & Deivanayagam Kandaswamy, 2012). Chen et al., 2018 fant identiske virulensgener som er identifisert i denne studien, hos samme bakterieart. Andre virulensgener identifisert hos *E. faecalis* var *fsrABC*, *gelE* og *spreE*. Genene styrer quorum-sensing-systemet (cellekommunikasjon) hos denne bakterien som sørger for kolonisering og formidling, som er en viktig årsak til nosokomiale

infeksjoner (Ali et al., 2017). Biofilmformasjon er et kjent problem for deling av genetisk arvemateriale. Virulensgenene som er observert hos arten *E. faecalis* kan være en potensiell faktor for deling av resistens- og virulensgener (La Rosa et al., 2016). Det er tidligere vist en positiv sammenheng mellom biofilm og antibiotikaresistens hos kliniske *E. faecalis* isolater (Zheng et al., 2017). Andre virulensegenskaper som ble identifisert hos bakteriestammen er hemolysingenet *tlyA*. Det har tidligere blitt identifisert fra bakterieisolater i meierianlegg i Italia (Piva et al., 2017). Det har blitt antatt at genet har en hemolytisk aktivitet på grunn av homologi til et annet poreformet cytotoxin (Rahman et al., 2010). Det er fortsatt usikkerhet om det er et hemolysin, eller en ribosomal RNA-metyltransferase, da det viser homologi til begge.

6.3.2 Virulensfaktorer hos *Pseudomonas* spp.

Slekten *Pseudomonas* spp. kan potensielt bestå av arter som er opportunistisk humanpatogene (De Bentzmann & Plésiat, 2011). Bakterien befinner seg i miljøomgivelser og kan smitte gjennom spenekanalen, innvandre epitelet og danne biofilm som sørger for videre kolonisering og inflammasjon (Park et al., 2014). En rekke virulensgener ble identifisert i prøve M40A og M40C fra mastittmelk. En genklynge som kodet for Type VI sekresjonssystem (T6SS) ble kun identifisert i prøve M40C. Genene som ble observert hos *Pseudomonas* spp. i denne studien er av de samme som er involvert i *P. aeruginosa* sitt sekresjonssystem (Chen et al., 2015). T6SS er vidt distribuert hos Gram- bakterier, og fungerer som en virulensegenskap ved at den potensielt kan overføre effektorporteiner (giftstoffer) som forhindrer vekst eller ødeleggelse hos vertscellen (Coulthurst, 2019). Effektorer som skilles ut av T6SS gir bakterien en overlevelsesfordel, og dette systemet er blant annet observert hos *P. aeruginosa* (Chen et al., 2015). Omtrent 13 gener er identifisert i T6SS-systemet, og disse er videre kategorisert etter funksjon i tre underenheter; membranassosierte proteiner, bakteriofagrelaterte haleproteiner og den siste gruppen omfavner proteiner med uidentifiserte funksjoner (Chen et al., 2015). Når det skjer en sammentrekning av systemet så vil den sekreterende cellen danne direkte kontakt mellom den og målorganismen (Coulthurst, 2019). Systemets haleproteiner har en strukturell likhet med bakteriofager. Det tyder på at infisering av effektorproteiner over til verten skjer på samme måte som fager overfører genetiske materiale til en bakterie. Sammenhengen mellom biofilm og T6SS-systemet er tidligere blitt diskutert (Chen et al., 2015). Bakteriesamfunn hvor celleaggregater danner en ekstracellulære substanser som binder bakteriene sammen kan muligens tillate T6SS-interaksjoner (Coulthurst, 2019). Rapporter viser at biofilmdannelse er en effektiv måte å kunne spre både antibiotika -og metallresistens mellom mikrobene (Baker-Austin et al., 2006). Det ideelle miljøet som dannes i en biofilm sørger for effektiv overføring

av genetisk materiale mellom mikrobielle populasjoner. I tillegg kan bakterier som opptrer i biofilm tåle en høy konsentrasjon av antimikrobielle stoffer. Adhesjon og bevegelighet er også viktige egenskaper knyttet til biofilmformasjon.

En rekke flagellassosierte gener ble identifisert hos begge bakterieisolater fra *Pseudomonas* slekten, deriblant lokus av *fle*, *fli*, *flg*, *flh* og *mot*. Flagellens rolle er å feste seg til overflaten av slimhinner, og denne egenskapen er en stor del av patogenesen til *P. aeruginosa* (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013). En annen virulensegenskap som kan bidra i dannelsen av biofilm er hårlignende utvekster (pili) (O'Toole & Kolter, 1998). Hos mange bakteriearter, blant annet hos *Pseudomonas* er disse lokalisert i overflaten av bakterien, og sørger for bakteriell translokasjon til eukaryote og prokaryote organismer (Mattick, 2002). Dette systemet er kjent som Type IV pili (T4P), hvorav opp imot 40 ulike komponenter er identifisert hos *P. aeruginosa*. Systemet består av en kvartær struktur, bestående av en rekke proteiner lokalisert i membranen som danner base for pilusstrukturen. Komplekset pilM-pilN-pilO-pilP-pilQ er essensielle for ekspresjon og funksjon (Ayers et al., 2009). Samtidig består T4P av piluslignende proteiner som sørger for overflateassosierte bevegelser, også kalt «twitching» (O'Toole & Kolter, 1998). For ekspresjon av T4P er det nødvendig med en rekke proteiner koblet til en rekke transkripsjonsregulatorer (Mattick, 2002).

P.aeruginosa benytter seg av alginat biosyntese, en to-komponents transkripsjonsregulator. Dette systemet er en viktig virulensegenskap ved akutte og kroniske infeksjoner (Stacey et al., 2017). Alginat er et type eksopolysakkarid (EPS) som kan bidra til cystisk fibrose (Damron & Hongwei, 2011). Genet *algU* koder for alginat biosyntetisk protein som er ansvarlig for overproduksjon av alginat i bakterien *P. aeruginosa*. Mutasjon i *MucA*-genet kan også være en årsak til masseproduksjon av alginat i en bakterie. Alginatprodusert biofilm har vist en høyere resistens mot antibiotika (Hentzer et al., 2001).

Oppsummert viste begge bakterieisolatene fra prøve M40A og M40C gener som koder for virulensmekanismer som alginatproduksjon, bakteriell adhesjon og kolonisering ved hjelp av pili -og flagellassosierte mekanismer. I tillegg T6SS Sekresjonssystem som kun ble identifisert i prøve M40C. Til sammen utgjør disse en viktig del i patogenesen til *Pseudomonas* spp. som ble isolert i denne studien. De virulente egenskapene identifisert i denne studien, er forbundet med virulensegenskaper hos *P.aeruginosa*. Det tyder på nært slektskap til denne organismen. Denne bakterien er en stor årsak til nosokomiale infeksjoner hos immunkompromitterte

pasienter i sykehus (Basseti et al., 2018). Sett i sammenheng med *Pseudomonas* spp. som ble identifisert i denne studien, kan det være en sannsynlighet for at bakterien kan adhere og kolonisere menneskers epitel. Likevel må andre virulensmekanismer være tilstede i organismen for at den skal forårsake sykdom hos verten. Toksinproduksjon er ofte forbundet med patogenesen hos en organisme (Woods & Iglewski, 1983).

6.3.2.1 Toksiner

En rekke toksiner involvert i toksin-antitoksin (TA) system ble identifisert i bakterieisolatet fra prøve M40A og M40C. TA er små genetiske elementer som er lokalisert på plasmider eller kromosomer hos mange bakteriearter (Fernández-García et al., 2016). Systemet består av stabile (toksiner) og ustabile (antitoksiner) proteiner som linker hverandre, og sørger for proteinekspresjon og kloning av DNA hos mikroorganismer (Fernández-García et al., 2016; Unterholzner et al., 2013). Så lenge tilstedeværelsen av begge genene er tilstede vil det ikke påvirke organismen, da antitoksiner sørger for å hemme uttrykket av toksiner. Antitoksiner brytes ned, og kontinuerlig syntetisering er nødvendig for å opprettholde stabilt nivå i cellen (Hayes & Sauer, 2003). Under lite gunstige forhold vil antitoksinet brytes ned og toksinet vil sørge for stopp i vekst og antageligvis celledød (Schmidt et al., 2007). I denne studien ble TA-systemet av *prlF-yhaV*, *higB/higA*, *ratA-ratB* og *relBE* identifisert. Toksinet *higB* er en type ribonuklease, som sammen med *higA* antitoksinet danner et TA-system (Fernández-García et al., 2016). Toksinet *higB* ble ikke identifisert i noen av stammene. Det kan tenkes at genet er tilstede men ikke ble identifisert ved PROKKA-søkefunksjon. Systemet *higB/higA* er ofte identifisert hos *P.aeruginosa* og utgjør en del av virulensfaktoren hos denne bakteriearten. Et annet TA-system ofte lokalisert hos denne bakterien er *RelBE*-lokus, som ble gjort funn av i M40A. Toksinet *relE* sørger for spalting av mRNA-kodon, som følgelig vil avslutte translasjonsprosessen (Hayes & Sauer, 2003). *RelB*-antitoksin sørger for inaktivering av toksinet *relE*. Lokuset har blitt identifisert på plasmider hos *K.pneumoniae* og *Acinetobacter baumannii* (Fernández-García et al., 2016). Plasmider som er integrert hos vertsceller med TA-systemer og resistensgener vil ikke kunne kvitte seg med plasmidet, og dermed vil det bidra til å opprettholde mobile elementer i genomet, som igjen kan bidra til spre resistens -og virulensgener via HGT (Lobato-Márquez et al., 2016).

6.4 Genotypisk påvisning av resistens

6.4.1 Antibiotikaresistens hos *E.faecalis*

Sensitivitetstesting av bakterieisolat B38 og M274 viste tilnærmet like MIC-verdier for de antibiotika som det ble testet for. Begge viste resistens mot fem antibiotika fra to ulike klasser; cefotaksim, cefepim (cefalosporin), amikacin, gentamicin, streptomycin (aminoglykosider). I tillegg viste det forhøyet MIC-verdi av erytromycin sammenlignet med Ecological Cut-Off (ECOFF). Helgenomsekvensering av B38 gav utslag for flere resistensgener. De viktigste som ble plukket fram var *ant(6)-la* (aminoglykosidresistens), *tetM* (tetracylinresistens), *tmrB* (tunicamycinresistens), *dfrE* (trimetoprimresistens) og en rekke multiresistente efflukspumper; *emeA*, *efrAB*, *mdtL*. I tillegg hadde *E.faecalis* gener som koder for metallresistens.

6.4.1.1 Resistens mot aminoglykosider

Aminoglykosidresistens kan være forårsaket av inaktiverende enzymer eller ribosomale mutasjonsendringer (Chow, 2000; Del Campo et al., 2000). Iboene resistensmekanismer forårsaker ofte aminoglykosidrestens hos enterokokker med en MIC verdi i fra 4 mg/l – 256 mg/l (Chow, 2000; Hollenbeck & Rice, 2012). Ervervet aminoglykosidresistens hos *E.faecalis* og *E.faecium* fører ofte til resistens med kritisk høyt nivå. Dette er det største bekymringen, da det ofte fører til gentamicin- og streptomycinresistens (Hollenbeck & Rice, 2012). For bakterieisolatet *E. faecalis* ble det gjort funn av genet *ant(6)-la*, som koder for aminoglykosid nukleotidtransferase. Studier har vist at enterokokker med dette genet er ofte viser høygradig resistens mot streptomycin (Choi & Woo, 2013; Del Campo et al., 2000; Vakulenko et al., 2003) og det er ofte koblet til ervervet resistens (Arias & Murray, 2012). Selv om genet er tilstede hos en organisme, er det ikke nødvendigvis at det uttrykker resistens mot streptomycin. Antibiotika sensitivitetstesting viste at bakterie fra B38 var resistent mot alle aminoglykosider (amikacin, gentamicin og streptomycin) testet for. En studie som isolerte *E faecalis* fra kliniske og fekale isolater identifiserte høynivå resistens mot gentamicin og streptomycin hvor genet *ant(6)-la* ble detektert (Del Campo et al., 2000).

Et annet gen som kan utøve resistens mot aminoglykosider, er *spw*. Genet koder for aminoglykosid nukleotidyltransferase, og kan gi resistens mot antibiotikumet spectinomycin (Wendlandt et al., 2013). Det stammer opprinnelig fra enterokokk-slekten, men genet har også blitt identifisert hos stafylokokker (Wendlandt et al., 2014). Det er også gjort funn av genet *spw* hos stafylokokker i kalkunfilet, og i gen-kluster fra gris og kylling (Wendlandt et al., 2013;

Wendlandt et al., 2014). For B38 ble det ikke gjennomført sensitivitetstesting for antibiotikumet spectinomycin, og det er ikke mulig å stadfeste resistens mot enda et antibiotikum i aminoglykosid-klassen.

6.4.1.2 Resistens mot trimetoprim

For prøve B38 ble det påvist resistensgenet *dfrE* mot antibiotikumet trimetoprim. Genet koder for dihydrofolatreduktase enzymer som blokkerer omdanningen av dihydrofolat til tetrahydrofolat som utgjør en viktig del av folatmetabolismen (Coque et al., 1999). Trimetoprimresistens har blitt observert verden over hos enterokokker siden det ble introdusert til markedet i 1969 (Coque et al., 1999). Trimetoprim er et bredspektret stoff benyttet i behandling av respiratoriske-, hud- eller urinveisinfeksjoner (UVI). Tidligere har stoffet også blitt brukt til forebyggende behandling av UVI (Huovinen, 1997). Kombinasjonsbehandling av trimetoprim og sulfametoksazol er ofte brukt (Coque et al., 1999). I 2018 utgjorde salget av trimetoprim-sulfa preparater i veterinærbehandling den nest største andelen etter penicilliner inkludert storfe (NORM/NORM-VET, 2018). Derimot ble det ikke observert resistensgener mot sulfapreparater i denne studien. Coque et al., 1999 detekterte genen *dfrE* hos alle *E.faecalis* isolater. Studien antok at genen *dfrE* skyldes intrinsisk resistens hos denne bakterien. Vanligvis har enterokokker vist resistens mot trimetoprim in vitro. Aktiviteten til trimetoprim er usikkert når det kommer til Enterokokkslekten, og derfor er det ikke satt kliniske brytningspunkter av EUCAST (EUCAST, 2020). Coque et al., 1999 observerte høy resistensgrad hvor MIC-verdi var > 1.024 mg/L. I denne studien ble det observert en betydelig lavere MIC-verdi for denne bakteriestammen.

6.4.1.3 Resistens mot Tetracyklin

Genet *tetM* som koder for tetracyklinresistens er vidt distribuert i både Gram+ og Gram-bakterier (Chopra & Roberts, 2001). Opprinnelig stammer genen fra Gram+ slekter, og genen skyldes overføring av mobile genetiske elementer. Hos *E. faecalis* er genen oftest assosiert med transponerbare elementer av typen Tn916 (Garrido et al., 2014). Tetracykliner er et bredspektret antibiotikum som bindes til 30S på den ribosomale subenhet, og hemmer proteinsyntetisering (Burdett, 1991). Resistens kan skyldes ribosomal beskyttelse hvor proteinet EF-G sørger for translokasjon av tRNA, har lik aminosyresekvenslikhet med genen *tetM* (Burdett, 1991; Chopra & Roberts, 2001). *TetM* har tidligere blitt isolert fra *E.faecalis* i rått kyllingkjøtt i en dansk studie (Wilcks et al., 2005). Det er også blitt gjort funn av bakterien med genen i andre matvarer som ost, melk, fermentert melk og myseprodukter (Hummel et al., 2007). Samtidig har

overføringspotensialet av *tetM* mellom enterokokker blitt bekreftet, noe som har gitt indikasjoner på overføringspotensiale i samfunnet (Jahan et al., 2015). Det kunne vært interessant å gjennomføre sensitivitetstesting av bakteriestammen for å undersøke tilstedeværelsen av fenotypisk resistens mot tetracykliner.

6.4.1.4 Efflukspumper

Efflukspumper er vidt distribuert hos både Gram- og Gram+ bakterier (Fernández & Hancock, 2012). Pumper er involvert i å eksportere alt i fra desinfeksjon, metaller og antibiotika ut av cellen. De ulike genene *emeA*, *efrAB* og *lsa* som det ble gjort funn av i denne studien, har tidligere blitt karakterisert som efflukspumper hos *E.faecalis* (Lee et al., 2003a; Lee et al., 2003b; Singh et al., 2002). Det er foreslått over 30 potensielle multiresistente efflukspumper hos denne bakterien, hvorav tre pumper ble detektert i denne studien. *emeA* har vist resistens mot enkelte fluorokinoloner hos *E.faecalis* (Jonas et al., 2001). En annen multiresistent efflukspumpe som ble detektert i B38 var *efrA* og *efrB*. Sammen utgjør disse et heterodimerisk struktur som tilhører ATP-bindene kassettfamilie (ABC-transportør), og er blitt rapportert hos både *E.faecalis* og *E.faecium* (Sanchez Valenzuela et al., 2013). Det er blitt rapportert funn av genet isolert fra kliniske isolater hos pasienter med påvist urinveisinfeksjon (Shiadeh et al., 2019). Studien viste at *efrAB* ble isolert hos alle *E. faecalis*, og utøvde resistens mot flourokinoloner. Antimikrobiell sensitivitetstesting på B38 gav indikasjon på at *E. faecalis* var følsom for ciprofloksacin (fluorokinolon). Genet *Lsa* stammer trolig fra en ATP-bindene kassettfamilie, og har vist sekvenslikheter med andre efflukspumper (Singh et al., 2002). Det er fortsatt usikkert hvilken funksjon genet har ved tilstedeværelse hos en organisme. *Lsa* er ofte kromosombundet til arten *E. faecalis*, en iboende resistensmekanisme som utøver resistens mot linkosamider og streptogramin A.

En annen efflukspumpe detektert hos *E.faecalis* i denne studien var *mdtL*, også omtalt som *yidY* membran transportproteiner som tilhører MFS systemet (Li & Nikaido, 2016). Kloning av genet fra *E.coli* viste resistens mot det bredspektrede antibiotikumet kloramfenikol (Nishino & Yamaguchi, 2001). Det er tidligere blitt observert i avløpsanlegg, elvesedimenter (Fan et al., 2018; Li & Nikaido, 2016; Lu & Lu, 2020). Antimikrobiell sensitivitetstesting for kloramfenikol ble ikke tatt i denne studien, og resistens mot dette antibiotikumet kan ikke vurderes. *tmrB*, et gen som koder for resistens mot tunicamycin ble observert hos *E.faecalis*. Noda et al., 1995 mente at det fungerer som efflukspumpe som pumper ut tunicamycin ut av cellen, eller forhindrer ansamling av stoffet. Det er få studier som bekreftet tilstedeværelsen av

dette genet hos denne bakteriearten. Studier viser det hovedsakelig er observert hos *Bacillus subtilis* (Harada et al., 1988; Noda et al., 1992).

6.4.2 Antibiotikaresistens hos *Pseudomonas* spp.

Helgenomsekvensering av M40A og M40C gav utslag for flere anerkjente resistensgener. Derimot skilte M40 seg ut hvor det ble gjort funn av *ampC* (β -laktam), *aph(3'')-Ib* og *aph(6)-IId*, (aminoglykosidresistens), samt en rekke resistensgener som koder for antimikrobiell resistens mot bicyclomycin, bleomycin, fosminomycin og linearmycin. I tillegg ble det gjort funn av en rekke multiresistente efflukspumper.

For antibiotika sensitivtesting av mastittprøver ble det valgt ut tre antibiotikastrips med cefotaksim, cefepim og streptomycin. Samtidig ble fenotypisk resistens mot streptomycin inkludert. Ifølge EUCAST sine brytningspunkter for antibiotikaresistens viste mastittprøve M40A og M40M klinisk resistens mot streptomycin og cefotaksim. På bakgrunn av dette var det i utgangspunktet tiltenkt helgenomsekvensering av M40M. På grunn av den pågående pandemien av Covid-19 ble kun mastittprøver som allerede hadde blitt sendt inn til helgenomsekvensering inkludert i oppgaven. I tillegg til resistens mot streptomycin og cefotaksim i M40M, viste bakterien moderat følsomhet for cefepim, men i følge EUCAST er det usikkert hvilken terapeutisk effekt middelet har på bakteriestammen. Cefepim er et fjerde generasjons cefalosporin, som kun skal benyttes når andre antibakterielle behandlinger ikke fungerer på livstruende tilstander (Aukrust et al., 2016).

De fleste studier knyttet til virulens -og resistensforekomst hos slekten *Pseudomonas* spp. er studert hos *P.aeruginosa*. Den er en av bakteriene som WHO har trukket fram som kritisk viktige når det kommer til antibiotikaresistens (WHO 2017B). Både M40A og M40C, hadde en rekke gener assosiert med virulens -og resistensegenskaper som tidligere er blitt identifisert med denne arten. Det som er bekymringsfullt er når flere mekanismer er tilstede samtidig og utøver multiresistens mot flere typer antibiotikum (Strateva & Yordanov, 2009).

6.4.2.1 Resistens mot β -laktam

Prøve M40C som ble identifisert som *Pseudomonas* spp. ble det gjort funn av *ampC*-gen som koder for β -laktamase (Lodge et al., 1993). Genet befinner seg ofte kromosomalt iboende hos mange slekter i *Enterobacteriaceae* familien (Jacoby, 2009). AmpC β -laktamaser er klinisk viktig når det kommer til resistens mot β -laktam antibiotika, som blant annet inkluderer

penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer. Det skyldes i de fleste tilfeller overproduksjon av kromosomale ampC β -laktamaser (cefalosporinaser) (Strateva & Yordanov, 2009). Induksjon av ampC β -laktamaser kan skje ved eksponering for spesifikke antibiotika hos en bakterie (Jacoby, 2009). Penicillin, ampicillin, amoxicillin og cefalosporiner er sterkt induserbare. Cefotaksim og cefepime er noe svakt induserbare, men samtidig kan hydrolyse oppstå ved tilstrekkelig enzymproduksjon. Den enzymatiske aktiviteten til AmpC β -laktamaser inaktiverer penicilliner og 1-3 generasjons cefalosporiner.

For M40C ble det bekreftet høynivå resistens mot cefotaksim (3. generasjons cefalosporin). I tillegg ble det observert redusert mottakelighet for cefepim (4. generasjons cefalosporin). M40A stammer fra samme melkeprøve, men genet *ampC* ble ikke identifisert hos denne bakterieslekten. Om tilstedeværelsen av genet *ampC* har skyld i resistens mot cefalosporiner i denne studien er usikkert, da andre mekanismer som aktiverer *ampC* er nødvendig for å utøve resistens (Lodge et al., 1993; Nakano et al., 2017). NORMVET rapporterte resistens mot cefotaksim fra *E. coli* isolert fra sau (NORM/NORM-VET, 2018). Genotypiske resultat viste mutasjoner i *ampC*, og som trolig var en årsak til resistens mot cefalosporiner. Hvis tilstedeværelsen av *ampC* medfører utskillelse av β -laktamaser kan slekten *Pseudomonas* være motstandsdyktige mot både penicilliner og cefalosporiner (Livermore, 2002). Penicilliner er en av de mest brukte preparatet til behandling av mastittinfeksjoner hos norsk melkekyr (Statens legemiddelverk, 2012). Det kunne vært interessant og gjennomført antimikrobiell sensitivitetstesting mot penicilliner for denne bakteriestammen for å se hvilken effekt antibiotikumet har på mastittbakterien.

6.4.2.2 Resistens mot aminoglykosider

Aminoglykosid fosfotransferase, *aph(3'')-lb* og *aph(6)-ld*, også kjent som *strA-strB* (Shaw et al., 1993) ble identifisert i prøve M40C. Flere studier har konkludert med at genene *strA-strB* utøver resistens mot streptomyciner (Chiou & Jones, 1995; Sunde & Norström, 2005), og høynivåresistens er kun observert ved tilstedeværelse av både *strA* og *strB* i samme organisme (Alekseeva et al., 2019). Tilsvarende funn er observert i denne studien da fenotypiske resultater viste høygradig resistens (>1024 mg/L) mot streptomycin i samme organisme som hadde både *aph(3'')-lb* (*strA*) og *aph(6)-ld* (*strB*) tilstede.

Genene *strA-strB* har blitt betraktet som svært distribuerte i miljøet verden over (Chiou & Jones, 1993). Genkassetten er blitt identifisert på mobile elementer som plasmider, konjugative

transposoner og kromosomale genomiske øyer (Daly et al., 2005). *strA-strB* er ofte blitt rapportert hos Gram- bakterier fra mennesker, miljø og husdyr (Sundin & Bender, 1996). Genene har blitt isolert på små ikke-konjugative plasmider, hovedsakelig på RSF1010 isolert hos bakterieisolater fra mennesker og dyr (Sundin & Bender, 1996). På slike plasmider er *strA-strB* ofte koblet med gener som koder for resistens mot sulfonamider. Samtidig er *strA-strB* hyppig identifisert som en del av det konjugative transposonet Tn5393 hos bakterieisolater fra jord og planter (Sundin & Bender, 1996). Sundin og Bender, 1996 reflekterte med at tilstedeværelsen av *strA-strB* i konjugative plasmider, utvilsomt bidrar til overføring mellom mikrober i planter og jord. Fytopatogene *P. aeruginosa* som befinner seg naturlig i miljøet kan potensielt sørge for overføring fra planteoverflater til husdyr og andre organismer. I Norge har genkassetten Tn5393 blitt identifisert blant annet i bakterier fra fisk og honningbier (Ludvigsen et al., 2018; Trine & Sørum, 2000). Chiou og Jones, 1993 fant *strA-strB* genet fra fire planteassosierte slekter på store konjugative plasmider som lignet på Tn5393, men som ikke var koblet til gener som koder for sulfonamidresistens. Lignende er observert for denne studien, da det ikke ble observert andre gener relaterte til transposonet Tn5393 og plasmidet RSF1010. Derimot må det gjennomføres ytterligere undersøkelser for å stadfeste om *strA-strB* er plassert på de ovennevnte mobile elementene. Det er lite forskning som viser overføringen av *strA-strB* mellom planteassosierte bakterier, mennesker og dyr (Sundin & Bender, 1996). Genene har tidligere blitt detektert hos *E. coli* hos kyr i både Irland og England (Enne et al., 2008; Karczmarczyk et al., 2011). Genene *aph(3'')-lb* og *aph(6)-ld* kan potensielt overføres fra dyr til mennesker, eller fra dyr til miljøet (Sundin & Bender, 1996). Etersom disse genene ofte koblet til ikke-konjugative plasmider hos mennesker og dyr, kan mye tyde på at de er blitt overført fra bakterieisolater fra planter eller jord.

6.4.2.3 Efflukspumper

Efflukspumper er ofte en intrinsisk resistensmekanisme observert hos slekten *Pseudomonas* (Bassetti et al., 2018). Fire ulike efflukssystemer er identifisert hos denne arten, og disse er satt sammen av tre ulike proteintyper som befinner seg i den cytoplasmatiske membranen (MexB, MexD, MexF og MexY), en ytre membranpore (OprM, OprJ og OprN) og proteiner plassert i det ytre periplasmatiske rommet (MexA, MexC, MexE og MexY). Disse genene er ofte plassert i nærheten av hverandre og danner et operon forårsaket av kromosomale mutasjoner (Strateva & Yordanov, 2009). MexAB-OprM og MexEF-OprN systemet ble observert i begge mastittprøvene. Felles for disse er at de kan være involvert i ervervet resistens mot kinoloner (Bassetti et al., 2018). MexAB-OprM kan i tillegg være en iboende resistensmekanisme som

utøver motstand mot β -laktamer, makrolider, tetracykliner og kloramfenicol hos *Pseudomonas*. Livermore, 2002 illustrerte positiv korrelasjon mellom efflukspumpesystemet MexAB-OprM og aminoglykosidresistens. Genet *cpxR* er et transkripsjonsprotein som sørger for ekspresjon av efflukspumpen MexAB-OprM (Tian et al., 2016). Det andre effluksystemet MexEF-OprN utøver i tillegg resistens mot karbapenemer, og skyldes i de fleste tilfeller ervervet resistens (Bassetti et al., 2018). Genet *mexD*, er en cytoplasmatisk efflukspumpe observert i bakteriestammen fra prøve M40C, men dens tilhørende *mexC* og *oprJ* operon for dannelsen av en tre komponentspumpe manglet. Samtidig ble det gjort funn av MexJK, som koder for multiresistent efflukspumpe. Dette systemet krever en ytre membranprotein av typen *oprM* for å utøve resistens mot ciprofloksacin, tetracyklin og erytromycin (Chuanchuen et al., 2002). Hvis det ytre membranproteinet *opmH* danner en trekomponentsefflukspumpe med MexJK, kan organismen pumpe ut biocidet triclosan (Chuanchuen et al., 2005). Etersom både *OpmH* og *oprM* ble observert i prøve M40C, kan mye tyde på resistens mot biocider og flere klasser av antibiotika.

Genet *pmpM* ble identifisert i begge bakteriestammer i M40A og M40C. Genet koder for effluksmediert H⁺ antiporter som tilhører MATE-familien. Proteinet er vist seg å være ansvarlig for å pumpe ut fluorokinoloner og en rekke desinfeksjonsmidler (He et al., 2004). EmrAB komplekset ble kun detektert hos M40C, og *emrB* hos M40A. *emrB*, som er selve avløpspumpen kan danne dimerkompleks med det periplasmatiske proteinet *emrA*. Komplekset er ofte assosiert med genet *tolC*, som danner et trepartssystem hos *E. coli* (Tanabe et al., 2009). Men lignende er også observert hos *A. Baumannii* (Lin et al., 2017). EmrAB pumpesystem utøver resistens mot colistin (polymyxin E). I det 20 århundre har middelet blitt brukt som siste linje behandling for infeksjoner forårsaket multiresistente Gram- bakterier, spesielt hos *P. aeruginosa* (Nation & Li, 2009).

En annen multiresistent efflukspumpe identifisert hos begge *Pseudomonas* slekter i denne studien var genene, *mdtA*, *mdtB* og *mdtC* som danner et operon. Efflukspumpen er en anerkjent iboende resistensmekanisme hos Gram- bakterier (Górecki & McEvoy, 2020; Perreten et al., 2001). Pumpen består av en heterodimer (*mdtB* og *mdtC*), og begge er nødvendig for å utøve dens funksjon. Når genene er tilstede hos en bakterie kan både metaller og stoffer med hydrofile og hydrofobe egenskaper skilles ut av cellen når mdtABC er tilstede. Ekspresjon av genet *mdtA* i *Lactococcus lactis* og *E. coli* gav redusert følsomhet for makrolider, linkosamider, tetracykliner og streptograminer (Nagakubo et al., 2002). Men det hadde ingen effekt hos

E.faecalis. For at mdtABC effluksproteinene skal utøve sin funksjon, må genet *tolC* befinne seg i cellemembranen. Det gjelder også *mdtE* og *mdtK* som begge ble identifisert i *M40C*. *mdtE*, som sammen med genet *mdtF* er en multiresistens efflukspumpe. *mdtEF* blir uttrykt under normale forhold, men regulert ved ekspresjon av histon-lignende nukleotid proteiner (Nishino & Yamaguchi, 2001).

6.4.3 Annen resistens

6.4.3.1 Metaller

Bekymringen for at forurensning av metaller kan fungere som et selektivt middel i spredning av antibiotikaresistens i miljøet er økende (Baker-Austin et al., 2006). Ansamling av tungmetaller i vann, jord og bunnsedimenter i landbruket kan forårsake langsiktig seleksjonstrykk (Baker-Austin et al., 2006; Wales & Davies, 2015). Når de samme genetiske resistensdeterminanter er lokalisert på samme genetiske element kan det oppstå kryssresistens (Baker-Austin et al., 2006). Selv om metaller er giftige i store mengder, er noen essensielle i små mengder. En rekke gener som koder for resistens mot zink, kobolt, kobber, arsen og kvikksølv ble identifisert hos *Pseudomonas* spp. En efflukspumpe involvert i utpumping av flere metaller er CzcCBA-systemet (Cánovas et al., 2003). Det danner en energiavhengig membranbundet pumpe som fjerner kadmium, kobolt og zink fra cellen (Rensing et al., 1997).

Genet *yycJ*, også omtalt som *walJ* har tidligere blitt sett på *walRK* operonet hos blant annet bakteriearter som *Streptococcus*, *S.aureus*, *E.faecalis*, *Listeria monocytogenes* og *B.subtilis* (Dubrac et al., 2008). *Yycj* er klassifisert som en metallo- β -laktamase, som er kjent for å hydrolysere β -laktam antibiotika. Derimot er det ikke bestemt hvilken funksjon *Yycj* har på bakterien. En studie vurderte om genet bidrar i syntetisering av celleveggen hos bakterien *B. Subtilis* (Biller et al., 2011). Når genet ikke var tilstede hos organismen viste det økt følsomhet for cefalosporiner. Det kan forklare cefotaksim- og cefepimresistens som ble observert ved antimikrobiell sensitivitetstesting for B38. Det ble ikke identifisert andre gener som kan knyttes til cefalosporinresistens hos denne organismen. Det ble også gjort funn av *acr3* og *arsD*, to gener som koder for arsenresistens. Arsen er et giftig metall, som forårsaker forurensinger i miljøet (Kaur et al., 2011). *E.coli* og *Saccharomyces cerevisiae* har mekanismer som kan degradere arsen. *acr3* genet koder for plasmidmediert efflukspumpe som ekstruderer arsenitt fra cellen (Rosen, 1999). Forskning viser at *acr3* genet har blitt isolert fra jordbakterier (Achour et al., 2007). Horisontal genoverføring har blitt oppdaget i arsenkontaminerte jordområder (Cai

et al., 2009). Derimot er det lite forskning som viser sammenhengen mellom *acr3* og *arsD*. Sistnevnte er en transkripsjonsrepressor som ofte er befinner seg i kromosomet hos Gram-bakterier (Rosen, 1999). Tidligere funn viser at metaller som kobber og sink har marginal effekt på antimikrobiell resistens i fekale bakterieisolater fra kyr (Jacob et al., 2010). I tillegg til resistens mot metaller, kan også andre toksiske stoffer som desinfeksjonsmidler utvikle resistens.

6.4.3.2 Desinfeksjonsresistens

Hygienisk praksis har vært en forutsetning for å spredning av resistente mikrober i ulike miljøer. Biocider benyttes til desinfisering av utstyr og overflate for bekjempelse av uønskede mikrober i produksjonsmiljø, sykehus og gårdsbruk. Mikroorganismer kan tilpasse seg desinfeksjonsmidler når subletale konsentrasjoner er igjen på overflaten etter desinfisering (Heir et al., 1999). Fremveksten av mikroorganismer som har tilpasset seg desinfeksjonsmidler legger en enda større belastning for kontroll -og behandling av infeksjoner (Wand, 2017).

Prøve fra friske melkekyr viste ingen gener som var assosiert med desinfeksjonsresistens. Derimot hadde *Pseudomonas* spp. gener som koder for resistens mot hydrogenperoksid (H₂O₂) og kvartære ammoniumforbindelser (QAC). Gram- bakterier har generelt en økt resistens mot biocider på grunn av dens ytre cellemembran (Wand, 2017). Begge bakteriestammene som befant seg i prøve M40A og M40C hadde gener (*ohr*) som koder for organisk resistens mot hydrogenperoksid (Fuangthong et al., 2001). Hydrogenperoksid er mye brukt på sykehus mot Gram+ bakterier (Wand, 2017). Samme mekanismer er tidligere blitt identifisert hos *B. subtilis* (Fuangthong et al., 2001). På grunn av en rekke efflukspumper hos slekten *Pseudomonas* er de spesielt resistente mot desinfeksjonsmidler (Wand, 2017). Overekspresjon i efflukspumpen MexAB-OprM og MexEF-OprN kan medføre at benzalkoniumklorid pumpes ut av cellen. For M40C, *Pseudomonas* spp. ble det observert en efflukspumpe (*qacG*) som koder for resistens mot benzalkoniumklorid. Et kvartært ammonium desinfeksjonsmiddel som benyttes som desinfisering i næringsmiddelindustrien (Heir et al., 1999). QAC er en av de mest brukte desinfeksjonsmidlene, og resistens mot dette kan gi kryssresistens mot andre biocider og antibiotika med klinisk relevans (Tronsmo et al., 2016). En studie viste at bakteriestammer som ble eksponert for benzalkoniumklorid, og ikke var bærer av *qacG*-genet måtte indusere andre resistensmekanismer. En studie identifiserte *qacG* genet lokalisert på plasmider hos multiresistente stafylokokkisolater i melk fra norske kyr (Bjorland et al., 2005). En

Pseudomonas art som er kjent for å være motstandsdyktige mot kvartære ammonium forbindelser er *P. aeruginosa*. Det skyldes trolig den manglende evnen QAC har til å trenge inn i den ytre membranen.

6.5 Relevans av funn

Norge er et av landene som anvender minst antibiotika til dyr, og det reflekteres i resistensforekomsten i norsk husdyrproduksjon (Animalia, 2017; NORM/NORM-VET, 2018). Denne studien kan bekrefte lav forekomst av antimikrobiell resistens i bakterieisolater fra melk hos friske kyr. Til tross for dette, ble det identifisert bakterier med genotypisk og fenotypisk resistens mot flere antibiotikum i melkeisolater fra både friske, og kyr med påvist mastitt. Kontinuerlig forebygging for å redusere forbruket av antibiotika hos norske melkekyr er en forutsetning for at den gunstige situasjonen skal vedvare. I tillegg vil det være viktig å hindre spredning og etablering av de aktuelle isolatene i samfunnet og helsesituasjoner, for å unngå ytterligere reduserte behandlingsalternativer ved bakterielle infeksjoner.

I denne studien viste *E.faecalis* som befant seg i melkeprøve B38 resistens mot cefotaksim, cefepim, amikacin, gentamicin og streptomycin som utgjør resistens mot to klasser av antibiotika. Cefotaksim, gentamicin, og amikacin er ett av de antibiotikatyperne som blir ansett på essensielle innen humanmedisin (WHO, 2019b). Enterokokker viser ofte iboene resistensmekanismer mot både cefalosporiner og aminoglykosider (Giraffa, 2002). Hvis mikroben skulle føre til infeksjon som krever antibiotika hos mennesker eller dyr ville verken cefepim eller cefotaksim vært effektive behandlingsalternativer, da de ikke egner seg på følgende bakterie (EUCAST, 2020). Enterokokker isolert fra næringsmidler er ikke en direkte årsak til resistens hos enterokokker med klinisk relevans (Giraffa, 2002). Det som kan være bekymringsfullt er hvis *E.faecalis* som befant seg i melkeprøven sprer resistensgener via HGT til andre kliniske isolater, eller erverver resistensdeterminanter fra andre resistente mikrober. Det er en sannsynlighet for at *E.faecalis* er en multiresistent mikrobe ettersom genotypiske metoder indikerte resistens mot tetracyklin og trimetoprim. Enterokokker utgjør en spesiell bekymring når det kommer til spredning av resistensgener, da de er såpass utbredt i miljøet. Melk fra friske kyr blir levert til meierianlegg for produksjon av konsummilk, eller andre meieriprodukter. Hele veien fra der innhenting av melk på gård med tankbil fram til råstoffet er varmebehandlet i meieriet kan utgjøre en risiko for kontaminering til omgivelsene. Potensielt kan *E.faecalis* forårsake horisontal spredning av resistensdeterminanter til andre mikrober som

befinner seg i melken. Dersom det ikke er optimal rengjøring av anlegg kan virulensgener som ble identifisert i denne mikroben bidra til dannelsen av biofilm, som utgjør en fare for deling av resistensgener mellom bakterier (Baker-Austin et al., 2006).

Pseudomonas spp. kan potensielt være en opportunistisk humanpatogen organisme (De Bentzmann & Plésiat, 2011). Denne mikroben som befant seg i prøve M40C utøvde resistens mot streptomycin og cefotaksim, som utgjør to av tre antibiotikaklasser det ble testet for. Illumina MiSeq viste gener som koder for aminoglykosidresistens på mobile genetiske elementer, som vil utgjøre en risiko for spredning mellom mikrober i dyrebesetningen, i miljøet eller hos mennesker. Tilstedeværelsen av *ampC* lignende gen som koder for resistens mot β -laktam, tilsier at organismen trolig kunne utøvd resistens mot andre β -laktam antibiotika i klassen penicilliner eller karbapenemer. Ettersom de fleste mastittinfeksjoner behandles med benzylpenicillin (penicillin G), er det en sannsynlighet for at antibiotikumet ikke ville hatt noen effekt. Når kyr med påvist klinisk mastitt behandles med antibiotika, så skal ikke melken gå til meierianlegg for konsummelk. Dermed vil potensielle spredningsfare være i fjøsmiljøet, og blant andre dyr og mennesker befinner seg tett på det syke dyret. *Pseudomonas* spp. som befant seg i prøve M40C hadde en rekke virulensmekanismer som kunne sørget for adhesjon og kolonisering av menneskelig vev. Hvis mennesker blir syke av bakterien, vil ikke streptomycin eller cefotaksim være effektiv behandling for denne organismen. Når organismen i tillegg viser resistens mot en rekke desinfeksjonsmidler, vil det trolig utgjøre en enda større belastning for matindustrien, helsevesenet og i veterinære sammenheng. Ettersom begge mastittprøvene viste resistens mot en rekke desinfeksjonsmidler som QAC og H₂O₂. Hvis resistens mot desinfeksjon er en økende trend hos mikrober, vil det medføre en ytterligere utfordring i bekjempelsen av antibiotikaresistens globalt.

6.6 Forslag til veien videre

For å øke kunnskapen om forekomsten av resistente bakterier i norsk produserte næringsmidler bør arbeidet med screening i melk fra norske kyr fortsette. Samtidig kunne det vært interessant å gjennomføre flere forsøk med prøver fra fjøsmiljøet eller hos mennesker som jobber tett med dyrene, for å se hvilken sammenheng det har med de bakterieisolatene som ble identifisert i denne oppgaven. For å forstå spredningspotensialet for *Pseudomonas* spp. og *E.faecalis*, kan det være aktuelt å gjennomføre flere molekylærbiologiske metoder for å se om resistensgenene er lokalisert på kromosom, eller på mobile elementer. I tillegg kunne det vært betydningsfullt å se undersøke overføringspotensiale mellom nært beslektede mikrober, eller hos andre slekter.

I denne studien kunne det vært aktuelt å gjennomføre sensitivitetstesting mot flere klasser av antibiotika, for å koble fenotypisk resistens med genotypiske analyser. Det gjelder hovedsakelig *Pseudomonas* spp. som kun ble testet for to ulike klasser. Det kunne vært interessant å gjennomføre sensitivitetstesting mot penicilliner, ettersom det benyttes for behandling av mastittinfeksjoner. Som tiltenkt burde prøvene som ble screenet for ampicillin -og penicillinresistens i buljong blitt undersøkt videre med genotypiske analyser for å identifisere årsaken til vekst. Videre kunne det vært interessant å se om prøve M40M hadde de samme resistensgenene som ble identifisert i M40C.

7. Konklusjon

Denne studien viste lav forekomst av antibiotikaresistens hos melkeisolater fra friske kyr fra Ås-gård. Allikevel ble det identifisert resistente bakterieisolater i melkeprøver fra både friske kyr, og hos kyr med påvist mastittinfeksjon. Fenotypisk og genotypisk resistens mot aminoglykosider og tredje generasjons cefalosporiner ble identifisert i begge bakteriestammer. Dette er antibiotika som blir ansett som kritisk viktige innen humanmedisin, og resistens mot disse bidrar til reduserte behandlingsalternativer. Funn av resistens mot desinfeksjon -og metaller kan være potensielle agenser for ko- og kryssresistens som kan fremme multiresistente bakterier. Fremveksten av mikrober som er resistente mot desinfeksjonsmidler vil medføre en ytterligere belastning for næringsmiddelindustrien og helsesektoren i bekjempelsen av resistente mikrober.

Tilstedeværelsen av mobile genetiske elementer som ble identifisert i bakterieisolatet fra mastittmelk kan potensielt forflyttes via horisontal genoverføring til andre mikrober i melken, fjøsmiljøet eller blant andre dyr i besetningen. Således vil melk være en potensiell årsak til spredning av resistens på tvers av ulike miljø. Dersom resistente bakterier får fotfeste i norske melkebesetninger kan det bidra til reduserte behandlingsalternativer av mastittinfeksjoner hos melkekyr. Studien illustrerer behovet for ytterligere forskning av antimikrobiell resistens for å forstå hvilken rolle den norske matkjeden har i spredning av antibiotikaresistens i Norge.

Litteraturliste

- Achour, A. R., Bauda, P. & Billard, P. (2007). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in microbiology*, 158 (2): 128-137.
- Addis, M., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies. *Molecular bioSystems*, 12 (8): 2359-2372.
- Alekseeva, M. G., Boyko, K. M., Nikolaeva, A. Y., Mavletova, D. A., Rudakova, N. N., Zakharevich, N. V., Korzhenevskiy, D. A., Ziganshin, R. H., Popov, V. O. & Danilenko, V. N. (2019). Identification, functional and structural characterization of novel aminoglycoside phosphotransferase APH (3 ")-Id from *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. *Archives of biochemistry and biophysics*, 671: 111-122.
- Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128 (6): 1037-1050.
- Ali, L., Goraya, M. U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.-L. & Yu, D. (2017). Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: its role in virulence and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 18 (5): 960.
- Almeida, M. D. (2017). *Roche doubles down in Fight against Antibiotic Resistance*. Labiotech. Tilgjengelig fra: <https://www.labiotech.eu/medical/roche-discuva-bacterial-resistance/> (lest 28.05.20).
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289 (1036): 321-331.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1: 134.
- Angulo, F., Nargund, V. & Chiller, T. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51 (8-9): 374-379.
- Animalia. (2017). *Husdyrnæringas felles handlingsplan mot antibiotikaresistente bakterier*. Animalia. Tilgjengelig fra: <https://www.animalia.no/contentassets/7449306a50344bd4ba69c4d71af51f07/husdyrnaringas-felles-handlingsplan-mot-antibiotikaresistente-bakterier.pdf> (lest 15.05.20).
- Arias, C. A. & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10 (4): 266-278.
- Ariza-Miguel, J., Oniciuc, E.-A., Sanz, I., Fernández-Natal, I., Hernández, M. & Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Evaluation of two commercially available chromogenic media for confirmation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from human, animal, and food samples. *International journal of food microbiology*, 209: 26-28.
- Aukrust, P., Hoe, T., Jensenius, M., Kvale, D., Lingaas, E. & Simonsen, G. S. (2016). *L1 Antimikrobielle midler*. Norsk legemiddelhandbok. Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelhandboka.no/L1.1/Om_bruk_av_antimikrobielle_midler (lest 03.05.2020).
- Ayers, M., Sampaleanu, L., Tammam, S., Koo, J., Harvey, H., Howell, P. & Burrows, L. (2009). PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the

- stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *Journal of molecular biology*, 394 (1): 128-142.
- 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.
- Baquero, F., Martínez, J.-L. & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19 (3): 260-265.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E. & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7.
- Bengtsson, B. & Wierup, M. (2006). Antimicrobial resistance in Scandinavia after a ban of antimicrobial growth promoters. *Animal biotechnology*, 17 (2): 147-156.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E. & Larsson, D. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 42 (1): fux053.
- Biller, S. J., Wayne, K. J., Winkler, M. E. & Burkholder, W. F. (2011). The putative hydrolase YycJ (WalJ) affects the coordination of cell division with DNA replication in *Bacillus subtilis* and may play a conserved role in cell wall metabolism. *Journal of bacteriology*, 193 (4): 896-908.
- Bio-Rad. (2016). *Selective and differential chromogenic culture medium for the isolation and direct identification of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Tilgjengelig fra: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/63757_2016_03_EN.pdf (lest 15.05.20).
- Bisht, S. S. & Panda, A. k. (2013). DNA Sequencing: Methods and Applications. I: *Advances in Biotechnology*, s. 11-21. Springer.
- Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M. & Heir, E. (2005). Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (9): 4363-4368. doi: 10.1128/jcm.43.9.4363-4368.2005.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13 (1): 42-51.
- Blowey, R. W. & Edmondson, P. (2010). *Mastitis control in dairy herds*: Cabi.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (1): 1-14.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14 (4): 933-951.
- Buermans, H. & Den Dunnen, J. (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842 (10): 1932-1941.
- Burdett, V. (1991). Purification and characterization of Tet (M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (5): 2872-2877.

- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8 (7): 1137-1144.
- Cai, L., Liu, G., Rensing, C. & Wang, G. (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC microbiology*, 9 (1): 4.
- Cánovas, D., Cases, I. & De Lorenzo, V. (2003). Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environmental Microbiology*, 5 (12): 1242-1256.
- Cantón, R. & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current opinion in pharmacology*, 11 (5): 477-485.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. & Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52 (2): 159-161.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B. & Cecchini, M. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19 (1): 56-66.
- CBD. (2019). *Repair Your Body's Good Bacteria After Antibiotics Destroys Both Good & Bad Bacteria*. Tilgjengelig fra: <https://legalcbdoilidaho.com/good-bacteria-after-antibiotics/> (lest 03.05.2020).
- Chandrasekaran, D., Venkatesan, P., Tirumurugaan, K., Nambi, A., Thirunavukkarasu, P., Kumanan, K., Vairamuthu, S. & Ramesh, S. (2014). Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. *Veterinary World*, 7 (6).
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B. & Dewulf, J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (3): 827-834.
- Chen, I. & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (3): 241-249.
- Chen, L., Zou, Y., She, P. & Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, 172: 19-25.
- Chen, M., Pan, H., Lou, Y., Wu, Z., Zhang, J., Huang, Y., Yu, W. & Qiu, Y. (2018). Epidemiological characteristics and genetic structure of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*. *Infection and drug resistance*, 11: 2397.
- Chiou, C. & Jones, A. (1993). Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 175 (3): 732-740.
- Chiou, C.-S. & Jones, A. (1995). Expression and identification of the strA-strB gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. *Gene*, 152 (1): 47-51.
- Choi, J.-M. & Woo, G.-J. (2013). Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *International journal of food microbiology*, 165 (1): 1-6.

- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 (2): 232-260.
- Chow, J. W. (2000). Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical Infectious Diseases*, 31 (2): 586-589.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. & Schweizer, H. P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol*, 184 (18): 5036-44. doi: 10.1128/jb.184.18.5036-5044.2002.
- Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N. & Schweizer, H. P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (5): 2133-6. doi: 10.1128/aac.49.5.2133-2136.2005.
- Citak, S., Yucel, N. & Mendi, A. (2005). Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. *Journal of food processing and preservation*, 29 (3-4): 183-195.
- Coque, T. M., Singh, K. V., Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (1999). Characterization of Dihydrofolate Reductase Genes from Trimethoprim-Susceptible and Trimethoprim-Resistant Strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (1): 141-147.
- Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology*, 165 (5): 503-515.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38 (7): 1447.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, 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. *J Antimicrob Chemother*, 65 (3): 490-5. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- Daly, M., Villa, L., Pezzella, C., Fanning, S. & Carattoli, A. (2005). Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (4): 558-561.
- Damron, F. H. & Hongwei, D. Y. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* MucD regulates the alginate pathway through activation of MucA degradation via MucP proteolytic activity. *Journal of bacteriology*, 193 (1): 286-291.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74 (3): 417-433.
- De Bentzmann, S. & Plésiat, P. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental microbiology*, 13 (7): 1655-1665.
- Del Campo, R., Tenorio, C., Rubio, C., Castillo, J., Torres, C. & Gómez-Lus, R. (2000). Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. *International journal of antimicrobial agents*, 15 (3): 221-226.
- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., Plaizier, J. C. & Khafipour, E. (2018). Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of dairy science*, 101 (12): 10605-10625.

- Doyle, M. P., Busta, F., Cords, B. R., Davidson, P. M., Hawke, J., Hurd, H. S., Isaacson, R. E., Matthews, K., Maurer, J. & Meng, J. (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system: an expert report, funded by the IFT foundation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5 (3): 71-137.
- Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K. M. & Msadek, T. (2008). A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Molecular microbiology*, 70 (6): 1307-1322.
- Duval, R. E., Grare, M. & Demoré, B. (2019). Fight against antimicrobial resistance: we always need new antibacterials but for right bacteria. *Molecules*, 24 (17): 3152.
- Enne, V. I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M. J. & Bennett, P. M. (2008). A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiology Letters*, 278 (2): 193-199.
- EUCAST. (2020). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* Version 10.0.
- EURL-AR. (2012). *Protocol for PCR amplification of mecA, mecC, spa and pvl*. 2 utg. (lest 17.03.20).
- Fan, X.-Y., Gao, J.-F., Pan, K.-L., Li, D.-C., Dai, H.-H. & Li, X. (2018). Functional genera, potential pathogens and predicted antibiotic resistance genes in 16 full-scale wastewater treatment plants treating different types of wastewater. *Bioresource technology*, 268: 97-106.
- FDA. (2018). *Summary Report on Antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals*.: U.S. Food & Drug administration. Center for veterinary medicine.
- Fernández, L. & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 25 (4): 661-681.
- Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. & Tomas, M. (2016). Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins*, 8 (7): 227.
- Finton, M. D. (2020). Upublisert manuskript.
- Folkehelseinstituttet. (2014). *Generelt om MRSA*: Folkehelseinstituttet Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/generelt-om-mrsa/> (lest 04.05.2020).
- Folkehelseinstituttet. (2019). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veiledere for helsepersonell*. FHI. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/> (lest 03.05.2020).
- Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J. & Holzappel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (9): 4385-4389.
- 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.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133 (3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1.

- Garmo, R. T., Waage, S., Sviland, S., Henriksen, B. I., Østerås, O. & Reksen, O. (2010). Reproductive performance, udder health, and antibiotic resistance in mastitis bacteria isolated from Norwegian Red cows in conventional and organic farming. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52 (1): 11.
- Garrido, A. M., Gálvez, A. & Pulido, R. P. (2014). Antimicrobial resistance in enterococci. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews*, 26 (2): 163-171.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Canton, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1): 1-4.
- Górecki, K. & McEvoy, M. M. (2020). Phylogenetic analysis reveals an ancient gene duplication as the origin of the MdtABC efflux pump. *PloS one*, 15 (2): e0228877.
- Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B. & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clinical infectious diseases*, 53 (1): 60-67.
- Haiko, J. & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2 (4): 1242-1267.
- Haldorsen, B. & Samuelsen, Ø. (2012). Multiresistente Gram-negative bakterier-et økende globalt helseproblem.
- Harada, K. & Asai, T. (2010). Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in Escherichia coli from food-producing animals in Japan. *BioMed Research International*, 2010.
- Harada, S., Yoda, K., Mori, M., Tanimoto, A., Furusato, T., Yamane, K., Takatsuki, A., Yamasaki, M. & Tamura, G. (1988). The Gene Responsible for Tunicamycin Resistance, tmrB, in Bacillus subtilis. *Agricultural and biological chemistry*, 52 (7): 1785-1789.
- Hayes, C. S. & Sauer, R. T. (2003). Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators? *Cell*, 112 (1): 2-4.
- He, G.-X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (2004). An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from Pseudomonas aeruginosa. *Journal of bacteriology*, 186 (1): 262-265.
- Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. (1999). The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of applied microbiology*, 86 (3): 378-388.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G. & Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23 (3): 504-511.
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2001). Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function. *Journal of bacteriology*, 183 (18): 5395-5401.
- Heritage, J., M'Zali, F. H., Gascoyne-Binzi, D. & Hawkey, P. M. (1999). Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 44 (3): 309-318.

- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (1): 15-25. doi: 10.1038/nrmicro2259.
- Hollenbeck, B. L. & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3 (5): 421-569.
- Hummel, A., Holzapfel, W. H. & Franz, C. M. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and applied microbiology*, 30 (1): 1-7.
- Huovinen, P. (1997). Increases in rates of resistance to trimethoprim. *Clinical infectious diseases*, 24 (1): 63-66.
- IACG. (2019). *No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections: Report to the Secretary-General of the United Nations* Washington.
- Illumina Inc. (2017). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. Tilgjengelig fra: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (lest 04.05.20).
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H. & Brow, M. A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 (24): 9436-9440. doi: 10.1073/pnas.85.24.9436.
- Jackson, C., Lombard, J., Dargatz, D. & Fedorka-Cray, P. (2011). Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *Letters in applied microbiology*, 52 (1): 41-48.
- Jacob, M. E., Fox, J. T., Nagaraja, T., Drouillard, J. S., Amachawadi, R. G. & Narayanan, S. K. (2010). Effects of feeding elevated concentrations of copper and zinc on the antimicrobial susceptibilities of fecal bacteria in feedlot cattle. *Foodborne pathogens and disease*, 7 (6): 643-648.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22 (1): 161-182.
- Jahan, M., Zhanel, G. G., Sparling, R. & Holley, R. A. (2015). Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *International journal of food microbiology*, 199: 78-85.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45 (9): 2761-4. doi: 10.1128/jcm.01228-07.
- 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.
- Jonas, B. M., Murray, B. E. & Weinstock, G. M. (2001). Characterization of *emeA*, *anrA* Homolog and Multidrug Resistance Efflux Pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (12): 3574-3579.
- Joste, V., Gydé, E., Toullec, L., Courboulès, C., Yasmina, T., Riverain-Gillet, E., Pangon, B. & Amara, M. (2019). *Enterococcus faecium* and ampicillin susceptibility

- determination: overestimation of resistance with disk diffusion method using ampicillin 2 µg. *Journal of clinical microbiology*.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33 (3): 300.
- Karczmarczyk, M., Walsh, C., Slowey, R., Leonard, N. & Fanning, S. (2011). Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (20): 7121-7127.
- Kaur, S., Kamli, M. R. & Ali, A. (2011). Role of arsenic and its resistance in nature. *Canadian journal of microbiology*, 57 (10): 769-774.
- Kemp, K. D., Singh, K. V., Nallapareddy, S. R. & Murray, B. E. (2007). Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *bps* (*srtC*), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infection and immunity*, 75 (11): 5399-5404.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (6): 423-435.
- Kolář, M., Urbánek, K. & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 17 (5): 357-363.
- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgeresson, C., Weijdegård, B., Söderström, H. & Larsson, D. J. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PloS one*, 6 (2).
- Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*, 57 (10): 1486-1513.
- Käppli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., Nüesch-Inderbinen, M. & Stephan, R. (2019). Sequence types and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Frontiers in veterinary science*, 6: 234.
- La Rosa, S. L., Montealegre, M. C., Singh, K. V. & Murray, B. E. (2016). *Enterococcus faecalis* Ebp pili are important for cell-cell aggregation and intraspecies gene transfer. *Microbiology*, 162 (5): 798.
- Lee, E.-W., Chen, J., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (2003a). Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26 (2): 266-270.
- Lee, E.-W., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (2003b). EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (12): 3733-3738.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (62): e3923.
- Levy, S. B. & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10 (12): 122-129.
- Li, X.-Z. & Nikaido, H. (2016). Antimicrobial Drug Efflux Pumps in *Escherichia coli*. I: *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria*, s. 219-259: Springer.

- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y. & Lan, C.-Y. (2017). Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology*, 55 (2): 130-136.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical infectious diseases*, 34 (5): 634-640.
- Livermore, D. M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J. & Norrby, R. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66 (9): 1941-1944.
- Lobanovska, M. & Pilla, G. (2017). Focus: Drug Development: Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale journal of biology and medicine*, 90 (1): 135.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R. & García-del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS microbiology reviews*, 40 (5): 592-609.
- Lodge, J., Busby, S. & Piddock, L. (1993). Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa* ampR gene and its role at the chromosomal ampC β -lactamase promoter. *FEMS microbiology letters*, 111 (2-3): 315-319.
- Lu, X.-M. & Lu, P.-Z. (2020). Seasonal variations in antibiotic resistance genes in estuarine sediments and the driving mechanisms. *Journal of hazardous materials*, 383: 121164.
- Ludvigsen, J., Amdam, G. V., Rudi, K. & L'Abée-Lund, T. M. (2018). Detection and characterization of streptomycin resistance (strA-strB) in a honeybee gut symbiont (*Snodgrassella alvi*) and the associated risk of antibiotic resistance transfer. *Microbial ecology*, 76 (3): 588-591.
- Madden, T. (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool. I: b. 2 *The NCBI Handbook*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US);
- 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.
- 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.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, 56 (1): 289-314.
- Matuschek, E., Brown, D. F. J. & Kahlmeter, G. (2014a). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (4): O255-O266. doi: 10.1111/1469-0691.12373.
- Matuschek, E., Brown, D. F. J. & Kahlmeter, G. (2014b). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (4): 255-266. doi: 10.1111/1469-0691.12373.
- McAuley, C. M., Britz, M. L., Gobius, K. S. & Craven, H. M. (2015). Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *Journal of dairy science*, 98 (12): 8348-8358.

- Medeiros, A. A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 19-45.
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*: 481-511.
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2002). The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of Escherichia coli via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *Journal of bacteriology*, 184 (15): 4161-4167.
- Nakano, R., Nakano, A., Yano, H. & Okamoto, R. (2017). Role of AmpR in the High Expression of the Plasmid-Encoded AmpC β -Lactamase CFE-1. *mSphere*, 2 (4). doi: 10.1128/mSphere.00192-17.
- NanoDrop Technologies, I. (2007). *260/280 and 260/230 Ratios. NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington, Delaware USA. Tilgjengelig fra: https://biosci-batzerlab.biology.lsu.edu/Genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf (lest 30.03.20).
- Nation, R. L. & Li, J. (2009). Colistin in the 21st century. *Current opinion in infectious diseases*, 22 (6): 535.
- Nguyen, B.-A. T., Chen, Q.-L., He, J.-Z. & Hu, H.-W. (2019). Microbial regulation of natural antibiotic resistance: Understanding the protist-bacteria interactions for evolution of soil resistome. *Science of The Total Environment*: 135882.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78: 119-146.
- Nishino, K. & Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 183 (20): 5803-5812.
- Noda, Y., Yoda, K., Takatsuki, A. & Yamasaki, M. (1992). TmrB protein, responsible for tunicamycin resistance of Bacillus subtilis, is a novel ATP-binding membrane protein. *Journal of bacteriology*, 174 (13): 4302-4307.
- NORM/NORM-VET. (2018). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway, 1890-9965*. Tromsø / Oslo 2019.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Molecular microbiology*, 30 (2): 295-304.
- Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H. & Bicalho, R. C. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PloS one*, 7 (10).
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E. & Larsson, D. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC genomics*, 16 (1): 964.
- Park, H., Hong, M., Hwang, S., Park, Y., Kwon, K., Yoon, J., Shin, S., Kim, J. & Park, Y. (2014). Characterisation of Pseudomonas aeruginosa related to bovine mastitis. *Acta Veterinaria Hungarica*, 62 (1): 1-12.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18 (4): 657-686.

- Paterson, G. K., Harrison, E. M. & Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 22 (1): 42-47.
- Peacock, S. J. & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual review of biochemistry*, 84.
- Perreten, V., Schwarz, F. V., Teuber, M. & Levy, S. B. (2001). Mdt (A), a New Efflux Protein Conferring Multiple Antibiotic Resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45 (4): 1109-1114.
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (1): 1-11.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V. & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of dairy science*, 87 (8): 2433-2441.
- Piva, S., Gariano, G., Bonilauri, P., Giacometti, F., Decastelli, L., Florio, D., Massella, E. & Serraino, A. (2017). Occurrence of putative virulence genes on *Arcobacter butzleri* isolated from three different environmental sites throughout the dairy chain. *Journal of applied microbiology*, 122 (4): 1071-1077.
- Poirel, L., Potron, A. & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (7): 1597-1606.
- Ponder, M. A., Gilmour, S. J., Bergholz, P. W., Mindock, C. A., Hollingsworth, R., Thomashow, M. F. & Tiedje, J. M. (2005). Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychrotolerant bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 53 (1): 103-115.
- Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4 (5): 500-508.
- Powers, J. (2004). Antimicrobial drug development—the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 23-31.
- Preethi, T. & Deivanayagam Kandaswamy, R. H. (2012). Molecular identification of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen efaA in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 15 (4): 319.
- Rahman, A., Srivastava, S. S., Sneh, A., Ahmed, N. & Krishnasastri, M. V. (2010). Molecular characterization of tlyA gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: A non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase. *BMC Biochemistry*, 11 (1): 35. doi: 10.1186/1471-2091-11-35.
- Rainard, P. (2017). Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? *Veterinary research*, 48 (1): 25.
- Rank, E. L. (2012). Chromogenic agar media in the clinical, food, and environmental testing arenas, part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34 (6): 43-47.
- Recchia, G. D. & Hall, R. M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in microbiology*, 5 (10): 389-394.
- Regjeringen. (2015). *Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens 2015-2020*, no. 23.6.
- Reinthaler, F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F. & Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water research*, 37 (8): 1685-1690.

- Rensing, C., Pribyl, T. & Nies, D. H. (1997). New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *Journal of bacteriology*, 179 (22): 6871-6879.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4 (3): 482.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M., Michael, I. & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the total environment*, 447: 345-360.
- Robinson, T. P., Bu, D., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M. & Kariuki, S. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110 (7): 377-380.
- Rosen, B. P. (1999). Families of arsenic transporters. *Trends in microbiology*, 7 (5): 207-212.
- Róžańska, H., Lewtak-Piłat, A., Kubajka, M. & Weiner, M. (2019). Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. *Journal of veterinary research*, 63 (1): 93.
- Saga, T. & Yamaguchi, K. (2009). History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ*, 52 (2): 103-108.
- Sanchez Valenzuela, A., Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Perez Pulido, R. & Abriouel, H. (2013). Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne pathogens and disease*, 10 (2): 143-149.
- Schmidt, O., Schuenemann, V. J., Hand, N. J., Silhavy, T. J., Martin, J., Lupas, A. N. & Djuranovic, S. (2007). prfF and yhaV encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 372 (4): 894-905. doi: 10.1016/j.jmb.2007.07.016.
- Schroeder, M., Brooks, B. D. & Brooks, A. E. (2017). The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*, 8 (1): 39.
- Scott, J. R. & Churchward, G. G. (1995). Conjugative transposition. *Annual review of microbiology*, 49 (1): 367-397.
- 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.
- Shaw, K., Rather, P., Hare, R. & Miller, G. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57 (1): 138-163.
- Shiadeh, S. M. J., Hashemi, A., Fallah, F., Lak, P., Azimi, L. & Rashidan, M. (2019). First detection of efrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis* in Tehran, Iran. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 66 (1): 57-68.
- Singer, R. S., Finch, R., Wegener, H. C., Bywater, R., Walters, J. & Lipsitch, M. (2003). Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet infectious diseases*, 3 (1): 47-51.
- Singh, K. V., Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (6): 1845-1850.

- Smith, T. C., Gebreyes, W. A., Abley, M. J., Harper, A. L., Forshey, B. M., Male, M. J., Martin, H. W., Molla, B. Z., Sreevatsan, S. & Thakur, S. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. *PLoS One*, 8 (5).
- Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., Hammerl, J. & Tenhagen, B. A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58 (4): 252-261.
- Stacey, S. D., Williams, D. A. & Pritchett, C. L. (2017). The *Pseudomonas aeruginosa* two-component regulator AlgR directly activates rsmA expression in a phosphorylation-independent manner. *Journal of bacteriology*, 199 (18): 00048-17.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C. & Ploy, M.-C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, 3: 119.
- Statens legemiddelverk. (2012). *Bruk av antibakterielle midler til produksjonsdyr*. Legemiddelverket. Tilgjengelig fra: https://legemiddelverket.no/Documents/Veterin%C3%A6rmedisin/Terapianbefalinger/Terapianbefaling_bruk%20av%20antibakterielle%20midler%20til%20produks.pdf (lest 22.05.20).
- Strateva, T. & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58 (9): 1133-1148.
- Sunde, M. & Norström, M. (2005). The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1): 87-90.
- Sundin, G. & Bender, C. (1996). Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Molecular ecology*, 5 (1): 133-143.
- Sweders-Swarm. (2018). *Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden*. Solna/Uppsala.
- Tanabe, M., Szakonyi, G., Brown, K. A., Henderson, P. J., Nield, J. & Byrne, B. (2009). The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from *Escherichia coli* forms a dimer in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 380 (2): 338-342.
- Thermo Fisher Scientific inc. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer - VI.0 User Manual*. Tilgjengelig fra: https://www.mlz-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf (lest 02.02.20).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010a). *Brilliance CRE*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxid.com/pdf/oxid-Brilliance-ESBL.pdf> (lest 14.01.20).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010b). *Oxoid Brilliance ESBL*. Tilgjengelig fra: <http://www.oxid.com/pdf/oxid-Brilliance-ESBL.pdf> (lest 14.01.20).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010c). *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: https://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2_Fluorometer_UserManual.pdf (lest 03.03.20).
- Tian, Z.-X., Yi, X.-X., Cho, A., O’Gara, F. & Wang, Y.-P. (2016). CpxR activates MexAB-OprM efflux pump expression and enhances antibiotic resistance in both laboratory and clinical nalB-type isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 12 (10).

- Tine Rådgivning. (2019). *Statistikksamling fra Ku- og Geitekontrollen 2019. Årsrapport fra Helsekortordningen* Tilgjengelig fra: https://medlem.tine.no/aktuelt/nyheter/husdyrkontrollen/_attachment/499536?_ts=171c62ad785 (lest 04.05.2020).
- Trine, M. & Sørum, H. (2000). Functional Tn5393-like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12): 5533-5535.
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforlaget.
- Tronsmo, A., Gjøen, T., Sørum, H., Godfroid, J., Yazdankhah, S. P., Jelmert, A., Klein, J., Okoli, A. S., Ytrehus, B. & Skaar, I. (2016). Antimicrobial resistance due to the use of biocides and heavy metals: a literature review. Opinion of the Panel Panel on Microbial Ecology of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. *VKM Report*.
- Ullah, H. & Ali, S. (2017). Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions. *Antibact. Agents*.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, 3 (5): 26219.
- Vakulenko, S. B., Donabedian, S. M., Voskresenskiy, A. M., Zervos, M. J., Lerner, S. A. & Chow, J. W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (4): 1423-1426.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (18): 5649-5654.
- Van Den Bogaard, A. E. & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*, 14 (4): 327-335.
- Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L. & Li, J. (2010). Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry*, 53 (5): 1898-1916.
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in microbiology*, 7: 173.
- Wales, A. D. & Davies, R. H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4 (4): 567-604.
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. & Nordmann, P. (2005). Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*, 18 (2): 306-325.
- Walther-Rasmussen, J. & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57 (3): 373-383.
- Wand, M. E. (2017). Bacterial resistance to hospital disinfection. I: *Modeling the Transmission and Prevention of Infectious Disease*, s. 19-54: Springer.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). *Molecular Biology of the Gene*, b. 7: Pearson Education.
- Wendlandt, S., Li, B., Lozano, C., Ma, Z., Torres, C. & Schwarz, S. (2013). Identification of the novel spectinomycin resistance gene spw in methicillin-resistant and methicillin-

- susceptible *Staphylococcus aureus* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (7): 1679-1680.
- Wendlandt, S., Li, J., Ho, J., Porta, M. A., Feßler, A. T., Wang, Y., Kadlec, K., Monecke, S., Ehricht, R. & Boost, M. (2014). Enterococcal multiresistance gene cluster in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from various origins and geographical locations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (9): 2573-2575.
- WHO. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. Tilgjengelig fra: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1.
- WHO. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Tilgjengelig fra: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 (lest 04.04.20).
- WHO. (2018a). *Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance: analysis report of the second round of results of AMR country self-assessment survey 2018*. Tilgjengelig fra: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273128/9789241514422-eng.pdf>.
- WHO. (2018b). *WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation*. Tilgjengelig fra: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880-eng.pdf?ua=1> (lest 20.04.20).
- WHO. (2019a). *Critically important antimicrobials for human medicine*. Geneva: World Health Organization. Tilgjengelig fra: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>.
- WHO. (2019b). *Executive summary: the selection and use of essential medicines 2019: report of the 22nd WHO Expert Committee on the selection and use of essential medicines: WHO Headquarters, Geneva, 1-5 April 2019*: World Health Organization. Tilgjengelig fra: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325773/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.05-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (lest 24.05.20).
- WHO. (2019c). *Ten threats to global health in 2019*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019> (lest 05.05.20).
- Wilcks, A., Andersen, S. R. & Licht, T. R. (2005). Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. *FEMS microbiology letters*, 243 (1): 15-19.
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12 (1): 35-48.
- Wilson, K. S., Appelt, K., Badger, J., Tanaka, I. & White, S. W. (1986). Crystal structure of a prokaryotic ribosomal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (19): 7251-7255. doi: 10.1073/pnas.83.19.7251.
- Winokur, P., Vonstein, D., Hoffman, L., Uhlenhopp, E. & Doern, G. (2001). Evidence for Transfer of CMY-2 AmpC β -Lactamase Plasmids between *Escherichia coli*

- and Salmonella Isolates from Food Animals and Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (10): 2716-2722.
- Woods, D. E. & Iglewski, B. H. (1983). Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Reviews of infectious diseases*, 5 (4): 715-S722.
- Yılmaz, M., Ozic, C. & Gok, İ. (2012). Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis–Principles and Basics*, 33.
- Yoneyama, H. & Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70 (5): 1060-1075.
- Zdolec, N., Dobranić, V., Butković, I., Koturić, A., Filipović, I. & Medvid, V. (2016). Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. *Vet. arhiv*, 86 (2): 163-172.
- Zheng, J.-X., Wu, Y., Lin, Z.-W., Pu, Z.-Y., Yao, W.-M., Chen, Z., Li, D.-Y., Deng, Q.-W., Qu, D. & Yu, Z.-J. (2017). Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Frontiers in microbiology*, 8: 2338.

Vedlegg

Vedlegg A. Protokoll for uttak av melkeprøver

National Mastitis Council

Procedures for Collecting Milk Samples

Proper collection of milk samples is of paramount importance for identification of mastitis pathogens. Aseptic technique is an absolute necessity when collecting milk samples to prevent contamination by organisms found on the cows' skin, udder, and teats; hands of the sampler; and in the barn environment. Contaminated samples result in misdiagnosis, increased work and expense, confusion, and frustration. Contamination can be avoided by following the procedures described below.

Materials for Sampling

- Sterile vials or tubes
- 70% alcohol (ethyl or isopropyl)
- Cotton balls or gauze pledgets soaked in 70% alcohol, or commercially prepared, individually packaged alcohol swabs
- Cooler with ice or freezer packs for storing samples
- Racks for holding sample tubes or vials while sampling cows, and for cooler storage
- Disinfectant for cleaning teats (effective germicidal products used for premilking teat disinfection are recommended)
- Paper towels or individual cloth towels
- Means of identifying samples: permanent ink pen (with ink that is stable in both water and alcohol) or typed labels

Sampling Technique

- Label tubes prior to sampling (date, farm, cow, quarter).
- Brush loose dirt, bedding, and hair from the udder and teats. Thoroughly wash and dry grossly dirty teats and udders before proceeding with sample collection. Udders should be washed as a last resort.
- Discard several streams of milk from the teat (strict foremilk) and observe milk and mammary quarters for signs of clinical mastitis. Record all observations of clinical signs.
- Dip all quarters in an effective premilking teat disinfectant and allow at least 30 seconds contact time.
- Dry teats thoroughly with an individual towel.
- Beginning with teats on the far side of the udder, scrub teat ends vigorously (10 to 15 seconds) with cotton balls or gauze pledgets moist (not dripping wet) with 70% alcohol. Teat ends should be scrubbed until no more dirt appears on the swab or is visible on the teat end. A single cotton ball or alcohol swab should not be used on more than one teat. Take care not to touch clean teat ends. Avoid clean teats coming into contact with dirty tail switches, feet, and legs. In herds where cows are not cooperative, begin by scrubbing the nearest teat until clean, obtain the sample, and move to the next teat.
- Begin sample collection from the closest teat and move to teats on the far side of the udder. Remove the cap from the tube or vial but do not set the cap down or touch the inner surface of the cap. Always keep the open end of the cap facing downward. Maintain the tube or vial at approximately a 45 degree angle while taking the sample. Do not allow the lip of the sample tube to touch the teat end. Collect one to three streams of milk and immediately replace and tightly secure the cap. Do not overfill tubes, especially if samples are to be frozen.
- To collect a composite sample (milk from all four quarters in the same tube), begin sample collection with the nearest teats and progress to the teats on the far side of the udder. One to 2 ml of milk should be collected from each quarter of the udder.
- When samples are taken at the end of milking or between milkings, teats should be dipped in an effective germicidal teat disinfectant following sample collection.
- Store samples immediately on ice or in some form of refrigeration. Samples to be cultured at a later date (more than 48 hours) should be frozen immediately.

Vedlegg B. Kvantifisering og renhetsmåling av DNA

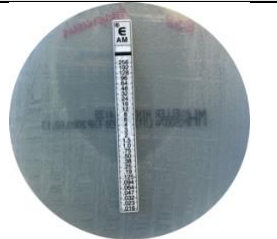
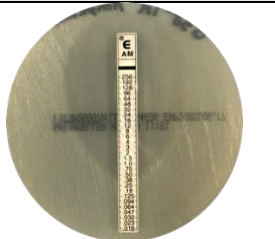
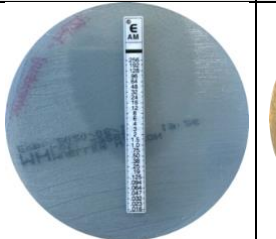
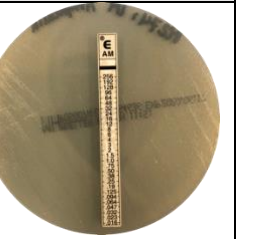
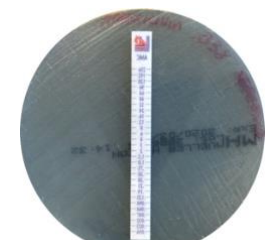
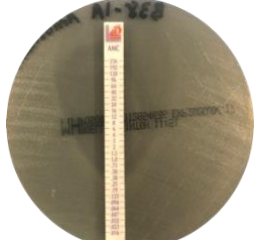
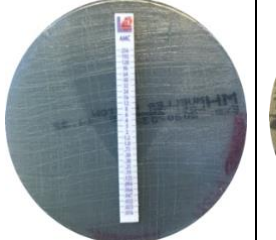
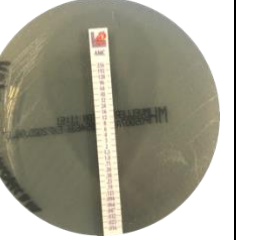
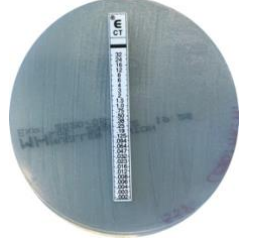
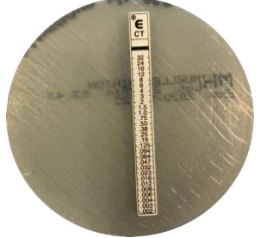
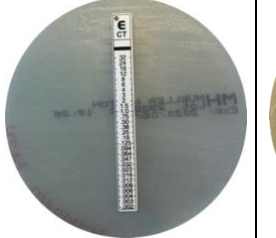
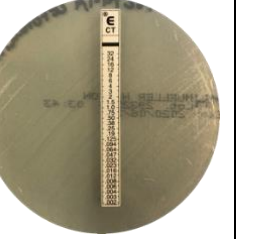
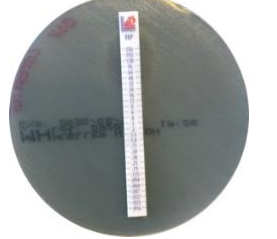
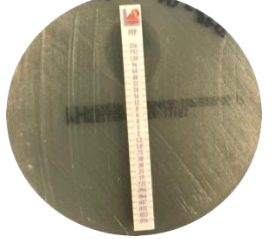


Tabell B1. Kvantifisering og renhetsmåling av DNA-ekstraksjon og PCR-produkt.

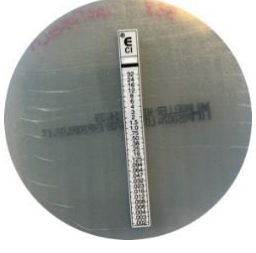
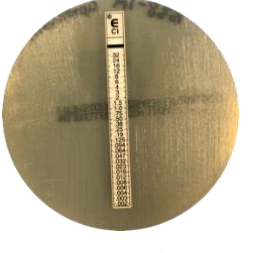
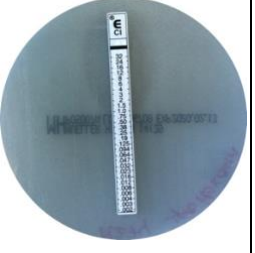

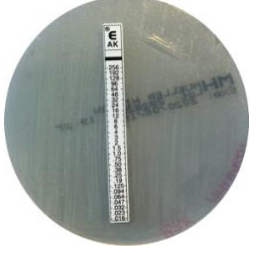
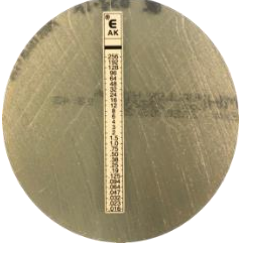
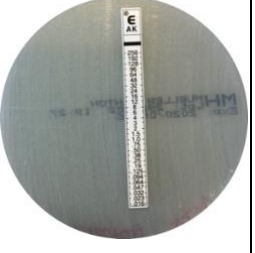
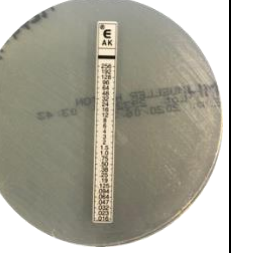

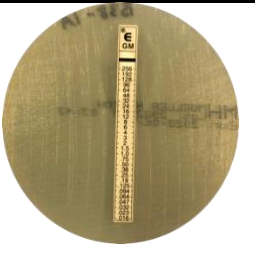
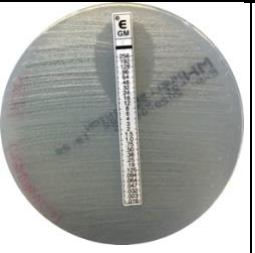
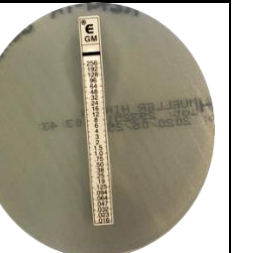
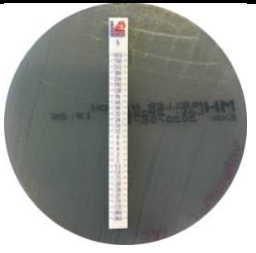
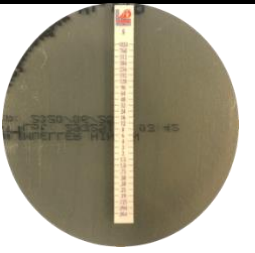
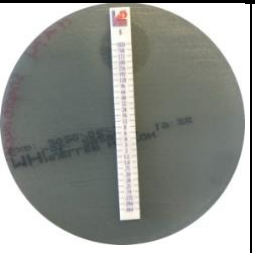
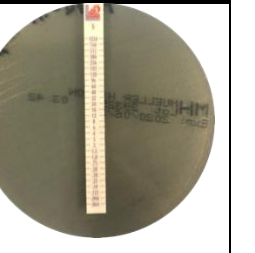
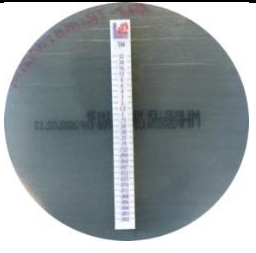

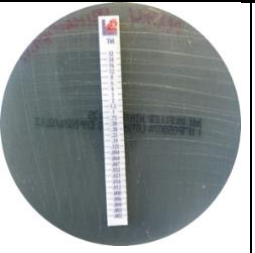
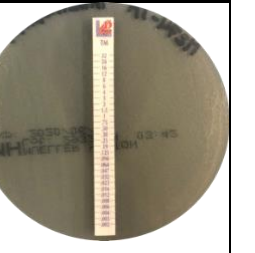
Prøve	Nanodrop™ 2000			Nanodrop™ 2000			Qubit® 2.0 fluorometer
	DNA-ekstraksjon			PCR-produkt			PCR-produkt
	DNA (nq/ul)	A _{260/280}	A _{260/230}	DNA (nq/ul)	A _{260/280}	A _{260/230}	DNA (nq/ul)
ESBL-M40-A	36.8	1.89	2.56	60.7	1.85	1.85	-
ESBL-M40-B	245.3	1.91	2.25	62.3	1.84	1.89	-
ESBL-M40-C	166.2	1.90	2.14	41.1	1.80	1.50	-
ESBL-M39-A	93.2	1.86	1.95	49.7	1.75	1.20	-
ESBL-M40-M	145.6	1.89	1.97	12.8	1.86	1.02	-
CRE-B38	337.1	1.87	2.32	56.2	1.86	1.89	9.36
CRE-M274	387.5	1.88	2.36	52.2	1.85	1.79	8.66

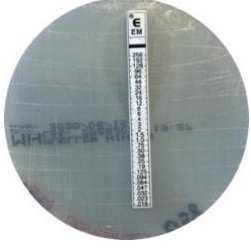
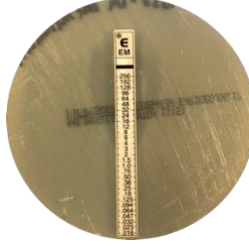
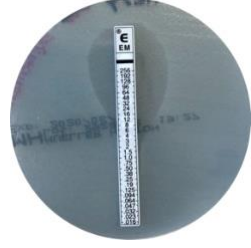
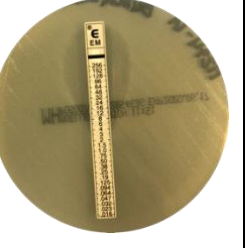
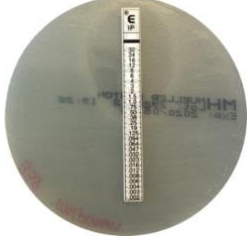
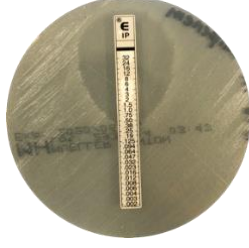
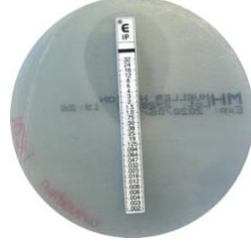
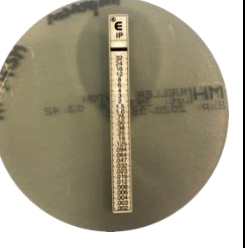
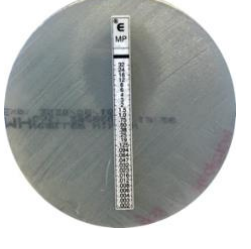
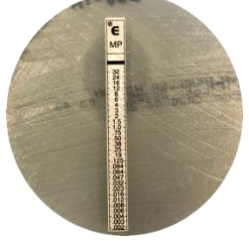
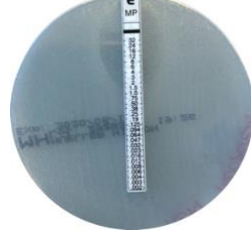
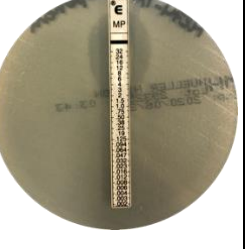
* Enkelte prøver ble ikke kvantifisert med Qubit® 2.0 fluorometer

Vedlegg C. Antimikrobiell sensitivitetstesting


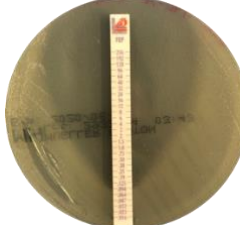
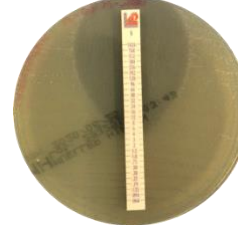

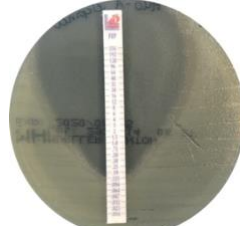
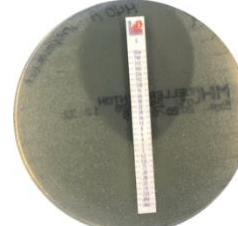
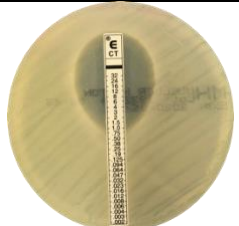
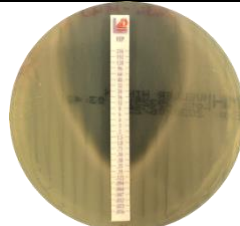
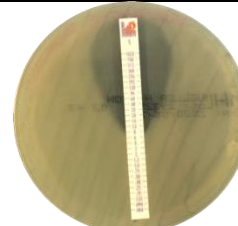

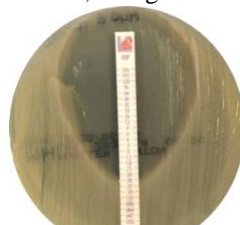
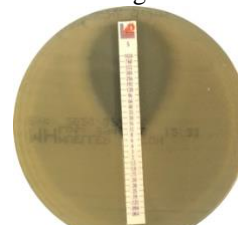
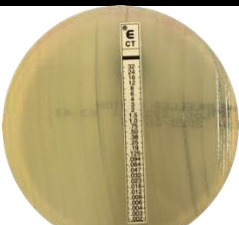
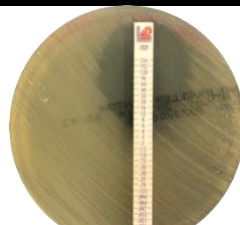
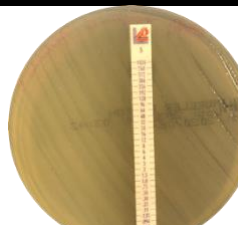
Tabell C1. Visuell framstilling av inhiberingszone til de 12 antimikrobielle stripsene med to gjentakelser fra prøve B38-1A og M274-1A (Friske kyr).


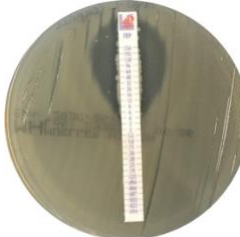
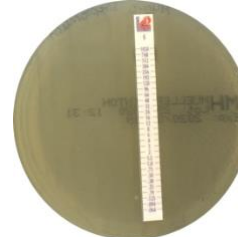
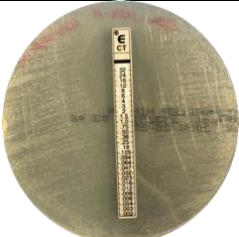
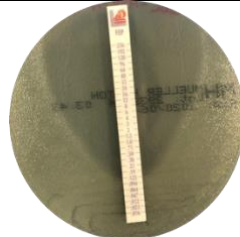
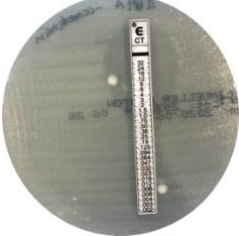
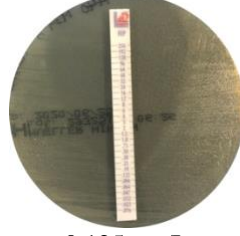
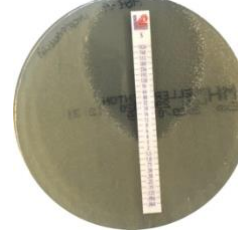
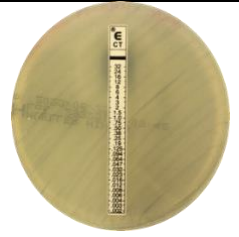

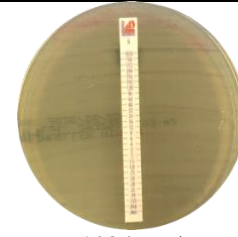
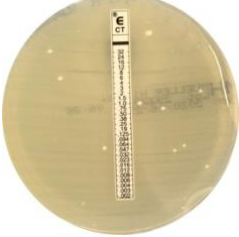
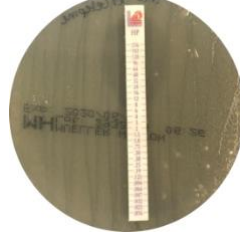
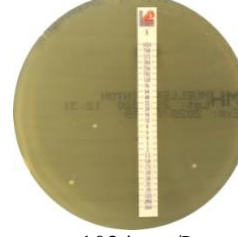
Prøve-ID	B38-1A <i>Enterococcus faecalis</i>		M274-1A <i>Enterococcus faecalis</i>	
	Gjentak 1	Gjentak 2	Gjentak 1	Gjentak 2
Ampicillin	 0,25 mg/L	 0,38 mg/L	 0,25 mg/L	 0,38 mg/L
	Gjennomsnitt: 0,44 mg/L		Gjennomsnitt: 0,44 mg/L	
Amoksisicillin	 0,38 mg/L	 0,38 mg/L	 25 mg/L	 0,38 mg/L
	Gjennomsnitt: 0,38 mg/L		Gjennomsnitt: 0,44 mg/L	
Cefotaksim	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L	 ≥ 32 mg/L
	Gjennomsnitt: ≥ 32 mg/L		Gjennomsnitt: ≥ 32 mg/L	
Cefepim	 24 mg/L	 32 mg/L	 24 mg/L	 32 mg/L
	Gjennomsnitt: 28 mg/L		Gjennomsnitt: 28 mg/L	

Ciprofloksacin	 1,5 mg/L	 1,0 mg/L	 0,75 mg/L	 1,0 mg/L
	Gjennomsnitt: 1,25 mg/L		Gjennomsnitt: 0,88 mg/L	
Amikacin	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L	 ≥ 256 mg/L
	Gjennomsnitt: ≥ 256 mg/L		Gjennomsnitt: ≥ 256 mg/L	
Gentamicin	 12 mg/L	 12 mg/L	 12 mg/L	 16 mg/L
	Gjennomsnitt: 12 mg/L		Gjennomsnitt: 14 mg/L	
Streptomycin	 512 mg/L	 ≥ 1024 mg/L	 192 mg/L	 ≥ 1024 mg/L
	Gjennomsnitt: 768 mg/L		Gjennomsnitt: 558 mg/L	
Trimetoprim	 0,25 mg/L	 0,19 mg/L	 0,047 mg/L	 0,19 mg/L
	Gjennomsnitt: 0,22 mg/L		Gjennomsnitt: 0,119 mg/L	

Erytromycin				
	4 mg/L	3 mg/L	5 mg/L	3 mg/L
	Gjennomsnitt: 3,5 mg/L		Gjennomsnitt: 4 mg/L	
Imipenem				
	0,50 mg/L	0,50 mg/L	0,50 mg/L	0,50 mg/L
	Gjennomsnitt: 0,50 mg/L		Gjennomsnitt: 0,50 mg/L	
Meropenem				
	0,50 mg/L	1,5 mg/L	1,5 mg/L	2 mg/L
	Gjennomsnitt: 1,0 mg/L		Gjennomsnitt: 1,75 mg/L	

Tabell C2. Framstilling av inhiberingssone for tre antimikrobielle stripser (Cefotaksim, cefepim og streptomycin) med to gjentakelser for prøve fra mastittkyr (M40A, M40B, M40C, M40M og M39A).

Prøve	Cefotaksim	Cefepim	Streptomycin
ESBL-M40-A <i>Pseudomonas Oleovorans</i>	 0,75 mg/L	 0,094 mg/L	 4 mg/L
	 1,0 mg/L	 0,125 mg/L	 4 mg/L
	Gjennomsnitt 0,88 mg/L	Gjennomsnitt 0,157 mg/L	Gjennomsnitt 4 mg/L
ESBL-M40-B <i>Pseudomonas Oleovorans</i>	 1,0 mg/L	 0,25 mg/L	 8 mg/L
	 1,0 mg/L	 0,38 mg/L	 8 mg/L
	Gjennomsnitt 1,0 mg/L	Gjennomsnitt 0,32 mg/L	Gjennomsnitt 8 mg/L
ESBL-M40-C <i>Pseudomonas Oleovorans</i>	 ≥ 32 mg/L	 4 mg/L	 ≥ 1024 mg/L

	Gjentak 2 <i>Pseudomonas Oleovorans</i>			
	Gjennomsnitt	≥ 32 mg/L ≥ 32 mg/L	4 mg/L 4 mg/L	≥ 1024 mg/L ≥ 1024 mg/L
	ESBL-M39-A	Gjentak 1 <i>Pseudomonas Oleovorans</i>		
	Gjentak 2 <i>Pseudomonas Oleovorans</i>			
	Gjennomsnitt	1,0 mg/L 1,0 mg/L	0,125 mg/L 0,125 mg/L	3 mg/L 3 mg/L
	Gjentak 1 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>			
	Gjentak 2 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>			
	Gjennomsnitt	≥ 32 mg/L ≥ 32 mg/L	6 mg/L 6 mg/L	≥ 1024 mg/L ≥ 1024 mg/L

Vedlegg D. Sekvensresultat for 16S rRNA

Tabell D1. Sekvenser som koder for 16S rRNA

Prøve		Sekvens
Friske kyr		
CRE-M274-1A	Forward	GGAATCTACCTATAAGCGGGGGATAACATTTCGGAAACGGGTGCTAATACCGCATAATATCTT CTTCCGCATGGAAGAAGATTGAAAGACGGCTCTGCTGTCACCTTATAGATGACCTTGC GGTC ATTAGTTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGACGATGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTC GTAAAACCTCTGTTATAAGAGAAGAACAATTGTAGAGTAACTGCTACAGTCTTGACGGTATC TTATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC ACGGCTTAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAATGTGG AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC ATTCTGGTCTGTTACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCG AGTTAAC
	Reverse	TGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGT GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCG GCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTTGCAT GACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGACTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAA GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGA GTGCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAAA GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAA TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCG GTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTC CAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC ACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC ATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCC CAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCT GCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTG
	Contig	ACCATCCCCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCT CGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCG CGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAA GCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCACTTGTAGCAGT GTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTGTC ACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTC GTTGCGGGACTTAACCCAACCATCTCCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCCACCTG TCCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGG TAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTGACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGT GCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTTCCAACACATTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCAGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGA GAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATT CCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGG GCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAAC GCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGAT ACCGTCAGGGGACGTTACGTTACTAACGTCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTACGATC CGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTACAGCTTTCGTTCCATTGCCGAAGATTC CCTACTGCTGCCTCCCCTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTC TCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGC GGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACCTTATGCCATGCGGCATAAACTGT TATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGT TACTACCCGTCGCCACTCCTCTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTT CGACTTGCATGTATAGCA

CRE-B38-1A	Forward	<p>CTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCAT CAGAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCA TAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG GACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTG TTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAG CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCACCC GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCTGGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGGTTGGAAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACG CATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCCTTTGACCACTCTAGA</p>
	Reverse	<p>CTGGCTCCAAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCG GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTC CGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTTGC ATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGACTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCAT AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTACCAGGAGTCTCGCTA GAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGA AAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG AATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTG CGGTCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTTGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCC TCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC CCACGTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCT CCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCT CCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGC CTGCGCTCGTTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGATTACCAGCGGCTG CTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCG</p>
	Contig	<p>CCCCATCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAAACTC TCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCC GCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGA AGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCAG TGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGT CACCGGCACTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAAATAAGGGTTGCGCTC GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA CTTTGTCCCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAG GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT TCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTTGCTGCAG CACTGAAGGGCGGAAACCCCTTCCAACCACTTAGCACTATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG GGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGC CGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACCATGGAATTTCCA CTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGGTGAGCCGGGGGCT TTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGTTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTT GCCACCTACGATTACCAGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCG TCAGGGGACGTTCAAGTACTAACGTCCTTGTCTTCTTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAA AACCTTCTTCACTACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTAC TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGG TCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTC CATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGC GGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTC ACCCGTCCGCACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCGAC TTGCATGTATAGCA</p>
Mastittkyr		

ESBL-M40-A	Forward	<p>CTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGT GGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGC TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAA CAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG CGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT GGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG GCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG AGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCC TGGGTAAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA</p>
ESBL-M40-B	Forward	<p>GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGG AACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCA GATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGT TGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACG GTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTCCCTGA GAACTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA AACTC</p>
ESBL-M40-C	Forward	<p>GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGG AACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCA GATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGT TGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACG GTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTCCCTGA GAACTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA AACTC</p>
ESBL-M40-M	Forward	<p>TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACTGTC TACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGC TAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAG TCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGC ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAGATTAATACTCTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAA TAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGG AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC AACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCT GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGA CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC CACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTTCCTTGAGAACTTAGTGGCGCAGCTAACG CATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCT TGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG</p>

ESBL-M39-A	Forward	<p> CTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGT TCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGA CGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCT AATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGT TCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGC TAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAG GAACACCAGTGGCGAAGGGGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGG GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGG GTTCCCTTGAGAACTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATT GGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGT </p>
------------	---------	---

Vedlegg E. BLAST-sekvensresultat

Tabell E1. BLAST-resultat med identitetsscore og Query lengde

Prøve	BLAST Sekvensresultat (bakterieslekt-Art-Stamme)	Identitets-score (%)	Lengde
CRE-M274			
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme YN771	99,25	1460
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme DUT1805	99,24	
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme DL 1505	99,24	
	<i>Enterococcus</i> ssp. CSQRZN 1.4	99,18	
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme CAU:292	99,18	
CRE-B38			
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme DUT1805	99,72	1454
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme DL1505	99,72	
	Bacterium JNMFL L5	99,72	
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme YN771	99,66	
	<i>Enterococcus faecalis</i> stamme CAU:292	99,66	
ESBL-M40A			
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> stamme HE_P101	100	1019
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13974	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> JCM 13973	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> stamme JCM 11598	100	
ESBL-M40B			
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13980	100	809
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13974	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> JCM 13973	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> stamme JCM 11598	100	
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> stamme HE_P101	100	
ESBL-M40C			
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13980	100	809
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13974	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13973	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> stamme JCM 11598	100	
ESBL-M39A			
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13980	100	969
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> JCM 13974 gene for 16S rRNA, partial sequence	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> stamme JCM 13973	100	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> stamme JMC 11598	100	
ESBL-M40M			
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> stamme E01h	99,67	909
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> stamme LPB0305	99,56	
	<i>Pseudomonas sihuiensis</i> stamme KCTC 32246	99,56	

Vedlegg F. MLST-sekvensresultat

Tabell F1. Bakterideintet screenet med MLST med identitetsscore (%).

Prøvenavn	rMLST bakterieidentitet (bakterieslekt-Art)	Identitetsscore (%)
B38	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
M40A	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	84
	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	4
	Konklusjon: Mest trolig <i>P. oleovorans</i> ¹	
M40C	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	32
	<i>Pseudomonas indoloxydans</i>	32
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	32
	Konklusjon: Ukjent <i>Pseudomonas</i> spp.	

¹ Kan ikke konkludere tilstedeværelse av *P.oleovorans* på grunn av lav identitetsscore.

Vedlegg G. Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq

Tabell G1. Resultat fra Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq for M40A og M40C.

Prøve	Gen	Coverage (%)	Identitet (%)	Contig	ACCESSION	Beskrivelse
Resistensgener						
B38	<i>ant(6)-Ia</i>	100.00	100.00	contig00001	KF648874.1:60 997-61861	Aminoglykosid nukleotidyltransferase
B38	<i>dfrE</i>	100.00	97.58	contig00003	AIIS01000002.1:233813-234308	Dihydrofolat reduktase
B38	<i>tetM</i>	100.00	97.76	contig00005	AM990992.1:10 01761-1003681	Tetracyclin resistens protein
B38	<i>emeA</i>	97.72	96.95	contig00006	AB091338:174-1356	Multiresistent efflukspumpe
B38	<i>lsaA</i>	100.00	99.40	contig00012	AY225127.1:41-1538	ATP-bindende kasett familie (ABC-F)
B38	<i>efrB</i>	96.69	97.63	contig00017	HG970103.1:1-1087	Multiresistent efflukspumpe
B38	<i>efrA</i>	98.49	99.09	contig00017	HG970100.1:1-1458	Multiresistent efflukspumpe
B38	<i>spw</i>	100.00	99.88	contig00001	NG_048075.1	Aminoglycoside nukleotidyltransferase
B38	<i>acr3</i>	-	-	-	-	Arsen-resistent protein
B38	<i>arsD</i>	-	-	-	-	Arsen-resistent operon trans-acting
B38	<i>azlC_1</i>	-	-	-	-	Azaleucine resistant protein
B38	<i>mdtL</i>	-	-	-	-	Multiresistent protein
B38	<i>tmrB</i>	-	-	-	-	Tunicamycin resistant protein
B38	<i>yycJ</i>	-	-	-	-	Metallo-beta-lactamase
Virulensgener						
B38	<i>clpP</i>	94.30	79.22	contig00001	NP_465991	ATP-avhengig protease
B38	<i>EF0818</i>	100.00	99.24	contig00001	NP_814561	Polysakkarid lyase familie
B38	<i>cpsB</i>	100.00	99.50	contig00002	NP_816140	Fosfatidat cytidyltransferase
B38	<i>cpsA</i>	100.00	99.51	contig00002	NP_816141	Undecaprenyl difosfat syntase
B38	<i>fsr2</i>	86.74	92.50	contig00002	NP_816151	Fibrinogen bindende protein
B38	<i>efaA</i>	100.00	99.57	contig00004	NP_815739	Endocarditis spesifikk antigen
B38	<i>Bsh</i>	93.15	76.33	contig00005	NP_465591	Gallesalt hydrolase
B38	<i>ebpA</i>	100.00	99.49	contig00006	NP_814821	Endokarditt og biofilmassosiert pilus tip protein
B38	<i>ebpB</i>	100.00	99.37	contig00006	NP_814822	Endokarditt og biofilmassosiert pilus tip protein
B38	<i>ebpC</i>	100.00	98.99	contig00006	NP_814823	Endokarditt og biofilmassosiert pilus tip protein
B38	<i>srtC</i>	100.00	99.18	contig00006	NP_814824	Sortase
B38	<i>ace</i>	100.00	96.99	contig00006	NP_814829	Kollagen adhesin protein
B38	<i>fsr1</i>	100.00	98.64	contig00007	NP_813892	Fibrinogen Bindende protein
B38	<i>bopD</i>	100.00	99.11	contig00008	NP_814691	Sukker-bindende transkripsjonsregulator - LacI familie
B38	<i>EF3023</i>	100.00	98.54	contig00010	NP_816637	Polysakkarid lyase familie - Hyaluronidase
B38	<i>fsrA</i>	100.00	98.63	contig00016	NP_815519	Respons regulator
B38	<i>fsrB</i>	100.00	98.77	contig00016	NP_815518	agrBfs protein
B38	<i>fsrC</i>	100.00	99.55	contig00016	NP_815517	Histidine kinase putative
B38	<i>gelE</i>	100.00	98.76	contig00016	NP_815516	Coccolysin - Gelatinase
B38	<i>sprE</i>	100.00	98.83	contig00016	NP_815515	Serin proteinase familie
B38	<i>cvfB</i>	-	-	-	-	Konservert virulens faktor B
Toksingener						
B38	<i>ndoA</i>	-	-	-	-	Toxin-antitoxin system, toxin component, MazF

B38	<i>Fic</i>	-	-	-	-	Toxin-antitoxin system, toxin component,
Hemolysingener						
B38	<i>TlyA</i>	-	-	-	-	Hemolysin A

Tabell G2. Resultat fra Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq for M40A og M40C.

Prøve	Gen	Coverage (%)	Identitet (%)	Contig	ACCESSION	Beskrivelse
Resistensgener						
M40A	<i>OpmH</i>	97.03	78.77	contig00038	NC_002516.2:5584101-5585550	Ytre membraneffluksprotein som kreves for triklosanspesifikk efflukspumpefunksjon
M40C	<i>OpmH</i>	96.96	77.12	contig00001	NC_002516.2:5584101-5585550	
M40C	<i>mexJ</i>	90.94	75.98	contig00002	NC_002516.2:4119270-4120374	Membranfusjonsproteinet til multidrug effluksprotein
M40A	<i>mexK</i>	99.35	81.74	contig00001	AE004091.2:4116188-4119266	Membranfusjonsproteinet til MexJK multidrug effluks protein.
M40C	<i>mexK</i>	99.42	81.41	contig00002	AE004091.2:4116188-4119266	
M40A	<i>CpxR</i>	96.46	80.12	contig00002	LT673656.1:1884345-1885023	Aktivering av ekspresjons av RND effluks pumpe MexAB-OprM. Forbedrer uttrykk og medikament
M40C	<i>CpxR</i>	97.35	78.47	contig00004	LT673656.1:1884345-1885023	
M40C	<i>APH(6)-Id</i>	100.00	99.88	contig00008	AF024602:3156-3993	Aminoglykosid fosfotransferase kodet av plasmider, integrative konjugative elementer og kromosale genomiske øyer
M40C	<i>APH(3'')-Ib</i>	100.00	99.88	contig00008	AF313472:15594-16398	Aminoglykosid fosfotransferase kodet av plasmider, transponer i integrative konjugative elementer og kromosomer
M40C	<i>qacG2</i>	100.00	100.00	contig00050	A7J11_04618	Kvartær ammoniumforbindelse effluks SMR-transportør
M40A	<i>MuxB</i>	97.03	76.28	contig00003	NC_002516.2:2850883-2854015	En av to nødvendige RND-komponentene i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> effluks-pumpesystem MuxABX-OpmB
M40C	<i>MuxB</i>	96.90	75.82	contig00009	NC_002516.2:2850883-2854015	
M40A	<i>PmpM</i>	90.73	76.99	contig00002	NC_002516.2:1472547-1473981	Strømningspumpe med flere legemidler som tilhører MATE-familien til <i>pseudomonas aeruginosa</i> . PmpM er en H ⁺ antiporter som gir resistens mot fluorokinoloner fradiomycin
M40C	<i>PmpM</i>	90.52	75.59	contig00011	NC_002516.2:1472547-1473981	
M40A	<i>OprM</i>	95.47	75.14	contig00009	NC_002516:476333-477791	Et ytre membranfaktorprotein som finnes i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> og <i>Burkholderia vietnamiensis</i> .
M40C	<i>OprM</i>	95.68	75.87	contig00016	NC_002516:476333-477791	
M40A	<i>MexB</i>	98.44	81.76	contig00009	L11616:1570-4711	Den indre membraneksportør av avløpskomplekset MexAB-OprM
M40C	<i>MexB</i>	98.38	80.93	contig00016	L11616:1570-4711	
M40A	<i>MexA</i>	86.55	76.27	contig00009	NC_002516:472024-473176	MexA er membranfusjonsproteinet til MexAB-OprM multidrug effluks-komplekset.
M40C	<i>MexA</i>	85.68	77.74	contig00016	NC_002516:472024-473176	
M40A	<i>OprN</i>	95.21	77.32	contig00028	NC_002516:2813194-2814613	OprN er den ytre membrankanalkomponenten til

M40C	<i>OprN</i>	89.36	79.26	contig00020	NC_002516:2813194-2814613	MexEF-OprN multidrug effluks kompleks.
M40A	<i>MexF</i>	98.40	85.27	contig00028	NC_002516:2810009-2813198	MexF er den indre legemembrantransportøren til MexEF-OprN-komplekset.
M40C	<i>MexF</i>	98.46	86.21	contig00020	NC_002516:2810009-2813198	MexF tilsvarer 2 loci i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
M40A	<i>MexE</i>	96.39	77.87	contig00028	NC_002516:2808743-2809988	MexE er membranfusjonsproteinet til MexEF-OprN multidrug effluks-komplekset.
M40C	<i>MexE</i>	84.10	80.64	contig00020	NC_002516:2808743-2809988	
M40C	<i>MexD</i>	98.15	79.00	contig00034	U57969:1486-4618	MexD er den indre medisin-membrantransportøren til MexCD-OprJ-komplekset.
M40A	<i>acr3</i>	-	-	-	-	Arsenikk resistens protein
M40C	<i>arsR1</i>	-	-	-	-	Arsenic resistance transcriptional regulator
M40A	<i>bcr</i>	-	-	-	-	Bicyclomycin resistance protein
M40C	<i>bcr</i>	-	-	-	-	
M40C	<i>ble</i>	-	-	-	-	Bleomycin resistance protein
M40A	<i>copA</i>	-	-	-	-	Putative copper-importing P-type ATPase A
M40C	<i>copA</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>copB</i>	-	-	-	-	Kobber resistens protein
M40C	<i>copB</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>czcA</i>	-	-	-	-	Kobolt-Zink-Kadmium resistens protein
M40C	<i>czcA</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>czcB</i>	-	-	-	-	Kobolt-Zink-Kadmium resistens protein
M40C	<i>czcC</i>	-	-	-	-	Kobolt-Zink-Kadmium resistens protein
M40C	<i>emrA</i>	-	-	-	-	Colistin resistens protein
M40A	<i>emrB</i>	-	-	-	-	Colistin resistens protein
M40C	<i>emrB</i>	-	-	-	-	
M40C	<i>fsr</i>	-	-	-	-	Fosmidomycin resistens protein
M40C	<i>lnrL</i>	-	-	-	-	Linearmycin resistens ATP-bindende protein
M40A	<i>mdtA</i>	-	-	-	-	Multidrug resistens protein
M40C	<i>mdtA</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>mdtB</i>	-	-	-	-	Multidrug resistens protein
M40C	<i>mdtB</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>mdtC</i>	-	-	-	-	Multidrug resistens protein
M40C	<i>mdtC</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>mdtE</i>	-	-	-	-	Multidrug resistens protein
M40C	<i>mdtH</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>mdtK</i>	-	-	-	-	Multidrug resistens protein
M40C	<i>mdtK</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>merRI</i>	-	-	-	-	Mercuric resistens operon regulatorisk protein
M40A	<i>ohrB</i>	-	-	-	-	Organisk hydrogenperoksid resistens protein
M40C	<i>ohrB</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>ohrR</i>	-	-	-	-	Organisk hydrogenperoksid resistens transcriptional
M40C	<i>ohrR</i>	-	-	-	-	fosforylase
M40A	<i>tetO</i>	-	-	-	-	Tetracycline resistance protein
M40A	<i>yaaA</i>	-	-	-	-	Hypotese protein
M40C	<i>yaaA</i>	-	-	-	-	
M40C	<i>ampC</i>	-	-	-	-	Beta-lactamase
Virulensgener						
M40C	<i>alg8</i>	97.78	83.20	contig00033	NP_252231	Alginat-c5-mannuronan-epimerase
M40C	<i>algA</i>	96.82	83.97	contig00033	NP_252241	Fosfomannose isomerase / guanosin 5'-difosfo-D-mannose fosforylase
M40C	<i>algB</i>	98.37	80.10	contig00001	NP_254170	To-Komponentsresponsregulator
M40A	<i>algC</i>	96.70	83.47	contig00048	NP_254009	Fosfomannomutase
M40C	<i>algC</i>	96.70	83.54	contig00008	NP_254009	

M40C	<i>algD</i>	99.92	82.82	contig00033	NP_252230	GDP-mannose 6-dehydrogenase
M40C	<i>algE</i>	92.19	75.05	contig00033	NP_252234	Alginatbiosyntetisk protein AlgK forløper
M40C	<i>algF</i>	90.78	75.71	contig00033	NP_252240	Alginat o-acetyltransferase
M40C	<i>algG</i>	85.66	75.54	contig00033	NP_252235	Ytre membranprotein
M40C	<i>algL</i>	87.50	75.60	contig00033	NP_252237	Poly (beta-d-mannuronat) lyase forløper
M40A	<i>algR</i>	96.65	80.19	contig00023	NP_253948	Alginat biosyntetisk regulatorisk protein
M40C	<i>algR</i>	96.65	79.78	contig00001	NP_253948	
M40A	<i>algU</i>	99.66	80.69	contig00008	NP_249453	Alginat Biosyntetisk protein
M40C	<i>algU</i>	99.66	79.48	contig00015	NP_249453	
M40A	<i>algW</i>	95.81	81.82	contig00029	NP_253136	Proteinregulering
M40C	<i>algW</i>	96.07	81.24	contig00002	NP_253136	
M40A	<i>algZ</i>	95.36	78.86	contig00023	NP_253949	Sigmafaktor
M40C	<i>algZ</i>	95.45	78.74	contig00001	NP_253949	
M40A	<i>ChpB</i>	93.60	77.72	contig00006	NP_249105	Sannsynlig metylesterase
M40C	<i>ChpB</i>	93.99	75.50	contig00001	NP_249105	
M40C	<i>clpV1</i>	98.12	83.25	contig00027	NP_248780	Type VI sekresjonssystem AAA+ familie ATPase
M40C	<i>dotU1</i>	85.04	79.64	contig00027	NP_248768	Type VI sekresjonssystem protein
M40C	<i>hcp1</i>	97.96	81.63	contig00027	NP_248775	Type VI sekresjonssystem substrat
M40C	<i>hsiB1/vipA</i>	96.53	86.71	contig00027	NP_248773	Type VI sekresjonssystem tubulidannende protein VipA
M40C	<i>hsiC1/vipB</i>	97.33	88.67	contig00027	NP_248774	Type VI sekresjonssystem tubulidannende protein VipB
M40C	<i>hsiG1</i>	99.62	78.26	contig00027	NP_248778	Type VI sekresjonssystem hcp sekresjon øyprotein
M40C	<i>hsiF1</i>	90.98	75.00	contig00027	NP_248777	Type VI sekresjonssystem hcp sekresjon øyprotein HsiF1 et gp25-lignende protein, men har ikke lysozymaktivitet
M40C	<i>hsiJ1</i>	99.25	76.73	contig00027	NP_248769	Type VI sekresjonssystem hcp sekresjon øyprotein
M40C	<i>icmF1/tss M1</i>	98.49	77.36	contig00027	NP_248767	Type VI sekresjonssystem protein
M40A	<i>fleN</i>	99.17	82.05	contig00026	NP_250145	Flagellær syntese regulator
M40C	<i>fleN</i>	98.46	82.52	contig00003	NP_250145	
M40A	<i>fleQ</i>	98.85	81.34	contig00033	NP_249788	Transkripsjonsregulator
M40C	<i>fleQ</i>	98.85	81.21	contig00003	NP_249788	
M40A	<i>fleR</i>	98.52	75.92	contig00026	NP_249790	To-komponents responsregulator
M40C	<i>fleR</i>	98.66	76.21	contig00003	NP_249790	
M40A	<i>fleS</i>	95.12	78.44	contig00026	NP_249789	To-komponents sensor
M40C	<i>fleS</i>	94.79	78.08	contig00003	NP_249789	
M40A	<i>fliA</i>	98.39	82.14	contig00026	NP_250146	Flagellær biosyntesigma-faktor
M40C	<i>fliA</i>	98.39	82.41	contig00003	NP_250146	
M40A	<i>fliE</i>	99.09	81.08	contig00026	NP_249791	Flagellær krok-basalt kroppskomplekst protein
M40C	<i>fliE</i>	98.18	81.63	contig00003	NP_249791	
M40A	<i>fliF</i>	95.88	79.30	contig00026	NP_249792	Flagell M-ring protein
M40C	<i>fliF</i>	94.38	79.65	contig00003	NP_249792	
M40A	<i>fliG</i>	99.80	86.11	contig00026	NP_249793	Flagell motor switch protein G
M40C	<i>fliG</i>	99.41	85.86	contig00003	NP_249793	
M40A	<i>FliI</i>	97.71	83.47	contig00026	NP_249795	Flagellumsesifikk ATP-syntase
M40C	<i>FliI</i>	97.94	82.15	contig00003	NP_249795	
M40A	<i>fliM</i>	100.00	85.70	contig00026	NP_250134	Flagell motor switch protein G
M40C	<i>fliM</i>	100.00	86.01	contig00003	NP_250134	
M40A	<i>fliN</i>	98.73	81.99	contig00026	NP_250135	Flagell motor switch protein
M40C	<i>fliN</i>	97.26	80.25	contig00003	NP_250135	
M40A	<i>fliP</i>	88.28	82.89	contig00026	NP_250137	Flagell bioyntetisk protein
M40C	<i>fliP</i>	87.37	81.97	contig00003	NP_250137	
M40A	<i>fliQ</i>	100.00	78.89	contig00026	NP_250138	Flagell bioyntetisk protein
M40C	<i>fliQ</i>	94.44	80.78	contig00003	NP_250138	
M40A	<i>fliR</i>	95.88	76.84	contig00026	NP_250139	Flagell bioyntetisk protein
M40C	<i>fliR</i>	95.62	78.64	contig00003	NP_250139	
M40A	<i>flgB</i>	99.02	75.00	contig00033	NP_249768	Flagell basal body rod protein

M40C	<i>flgB</i>	99.02	75.24	contig00003	NP_249768	
M40A	<i>flgC</i>	99.32	83.07	contig00033	NP_249769	Flagell basal body rod protein
M40C	<i>flgC</i>	99.55	82.35	contig00003	NP_249769	
M40A	<i>flgD</i>	82.35	76.83	contig00033	NP_249770	Flagell basal-body rod modifiseringsprotein
M40C	<i>flgD</i>	82.63	75.75	contig00003	NP_249770	
M40A	<i>flgF</i>	98.53	77.93	contig00033	NP_249772	Flagell basal body rod protein
M40C	<i>flgF</i>	98.67	77.76	contig00003	NP_249772	
M40A	<i>flgG</i>	98.85	87.20	contig00033	NP_249773	Flagell basal body rod protein
M40C	<i>flgG</i>	98.85	84.64	contig00003	NP_249773	
M40A	<i>flgH</i>	89.66	77.16	contig00033	NP_249774	Flagell L-ring proteinforløper
M40C	<i>flgH</i>	92.96	76.51	contig00003	NP_249774	
M40A	<i>flgI</i>	96.22	83.15	contig00033	NP_249775	Flagell P-ring proteinforløper
M40C	<i>flgI</i>	94.77	83.51	contig00003	NP_249775	
M40A	<i>flhA</i>	99.95	84.28	contig00026	NP_250143	Flagell bioyntetisk protein
M40C	<i>flhA</i>	99.81	83.55	contig00003	NP_250143	
M40A	<i>flhF</i>	99.30	75.76	contig00026	NP_250144	Flagell Biosyntese protein
M40A	<i>mucD</i>	94.32	78.96	contig00008	NP_249457	Serin protease MucD forløper
M40C	<i>mucD</i>	94.32	79.11	contig00015	NP_249457	
M40A	<i>mucP</i>	99.63	76.22	contig00011	NP_252339	Metalloprotease [Alginat regulering]
M40C	<i>mucP</i>	99.33	76.36	contig00003	NP_252339	
M40A	<i>motA</i>	99.06	80.14	contig00046	NP_253641	Flagell motor protein
M40C	<i>motA</i>	99.06	80.26	contig00001	NP_253641	Flagell motorisk protein
M40A	<i>motB</i>	81.13	77.05	contig00046	NP_253640	
M40C	<i>motB</i>	81.23	75.35	contig00001	NP_253640	Flagell motorisk protein
M40A	<i>motC</i>	99.73	82.64	contig00026	NP_250151	
M40C	<i>motC</i>	99.87	81.13	contig00003	NP_250151	Sannsynligvis ytre membranproteinforløper
M40C	<i>motY</i>	81.88	75.56	contig00015	NP_252216	
M40A	<i>pilB</i>	99.71	78.06	contig00071	NP_253216	Type 4 fimbrial biogenese protein
M40C	<i>pilB</i>	99.82	79.61	contig00002	NP_253216	
M40A	<i>pilG</i>	96.81	89.37	contig00006	NP_249099	Twitching motilitetsprotein
M40C	<i>pilG</i>	96.81	88.86	contig00001	NP_249099	
M40A	<i>pilH</i>	100.00	89.07	contig00006	NP_249100	Twitching motilitetsprotein
M40C	<i>pilH</i>	100.00	88.80	contig00001	NP_249100	
M40A	<i>PilI</i>	91.25	80.69	contig00006	NP_249101	Twitching motilitetsprotein
M40C	<i>PilI</i>	96.09	80.46	contig00001	NP_249101	
M40A	<i>pilJ</i>	98.93	84.26	contig00006	NP_249102	Twitching motilitetsprotein
M40C	<i>pilJ</i>	98.93	84.60	contig00001	NP_249102	
M40A	<i>pilM</i>	99.91	80.96	contig00032	NP_253731	Type IV pilus indre membranplattformprotein
M40C	<i>pilM</i>	99.91	81.80	contig00001	NP_253731	
M40C	<i>pilN</i>	90.62	75.14	contig00001	NP_253730	Type IV pilus indre membranplattform protein
M40A	<i>pilO</i>	95.99	75.04	contig00032	NP_253729	
M40A	<i>pilR</i>	99.93	85.25	contig00022	NP_253237	To-komponents responsregulator
M40C	<i>pilR</i>	99.93	84.80	contig00025	NP_253237	
M40A	<i>pilT</i>	99.81	88.00	contig00005	NP_249086	Twitching motilitetsprotein
M40C	<i>pilT</i>	99.81	87.22	contig00005	NP_249086	
M40A	<i>pilU</i>	99.65	87.22	contig00005	NP_249087	Twitching motilitetsprotein
M40C	<i>pilU</i>	99.65	86.70	contig00005	NP_249087	
M40C	<i>tagR</i>	92.00	76.16	contig00027	NP_248761	Type IV sekresjonsassosiert protein som positivt regulerer PpkA
M40C	<i>vgrG1a</i>	95.45	77.58	contig00027	NP_248781	Type IV sekresjonssystem substrat VgrG
M40A	<i>waaA</i>	86.85	77.23	contig00046	NP_253675	Lipopolysakkaridkjerne biosyntese protein
M40C	<i>waaA</i>	78.57	78.57	contig00001	NP_253675	
M40A	<i>waaC</i>	81.84	75.11	contig00038	NP_253698	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid (KDO) transferase [LPS (VF0085)]
M40A	<i>waaF</i>	99.13	81.04	contig00038	NP_253699	Heptosyltransferase [LPS]
M40C	<i>waaF</i>	97.50	79.51	contig00001	NP_253699	
M40A	<i>waaG</i>	98.04	80.16	contig00038	NP_253697	B-Bånd O-antigenpolymerase [LPS]
M40C	<i>waaG</i>	97.77	81.29	contig00001	NP_253697	
M40A	<i>waaP</i>	94.42	77.08	contig00038	NP_253696	UDP-glukose: (heptosyl) LPS alfa 13-glukosyltransferase WaaG
M40C	<i>waaP</i>	93.80	76.48	contig00001	NP_253696	

M40A	<i>xcpA/pilD</i>	96.91	79.60	contig00071	NP_253218	Type IV prepilin peptidase
M40C	<i>xcpA/pilD</i>	97.94	78.88	contig00002	NP_253218	
M40C	<i>xcpQ</i>	90.59	78.46	contig00004	NP_251795	Generell sekresjonsvei protein D
M40C	<i>xcpR</i>	95.89	83.15	contig00004	NP_251793	Generell sekresjonsvei protein E
M40C	<i>xcpS</i>	99.84	79.75	contig00004	NP_251792	Generell sekresjonsvei protein F
M40C	<i>xcpT</i>	89.71	83.29	contig00004	NP_251791	Generell sekresjonsvei protein G
M40C	<i>xcpV</i>	80.00	76.36	contig00004	NP_251789	Generell sekresjonsvei protein I
M40A	<i>cvfB</i>	-	-	-	-	Konservert virulens faktor B
M40C	<i>cvfB</i>	-	-	-	-	
M40A	<i>phoP</i>	-	-	-	-	Virulens transkripsjon
M40C	<i>phoP</i>	-	-	-	-	regulatorisk protein
Toksingener						
M40A	<i>RelE2</i>	-	-	-	-	Toxin
M40C	<i>RelE2</i>	-	-	-	-	Toxin
M40A	<i>RelB</i>	-	-	-	-	Antitoxin
M40A	<i>RelE</i>	-	-	-	-	mRNA interferase toxin
M40C	<i>RatA</i>	-	-	-	-	Ribosome association toxin
M40A	<i>RatA</i>	-	-	-	-	Ribosome association toxin
M40C	<i>VgrG1</i>	-	-	-	-	Actin cross-linking toxin
M40A	<i>HigA</i>	-	-	-	-	Antitoxin
M40C	<i>HigA</i>	-	-	-	-	Antitoxin
M40A	<i>FitB</i>	-	-	-	-	Toxin
M40A	<i>YhaV</i>	-	-	-	-	Ribonuclease toxin
M40A	<i>PrlF</i>	-	-	-	-	Antitoxin
M40A	<i>apxIB</i>	-	-	-	-	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein"

* Søk i annoteringsprogrammet PROKKA viser ikke Coverage (%), identitet (%) eller accession-nr.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway