



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Multiresistente bakteriestammer fra vannmiljøer

- deteksjon av betalaktamaser med utvidet spektrum blant bakterieisolater ved bruk av fenotypiske og genotypiske metoder**

Multidrug resistant bacterial strains from aquatic environments

- Detection of extended spectrum beta-lactamases among bacterial isolates using phenotypic and genotypic methods

Astrid Brekke Øye

Kjemi- og bioteknologi

FORORD

Denne oppgaven ble utført som et avsluttende arbeid av en mastergrad i kjemi- og bioteknologi ved fakultetet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø – og biovitenskapelig universitet (NMBU) våren 2020. Fordypning i temaet antibiotikaresistens har vært svært spennende og tankevekkende, og alt fra det praktiske arbeidet til research og selve skriveprosessen har vært både utfordrende og lærerikt.

En stor takk må rettes til veileder professor Bjørn-Arne Lindstedt, som har svart på store og små spørsmål, lest utkast og kommet med gode tilbakemeldinger. Videre vil jeg også si takk til stipendiat Misti Dawn Finton for god hjelp og oppfølging på laben. Til slutt vil jeg rette en stor takk til min medstudent Amanda Eliassen som jeg utført forsøket sammen. Jeg er svært takknemlig for selskapet på laben og for samarbeidet, selv om vi ikke kunne møtes på lesesalen slik som planlagt.

Utover det faglige må jeg takke familien min som har bidratt med både korrekturlesing og uvurderlig moralsk støtte under arbeidet med oppgaven. Gitt den spesielle situasjonen vi var kommet i var dette helt avgjørende for meg.

Oslo, 2 juni, 2020

Astrid Brekke Øye

ABSTRAKT

Utviklingen av antibiotikaresistens (AR) blant viktige patogene bakterier anses som å være en av de største helsetruelsene globalt i moderne tid. Produsenter av ekstendert-spektrum betalaktamaser (ESBL) og karbapenemaser blant gram-negative Enterobacteriaceae er ansett som spesielt viktige faktorer i utviklingen av denne trusselen. Det er en voksende forståelse for miljøets viktige rolle både i utvikling og spredning av AR. Formålet med denne masteroppgaven var å undersøke forekomsten av ESBL-produserende bakterier i akvatiske miljøer, samt grad av klinisk resistens og virulens blant disse. Vannprøver ble samlet inn fra tre dammer på campus Ås ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), filtrert og grodd på selektivt kromogent medium for ESBL-deteksjon. 16S rRNA fra alle isolatene ble sendt til Sanger-sekvensering for identifikasjon. Det ble benyttet tre multipleks primermikser for genotypisk deteksjon av ESBL-enzymmer i tillegg til to for å detektere karbapenemaser. PCR-produktene ble kjørt på 1 % gelelektroforese, og prøver med positivt bånd ble nøyere undersøkt med singelpleks PCR. Utvalgte prøver ble sendt til helgenomsekvensering med Illumina MiSeq for å identifisere virulens- og resistensgener, samt mer nøyaktig identifikasjon. Til slutt ble det utført antimikrobiell sensitivitetstesting (AST) av utvalgte isolater for å undersøke grad av AR mot 12 ulike antibiotika. Dette ble gjort ved hjelp av gradient-diffusjons metoden.

Fem bakterieisolater ble dyrket frem på det selektive mediet. Sanger-sekvensering av 16S rRNA antydte at isolatene tilhørte slektene *Escherichia*, *Serratia*, *Pseudomonas* og *Lewinella*. En av prøvene ble ikke identifisert. Helgenomsekvensering identifiserte to av isolatene som *E. coli* og *S. fonticola*. *E. coli*-stamme ble i tillegg identifisert som sekvenstype ST1193 serotype O75:K1:H5, og var «multidrug»-resistent (MDR) samt bar på en rekke virulensdeterminanter som var assosiert med uropatogene *E. coli* (UPEC). Stammen bar også ESBL-genet *bla*_{CTX-M-15}. *S. fonticola*-stammen bar et *bla*_{FONA}-gen, som er et iboende og kromosomalt ESBL-gen. *E. coli*-isolatet samt isolatet identifisert som en *Lewinella*-art i henhold til 16S rRNA sekvensering kunne på bakgrunn av AST-resultatene beskrives som MDR, og var resistente mot blant annet cefotaxim og trimetoprim. ST1193-stammen var resistent mot ciprofloxacin.

Det ble konkludert med at MDR organismer med produksjon av ESBL fantes i Andedammen og Niagara-dammen på campus Ås ved NMBU, både i form av miljøbakterier og en klinisk signifikant patogen *E. coli*-stamme.

ABSTRACT

The emergence of antibiotic resistance (AR) among important pathogenic bacteria is considered to be one of the greatest health threats globally in modern times. Bacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and carbapenemases among gram-negative Enterobacteriaceae are considered particularly important factors in the development of this threat. There is a growing recognition of the important role of the environment in both the development and dissemination of AR. The purpose of this thesis was to investigate the presence of ESBL-producing bacteria in aquatic environments, as well as the degree of clinical resistance and virulence among them. Water samples were collected from three ponds on the Ås campus at the Norwegian University of Life Sciences (NMBU), filtered and grown on selective chromogenic medium for ESBL detection. 16S rRNA from all the isolates were sent to Sanger sequencing for identification. Three multiplex primer mixes were used for genotypic detection of ESBL enzymes in addition to two for the detection of carbapenemases. The PCR products were run on 1% gel electrophoresis, and positive band samples were examined more closely by singleplex PCR. Selected samples were sent for whole-genome sequencing with Illumina MiSeq to identify virulence and resistance genes, as well as more accurate identification. Finally, antimicrobial sensitivity testing (AST) of selected isolates was performed to examine the degree of AR against 12 different antibiotics. This was done using the gradient-diffusion method.

Five bacterial isolates were grown on the selective medium. Sanger sequencing of 16S rRNA suggested that the isolates belonged to the genera *Escherichia*, *Serratia*, *Pseudomonas* and *Lewinella*. One of the samples was not identified. Whole-genome sequencing identified two of the isolates as *E. coli* and *S. fonticola*. The *E. coli* strain was additionally identified as sequence type ST1193 serotype O75:K:H5, and was multidrug resistant (MDR) as well as carrying a number of virulence determinants associated with uropathogenic *E. coli* (UPEC). The strain also carried the ESBL gene *bla*_{CTX-M-15}. The *S. fonticola* strain carried a *bla*_{FONA} gene, which is an intrinsic and chromosomal ESBL gene. The *E. coli* isolate as well as the isolate identified as a *Lewinella* species according to 16S rRNA sequencing could be described as MDR on the basis of the AST results and were resistant to cefotaxime and trimethoprim, among others. The ST1193 strain was resistant to ciprofloxacin.

It was concluded that MDR organisms harbouring and producing ESBL were found in Andedammen and Niagara on the Ås campus at NMBU, both in the form of environmental bacteria and a clinically significant pathogenic *E. coli* strain.

FORKORTELSER

3GC	Tredje-generasjons cefalosporiner
AR	Antibiotikaresistent
APEC	Avian patogenisk <i>Escherichia coli</i>
AmpC	Ampicillinase C
AR	Antibiotikaresistens
ARG	Antibiotikaresistensgen
<i>bla</i>	Betalaktamasegen
BLAST	Basic Logical Alignment Search Tool»
bp	Basepar
CARD	«The Comprehensive Antibiotic Resistance Database»
CRE	Karbapenemresistente bakterier fra Enterobacteriaceae familien
CTX-M	Cefotaksimase
DEC	Diarégenisk <i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
ECOFF	Ecological Cut-OFF
EHEC	Enterohemoragisk <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogenisk <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Betalaktamaser med utvidet spektrum (ekstendert-spektrum betalaktamaser)
EUCAST	«European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing»
ExPEC	Ekstraintestinale <i>Escherichia coli</i>
DNA	Deoksyribonukleinsyre
<i>gyrA</i>	GyraseA
HGO	Horisontal genoverføring
HGS	Helgenomsekvensering
MDR	«Multidrug» resistente
MGE	Mobile genetiske elementer («mobile genetic elements»)
MIC	«Minimum bacterial concentration»
nBLAST	«Nucleotide Basic Logical Alignment Search Tool»
NCBI	«National Center for Biotechnology Information Search database»
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NMEC	Neonatal meningitt <i>Escherichia coli</i>

NORM	Norges overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	NORM – Veterinærinstituttet
parE	DNA topoisomerase IV subenhet
parC	DNA topoisomerase IV subenhet
PCR	«Polymerase chain reaction»
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
ST	Sekvenstype
UTI	“Urinary tract infections” (Urinveisinfeksjoner)
UPEC	Uropatogeniske Escherichia coli
VFDB	«The virulence factor database»

INNHALDSFORTEGNELSE

1 INNLEDNING	5
2 TEORETISK BAKGRUNN	6
2.1 VIRKEMÅTER FOR ANTIBIOTIKA	6
2.2 RESISTENSMEKANISMER	7
2.2.1 Iboende resistensdeterminanter	7
2.2.2 Horisontal genoverføring	10
2.3 MULTIRESISTENTE ORGANISMER	12
2.4 BETALAKTAMASER OG EKSTENDERT-SPEKTRUM BETALAKTAMASER (ESBL)	12
2.5 VIRULENS: KOSELEKSJON OG HØYRISIKOKLONER	14
2.6 MILJØET SOM RESERVOAR FOR UTVIKLING OG SPREDNING AV AR OG ARG	16
2.7 DETEKSJON AV ESBLER	18
2.7.1 Fenotypisk deteksjon	18
2.7.2 Genotypisk deteksjon	19
2.8 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	20
3 MATERIALER OG METODER	21
3.1 PROSESS	21
3.2 FILTRERING OG RENDYRKNING PÅ SELEKTIVT, KROMOGENT MEDIUM	24
3.3 ISOLERING AV DNA	24
3.3.1 Renhetsbestemmelse og kvantifisering av ekstrahert DNA	25
3.4 SANGER-SEKVENSERING AV 16S RRNA	25
3.4.1 PCR amplifisering	25
3.4.2 Gelelektroforese	27
3.4.3 Rensing av PCR-produkt og Sanger-sekvensering	27
3.4.4 Databehandling av sekvenserings-resultater	27
3.5 GENOTYPISK DETEKSJON AV RESISTENSGENER	28
3.5.1 Multi- og singelpleks PCR med ESBL- og CAR-primermikser	28
3.5.2 Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq	30
3.5.3 Dataanalyse av MiSeq-resultatene	31
3.6 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	31
4 RESULTATER	33
4.1 FENOTYPISKE RESULTATER OG 16S RRNA	33
4.2 RENHETSMÅLING OG KVANTIFISERING AV ISOLERT DNA	36
4.3 GENOTYPISK DETEKSJON AV RESISTENS	37

4.3.1 Multipleks og singelpleks PCR	37
4.3.2 Sanger-sekvensering	38
4.3.3 MiSeq-sekvensering	39
4.4 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	45
5 DISKUSJON	47
5.1 FENOTYPISK DETEKSJON	47
5.2 GENOTYPISK DETEKSJON	49
5.2.1 16S rRNA Sanger-sekvensering	49
5.2.2 Multi- og singelplex PCR for screening av viktige ARG	50
5.3 VIRULENS	50
5.3.1 <i>E. coli</i> -stamme ST1193, serotype O75:K1:H5	50
5.3.2 Fimbriae og adhesjon	52
5.3.3 Autotransportører	53
5.3.4 Intimin-lignende proteiner	54
5.3.5 Jernopptakssystemer	55
5.3.6 «Pathogenicity associated islands» (PAI)	56
5.3.7 Sekretede toksiner	57
5.3.8 <i>Serratia fonticola</i> : virulens	58
5.3.9 OmpA	59
5.3.10 Type VI sekresjonssystem	59
5.4 ANTIBIOTIKARESISTENSGENER	61
5.4.1 Mutasjoner i mål for kinoloner	61
5.4.2 <i>tetB</i>	62
5.4.3 CTX-M-15	63
5.4.4 <i>dfrA17</i> (trimetoprimresistens)	65
5.4.5 <i>mphA</i> og <i>erm</i> (makrolidresistens)	66
5.4.6 Generelt om resistens blant <i>Serratia</i> og FONA	67
5.4.7 <i>AmpC</i>	68
5.4.8 Effluks-proteiner	69
5.5 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING	70
5.5.1 Ampicillin-resistens	70
5.5.2 Resistens mot cefotaxim og cefepim	71
5.5.3 Resistens mot erytromycin	72
5.5.4 Resistens mot erytromycin	72
5.5.5 Trimetoprim-resistens	73
5.5.6 <i>Lewinella</i> spp. og antibiotikaresistens	74
5.5.7 Multiresistens (MDR)	75

5.6 OPPHAV OG SPREDNING AV STAMMENE	76
6 KONKLUSJON	78
7 REFERANSELISTE	80
Vedlegg A – Treff ved BLAST av 16S rRNA og singelpleks-PCR-produkt	i
Vedlegg B – Innhold i primermikser til ESBL og CAR multipleks PCR	iii
Vedlegg C – Gelbilder	v
Vedlegg D – Resultater fra dataanalyser av HGS-resultater, virulens- og resistensgener identifisert gjennom NCBI, VFDB og CARD	viii
Vedlegg E – Resultater fra AST	lvii

1 INNLEDNING

Begrepet «antibiotika» inkluderer i dag alle organiske molekyler som hemmer veksten av eller dreper mikrober gjennom spesifikke interaksjoner med cellulære mål, både naturlige og syntetiske eller semi-syntetiske stoffer (Davies & Davies, 2010). Antibiotika produseres naturlig i miljøet, for eksempel av mange jordmikrober, som en adaptiv overlevelsesmekanisme i konkurransen mellom arter (Sykes, 2010). Introduksjon av antibiotika til klinisk bruk har gjort mange moderne medisinske prosedyrer mulig og kan sies å være det største medisinske gjennombruddet det siste århundret (Katz & Baltz, 2016). Utviklingen av antibiotika med nye virkemåter har imidlertid stort sett stanset opp siden slutten av 80-tallet. Mye av grunnen til dette er relativt lav økonomisk avkastning, i tillegg til at de eksisterende medikamentenes funksjon trues av økende resistensutvikling blant patogenene (Yazdankhah S., 2013). Antibiotikaresistens (AR) blant bakterier ble observert allerede før penicillin ble introdusert på markedet (Mohr, 2016). Fenomenet forekommer naturlig som en mekanisme for adaptiv konkurranse blant miljøbakterier (Allen et al., 2010), men utviklingen har sannsynligvis blitt akselerert som følge av mennesker sitt ekstensive bruk og misbruk av antibiotika (Alekshun & Levy, 2007). I dag er fremveksten av svært resistente gram-negative bakterier, spesielt produsenter av ekstandert spektrum betalaktamaser (ESBL) fra Enterobacteriaceae, ansett som en global trussel mot behandlingen av alvorlige bakterielle infeksjoner (J. D. Pitout & Laupland, 2008). Disse genene har evnen til å spre seg raskt grunnet høy forekomst på mobile genetiske elementer (MGE) som kan overføres via horisontal genoverføring (HGO) (Bradford, 2001; Soucy, Huang, & Gogarten, 2015), og er en viktig årsak bak den økende forekomsten av «multidrug»-resistens (MDR) (Davies & Davies, 2010).

Tidligere har fokuset rundt kartlegging av AR-problemet hovedsakelig vært rettet mot sykehus, industri og landbruk, men det er i dag en voksende forståelse for at også miljøet, kanskje spesielt akvatiske miljøer, er et viktig reservoar for utviklingen og spredningen av antibiotikaresistensgener (ARG) (Allen et al., 2010; Singer, Shaw, Rhodes, & Hart, 2016; Waseem, Williams, Stedtfeld, & Hashsham, 2017). I denne oppgaven ble det samlet inn vannprøver fra dammer på campus Ås ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) med mål om å undersøke forekomst av ESBL-produserende og multiresistente bakterier i disse miljøene.

2 TEORETISK BAKGRUNN

2.1 Virkemåter for antibiotika

Antibakterielle stoffer kan ha en bakteriedrepende effekt (batericid) eller en hemmende (bakteriostatisk) effekt (Kohanski, Dwyer, & Collins, 2010). Virkemekanismene kan deles inn i fem kategorier (Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi, & Kamal, 2015), hvorav tre sentrale mekanismer vil bli kort beskrevet her. Den første er hemming av celleveggsyntesen. Dette er for eksempel måten penicillin fungerer på. Strukturen til dette antibiotikumet består blant annet av en betalaktam-ring som brukes til å hemme flere enzymer som er essensielle i oppbyggingen av celleveggen (kalt penicillin-bindende proteiner (PBP)) hos bakterier (Schneider & Sahl, 2010). Etter penicillin har mange flere betalaktam-antibiotika blitt utviklet, og i tillegg har flere klasser som hemmer celleveggsyntesen gjennom samme mekanisme, men med andre målmolekyl enn PBP blitt oppdaget. Målene for disse typene er vanligvis høyt konserverte lipid-bundne intermediater av byggesteinene i celleveggsyntesen, slik som lipid II (Breukink & de Kruijff, 2006). En annen mekanisme er hemming av proteinsyntesen. Antibiotika kan hemme ulike trinn i syntesen av proteiner ved å interferere med funksjonen til subenhetene i bakterielle ribosomer (50S og 30 S) (Nikaido, 2009). Tetrasykliner interfererer for eksempel med proteinsyntesen ved å binde til 30S subenheten og slik svekke interaksjonen mellom ribosomet og tRNA (Chopra & Roberts, 2001). En tredje mekanisme er hemming av nukleinsyresyntesen. Et eksempel er kinoloner, som interfererer med type II og IV topoisomerase i tillegg til DNA-gyrase. Disse kompleksene utfører essensielle funksjoner under DNA-replikasjon (Aleksun & Levy, 2007). Antibiotika kan også hemme andre viktige biosyntese-prosesser. Eksempelvis hemmer sulfanomider og trimetoprim essensielle trinn i syntesen av folat, som er en kofaktor i nukleotid-syntesen (Shaikh et al., 2015).

Betalaktamer er den vanligste formen for antibiotika i behandling av bakterieinfeksjoner (Shaikh et al., 2015), og er en av de typene som har blitt brukt lengst, innledet av oppdagelsen og utviklingen av penicilliner. Felles for alle betalaktamer er at de inneholder en ring-struktur (betalaktam-ring) som strukturelt ligner på substratene til enzymer som er involvert i kryssbindingen av peptidkjeder under den bakterielle celleveggsyntesen. Dette fører til at enzymene gjenkjenner og binder betalaktam-ringen i stedet for NAG-NAM-monomerene, og syntesen blir hemmet (Schneider & Sahl, 2010). Ettersom celleveggsyntesen er en essensiell funksjon for overlevelse hos bakterier har betalaktamer generelt en bakteriocid effekt (Kohanski et al., 2010). Etter oppdagelsen av penicillin har flere typer betalaktam-antibiotika

blitt introdusert på markedet, både semisyntetiske derivater, og også flere stoffer fra ulike miljøorganismer (Kong, Schneper, & Mathee, 2010). Blant annet ble karbapenem isolert fra jordbakterie-slekten *Streptomyces* (Katz & Baltz, 2016).

2.2 Resistensmekanismer

Antibiotikaresistens er reduksjon i effektiviteten til et medikament i behandling av en sykdom (Shaikh et al., 2015). Bakterier kan benytte flere ulike mekanismer for å unngå effekten av antibiotika. En mekanisme er inaktivering av antibiotikumet gjennom hydrolyse av kjemiske bindinger (Shaikh et al., 2015). Eksempelvis er det denne mekanismen betalaktamaser benytter (J. D. Pitout & Laupland, 2008). Bakterier kan også benytte reduksjon eller oksidasjon av antibiotikumet, men dette er relativt sjeldent blant patogener (Shaikh et al., 2015). Antibiotisk inaktivering gjennom overføring av kjemiske grupper er en annen mulig mekanisme. For eksempel er *erm*-gener metylaser som gir resistens mot makrolider slik som erytromycin, i tillegg til linomyciner og streptograminer (Gomes et al., 2017). Til slutt kan bakterier benytte målsetemodifisering for å oppnå resistens mot ulike agens. Eksempelvis er spesifikke mutasjoner i medikamentmålene topoisomerase IV og DNA-gyrase forbundet med svært fluorokinolone-resistente stammer (Alekshun & Levy, 2007).

Bakteriell antibiotikaresistens kan oppnås gjennom iboende eller tilegnede mekanismer (Alekshun & Levy, 2007). Iboende mekanismer kodes av naturlig forekommende gener kodet på kromosomet, mens tilegnede mekanismer innebærer mutasjoner i gener som er mål for ulike antibiotika, samt overføring av resistensdeterminanter kodet på mobile genetiske elementer (MGE). Dette skjer hovedsakelig gjennom horisontal genoverføring (HGO).

2.2.1 Iboende resistensdeterminanter

Det «iboende resistomet» hos bakterier kan defineres som de elementene som bidrar direkte eller indirekte til AR, og som ikke har oppstått gjennom HGO eller som et resultat av eksponering til antibiotika (Wright, 2010). Iboende resistens-elementer kan identifiseres hos mange bakterier ettersom de er uavhengige av nylig oppstått selektivt press fra menneskelig bruk og utslipp av antibiotika, selv om de ikke alltid er ansett som iboende resistente fra et klinisk ståsted (Olivares Pacheco et al., 2013). Tre viktige årsaker til iboende resistens er manglende medikamentmål, kromosomale enzymer som inaktiverer antibiotikumet, og redusert opptak av antibiotikumet gjennom modifisert membranpermeabilitet og/eller efflukspumper

(Olivares Pacheco et al., 2013). Ekspresjon av disse genene er ofte tett regulert, og mutasjoner i regulatoriske gener kan resultere i overekspresjon og høyt nivå av AR mot agensene de interagerer med (Jacoby, 2009).

Effluks-pumper bidrar til klinisk AR blant gram-negative bakterier både gjennom å pumpe ut noen spesifikke agenser fra cellen, eller de kan gjenkjenne mange strukturelt ulike stoffer som substrater (Piddock, 2006). Proteinene kan generelt deles i fem familier: ABC-transportører; «major facilitator superfamily» (MFS); «multidrug and toxic compound extrusion» (MATE)-familien; «small multidrug resistance» (SMR)-familien og «resistance-nodulation-cell division» (RND)-familien (Li & Nikaido, 2004; Nikaido, 2009). Effluks er blant de vanligste mekanismene bak klinisk tetrasyklin-resistens, og det er identifisert en rekke ulike tetrasyklin-effluksproteiner (Alekshun & Levy, 2007; Roberts, 2005). Disse kodes av *tet*-genene, slik som *tetA* og *tetB*. Efflukspumper er vanligvis kodet kromosomalt, men Tet-proteiner kan bli mobilisert på MGE (Chopra & Roberts, 2001). *tetG* hos *Salmonella* bæres eksempelvis på en «genomic island 1» (SGI1) som inneholder virulensdeterminanter og en MDR-region som bærer resistens mot tetrasyklin og andre komponenter (referanser i (Beceiro, Tomas, & Bou, 2013)). Tet-transportørene er et eksempel på en efflukspumpe som virker på en gruppe svært spesifikke substrater (tetrasykliner), og er medlemmer av MFS-familien (Chopra & Roberts, 2001).

Andre typer effluksproteiner kan binde mange strukturelt ulike stoffer og dermed bidra til mer bredspektrede resistensfenotyper (MDR-efflukspumper) (Piddock, 2006). Blant gram-negative bakterier, inkludert *E. coli* og diverse ikke-fermenterende arter som f.eks. *P. aeruginosa*, er RND-familien særlig viktig. Denne gruppen består av transportør-proteiner som drives av en protongradient, og dette kalles derfor sekundærtransport (Davies & Davies, 2010). Tidligere var det antatt at den høye graden av iboende resistens blant gram-negative bakterier skyldtes den tykke yttermembranen, men det har vist seg at også transport av komponenter gjennom NDR-efflukspumper er en viktig årsak. Efflukssystemene AcrAB-TolC hos *E. coli* og MexAB-OprM hos *P. aeruginosa* er blant de best beskrevne systemene, og medierer MDR hos disse organismene (Piddock, 2006). Regulering av efflukspumper skjer gjennom spesifikke reseptorgener, globale regulator-gener, promotere og insersjonssekvenser (Piddock, 2006). Ekspresjon av RND-pumper hemmes av spesifikke repressor-proteiner, og overproduksjon av efflukspumper blant kliniske isolater forekommer ofte som et resultat av mutasjoner i repressor-genene (Alekshun & Levy, 2007; Davies & Davies, 2010; Piddock, 2006). F.eks. kan mutasjon

av *mexR* føre til overproduksjon av MexAB-OprM systemet i *P. aeruginosa*. Eksempelvis har en multiresistent, virulent *P. aeruginosa*-stamme kalt «Liverpool epidemic strain» (LES) blitt beskrevet fra pasienter med cystisk fibrose i Storbritannia. Denne stammen karakteriseres av oppregulering av efflukspumpen MexAB-OprM som assosieres med resistens mot betalaktamer og aminoglykosider og i tillegg med forhøyet virulens pga involvering i «quorum sensing»-systemet (referanser i (Beceiro et al., 2013)).

RND-efflukspumper har ikke oppstått som et resultat av menneskelig bruk av antibiotika, noe som er tydelig ettersom de fleste av genene er kromosomkodete og er til stede i stammer isolert lenge før «antibiotika-tidsalderen». I tilfellet med AcrB-TolC fra *E. coli*, og andre enteriske bakterier, er den viktigste fysiologiske funksjonen sannsynligvis å beskytte bakterien mot gallesalter (Li & Nikaido, 2004; Piddock, 2006). Hos jordorganismer, slik som *P. aeruginosa*, er det sannsynlig at RND-effluks er involvert i transport av toksiske komponenter utskilt av andre jordorganismer i miljøet (Li & Nikaido, 2004). RND-efflukspumper kan imidlertid bidra til økt resistensnivå blant klinisk relevante patogener. Selv om for eksempel resistens mot fluorokinoloner stort sett tilskrives mutasjoner i medikamentmålet, ser også effluks av antibiotikumet ut til å være viktig for et høyt resistensnivå (Piddock, 2006).

Membranpermeabilitet spiller også en rolle i gram-negativ AR. Den gram-negative yttermembranen er en barriere mot ulike komponenter, og små, organiske molekyler slippes uspesifikt inn og ut gjennom poriner i membranen. Imipenem slipper f.eks. inn gjennom porinet OprD hos *P. aeruginosa*, og mutasjoner som senker ekspresjonen av OprD gjør derfor bakterien mindre sensitiv ovenfor imipenem og bidrar slik til klinisk resistens (Alekhun & Levy, 2007). Et tilsvarende porin i *E. coli* er OmpF. I tillegg til en mengde spesifikke resistensmekanismer, har bakterier utviklet høy grad av resistens gjennom kombinasjon av lav membranpermeabilitet og effluksystemer (Nikaido, 2009). Organismer som *Pseudomonas aeruginosa* og *Acinetobacter baumannii* er spesielt bekymrende ettersom det finnes svært få, eller i noen tilfeller ingen, medikamenter mot XDR- eller PDR-stammer av disse bakteriene (Iredell, Brown, & Tagg, 2016).

Mange gram-negative bakterieslekter har et naturlig forekommende betalaktamasegen på kromosomet (Bradford, 2001). Disse enzymene stammer sannsynligvis fra penicillin-bindende proteiner (PBP) og har oppstått som følge av selektivt press fra betalaktam-produserende jordorganismer (Ghuysen, 1991).

AmpC-betalaktamaser er klinisk signifikante cefalosporinaser som finnes kromosomalt hos mange medlemmer av Enterobacteriaceae. De kan hydrolyserer de fleste penicilliner i tillegg til første- og andre generasjons cefalosporiner, og inhiberes ikke av klassiske betalaktamasehemmere slik som klavulansyre (Jacoby, 2009). Ekspresjonen av dem, i likhet med efflukssystemer, er typisk tett regulert og kan induseres ved tilstedeværelse av ulike betalaktamer (Lister, Wolter, & Hanson, 2009; Piddock, 2006). Hos *P. aeruginosa* har mutasjoner i genet for transkripsjonsfaktoren AmpR blitt vist å føre til konstitutiv ekspresjon av AmpC-genet, selv i fravær av antibiotika (Lister et al., 2009). Overekspresjon av AmpC hos *E. coli* av lignende årsaker har også blitt demonstrert (Mataseje et al., 2009). Ved overekspresjon kan AmpC mediere resistens mot bredspektrede cefalosporiner (Jacoby, 2009). *E. coli*-stammer har vanligvis et kromosomalt AmpC-gen, og kromosomale *bla*_{AmpC}-gener er vidt distribuert blant miljøbakterier, blant annet i arter som er assosiert med vann slik som flere ulike *Enterobacter* (Jacoby, 2009). *bla*_{AmpC}-gener kan også være lokalisert på overførbare plasmider (avsnitt 2.2). Plasmider som bærer *ampC*-gener har også ofte flere andre ARG, blant annet inkludert aminoglykosider, kinoloner, tetrasykliner og trimetoprim, og genene er vanligvis del av et integron (Jacoby, 2009). Inersjons-sekvensen ISEcp1 har blitt vist å være i stand til å mobilisere et kromosomalt *bla*_{AmpC}-gen til et plasmid (Lartigue, Poirel, Aubert, & Nordmann, 2006).

Karbapenemer kan vanligvis brukes til å behandle infeksjoner grunnet AmpC-produserende bakterier. Det har imidlertid blitt observert at en kombinasjon av overekspresjon av AmpC, redusert membranpermeabilitet og økt effluks kan føre til klinisk resistens, for eksempel kan dette forekomme i kliniske isolater av *P. aeruginosa* som kan kombinere overekspresjon av AmpC med redusert ekspresjon av porinet OprD hvor karbapenemet imipenem slipper inn i cellen gjennom, i tillegg til aktivering av MexAB-OprM og andre efflukssystemer (referanser i (Jacoby, 2009)).

2.2.2 Horisontal genoverføring

Selv om mye kommer av iboende mekanismer, er resistens også ofte oppnådd gjennom tilegning av ekstrakromosomale elementer fra andre bakterier i miljøet. Dette inkluderer ulike typer mobile DNA-segmenter som plasmider, transposoner og integroner (Aleksun & Levy, 2007), og skjer gjennom en prosess kalt horisontal genoverføring (HGO) Her inngår

transduksjon, transformasjon og konjugasjon (Soucy et al., 2015). Transduksjon er levering av genetisk materiale via bakteriofager. Dette skjer gjennom at eksogent genetisk materiale innsettes i et fage-genom. Transformasjon er opptak av fritt, eksogent DNA fra miljøet. Konjugasjon krever fysisk kontakt mellom en donor og en akseptor via en konjugasjons-pilus som genetisk materiale overføres gjennom. Dette er en replikativ prosess, og både donor- og akseptor-cellen ender opp med en kopi av det overførte genetiske elementet (Bennett, 2008). De overførte genetiske elementene kalles mobile genetiske elementer (MGE). MGE kan deles inn i to generelle kategorier (Bennett, 2008). Elementer som kan overføres fra en celle til en annen inkluderer konjugative resistens-plasmider og -transposoner. Det er disse som overføres i HGO. Elementer som overføres fra ett sted til et annet innad i en celle inkluderer blant annet transposoner og genkassetter.

Plasmider er genetiske elementer som inneholder gener for resistens og mange andre egenskaper, og replikeres uavhengig av vertskromosomet. En bakterie kan inneholde flere plasmider samtidig, og disse bidrar til cellens totale genetiske potensial (Alekhun & Levy, 2007). Konjugative plasmider er i stand til å promotere sin egen og andre plasmiders overføring fra en bakteriecelle til en annen. De bærer gener som kan være periodevis nyttige for bakterien for overlevelse under ugunstige forhold, for eksempel ved eksponering for toksiske substanser slik som antibiotika, og de kan også bære virulensgener (Bennett, 2008). Plasmider som inneholder ett eller flere resistensgener kalles resistens-plasmider (R-plasmider). R-plasmider med lignende replikasjons-maskinerier kan ikke stabilt koeksistere i samme vertscelle, og dette har dannet grunnlaget for inndeling av plasmider i såkalte «inkompatibilitets-grupper» (Inc) (Nikaido, 2009). Et eksempel på en slik gruppe er IncF11-plasmider. Denne gruppen av R-plasmider er hovedsakelig assosiert med Enterobacteriaceae, og har stor evne til å tilegne seg og overføre ARG (Carattoli, 2011). *bla*_{CTX-M-15} (CTX-M, avsnitt 2.4) er i stor grad assosiert med denne gruppen (Canton, Gonzalez-Alba, & Galan, 2012).

Transposoner er MGE som kan forflytte seg mellom spesifikke genomiske områder, enten på plasmider, andre transposoner eller vertsgenomet, og koder gener for rekombinasjon (for eksempel rekombinase eller transposase). Konjugative transposoner kan fasilitere overføring av plasmider fra en organisme til en annen (Alekhun & Levy, 2007).

Integroner er genetiske elementer som benytter steds-spesifikk rekombinasjon, i motsetning til transposisjon, til å «fange opp» gener. Rekombinasjonssystemet deres består av *int*-genet, som

koder for integrase, og et sete der samlinger av korte DNA-biter kalt «genkassetter» kan innsettes av integrasen (Bennett, 2008). Genkassetter er små MGE som normalt sett inneholder ett enkelt gen. De skiller seg fra andre MGE i at de ikke inneholder gener nødvendig for mobilisering, og i stedet fanges opp og integreres på integroner (Recchia & Hall, 1995).

2.3 Multiresistente organismer

Når en organisme viser *in vitro* resistens mot minst én antimikrobiell agens fra tre eller flere antimikrobielle kategorier kalles den multiresistent («multidrug resistant – MDR») (Magiorakos et al., 2012). I tillegg finnes det bakterier som er ekstensivt resistente (XDR), det vil si resistente mot minst én agens i alle unntatt maks to antimikrobielle kategorier, og panresistente bakterier (PDR) som er resistente mot alle vanlig brukte antibiotika-typer (Magiorakos et al., 2012). Et eksempel på en slik bakterie er *Mycobacterium tuberculosis* som forårsaker tuberkulose. Både XDR- og PDR-stammer av denne bakterien er identifisert (Davies & Davies, 2010). MDR oppstår gjennom akkumulering av resistensgener på mobile plasmider eller transposoner, og/eller ved hjelp av effluks-systemer og redusert membranpermeabilitet (Nikaido, 2009). MGE slik som plasmider og transposoner kan bære på mange funksjonelt urelaterte gener. I tillegg til resistensgener er de også ofte assosiert med virulensdeterminanter. Akkumuleringen av multiple resistens- og virulensgener på MGE som overføres gjennom HGO kan derfor føre til koseleksjon av større antall resistensgener i tillegg til virulensgener (Soucy et al., 2015).

2.4 Betalaktamaser og ekstendert-spektrum betalaktamaser (ESBL)

Cefalosporin C ble isolert fra en stamme av *Cephalosporium acremonium* (Newton & Abraham, 1956). Siden har flere semisyntetiske cefalosporiner med bredere spekter av aktivitet blitt utviklet. Disse deles inn i såkalte «generasjoner» basert på antimikrobiell aktivitet (Karchmer, 2000). Første generasjon har god virkning mot gram-positive bakterier, men lavere mot gram-negative. Aktiviteten deres mot noen gram-negative organismer, slik som *E. coli* og *K. pneumoniae* er imidlertid god. Andre-generasjons cefalosporiner har noe bedre effekt mot gram-negative organismer, men er generelt mindre aktive enn første-generasjon. Tredje-generasjons cefalosporiner ble utviklet som følge av økende forekomst av betalaktamase-produserende organismer (Paterson & Bonomo, 2005). Disse medikamentene, som inkluderer blant annet cefotaxime, ceftazidime og aztreonam, ble på 80-allet vidt tatt i bruk mot alvorlige infeksjoner forårsaket av gram-negative bakterier (Bradford, 2001).

Betalaktamaser er bakterielle enzymer som hydrolyserer betalaktam-ringen på betalaktam-antibiotika og slik inaktiverer dem (J. D. Pitout & Laupland, 2008). Blant gram-negative bakterier er produksjon av betalaktamaser den vanligste mekanismen bak betalaktam-resistens (Kong et al., 2010). Introduksjonen av tredje-generasjons cefalosporiner (3GC), også kalt ekstendert-spektrum cefalosporiner, var derfor ansett som et viktig gjennombrudd i kampen mot disse enzymene (Paterson & Bonomo, 2005). 3GC er mindre aktive mot gram-positive organismer, men fungerer mye bedre mot bakterier i *Enterobacteriaceae*, inkludert betalaktamase-produserende stammer. Det tok imidlertid ikke lang tid før betalaktamaser i stand til å hydrolysere disse nye stoffene ble oppdaget, sannsynligvis som et resultat av selektivt press som følge av den vide bruken av disse nye medikamentene (Bradford, 2001). Denne gruppen betalaktamaser ble kalt «ekstendert-spektrum betalaktamaser» (ESBL) (Bradford, 2001). ESBL er generelt sett lokalisert på plasmider, og kan hydrolysere alle penicilliner, 3GC og monobactamer, men er sensitive overfor cefamyciner og karbapenemer. I tillegg er de generelt sett sensitive for betalaktamase-hemmere slik som klavulanat (Bonnet, 2004; Canton et al., 2012). Fjerde-generasjons cefalosporiner, eksempelvis cefepim, har også blitt utviklet. Disse har et bredere spekter av aktivitet sammenlignet med 3GC, og blir i mindre grad hydrolysert av betalaktamaser. De blir imidlertid fortsatt hydrolysert av ESBL (Karchmer, 2000).

En av flere måter å klassifisere betalaktamaser på er på bakgrunn av deres primærsekvenser og homologi mellom de ulike enzymene (Amblers system) (Shaikh et al., 2015). Ifølge denne ordningen deles betalaktamaser inn i fire klasser (A-D). Enzymer i klassene A, C og D er serin-betalaktamaser og enzymer i klasse B er metallo-betalaktamaser. En annen vanlig inndelingsmetode deler dem inn etter de funksjonelle egenskaper til enzymene (Bush–Jacoby–Medeiros' system) (Shaikh et al., 2015). Videre i oppgaven vil Amblers system benyttes. Hos gramnegative bakterier er induserbar ekspresjon av betalaktamaser vanlig blant kromosomale enzymer, mens plasmid-medierte enzymer generelt sett er konstitutivt uttrykt. Forbedret ekspresjon av deres hydrolytiske aktivitet er ofte regulert av promotere fra gener oppstrøms for betalaktamasegenet (Canton et al., 2012).

Det finnes ingen internasjonal rundt klassifisering av ESBL-enzymmer. I denne oppgaven brukes inndelingen fra Folkehelseinstituttet (FHI) (Folkehelseinstituttet, 2010b) som deler inn i klassene $ESBL_A$, $ESBL_M$ og $ESBL_{KARBA}$. De to førstnevnte gruppene er hovedsakelig resistente mot penicilliner og de fleste cefalosporiner, mens $ESBL_{KARBA}$ er resistente mot alle

betalaktamer, inkludert karbapenemer. ESBL tilhører klasse A betalaktamaser, og kodes av *bla*-gener (Bradford, 2001). ESBL er ofte lokalisert på store plasmider inneholdende flere andre resistensgener, for eksempel IncFII-plasmidene, som er linket til spredningen av *bla*_{CTX-M-15}. Kromosomale *bla*-gener kan bli mobilisert og integrert på plasmider eller transposoner (Bevan, Jones, & Hawkey, 2017). De mest utbredte ESBL-typene inkluderer TEM, SHV, CTX-M, VEB og GES enzymer. Blant disse er CTX-M vanligst, og man har sett en eksplosiv økning i forekomsten av disse enzymene den siste tiden (Canton et al., 2012).

En stor økning i antallet betalaktamaser har blitt beskrevet siden 1980-tallet (Davies & Davies, 2010), og blant klasse A betalaktamasene er ESBL ansett som et offentlig helseproblem. ESBL-produserende bakterier er ofte multiresistente, og infeksjoner er derfor forbundet med økt morbiditet og mortalitet som et resultat av feil klinisk behandling (J. D. Pitout & Laupland, 2008). ESBL produseres hovedsakelig av *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae*, men er også assosiert med andre arter fra Enterobacteriaceae, samt noen ikke-fermenterende arter (J. D. Pitout & Laupland, 2008). *E. coli* er en del av normalfloraen i tarmen hos mennesker og andre varmblodige dyr, men kan også være patogen og forårsake en rekke ulike infeksjoner. ESBL-produserende *E. coli* er i dag en viktig samfunnsassosiert patogen, spesielt assosiert med urinveisinfeksjoner (UTI) (Johann DD Pitout, Nordmann, Laupland, & Poirel, 2005).

2.5 Virulens: koseleksjon og høyriskokloner

Økt resistens er i mange tilfeller assosiert med redusert bakteriell virulens og/eller redusert «fitness», altså evne til overlevelse og reproduksjon (Beceiro et al., 2013). AR kan likevel bli vedlikeholdt i bakteriepopulasjoner, selv i fravær av eller ved lave konsentrasjoner av antibiotika, gjennom for eksempel kompensatoriske mutasjoner, «kostnadsfrie» resistensmutasjoner og koseleksjon gjennom akkumulering av resistens- og virulensdeterminanter på MGE (Andersson & Hughes, 2011). Koseleksjon av ARG kan forekomme i infeksjøs miljøer, og koseleksjon av virulensgener kan forekomme under selektivt press som følge av antibiotika-eksponering. IncF-plasmider er særlig viktig i denne sammenhengen da denne gruppen er den største gruppen plasmider involvert i spredning av resistens og virulens (Beceiro et al., 2013). Resistens er ikke i seg selv en virulensfaktor, men ettersom AR er nødvendig for å overleve under forhold med høyt ABP kan AR øke virulens eller fitness hos noen organismer i slike miljøer og gjøre dem i stand til å kolonisere nye nisjer. Dette er for eksempel viktig i forhold til opportunistiske patogener og deres evne til å infisere

pasienter med nedsatt immunforsvar. I helseassosierte settinger kan derfor resistente og/eller virulente varianter lett bli selektert for som følge av et høyt ABP. I samfunns-settinger er det som regel ingen direkte ABP, og kun lave konsentrasjoner av antibiotika. I disse situasjonene kan tilegning av resistens og/eller virulensgener ha en negativ effekt på bakteriens fitness (Beceiro et al., 2013). Det er imidlertid en økende forekomst av isolater som gjennom kompensatoriske mutasjoner og koseleksjons-mekanismer har evnen til å unngå en slik fitness-reduksjon selv i fravær av antimikrobielle stoffer. Disse er overrepresentert blant såkalte «høyrisiko-kloner» (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011).

I nyere tid har man sett flere tilfeller av multiresistente og virulente høyrisikokloner spre seg globalt. Slike kloner er svært effektive i spredningen av ARG, blant annet på grunn av høy grad av vertikal overføring (fra mor- til dattercelle), i tillegg til mange muligheter for spredning gjennom HGO til andre stammer grunnet den store klonale dissemineringen (Woodford, Turton, & Livermore, 2011). Assosiasjon med høyrisikokloner er antatt å være en av årsakene bak den globale spredningen av *bla*_{CTX-M}-gener. MLST-typing av CTX-M-produsenter har vist at noen få sekvenstyper (ST), som er gruppert i klonekomplekser (CC), stadig blir linket til CTX-M-enzymet. Dette kan indikere at de er involvert i spredningen av disse enzymene, og at enzymenes adaptive suksess muligens er avhengig av spesifikke ST eller CC (Canton et al., 2012). CTX-M-15-produserende *E. coli* er et eksempel på dette. De fleste produsentene av dette enzymet tilhører den internasjonalt spredte ST131-klonen. Denne klonen er relatert til serotype O25:H4 og den fylogenetiske gruppen B2 som er assosiert med virulente ekstraintestinale stammer. ST131 ble først beskrevet tidlig på 2000-tallet, og ble raskt spredt globalt. Denne klonen er sannsynligvis den bredest distribuerte resistente klonen i verden. Man har tidligere estimert at 30-60 % av fluorokinolone-resistente *E. coli* isolater tilhører denne klonen (Price et al., 2013). Koseleksjon av resistensgener og virulensgener på plasmider tilhørende IncFII-gruppen er antatt å være viktig i den store spredningen. STS131 er i tillegg til CTX-M-15 også assosiert med andre CTX-M-enzymet, både andre av gruppe 1 og flere distinkte grupper, samt at den er overrepresentert blant isolater som ikke produserer ESBL. Multiresistens kan ha fasilitert den globale spredningen av ST131, i tillegg til virulensfaktorer som hjelper med adhesjon og overlevelse i vert (Price et al., 2013). ST131 er assosiert med en rekke ulike infeksjoner, men er mest vanlig i UTI. Spredningen av multiresistente ekstraintestinale patogener *E. coli* (ExPEC)-stammer, hvorav ESBL-produserende ST131 har vært særlig viktig, har gjort UTI-behandling mer problematisk og har ført til økning i assosiert morbiditet og mortalitet (Woodford et al., 2011). Høyrisiko kloner med CTX-M-ekspressjon er med større

sannsynlighet koresistente mot andre antibiotika-typer, for eksempel aminoglykosider, trimetoprim-sulfametoxazole- og fosfomyicin. I tillegg til dette er CTX-M-assosierte *E. coli* svært virulente. Smitte foregår lett mellom familiemedlemmer fra koloniserte eller infiserte pasienter, og har også blitt funnet i ville dyr, kjæledyr og husdyr ((Woodford et al., 2011), og referanser der).

E. coli er en stor produsent av CTX-M, men er i mindre grad assosiert med karbapenemaser. Etersom karbapenemer er antibiotikatypen brukt som «siste utvei» ved behandling av alvorlige/kompliserte infeksjoner, ofte mot multiresistente organismer, er spredning av disse enzymene en stor helsebekymring globalt. I mange tilfeller finnes det få eller ingen behandlingsalternativer ved slike infeksjoner (Gupta, Limbago, Patel, & Kallen, 2011). En studie har også vist at ST131 kan rekruttere den spredende karbapenemasen NDM-1, og denne har blitt detektert i et *E. coli* ST131 isolat i Frankrike (Poirel, Hombrouck-Alet, Freneaux, Bernabeu, & Nordmann, 2010). Gitt det globale omfanget av denne klonen ville det vært svært uheldig dersom karbapenemaser skulle blitt etablert i denne eller andre høyrisiko kloner.

2.6 Miljøet som reservoar for utvikling og spredning av AR og ARG

Det er i dag en voksende forståelse for at forekomst av antibiotika-resistente bakterier og ARG i miljøet representerer en viktig arena for overføring av og utvikling av AR (Singer et al., 2016). På grunn av bakterier og ARG sin evne til å lett bevege seg mellom mennesker, dyr og miljøet er det nødvendig med en tilnærming til resistens-problemet som tar hensyn til dette. For det første er produksjon av antibiotika som nevnt en naturlig adaptiv prosess blant miljøbakterier, og naturlig forekommende ARG oppstått uavhengig av menneskelig aktivitet er derfor svært vanlig blant disse organismene (Iredell et al., 2016). Det er blitt demonstrert at det er en risiko for overføring av resistensgener fra miljøbakterier med iboende resistens til patogener (se referanser i (Singer et al., 2016)). For eksempel stammer de i dag verdensomspennende, plasmidmedierte CTX-M-enzymene fra de kromosomale *bla_{ktu}*-genene fra jordbakteriene i slekten *Kluyvera* (Bevan et al., 2017). For det andre har utslipp fra ekstensiv menneskelig bruk av antibiotika, spesielt fra husdyrhold, samt avfall og avløpsvann fra sykehus og industri, vist seg å være en sannsynligvis viktig driver for spredning av resistens (Iredell et al., 2016; Singer et al., 2016; Waseem et al., 2017). Eksponering til antibiotika kan trigge SOS-respons hos bakterier, noe som innebærer hypermutering av genomet. SOS-responsen kan også trigge HGO og representerer slik en spredningsmekanisme for resistens (Singer et al., 2016). Det er derfor

essensielt å overvåke forekomsten av AR og ARG i miljøet, både i forhold til helsemessig trygghet ved konsumering av drikkevann og matvarer, og for å forhindre spredning (Waseem et al., 2017).

Selv om AR forekommer naturlig, har sannsynligvis den vide bruken av antibiotika akselerert utviklingen (Allen et al., 2010). Nivå av AR-infeksjoner korrelerer sterkt med nivå av AB-konsumering, spesielt i sammenheng med betalaktamer og betalaktamaser (Davies & Davies, 2010). Rollen til miljøet som et reservoar for resistente, bakterielle patogener er ofte assosiert med utslipp fra utilstrekkelig behandlet kloakk, kontaminert vann (avløpsvann fra ulike kilder) eller organisk gjødsel (Singer et al., 2016). Antibiotika blir mange steder brukt i jordbruk og husdyrhold både for å behandle sykdom, men også for å promotere vekst gjennom tilsetning i dyrefor, selv om denne praksisen er blitt forbudt i Europa (Allen et al., 2010; Singer et al., 2016). En studie i Nederland fant antibiotika i henholdsvis 55 % og 75 % av avføring fra svin og kveg fra 80 og 95 % av de 20 svin- og kveg-gårdsbrukene undersøkt (Berendsen, Wegh, Memelink, Zuidema, & Stolker, 2015). Over en tredjedel av prøvene hvor antibiotika ble detektert inneholdt 3 eller flere ulike typer.

Forekomsten av antibiotika, AR-bakterier og ARG i ulike vannkilder kan være en primær kilde til introduksjon og spredning av disse faktorene til andre miljø-nisjer (Waseem et al., 2017). Utslipp fra urbane renseanlegg for avløpsvann kan anses som særlig viktig, fordi det har blitt vist å ha høy tetthet av bakterier og høyt innhold av antibiotika (Ferro, Guarino, Castiglione, & Rizzo, 2016). Gardner et al. undersøkte 16 renseanlegg i Storbritannia og fant alle tre typene antibiotika de lette etter i alle anleggene (erytromycin, ofloksacin, og oxytetracyklin) (Gardner et al., 2013). Avløpsvann som har gjennomgått ekstra rensing brukes mange steder på nytt til vanning av avlinger og landskap, samt at slam benyttes til gjødsling (Singer et al., 2016). ESBL-produserende Enterobacteriaceae har også blitt isolert fra en offentlig strand i Kroatia, og blant disse var CTX-M-produserende *E. coli*-isolater klonalt relatert til CTX-M-produserende isolater fra et regionalt sykehus (Maravić et al., 2015). Cefoxitin-resistente *E. coli* isolater har blitt funnet drikkevann i Canada (Mataseje et al., 2009), og en annen studie fra Storbritannia rapporterte nylig om kraftig økning i forekomst av *bla*_{CTX-M-15}-gener i en elv nedstrøms for et renseanlegg (Amos, Hawkey, Gaze, & Wellington, 2014). Genet ble identifisert både i vanlige patogene *E. coli*-stammer (f.eks. ST131), og i akvatiske bakterier, og i tillegg var det overførbart til andre gram-negative bakterier. Kanskje enda mer skremmende var identifiseringen av et imipenem-resistent *E. coli*-isolat.

AR human-patogener er også vanlige i mat og i næringskjeden (referanser i (Iredell et al., 2016). Det har også blitt rapportert om tilfeller der kjæledyr bærer lignende multiresistente isolater som mennesker. Blant annet ble det i Australia observert forekomst av en ny, multiresistent *E. coli* CC som ble funnet i isolater fra både mennesker og hunder (Platell et al., 2012). Tilsvarende observasjoner av isolater fra samme CC har også blitt observert i USA (J. R. Johnson et al., 2019). Funn av ESBL-produserende *E. coli* forekommer også blant ville dyr (Guenther, Ewers, & Wieler, 2011).

2.7 Deteksjon av ESBLer

Den økende forekomsten av ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* danner et stort behov for laboratorie-testings-metoder som raskt og presist kan detektere tilstedeværelse av disse enzymene i kliniske isolater. Metodene for deteksjon av ESBL kan deles inn i to hovedgrupper: fenotypiske metoder, som bruker ikke-molekylære teknikker til å teste sensitivitet overfor ulike cefalosporiner, og genotypiske metoder, som bruker molekylære teknikker for å identifisere genotypen ansvarlig for ESBL-produksjon (J. D. Pitout & Laupland, 2008). Klinisk diagnostiske laboratorier bruker oftest fenotypiske metoder, fordi disse gjerne er enklere, raskere og billigere til rutinemessige undersøkelser (Drieux, Brossier, Sougakoff, & Jarlier, 2008). Fenotypiske metoder kan imidlertid ikke skille mellom de spesifikke enzymene ansvarlige for ESBL-produksjonen (J. D. Pitout & Laupland, 2008). Genotypisk identifisering av enzymene gir derfor essensiell informasjon for å hindre spredning, og i overvåkingen av AR blant viktige patogener.

2.7.1 Fenotypisk deteksjon

Majoriteten av fenotypiske metoder for deteksjon av ESBL-mediert resistens baseres på reduksjon i MIC-verdier ved bruk av 3GC, som oftest cefotaxim eller ceftazidim, samt en betalaktamase-hemmer, vanligvis klavulansyre (Drieux et al., 2008). Utfordringen med fenotypiske deteksjonstester er at de må kunne skille mellom ESBL-produserende organismer og organismer med andre mekanismer for resistens, slik som overproduksjon av cefalosporinaser, hemmer-resistens og produksjon av bred-spektrede betalaktamaser (Drieux et al., 2008). Man må derfor være forsiktige når man tolker resultatene av slike tester. Det har for eksempel blitt rapportert om falske positive resultater ved overproduksjon av cefalosporinase SHV-1 i *K. Pneumoniae*, og ved produksjon av betalaktamase i kombinasjon med manglende

porin i membran. I tillegg har det blitt observert falske negative resultater f. eks ved ekspresjon av et AmpC-type enzym i en ESBL-produserende stamme (referanser i (Bradford, 2001). Fenotypiske deteksjonstester utviklet spesifikt for identifisering av ESBL-produserende bakterier inkluderer «double-disk synergy test» (DDST), Etest strips, kombinasjonsdisk-metode, samt diverse automatiserte systemer basert på måling av turbiditet i buljongfortynninger (Drieux et al., 2008).

For deteksjon av ESBL-produserende bakterieisolater direkte fra prøver kan skåler med selektive og kromogene agar-medier benyttes. I denne oppgaven ble *Brilliance*TM ESBL Agar (Oxoid, 2010) benyttet. Dette er et kromogent screening-medium for deteksjon av ESBL-produserende Enterobacteriaceae fra kliniske prøver. Mediet gjør det også mulig å identifisere slektene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter* (KESC-gruppen), samt *E. coli* basert på kulturfarge. Mediet inneholder cefpodoxim som i kombinasjon med andre antibakterielle stoffer inhiberer vekst av ikke-ESBL-produserenter, samt de fleste AmpC-produserer (Oxoid, 2010). *Brilliance*TM ESBL inneholder to kromogener, en som reagerer med galaktosidase produsert av bakterier i KESC-gruppen og resulterer i grønne kolonier, og en som i tillegg til galaktosidase også reagerer med glucuronidase. *E. coli* kan produsere begge disse stoffene og man får da blå kolonier. β -Galaktosidase-negative *E. coli* gir rosa kolonier (Oxoid, 2010). Vekst av *Proteus*, *Morganella* og *Providencia* spp, som ikke reagerer med noen av kromogenene, vil gi brunaktige kolonier med mørkere ringer rundt som resultat av tryptofan-deaminering (Oxoid, 2010). Kromogene medier der koloniene selv i motsetning til mediet rundt blir farget, har tidligere blitt benyttet blant annet i deteksjon og identifisering av urinveisinfeksjons-relaterte patogener, hvor det har vist seg å være mer effektivt enn tradisjonelle medier (Hengstler, Hammann, & Fahr, 1997).

2.7.2 Genotypisk deteksjon

Mange molekylære metoder for rask genotypisk deteksjon av ESBL-positive organismer er blitt foreslått. Den enkleste og mest brukte molekylære metoden er PCR med spesifikke oligonukleotid-primere etterfulgt av sekvensering (Bradford, 2001). Primere kan velges fra sekvenser tilgjengelige i offentlige databaser som f.eks. GenBank (GenBank[®], National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Sekvensering er viktig for å skille ikke-ESBL SHV- og TEM-varianter fra ESBL-derivater av disse (Bradford, 2001). Flere metoder som unngår behovet for sekvensering er også blitt foreslått, men et stort antall subtyper innen hver familie

med varierende punktmutasjoner gjør disse metodene utfordrende. Når det gjelder CTX-M er i motsetning til SHV og TEM PCR av CTX-M-spesifikke produkter uten videre sekvensering vanligvis nok indikasjon for tilstedeværelsen av *bla*_{CTX-M}. Flere metoder for rask screening etter *bla*_{CTX-M} blant ESBL-positive organismer er derfor blitt beskrevet, blant annet inkludert multipleks PCR (J. D. Pitout & Laupland, 2008).

I multipleks PCR kan mer enn én målsekvens oppformerer ved å inkludere et sett med to eller flere primere i reaksjonsmiksen (Elnifro, Ashshi, Cooper, & Klapper, 2000). Multipleks PCR med tilpassede mikser av primere gjør det mulig å effektivt screene prøver etter en gruppespesifikk målsekvens, for eksempel etter de mest utbredte ESBL-gruppene. Dette kan være nyttig i monitorering av ARG-spredning og til bruk i epidemiologiske undersøkelser (Dallenne, Da Costa, Decre, Favier, & Arlet, 2010). Primersett utvikles ved å laste ned sekvensene til ESBL for eksempel fra GenBank, og deretter sammenstille disse innad i grupper ved bruk av et sammenstillings-dataprogram. Slik kan gruppespesifikke primere lages for å amplifisere interne fragmenter som deles eller er svært like mellom ESBL-typer (Dallenne et al., 2010). I motsetning til multipleks har singlepleks PCR kun ett målgen, og kan for eksempel brukes etter scanning med multipleks for å verifisere resultatet og mer spesifikt identifisere ESBL-genet. Bruk av multipleks PCR etterfulgt av singlepleks PCR kan derfor være en nyttig metode for rask genotypisk identifikasjon av ESBL-produserende isolater, spesielt i tilfellet med CTX-M-enzym. For SHV- og TEM-derivater er det imidlertid ofte i tillegg nødvendig med sekvensering, ettersom det er vanskelig å skille mellom ESBL-typer og bredspektrede cefalosporinaser (Bradford, 2001). I mange tilfeller kan man sekvensere direkte fra rensset PCR-produkt og på denne måten identifisere et bredt spekter av ulike ESBL ettersom produktene kan inneholde signifikante substitusjoner (Dallenne et al., 2010).

2.8 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Antimikrobiell sensitivitetstesting (AST) av bakterieisolater er svært viktig i kliniske sammenhenger for å oppdage resistens hos viktige patogener og for å forsikre seg om effektiviteten til valgte medikamenter i en infeksjonssammenheng (Jorgensen & Ferraro, 2009). Et «breakpoint» (klinisk brytningspunkt) er en valgt konsentrasjon (mg/L) av antimikrobielt stoff som definerer om en mikroorganisme er klinisk resistent eller mottagelig for det gitte stoffet (EUCAST, 2020). Hvis en «minimum inhibitory concentration» (MIC)-verdi blir bestemt å være lik eller lavere enn det gitte brytningspunktet sies organismen å være sensitiv

overfor antibiotikumet, mens dersom MIC-verdien er lik eller høyere enn brytningspunktet er organismen intermediat eller resistent (EUCAST, 2020). De kliniske brytningspunktene er fastslått av «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST). EUCAST beregner også «epidemiological cut-off values» (ECOFF-verdier), som gir info om MIC-verdier forventet for villtype-bakterier (EUCAST, n.d).

Noen vanlige metoder for testing inkluderer manuelle metoder som fortyningstest i buljong, bruk av en antimikrobiell gradient, disk-diffusjon eller instrumentelle, helautomatiske systemer (Jorgensen & Ferraro, 2009). Den antimikrobielle gradient-metoden er basert på en gradient av en antimikrobiell agens i agar i motsetning til i buljong som i fortyningstesten. Man bruker da tynne plastikk test-strips som på undersiden er dekket av en konsentrasjonsgradient av et antimikrobielt stoff og som er markert med en konsentrasjonsskala på oversiden. Etter inokulering av agarmediet med standardisert suspensjon av målorganismen og inkubasjon i ca. 24 timer, leses MIC-verdier av ved å studere den eventuelle hemmingssonen som oppstår rundt stripsene og lese av konsentrasjonsskalaen på oversiden ved nedre grense av hemmingssonen. Resultater fra gradient-metoden har vist seg å i høy grad samsvare med resultater fra andre standardiserte suseptibilitets-tester (Baker, Stocker, Culver, & Thornsberry, 1991; Jorgensen & Ferraro, 2009).

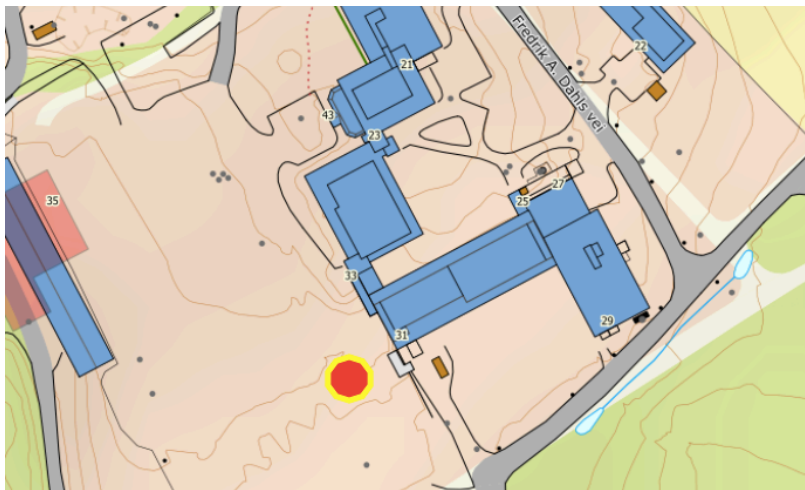
3 MATERIALER OG METODER

3.1 Prosess

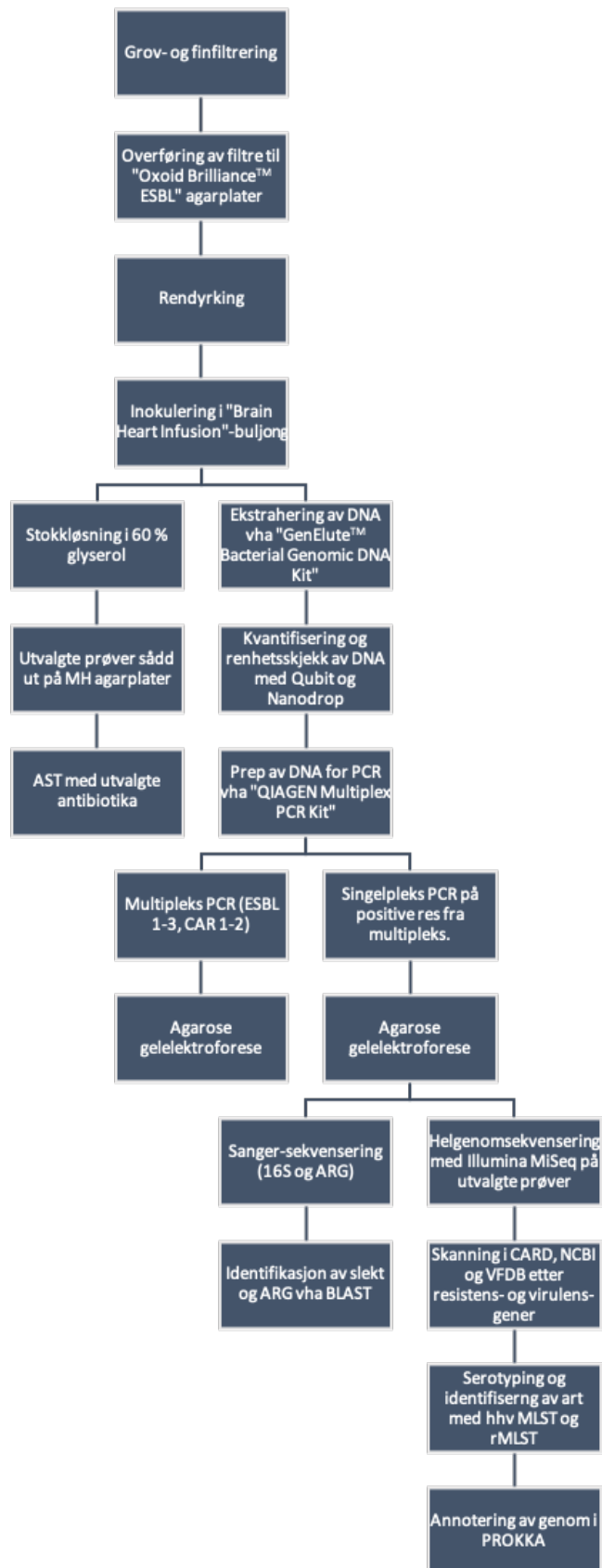
Vannprøver ble samlet inn fra tre ulike vanddammer på NMBU campus Ås. V1 ble hentet fra nordsiden av Andedammen og V2 ble hentet fra en liten dam tilknyttet Niagara-bekken som renner ut fra Andedammen (figur 3.1). En tredje vannprøve, V3, ble hentet fra en nylaget dam på vestsiden av Jordfagbygningen (figur 3.2). Prøvene ble samlet inn på 1000 mL sterile Scott Duran glassflasker. Alle prøvene ble samlet inn den 21. januar 2020. De innsamlede prøvene ble før videre behandling oppbevart på kjølerom ved 4 °C i ett døgn for sedimentering. Flytskjema for videre behandling og analyse av prøvene vises i figur 3.3.



Figur 3.1: Kart med markeringer over prøveuttakings-steder fra Andedammen og Niagara.



Figur 3.2: Kart med markering over prøveuttakings-sted fra dam ved Jordfagbygning.



Figur 3.3: Flytskjema over behandling og analyser av vannprøver fra Andedammen, Niagara og «Jordfagdammen» ved NMBU.

3.2 Filtrering og rendyrking på selektivt, kromogent medium

Prøvene ble etter sedimentering grovfiltret ved bruk av sterile «Whatman filter paper 589/1 Black ribbon 150 mm diameter» (GE Healthcare, VWR™ Life Science, Pittsburgh, USA). Med dette filteret slippes bakterier gjennom, men ikke jord og uønskede partikler fra vannprøvene. Filteret ble plassert i en trakt og vannprøvene ble filtrert ned i en ny steril 1000 mL steril Scott Duran glassflaske. For prøve 1 og 2 ble 500 mL filtrert, mens for prøve 2 ble 400 mL filtrert.

Etter grovfiltrering ble det utført finfiltrering av vannprøvene i et Millipore™ Microfil-vakuumsfiltreringssystem MISP00002 (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) koblet til vasken med en slange. Sterile filtre av typen EZ-Pak® membranfilter (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) 087 med 0,45 µm porestørrelse ble benyttet. 100 mL av hver vannprøve ble fylt i plastbegre og finfiltrert ved at trykket fra vannet i kranen trakk vannprøvene gjennom filteret og ut i vasken. Videre ble filtrene overført til ferdigstøpte agarskåler med AR-mediet «Oxoid Brilliance™ ESB�» (Thermo Fisher Scientific Inc., Hampshire, Storbritannia). Skålene ble deretter inkubert ved 37°C i 72 timer. Anbefalingene fra produsenten er 24-48 timer (Oxoid, 2010), men ettersom det ble observert lite vekst selv etter 48 timer ble skålene inkubert i ytterligere 24 timer.

Etter inkubasjon ble kolonier som hadde vokst fram plukket ut med podenål og streket ut på nye petriskåler med det samme mediet. Det var hovedsakelig blå og grønne kolonier som var av interesse, men noen beige/fargeløse kolonier ble også plukket ut. De nye skålene ble inkubert ved 37°C i 24 timer. 2. gangs utstrykning av kolonier fra hver av skålene ble utført på samme måte for å rendyrke kulturene, og de nye skålene ble igjen inkubert ved 37°C i 24 timer. 10 mL rør med kork fylt med «Brain Heart Infusion» (BHI) buljong (OXOID Ltd., Loughborough, Storbritannia) ble deretter inokulert med renkulturer fra hver prøve. Rørene ble satt til inkubasjon ved 37°C i 24 timer. Deretter ble stokkløsninger av hver prøve tillaget ved å pipettere 500 µL BHI med hver bakteriekulturer og 500 µL 60 % glyserol i 2 mL kryorør (Nunc™ CryoTubes™, Thermo Fisher Scientific Inc., Hampshire, Storbritannia). Rørene ble fryst ned ved -80°C for langtidslagring.

3.3 Isolering av DNA

Videre ble DNA-ekstraksjon utført ved hjelp av «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA). Protokoll for Gram-positive bakterier ble brukt ettersom det

var uvisst om isolatene var gram-positive eller -negative. Den gram-positive protokollen benytter enzymet lysozym som kan bryte ned det tykke peptidoglykanlaget i celleveggen hos grampositive bakterier (Sigma Aldrich, u.å.). Protokollen fra produsenten ble fulgt med unntak av at kittets buffer ble byttet ut med «SequalPrep™ Normalization Elution Buffer» (Thermo Fisher Scientific Inc.). De ekstraherte DNA-prøvene ble oppbevart ved -8 °C for videre analyser.

3.3.1 Renhetsbestemmelse og kvantifisering av ekstrahert DNA

Renheten på det isolerte DNAet ble målt med et NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, USA). Absorpsjonsforholdene $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$ ble bestemt. 2 μL destillert vann ble brukt som blank for kalibrering av instrumentet, og 2 μL av hvert DNA-isolat ble pipettert ut på linsen for avlesning. Konsentrasjonen på det isolerte DNAet ble bestemt med et Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA). For å klargjøre DNAet til kvantifisering ble et «Qubit® dsDNA BR Assay Kit» (Invitrogen™ Life Technologies Corporation, Eugene, USA) brukt i henhold til protokoll. DNAet ble tint på is og vortexet før bruk, og alle reagensene fra kittet var ved romtemperatur ved bruk. Som beskrevet i protokoll fra produsent ble 2 μL av prøve tilsatt 198 μL reagensmiks og inkubert ved romtemperatur i to minutter før avlesning i apparatet. Før prøvene ble målt ble de to standardene i settet brukt til å kalibrere (for å lage standardkurve prøvene kunne måles mot). 10 μL av hver standard ble tilsatt 190 μL reagensløsning.

3.4 Sanger-sekvensering av 16S rRNA

Ettersom dyrking på selektivt, kromogent medium ikke alene er nok til å identifisere isolatene, ble gener for 16S rRNA isolert fra prøvene og sekvensert og analysert. Dette ble gjort gjennom PCR-amplifisering av disse genproduktene og rensing av PCR-produkt før prøvene ble sendt til Sanger-sekvensering.

3.4.1 PCR amplifisering

Det ble utført PCR-amplifisering av 16S rRNA fra prøvene med «iProof™ High Fidelity DNA Polymerase Kit» (Bio-Rad Laboratories Inc., Vilnius, Litauen). Dette ble gjort ved å forberede en «mastermiks» bestående av Iproof™ HF Buffer, dNTP-mix, «forward» og «reverse» primere (se tabell 3.1) og PCR-gradert H_2O . 38 μL av mastermiksen ble pipettert ut i fem rør på

MicroAmp® 8-Tube Strip, 0,2 mL (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), og 2 µL av hver prøve ble deretter tilsatt. Reagensene, konsentrasjoner og mengder tilsatt er oppgitt i tabell 3.2. 16S rRNA PCR ble kjørt på en BioRad C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA), og programmet beskrevet i tabell 3.3 ble brukt.

Tabell 3.1: Primer-par og -sekvens og antall basepar brukt for å detektere og amplifisere 16S rRNA-gene fra prøve 1-5.

Primer	Primer-sekvens (5'-3')	Basepar (bp)
Forward (F)	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	1505
Reverse (R)	GGTTACCTTGTTACGACTT	

Tabell 3.2: reagenser, konsentrasjoner og volumer tilsatt for PCR-reaksjonen for 16S rRNA amplifisering av prøve 1-5.

Reagens	Init. kons.	End. kons.	Vol. per reaksjon, µL
Iproof HF buffer	5x	1x	8
dNTP'er	10 mM	200 µM	0.8
Forward	5 µM	0,25 µM	2
Reverse	5 µM	0,25 µM	2
PCR grade H ₂ O			24.8
Iproof DNA polymerase	2 U/µl	0,02 U/µl	0.4
Templat-DNA			2
		Totalt	40

Tabell 3.3: program for PCR-reaksjon ved 16S rRNA amplifisering.

Temperatur, °C	Tid	Antall sykluser
98	30 sek	1
98	10 sek	35
55	30 sek	
72	45 sek	
72	10 min	1
4	∞	

3.4.2 Gelelektroforese

PCR-produktene fra 16S rRNA-amplifisering ble kjørt på gelelektroforese med en 1% agarose-gel. Denne ble laget ved å veie ut 0,5 g SeaKem® LE Agarose (Lonza Rockland Inc., Rockland, USA) og blande med 50 mL 1x Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) i en Erlenmeyerkolbe. Blandingen ble varmet i mikrobølgeovn til alt pulveret var oppløst, og noe avkjølt før det ble tilsatt 2,5 μ L «GelRed™ Nucleic Acid» (Biotium, Fremont, USA). Et «Mini-Sub Cell® Model GT System» (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.) ble benyttet til støpning av gelen og kjøring av gelelektroforese.

Prøvene ble preparert for applisering på gel ved å blande 3 μ L «Agrose Gel Loading Dye 6x» (GE Healthcare, VWR™ Life Science, AMERSCO®, Solon, OH, USA), 4 μ L RNase-fritt vann og 3 μ L av hver prøve i hver sin brønn på en CELLSTAR® 96-brønn mikroplate (Greiner Bio-One, ThermoFischer Scientific Inc.). Det ble forsiktig pipettert opp og ned for å blande. 10 μ L fra hver av brønnene ble deretter pipettert over i hver sin brønn på gelen. 7 μ L «Quick-Load 100 bp DNA ladder» (New England BioLabs Inc., Ipswich, England) ble tilsatt i første brønn på hver rad på gelen. Gelelektroforesen ble kjørt på 80 V i 30-60 minutter. Det ble tatt bilder av gelen under UV lys med en Molecular Imager® Gel Doc™ XR Image System (Life Science, Bio-Rad Laboratories Inc.).

3.4.3 Rensing av PCR-produkt og Sanger-sekvensering

PCR-produktene fra 16S rRNA-amplifisering ble rensed med Sigma-Aldrich® GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Missouri, USA). Protokollen ble fulgt fram til eluering der det ble tilsatt 25 μ L «Elution Solution» (Sigma-Aldrich®) i stedet for 50 μ L. Dette ble gjort for å fortynne prøvene så lite som mulig. Kvantifisering av det rensede PCR-produktet ble gjort med Qubit® 2.0 Fluorometeret som beskrevet under i avsnitt 3.3.1. 10 1,5 mL reagensrør ble merket med strekkoder (ett for forward primer og ett for reverse primer per prøve). 5 μ L primer og 5 μ L prøve ble pipettert opp i hvert rør, og de ble sendt til GATC Biotech i Tyskland for Sanger-sekvensering (Eurofins GATC, Konstanz, Tyskland).

3.4.4 Databehandling av sekvenserings-resultater

Programmet «Nucleotide Basic Logical Alignment Search Tool» (nBLAST) fra nettsidene til «National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI); <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ble benyttet for å analysere resultatene fra Sanger-

sekvenseringen. Sekvensene ble ikke redigert eller behandlet på noen måte før analysering, men ble direkte satt inn i søkefeltet og det ble utført søk mot databasen «Reference RNA sequences» (refseq_rna). Søkeresultatene ble kun brukt for å gi en pekepinn på hvilke bakterieslekter som prøvene kunne stamme fra, ettersom senere helgenomsekvensering ville gi mer definitive resultater for de interessante isolatene.

3.5 Genotypisk deteksjon av resistensgener

3.5.1 Multi- og singelpleks PCR med ESBL- og CAR-primermikser

For å screene etter ESBL-gener i DNA-prøvene ble det utført multipleks-PCR med tre ulike multipleks-primermikser (ESBL 1, 2, 3). I tillegg ble det brukt to multipleks-primermikser (CAR 1 og 2) for å detektere eventuelle karbapenemase-gener i prøvene. Hver primermiks inneholder ulike sett med primerpar for detektering av ulike grupper ESBL (vedlegg B). Primerne i ESBL 1-3 ble valgt på bakgrunn av de mest utbredte og vanlige beta-laktamasene i klinisk sammenheng (Dallenne et al., 2010; Finton M.D., 2020).

«QIAGEN Multiplex PCR Kit» (QIAGEN, Hilden, Tyskland) ble brukt til preparering av reaksjonsmikser for både multi- og singelpleks PCR. Protokoll fra produsent ble fulgt, med unntak av at mengder reagenser ble halvert. «5x Q Solution» ble ikke benyttet. Totalvolumet for hver PCR-reaksjonsmiks ble 24 μ L reagensblanding og 1 μ L prøve (tabell 3.4). PCR ble videre gjennomført slik som beskrevet under punkt 2.5.1, men programmene Master ESBL-2» og «Master ESBL» ble benyttet (tabell 3.5 og 3.6), henholdsvis for amplifisering av ESBL og CAR.

Tabell 3.4: Volum og endelig konsentrasjon av komponenter i reaksjonsmiks for multi- og singelpleks PCR. Mastermikser med Master Mix, primere og vann ble laget først og fordelt i PCR-rør, og templat-DNA ble tilsatt til slutt.

Reagens	Volum per reaksjon (μL)	Endelig konsentrasjon
Mastermiks		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12,5	1x
10x primer mix (2 μM av hver primer)	2,5	0,2 μM av hver primer
RNase-fritt vann	9	-
Templat-DNA	1	
Totalt reaksjonsvolum	25	

Tabell 3.5: program brukt i termosyklere for ESBL multipleks-PCR av prøve 1-5.

Temperatur, $^{\circ}\text{C}$	Tid	Antall sykluser
95	15 min	1
94	30 s	28
60	90 s	
72	90 s	
72	10 min	1
4	∞	

Tabell 3.6: program brukt i termosyklere for CAR-multiple-PCR av prøve 1-5.

Temperatur, $^{\circ}\text{C}$	Tid	Antall sykluser
95	15 min	1
94	30 s	30
62	90 s	
72	90 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
4	∞	

PCR-produktene ble satt på 1 % agarosegel ved å lage gel og reaksjonsmikser som beskrevet for 16S amplifiserings-produktene under avsnitt 3.4.2.

Ingen prøver viste positive bånd på gel etter CAR-multipleks, og singelpleks for karbapenemase-deteksjon ble derfor ikke gjennomført. Etter ESBL multipleks-PCR og gelelektroforese ble det utført singelpleks-PCR på prøvene med DNA-bånd som var på størrelse forventet amplicon-lengde for ESBL-gener sammenlignet med ladder. Primere som korresponderte til mulige ESBL-typer ble benyttet i reaksjonen. Prøve 1 ble kjørt med primere spesifikke for CTX-gruppe-2 og OXA. Prøve 2 ble kjørt med CTX-gruppe-1- og -gruppe-9-primere. Reaksjonsblandingen ble preparert på tilsvarende måte som beskrevet over. PCR-program beskrevet i tabell 3.5 ble benyttet også her. Produktene ble satt på gel på tilsvarende måte som beskrevet i 3.4.2. Prøve 2 med CTX-M-gruppe-1-primere viste bånd som korresponderte til forventet sekvensstørrelse når sammenlignet med ladder. Fra denne prøven ble derfor PCR-produkt rensset og sendt til Tyskland for sekvensering (se punkt 3.4.3).

Etter at resultatene fra sekvenseringen var det behov for å utføre dette på nytt da for uklart resultat ble oppnådd. DNA fra prøve 2 ble derfor isolert og analysert på nytt som beskrevet overfor. Resultatene fra ny multi- og singelpleks PCR samsvarte med tidligere resultater, men det ble oppnådd en høyere konsentrasjon av DNA etter rensset singelpleks-produkt, og lengre sekvens etter Sanger-sekvensering. Resultatene fra Sanger-sekvensering av produktet fra singelpleks-PCR av prøve 2 ble videre analysert ved å søke i databasen «Reference proteins (refseq_protein)» med ubehandlet sekvens med programmet blastx fra NCBI sine nettsider for å identifisere det eventuelle ESBL-enzymet.

3.5.2 Helgenomsekvensering med Illumina MiSeq

Ettersom prøve 2 og 5, ifølge analyse av 16S-sekvensene, tilhørte bakterieslekter som man er bekymret for spredningen av (patogenisitet, multiresistens) ble disse sendt til helgenomsekvensering. Dette for å avgjøre hvilke resistensgener og eventuelt virulensgener disse bakteriestammene hadde. 200 ng av det ekstraherte DNAet fra prøvene ble overført til totalt 20 μ L sterilt vann i et 1,5 mL eppendorfrør. Rørene ble deretter levert til UiO for sekvensering. Dette ble utført av stipendiat Misti Dawn Finton.

Ved hjelp av Nextera™ DNA Flex Tagmentation (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) ble prøvebibliotek med parede ender (2 x 300 bp) preparert, og disse ble sekvensert på en Illumina MiSeq plattform med v3-kjemi. Dette ble utført av Norsk sekvenseringscenter (NSC) (Oslo, Norge).

3.5.3 Dataanalyse av MiSeq-resultatene

De resulterende filene med «reads» etter helgenomsekvensering ble lastet opp på Galaxy-plattformen (<https://usegalaxy.eu/>) og videre analysert der. Reads ble renset for adaptore ved bruk av programmet «Trimmomatic» (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014). Videre ble programmet «Shovill», som igjen bygger på et program som heter «SPades», benyttet til å sette sammen de trimmede readsene til «contigs» (Bankevich et al., 2012; Seemann, 2017). Contigs-filene ble videre skannet mot «The Comprehensive Antibiotic Resistance Database» (CARD) og «The Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database» gjennom NCBI for å finne resistensgener. De ble i tillegg skannet med «The virulence factor database» (VFDB) for å finne virulensgener. Skanning med CARD, NCBI og VFDB ble utført gjennom Galaxy med verktøyet «ABRicate» (Seemann, 2016). Filen fra prøve 2 ble typet med MLST og SeroTypeFinder gjennom den online søkemotoren «Center for Genomic Epidemiology» (CGE) (DTU, Danmark). I tillegg ble det med denne prøven søkt etter virulens- og resistensgener gjennom ResFinder og VirulenceFinder (gjennom CGE) og etter virulensgener med professor Bjørn-Arne Lindstedt sin egne nBLAST søke-«pipeline» (ikke publisert). Identifikasjon av isolatene (prøve 2 og prøve 5) ble gjort med «Ribosomal Multilocus Sequence Typing» (rMLST) fra pubMLST databasen. Denne metoden er mye mer nøyaktig enn 16S (Jolley et al., 2012). Programmet «PROKKA» (Seemann, 2014) i Galaxy ble benyttet til annotering av assembly-filene. Alle disse data-analysene ble utført av veileder professor Lindstedt.

Det ble gjort søk i de annoterte genene fra PROKKA for å finne relevante resistens- og virulensgener. For treff i VFDB som var fra andre bakterieslekter enn identifisert i prøvene ble sekvensen hentet fra antatt korresponderende annoterte gen i PROKKA og det ble utført søk med pBLAST på proteinsekvensen mot databasen «Non-redundant protein sequences (nr)».

3.6 Antimikrobiell sensitivitetstesting

M.I.C. Evaluator (Oxoid), ETEST® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), eller MIC (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) gradient-strips ble brukt for å evaluere grad av

resistens hos prøve 2, 3 og 5. Totalt 12 antibiotika tilhørende 7 ulike klasser ble brukt (tabell 3.7). Bakterieisolatene ble strøket ut på ferdigstøpte MH-agarplater (Thermo Fisher Scientific Inc.), og petriskålene ble inkubert ved 37°C i ett døgn. Bakteriekolonier fra petriskålene ble overført til rør med steril NaCl-løsning (8%) ved bruk av en steril bomullspinne. Turbititeten til bakteriesuspensjonen ble sammenlignet med en McFarland Standard 5.0 (Pro-Lab Diagnostics Inc., Bromborough, Storbritannia). Med en steril bomullspinne ble suspensjonen jevnt strøket ut på nye petriskåler med MH-agarmedium. En steril pinsett ble brukt for å legge en antimikrobiell strip på overflaten av agaren, og skålene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. All testing ble gjennomført i henhold til produsentens instruksjoner, og testen ble gjennomført to ganger for å validere resultatene. Gjennomsnittlig MIC-verdi ble bestemt og sammenlignet med MIC kliniske brytningspunkt fra EUCAST for å bestemme grad av resistens (EUCAST, 2020).

Tabell 3.7: Viser de 12 ulike antibiotika og se sju ulike klassene disse tilhører, som ble brukt under antimikrobiell sensitivitetstesting av bakterieisolatene fra prøve 2, 3 og 5.

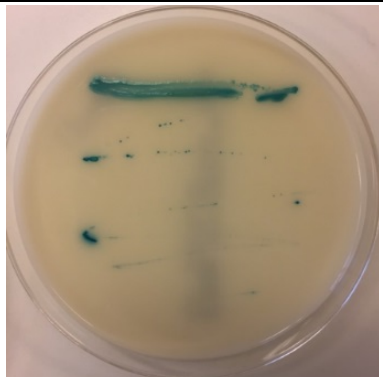

Antibiotika-klasse	Antibiotikum
Aminoglykosider	Amikacin (AK)
	Gentamicin (GM)
	Streptomycin (S)
Karbapenemer	Imipenem (IP)
	Meropenem (MP)
Cefalosporiner	Cefotaxime (CT)
	Cefepime (FEP)
Fluoroquinoler	Ciprofloxacin (CI)
Makrolider	Erytromycin (EM)
Penicilliner	Ampicillin (AM)
	Amoxicillin med klavulansyre (AMC)
Trimetoprim	Trimetoprim (TM)




4 RESULTATER

4.1 Fenotypiske resultater og 16S rRNA

Fargescreening av bakteriekulturer vokst frem på selektive, kromogene skåler ble gjennomført for å undersøke koloniens fenotypiske egenskaper. Tabell 4.1 viser hvor de ulike prøvene ble hentet fra og hvilke fenotypiske trekk koloniene viste etter fremvekst på Oxoid Brilliance™ ESBL agarskåler. Ut ifra fargen på koloniene ble det tolket ved hjelp av protokollen (Oxoid, 2010) hvilke arter eller hvilke bakterieslekter isolatene kunne tilhøre. I tillegg oppgir tabell 4.1 oppsummert resultatene fra BLAST-søk på Sanger-sekvensert 16S rRNA fra alle prøvene, samt hvilke prøver som ble helgenomsekvensert og hvilke arter disse tilhørte ifølge disse resultatene.

Tabell 4.1: Resultater fra rendyrking av bakterier fra vannprøver på selektivt, kromogent medium. Tabellen viser fenotypiske egenskaper på kolonier, samt resultat fra 16S rRNA sekvensering og BLAST-søk i tillegg til resultater fra de prøvene som ble helgenomsekvensert.

Prøve	Vann - prøve	Petriskål med AR vekst	Kolonifarge	Fargescreening	16S rRNA BLAST-resultat	Helgenomsekvensering med MiSeq
1	V1		Grønne	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., eller <i>Citrobacter</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp. (query-lengde: 1170)	Ikke utført
2	V1		Mørkeblå	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia</i> eller <i>Shigella</i> spp. (query-sekvens: 834)	<i>E. coli</i> ST1193 075:K1:H5

3	V2		Lys beige	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. eller <i>Providencia</i> spp.	<i>Lewinella</i> spp. (query-sekvens: 20)	Ikke utført
4	V2		Brune (rødbrune)	Farge ikke beskrevet av produsent	Ingen resultater (query-sekvens: 22)	Ikke utført
5	V3		Grønne	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.	<i>Serratia</i> spp. (<i>fonticola</i>) (query-sekvens: 616)	<i>S. fonticola</i>

Som vist i Tabell 4.1 ble det isolert og rendyrket fem ulike bakteriekulturer fra de filtrerte prøvene sådd på selektive, kromogene ESBL agarplater. To fra lokasjon 1 (V1 Andedammen), to fra lokasjon 2 (V2 Niagara) og en fra lokasjon 3 (V3 dam ved Jordfag). Prøve 1 og 5 viste lignende blå-grønne farger på kulturene, og ifølge protokollen indikerer denne fargen at de tilhørte slekter fra *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, eller *Citrobacter spp.* (KESC-gruppen). Ved BLAST-søk med amplifisert 16S rRNA fra prøvene som query-sekvens var det henholdsvis *Pseudomonas* og *Serratia* spp. (mest trolig *S. fonticola*) som var de beste treffene. Prøve 2 skulle ifølge protokollen på grunn av den mørkeblå fargen på koloniene være en *Escherichia coli*-stamme. BLAST-søk på 16S rRNA fra dette isolatet antydte en *Escherichia* art eller en *Shigella* art, men kunne ikke identifisere hvilken av disse isolatet tilhørte. Koloniene fra prøve 3 hadde en lys beige-aktig farge som kunne indikert en *Proteus*-, *Morganella*- eller *Providencia*-art. Resultatene fra BLAST-søk på 16S rRNA fra denne prøven antydte *Lewinella* som en mulig slekt den tilhørte, men query-sekvensen var svært kort (kun 20 bp). Koloniene fra prøve 4 hadde en mørk, rødaktig brunfarge. Denne fargen er ikke oppgitt i protokollen, og det var derfor ut ifra denne uvisst hvilken bakterieslekt dette isolatet kunne tilhøre. Tidligere rapporter har imidlertid beskrevet isolater av *Pseudomonas aeruginosa* å ha en lignende farge (Huang, Bogaerts, Berhin, Guisset, & Glupczynski, 2010). Det ble isolert for lav konsentrasjon av 16S rRNA slik at BLAST-søk ikke førte til meningsfulle treff for denne prøven. Den ble heller ikke videre undersøkt. Oppsummering av blast-treff for 16S rRNA er vist i vedlegg A.

4.2 Renhetsmåling og kvantifisering av isolert DNA

For å bestemme konsentrasjon av og renhet til prøvene med ekstrahert DNA ble dette målt med henholdsvis Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen[™] Life Technologies Corporation, Wilmington, USA) og NanoDrop[™] 2000/2000C Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, USA). Resultatene vises i tabell 4.2, nyeste måling av prøve 2 er oppgitt.

Tabell 4.2: absorbans ($A_{260/280}$ og $A_{260/230}$) målt med NanoDrop spektrofotometer, og konsentrasjon målt med Qubit fluorometer for ekstrahert DNA fra rendyrkede bakterieprøver.

Prøve	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Konsentrasjon (ng/ μ L)
1	1,90	1,94	107
2	1,85	1,80	165
3	1,88	1,86	85,5
4	1,83	1,99	560
5	1,84	1,75	142

Konsentrasjonene målt var relativt høye. Tre av de fem prøvene målte mellom 107-146 ng/ μ L, prøve 3 var noe lavere på 85,5 ng/ μ L mens prøve 5 hadde en spesielt høy konsentrasjon på 560 ng/ μ L. Alle prøvene ble ansett som forholdsvis rene ut ifra målte absorbansverdier. Disse lå på 1,83-1,90 for $A_{260/280}$ og 1,75-1,99 for $A_{260/230}$, noe som er nære ønskede verdier på hhv. \sim 1,8 og \sim 2,0 (Thermo Scientific, 2013). Prøve 5, som hadde en $A_{260/230}$ på 1,75, og prøve 3, der tilsvarende verdi var på 1,86, var noe lengre unna ønsket verdi enn de andre prøvene (1,93-1,99). Dette kan komme av f.eks. rester av fenoler eller salter fra nukleinsyre-ekstraksjonen som også absorberer lys ved 230 nm (Matlock, 2015).

4.3 Genotypisk deteksjon av resistens

4.3.1 Multipleks og singelpleks PCR

Bilder av gelene etter agarose gelelektroforese av PCR-produktene fra multipleks og singelpleks PCR vises i vedlegg C. Oppsummering av resultatene vises i tabell 4.3. Gelen med 16S ble kjørt for å forsikre om at det var produkt til stede som kunne renses og sendes til sekvensering. Det bør nevnes at laderen brukt ga relativt uklare bånd som var vanskelige å lese. Det var usikkert hva grunnen til dette var, men ettersom båndene fra prøvene var klare ble det antatt at det ikke var noe galt som hadde skjedd under forsøket. Som nevnt under punkt 3.5.1 ble prøve 2 analysert på nytt. Kun de nyeste resultatene er inkludert her. Prøve 3 og 4 ga ingen synlige bånd på gelen. Dette kom sannsynligvis av at for lav konsentrasjon DNA ble amplifisert (vedlegg A). Dette stemte overens med at det var prøve 3 og 4 som hadde svært korte sekvenser etter Sanger-sekvensering. Tydelige bånd ble observert ved forventet størrelse for prøve 1, 2 og 5.

Tabell 4.3: Viser hvilke bånd som ble tolket som mulige positive ved avlesning av gelbildene, vurdert ut ifra lengden på båndene i forhold til bånd på ladder benyttet.

Prøve	ESBL 1				ESBL 2			ESBL 3		
	OXA-48	CTX-M gr. 2	OXA	SHV	CTX-M gr. 1	CTX-M gr. 9	TEM	NDM	VIM	KPC
1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Prøve 1 og 2 så ut til å ha positive bånd på henholdsvis ESBL 1 og 2 primermikser. ESBL 1 inneholdt primere for genene $bla_{CTX-M (gruppe 1)}$, $bla_{CTX-M (gruppe 9)}$ og bla_{TEM} , mens ESBL 2 inneholdt bla_{OXA-48} , $bla_{CTX-M (gruppe 2)}$, bla_{OXA} og bla_{SHV} (vedlegg B). Ut ifra plasseringen på båndene i forhold til ladder virket det som prøve 1 inneholdt gener fra CTX-M gruppe 1 eller 9, mens prøve 2 kunne inneholde CTX-M gruppe 2, men OXA ble også undersøkt. Det var derfor disse to prøvene med nevnte primere som ble undersøkt videre i singlepleks PCR. Det ble ikke testet for de andre ESBL-gruppene ettersom de observerte DNA-båndene på gelen ble ansett som for langt unna de forventede posisjonene på gelen i forhold til ladder-bånd. Ingen positive bånd ble observert for noen av prøvene på gelen kjørt med CAR multiplex (CAR 1-2) PCR-produktene. Tabell 4.4 viser hvilke bånd som ble tolket som positive ut ifra gelbildet fra singlepleks PCR. Det ble observert et tydelig bånd i prøve 2 ved forventet posisjon for CTX-M gruppe 1. Ingen positive bånd for noen av genene testet ble observert for prøve 1. Gelbilder vises i vedlegg C.

Tabell 4.4: Tolkning av bånd på bilde av agarosegel etter gelelektroforese av PCR-produkter fra singlepleks PCR av prøver og primer-kombinasjoner som ga positive bånd på multipleksgel.

Prøve	CTX-M gr. 2	OXA	CTX-M gr. 1	CTX-M gr. 9
1	-	-		
2			+	-

4.3.2 Sanger-sekvensering

Renset singlepleks PCR-produkt med CTX-M-1-primer fra prøve 2 ble sendt til Tyskland for Sanger-sekvensering. BLAST-søk med sekvensen bekreftet at den tilhørte et gen som kodet for en klasse A betalaktamase, og flere treff oppga også at det tilhørte CTX-M-familien. Man kunne

imidlertid ikke identifisere spesifikt enzym. Treff fra BLAST-søk på resistensgenet vises i vedlegg A.

4.3.3 MiSeq-sekvensering

Prøve 2 og prøve 5 ble sendt til Oslo for helgenomsekvensering med Illumina MiSeq. Identifisering av isolatene for prøvene ble utført med rMLST fra pubMLST databasen. Prøve 5 ble med denne metoden identifisert som *Serratia fonticola*, og prøve 2 som *E. coli*. Bestemmelse av sekvenstype og serotype for prøve 2 ble gjort via «Center for Genomic Epidemiology» med MLST, og med denne metoden ble stammen klassifisert som sekvenstype ST1193, serotype O75:K1:H5. Ingen info om sekvens- eller serotype var tilgjengelig for prøve 5, ettersom MLST ikke lot seg gjøre med denne stammen.

Alle resultatene fra helgenomsekvensering vises i vedlegg 4. Resistensgenene ansett som mest sentrale funnet i isolatene etter sekvensering, behandling av sekvenseringsdata og søk i databasene NCBI og CARD er fremstilt i tabell 4.5. Det fremstilles også resultater fra søk etter resistensgener i ResFinder for prøve 2. Alle interessante annoterte gener fra PROKKA ble identifisert gjennom søk med pBLAST i databasen «Non-redundant protein sequences» (nr).

Tabell 4.5: Resistensgener prøve 2 og 5 identifisert med CARD, database gjennom NCBI og ved søk i annoterte gener med PROKKA.

Resistensgener	Database	Identitet (%)	Query coverage (%)	Kommentar	Accession number
Prøve 2					
Beta-laktamaser					
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	NCBI	100	100	Klasse A ESBL	NG_048935.1
<i>bla</i> _{EC-5}	NCBI	99,82	100	Klasse C beta-laktamase (AmpC)	NG_049085.1
<i>dfrA17</i>	NCBI	99,79	100	Trimetoprimresistens	NG_047710.1
<i>mphA</i>	NCBI	98,71	100	Makrolidresistens	NG_047986.1
<i>ermB</i>	NCBI	99,86	100	MLS-fenotype*	NG_047804.1
<i>tetB</i>	NCBI	100	100	Tetracyclinresistens	NG_048163.1

<i>mdtA</i>	CARD	95,75	100	MDR** RND-	U00096:2154016-2155264
<i>mdtB</i>	CARD	95,90	100	efflukspumpe	U00096:2155263-2158386
<i>mdtC</i>	CARD	93,92	100	MdtABC-TolC	U00096:2158386-2161464
<i>tolC</i>	CARD	100	100		FJ768952:1-1489
<i>acrA</i>	CARD	99,16	100	MDR***	U00096.3:484426-485620
<i>acrB</i>	CARD	98,79	100	RND-efflukspumpe AcrAB-TolC	U00096.3:481254-484404
Mutasjoner					PMID
<i>gyrA</i> S83L	ResFinder			Nalidixinsyre og	8891148
<i>gyrA</i> D87N	ResFinder			ciprofloxasin	12654733
<i>parC</i> S80I	ResFinder				8851598
<i>parE</i> L416F	ResFinder				14510643
Prøve 5					
<i>bla</i> _{FONA-5}	NCBI	99,32	100	Klasse A ESBL	NG_049096.1
<i>ampC</i>	nr***	99,21	100	Klasse C beta-laktamase	WP_021806393.1
<i>acrB</i>	nr***	100	100	MDR**-effluks, RND-familien	WP_094981187.1
<i>mdtA</i>	nr***	100	100	MDR** effluks,	WP_037376405.1
<i>mdtB</i>	nr***	99,90	100	RND-familien MdtABC-TolC	WP_021178786.1
<i>tolC</i>	nr***	99,58	100		WP_037376203.1

*Makrolid-, Linkosamid- og Streptogramin-resistent fenotype

**Multidrug resistance (MDR)

***Der gener ble annotert i PROKKA ble det søkt på proteinsekvensen med pBLAST (NCBI) i databasen «Non-redundant protein sequences» (nr).

I prøve 2 ble genet *bla*_{CTX-M-15} kodende ESBL_A-enzymet CTX-M-15 identifisert. Denne var identisk til CTX-M-15-sekvensen fra NCBI med accession-nummer NG_048935.1. Dette enzymet tilhører CTX-M-gr.1 (Bonnet, 2004). Det ble også identifisert en ESBL_A i prøve 5. Denne hadde 99,32 % sekvensidentitet til FONA-5 i NCBI (NG_049096.1), men var forøvrig identisk til en FONA-sekvens fra *S. fonticola* med accession-number WP_021806421 ved pBLAST-søk på proteinsekvens annotert i PROKKA. Begge stammene inneholdt i tillegg en klasse C betalaktamase. *ampC* ble funnet etter søk i PROKKA for prøve 5. Ved pBLAST av

sekvensen ble det funnet et treff på CMY2/MIR/ACT/EC-familie klasse C betalaktamaser fra *S. fonticola* med 99,90 % sekvensID (WP_021806393.1). Et gen med 99,82 % sekvensID til *bla_{EC-5}* ble identifisert i NCBI for prøve 2. Dette genet koder også en klasse C betalaktamase (AmpC). I tillegg ble det identifisert gener kodende komponentene i en rekke efflukssystemer for begge prøvene (vedlegg 4). Etersom RND-familien anses som spesielt viktig i forbindelse med AR blant gram-negative bakterier (Davies & Davies, 2010) ble disse fokusert på, og tabell 4.5 inkluderer to av disse. Gener kodende komponenter til MDR-efflukssystemet MdtABC-TolC ble funnet i begge prøvene, med unntak av MdtC for prøve 5. I prøve 5 hadde disse genene svært høy sekvensID til sekvenser tidligere sekvensert fra *S. fonticola* (99,58-100 %). For prøve 2 var sekvensID med sekvenser i CARD noe lavere (93,92-95,90 % for *mdtABC*, 100 % for *tolC*). pBLAST på tilsvarende MdtA-sekvens i PROKKA avslørte imidlertid 100 % sekvensID med et MdtA-protein fra *E. coli* TA464 (OSL39579.1).

I prøve 2 ble det videre et gen homologt til *dfrA17* identifisert (99,79 % sekvensID) som gir resistens mot trimetoprim, i tillegg til *mphA* (98,71 % identitet) og *ermB* (99,86 % identitet) som er hhv. en fosforylase og en metylase som inaktiverer makrolider (Gomes et al., 2017; Poole, Callaway, Bischoff, Warnes, & Nisbet, 2006). Til slutt ble det gjennom ResFinder identifisert to mutasjoner i *gyrA* (*gyrA* S83L og *gyrA* D87N), i tillegg til mutasjonene *parC* S80I og *parE* L416F. *gyrA*, *parC* og *parE* er mål for fluorokinoloner, og alle mutasjonene funnet her er beskrevet å bidra til økte MIC-verdier mot disse antibiotikaene (Rice, 2012; Lesley R Varughese et al., 2018).

Det ble også identifisert virulensgener i prøve 2 og prøve 5 gjennom søk i VFDB-databasen, i tillegg til VirFinder og nBLAST-søk gjennom professor Lindstedt sin egne søke-pipeline for prøve 2. De mest sentrale resultatene fremstilles i tabell 4.6.

Tabell 4.6: sentrale virulensgener funnet i prøve 2 og 5 etter helgenomsekvensering, behandling av rådata og søk i databaser.

Virulensgen	Database	Identitet (%)	Query coverage (%)	Kommentar	Accession number
Prøve 2					
<i>sat</i>	nBLAST*	99,92	3889/3888	Sekretert autotransportør (AT)-toksin	HG941718
<i>vat</i>	nBLAST*	99,72	5632/5631	Haemoglobin protease, vakuolerende AT-toksin	KR094926
<i>kpsD</i>	VFDB	99,05	100	K1 bakteriekapsel <i>ksp</i> -gencluster	AAA21682
<i>kpsT</i>	VFDB	100	100		AAA24047
<i>kpsM</i>	VFDB	99,87	100		AAA24046
<i>neuB</i>	nBLAST*	100	100		NC_011750
<i>neuC</i>	nBLAST*	100	100		CP003034
<i>yfcV</i>	nBLAST*	97,18	100	Adhesjons-protein	NC_011750
<i>fuyA</i>	VFDB	99,95	100	Yersiniabactin-jern-reseptor	NP_405467
<i>irp1</i>	VFDB	99,33	100		NP_405471
<i>irp2</i>	VFDB	98,87	99,95		Biosyntetiske proteiner
<i>chuA</i>	VFDB	99,69	100	Yttermembran hem/hemoglobin-reseptor	NP_756170
<i>iucA</i>	nBLAST*	99,44	100	IuCABCD utgjør sideroforen aerobactin	CU928163
<i>iucB</i>	nBLAST*	99,4	100		AE014075
<i>iucC</i>	nBLAST*	98,16	100		AE014075
<i>iucD</i>	nBLAST*	99,84	100	IutA: Jern-aerobactin reseptor	CP001232
<i>iutA</i>	nBLAST*	99,85	100		CP011134
<i>antigen-43</i>	nBLAST*	99,43	78,1	Ahesin, assosiert med aggregering og biofilm	NZ_ANXM01000041

<i>upaB</i>	nBLAST*	98,07	2337/2331	Autotransportør (AT)- proteiner, UPEC- assosiert	AE014075
<i>upaC</i>	nBLAST*	99,93	100		AE014075
<i>ehaC</i>	nBLAST*	96,24	3754/3753	EHEC AT C	BA000007
<i>fdeC</i>	nBLAST*	99,65	100	Intimin-lignende protein (adhesin)	CP019777
<i>gipA</i>	nBLAST*	99,91	100	Virulensassosiert gen hos AIEC	NC_017634
<i>Iha</i>	nBLAST*	99,75	100	IrgA-homolog adhesin, virulensfaktor i UTI hos mus	CP018957
<i>malX</i>	nBLAST*	98,61	100	Patogenisitets-«island» (PAI)-markør	AF003742
<i>sinH</i> (<i>sivH</i>)	nBLAST*	98,07	100	Intimin-lignende adhesin	NMHI01000013
<i>sitA</i>	nBLAST*	97,16	100	Mangan-jern- transportør	FQ482074
<i>sitB</i>	nBLAST*	98,67	100		NC_017659
<i>sitC</i>	nBLAST*	98,95	100		CP000836
<i>sitD</i>	nBLAST*	97,09	100		UGFR01000001
<i>papA</i>	nBLAST*	100	100	«Pyelonephritis- associated pili» (pap)	AP018784
<i>papB</i>	VFDB	98,41	99,68		_****
<i>papI</i>	nBLAST*	99,57	100		CU928164
<i>papX</i>	nBLAST*	97,46	100		CP025251_
<i>usp</i>	nBLAST*	99,55	100	«uropathogenic specific protein» (usp)	CU651637
Prøve 5					
<i>flhD</i>	nr**	100	100	Flagellære transkripsjonsaktivatore r	WP_021805724.1
<i>flhC</i>	nr**	99,48	100		WP_021180920.1

<i>ompA</i>	nr**	99,73	100	Yttermembran-protein OmpA	WP_094981266.1
<i>hcp1</i>	nr**	99,39	100	Type VI sekresjons- system (T6SS)-relaterte gener	WP_024531156
<i>hcp2***</i>	VFDB	75,34	100		NP_232418
<i>clpV1</i>	nr**	100	100		WP_021178396.1
<i>vgrG1</i>	nr**	99,87	100		WP_0940982339.1

*Funnet i professor Lindsedt sin egne nBLAST søke-pipeline (ikke publisert)

** For sekvenser funnet blant annoterte gener i PROKKA ble det søkt på proteinsekvensen med pBLAST (NCBI) i databasen «Non-redundant protein sequences» (nr).

***Treff i VFDB-databasen mot en sekvens fra *Vibrio cholerae*.

****Accession number for *papB* ble ikke returnert ved søk i VFDB-databasen. Dette var sannsynligvis en feil i systemet for VFDB.

I prøve 2 ble det identifisert en rekke virulens-assosierte gener. Stammen hadde gener som koder to ExPEC-assosierte sekreterte toksiner, *sat* og *vat* (Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008), ved søk både i VFDB og ved nBLAST gjennom professor Lindstedts egne søke-pipeline. Sekvensene hadde identitet hhv. 99,49 og 99,69 i VFDB, og 99,92 og 99,72 % ved nBLAST. Det ble også funnet gener med høy sekvensID (99,05-100 %) til gener i *kps*-clusteret kodende bakteriekapsel K1(*kpsMDT*, *neuBC*) (Vann et al., 2004), samt gener homologe til type P fimbriae kodet av *pap*-clusteret (*papABIX*) i tillegg til *yfcv* kodende type 1 fimbriae. Fimbriagenene hadde sekvensID på hhv. 99,05-100 %, 97,46-100 (*papB* hadde 99,68 % QV) og 97,18 %. Et gen med 99,43 % identitet til *ag43*, hvorav det korresponderende proteinet antigen 43 (Ag43) er et adhesin assosiert med aggregering og biofilmformasjon, ble også identifisert gjennom nBLAST. «Query coverage» (QV) var imidlertid noe lav (78,1 %). Det ble videre funnet gener som var homologe til flere jernopptakssystemer. *iucABCD* (sekvensID 98,16-99,84 %) koder sideroforen aerobactin, og *iutA* (sekvensID 99,85) en reseptor for jern-aerobactin-komplekset. *chua* (sekvensID 99,69 %) koder for en yttermembran-reseptor for hem/hemoglobin. Til slutt ble det funnet gener med høy sekvensID til *fyuA-irp*-genclusteret. Disse var *fyuA* (sekvensID 99,95), *irp1* (sekvensID 99,33) og *irp2* (sekvensID 98,87). Dette genclusteret er involvert i opptak av jern gjennom sideroforen yersiniabactin. *sitABCD* koder et mangan-jern transportør-kompleks, og gener med 97,09-98,95 % sekvensID til disse komponentene ble også funnet.

Videre ble det funnet flere gener som var homologe til uropatogen-assosierte virulensdeterminanter, slik som *upaBC* (98,07 og 99,93 % identitet) og *usp* (99,55 % identitet). *Usp* er tidligere beskrevet i forbindelse med en UPEC-assosiert patogenisitiets-øy (PAI) (Yamamoto et al., 2001). Det ble i tillegg funnet et gen homologt til *malX* (98,61 % sekvensID), som er blitt identifisert som en PAI-markør for UPEC-stammen CFT073 (Guyer, Kao, & Mobley, 1998). I tillegg ble genet *Iha* kodende et UPEC-assosiert adhesin Iha identifisert gjennom nBALST-søk med 99,75 % sekvensID. Gener homologe til virulensdeterminanter assosiert med enterohemoragisk *E. coli* (EHEC) ble også oppdaget i prøve 2. Disse inkluderte de intimin-lignende proteinene *fdeC* og *sinH* (også kalt *sivH*), med hhv 99,65 og 98,07 % sekvensID, i tillegg til det overflateassosierte autotransportør-proteinet EhaC med 96,24 % sekvensID, og *gipA* med 99,91 % sekvensID.

I prøve 5 ble det identifisert gener med høy sekvensID til gener kodende flagellære systemer, i tillegg til yttermembranproteinet OmpA, samt type 6 sekresjonssystem (T6SS). *flhCD* koder flagellære transkripsjonsaktivatorer. *flhD*-genet funnet hadde 100 % sekvensID til et sekvensert FlhD fra *S. fonticola* (WP_021805724.1) ved pBLAST på proteinsekvens til genet i PROKKA. Tilsvarende søk på *flhC*-proteinsekvens hadde 99,48 % sekvensID til FlhC sekvensert fra *S. fonticola* (WP_021180920.1). Treff fra VFDB-databasen viste et treff på et gen som hadde 75,34 % sekvensID til et *hcp-2*-gen fra *Vibrio cholerae*. Søk på «hcp-2» i annoterte gener i PROKKA avslørte et *hcp-1*-gen som ved pBLAST på korresponderende proteinsekvens hadde 99,39 % sekvensID til «T6SS tube protein Hcp [Serratia fonticola]» (WP_024531156). Omkringliggende gener i PROKKA inkluderte *clpVI*, med en proteinsekvens med 100 % identitet til T6SS ATPase TssH fra *S. fonticola* (WP_021178396.1), og *vgrG1* med 99,87 % sekvensID til et T6SS-assosiert «tip-protein» VgrG fra *S. fonticola* (WP_0940982339.1). *hcp-2* ble ikke funnet ved søk i PROKKA. Videre ble virulensgenet *ompA* identifisert i VFDB med 99,73 % identitet til en OmpA-sekvens, også fra *S. fonticola* (WP_094981266.1). *ompA* koder for et yttermembranprotein, OmpA, som er høyt konservert blant gram-negative bakterier.

4.4 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Tabell 3.6 viser gjennomsnittlig MIC-verdi avlest fra inhiberingssonene etter to gjentak av AST med 12 ulike antibiotika på prøve 2, 3 og 5 med M.I.C. Evaluator (Oxoid), ETEST® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), eller MIC (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy)

gradient-strips på MH-agarskåler (vedlegg E). Tabellen viser også hvilke antibiotika de ulike prøvene ble klassifisert som resistente mot i henhold til MIC kliniske brytningspunkt fra EUCAST (EUCAST, 2020).

Tabell 4.6: Gjennomsnittlig MIC-verdi avlest under AST av prøve 2, 4 og 5 og kliniske brytningspunkt for MIC-verdier gjeldende for Enterobacterales, hentet fra EUCAST (2020). Røde tall indikerer MIC-verdier over oppgitt klinisk brytningspunkt.

Antibiotikum	MIC-verdier			EUCAST klinisk brytningspunkt* for MIC-verdier (R >)
	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 5	
Amikacin	2,5	0,625	2	8
Gentamicin	1,0	0,285	0,875	2
Streptomycin	8	1,25	2	-
Imipenem	0,12	1,5	0,22	4
Meropenem	0,035	1,25	0,063	8
Cefotaxim	≥ 32	≥ 32	1,0	2
Cefepim	16	3,5	0,158	4
Ciprofloxacin	≥ 32	0,032	0,014	0,5
Erytromycin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	-
Ampicillin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	8
Amoxicillin m/ klavulansyre	5	≥ 256	3,5	8
Trimetoprim	≥ 32	≥ 32	0,158	4

Røde tall indikerer MIC-verdier som er høyere enn EUCAST kliniske brytningspunkt, og derfor anses som klinisk resistente.

*Oppgitte brytningspunkt gjelder for arter tilhørende fylogeniske orden Enterobacterales.

Som det fremgår av tabellen viste prøve 2 høyest grad av resistens, med MIC-verdier som for fem ulike antibiotika (cefotaxim, cefepim, ciprofloxacin, ampicillin og trimetoprim) var over kliniske brytningspunkt fra EUCAST. Stammen kunne dermed klassifisert som klinisk resistente mot disse medikamentene. For de fleste av disse antibiotikumene var MIC-verdiene

maksimale i henhold til AR-strippene benyttet (≥ 32 for cefotaxim, ciprofloxacin og trimetoprim, og ≥ 256 for ampicillin). For cefepim ble en MIC-verdi på 16 avlest, som fremdeles er forholdsvis langt over det kliniske brytningspunktet 4. I tillegg ble det ikke observert noen inhiberingssone for prøve 2 på antibiotikumet erytromycin (MIC-verdi ≥ 256). EUCAST har imidlertid ikke noe brytningspunkt oppgitt for dette agens som er gjeldende for Enterobacterales. For prøve 3 var det fem ulike antibiotikum som det ikke ble observert noen inhiberingssone rundt (cefotaxim, erytromycin, ampicillin, amoxicillin m/klavulansyre og trimetoprim). Ingen kliniske brytningspunkt er imidlertid blitt beregnet som er gjeldende for bakterieslekten *Lewinella* som isolatet muligens tilhørte. Prøve 5 hadde generelt lavest MIC-verdier, med kun én MIC-verdi som var over klinisk brytningspunkt (ampicillin). I tillegg ble ingen hemningssone observert for antibiotikumet erytromycin, men som sagt finnes ingen brytningspunkt for dette agens som er gjeldende for Enterobacterales.

5 DISKUSJON

5.1 Fenotypisk deteksjon

I denne oppgaven ble det brukt et selektivt, kromogent medium (Oxoid Brilliance™ ESBL) til å screene for ESBL-produksjon blant bakterier isolert fra vannprøver på NMBU campus Ås. Fem renkulturer ble totalt dyrket fram på mediet, noe som indikerer at det finnes Enterobacteriaceae-arter med evne til å hydrolysere betalaktamer med utvidet spektrum i disse dammene. Dette er foruroligende ettersom produksjon av disse enzymene og spredning av genene anses som å være en stor helsemessig bekymring globalt i dag (J. D. Pitout & Laupland, 2008).

Oxoid Brilliance™ ESBL er fremstilt til bruk i medisinsk sammenheng for rask og direkte detektering av ESBL-produserende gramnegative Enterobacteriaceae-bakterier fra kliniske isolater i tillegg til identifisering av *E. coli* og arter i slektene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* og *Citrobacter* (såkalt KESC-gruppe) (Oxoid, 2010). Mediet er tilsatt ceftodoxime for å inhibere vekst av ikke-ESBL-produserende Enterobacteriaceae-arter. Tilsetningen av dette antibiotikumet i kromogene medier har i flere studier vist seg å føre til høyere sensitivitet for CTX-M-type ESBLer sammenlignet med andre ESBL-selektive medier (Glupczynski, Berhin, Bauraing, & Bogaerts, 2007). Miljøbakterier er generelt mer adaptive, har lavere membranpermeabilitet og mer effluks-systemer enn kliniske bakterier, som f.eks. *E. coli*, som

lever i mer «beskyttede» miljøer med mindre toksiske forbindelser (Iredell et al., 2016). Ved bruk av miljøprøver, slik som i denne oppgaven, kan det derfor tenkes at miljøbakterier av andre slekter kan vokse på mediet og slik gi misvisende resultater, noe som har blitt beskrevet tidligere (Huang et al., 2010). Dette ble også observert i prøve 1 og prøve 3 som var henholdsvis en *Pseudomonas*- og en *Lewinella*-art ifølge Sanger-sekvensering av 16S rRNA-genet.

Bruk av selektive medier kan sies å være en god metode for å raskt screene pasientprøver for å utelukke tilstedeværelse av ESBL-produserende bakterier på grunn av høy sensitivitet for disse men har viktige ulemper (Glupczynski et al., 2007; Huang et al., 2010). Lav spesifisitet gjør at videre testing er nødvendig for å verifisere resultater. I tillegg gir resultatene ingen info om hvilke gener som forårsaker observert fenotype, og videre undersøkelser er derfor nødvendig. Etter Sanger-sekvensering av 16S viste det seg også at prøve 1 og prøve 3 tilhørte andre slekter enn antatt ved fargescreening. Prøve 1, som fenotypisk fremsto som tilhørende KESC-gruppen, viste seg å være en *Pseudomonas*-art, mens prøve 3 ble antatt å være en *Lewinella*-art etter sekvensering selv om den ifølge fargescreening var *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*. Variable farger på *E. coli*-kulturer (alt fra grønn/turkis til lilla/blå) har også blitt rapportert om og kan føre til mistolking (Huang et al., 2010), men i denne oppgaven var fargen som forventet i henhold til produsentens instruksjoner (Oxoid, 2010). Det er også mulig at alternative resistensmekanismer (ikke ESBL-produksjon) fører til vekst på mediet. Gram-negative bakterier kan ofte bruke yttermembran-poriner og efflukspumper for å redusere membranpermeabilitet og øke effluks og slik fremstå som resistente (Davies & Davies, 2010; Iredell et al., 2016). En annen kilde til falske positive kan være overekspressjon av AmpC-enzymmer (Glupczynski et al., 2007; Huang et al., 2010). Selv om mediet ifølge produsenten skal inhibere vekst av slike AmpC-produserende arter (Oxoid, 2010), så har det blitt rapportert at disse likevel vokser på mediet (Huang et al., 2010; Sturød, Dahle, Berg, Steinbakk, & Wester, 2014) om enn ikke like godt som ikke-produserende isolater. Disse resultatene illustrerer viktigheten av videre undersøkelser. Det er viktig å korrekt identifisere mulige ESBL-produsenter ettersom feil i kliniske sammenhenger kan føre til at behandlinger ikke virker, noe som igjen kan føre til selektering og spredning av resistente fenotyper på grunn av selektivt press ved eksponering for antibiotika (Iredell et al., 2016).

5.2 Genotypisk deteksjon

5.2.1 16S rRNA Sanger-sekvensering

Ved Sanger-sekvensering av 16S rRNA amplifisert ved PCR var det to av prøvene som ikke dukket opp på gelen (se vedlegg C). Feil kan oppstå i en PCR-reaksjon dersom det er for lite eller for mye DNA i reaksjonsmiksen (ThermoFisher Scientific, u.å). For lav konsentrasjon kan føre til lavt produktutbytte, mens for mye DNA kan føre til høy grad av ikke-spesifikk amplifisering, og dermed også føre til lavt utbytte. Dette kan ha skjedd i prøve 3, der målt DNA-konsentrasjon ved Qubit før PCR var relativt lav i forhold til de andre prøvene (85,5 ng/ μ L), og i prøve 4 der DNA-konsentrasjonen var svært høy (560 ng/ μ L).

Det finnes flere styrker med analyse av 16S rRNA. Alle bakteriearter har dette genet, og det inneholder både svært konserverte regioner som man brukes til å konstruere universale primere, og variable regioner som kan brukes til taksonomiske studier (Clarridge, 2004). Databaser som GenBank inneholder store mengder sekvenserte 16S rRNA sekvenser som sekvenser fra ukjente prøver kan sammenlignes mot. I noen tilfeller kan dette imidlertid gjøre det vanskeligere å identifisere prøver dersom sekvensen matcher bra med flere velkjente arter (Clarridge, 2004). Dette kan særlig være et problem dersom man har veldig korte sekvenser. Dette ble observert i prøve 2 på tross av relativt lang «query»-sekvens, som fikk treff på både *Escherichia* og *Shigella*. I tilfellet med prøve 4, som hadde svært kort query-sekvens, ble det ikke funnet noen treff i det hele tatt, og det var derfor uvisst hvilken slekt denne tilhørte. Den ble heller ikke undersøkt videre. Prøve 3 hadde også veldig kort sekvens (20 bp). Det beste treffet ved nBLAST-søk var for dette isolatet på arten slekten *Lewinella*. Ettersom query-lengden kun var på 20 bp var det resultatet imidlertid meget usikkert. Dersom identifikasjonen av isolatet skulle stemme er dette interessant. *Lewinella* er en bakterieslekt i familien *Saprospiraceae* som tidligere er blitt beskrevet som gram-negativ kjemoorganotrof og strikt anaerob (Sly, Taghaviti, & Fegan, 1998). Den har hovedsakelig blitt isolert fra marine miljøer og er blitt rapportert å trenge sjøvann (NaCl) for å vokse (Kang, Kim, Joung, & Joh, 2017; Sly et al., 1998). Det har imidlertid for eksempel blitt observert svak vekst av *L. xylanilytica* ved 0 og 6 % NaCl (Sung, Lee, Kim, & Shin, 2015). Tatt i betraktning at prøven ble isolert fra en dam med ferskvann på NMBU campus Ås, et stykke fra sjøen, kan dette sees på som litt rart.

5.2.2 Multi- og singelplex PCR for screening av viktige ARG

Multipleks PCR etterfulgt av gelelektroforese ble utført med primermikser valgt på bakgrunn av de mest klinisk signifikante ESBL-genene produsert av Enterobacteriaceae (Dallenne et al., 2010) (vedlegg B). Tolkning av gelbilder av resulterende PCR-produkt indikerte genfamiliene CTX-M-1 eller CTX-M-9 fra prøve 2, og også et gen som så ut til å være *bla*_{CTX-M} gruppe 2 eller *bla*_{OXA} i prøve 1 (tabell 4.3, vedlegg C). Ved videre undersøkelse med singelpleks og elektroforese ble det påvist en CTX-M fra gruppe 1 i prøve 2, men ingen positive bånd i singelpleks av prøve 1 (vedlegg C). Det kan tenkes at det burde ha blitt sjekket for siste mulige gen fra primermiksen (*bla*_{SHV}). Prøven ble ikke videre undersøkt. Styrken med multipleks PCR er rask screening etter flere gener i samme reaksjon ved hjelp av utvalgte gruppe-spesifikke primere, men en viktig ulempe er begrensning i antall primere som kan benyttes, og det kan derfor ikke utelukkes at noen av de negative prøvene produserte andre, mindre vanlige, ESBL-enzymmer (Brownie et al., 1997).

Sanger-sekvensering bekreftet funnet i prøve 2 som en klasse A ESBL og et CTX-M-enzym (vedlegg A), men ikke nærmere. Sannsynligvis var det for lav DNA-konsentrasjonen til å nøyere identifisere enzymet. Det finnes et stort antall CTX-M-enzymmer, og det kan derfor tenkes at en lengre sekvens er nødvendig for å skille mellom nært relaterte enzymmer. Resultatene stemmer overens med globale funn i dag. CTX-M er de generelt vanligste ESBL-typene, og CTX-M-gr1 er de mest spredte enzymene (Canton et al., 2012).

5.3 Virulens

5.3.1 *E. coli*-stamme ST1193, serotype O75:K1:H5

Helgenomsekvensering med MiSeq og typing med MLST av prøve 2 bekreftet antakelsen om at det var en *E. coli*, og stammen ble identifisert som en sekvenstype ST1193, serotype O75:K1:H5. ST1193 er en nylig identifisert ekstraintestinal patogen *E. coli* (ExPEC) (V. L. Tchesnokova et al., 2019). Den er avledet fra ST14 klonekompleks (STc14) som i likhet med ST131 er del av den virulensassosierte fylogenetiske gruppen B2. Dette er den vanligste gruppen *E. coli* isolert fra mennesker (Platell et al., 2012). ST1193 isolater fermenterer ikke laktose, har oftest K1 bakteriekapsel (noen ganger K5), er resistente mot fluorokuinoloner samt et bredt spekter av andre antibiotikatyper, i noen tilfeller inkludert tredje-generasjons-cefalosporiner (V. L. Tchesnokova et al., 2019). I løpet av de siste årene har ExPEC ST1193 blitt i økende grad isolert fra mennesker, og blitt rapportert om fra flere distinkte geografiske

områder i verden, inkludert Norge (J. R. Johnson et al., 2019; Jørgensen et al., 2017; Platell et al., 2012; V. L. Tchesnokova et al., 2019).

De fleste tilfellene av ST1193 har blitt isolert fra avførings- eller urogenitale prøver, men ett funn av typen var i forbindelse med alvorlig hjernehinnebetennelse hos nyfødt (Iqbal et al., 2016). Stammen i prøve 2 var av samme serotype som ble identifisert i dette tilfellet, og kodet flere av de samme virulensgenene som ble funnet av Iqbal et al. Kanskje spesielt viktig i denne sammenhengen var at det ble funnet gener med høy sekvensID til *kps*-clusteret kodende bakteriekapsel K1 (99,05-100 %, se tabell 3.6). K1 bakteriekapsel er en viktig virulensfaktor blant *E. coli*, og er høyt assosiert med meningitt hos nyfødte, i tillegg til sepsis og bakteriemi (Kaczmarek, Budzyńska, & Gospodarek, 2014). Man tror den er essensiell for bakteriens overlevelse i det sentrale nervesystemet hos verten, i tillegg til at den sannsynligvis hjelper til i overgangen fra blod til hjernehinne ved binding til spesifikt vev (Hoffman, Wass, Stins, & Kim, 1999; K. S. Kim et al., 1992). Biosyntese og transport av K1-kapselen hos *E. coli* kodes av *kps*-gen-clusteret. Dette er funksjonelt delt inn i tre deler, der den sentrale delen er unik for kapsel-type. For K1 inneholder denne delen *neu*-gener. I prøve 2 ble det genene *kpsM* og *kpsT* identifisert ved søk mot VFDB databasen, i tillegg til *neuB* og *neuC* (tabell 4.6). Dette tydet på at stammen uttrykte K1 bakteriekapsel (Vann et al., 2004).

Genene *vat*, *chuA*, *yfcV* og *fyuA* ble alle identifisert med høy sekvensID til kjente *E. coli*-sekvenser (tabell 4.6). Den laveste av disse var *yfcV* med 97,18 % identitet. Denne kombinasjonen av gener er en sterk indikator på en UPEC-stamme (Spurbeck et al., 2012). UPEC er den typen ExPEC som er vanligst assosiert med sykdom hos mennesker. De er den viktigste årsaken til UTI utenfor sykehus, og er i tillegg en vanlig årsak til helseassosierte UTI (Wiles et al., 2008). I Norge var UTI den vanligste typen helseassosierte infeksjoner på sykehjem i 2018, og den hyppigste årsak til bruk av antibiotika på sykehjem (Folkehelseinstituttet, 2019). Forekomsten av ESBL-positive blod- og urinisolater av *E. coli* var heldigvis relativt lav (hhv. 6,5 og 3,7 %). Multiresistente isolater av ST1193, hvorav ett var CTX-M-produsent, har imidlertid blitt beskrevet fra avføringsprøver fra pasienter på et universitetssykehus i Norge allerede i 2015-2016 (Jørgensen et al., 2017).

Virulensfaktorer som er vanligst assosiert med UPEC inkluderer fimbriae, som gjør bakterien i stand til å feste seg til verts-vev, i tillegg til jernopptaks-systemer og sekresjon av toksiner. Blant disse faktorene er evnen til å adhere til verts-vev, som igjen promoterer invasjon av

uroepiteliale celler, essensiell for å unngå immunsystemet og effektivt kolonisere urinveiene ved UTI (Wiles et al., 2008). Jern er et essensielt grunnstoff som infeksjøs bakterier har begrenset tilgang til i vert. ExPEC, og særlig UPEC-isolater har derfor utviklet mange strategier for opptak av jern fra vert, inkludert bruk av sideroforer – sekreterte, små molekyler med høy affinitet for Fe³⁺. Bakteriene tar inn jern-bundne sideroforer gjennom reseptorer som fasiliterer transport av komplekset over membranen og inn i cytosol hvor jernet frigjøres (Wiles et al., 2008). ExPEC koder også flere toksiner, inkludert type V sekreterte toksiner, kjent som autotransportører (AT) som kan forårsake varierende grad av skade hos vert (Wiles et al., 2008). I prøve 2 ble gener kodende for systemer i alle disse viktige «virulens-kategoriene» identifisert.

5.3.2 *Fimbriae og adhesjon*

UPEC-stammer regulerer overgang mellom motil og stillestående fase gjennom å regulere ekspresjonen av flagella og fimbriae. Dette kalles fase-variasjon. Bakteriell motilitet er viktig for UPEC-bakterier sin evne til å spre seg til nye områder i urinveiene i tillegg til å unngå vertens immunforsvar, og evnen til adhesjon er essensiell i de tidlige stadiene av kolonisering (M. C. Lane, Simms, & Mobley, 2007). I denne sammenhengen er ekspresjon av fimbriae svært viktig. En studie fant en signifikant sammenheng mellom antall fimbriae-gener og virulens blant UPEC-isolater (Spurbeck et al., 2011). Isolater med lavere antall fimbriae-gener var mindre virulente og var i hovedsak isolert fra avføringsprøver, mens de med et høyere antall fimbriae-gener var mer virulente og primært assosierte med urinveis-isolater.

Blant de best studerte fimbriae fra UPEC er såkalte P-fimbriae som er kodet av *pap*-gen-clusteret (pyelonefritt-assosierte pili) (M. Lane & Mobley, 2007). Tilstedeværelse av P-fimbriae har blitt vist å forbedre tidlig etablering av UPEC-isolater i urinveier hos mennesker (Wullt et al., 2000), og er sterkt assosiert med akutt nyreinfeksjon (M. Lane & Mobley, 2007). P-fimbriae er kjent for å mediere adhesjon til uroepiteliale celler selv i nærvær av mannose, som er en kjent hemmer av type 1 fimbriae (Edén & Hansson, 1978). Flere gener fra *pap*-clusteret ble funnet i HGS-resultatene fra prøve 2: *papA*, *papB*, *papI* og *papX* med 97,46-100 % sekvensID (tabell 4.6). PapI/B er regulatoriske proteiner av *pap*-operonet og PapA koder for den største subenheten av P pilus. PapX er en regulator av type-1-fimbria-mediert motilitet, og er i en studie blitt demonstrert å regulere motilitet hos UPEC-stammen CFT073 ved å binde promotoren *flhD* og slik undertrykke transkripsjon av den flagellære regulatoren FlhD₂C₂ (Simms & Mobley, 2008). Dette medierte overgang mellom motil og adhesjons-fase i stammen.

Det ble også funnet et antatt type 1 fimbriae-gen, *yfcV*, i prøve 2 (97,18 % identitet). Dette genet er funnet å være signifikant mer assosiert med urinisolater av *E. coli* enn med kommensale isolater (Spurbeck et al., 2011). Funnene av disse fimbria-genene indikerte at ST1193-stammen funnet i prøve 2 hadde høy evne til å adhere til uroepitel.

I tillegg til fimbriae-gener ble også et gen kodende det UPEC-assosiert yttermembranproteinet Iha, som er antatt å ha en viktig funksjon i adhesjon under UTI, identifisert i ST1193-stammen med 99,79 % sekvensID (tabell 4.6). IrgA-homologen Iha er blitt vist å være en viktig virulensfaktor ved UTI hos mus (J. R. Johnson et al., 2005). I denne studien ble det også vist at en ikke-adhesiv *E. coli* stamme fikk evnen til å adhere til menneskelige uroepiteliale celler etter rekombinasjon med Iha fra et UTI-isolat av CT073, i tillegg til en signifikant høyere forekomst av Iha blant UTI-isolater sammenlignet med fekale isolater av *E. coli*.

5.3.3 Autotransportører

Autotransportører (AT) er en stor familie av sekreterte proteiner hos gram-negative bakterier med svært konservert struktur bestående av tre funksjonelle domener som medierer transport over inner- og yttermembraner (Henderson, Navarro-Garcia, & Nataro, 1998). Mange av AT-proteinene som er blitt identifisert fra *E. coli* er assosiert med virulens, og kan ha en rekke ulike funksjoner inkludert adhesjon, hemagglutineringsaktivitet, proteaseaktivitet, biofilmformasjon og toksisk aktivitet (Wells, Totsika, & Schembri, 2010). Flere AT-proteiner med ulike funksjoner ble identifisert i stammen fra prøve 2 etter analyse av helgenomsekvenserings-resultatene (tabell 4.6). Antigen-43 (Ag43) (produkt av *flu*-genet, også kalt *agt43*) er et selvgjenkjennende overflateprotein hos *E. coli*, og medierer autoaggregering av statisk flytende kulturer (Henderson, Meehan, & Owen, 1997). På grunn av denne funksjonen har proteinet vist seg å være viktig for biofilmdannelse, og funksjonell analyse av proteinet har vist at det spiller en rolle i langvarig overlevelse i urinveiene hos mus (Ulett et al., 2007). Genet identifisert i denne stammen hadde 99,43 % sekvensID med en kjent *E. coli ag43*-sekvens (NZ_ANXM01000041), imidlertid med litt lav «query coverage» (78,1 %). Uropatogenisk *E. coli* autotransportør (Upa) er et annet overflatelokalisert AT-protein assosiert med aggregering, biofilmdannelse og langvarig kolonisering av blæren i en musemodell (Allsopp et al., 2012; Zude, Leimbach, & Dobrindt, 2014). I prøve 2 ble genene *upaB* og *upaC* identifisert (hhv. 98,07, 99,93 % sekvensID). Ekspresjon av UpaC har blitt vist å promotere biofilmdannelse eller aggregering under ulike eksperimentelle forhold, mens UpaB ser ut til å interagere med verts-

makromolekyler og slik promotere adhesjon til ekstracellulære proteiner og langvarig kolonisering av vert (Allsopp et al., 2012; Paxman et al., 2019; Zude et al., 2014).

Det ble funnet et annet gen med 96,24 % sekvensID til et gen som også sannsynligvis er et overflatelokalisert AT-protein hos *E. coli* – *ehaC*. Det som er interessant med *eha*-genene er at de er assosiert med adhesjon og biofilmformasjon hos enterohemoragisk *E. coli* (EHEC) (Wells et al., 2008). EHEC er viktige humanpatogener som kan forårsake svært alvorlige tarminfeksjoner med, i de verste tilfellene, massiv blodig diaré, og infeksjonen kan i noen tilfeller føre til utvikling av hemolytisk-uremisk-syndrom (HUS) som kan være dødelig (Folkehelseinstituttet, 2010a). EhaA, B og D har vist evne til å indusere dannelse av biofilm, men funksjonen til EhaC, som ble funnet her, er foreløpig ikke blitt bekreftet, selv om en posisjonell homolog til proteinet har vist seg, i kombinasjon med en promoter, å ha evne til å promotere biofilmformasjon på abiotiske overflater (Wells et al., 2008). En tidligere studie har funnet at Eha har redusert forekomst blant ExPEC-stammer, der Upa er en mer prevalent AT-homolog (Zude et al., 2014). At stammen funnet her har en Eha-variant i tillegg til Upa-genene kan derfor sees som uvanlig og interessant, og kan indikere en forhøyet evne til adhesjon til ulikt humant vev.

5.3.4 Intimin-lignende proteiner

Det ble videre funnet flere gener kodende proteiner assosiert med enteropatogeniske *E. coli* (EPEC) i ST1193-stammen. FdeC er et overflatelokalisert adhesjons-protein som har strukturelle likheter med proteinet intimin. Intimin og invasiv er medlemmer av en stor familie virulensrelaterte bakterielle adhesjons-proteiner. Intimin er assosiert med både EPEC og enterohemoroagisk *E. coli* (EHEC), mens invasin finnes i de enteropatogene *Yersinia*-artene *Y. enterocolitica* og *Y. pseudotuberculosis* (Leo, Oberhettinger, Schütz, & Linke, 2015). Proteinene FdeC har blitt vist å ha bidra i kolonisering av nyreveg i en musemodell (Nesta et al., 2012), trolig gjennom å ha en viktig rolle i biofilmdannelse (Easton et al., 2014). I ST1193-stammen fra prøve 2 ble et gen med 99,65 % sekvensID til *fdeC* identifisert (tabell 4.6). SinH («*Salmonella* invasin-homolog») er et invasin-lignende protein, og ble funnet med 98,07 % sekvensID. Den spesifikke funksjonen til dette proteinet er ikke blitt beskrevet, men ettersom det er signifikant assosiert med UTI er det antatt å være en viktig virulensfaktor for UPEC (Shakhathreh, Swedan, Ma'en, & Khabour, 2019). I tillegg ble genet *gipA* funnet med 99,91 % sekvensID. GipA er blitt rapportert som en viktig faktor for overlevelse og vekst av *Salmonella*

Typhimurium i tarmen hos mus (Stanley, Ellermeier, & Slauch, 2000). Genet er også blitt assosiert med adherent-invasive *E. coli* (AIEC), som er i stand til å binde til epiteliale celler i tarmen hos verten og kan bidra til inflammatorisk tarmsykdom (IBD) (J. G. Lee et al., 2019). *gipA* har også blitt funnet i *E. coli* stammer assosiert med UTI, inkludert UPEC-stammer (Vazeille et al., 2016). Funnet av disse genene i tillegg til de UPEC-assosierte virulensfaktorene indikerer at den identifiserte *E. coli* ST1193-stammen har potensial til å forårsake et bredt spekter av ulike infeksjoner.

5.3.5 Jernopptakssystemer

Det er vanlig for UPEC-stammer å besitte gener for flere ulike jernopptaks-systemer (Wiles et al., 2008). Flere homologer til gener fra slike systemer ble identifisert i genomet til prøve 2. Bakterier som uttrykker flere systemer har en viktig fordel i kolonisering av vert (Torres, Redford, Welch, & Payne, 2001). Tilstedeværelsen av disse genene i *E. coli*-stammen fra prøve 2 indikerer stor evne til opptak av jern og dermed til potensial for langvarig kolonisering og overlevelse i vert.

De fleste ExPEC-stammer kan bruke hem, eller hemoglobin, som en direkte jernkilde ved å uttrykke en spesifikk yttermembran-reseptor som kodes av *chuA*-genet («*E. coli* haem-utilizing gene») (Torres & Payne, 1997; Torres et al., 2001). Dette genet ble identifisert i prøve 2 med 99,69 % sekvensID til *chuA*-sekvensen fra EHEC-stammen CFT073 (NP_756170) (Torres & Payne, 1997). Hos denne stammen førte delesjon av genet til tap av vekst på jernfattig medium med hem. Muligheten til å bruke hem som jernkilde kan derfor gi stammene som uttrykker ChuA en fordel foran ikke-produsenter når det gjelder evne til kolonisering av urinveier (Torres et al., 2001). I tillegg ble to gener kodende siderofor-reseptorer identifisert i prøve 2. Sideroforen aerobactin produseres ofte av patogene medlemmer av Enterobacteriaceae, og ser ut til å være en viktig faktor i ekstracellulær patogenisitet, spesielt hos *E. coli*-stammer som forårsaker sepsis, UTI og meningitt (De Lorenzo & Martinez, 1988). Aerobactin er funnet å være viktig i virulens hos både APEC og UPEC (Gao et al., 2012), men er særlig assosiert med APEC der genene ofte er lokalisert på store, overførbare plasmider (T. J. Johnson, Siek, Johnson, & Nolan, 2006), noe som indikerer at APEC-stammer potensielt kan fungere som et reservoar for virulensgener for andre bakterier (Ewers et al., 2007). Biosyntese av aerobactin kodes av *iucABCD*-operonet, og opptak reguleres av en reseptor kodet av genet *iutA* (De

Lorenzo & Martinez, 1988). Både *iucABCD* og *iutA* ble funnet i prøve 2 med høy sekvensID til tidligere sekvenserte gener fra *E. coli* (tabell 3.6).

Gener med 98,87-99,95 % sekvensID til genclusteret *fyuA-irp* ble også funnet i ST1193-stammen. Gen-clusteret *fyuA-irp* koder for et jern-opptaks-system mediert av sideroforen (jern-bæremolekyl) yersinabactin (Ybt), og kodes på en kromosomal «High-pathogenicity Island» (HPI) (S Schubert, Rakin, Karch, Carniel, & Heesemann, 1998). «Ferric yersiniabactin uptake» (*fyu*) koder et yttermembran-protein som fungerer som en reseptor for Ybt (Hancock, Ferrieres, & Klemm, 2008). Genene *irp1* og *irp2* koder for proteiner som man tror er involvert i produksjon av Ybt. Unikt med Ybt HPI er en bred distribusjon blant ulike medlemmer av Enterobacteriaceae, spesielt blant ExPEC som forårsaker UTI, sepsis og meningitt hos nyfødte (Sören Schubert, Picard, Gouriou, Heesemann, & Denamur, 2002). Dette har trolig skjedd som følge av HGO (S Schubert et al., 1998). Mesteparten av HPI-positive ExPEC har vist seg å ha et funksjonelt Ybt-system. Dette indikerer selektivt press for vedlikehold av dette systemet (Sören Schubert, Cuenca, Fischer, & Heesemann, 2000). Systemet er også i høy grad blitt assosiert med virulens hos mus (Sören Schubert et al., 2002). FyuA har blitt vist ha en viktig funksjon i biofilmdannelse av UPEC i menneskelig urin (Hancock et al., 2008).

Til slutt ble det også identifisert gener med høy sekvensID til operonet *sitABCD* (tabell 3.6). SitABCD er et medlem av de periplasmiske «ATP-binding Cassett» (ABC)-transportørene. Tidligere har tidligere proteinet blitt indikert å fungere som en jern- og mangan-transportør i en avian-patogeniske *E. coli* (APEC)-stamme i tillegg til å gjenopprette vekst på jernfattig medium for en ikke-virulent *E. coli* stamme (Sabri, Léveillé, & Dozois, 2006). Senere har SitABCD blir indikert å være signifikant mer assosiert med APEC- og ExPEC-stammer i sammenligning med kommensale stammer og diaréfremkallende *E. coli* (DEC) ((Sabri et al., 2008), og kildene der).

5.3.6 «Pathogenicity associated islands» (PAI)

Virulensassosierte gener i bakterier er ofte lokalisert på spesifikke regioner i bakteriekromosomet kalt patogenisitetes-øyer («pathogenicity associated islands» (PAI)) der virulensgener har akkumulert. Ybt HPI er et eksempel på en type PAI. PAIer, og deres assosierte virulensgener, har spredt seg mellom bakteriepopulasjoner gjennom HGT (J Hacker, Blum-Oehler, Mühlendorfer, & Tschäpe, 1997). PAIer er MGEr og inneholder

insersjonssekvenser, integraser og transposaser (J Hacker et al., 1997), noe som gir mekanismer for koordinert HGO av virulensgenene (Jörg Hacker & Kaper, 2000).

malX er blitt identifisert som en PAI-markør fra ExPEC-stammen CFT073 (Guyer et al., 1998), og et gen med 98,61 % sekvensID til en *malX*-sekvens ble identifisert i stammen fra prøve 2. *malX* koder for et fosfotransferase-enzym som gjenkjenner maltose og glukose og kan slik gjøre bakterien i stand til å bruke disse sukkerne som substrater, selv om de ikke er naturlige substrater for systemet (Reidl & Boos, 1991). Genet er ekstra vanlig blant ExPEC, og har blant annet blitt assosiert med NMEC (J. R. Johnson, Oswald, O'Bryan, Kuskowski, & Spanjaard, 2002). I tillegg ble «Uropathogenic-specific protein» (Usp), som er forbundet med en UPEC-relatert antatt PAI (Yamamoto et al., 2001), også funnet i prøve 2, kodet av genet *usp*. Dette genet hadde 99,55 % identitet til en tidligere identifisert Usp fra *E. coli* (tabell 4.6). Dette proteinet er antatt å bidra til virulens i UPEC-infeksjoner basert på tidligere assosiasjon med UTI i en musemodell, samt at proteinet har blitt oftere assosiert med UPEC-stammer enn fekale isolater (referanser i (Zaw et al., 2013)). Sekvensen til Usp inneholder H-N-H-motivet som finnes i en rekke ulike nukleaser, inkludert bakteriosiner med nukleaseaktivitet, og denne er blitt vist å gi nuklease-aktivitet til Usp (Zaw et al., 2013). Proteinets er blitt foreslått å være et bakteriosin (Parret & De Mot, 2002). Funnet av *malX* og *usp* i denne stammen, i tillegg til *fyu-irp*-genclusteret tidligere beskrevet, indikerer at stammen i prøve 2 besitter minst én PAI, noe som ikke er overraskende ettersom mange medlemmer av Enterobacteriaceae kan forårsake ulike typer infeksjoner via gener kodet i PAIer (Jörg Hacker & Kaper, 2000). Stammen kan potensielt spre virulensgener gjennom PAI i miljøet (funnet i Andedammen) til andre mottakelige potensielt virulente stammer, noe som er bekymringsverdig.

5.3.7 Sekreterte toksiner

Sekretert autotransportør-toksin (Sat) og vakuolerende autotransportør-toksin (Vat) er begge medlemmer av klasse I serinprotease-autotransportører av Enterobacteriaceae (SPATeR) som er en subfamilie av autotransportør-proteiner. Dette er toksiske serinproteaser som sekreteres og har konserverte struktur blant enteriske patogener av Enterobacteriaceae (Boisen, Ruiz-Perez, Scheutz, Krogfelt, & Nataro, 2009; Dutta, Cappello, Navarro-García, & Nataro, 2002). Både Sat- og Vat-produkerende UPEC har vist seg å være signifikant mer assosiert med UTIer sammenlignet med DEC eller kommensale isolater (Restieri, Garriss, Locas, & Dozois, 2007). Vat-producenter har vist seg å i større grad kolonisere urinveier enn ikke-producenter av

toksinet (Spurbeck et al., 2012). *Vat* og *Sat*, var i en studie av Tapader et al. de klart mest isolerte SPATE-proteinene blant isolater fra sepsis-tilfeller hos nyfødte (hhv. 51 og 39 %) (Tapader et al., 2014). *E. coli*-stammen fra prøve 2 inneholdt et gen med 99,49 % sekvensID til et sekvensert *sat*-gen fra *E. coli* CFT073 (NP_755494), og et med 99,72 % sekvensID til *vat* fra *E. coli*-stammen PAB05 (tabell 4.6). Kombinasjonen av disse to genene, begge i stor grad assosiert med svært virulente stammer, tyder på at stammen har stort potensial til å forårsake sykdom.

5.3.8 *Serratia fonticola*: virulens

Helgenomsekvensering med MiSeq av prøve 5 bekreftet antakelsen om at det var en *Serratia*-art, nærmere bestemt *S. fonticola*. Det var ikke mulig å identifisere stammen med MLST.

Serratia er miljøbakterier som vanligvis finnes i vann og jord, men er også assosiert med insekter, planter og dyr (Mahlen, 2011). *S. marcescens* er anerkjent som en viktig humanpatogen, og er den vanligste *Serratia*-arten isolert i forbindelse med infeksjon hos mennesker (Laupland et al., 2007). *S. fonticola* er imidlertid en uvanlig humanpatogen som er blitt lite isolert i klinisk sammenheng. Tidligere rapportert består hovedsakelig av infeksjoner i hud- og bløtvev, men har i tillegg nevnt blodforgiftning, urinveisinfeksjoner og asymptomatisk bakteriuri (ABU), samt ett tilfelle av diaré (Aljorayid, Viau, Castellino, & Jump, 2016). Selv om *S. fonticola* alene kan forårsake sykdom, er dette relativt sjeldent, og arten har oftest blitt isolert i forbindelse med polymikrobielle infeksjoner der den trolig er en «tilskuer» (Aljorayid et al., 2016).

Serratia-arter er vanligvis opportunistisk patogener, og virulensgener produsert av dem er ikke godt forstått (Mahlen, 2011). De fleste virulens-genene funnet i prøve 5 var relatert til produksjon av flageller (tabell 4.6, vedlegg D). De mest signifikante var kanskje *flhD* og *flhC* med sekvensIDer på hhv 100 og 99,48 % til kjente *S. fonticola*-sekvenser. Hos tarmbakterier er ekspresjon av flageller kontrollert av operonet *flhDC* i tillegg til at genene er viktige for «quorum sensing» (QS) (Van Houdt, Givskov, & Michiels, 2007). I tillegg er *flhDC* involvert i regulering av hemolysin-produksjon og i sverming og biofilmproduksjon hos *S. marcescens* (Lin et al., 2010; Van Houdt et al., 2007). Flagellær motilitet har vist seg å være nødvendig både for effektiv cellulær invasjon av en vert hos *Y. enterocolitica* (Young, Badger, & Miller,

2000) og for sekresjon av proteiner som påvirker bakterie-vert-interaksjoner (Young, Schmiel, & Miller, 1999).

5.3.9 *OmpA*

Et gen med 99,73 % sekvensID til *ompA* fra *S. fonticola* ble funnet i stammen fra prøve 5. Genet *ompA* koder for yttermembran-protein A som er svært konservert blant bakteriearter, spesielt hos gram-negative tarmbakterier (Vila-Farrés et al., 2017). Mange patogene bakterier bruker yttermembran-proteiner (OMP'er) til å interagere med vertsmiljøet for å inducere ekspresjon av virulensfaktorer, for å invadere vev og for å unngå vertens immunsystem (Vila-Farrés et al., 2017). OmpA-proteinet er multifunksjonelt og har også blitt vist å ha funksjoner i både adhesion, innvasjon av vert, biofilmformasjon og som en reseptor for flere bakteriofager (Smith, Mahon, Lambert, & Fagan, 2007). Hos mennesker har OmpA blitt assosiert med utvikling av lungebetennelse og bakteriemi hos den gram-negative bakterien *Acinetobacter baumannii* (Sánchez-Encinales et al., 2017). Hos *E. coli* er OmpA blitt assosiert med hjernehinnebetennelse (Khan et al., 2003). *ompA* ble forøvrig funnet også i *E. coli*-stammen i prøve 5 hvor det identifiserte genet hadde 99,52 % sekvensID til en kjent *ompA*-sekvens fra VFDB-databasen (AAF37887, se vedlegg D).

5.3.10 Type VI sekresjonssystem

Det ble funnet flere gener assosiert med type VI sekresjonssystemer (T6SS) i *S. fonticola*-stammen fra prøve 5. Et treff på *hcp-2* fra *Vibrio cholerae* med 75,34 % sekvensID til stammen ble identifisert ved søk i VFDB (tabell 4.6). Blant annoterte gener i PROKKA ble *hcp-1*, *clpVI* og *vgrG1* funnet. Disse hadde proteinsekvenser med hhv. 99,32, 100 og 99,87 % identitet til T6SS-assosierte proteiner fra *S. fonticola*.

Type VI sekresjonssystemer (T6SS) er en mekanisme for transport av proteiner gjennom innermembranen og celleveggen hos gram-negative bakterier (Bingle, Bailey, & Pallen, 2008). Systemet ble først beskrevet i *Vibrio cholerae* kodet av *vas*-genene («virulence associated secretion» - *vas*) (Pukatzki et al., 2006). Forfatterene viste at *vas*-genene medierte ekstracellulær translokasjon av proteiner og ga cytotoxisk aktivitet mot makrofager (hvite blodceller) gjennom celle-celle-kontakt i en *Dictyostelium*-modell (amøbe-slekt). I tillegg fant de at mange gram-negative bakterier bærer gener som er homologe til *vas*-genene.

hcp-1 og *hcp-2* er to alleler som begge koder for et protein som korresponderer til «hemolysin-koregulert-protein» (HCP, også kalt TssD), som hos *V. cholerae* uttrykkes sammen med hemolysinet HlyA (Bingle et al., 2008). Pukatzki et al. fant at både *hcp-1* og *hcp-2* var essensielle i den cytotoxiske aktiviteten til *V. cholerae*. Senere ble det beskrevet gjennom forskning på mutanter av *Aeromonas hydrophila* i en musemodell at T6SS spiller en viktig rolle i virulens, mer spesifikt at HCP-proteinet virket inn på bakteriens evne til å unngå det murine immunforsvaret gjennom å indusere produksjonen av cytokiner som hemmer fagocytose (Suarez, Sierra, Kirtley, & Chopra, 2010). HCP-proteinene var blant de første proteinene som ble identifisert som substrater for T6SS, og ser ut til å bli ekstracellulært sekretert av alle T6SS-systemer (Bingle et al., 2008). ClpV (også kalt TssH) er en ATPase, og tap av ClpV1 eller dets ATPase-motiv har i *P. aeruginosa* vist seg å føre til stans av sekretering (Mougous et al., 2006). «Valine–glycine repeat protein G» (VgrG) er også et sekretert protein i T6SS. VgrG1 har blitt vist *in vitro* å være i stand til å kovalent krysslinke actin, og overføres til makrofager ved hjelp av T6SS. Det finnes imidlertid også bevis for at denne prosessen er avhengig av to ekstra VgrG-enheter (VgrG2 og 3) som til sammen danner et kompleks som fungerer som en membranpenetrerende struktur og som leverer VgrG1 til vertens cytoplasma (Bingle et al., 2008). VgrG2 og 3 ble ikke identifisert i genomet til prøve 5. Det er imidlertid likevel mulig at homologe gener er til stede i stammen, ettersom ikke alle gener er navngitt i PROKKA (Lindstedt, B.A, personlig kommunikasjon, 2020).

T6SS har også blitt identifisert i *P. aeruginosa*, hvor et av systemene er vist å påvirke patogenesitet i cystisk fibrose pasienter, hvorav sekretering av Hcp-1 var viktig (Mougous et al., 2006), og i enteroaggregative *E. coli* (EAEC), kodet på PAIer, i tillegg til flere *E. coli* stammer og en rekke andre patogene bakterier (referanser i (Bingle et al., 2008). Viktigheten til T6SS blir altså klarere og klarere, spesielt på grunn av deres bidrag til virulens blant klinisk viktige stammer. T6SS har også blitt identifisert i *S. marcescens* hvor systemet er vist å gjøre bakterien i stand til å effektivt drepe konkurrerende bakterier i miljøet (Murdoch et al., 2011). Systemet induserer produksjon av antibakterielle toksiner og selvbeskyttende proteiner som bidrar til virulens overfor konkurrenter i miljøet, til og med beslektede *Serratia*-arter.

Ingen studier om T6SS-systemer i *S. fonticola* ble funnet i arbeidet med denne oppgaven. Ettersom dette er blitt identifisert i en rekke gram-negative bakterier, inkludert *S. marcescens*, er det imidlertid sannsynlig at stammen kan uttrykke et T6SS-system, spesielt med tanke på at flere essensielle gener forbundet med dette ble identifisert. Det er også mulig at stammen

inneholder flere T6SS-assosiert gener som ikke ble identifisert her. Dersom dette er tilfellet er det interessant ikke bare med tanke på stammens egenskaper til å drepe konkurrerende bakterier i miljøet, men også med tanke på stammens potensielle virulensegenskaper.

5.4 Antibiotikaresistensgener

5.4.1 Mutasjoner i mål for kinoloner

Det ble funnet totalt fire mutasjoner i genene *gyrA*, *parC* og *parE* i prøve 2: *gyrA* S83L, *gyrA* D87N, *parC* S80I og *parE* L416F. GyrA representerer en av to subenheter til DNA gyrase, og ParC og ParE utgjør subenhetene til topoisomerase IV (Alekhun & Levy, 2007). Disse kompleksene utfører kritiske funksjoner under DNA-replikasjon, og er målene for fluorokinolone-antibiotika. Blant gram-negative bakterier, slik som *E. coli*, er DNA-gyrase hovedmålet for kinoloner, og de vanligste mutasjonene som medierer fluorokinolone-resistens blant disse organismene er nettopp på kodon 83 og 87 av *gyrA* i tillegg til S80 og i mindre grad D87 av *parC* (V. Tchesnokova et al., 2019; L. R. Varughese et al., 2018). Forskning antyder at ST1193 har anskaffet de to mutasjonene i *gyrA* og S80I i *parC* samtidig gjennom overføring av DNA fra en fjernt beslektet *E. coli*-stamme etterfulgt av homolog rekombinasjon, i motsetning til den normale trinnvise evolusjonen. Dette skal ha skjedd så nylig som for under 12 år siden (V. Tchesnokova et al., 2019). Flere av disse mutasjonene forekommer ofte blant kinolone-resistente kliniske *E. coli* isolater. Fendukly et al. fant at dobbeltmutasjoner i *gyrA* i tillegg til en singel eller dobbel mutasjon i *parC* ofte forekom blant ciprofloxacin-resistente sepsis-isolater, hvorav mutasjoner i *parC* så ut til å spille en komplementær rolle i økning av resistens (Fendukly, Karlsson, Hanson, Kronvall, & Dornbusch, 2003). De tre mutasjonene *gyrA* S83L, *gyrA* D87N og *parC* S80I har blitt beskrevet i flere rapporter om ST1193 (Platell et al., 2012; V. Tchesnokova et al., 2019; V. L. Tchesnokova et al., 2019), og fluorokinolone-resistens ser ut til å være et kjennetegn for klonegruppen (V. Tchesnokova et al., 2019). Mutasjonen funnet i *parE* er imidlertid mer uvanlig. Fendukly et al. fant mutasjoner i *parE* blant 6/18 isolater med høy grad av resistens mot ciprofloxacin, hvorav 4 av disse var mutasjonen L416F som også ble identifisert i ST1193-stammen i denne oppgaven. Forholdet mellom mutasjoner i *parE* og høynivåresistens mot fluorokinoloner trenger imidlertid nærmere undersøkelser for å få klarhet i dette (Fendukly et al., 2003). Høye nivåer av resistens mot kinoloner ser ut til å komme av en additiv effekt av flere punktmutasjoner i genene som koder medikamentmålet, i tillegg til tilegnelse av andre resistensmekanismer som bidrar til å øke MIC-verdi, eksempelvis

efflukspumper (Rice, 2012). Prøve 2 hadde fire mutasjoner i medikamentmålene for fluorokinoloner, og det ble i tillegg funnet gener med høy identitet til MDR RND effluks-systemet MdtABC-TolC i tillegg til AcrAB-TolC (tabell 4.5). Disse efflukspumpene er begge assosiert med utpumping av antibiotika, deriblant fluorokinoloner (Anes, McCusker, Fanning, & Martins, 2015; Piddock, 2006). Disse resultatene indikerer at stammen har høy grad av resistens mot fluorokinoloner.

5.4.2 *tetB*

Etter helgenomsekvensering ble det identifisert et gen med 100 % sekvensID med et *tetB*-gen fra *E. coli* (tabell 4.5). Tetrasyklin hemmer proteinsyntesen hos bakterier ved å binde til ribosomet (Alekshun & Levy, 2007). I 2018 var tetrasyklin det andre mest brukte antibiotikumet til behandling av mennesker i Norge, og i *E. coli* isolater fra dyr var tetrasyklinresistens blant de vanligste resistenstypene (NORM & NORM-VET, 2018). Tetrasyklin brukes ikke til behandling av *E. coli*-infeksjoner, men tetrasyklinresistens er likevel vanlig blant *E. coli* stammer. *tetA* og *tetB* er de vanligste tetrasyklin-resistensgenene blant *E. coli*-isolater fra både mennesker og dyr (Roberts, 2005). Det er mulig at resistente typer kan bli selektert for gjennom at kommensale enteriske stammer eksponeres for antibiotikumet ved behandling av urelaterte infeksjoner. Tetrasyklin-resistens er hos de fleste bakterier oppnådd gjennom opptak av nye gener, gjerne via plasmider eller transposoner, og disse er ofte konjugative (Roberts, 2005). De fleste *tet*-genene koder for energiavhengige membranassosierte effluks-proteiner som frakter tetrasyklin ut av cellen. Dette inkluderer de vanligste *tet*-genene hos gram-negative bakterier, blant annet *tetA* og *tetB*. I en studie av tetrasyklinresistente bakterier fra nyfødte var *tetB* det vanligste tetrasyklinsresistens-genet funnet blant *E. coli*-stammer (Karami, Nowrouzian, Adlerberth, & Wold, 2006). Forfatterne fant i tillegg signifikant høyere MIC-verdier for isolater med *tetB* sammenlignet med *tetA*. Stammer med *tetA* eller *tetB* var oftere resistente mot andre antibiotika i tillegg i forhold til tetrasyklin-sensitive stammer, og *tetB*-bærere var generelt sett mer virulente enn *tetA*-bærere og tetrasyklinsensitive stammer.

Det er ut ifra disse resultatene ikke mulig å fastslå om *tet*-genet som ble funnet var plasmidmediert eller kromosomalt, men tatt i betraktning at *tet*-gener i stor grad er assosiert med MGE er det relativt stor sannsynlighet for at det er lokalisert på et slikt element. Det ble

heller ikke testet for tetrasyklin-resistens i denne oppgaven, og det er derfor ikke mulig å fastslå om stammen viste en resistens fenotype som et resultat av *tetB*-genet eller ikke.

Det var i tillegg interessant at repressorgenet *tetC* ble identifisert i prøve 5 ved søk i annoterte gener (PROKKA). Ved BLASTp-søk på proteinsekvensen til dette treffet ble imidlertid proteinet identifisert som «TetR/AcrR family transcriptional regulator [*Serratia fonticola*]» (sekvensID 100 %, accession number: WP_021805970.1). Ekspresjon av en gruppe *tet*-gener reguleres av repressorer som *tetR*, og eksponering til antibiotika kan inaktivere repressor-genet og slik føre til ekspresjon av tetrasyklin-effluks-systemet kodet av andre *tet*-gener (Alekshun & Levy, 2007). Et nærliggende «hypotetisk protein» i PROKKA ble ved pBLAST-søk identifisert som et «major facilitator superfamily» (MFS) transportørprotein (identitet 99,50 %, WP_115158189.1). Tet-effluksproteiner tilhører MFS-familien av transportørproteiner (Nikaido, 2009), men det kan ikke bekreftes at dette var et *tet*-gen. Ingen andre *tet*-gener ble funnet i prøve 5 sitt genom, men det kan ikke utelukkes at de var til stede.

5.4.3 CTX-M-15

Helgenomsekvenseringen bekreftet at isolatet fra prøve 2 inneholdt et *bla*_{CTX-M}-gen av gruppe 1 slik som resultatene fra singelpleks PCR og gelelektroforese antydte. Søk i databasene NCBI, CARD og VirFinder, samt gjennom nBLAST avslørte et gen kodende CTX-M-15 med 100 % sekvensID og sekvensdekning til en kjent sekvens (NG_048935.1). CTX-M er en klasse A ESBL som de siste årene i økende grad har blitt rapportert om rundt omkring i verden (Cantón and Coque, 2006). CTX-M-15 og CTX-M-14 er i dag regnet som de mest dominante ESBLene i store deler av verden (Bevan et al., 2017), og har blitt isolert fra både kliniske prøver, animalske prøver og miljø-prøver verden over (referanser i (Canton et al., 2012)). I en studie fra 2019 der spredningen av ESBL og karbapenemaser blant Enterobacteriaceae og *P. aeruginosa* i Europa ble undersøkt, var CTX-M-15 det hyppigst isolerte ESBL-enzymet i alle land unntatt Hellas (Kazmierczak, de Jonge, Stone, & Sahn, 2020). I Norge er også CTX-M gruppe 1 og 9, hvor hhv. CTX-M-15 og -14 er gruppert under, dominerende (NORM & NORM-VET, 2018). I 2007 ble det første utbruddet av multiresistente CTX-M-15-produserende *E. coli* i Skandinavia rapportert om fra et sykehus i Stavanger (Naseer et al., 2007), og i 2008-2009 et nytt utbrudd av CTX-M-15-produserer, denne gangen *Klebsiella pneumoniae* (Rettedal et al., 2012). Det har i tillegg blitt rapportert om funn av *bla*_{CTX-M-15}-produserende *E. coli* på bladgrønnsaker i Norge (NORM & NORM-VET, 2018).

CTX-M-15 ble først beskrevet i India i 1999, og i 2001 i UK hvor enzymet raskt spredte seg (Canton et al., 2012). Majoriteten av produserende isolater var *E. coli*, og de fleste tilhørte den internasjonalt spredte sekvenstypen ST131. Siden har *bla*_{CTX-M-15} spredt seg over store deler av verden gjennom HGT og høyrisiko *E. coli* kloner, spesielt ST131 (Bevan et al., 2017). ST1193 ser ut til å være en ny framvoksende høyrisiko-klone som viser pandemisk spredning i verden, og som potensielt kan bli et problem på linje med ST131 (J. R. Johnson et al., 2019; V. Tchesnokova et al., 2019; V. L. Tchesnokova et al., 2019). ST1193 har tidligere hovedsakelig blitt assosiert med høy grad av fluorokinolone-resistens, og flere rapporter har beskrevet lavere grad av resistens mot andre typer antibiotika sammenlignet med andre sekvenstyper. Eksempelvis fant en studie i Korea at ST1193 var blant de vanligste sekvenstypene blant ciprofloxacin-resistente *E. coli* fra UTI-pasienter, men at disse isolatene var signifikant mindre resistente mot andre typer antibiotika, og ingen av isolatene var ESBL-produsenter (B. Kim et al., 2020). En annen studie som ble utført i USA mellom 2016-2017 fant at blant 301 kliniske ST1193-isolater var 8,0 % ESBL-produsenter, noe som var signifikant lavere ved sammenligning med isolater av typen ST131, subklone H30, hvorav 32,4 var ESBL-produsenter (V. L. Tchesnokova et al., 2019). I en fylogenetisk studie av Johnson et al. hvor ST1193-isolater sekvensert mellom 2008-2018 ble undersøkt ble det imidlertid funnet at 26,7 % av ST1193-isolatene var bærere av *bla*_{CTX-M} hvorav 9,0 % av disse var *bla*_{CTX-M-15} (T. J. Johnson et al., 2019). Ett isolat av en CTX-M-produserende ST1193 *E. coli* stamme har også tidligere blitt funnet i Norge (Jørgensen et al., 2017), i dette tilfellet CTX-M-27. Oppdagelsen av et CTX-M-15-enzym i ST1193-stammen isolert fra Andedammen er derfor noe uvanlig, men har likevel blitt beskrevet tidligere i litteraturen. Funnet kunne potensielt tydet på at CTX-M-produserende *E. coli* eller andre organismer finnes i Andedammen og at resistensgenet er tatt opp gjennom HGO. Det er selvfølgelig også mulig at dette har skjedd et annet sted og at stammen senere har kommet i kontakt med Andedammen. Alt dette er spekulasjoner, og det er selvfølgelig ikke mulig å bekrefte på bakgrunn av resultatene presentert i oppgaven.

HGO av resistensplasmider mellom Enterobacteriaceae skjer i tarmene hos mennesker og dyr, i tillegg til i miljøet (Huddleston, 2014; Soucy et al., 2015). CTX-M-enzymene er antatt å stamme fra kromosomale enzymer hos miljøbakterieslekten *Kluyvera* (Canton et al., 2012), og miljøet har derfor trolig spilt en essensiell rolle i spredningen av *bla*_{CTX-M} (Bevan et al., 2017). I tillegg har CTX-M-15 blitt funnet i alt fra elver tilknyttet renseanlegg (Amos, Hawkey, Gaze, & Wellington, 2014) til marine miljøer (Maravić et al., 2015), noe som indikerer at utslipp fra

mennesker og industri er medvirkende faktor i spredningen. Reising og transport av både mennesker, dyr og varer over landegrensener har trolig også spilt en rolle i globaliseringen av *bla*_{CTX-M-15} (Bevan et al., 2017; Canton et al., 2012). I tillegg til den viktige rollen til konjugasjon spiller også transduksjon en rolle i overføring av *bla*_{CTX-M-15} mellom miljøbakterier. Bakteriofager har blitt assosiert med *bla*_{CTX-M} – genotyper, inkludert *bla*_{CTX-M-15} (Subirats, Sánchez-Melsió, Borrego, Balcázar, & Simonet, 2016).

Fremveksten og spredningen av CTX-M-enzymmer byr på store utfordringer i helsesektor med begrensninger rundt mulig behandling av infeksjoner. Dette har ført til økt bruk av karbapenemer som en «siste utvei», som igjen fører til fremvekst og spredning av karbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE). Dette er urovekkende ettersom infeksjoner av CRE er forbundet med høy mortalitet (Gupta et al., 2011). I Norge er forekomsten av CRE fremdeles lav sammenlignet med andre Europeiske land. Fra matvarer har ingen CRE så langt blitt isolert, og forekomsten fra kliniske isolater er fremdeles lav, selv om det ble observert en økning i tilfeller fra 2017-2018 (NORM & NORM-VET, 2018). Ingen karbapenemaser ble detektert i resultatene fra denne oppgaven.

5.4.4 *dfrA17* (trimetoprimresistens)

Et gen med 99,79 % sekvensID til *E. coli dfrA17*-genet, som medierer trimetoprim-resistens, ble identifisert i ST1193-stammen fra prøve 2. Trimetoprim er et syntetisk antibiotikum som hemmer reduksjon av dihydrofolat katalysert av dihydrofolatreduktase (DHFR), noe som er en essensiell reaksjon hos alle levende organismer (Sköld, 2001). Mutasjoner i DHFR-genet hos bakterier kan føre til overekspressjon av et enzym med redusert affinitet for trimetoprim og kan dermed gi høyt nivå av resistens hos blant annet *E. coli* (Sköld, 2001). Blant urinveisisolater av *E. coli* er trimetoprim-resistens relativt normalt, og den vanligste mekanismen bak er tilegnelse av *dfr*-gener gjennom MGE som plasmider og transposoner. Genene finnes ofte som genkassetter på integroner (Yu et al., 2004)

Det er beskrevet mange plasmidmedierte gener kodende trimetoprim-resistente DHFR som er spredt i et bredt spekter patogene bakterier, noe som sannsynligvis er grunnet den vanlige forekomsten på integron-kassetter som kan mobiliseres og overføres horisontalt (Sköld, 2001). Blant gram-negative bakterier er *dfr1* veldig vanlig, og det forekommer på både klasse 1 og 2

integroner. Ni ulike *dfr*-gen-kassetter har blitt identifisert blant klasse 1 integroner, og *dfrA17* er en av disse (Yu et al., 2004). I en studie fra 1994 var *dfrA17* og *dfrA12* de to vanligst isolerte *dfr*-genene blant urinvei-isolerte *E. coli* i Korea (J. C. Lee et al., 2001), og i en nyere studie av den samme gruppen var *dfrA17* den vanligste de siste årene ved undersøkelser av UTI-*E. coli*-isolater (undersøkt over to tiår) (Yu et al., 2004). Alle *dfrA17* var assosiert med plasmider, og 65 % av klasse 1 integronene med *dfrA17* var konjugativt overførbare. I tillegg var *E. coli* isolatene med disse integronene i stor grad genetisk urelaterte, noe som indikerer at den økende utbredelsen av *dfrA17* blant urinvei-isolater var pga HGO av integroner gjennom konjugative plasmider. En studie utført i Lativa i 2005-2008 fant også *dfrA17* blant de to vanligste *dfr*-genene blant kliniske isolater fra mennesker (Šeputienė, Povilonis, Ružauskas, Pavilonis, & Sužiedėlienė, 2010). I en fylogenetisk studie av 355 ST1193-isolater fra 72 ulike isolater ble *dfrA17* funnet å være blant de vanligste resistensgenene (T. J. Johnson et al., 2019). Funnet av *dfrA17* i UPEC-stammen av typen ST1193 samsvarer derfor godt med litteraturen. I tillegg understreker det muligheten for at stammen bærer MGE som potensielt kan overføres til andre bakterier i miljøet.

5.4.5 *mphA* og *erm* (makrolidresistens)

Hos gram-negative bakterier er resistens mot makrolider i hovedsak assosiert med overekspresjon av efflukspumper, og i mindre grad alterering av målsete (Beceiro et al., 2013). I prøve 2 ble det funnet to gener med høy sekvensID (tabell 4.5) til gener assosiert med makrolidresistens hos *E. coli*. Disse hemmer antibiotikumet gjennom hhv fosforylering og metylering: *mphA* og *ermB*.

Uttrykking av *mphA* gir resistens mot makrolider gjennom inaktivering av antibiotikumet ved fosforylering (Poole et al., 2006). Dette genet er vanlig blant *E. coli* med en MDR fenotype, og er i tillegg ofte funnet blant andre patogene gram-negative bakterier som *K. pneumoniae* og *A. baumannii* (Pawlowski et al., 2018). I likhet med *dfrA17* er også *mphA* blant de vanligst identifiserte ARG i kliniske isolater av *E. coli* ST1193 (T. J. Johnson et al., 2019). Funnet er altså ikke overraskende, men ettersom *mphA*-genet ofte er plasmidmediert og overførbart gjennom HGT (Poole et al., 2006), understreker det mulighet for spredning til mottakelige celler i miljøet.

ermB er induserbart og koder for en makrolid-metylase. *ermB*, som kan gi resistens mot både makrolider, linomyciner og streptograminer, er blitt identifisert i en rekke ulike bakterieverter,

inkludert *E. coli* og *Shigella* spp i tillegg til *Citrobacter*, *Enterobacter* og *Salmonella* spp. (Gomes et al., 2017) Hos Enterobacteriaceae har *erm*-genene blitt assosiert med MGE som plasmider bærende på multiple *erm*-gener. Dette er f.eks. tilfellet i det *E. coli*-assosierte plasmidet pTN48 som bærer *ermB* og *ermC*, i tillegg til et annet ARG som gir makrolidresistens, slik som *mphA* (Gomes et al., 2017). I en studie ble alle plasmider fra gram-negative bakterier som inneholdt et *ermB*-gen tilgjengelig fra GenBank analysert (Di Pilato et al., 2019). Forfatterne fant at genet oftest forekom på konjugative plasmider, i tillegg til en link mellom dette genet og andre relevante resistensgener på slike plasmider. Blant annet ble det observert stor grad av kobling mellom *ermB* og både *mphA* og *bla*_{CTX-M} blant plasmider detektert i *E. coli* fra mennesker, dyr og fra miljøprøver. Dette er interessant da alle disse genene også ble funnet i prøve 2. Det er derfor mulig at bakteriestammen i prøve 2 inneholder et tilsvarende overførbart plasmid med multiple resistensgener, men dette kan ikke bekreftes på bakgrunn av resultatene i denne oppgaven. *ermB* har også i en fylogenetisk studie blitt funnet blant ST1193 i større grad enn andre isolater tilhørende STc14 (T. J. Johnson et al., 2019).

5.4.6 Generelt om resistens blant *Serratia* og FONA

Mesteparten av resistens som er blitt beskrevet blant *Serratia*-arter er fra *Serratia marcescens*. Denne arten er kjent for å være resistent mot flere typer antibiotika, og utbrudd av multiresistente stammer har blitt beskrevet. Mange stammer har både kromosomalt og plasmidmedierte resistensgener (Mahlen, 2011). I likhet med mange andre medlemmer av Enterobacteriaceae-arter har *S. marcescens* og andre *Serratia*-arter iboende resistens mot bl. a. penicilliner og makrolider, og i tillegg er de fleste medlemmene vanligvis resistente mot bl.a. ampicillin, amoxicillin-klaavlansyre og smalspektrede cefalosporiner (Stock et al., 2003, Stock og Wiedemann, 2003).

Etter analysering av helgenomsekvenserings-resultatene ble det identifisert en sjelden ESBL i genomet til *S. fonticola*-stammen fra prøve 5. Dette genet viste 99,32 % nukleotididentitet med FONA-5, og hadde forøvrig 100 % identitet til «FONA family class A beta-lactamase [*Serratia fonticola*]» ved pBLAST-søk på proteinsekvens (accession: WP_021806421). FONA er en klasse A ESBL kun isolert fra *S. fonticola* (Péduzzi, Farzaneh, Reynaud, Barthélémy, & Labia, 1997). De fleste klinisk isolerte ESBL-enzymene er av de «etablerte» familiene TEM, SHV eller CTX-M (Bradford, 2001), men flere typer som ikke er nært relatert til noen av disse har blitt beskrevet, f.eks. SFO, BES, PER og VEB. Disse er ikke «enkle punkt-mutasjons-

derivater» av noen kjente beta-laktamaser, og bortsett fra for SFO-1 er opphavet deres i stor grad ukjent. (Naas, Poirel, & Nordmann, 2008). Mange Gram-negative bakterier har iboende kromosom-lokaliserte ESBL-gener (Bradford, 2001). Med en svak promoter vil arter med kun dette ene genet vise lavt nivå av den resistente fenotypen (Naas et al., 2008). Enzymet SFO-1, som kodes på plasmid, er høyt relatert til FONA-1 fra *S. fonticola* (Matsumoto & Inoue, 1999). SFO-1 ble beskrevet i et klinisk isolat av *Enterobacter cloacae*. Et uvanlig trekk ved SFO-1 var at det var kodet på et selvreplikerende plasmid og at produksjonen av betalaktamasen ble sterkt induisert av imipenem (Matsumoto & Inoue, 1999). Plasmidet har også et regulatorisk gen, *ampR*, nødvendig for induksjonen av betalaktamasen på en måte som ligner på klasse C betalaktamaser. Det ble forøvrig funnet en proteinsekvens med 98,28 % sekvensID til AmpR av *E. cloacae* (BAA76881.1) i annoterte gener fra prøve 5, og FONA har i tidligere studier vist seg å være induserbart (Péduzzi et al., 1997; I. Stock, Burak, Sherwood, Gruger, & Wiedemann, 2003). Ekspresjonen av FONA-enzymet i *S. fonticola* stammen funnet i prøve 5 kan derfor også muligens være tett regulert og induserbart, men dette er ikke mulig å fastslå.

5.4.7 AmpC

AmpC-enzymet klassifiseres som klasse C-enzymet etter Amblers system, og de hydrolyserer primært cefalosporiner, men har også aktivitet mot penicilliner og aztreonam (Jacoby, 2009).

Alle *E. coli* og de fleste miljøbakterier, slik som *S. marcescens* og de fleste andre *Serratia*-arter, har et kromosomalt *ampC*-gen (Jacoby, 2009; Mahlen, 2011). Det var derfor ikke overraskende å finne dette genet i genomet til både prøve 2 og 5. Ingen av prøvene var imidlertid resistente mot amoxicillin m/klavulanat ved AST, en kombinasjon som AmpC vanligvis er mindre sensitiv overfor (Jacoby, 2009). Dette indikerer at genet enten ikke er uttrykt, eller kun er svakt uttrykt. Det er rimelig å anta at sistnevnte er tilfellet for prøve 5, da ekspresjonen av AmpC hos *Serratia*-arter vanligvis er genet lav, men kan induseres av diverse betalaktam-antibiotika (Mahlen, 2011). Sterke inducere inkluderer cefoxitin, imipenem, ampicillin, amoxicillin, benzyloxyfenicillin, og smalspektrede cefalosporiner, inkludert cephalothin og cefazolin, og svake inducere inkluderer bredspektrede cefalosporiner, for eksempel ceftazidime, cefotaxime, og også ceftriaxone og andre betalaktamer, inkludert cefepime, cefuroxime, og aztreonam. Overekspresjon av AmpC er ofte forårsaket av mutasjoner. Dette kan gi såkalte «derepresserte» mutanter. Disse er klinisk signifikante og kan føre til behandlingssvikt med beta-laktam-antibiotika (Jacoby, 2009). Bruk av bredspektrede cefalosporiner fører i større grad til utvikling

av derepresserte mutanter enn bruk av andre antibiotika-typer (Mahlen, 2011). Kromosomalt *ampC*-gen har tidligere blitt identifisert hos *S. fonticola* (Ingo Stock, Burak, Sherwood, Grüger, & Wiedemann, 2003), og var i tillegg induserbart. Det er derfor svært sannsynlig at genet funnet her også var kromosomalt, og at ekspresjonen kan induseres av tilstedeværelse av diverse antibiotika. Dette bidrar til stammen sitt potensiale til å utvikle videre resistens.

bla_{AmpC} kan også være lokalisert på overførbare plasmider. Plasmider som bærer *ampC*-gener har ofte også flere andre ARG blant annet inkludert aminoglykosider, kinoloner og tetrasykliner og trimetoprim, og genene er vanligvis del av et integron (Jacoby, 2009). Dette stemmer godt overens med resistens observert og gener funnet i prøve 2. På den andre siden er plasmidmediert AmpC vanligvis assosiert med høyere grad av ekspresjon (Jacoby, 2009). Selv om det ikke kan bekreftes om det identifisert AmpC-genet i prøve 2 er kromosomalt eller plasmidmediert, virker det derfor sannsynlig at det førstnevnte er tilfellet. Selv om ekspresjonen av genet ser ut til å være lav i denne stammen, kan den gjennom punktmutasjoner potensielt økes, noe som kan bidra til økt resistens hos stammen. I tillegg er det kanskje mulig for genet hos begge stammer å mobiliseres på plasmider og slik spres til andre mottakelige celler. Inersjons-sekvensen ISEcp1 har eksempelvis blitt vist å være i stand til å mobilisere et kromosomalt *bla_{AmpC}*-gen til et plasmid (Lartigue, Poirel, Aubert, & Nordmann, 2006).

5.4.8 Effluks-proteiner

Det ble identifisert gener som viste sekvenshomologi til gener kodende flere ulike effluks-systemer i stammene fra prøve 2 og prøve 5 (vedlegg D). Evnen til å pumpe ut antibiotika fra cellen gjennom efflukssystemer er en vanlig egenskap både blant miljø-mikrober og patogener, og er en av de vanligste mekanismene bak resistens mot mange klasser antibiotika (Davies & Davies, 2010). Ekspresjon av efflukspumper er svært vanlig blant gram-negative bakterier (Li & Nikaido, 2004), og effluksproteiner fra RND-familien er ansett som spesielt viktig i forbindelse med iboende resistens blant disse bakteriene (Davies & Davies, 2010). AcrAB ble identifisert i begge prøvene med høy sekvensID (tabell 4.5), i tillegg til yttermembrankanalen TolC som fungerer som del av multiple efflukssystemer. AcrAB-TolC er blant de best studerte RND-efflukspumpene, og er forbundet med ekstrudering av en rekke ulike antibiotika-typer, deriblant penicillin G, makrolider, fluorokinoloner, cefalosporiner og tetracykliner (Piddock, 2006)

Selv om mange efflukssystemer er iboende og ikke har oppstått som et resultat av antibiotikaforbruk er det en bekymring tilknyttet deres bidrag i utviklingen av MDR, blant annet i forbindelse med ESBL-produserende *E. coli*. Den økende forekomsten av ESBL-produserende *E. coli* er svært bekymringsverdig, spesielt CTX-M-produsenter. Infeksjoner med disse isolatene fører typisk til både andre- og tredjegang behandling grunnet behandlingsfeil, og disse medikamentene er ofte substrater for efflukspumper (Beceiro et al., 2013; Piddock, 2006). Dette fører til et økende selektivt press på disse isolatene mot utvikling av svært resistente stammer. MDR-efflukspumper som unngår funksjonen til mange agens gjør det derfor vanskeligere å finne nye effektive medikamenter i kampen mot AR (Alekshun & Levy, 2007).

5.5 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Prøve 2, 3 og 5 ble undersøkt for sensitivitet ovenfor 12 ulike antibiotika gjennom gradient diffusjonstest. Til dette forsøket ble en McFarland Standard 5.0 (Pro-Lab Diagnostics Inc., Bromborough, Storbritannia) benyttet ved tillaging av bakteriesuspensjoner. Dette ble gjort manuelt, og det er derfor mulig at konsentrasjonen av isolat varierte noe mellom hver suspensjon og at de avvok noe fra standard konsentrasjon. Dette representerer en mulig feilkilde i testingen. Det var av denne grunn at to runder av AST ble gjennomført og gjennomsnittlig resultat ble rapportert (tabell 4.7). Resultatene fra runde 1 og runde 2 av testing samsvarte imidlertid godt (vedlegg E).

5.5.1 Ampicillin-resistens

Alle prøvene var resistente mot ampicillin (MIC-verdi ≥ 256 , tabell 4.7). Dette er ikke overraskende ettersom iboende resistens mot penicilliner er svært vanlig blant Enterobacteriaceae (Iredell et al., 2016). Helgenomsekvenseringen av prøve 2 og 5 avslørte at begge isolatene bar et AmpC-gen i tillegg til et ESBL-gen. Ampicillin er en sterk inducer av AmpC-betalaktamaser (Jacoby, 2009), og i tilfellet med *S. fonticola* der AmpC-genet sannsynligvis er båret på kromosom og ekspresjonen regulert (diskutert i avsnitt [_](#)) er det derfor mulig at dette enzymet bidro til den observerte resistensen mot ampicillin. På den andre siden er klasse C betalaktamaser generelt mindre sensitive overfor betalaktamase-hemmere, og amoxicillin er også ansett som en sterk inducer av enzymet (Jacoby, 2009). Prøve 5 hadde lav MIC-verdi for amoxicillin-klavulanat (MIC 3,5, tabell 4.7). Disse resultatene stemmer med en tidligere studie som utførte AST på «uvanlige» *Serratia*-arter der *S. fonticola* viste seg å være

unik i at isolatene så ut til å være naturlige resistente mot amoxicillin, men sensitive overfor betalaktamasehemmere (I. Stock et al., 2003). Det er derfor også mulig at det i større grad var ESBL-enzymet FONA som sto bak den resistente fenotypen, eller andre iboende mekanismer. I *E. coli*-stammen var det sannsynligvis CTX-M-15 som sto bak mesteparten av den observerte resistensen, ettersom dette enzymet er assosiert med MGE og som oftest konstitutivt uttrykt (Canton et al., 2012).

5.5.2 Resistens mot cefotaxim og cefepim

Prøve 2 viste også resistens mot både cefotaxim og cefepim som er henholdvis 3. og 4. genreasjons-cefalosporiner. Dette var heller ikke overraskende ettersom CTX-M-enzymene fortrinnsvis hydrolyserer cefotaxim (Canton et al., 2012), og også tidligere har blitt rapportert å ha signifikant hydrolytisk aktivitet mot cefepim (Bonnet, 2004). *S. fonticola*-stammen fra prøve 5 var imidlertid sensitiv overfor disse agensene, og hadde lave MIC-verdier på hhv 1,0 og 0,158 (tabell 4.7). Tatt i betraktning at isolatet bar gen for ESBL-enzymet FONA var dette noe overraskende ettersom ESBL-produsenter karakteriseres av sin evne til å hydrolysere ekstendert-spektrum cefalosporinaser (Bradford, 2001). Det er vanskelig å si hvorfor dette ble observert, men forklaringen kan potensielt ligge i at FONA-enzymet sannsynligvis var induserbart regulert og derfor under normale forhold muligens var svakt uttrykt (Mahlen, 2011; Péduzzi et al., 1997). Det er publisert svært få studier angående antimikrobiell sensitivitet blant «uvanlige» *Serratia*-arter som *S. fonticola*. En studie fra 2002 undersøkte sensitiviteten blant 18 *S. fonticola*-isolater av ulike opphav (kliniske isolater, vannkilder, snegler), i tillegg til isolater av en rekke andre mindre vanlige *Serratia*-arter, overfor en rekke ulike antibiotika (I. Stock et al., 2003). Naturlige forekommende betalaktamaser ble i denne studien detektert i alle isolatene med unike arts-spesifikke substratprofiler. *S. fonticola* var sensitiv overfor både cefotaxim og cefepim med MIC-verdier hhv mellom 0,5-2 og 0,06-0,13 i denne studien. MIC-verdiene beregnet i denne oppgaven samsvarer altså godt med dette. Selv om *S. fonticola* stammen ikke viste resistens mot de ekstendert-spektrum cefalosporinene cefotaxim og cefepim, så overlevde den og viste vekst på ESBL-selektive agarskåler som inneholdt 3dje generasjons cefalosporinen cefpodoxim. Dette kunne antyde at stammen i dette tilfellet uttrykte FONA. Det kan spekuleres i om, ettersom FONA-enzymet både i Stock et al. sin studie (I. Stock et al., 2003) og i en tidligere studie (Péduzzi et al., 1997) har vist seg å være induserbart, at ulike cefalosporiner har varierende evne til å indusere ekspresjon av FONA, men dette er naturligvis ikke mulig å fastslå i denne oppgaven. Til slutt er det som nevnt mulig med falske

positive resultater ved screening for ESBL-produsenter, spesielt i tilfellet med miljøbakterier som ved en kombinasjon av lav membranpermeabilitet og høy grad av effluks kan vise høy grad av resistens og slik fremstå som ESBL-produserende (Davies & Davies, 2010; Iredell et al., 2016).

5.5.3 Resistens mot erytromycin

Kun *E. coli*-stammen i prøve 2 var resistent overfor ciprofloksasin, med en svært høy MIC-verdi (≥ 32) langt over det kliniske brytningspunktet (0,5) (tabell 4.7). Både prøve 3 og 5 var sensitive overfor ciprofloksasin. Dette stemmer også overens med Stock et al. sin studie der alle *Serratia*-isolatene testet viste uniform sensitivitet overfor alle fluorokinolonene testet (I. Stock et al., 2003). Den høye MIC-verdien beregnet for *E. coli* ST1193-stammen i prøve 2 var som forventet med tanke på antallet mutasjoner i medikamentmålet for fluorokinoloner oppdaget i stammen. Disse resultatene stemmer også overens med tidligere rapporter som har rapportert høy grad av resistens mot fluorokinoloner blant ST1193-isolater (J. R. Johnson et al., 2019; T. J. Johnson et al., 2019; Jørgensen et al., 2017; Platell et al., 2012; V. L. Tchesnokova et al., 2019). I følge regler for AST-testing satt av EUCAST skal Enterobacteriaceae-isolater bestemmes som resistente mot ciprofloksasin regnes som resistente mot alle typer fluorokinoloner (EUCAST, 2019).

Fluorokinoloner er en av de mest brukte antibiotikatyper i verden, og er på grunn av sin bredspektrede aktivitet blitt tatt i vidt bruk til behandling av en rekke ulike infeksjoner, inkludert enteriske infeksjoner, respiratoriske infeksjoner og UTI (Ruiz, 2003). Etersom ST1193-stammen fra prøve 2 sannsynligvis var en UPEC-stamme er resistens mot fluorokinoloner derfor svært uheldig. Etersom stammen i tillegg produserte et CTX-M-enzym vil behandling av infeksjoner med denne stammen kunne være komplisert ettersom både ceflosporiner og fluorokinoloner sannsynligvis ikke ville vært effektivt.

5.5.4 Resistens mot erytromycin

Bakterier fra Enterobacteriaceae har generelt lav sensitivitet for makrolider på grunn av deres lave membranpermeabilitet og har av den grunn blitt lite brukt til behandling av infeksjoner av disse typene, og i større grad mot gram-positive infeksjoner (Gomes et al., 2017). Makrolidet azitromycin har imidlertid vist god effekt mot bakterier som *Shigella* spp. og *Salmonella enterica*, og i kombinasjon med medikamentets brede aktivitet og lave toksisitet har dette gjort

at det har blitt tatt i bruk mot ulike gram-negative infeksjoner (Gomes et al., 2017). Alle prøvene som ble testet for sensitivitet mot erytromycin i denne oppgaven hadde en MIC-verdi på ≥ 256 (tabell 4.7). Disse resultatene er ikke overraskende ettersom ivermektin resistens mot makrolider er utbredt blant gram-negative bakterier. Stock et al. fant at alle *Serratia*-isolatene undersøkt var resistente overfor alle makrolidene testet, deriblant erytromycin (I. Stock et al., 2003). I helgenomsekvenseringen av prøve 2 og 5 ble det også funnet flere gener som kan gi resistens mot makrolider (tabell 4.5). I prøve 2 ble RND efflukspumpen AcrAB-TolC identifisert med høy sekvensID, og denne er kjent for å ekstrudere en rekke ulike antibiotika, deriblant makrolider (Anes et al., 2015). Genene *mphA* og *ermB* spilte sannsynligvis også en rolle i den observerte resistensen. *ermB* medierer også resistens mot linkosamider og streptogramin, men disse agensene ble ikke testet i denne oppgaven, og det kan dermed ikke fastslås om stammen var resistent mot disse.

Selv om erytromycin benyttes i liten grad til behandling av gram-negative bakterier, kan kommensale isolater utsettes for selektivt press når et individ mottar antibiotikabehandling av urelaterte infeksjoner ettersom *E. coli* er en vanlig del av normalfloraen i tarmene hos mennesker og dyr. Dette kan også skje i miljøet, der utslipp fra både mennesker og dyr kan etablere selektivt press (Davies & Davies, 2010), og makrolidresistens kan slik potensielt spres til andre gram-negative organismer, f.eks. *Shigella* spp. som makrolidet azitromycin hovedsakelig benyttes mot (Gomes et al., 2017), eller til og med til gram-positive patogene arter som erytromycin hovedsakelig benyttes mot. Selv om HGO er mest vanlig mellom nærmere relaterte arter, kan også overføring mellom mer fjernt relaterte organismer også forekomme, til og med mellom en gram-negativ og -positiv organisme (Aleksun & Levy, 2007). Både *mphA* og *ermB* er assosiert med MGE. Konsentrasjonen av antibiotika i dammene som prøvene ble hentet fra ble ikke undersøkt, og det kan dermed ikke fastslås om et selektivt press som følge av AB-eksponering var til stede i disse miljøene ved prøvetaking.

5.5.5 Trimetoprim-resistens

Isolatene fra prøve 2 og prøve 3 hadde begge MIC-verdier på ≥ 32 ved testing med trimetoprim. ExPEC-stammen i prøve 2 ble i henhold til dette karakterisert som klinisk resistent mot trimetoprim, og resultatene tyder på at også den mulige *Lewinella*-stammen i prøve 3 også uttrykte resistensmekanismer mot dette antibiotikumet. Trimetoprim, oftest kombinert med sulfanomider, er en viktig behandlingsform ved UTI, samt respiratoriske og intestinale

infeksjoner (Masters, O'Bryan, Zurlo, Miller, & Joshi, 2003). Utviklingen av resistens mot disse antibiotikaene er derfor en stor bekymring (Sköld, 2001). Ettersom de er syntetiske medikamenter stammer utviklingen av resistens ikke fra naturlige produsenter av stoffet, men er heller assosiert med mutasjoner i medikamentmål og spredning gjennom HGO (Sköld, 2001; Yu et al., 2004). Genet *dfr17*, assosiert med MGE, ble også identifisert ved helgenomsekvensering av prøve 2. Prøve 3 ble ikke sekvensert, og genotype ansvarlig for den høye MIC-verdien er derfor ikke mulig å identifisere. Forekomsten av trimetoprim-resistens både i prøve 2 og 3, hvorav prøve 2 ble funnet i Andedammen (V1) og prøve 3 i Niagara (V2), er urovekkende, ettersom resistensdeterminanter muligens kan spres via HGO til andre mottakelige, potensielt patogene stammer. Prøve 5 var sensitiv overfor trimetoprim, noe som stemmer med litteraturen (I. Stock et al., 2003).

5.5.6 *Lewinella* spp. og antibiotikaresistens

Prøve 3 viste ingen inhiberingssone rundt fem ulike antibiotika-strips (cefotaxim, erytromycin, ampicillin, amoxicillin m/klavulansyre og trimetoprim) (MIC-verdiene var maksimale for de ulike stripsene). Ingen kliniske brytningspunkt er imidlertid tilgjengelig fra EUCAST når det gjelder *Lewinella*-arter. Grunner til at dette ikke finnes kan være at disse artene ikke er klinisk signifikante, eller at de ikke har blitt beregnet enda (EUCAST, 2016). *Lewinella* er som diskutert i avsnitt 4.1.1 en maritim bakterieslekt, i hovedsak isolert fra havområder (Kang et al., 2017; Sly et al., 1998). *Lewinella*-arter er derfor ikke ansett som en viktig humanpatogen bakterieslekt. Tidligere beskrivelser av *Lewinella*-arter har beskrevet resistens mot flere antibiotika, mest vanlig mot kanamycin, gentamicin, erytromycin og penicillin (Kang et al., 2017; Sung et al., 2015). I dette forsøket ble det observert resistens mot erytromycin og ampicillin, noe som samsvarer med tidligere studier, men stammen viste ikke resistens mot gentamicin. Kanamycin ble ikke testet for. Det ble også observert resistens mot cefotaxim, amoxicillin m/klavulanat og trimetoprim, noe som ikke har blitt rapportert om i litteraturen for denne slekten tidligere.

På grunn av resistensen mot cefotaxim kunne det ha virket som om stammen uttrykte et ESBL-enzym, men dette ble ikke indikert ved gelelektroforese av multipleks PCR-produkt (tabell 3.3, vedlegg D), og i tillegg ville man da sannsynligvis ha forventet å observere resistens mot cefepim i tillegg (Karchmer, 2000). Det kan spekuleres i om dette kom av overproduksjon av betalaktamasen AmpC. AmpC-zymer er vanligvis mindre sensitive for

betalaktamasehemmere som klavulanat (Jacoby, 2009), og stammen var den eneste prøven testet som viste resistens mot amoxicillin m/klavulanat. I tillegg er fjerde generasjons cefalosporiner (som cefepim) vanligvis mindre sensitive for hydrolyse av betalaktamaser (Karchmer, 2000). Etersom stammen ikke ble sekvensert kan ingenting fastslås på bakgrunn av disse resultatene. Til slutt var det interessant at prøve 3 var den av de tre prøvene med høyest MIC-verdier når testet for sensitivitet mot de to karbapenemene imipenem og meropenem. Disse var på henholdsvis 1,5 og 1,25 kontra hhv 0,12 og 0,035 for prøve 2, og 0,22 og 0,063 for prøve 5. Selv om dette var under det kliniske brytningspunktet (beregnet for Enterobacteriaceae) på henholdsvis 4 og 8 for imipenem og meropenem, kunne dette sees på som foruroligende i forhold til videre utvikling av resistens i denne stammen.

5.5.7 Multiresistens (MDR)

Prøve 5 og prøve 3 kunne i henhold til resultatene fra AST beskrives som MDR, ettersom prøve 2 viste klinisk resistens, og prøve 5 hadde svært høye MIC-verdier, for mer enn tre antibiotikaklasser (Magiorakos et al., 2012). MDR bakterier representerer en stor utfordring i klinisk sammenheng ettersom de kan forårsake feil i behandling av infeksjoner og derfor er forbundet med høy morbiditet og mortalitet (Aleksun & Levy, 2007). At prøve 2 var MDR var ikke overraskende sett i lys av at prøven ble identifisert som *E. coli* ST1193, en type som er universalt resistente mot fluorokinoloner (V. Tchesnokova et al., 2019) og som også tidligere er blitt rapportert å vise resistens mot flere andre typer antibiotika. Det er imidlertid bekymringsverdig å finne en så resistent stamme i Andedammen tatt i betraktning at den også fremsto som svært virulent på bakgrunn av virulensgenene identifisert, og muligens hadde potensial til å forårsake både tarm- og urinveisinfeksjoner i tillegg til sepsis og meningitt. Sistnevnte ble understreket ettersom stammens serotype var identisk til stammen som av Iqbal et al. ble isolert fra et tilfelle av dødelig hjernehinnebetennelse hos en nyfødt. Flere felles virulensgener mellom de to stammene ble identifisert, blant annet K1 bakteriekapsel, sideroforreseptorene *fyuA* og *iutA*, toksinet *sat* samt PAI-assosierte *malX* (Iqbal et al., 2016). Overføring av resistensgener på MGE mellom bakteriestammer foregår i stor grad i miljøet (Singer et al., 2016) og også i tarmene hos mennesker og dyr (Huddleston, 2014). Når en bakterie først er MDR kan den i tillegg ha økt potensial for å ta opp flere resistensgener, pluss at faren for koseleksjon av resistensgener øker på grunn av akkumulering av gener på MGE (Iredell et al., 2016). I tillegg til resistensgener er også virulensgener assosiert med MGE, og koseleksjon av disse genene kan derfor forekomme. I den internasjonalt spredte høyrisiko-klonen ST131 er det

eksempelvis antatt at koseleksjon av resistensgener (CTX-M) og virulensgener i IncFII-plasmider er en viktig faktor viktig i spredningen (Beceiro et al., 2013). Slike koseleksjonsprosesser er viktige mekanismer som gjør bakteriestammer i stand til å unngå fitness-reduksjonen som ofte er assosiert med tilegning av AR. Selv om CTX-M-15 ble identifisert i ST1193-stammen i denne oppgaven kunne det ikke fastslås om genet var båret på et tilsvarende plasmid eller ikke, men muligheten for dette er foruroligende.

At prøve 3 viste en MDR fenotype var interessant, ettersom dette muligens var en marin miljøbakterie. Utslipp av antibiotika i miljøet gjennom avfall fra både industri, renseanlegg landbruk og akvakultur har bidratt til stor forekomst av ARG i naturen (Davies & Davies, 2010). Noen studier fra Norge, Finland og Chile indikerer utvikling av AR i miljøer tilknyttet fiskeoppdrettsanlegg (Steinbakk et al., 2014). I en studie fra Chile fant man høyt nivå av AR både i nærområdet til et fiskeoppdrettsanlegg, men også i områder 8 km unna anlegget, noe som indikerer at det selektive presset forårsaket av bruken i akvakultur har ført til spredning også utenfor området (Shah et al., 2014). MDR Enterobacteriaceae, deriblant ESBL-produsenter, er blitt funnet i sjøprøver fra en offentlig strand i Kroatia (Maravić et al., 2015). Forfatterne fant blant annet *bla*_{CTX-M-15}-gener som alle var lokalisert på plasmider. Gitt multiresistente bakterier sitt store potensial til å spre R-plasmider gjennom HGO er det mulig at multiresistens blant marine miljøbakterier kan oppstå på denne måten. På den andre siden representerer naturlige miljøer et viktig reservoir for ARG og for utvikling av MDR i seg selv (Davies & Davies, 2010). Dette illustreres for eksempel av at det er blitt isolert flere multiresistente bakterier fra jordbakteriene actinomycetes (D'Costa, McGrann, Hughes, & Wright, 2006), og fra maritime, antarktiske områder, langt unna menneskelig aktivitet (Tam, Wong, Yong, Blamey, & González, 2015).

5.6 Opphav og spredning av stammene

ST1193 ser ut til å være en framvoksende multiresistent høyrisiko klon på linje med ST131. Flere studier fra ulike områder i verden rapporterer om økning i forekomsten, både blant UTI-pasienter og blant friske bærere. Johnson et al. beskrev en parallell økning i kliniske og kommensale isolater av typen på et senter for veteraner i USA (J. R. Johnson et al., 2019). En annen studie fra et universitetssamfunn, også i USA, oppdaget at ST1193 var en av ni ExPEC-stammer som ble isolert fra både UTI-syke og friske bærere i løpet av studie-perioden (Matsui et al., 2020), selv om frekvensen av forekomst var signifikant forskjellig mellom de to

gruppene. ST1193 var i tillegg blant de vanligste typene blant UTI-prøvene (7%). Blant de friske bærerne varierte frekvensen på de ulike genotypene over tid. Slike studier kan tyde på at patogene ExPEC-stammer, slik som ST1193, kan sporadisk kolonisere tarmen hos friske bærere og slik gi opphav til kliniske isolater. Det er mulig at slike «utbrudd» kan stamme fra eksterne kilder som kontaminert mat og miljø (Matsui et al., 2020). I Norge er det generelt funnet lite AR bakterier i matvarer sammenlignet med mange andre land. NORM-VET rapporterte i 2019 om ett funn av *E. coli* resistente mot tredje-generasjons cefalosporiner fra kyllingkjøtt (0,4 %) samt i 3,6 % av undersøkte kalkun-prøver, hvorav to av disse i tillegg var resistente mot ciprofloxacin og nalidixinsyre (NORM & NORM-VET, 2018). Samme rapport beskrev også funn av *E. coli* med ESBL-fenotyper blant bladgrønnsaker, hvorav ett isolat var CTX-M-15-produsent og i tillegg fluorokinolone-resistent. Hvilke stammer disse isolatene tilhørte ble ikke rapportert om.

Funnene av typen ble gjort av Jørgensen et al. blant avføringsprøver fra pasienter innlagt på et norsk universitetssykehus av urelaterte årsaker (Jørgensen et al., 2017). Selv om det ikke til nå er beskrevet tilfeller av infeksjoner med *E. coli*-typen ST1193 i Norge, indikerer funnene gjort av Jørgensen et al. sammen med funnene i denne oppgaven på at typen er på frammarsj i Norge og at noen sannsynligvis er bærere av denne MDR patogenen. Det er derfor mulig at isolatet stammer fra fekal forurensing av dammen, enten menneskelig eller fra dyr. NMBU campus Ås er omgitt av jordbruksområder som benytter dyreavføring til gjødsling. Bruk av organisk gjødsel anses som en av de viktigste kildene til antibiotikakontaminasjon i naturen (Allen et al., 2010), og selv om Andedammen selv ikke er i direkte kontakt med jordbruket kan ville dyr eller til og med faktorer som vind og nedbør ha fungert som spredningsvektorer (Allen et al., 2010). Koloniseringen av ville dyr med AR-organismer gjennom kontakt med kloakk eller dyravføring kan være en viktig faktor i spredning av ARG, og CTX-M er eksempelvis den vanligst ESBL-typen isolert fra fugler (Wellington et al., 2013). I tillegg har man et rikt studentsamfunn på NMBU, med utvekslingsstudenter som kan ha tatt med seg AR organismer fra områder med høyere prevalens enn i Norge. Reising utenlands blant studenter og ansatte kan også bidra til etablering av nye MDR organismer på campus. Uansett opphav av ST1193-isolatet er funnet bekymringsverdig ettersom *E. coli* kan overleve i vann over lang tid avhengig av temperatur, og akvatiske miljøer kan fungere som «hot spots» for HGO (Wellington et al., 2013). MDR-organismer har høyt potensial for spredning til andre potensielt patogene organismer, i tillegg til opptak av flere resistensgener (Iredell et al., 2016). Lave konsentrasjoner av antibiotika kan bidra til seleksjon for resistente typer og øke HGO-frekvens

(Aminov, 2011), men konsentrasjonen av antibiotika i Andedammen ble ikke undersøkt så det er ikke mulig å fastslå om dette skjer.

S. fonticola er en naturlig resistent miljøbakterie assosiert med vann, og det kan derfor hende at denne stammen naturlig forekommer i Jordfagsdammen (V3). Ettersom arten også er assosiert med jord, er det også mulig at den stammer fra jordsmonn i nærområdet. Van Hoek et al. fant *S. fonticola* med FONA-gener på ferske grønnsaker fra gårder i Nederland (van Hoek et al., 2015). Disse studiene illustrerer muligheten for overføring av miljøbakterier med iboende resistens til mennesker gjennom konsumering av rå mat. Selv om *S. fonticola* i seg selv sjelden forårsaker sykdom, er det som nevnt blitt beskrevet overføring av resistensgener fra miljøbakterier til patogene bakterier (Singer et al., 2016). Det plasmid-medierte resistensprotein SFO-1 er sannsynligvis et resultat av mobilisering av det kromosomale enzymet FONA-1 fra *S. fonticola* (Matsumoto & Inoue, 1999). Dette tyder på at det kan være en potensiell risiko for mobilisering og overføring av FONA-genet til potensielt patogene bakterier i tarmene ved konsumering av kontaminert mat, i tillegg til ved kontakt mellom organismer i miljøet. Van Hoek et al. fant også ESBL-produserende enteriske arter på grønnsakene, blant annet *E. coli*, som mest sannsynlig stammer fra bruk av gjødsel, eller fra vann kontaminert med animalsk avføring i jordbruket (van Hoek et al., 2015). Dette er særlig bekymrende, ettersom disse artene er svært mottakelige for MGE gjennom HGS, noe som er vist å skje i tarmene hos mennesker (Huddleston, 2014).

6 KONKLUSJON

Ut ifra resultatene fra fenotypiske og genotypiske deteksjonsmetoder for ESBL anvendt i denne oppgaven ble det konkludert at det fantes ESBL-produserende, patogene *E. coli*-bakterier i Andedammen på campus Ås ved NMBU. Stammen identifisert var i tillegg en høyvirulent, MDR UPEC-stamme med et *bla*_{CTX-M-15}-gen. *bla*_{CTX-M-15} er en av de dominerende ESBL-enzymene i dag, og ettersom ESBL-gener ofte bæres på MGE er det sannsynlig at resistens kan overføres til andre bakterier i nærmiljøet gjennom HGO. ST1193 ser ut til å være en høyrisikoklone på lik linje med ST131 og på frammarsj i verden, og tidligere funn i Norge sammen med disse resultatene indikerer at dette kanskje også er tilfellet for Norge, men nøyere undersøkelser er nødvendig for å slå dette fast. MDR-fenotyper og et iboende kromosomalt ESBL-enzym ble også indentifisert blant miljøbakterier i denne oppgaven. Dette antydnet at

miljøet er en viktig arena for AR-utvikling, noe som samsvarer med den voksende forståelsen av naturen og miljøet, deriblant akvatiske miljøer, som utviklings- og spredningsvektor for ARG. Mer forskning på området er nødvendig for å kunne nøyere beskrive disse prosessene og deres innvirkning på det voksende problemet med resistente patogener som verden i dag står overfor.

7 REFERANSELISTE

- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, *128*(6), 1037-1050. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004
- Aljorayid, A., Viau, R., Castellino, L., & Jump, R. L. (2016). *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature. *IDCases*, *5*, 6-8. doi:10.1016/j.idcr.2016.05.003
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), 251-259.
- Allsopp, L. P., Beloin, C., Ulett, G. C., Valle, J., Totsika, M., Sherlock, O., . . . Schembri, M. A. (2012). Molecular characterization of UpaB and UpaC, two new autotransporter proteins of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infection and immunity*, *80*(1), 321-332.
- Amos, G. C., Hawkey, P., Gaze, W. H., & Wellington, E. (2014). Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *69*(7), 1785-1791.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS microbiology reviews*, *35*(5), 901-911.
- Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 587.
- Baker, C. N., Stocker, S. A., Culver, D. H., & Thornsberry, C. (1991). Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of clinical microbiology*, *29*(3), 533-538.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., . . . Prjibelski, A. D. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, *19*(5), 455-477.
- Beceiro, A., Tomas, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*, *26*(2), 185-230. doi:10.1128/CMR.00059-12
- Bennett, P. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, *153*(S1), S347-S357.
- Berendsen, B. J., Wegh, R. S., Memelink, J., Zuidema, T., & Stolker, L. A. (2015). The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, *132*, 258-268.
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *72*(8), 2145-2155.
- Bingle, L. E., Bailey, C. M., & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current opinion in microbiology*, *11*(1), 3-8.
- Boisen, N., Ruiz-Perez, F., Scheutz, F., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. (2009). High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *80*(2), 294-301.

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*(1), 1-14. doi:10.1128/aac.48.1.1-14.2004
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, *14*(4), 933-951, table of contents. doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
- Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature reviews Drug discovery*, *5*(4), 321-323.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., & Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic acids research*, *25*(16), 3235-3241.
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M., & Galan, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, *3*, 110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110
- Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current opinion in pharmacology*, *11*(5), 477-485.
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(8), 654-658.
- 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.
- Clarridge, J. E., 3rd. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, *17*(4), 840-862, table of contents. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, *311*(5759), 374-377.
- 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), 490-495. doi:10.1093/jac/dkp498
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, *74*(3), 417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- De Lorenzo, V., & Martinez, J. (1988). Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *7*(5), 621-629.
- Di Pilato, V., Papa-Ezdra, R., Chiarelli, A., García-Fulgueiras, V., Pallecchi, L., & Vignoli, R. (2019). Characterization of the first blaCTX-M-14/ermB-carrying IncI1 plasmid from Latin America. *Plasmid*, *102*, 1-5.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*, *14 Suppl 1*, 90-103. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x
- Dutta, P. R., Cappello, R., Navarro-García, F., & Nataro, J. P. (2002). Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infection and immunity*, *70*(12), 7105-7113.

- Easton, D. M., Allsopp, L. P., Phan, M.-D., Moriel, D. G., Goh, G. K., Beatson, S. A., . . . Schembri, M. A. (2014). The intimin-like protein FdeC is regulated by H-NS and temperature in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *80*(23), 7337-7347.
- Edén, C. S., & Hansson, H. (1978). *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infection and immunity*, *21*(1), 229-237.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, *13*(4), 559-570.
- EUCAST. (2016). Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints. Retrieved from [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General documents/Organisms and agents without breakpoints 20160626.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Organisms_and_agents_without_breakpoints_20160626.pdf)
- EUCAST. (2019). EUCAST Expert Rules v 3.2 on Enterobacterales.
- EUCAST. (2020). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. Retrieved from [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint tables/v_10.0 Breakpoint Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf)
- EUCAST. (n.d). MIC and zone diameter distributions and ECOFFs. Retrieved from https://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kieβling, S., Alt, K., Antáo, E.-M., . . . Homeier, T. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, *297*(3), 163-176.
- Fendukly, F., Karlsson, I., Hanson, H., Kronvall, G., & Dornbusch, K. (2003). Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *Apmis*, *111*(9), 857-866.
- Ferro, G., Guarino, F., Castiglione, S., & Rizzo, L. (2016). Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H₂O₂ process. *Science of the total environment*, *560*, 29-35.
- Finton M.D. (2020). Accepted manuscript. *Frontiers in Microbiology*.
- Folkehelseinstituttet. (2010a, 04.16.2019). *E. coli*-enteritt (inkludert EHEC-infeksjon og HUS) - veileder for helsepersonell.
- Folkehelseinstituttet. (2010b, 08.22.2019). ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell. Retrieved from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>
- Folkehelseinstituttet. (2019). *Årsrapport 2018 Helsetjenesteassosierte infeksjoner, antibiotikabruk (NOIS), antibiotikaresistens (MSIS) og Verdens håndhygienedag*. Retrieved from https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2019/arsrapport-nois-mm_publicertpdf.pdf
- Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., . . . Liu, X. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and

- aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology*, 12(1), 143.
- Gardner, M., Jones, V., Comber, S., Scrimshaw, M. D., Coello-Garcia, T., Cartmell, E., . . . Ellor, B. (2013). Performance of UK wastewater treatment works with respect to trace contaminants. *Science of the total environment*, 456, 359-369.
- Glupczynski, Y., Berhin, C., Bauraing, C., & Bogaerts, P. (2007). Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 45(2), 501-505.
- Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M. J., & Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: focus on azithromycin. *Critical reviews in microbiology*, 43(1), 1-30.
- Guenther, S., Ewers, C., & Wieler, L. H. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Frontiers in Microbiology*, 2, 246.
- Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*, 53(1), 60-67. doi:10.1093/cid/cir202
- Guyer, D. M., Kao, J.-S., & Mobley, H. L. (1998). Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. *Infection and immunity*, 66(9), 4411-4417.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*, 23(6), 1089-1097.
- Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 641-679.
- Hancock, V., Ferrieres, L., & Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154(1), 167-175.
- Henderson, I. R., Meehan, M., & Owen, P. (1997). Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS microbiology letters*, 149(1), 115-120.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., & Nataro, J. P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in microbiology*, 6(9), 370-378.
- Hengstler, K. A., Hammann, R., & Fahr, A.-M. (1997). Evaluation of BBL CHROMagar orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *Journal of clinical microbiology*, 35(11), 2773-2777.
- Hoffman, J. A., Wass, C., Stins, M. F., & Kim, K. S. (1999). The Capsule Supports Survival but Not Traversal of *Escherichia coli* K1 across the Blood-Brain Barrier. *Infection and immunity*, 67(7), 3566-3570.
- Huang, T. D., Bogaerts, P., Berhin, C., Guisset, A., & Glupczynski, Y. (2010). Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 48(6), 2091-2096. doi:10.1128/JCM.02342-09
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7, 167.

- Iqbal, J., Dufendach, K. R., Wellons, J. C., Kuba, M. G., Nickols, H. H., Gomez-Duarte, O. G., & Wynn, J. L. (2016). Lethal neonatal meningoencephalitis caused by multi-drug resistant, highly virulent *Escherichia coli*. *Infect Dis (Lond)*, *48*(6), 461-466. doi:10.3109/23744235.2016.1144142
- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ*, *352*, h6420. doi:10.1136/bmj.h6420
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, *22*(1), 161-182, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00036-08
- Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L., & Tarr, P. I. (2005). The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and immunity*, *73*(2), 965-971.
- Johnson, J. R., Johnston, B. D., Porter, S. B., Clabots, C., Bender, T. L., Thuras, P., . . . Banerjee, R. (2019). Rapid Emergence, Subsidence, and Molecular Detection of *Escherichia coli* Sequence Type 1193-fimH64, a New Disseminated Multidrug-Resistant Commensal and Extraintestinal Pathogen. *J Clin Microbiol*, *57*(5). doi:10.1128/JCM.01664-18
- Johnson, J. R., Oswald, E., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M. A., & Spanjaard, L. (2002). Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *The Journal of infectious diseases*, *185*(6), 774-784.
- Johnson, T. J., Enekave, E., Miller, E. A., Munoz-Aguayo, J., Figueroa, C. F., Johnston, B., . . . Johnson, J. R. (2019). Phylogenomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 1193, an emerging multidrug-resistant clonal group. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(1), e01913-01918. Retrieved from <https://aac.asm.org/content/63/1/e01913-18.abstract>
- Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J., & Nolan, L. K. (2006). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*, *188*(2), 745-758.
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., . . . Maiden, M. C. J. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, *158*(Pt 4), 1005-1015. doi:10.1099/mic.0.055459-0
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, *49*(11), 1749-1755. doi:10.1086/647952
- Jørgensen, S. B., Sunde, M., Fladberg, Ø. A., Leegaard, T. M., Berg, E. S., & Steinbakk, M. (2017). *Fluoroquinolone resistant Escherichia coli ST1193 - another global successful clone?* Retrieved from
- Kaczmarek, A., Budzyńska, A., & Gospodarek, E. (2014). Detection of K1 antigen of *Escherichia coli* rods isolated from pregnant women and neonates. *Folia microbiologica*, *59*(5), 419-422.
- Kang, H., Kim, H., Joung, Y., & Joh, K. (2017). *Lewinella maritima* sp. nov., and *Lewinella lacunae* sp. nov., novel bacteria from marine environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(9), 3603-3609.
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2006). Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(1), 156-161.

- Karchmer, A. W. (2000). Cephalosporins. *Principles and practice of infectious diseases*, 299-305.
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43(2-3), 155-176. doi:10.1007/s10295-015-1723-5
- Kazmierczak, K. M., de Jonge, B. L. M., Stone, G. G., & Sahm, D. F. (2020). Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) global surveillance programme, 2013-17. *J Antimicrob Chemother*. doi:10.1093/jac/dkz571
- Khan, N. A., Shin, S., Chung, J. W., Kim, K. J., Elliott, S., Wang, Y., & Kim, K. S. (2003). Outer membrane protein A and cytotoxic necrotizing factor-1 use diverse signaling mechanisms for *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Microbial pathogenesis*, 35(1), 35-42.
- Kim, B., Seo, M.-R., Kim, J., Kim, Y., Wie, S.-H., Ki, M., . . . Kwon, K. T. (2020). Molecular Epidemiology of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Community-Acquired Urinary Tract Infections in Korea. *Infection & Chemotherapy*, 52.
- Kim, K. S., Itabashi, H., Gemski, P., Sadoff, J., Warren, R. L., & Cross, A. S. (1992). The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 90(3), 897-905.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435.
- Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1-36.
- Lane, M., & Mobley, H. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney international*, 72(1), 19-25.
- Lane, M. C., Simms, A. N., & Mobley, H. L. (2007). Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(15), 5523-5533.
- Lee, J. C., Oh, J. Y., Cho, J. W., Park, J. C., Kim, J. M., Seol, S. Y., & Cho, D. T. (2001). The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(5), 599-604.
- Lee, J. G., Han, D. S., Jo, S. V., Lee, A. R., Park, C. H., Eun, C. S., & Lee, Y. (2019). Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PloS one*, 14(4).
- Leo, J. C., Oberhettinger, P., Schütz, M., & Linke, D. (2015). The inverse autotransporter family: intimin, invasins and related proteins. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 276-282.
- Li, X.-Z., & Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159-204.
- Lin, C.-S., Horng, J.-T., Yang, C.-H., Tsai, Y.-H., Su, L.-H., Wei, C.-F., . . . Lai, H.-C. (2010). RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infection and immunity*, 78(11), 4870-4881.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions

- for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Mahlen, S. D. (2011). Serratia infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev*, 24(4), 755-791. doi:10.1128/CMR.00017-11
- Maravić, A., Skočibušić, M., Cvjetan, S., Šamanić, I., Fredotović, Ž., & Puizina, J. (2015). Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Marine pollution bulletin*, 90(1-2), 60-67. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X14007747?casa_token=bghgTO5VkekAAAAA:nwtriS_ICGTvGe-AJGLRioFT2XJEQ1HhdwKdF-mqb6AT02ID0cXYQnR0XyLRVhG5dM12occ7MFE
- Masters, P. A., O'Bryan, T. A., Zurlo, J., Miller, D. Q., & Joshi, N. (2003). Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), 402-410.
- Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Matsui, Y., Hu, Y., Rubin, J., de Assis, R. S., Suh, J., & Riley, L. W. (2020). Multilocus sequence typing of Escherichia coli isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *Microbiologyopen*, e1032. doi:10.1002/mbo3.1032
- Matsumoto, Y., & Inoue, M. (1999). Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from Enterobacter cloacae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(2), 307-313.
- Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. In M. Stadler & P. Dersch (Eds.), *How to Overcome the Antibiotic Crisis : Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives* (pp. 237-272). Cham: Springer International Publishing.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., . . . Lory, S. (2006). A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312(5779), 1526-1530.
- Murdoch, S. L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M. J., Pourkarimi, E., & Coulthurst, S. J. (2011). The opportunistic pathogen Serratia marcescens utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *Journal of bacteriology*, 193(21), 6057-6069.
- Naseer, U., NATÅS, O. B., HALDORSEN, B. C., Bue, B., Grundt, H., Walsh, T. R., & Sundsfjord, A. (2007). Nosocomial outbreak of CTX-M-15-producing E. coli in Norway. *Apmis*, 115(2), 120-126.
- Nesta, B., Spraggon, G., Alteri, C., Moriel, D. G., Rosini, R., Veggi, D., . . . Ferlenghi, I. (2012). FdeC, a novel broadly conserved Escherichia coli adhesin eliciting protection against urinary tract infections. *MBio*, 3(2), e00010-00012.
- Newton, G., & Abraham, E. (1956). Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- α -amino adipic acid. *Biochemical Journal*, 62(4), 651.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 78, 119-146. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
- NORM, & NORM-VET. (2018). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*.
- Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14 Suppl 1, 42-52. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01861.x

- Oxoid. (2010). Brilliance ESBL. Retrieved from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO5302&cat=&c=UK&lang=EN
- Parret, A. H., & De Mot, R. (2002). Escherichia coli's uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology*, *148*(6), 1604-1606.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, *18*(4), 657-686.
- Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., & Wright, G. D. (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature communications*, *9*(1), 1-12.
- Paxman, J. J., Lo, A. W., Sullivan, M. J., Panjikar, S., Kuiper, M., Whitten, A. E., . . . Tan, L. (2019). Unique structural features of a bacterial autotransporter adhesin suggest mechanisms for interaction with host macromolecules. *Nature communications*, *10*(1), 1-12.
- Péduzzi, J., Farzaneh, S., Reynaud, A., Barthélémy, M., & Labia, R. (1997). Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A β -lactamase from *Serratia fonticola* CUV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1341*(1), 58-70.
- Piddock, L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, *19*(2), 382-402.
- Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, *8*(3), 159-166. doi:10.1016/S1473-3099(08)70041-0
- Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., & Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *56*(1), 52-59.
- Platell, J. L., Trott, D. J., Johnson, J. R., Heisig, P., Heisig, A., Clabots, C. R., . . . Cobbold, R. N. (2012). Prominence of an O75 clonal group (clonal complex 14) among non-ST131 fluoroquinolone-resistant Escherichia coli causing extraintestinal infections in humans and dogs in Australia. *Antimicrob Agents Chemother*, *56*(7), 3898-3904. doi:10.1128/AAC.06120-11
- Poirel, L., Hombrouck-Alet, C., Freneaux, C., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2010). Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *The Lancet infectious diseases*, *10*(12), 832.
- Poole, T., Callaway, T., Bischoff, K., Warnes, C., & Nisbet, D. (2006). Macrolide inactivation gene cluster mphA-mrx-mphR adjacent to a class 1 integron in *Aeromonas hydrophila* isolated from a diarrhoeic pig in Oklahoma. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *57*(1), 31-38.
- Price, L. B., Johnson, J. R., Aziz, M., Clabots, C., Johnston, B., Tchesnokova, V., . . . Stegger, M. (2013). The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*, *4*(6), e00377-00313.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., . . . Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1528-1533.

- Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, *141*(12), 3015-3027.
- Reidl, J., & Boos, W. (1991). The malX malY operon of Escherichia coli encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *Journal of bacteriology*, *173*(15), 4862-4876.
- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M.-C., & Dozois, C. M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, *73*(5), 1553-1562.
- Rettedal, S., Löhr, I. H., Natås, O., Giske, C. G., Sundsfjord, A., & Øymar, K. (2012). First outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing K lebsiella pneumoniae in a Norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. *Apmis*, *120*(8), 612-621.
- Rice, L. B. (2012). *Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS microbiology letters*, *245*(2), 195-203.
- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *51*(5), 1109-1117.
- Sabri, M., Caza, M., Proulx, J., Lymberopoulos, M. H., Brée, A., Moulin-Schouleur, M., . . . Dozois, C. M. (2008). Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic Escherichia coli O78 strain χ 7122. *Infection and immunity*, *76*(2), 601-611.
- Sabri, M., Léveillé, S., & Dozois, C. M. (2006). A SitABCD homologue from an avian pathogenic Escherichia coli strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, *152*(3), 745-758.
- Sánchez-Encinales, V., Álvarez-Marín, R., Pachón-Ibáñez, M. E., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., Garnacho-Montero, J., . . . Cisneros, J. M. (2017). Overproduction of outer membrane protein A by Acinetobacter baumannii as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *The Journal of infectious diseases*, *215*(6), 966-974.
- Schneider, T., & Sahl, H.-G. (2010). An oldie but a goodie—cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(2-3), 161-169.
- Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D., & Heesemann, J. (2000). High-pathogenicity island of Yersinia pestis in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *The Journal of infectious diseases*, *182*(4), 1268-1271.
- Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J., & Denamur, E. (2002). Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in Escherichia coli causing extraintestinal infections. *Infection and immunity*, *70*(9), 5335-5337.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., & Heesemann, J. (1998). Prevalence of the “high-Pathogenicity Island” of Yersinia species among Escherichia coli strains that are pathogenic to humans. *Infection and immunity*, *66*(2), 480-485.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068-2069.

- Seemann, T. (2016). ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. Retrieved from <https://github.com/tseemann/abricate>
- Seemann, T. (2017). Shovill: Faster SPAdes assembly of Illumina reads. Retrieved from <https://github.com/tseemann/shovill>
- Šeputienė, V., Povilonis, J., Ružauskas, M., Pavilonis, A., & Sužiedėlienė, E. (2010). Prevalence of trimethoprim resistance genes in Escherichia coli isolates of human and animal origin in Lithuania. *Journal of medical microbiology*, 59(3), 315-322.
- Shah, S. Q. A., Cabello, F. C., L'Abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental microbiology*, 16(5), 1310-1320. doi:10.1111/1462-2920.12421
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*, 22(1), 90-101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002
- Shakhatreh, M. A. K., Swedan, S. F., Ma'en, A., & Khabour, O. F. (2019). Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) in Jordan: Prevalence of urovirulence genes and antibiotic resistance. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 648-652.
- Simms, A. N., & Mobley, H. L. (2008). PapX, a P fimbrial operon-encoded inhibitor of motility in uropathogenic Escherichia coli. *Infection and immunity*, 76(11), 4833-4841.
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1728.
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3-4), 261-273.
- Sly, L., Taghavit, M., & Fegan, M. (1998). Phylogenetic heterogeneity within the genus Herpetosiphon: transfer of the marine species Herpetosiphon cohaerens, Herpetosiphon nigricans and Herpetosiphon persicus to the genus Lewinella gen. nov. in the Flexibacter-Bacteroides-Cytophaga phylum. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 48(3), 731-737.
- Smith, S. G., Mahon, V., Lambert, M. A., & Fagan, R. P. (2007). A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters*, 273(1), 1-11.
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472-482. doi:10.1038/nrg3962
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., . . . Mobley, H. L. (2012). Escherichia coli isolates that carry vat, fyuA, chuA, and yfcV efficiently colonize the urinary tract. *Infection and immunity*, 80(12), 4115-4122.
- Spurbeck, R. R., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M., & Mobley, H. L. (2011). Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic Escherichia coli strains: contribution of ygi and yad fimbriae. *Infection and immunity*, 79(12), 4753-4763.
- Stanley, T. L., Ellermeier, C. D., & Slauch, J. M. (2000). Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects Salmonella enterica serovar Typhimurium survival in Peyer's patches. *Journal of bacteriology*, 182(16), 4406-4413.
- Steinbakk, M., Sunde, M., Urdahl, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B.-T., . . . Bjørnholt, J. V. (2014). *Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak*. Retrieved from

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

- Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Gruger, T., & Wiedemann, B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *J Antimicrob Chemother*, *51*(4), 865-885. doi:10.1093/jac/dkg156
- Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Gröger, T., & Wiedemann, B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *51*(4), 865-885.
- Sturød, K., Dahle, U. R., Berg, E. S., Steinbakk, M., & Wester, A. L. (2014). Evaluation of the ability of four ESBL-screening media to detect ESBL-producing *Salmonella* and *Shigella*. *BMC Microbiology*, *14*(1), 217. doi:10.1186/s12866-014-0217-3
- Suarez, G., Sierra, J. C., Kirtley, M. L., & Chopra, A. K. (2010). Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. *Microbiology*, *156*(Pt 12), 3678.
- Subirats, J., Sànchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., & Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International journal of antimicrobial agents*, *48*(2), 163-167.
- Sung, H.-R., Lee, J.-M., Kim, M., & Shin, K.-S. (2015). *Lewinella xylanilytica* sp. nov., a member of the family Saprospiraceae isolated from coastal seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *65*(10), 3433-3438.
- Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother*, *65*(9), 1842-1852. doi:10.1093/jac/dkq217
- Tam, H. K., Wong, C. M. V. L., Yong, S. T., Blamey, J., & González, M. (2015). Multiple-antibiotic-resistant bacteria from the maritime Antarctic. *Polar Biology*, *38*(8), 1129-1141.
- Tapader, R., Chatterjee, S., Singh, A., Dayma, P., Haldar, S., Pal, A., & Basu, S. (2014). The high prevalence of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) in *Escherichia coli* causing neonatal septicemia. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, *33*(11), 2015-2024.
- Tchesnokova, V., Radey, M., Chattopadhyay, S., Larson, L., Weaver, J. L., Kisiela, D., & Sokurenko, E. V. (2019). Pandemic fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* clone ST1193 emerged via simultaneous homologous recombinations in 11 gene loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(29), 14740-14748. doi:10.1073/pnas.1903002116
- Tchesnokova, V. L., Rechkina, E., Larson, L., Ferrier, K., Weaver, J. L., Schroeder, D. W., . . . Sokurenko, E. V. (2019). Rapid and Extensive Expansion in the United States of a New Multidrug-resistant *Escherichia coli* Clonal Group, Sequence Type 1193. *Clin Infect Dis*, *68*(2), 334-337. doi:10.1093/cid/ciy525
- Thermo Scientific. (2013). *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers Assessment of Nucleic Acid Purity* Wilmington, DE: Thermo Scientific Nanodrop Products.
- ThermoFisher Scientific. (u.å). PCR Setup—Six Critical Components to Consider. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html#Template>

- Torres, A. G., & Payne, S. M. (1997). Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular microbiology*, *23*(4), 825-833.
- Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and immunity*, *69*(10), 6179-6185.
- Ulett, G. C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J.-M., & Schembri, M. A. (2007). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infection and immunity*, *75*(7), 3233-3244.
- van Hoek, A. H., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL-and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International journal of food microbiology*, *204*, 1-8.
- Van Houdt, R., Givskov, M., & Michiels, C. W. (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS microbiology reviews*, *31*(4), 407-424.
- Vann, W. F., Daines, D. A., Murkin, A. S., Tanner, M. E., Chaffin, D. O., Rubens, C. E., . . . Silver, R. P. (2004). The NeuC protein of *Escherichia coli* K1 is a UDP N-acetylglucosamine 2-epimerase. *Journal of bacteriology*, *186*(3), 706-712.
- Varughese, L. R., Rajpoot, M., Goyal, S., Mehra, R., Chhokar, V., & Beniwal, V. (2018). Analytical profiling of mutations in quinolone resistance determining region of *gyrA* gene among UPEC. *PloS one*, *13*(1), e0190729. doi:10.1371/journal.pone.0190729
- Varughese, L. R., Rajpoot, M., Goyal, S., Mehra, R., Chhokar, V., & Beniwal, V. (2018). Analytical profiling of mutations in quinolone resistance determining region of *gyrA* gene among UPEC. *PloS one*, *13*(1).
- Vazeille, E., Chassaing, B., Buisson, A., Dubois, A., De Vallee, A., Billard, E., . . . Barnich, N. (2016). GipA factor supports colonization of Peyer's Patches by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Inflammatory bowel diseases*, *22*(1), 68-81.
- Vila-Farrés, X., Parra-Millán, R., Sánchez-Encinales, V., Varese, M., Ayerbe-Algaba, R., Bayó, N., . . . García, J. (2017). Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Scientific reports*, *7*(1), 1-11.
- Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., & Hashsham, S. A. (2017). Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ Res*, *89*(10), 921-941. doi:10.2175/106143017X15023776270179
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., . . . Otten, W. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases*, *13*(2), 155-165.
- Wells, T. J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S. A., Torpdahl, M., . . . Gally, D. L. (2008). EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environmental microbiology*, *10*(3), 589-604.
- Wells, T. J., Totsika, M., & Schembri, M. A. (2010). Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization. *Microbiology*, *156*(8), 2459-2469.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, *85*(1), 11-19.
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, *35*(5), 736-755.

- Wullt, B., Bergsten, G., Connell, H., Röllano, P., Gebretsadik, N., Hull, R., & Svanborg, C. (2000). P fimbriae enhance the early establishment of Escherichia coli in the human urinary tract. *Molecular microbiology*, 38(3), 456-464.
- Yamamoto, S., Nakano, M., Terai, A., Yuri, K., Nakata, K., Nair, G. B., . . . Ogawa, O. (2001). The presence of the virulence island containing the usp gene in uropathogenic Escherichia coli is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *The Journal of urology*, 165(4), 1347-1351.
- Yazdankhah S., L. J., Midtvedt T., Solberg C. O. (2013). Historien om antibiotika. *Tidsskriftet den norske legeförening*, 23(133), 7. doi:10.4045/tidsskr.13.0145
- Young, G. M., Badger, J. L., & Miller, V. L. (2000). Motility is required to initiate host cell invasion by Yersinia enterocolitica. *Infection and immunity*, 68(7), 4323-4326.
- Young, G. M., Schmiel, D. H., & Miller, V. L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6456-6461.
- Yu, H. S., Lee, J. C., Kang, H. Y., Jeong, Y. S., Lee, E. Y., Choi, C. H., . . . Cho, D. T. (2004). Prevalence of dfr genes associated with integrons and dissemination of dfrA17 among urinary isolates of Escherichia coli in Korea. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 53(3), 445-450.
- Zaw, M. T., Yamasaki, E., Yamamoto, S., Nair, G. B., Kawamoto, K., & Kurazono, H. (2013). Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic Escherichia coli, encodes a new member of HNH nuclease superfamily. *Gut pathogens*, 5(1), 13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759109>
- Zude, I., Leimbach, A., & Dobrindt, U. (2014). Prevalence of autotransporters in Escherichia coli: what is the impact of phylogeny and pathotype? *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4), 243-256.

Vedlegg A

Tabell A.1: Bakterieslekter, -arter og -stammer funnet ved søk med nBLAST på Sanger-sekvensert PCR-produkt av 16S rRNA fra prøve 1-5. Ingen treff ble funnet for prøve 4.

Prøve	DNA-konsentrasjon ved innsending (ng/mL)	Treff ved nBLAST mot databasen refseq_rna	Identitet sscore (%)	«Query»-lengde	«Query cover»	«Accession»
1	33,9	<i>Pseudomonas paralactis</i> stamme DSM 29164 <i>Pseudomonas azotoformans</i> stamme NBRC 12693 <i>Pseudomonas lactis</i> stamme DSM 29167	98.71% 98.63% 98.63%	1170	99% 99% 99%	NR_156987.1 NR_113600.1 NR_156986.1
2	111	<i>Shigella sonnei</i> stamme CECT 4887 <i>Escherichia fergusonii</i> stamme ATCC 35469 <i>Escherichia fergusonii</i> stamme ATCC 35469	99.40% 99.39% 99.39%	834	99% 99% 99%	NR_104826.1 NR_074902.1 NR_027549.1
3	12,0	<i>Lewinella persica</i> stamme ATCC 23167 <i>Lewinella persica</i> stamme NBRC 102663 <i>Algoriphagus formosus</i> stamme XAY3209	100,00% 100,00% 100,00%	20	90% 90% 85%	NR_115014.1 NR_112674.1 NR_164894.1
4	9,99	-	-	-	-	-
5	41,8	<i>Serratia fonticola</i> stamme NBRC 102597 <i>Serratia fonticola</i> DSM 22080 stamme C1 <i>Serratia fonticola</i> stamme DSM 4576		99,34% 99,51% 99,34%	98% 98% 98%	NR_114156.1 NR_116808.1 NR_025339.1

Tabell A.2: Resistensgener funnet gjennom blastx ved søk i «refseq_protein»-databasen på Sanger-sekvensert PCR-produkt fra singelpleks av prøve 2 med primere for CTX-M gruppe 1.

DNA-konsentrasjon ved innsending (ng/mL)	Treff ved nBLAST mot databasen refseq_rna	Identitet sscore (%)	«Query»-lengde	«Query cover»	Total score	«Accession»
58,9	Klasse A beta-laktamase [<i>Serratia marcescens</i>]	100%	614	97%	429	WP_162091499.1
	Klasse A beta-laktamase [<i>Klebsiella variicola</i>]	100%		97%		WP_115871710.1
	Klasse A ekstendertspektrum beta-laktamase CTX-M-216 [<i>Escherichia coli</i>]	100%		97%		WP_109791209.1

Vedlegg B

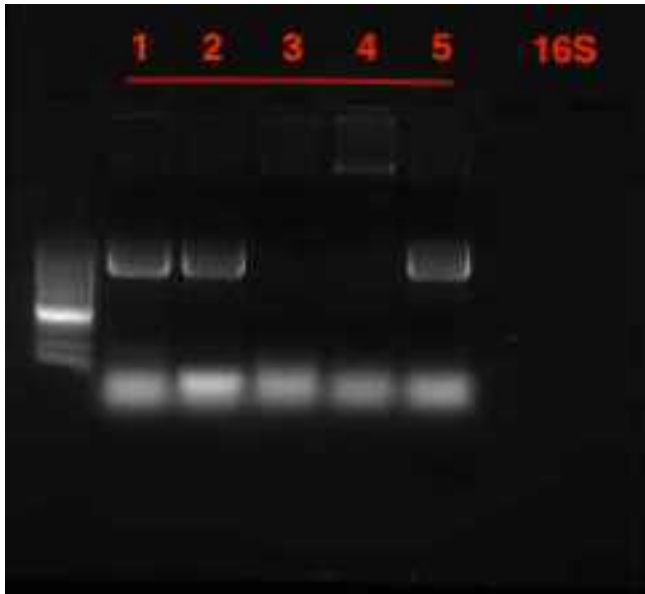
Tabell B.1: Målgener for og primer-sekvenser i primermikser benyttet til ESBL-multipleks PCR (ESBL 1-3).

Målgener	Primer-sekvens (5'-3')	Amplicon-størrelse (bp)	Referanse
ESBL 1			
<i>blaOXA-48</i>	F-GCTTGATCGCCCTCGATT R-GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281	(Dallenne, Da Costa, Decre, Favier, & Arlet, 2010)
<i>blaCTX-M</i> (gr. 2)	F-CGTTAACGGCACGATGAC R-CGATATCGTTGGTGGTTCCAT	404	(Dallenne et al., 2010)
<i>blaOXA</i>	F-GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R-GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564	(Dallenne et al., 2010)
<i>blaSHV</i>	F-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R-ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	(Dallenne et al., 2010)
ESBL 2			
<i>blaCTX-M</i> (gr. 9)	F-TCAAGCCTGCCGATCTGGT R-TGATTCTCGCCGCTGAAG	561	(Dallenne et al., 2010)
<i>blaCTX-M</i> (gr. 1)	F-TTAGGAARTGTGCCGCTGYA R-CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	(Dallenne et al., 2010)
<i>blaTEM</i>	F-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC R-CGTTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	(Dallenne et al., 2010)
ESBL 3			
<i>blaNDM</i>	F-TGGCCCGCTCAAGGTATTTT R-GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	157	(Finton M.D., 2020)
<i>blaVIM</i>	F-ATAGAGCACACTCGCAGACG R-TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	564	(Finton M.D., 2020)
<i>blaKPC</i>	F-TCCGTTACGGCAAAAATGCG R-GCATAGTCATTTGCCGTGCC	460	(Finton M.D., 2020)

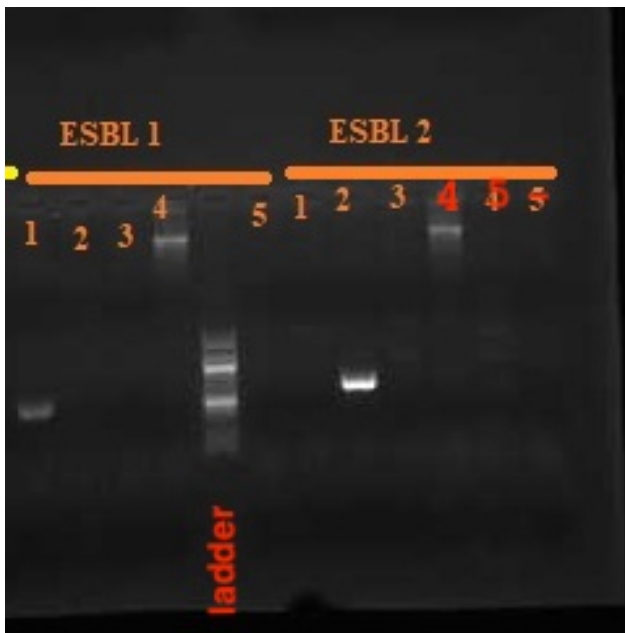
Tabell B.2: Målgener for og primersekvenser i primermikser benyttet til CAR multipleks PCR (CAR 1-2)

Målgener	Primer-sekvens (5'-3')	Amplicon-størrelse (bp)	Referanse
CAR 1			
<i>blaCMY</i>	F-GCATCTCCCAGCCTAATCCC R-TTCTCCGGGACAACCTTGACG	188	(Finton M.D., 2020)
<i>blaOXA-48</i>	F-GCTTGATCGCCCTCGATT R-GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281	(Dallenne et al., 2010)
<i>blaIMP</i>	F-ACAGGGGGAATAGAGTGGCT R-AGCCTGTTCCCATGTACGTT	393	(Finton M.D., 2020)
<i>blaVIM</i>	F-ATAGAGCACACTCGCAGACG R-TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	564	(Finton M.D., 2020)
CAR 2			
<i>blaNDM</i>	F-TGGCCCGCTCAAGGTATTTT R-GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	157	(Finton M.D., 2020)
<i>blaSFC</i>	F-GGAGGGCGAATTGGGGTTTA R-CACTGTACTGCAGAGTGGCA	268	(Finton M.D., 2020)
<i>blaKPC</i>	F-TCCGTTACGGCAAAAATGCG R-GCATAGTCATTTGCCGTGCC	460	(Finton M.D., 2020)

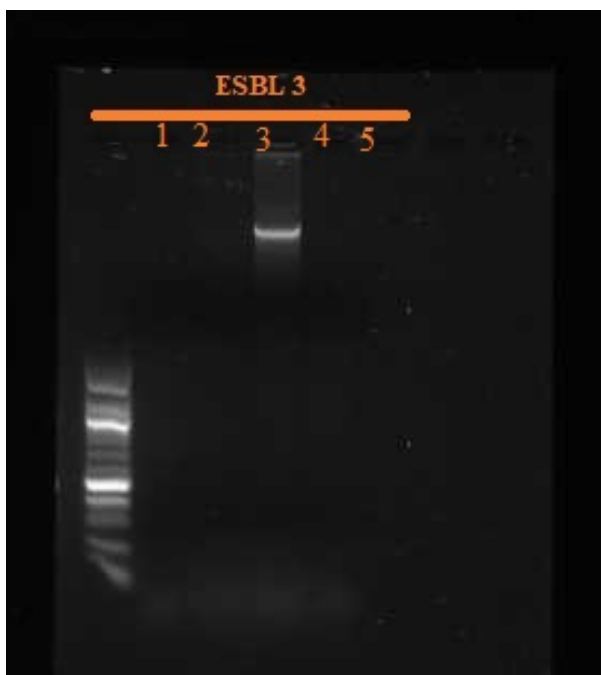
Vedlegg C



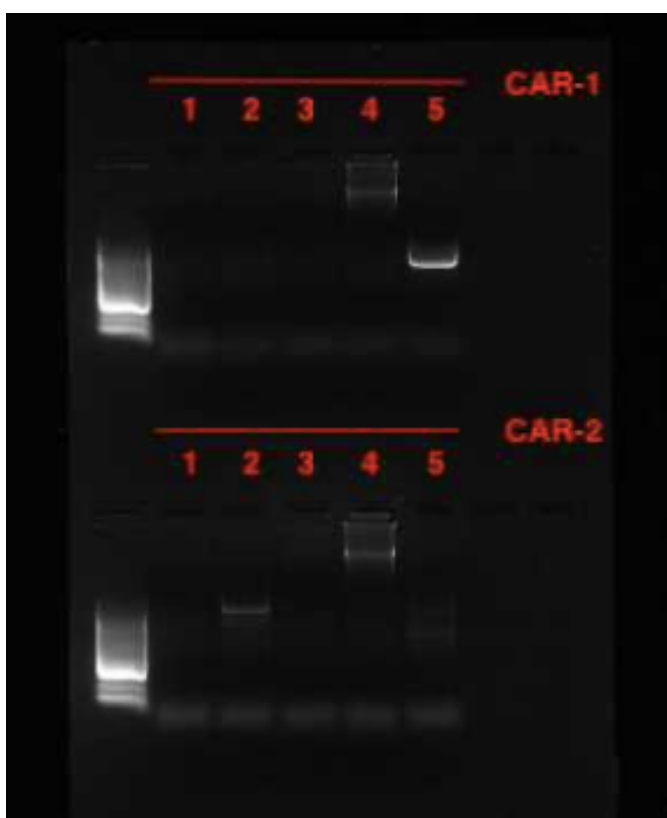
Figur C.1: Gelbilde av 16S rRNA PCR-produkt for prøve 1-5. Ladder lengst til venstre på bildet.



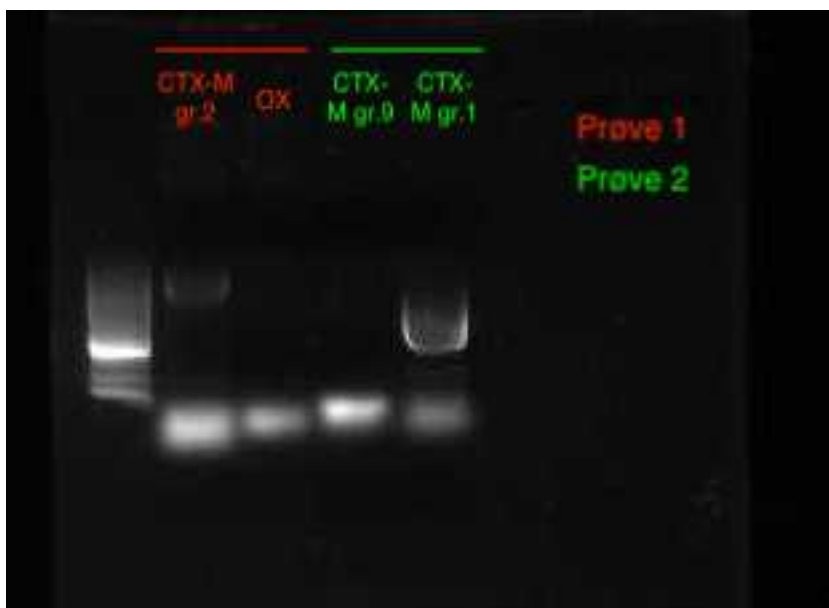
Figur C.2: Gelbilde av multipleks PCR ESBL1 (bla_{OXA-48} , bla_{CTX-M} (gr. 2), bla_{OXA} og bla_{SHV}) og ESBL 2 (bla_{CTX-M} (gr. 9), bla_{CTX-M} (gr. 1) og bla_{TEM}) for prøve 1-5. Positive DNA-bånd for prøve 1, ESBL1 og prøve 2, ESBL 2. Ladder markert med rød skrift på figur.



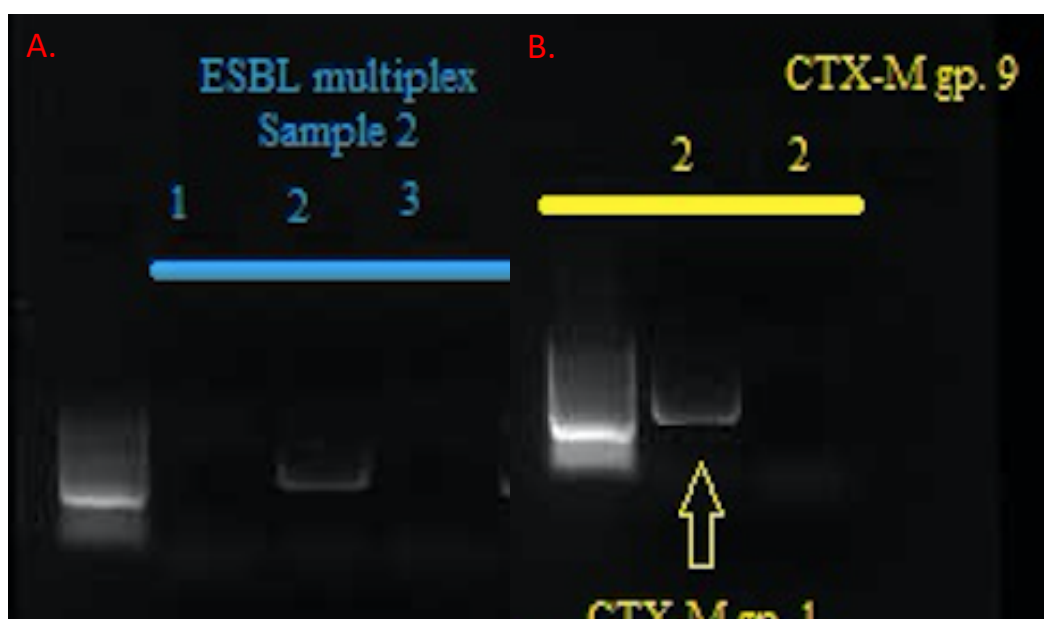
Figur C.3: Gelbilde av multipleks PCR ESBL3 (bla_{NDM} , bla_{VIM} og bla_{KPC}) for prøve 1-5. Ingen positive DNA-bånd iht ladder. Ladder i brønn lengst til venstre på bildet.



Figur C.4: Gelbilde av multipleks PCR for CAR 1 (bla_{CMY-2} , bla_{OXA-48} , bla_{IMP} og bla_{VIM}) og CAR 2 (bla_{NDM} , bla_{SFC-1} og bla_{KPC}) for prøve 1-5. Ingen DNA-bånd som samsvarte med forventet amplikonlengde.



Figur C.5: Gelbilde av singelpleks PCR av prøve 1 (rødt) og prøve 2 (grønt). Brønner fra venstre: ladder, prøve 1 med CTX-M (gr.2)-primere, prøve 1 med OXA-primere, prøve 2 med CTX-M (gr. 9)-primere, prøve 2 med CTX-M (gr.1)-primere. Positive DNA-bånd som tilsvarte forventet ampliconstørrelse for prøve 2 med CTX-M (gr.1).



Figur C.6: Multi- og singelpleks ble utført på nytt for prøve 2 i et forsøk på å isolere større mengde DNA for ESBL-deteksjon. **A.** ESBL multipleks (ESBL1 (1), ESBL2 (2), ESBL3) (3) av prøve 2. Ladder i brønn lengst til venstre. Positivt DNA-bånd for ESBL-2. **B:** ESBL singelpleks av prøve 2 med CTX-M (gr.1)-primere (midterste brønn) og CTX-M (gr.9)-primere (til høyre). Ladder i brønn lengst til venstre. Positivt DNA-bånd for CTX-M gr. 1.

Vedlegg D

Tabell D.1: Virulens- og resistensgener identifisert i prøve 2 gjennom søk med programmet nBLAST med professor Lindstedt sin søkepipeline (ikke publisert). Dette er hovedsakelig rettet mot virulensgener, men noen resistensgener ble også identifisert.

Gene/Marker name	Accession number	Comment	% nucleotide match	Coverage	Contig ID	Location
AcrA	NC_000913	Multidrug efflux pump subunit AcrA	99.16	1194 / 1194	contig00008 len=210541 cov=27.1 corr=0 origname=NODE_8_length_210541_cov_27.056912 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	70003.71196
acs	NC_000913	Acetyl-coenzyme A synthetase. APEC acs-yjch-actP operon, encoding acetate assimilation system, presented the host-induced transcription during its proliferation in macrophages.	97.04	1959 / 1959	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	81409.83367
actP	NC_000913	Cation/acetate symporter ActP. APEC acs-yjch-actP operon, encoding acetate assimilation system, presented the host-induced transcription during its proliferation in macrophages.	95.76	1650 / 1650	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	84061.85710

aec77	AJ61768 5	YeeW-like protein	99.8	489 / 489	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	1441.. 1929
aer	NC_0117 51	Aerotaxis receptor	98.2 2	/ 1521	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	14705 4..148 574
AmpC	BA00000 7	AmpC β -lactamases (also termed class C or group 1) are typically encoded on the chromosome of many Gram-negative bacteria	99.8 2	/ 1134	contig00013 len=140204 cov=29.5 corr=0 origname=NODE_13_length_140204_cov_29.493386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	14981.. .16114
antigen-43	NZ_ANX M01000 041	A self-recognizing adhesin that is associated with cell aggregation and biofilm formation in E. coli.	99.4 3	/ 2438	contig00003 len=355210 cov=28.6 corr=0 origname=NODE_3_length_355210_cov_28.579566 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	35277 3..355 210
antigen-43	NZ_BGJU 0100006 2	A self-recognizing adhesin that is associated with cell aggregation and biofilm formation in E. coli.	96.3	/ 2165	contig00005 len=241261 cov=25.0 corr=0 origname=NODE_5_length_241261_cov_25.030444 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	23909 7..241 261
APEC O1 conserved protein (APECO1_2080)	CP00046 8	APEC O1 conserved protein from CP000468	97.5 5	/ 2202	contig00003 len=355210 cov=28.6 corr=0 origname=NODE_3_length_355210_cov_28.579566 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	29280 3..295 004
arnC	NC_0009 13	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	97.7 3	969 / 969	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	36745 2..368 420
asl (Arylsulfatase)	CU92816 3	Arylsulfatase	98.3 1	/ 1656	contig00017 len=113232 cov=30.9 corr=0 origname=NODE_17_length_113232_cov_30.903019 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	74871.. .76526

atoC	NC_011751	Member of the two-component regulatory system AtoS/AtoC	98.4 1	1386 / 1386	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	32219 5..323 580
atoE	NC_011751	Short chain fatty acid transporter [Escherichia coli UMN026], positive in EPEC1 and negative in EPEC2	97.8 8	1323 / 1323	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	32508 5..326 407
atoS	NC_011751	Member of the two-component regulatory system AtoS/AtoC	98.4 7	1827 / 1827	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	32037 2..322 198
bcr	CP027060	Bicyclomycin resistance protein	96.3 1	1191 / 1191	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	28261 9..283 809
bcsA (cellulose synthase)	CP006632	Catalytically active subunit of cellulose synthase (Biofilm related)	96.9 6	1347 / 1347	contig00018 len=111758 cov=32.2 corr=0 origname=NODE_18_length_111758_cov_32.175999 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	84978. .86324
BlaAMPH	AP012030	A weak beta-lactamase	97.2 4	1158 / 1158	contig00008 len=210541 cov=27.1 corr=0 origname=NODE_8_length_210541_cov_27.056912 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	16312 8..164 285
c0426/upaB	AE014075	An autotransporter that is known to contribute to uropathogenic E. coli (UPEC) colonisation of the urinary tract.	98.0 7	2337 / 2331	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10678 7..109 117
c0478/upaC	AE014075	Autotransporter (AT) adhesin from UPEC strain CFT073	99.9 3	2988 / 2988	contig00008 len=210541 cov=27.1 corr=0 origname=NODE_8_length_210541_cov_27.056912 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	16499 5..167 982

c3029	NC_004431	Ribosome association toxin RatA-like gene	99.76	8052 / 8052	contig00005 len=241261 cov=25.0 corr=0 origname=NODE_5_length_241261_cov_25.030444 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	90891.98942
c4485	NC_004431	UPEC-specific gene identified using CGH and in silico BSR analysis of ten UPEC and four fecal/commensal strains. doi: 10.1128/JB.01744-06	99.63	1092 / 1092	contig00021 len=75175 cov=33.2 corr=0 origname=NODE_21_length_75175_cov_33.187760 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10184.11275
c4759	NC_004431	Transketolase 1. doi: 10.1128/JB.01744-06	99.15	1998 / 1998	contig00017 len=113232 cov=30.9 corr=0 origname=NODE_17_length_113232_cov_30.903019 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	34917.36914
cadA (lysine decarboxylase)	CP025573	Inducible lysine decarboxylase	99.02	2148 / 2148	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	6871..9018
cheW	CP027060	Chemotaxis protein	99.01	504 / 504	contig00010 len=183635 cov=23.1 corr=0 origname=NODE_10_length_183635_cov_23.075490 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	94896.95399
cheY	CP028306	Chemotaxis protein	98.97	390 / 390	contig00010 len=183635 cov=23.1 corr=0 origname=NODE_10_length_183635_cov_23.075490 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	90483.90872
ChuA	LT827011	Outer membrane hemin receptor	99.5	1983 / 1983	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	16992.18974
cirA	CP030337	Outer membrane receptor for colicins IA and IB	99.42	1026 / 1026	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	249988..251013

cjrc	NC_0117 49	Outer membrane colicin Js receptor. Colicin Js is a polypeptide toxin (molecular mass, 10.4 kDa) originally identified as a product of <i>Shigella sonnei</i> . Compared to other colicins, colicin Js has a unique antimicrobial spectrum, being active only on enteroinvasive serotypes of <i>E. coli</i> and <i>Shigella</i> strains.	100	2262 / 2262	contig00042 len=10524 cov=16.7 corr=0 origname=NODE_42_length_10524_cov_16.668106 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	6072.. 8333
ECSE_RS24525	NC_0114 19	Colicin-1A immunity protein	99.7	336 / 336	contig00042 len=10524 cov=16.7 corr=0 origname=NODE_42_length_10524_cov_16.668106 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	1458.. 1793
copA	AE01407 5	Copper-exporting P-type ATPase	98.9 2	2505 / 2505	contig00008 len=210541 cov=27.1 corr=0 origname=NODE_8_length_210541_cov_27.056912 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	44288.. .46792
csgA	CP00024 7	curli fimbriae gene	100	459 / 459	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	80461.. .80919
csgB	CP00024 3	curli fimbriae gene	99.5 9	483 / 483	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	80960.. .81442
csgE	NC_0117 50	curli fimbriae gene	98.4 6	390 / 390	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	82823.. .83212

csgF	NC_011750	curli fimbriae gene	97.6	417 / 417	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	83237. .83653
csgG	LT903847	curli fimbriae gene	99.7	834 / 834	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	83680. .84513
CTX-M-15	KF055402	An extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)	100	876 / 876	contig00031 len=28959 cov=34.3 corr=0 origname=NODE_31_length_28959_cov_34.270949 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	23798. .24673
cusA	NZ_NMMD01000001	Part of a cation efflux system that mediates resistance to copper and silver.	97.6	3144 / 3144	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	54762 3..550 766
CvaA-colicin V secretion protein	GG773553	Involved, in conjunction with CvaB, in the secretion of colicin V.	98.5	1242 / 1242	contig00025 len=41579 cov=30.3 corr=0 origname=NODE_25_length_41579_cov_30.315739 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	8950.. 10191
ecotin	CP025268	General inhibitor of pancreatic serine proteases	97.1	419 / 419	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	30485 5..305 273
ecpA (common pilus)	BA000007	common pilus gene	98.4	588 / 588	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	81963. .82550
ecpB (common pilus)	NZ_QOON01000045	common pilus gene	98.0	669 / 669	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	81238. .81906
ecpD (common pilus)	CP019777	common pilus gene	99.7	1644 / 1644	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	77054. .78697

ehaC	BA000007	EHEC autotransporter C	96.2 4	3754 / 3753	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	34074 6..344 498
elfC	CP021288	Outer membrane usher protein	99.8 1	2595 / 2595	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10112 9..103 723
entA	CP027060	enterobactin biosynthesis and transportation	95.4 5	747 / 747	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51024 4..510 990
entE	CP027060	enterobactin biosynthesis and transportation	95.7 2	1611 / 1611	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51186 1..513 471
evfA	JN837480	Putative T6SS gene of the evf cluster (E. coli virulence factors)	99.5 8	480 / 480	contig00028 len=31423 cov=28.4 corr=0 origname=NODE_28_length_31423_cov_28.365734 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	9803.. 10282
evfC (macrophage toxin)	JN837480	Putative T6SS gene of the evf cluster (E. coli virulence factors)	99.0 7	3018 / 3018	contig00028 len=31423 cov=28.4 corr=0 origname=NODE_28_length_31423_cov_28.365734 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	11669.. .14686
evfQ	JN837480	Putative T6SS gene of the evf cluster (E. coli virulence factors)	99.9 5	1842 / 1842	contig00028 len=31423 cov=28.4 corr=0 origname=NODE_28_length_31423_cov_28.365734 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	25124.. .26965
evfW	JN837480	Putative T6SS gene of the evf cluster (E. coli virulence factors)	96.7 8	1213 / 1983	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	1..121 1
fdeC (intimin-like protein)	CP019777	FdeC (factor adherence E. coli) able to mediate E. coli adhesion to mammalian cells and extracellular matrix.	99.6 5	4251 / 4251	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	92468.. .96718

fecA	NC_011751	Outer membrane ferri-siderophore receptor, an E. coli 83972 isolate during deliberate bladder colonization lost genes for the aerobactin siderophore system, which is immunogenic, while expression of the ferric citrate receptor FecA was upregulated	99.78	2325 / 2325	contig00034 len=18613 cov=31.2 corr=0 origname=NODE_34_length_18613_cov_31.160933 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	5065..7389
fecA	NC_011751	Outer membrane ferri-siderophore receptor, an E. coli 83972 isolate during deliberate bladder colonization lost genes for the aerobactin siderophore system, which is immunogenic, while expression of the ferric citrate receptor FecA was upregulated	99.78	2325 / 2325	contig00034 len=18613 cov=31.2 corr=0 origname=NODE_34_length_18613_cov_31.160933 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	5065..7389
feoB	CP019777	Fe(2+) transporter	98.58	2322 / 2322	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	130018..132339
fepA	CP000468	Ferrienterobactin receptor	99.59	1945 / 1947	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	526861..528805

fepB	AE01407 5	Ferrienterobactin-binding periplasmic protein	99.7 9	957 / 957	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51484 5..515 801
fepC	AE01407 5	Predicted ATP-binding subunit of a ferric enterobactin ABC transporter	99.3 9	816 / 816	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51915 6..519 971
fepD	AE01407 5	Ferric enterobactin (Enterochelin) transport	99.5 1	1017 / 1017	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51715 4..518 170
fepE	AE01407 5	Ferric enterobactin transport protein	95.1 5	1134 / 1134	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51996 8..521 101
fepG	CP02557 3	Ferric enterobactin transport system permease protein	99.8	993 / 993	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51816 7..519 159
fes	CP02706 0	Enterochelin esterase	96.3 6	1125 / 1125	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	52541 6..526 540
EcSMS35_3916	NC_0104 98	Fic family protein, positive in EPEC1 absent from EPEC2	99.8 5	1296 / 1296	contig00018 len=111758 cov=32.2 corr=0 origname=NODE_18_length_111758_cov_32.175999 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	20161. .21456
fiu	CP02382 0	Catechol siderophore receptor	96.7 1	2283 / 2283	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	31764 3..319 925
flgD	CP02706 0	Basal-body rod modification protein	96.5 5	696 / 696	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	52812. .53507

flgM	CP02819 2	Negative regulator of flagellin synthesis	98.3	294 / 294	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	55233. .55526
fmlA (F9-fimbriae)	BA00000 7	F9 Fimbriae of Uropathogenic Escherichia coli Are Expressed at Low Temperature. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093177	96.8	564 / 564	contig00026 len=37497 cov=22.0 corr=0 origname=NODE_26_length_37497_cov_21.958657 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	21894. .22457
fsr (Fosmidomycin resistance)	CP02706 0	Fosmidomycin resistance protein	97.9	1221 / 1221	contig00008 len=210541 cov=27.1 corr=0 origname=NODE_8_length_210541_cov_27.056912 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	51046. .52266
fyuA	CP01682 8	The ferric yersiniabactin uptake receptor	99.7	2022 / 2022	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	42087. .44108
gipA	NC_0176 34	One particular gene that contributes to AIEC's ability to survive and replicate inside macrophages is gipA	99.9	1131 / 1131	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	35103 5..352 165
gspD (Shigella)	NC_0076 06	Type II secretion system protein	96.0	1851 / 1836	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	26302. .28152
Hemolysin-III	CP00303 4	Inner membrane protein, hemolysin III family gene	99.5	690 / 690	contig00004 len=323422 cov=28.2 corr=0 origname=NODE_4_length_323422_cov_28.164871 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	66181. .66870
hmuR	AJ58688 7	Putative outer membrane heme/hemoglobin receptor	97.2	1971 / 1971	contig00053 len=4429 cov=18.5 corr=0 origname=NODE_53_length_4429_cov_18.501395 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	2067.. 4037

hutX	NZ_CP023820	Cytoplasmic Heme-Binding Protein, heme utilization cytosolic carrier protein HutX	95.3 5	495 / 495	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	13530. .14024
ibeB	AF094824	Invasion protein	98.1 2	/ 1383	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	55237 3..553 755
ibeC	CP019777	Invasion protein	99.7 7	/ 1734	contig00016 len=118791 cov=30.5 corr=0 origname=NODE_16_length_118791_cov_30.469873 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	21754. .23487
iha	CP018957	The IrgA homologue adhesin Iha is an Escherichia coli virulence factor in murine urinary tract infection.	99.7 5	/ 2010	contig00046 len=7966 cov=30.5 corr=0 origname=NODE_46_length_7966_cov_30.520347 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	627..2 636
imm	NC_013589	colicin E1 immunity protein	99.7	336 / 336	contig00042 len=10524 cov=16.7 corr=0 origname=NODE_42_length_10524_cov_16.668106 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	1458.. 1793
pEC14_8	NC_013175	High affinity Fe+2 binding protein permease component	99.9 5	/ 1941	contig00041 len=11764 cov=16.7 corr=0 origname=NODE_41_length_11764_cov_16.695626 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	2479.. 4419
irp1	CU928163	Yersiniabactin biosynthetic protein, part of the HPI (High Pathogenicity Island).	99.2 7	/ 9493	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	28987. .38478
irp2	CP006834	Yersiniabactin biosynthetic protein. The irp2 and fyuA genes in High Pathogenicity Islands are involved in the pathogenesis of infections	98.8 7	/ 6106	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	22793. .28897

		caused by avian pathogenic Escherichia coli (APEC)				
IS26-transposase	AP018456	IS26 transposase from Escherichia coli O25b:H4-ST131 plasmid	100	705 / 705	contig00094 len=798 cov=61.1 corr=0 origname=NODE_94_length_798_cov_61.146051 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	64..768
iucA	CU928163	Part of Aerobactin siderophore	99.44	1788 / 1788	contig00039 len=15288 cov=31.4 corr=0 origname=NODE_39_length_15288_cov_31.397269 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	11749..13536
iucB	AE014075	Part of Aerobactin siderophore	99.4	668 / 668	contig00039 len=15288 cov=31.4 corr=0 origname=NODE_39_length_15288_cov_31.397269 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10801..11468
iucC	AE014075	Part of Aerobactin siderophore	98.16	1742 / 1742	contig00039 len=15288 cov=31.4 corr=0 origname=NODE_39_length_15288_cov_31.397269 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	9059..10800
iucD	CP001232	Part of Aerobactin siderophore	99.84	1278 / 1278	contig00039 len=15288 cov=31.4 corr=0 origname=NODE_39_length_15288_cov_31.397269 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	7785..9062
iutA	CP011134	Ferric aerobactin receptor	99.95	2202 / 2202	contig00039 len=15288 cov=31.4 corr=0 origname=NODE_39_length_15288_cov_31.397269 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	5502..7703
ivy	CP025268	Inhibitor of vertebrate lysozyme	98.1	474 / 474	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	7592..8065
kpsC	AWDO01000031	Capsule polysaccharide export protein	96.75	2028 / 2028	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	6484..8511
kpsD	NC_007946	Capsule transport protein	99.05	1677 / 1677	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	4061..5737

kpsS	CP00663 2	Capsule polysaccharide export protein	97.0 1	1172 / 1188	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	8546.. 9717
malX	AF00374 2	Pathogenicity Island Marker	98.6 1	1581 / 1581	contig00004 len=323422 cov=28.2 corr=0 origname=NODE_4_length_323422_cov_28.164871 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	15082 5..152 405
matD	HM1023 65	Predicted outer membrane protein associated with E. coli common pilus (ECP) formation in pathogenic E. coli strains	99.7 2	2526 / 2526	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	78687.. .81212
MBL-fold metallo-hydrolase	CP02338 8	Candidate phylogroup B2 specific marker	99.9	1044 / 1044	contig00004 len=323422 cov=28.2 corr=0 origname=NODE_4_length_323422_cov_28.164871 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	26840 9..269 452
mdfA	Y08743	Multidrug transporter	97.8 9	1233 / 1233	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	27587 3..277 105
mdtH	CP01977 7	Multidrug resistance protein	99.4 2	1209 / 1209	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	60035.. .61243
MphA	DQ4452 70	Macrolide resistance	100	903 / 906	contig00059 len=3813 cov=17.8 corr=0 origname=NODE_59_length_3813_cov_17.824200 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	196..1 098
mviM	CU92816 4	Putative virulence factor	97.0 8	924 / 924	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	57632.. .58555
neuB	NC_0117 50	Sialic acid synthase, K1-capsule	100	1041 / 1041	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	14689.. .15729

neuC	CP003034	UDP N-Acetylglucosamine 2-Epimerase, K1-capsule	100	1176 / 1176	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	12261. .13436
nikA	CU928163	Nickel-binding periplasmic protein	98.41	1575 / 1575	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	45252. .46826
nlpD-lipoprotein	NC_017634	NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in Escherichia coli	99.91	1140 / 1140	contig00004 len=323422 cov=28.2 corr=0 origname=NODE_4_length_323422_cov_28.164871 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	26526 1..266 400
ompA	CP027060	Outer membrane protein A	97.6	1041 / 1041	contig00001 len=564223 cov=23.7 corr=0 origname=NODE_1_length_564223_cov_23.659386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	15148 4..152 524
papA	AP018784	Pyelonephritis-associated pili (pap). Pap fimbrial major pilin protein. Strains of E.coli that cause infection of the human urinary tract produce pap-pili which are hair-like appendages consisting of about 1000 helically arranged subunits of the protein PapA.	100	270 / 270	contig00044 len=8564 cov=32.0 corr=0 origname=NODE_44_length_8564_cov_31.985895 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	8197.. 8466
papI	CU928164	Pap operon regulatory protein PapI	99.57	234 / 234	contig00044 len=8564 cov=32.0 corr=0 origname=NODE_44_length_8564_cov_31.985895 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	6739.. 6972

papX	CP02525 1_	P fimbrial operon-encoded inhibitor of motility in uropathogenic Escherichia coli	97.4 6	552 / 552	contig00077 len=1511 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_77_length_1511_cov_29.738439 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	578..1 129
pduC	CP03011 1	PduC (propanediol dehydratase) was enriched in CD-derived AIEC. Inflamm Bowel Dis. 2014 Nov;20(11):1919-32. doi: 10.1097/MIB.00000000000000183.	100	1665 / 1665	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	75264. .76928
pemK-toxin	NC_0228 85	Toxic component of a type II toxin-antitoxin (TA) system. Probably functions as an endoribonuclease. Responsible for the stable maintenance of the plasmid during cell division by postsegregational killing of plasmid-less daughter cells.	100	333 / 333	contig00029 len=30717 cov=16.8 corr=0 origname=NODE_29_length_30717_cov_16.847434 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	320..6 52
ppk	CP02526 8	Polyphosphate kinase	98.8 4	2067 / 2067	contig00005 len=241261 cov=25.0 corr=0 origname=NODE_5_length_241261_cov_25.030444 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10950 9..111 575
recG	CP01945 5	RecG catalyzes reversal of stalled replication forks in response to replication stress in bacteria.	96.6 2	2072 / 2082	contig00021 len=75175 cov=33.2 corr=0 origname=NODE_21_length_75175_cov_33.187760 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	19514. .21585

rpiR	NC_011750	DNA-binding transcriptional repressor RpiR, involved in rpiB and als operon repression, positive. Positive in EPEC absent in EHEC	99.55	891 / 891	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	50255.51145
sapA	NC_011751	Antimicrobial peptide ABC transporter substrate-binding protein [Escherichia coli UMN026]	96.9	1644 / 1644	contig00012 len=162202 cov=22.1 corr=0 origname=NODE_12_length_162202_cov_22.101539 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	112085.113728
sat	HG941718	The secreted autotransporter toxin	99.92	3889 / 3888	contig00039 len=15288 cov=31.4 corr=0 origname=NODE_39_length_15288_cov_31.397269 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	667.4555
sbmC (DNA Gyrase inhibitor)	CP027060	sbmC, a stationary-phase induced SOS Escherichia coli gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17	97.05	474 / 474	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	88991.89464
shiA	NC_011751	shiA, suppress the host inflammatory response	98.86	1311 / 1317	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	49100.50410
sinH (Intimin-like protein)	NZ_NMH101000013	Salmonella virulence factor SinH (also known as SivH)	98.07	2178 / 2178	contig00005 len=241261 cov=25.0 corr=0 origname=NODE_5_length_241261_cov_25.030444 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	87561.89738
sitA	FQ482074	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	97.16	915 / 915	contig00019 len=107452 cov=22.8 corr=0 origname=NODE_19_length_107452_cov_22.839953 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	4202.5116

sitB	NC_017659	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	98.67	825 / 825	contig00019 len=107452 cov=22.8 corr=0 origname=NODE_19_length_107452_cov_22.839953 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	3375..4199
sitC	CP000836	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	98.95	858 / 858	contig00019 len=107452 cov=22.8 corr=0 origname=NODE_19_length_107452_cov_22.839953 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	2521..3378
sitD	UGFR0100001	In E. coli SitABCD represents a manganese and iron transporter	97.09	858 / 858	contig00019 len=107452 cov=22.8 corr=0 origname=NODE_19_length_107452_cov_22.839953 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	1667..2524
Slp-lipoprotein	NZ_NLYY01000004	The Escherichia coli O157:H7 carbon starvation-inducible lipoprotein Slp contributes to initial adherence in vitro via the human polymeric immunoglobulin receptor. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216791	99.12	567 / 567	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	20791..21357
stcD (Fimbrial adhesin)	NC_018658	Putative fimbrial-like adhesin protein gene	97.68	1035 / 1035	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	192223..193257
stfD	LOFW01000008	fimbrial protein, Associated with systemic and fatal infection in inbred mice	98.01	753 / 753	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	446984..447736
sugE	CP018976	Quaternary ammonium compound-resistance SugE	98.43	318 / 318	contig00013 len=140204 cov=29.5 corr=0 origname=NODE_13_length_140204_cov_29.493386 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	14045..14362
tagH	NC_017626	Type VI secretion system protein Impl	98.85	1389 / 1389	contig00028 len=31423 cov=28.4 corr=0 origname=NODE_28_length_31423_cov_28.365734 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	22814..24202

tehA	CP027060	Tellurite resistance protein TehA	99.19	993 / 993	contig00012 len=162202 cov=22.1 corr=0 origname=NODE_12_length_162202_cov_22.101539 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	22362. .23354
tehB	CP027060	Tellurite resistance protein TehB	98.32	594 / 594	contig00012 len=162202 cov=22.1 corr=0 origname=NODE_12_length_162202_cov_22.101539 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	21772. .22365
tnpA iSEcp1-transposase	NC_014384	Typically associated with CMY-type beta-lactamases	100	1266 / 1266	contig00031 len=28959 cov=34.3 corr=0 origname=NODE_31_length_28959_cov_34.270949 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	22277. .23542
tonB	NZ_CP023820	TonB is a component of the energy transducing Ton system	97.36	720 / 720	contig00019 len=107452 cov=22.8 corr=0 origname=NODE_19_length_107452_cov_22.839953 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10227 6..102 992
tssA	NC_011751	Type VI secretion system protein TssA	98.28	1509 / 1509	contig00028 len=31423 cov=28.4 corr=0 origname=NODE_28_length_31423_cov_28.365734 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	15216. .16724
usp	CU651637	Uropathogenic specific protein	99.55	1782 / 1782	contig00003 len=355210 cov=28.6 corr=0 origname=NODE_3_length_355210_cov_28.579566 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10331 7..105 098
vagD	DQ381420	Toxin-antitoxin (TA) system. VagCD, was found to be encoded on a virulence plasmid of Salmonella enterica serovar Dublin in 1992	100	756 / 756	contig00029 len=30717 cov=16.8 corr=0 origname=NODE_29_length_30717_cov_16.847434 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	27031. .27786
VapA	CP030111	A Rhodococcus equi virulence gene. VapA is associated with all R. equi strains isolated from infected foals; moreover, deletion mutagenesis	100	453 / 453	contig00012 len=162202 cov=22.1 corr=0 origname=NODE_12_length_162202_cov_22.101539 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	16062 1..161 073

		experiments have shown that the presence of the vapA gene is essential for intracellular growth of the bacterium in macrophages				
vat	KR094926	The vacuolating autotransporter toxin	99.72	5632 / 5631	contig00015 len=119650 cov=28.7 corr=0 origname=NODE_15_length_119650_cov_28.691909 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	67879. .73510
ybbP (putative ABC-transporter permease)	NC_011751	YbbP is the predicted membrane-spanning subunit of a putative ATP-binding cassette (ABC) exporter complex	96.73	2416 / 2415	contig00008 len=210541 cov=27.1 corr=0 origname=NODE_8_length_210541_cov_27.056912 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	29879. .32293
ybtA	CP028714	Yersiniabactin transcriptional regulator	99.58	960 / 960	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	21643. .22602
ybtQ	CP003034	Yersiniabactin-iron ABC transporter permease ATP-binding protein YbtQ	99.83	1803 / 1803	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	17885. .19687
ybtS	NC_007946	Yersiniabactin biosynthesis salicylate synthase	99.69	1305 / 1305	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	15280. .16584
ybtX	CP003034	Yersiniabactin-iron transporter permease YbtX	99.69	1281 / 1281	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	16612. .17892
ydeR	CU928163	Two genes of the F9 operon, ydeQ and ydeR, were increased 2.2-fold with bile treatment. doi:	98.21	504 / 504	contig00026 len=37497 cov=22.0 corr=0 origname=NODE_26_length_37497_cov_21.958657 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	26780. .27283

		10.1371/journal.pone.0074647				
yecI (ferritin-like protein 2)	AE014075	Gene encoding a ferritin-like protein (FtnB). Ferritin Mutants of Escherichia coli Are Iron Deficient and Growth Impaired	99.8	504 / 504	contig00010 len=183635 cov=23.1 corr=0 origname=NODE_10_length_183635_cov_23.075490 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	10820 9..108 712
YfcQ	CYEA0100003	Fimbrial-like protein	97.9	480 / 480	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	44598 8..446 467
yfcV	NC_011750	Any two of the genes chuA (heme receptor), yfcV (YfC fimbria) or vat (vacuolating autotransporter protein), when detected along with the gene fyuA (yersiniabactin siderophore receptor), can be used to differentiate UPEC strains from commensal and DEC strains	97.1	567 / 567	contig00002 len=477996 cov=24.3 corr=0 origname=NODE_2_length_477996_cov_24.311361 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	45048 5..451 051
yfdV (transporter gene)	NC_011750	Predicted transporter. The EvgA acid response regulator activates transcription of the Escherichia coli yfdXWUVE operon	98.7	945 / 945	contig00005 len=241261 cov=25.0 corr=0 origname=NODE_5_length_241261_cov_25.030444 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	21924 0..220 184
ygfl	CU928163	regulatory RNA gene	96.8	897 / 897	contig00004 len=323422 cov=28.2 corr=0 origname=NODE_4_length_323422_cov_28.164871 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	47469. .48359

yjaA	CP021288	YjaA is involved in the cellular response to hydrogen peroxide and acid stress	100	384 / 384	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	168029.168412
yjch	NC_000913	APEC acs-yjch-actP operon, encoding acetate assimilation system, presented the host-induced transcription during its proliferation in macrophages.	96.51	315 / 315	contig00011 len=168606 cov=30.4 corr=0 origname=NODE_11_length_168606_cov_30.427258 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	83750.84064
YqgB (putative virulence promoting factor)	CP023258	Gene of unknown class or function significantly induced by AI-2 quorum signaling	100	147 / 147	contig00004 len=323422 cov=28.2 corr=0 origname=NODE_4_length_323422_cov_28.164871 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	24316.24462
zntA	AP010958	Zinc/cadmium/lead-transporting P-type ATPase.	95.04	2199 / 2199	contig00009 len=196353 cov=30.6 corr=0 origname=NODE_9_length_196353_cov_30.578063 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	52011.54209
ZnuA	BA000007	Protein associated with the high-affinity ATP-binding cassette ZnuABC transporter	98.5	933 / 933	contig00010 len=183635 cov=23.1 corr=0 origname=NODE_10_length_183635_cov_23.075490 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	65941.66873
znuB	NC_000913	Protein associated with the high-affinity ATP-binding cassette ZnuABC transporter	97.58	786 / 786	contig00010 len=183635 cov=23.1 corr=0 origname=NODE_10_length_183635_cov_23.075490 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	67704.68489
ZnuC	BA000007	Protein associated with the high-affinity ATP-binding cassette ZnuABC transporter	98.02	756 / 756	contig00010 len=183635 cov=23.1 corr=0 origname=NODE_10_length_183635_cov_23.075490 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	66952.67707

zupT	CP02706 0	Zinc transporter	99.8 7	774 / 774	contig00007 len=216683 cov=29.7 corr=0 origname=NODE_7_length_216683_cov_29.687462 sw=shovill-spades/1.0.4 date=20200324	11338 4..114 157
------	--------------	------------------	-----------	--------------	--	------------------------

Tabell D.2: Virulensgener identifisert etter scanning av helgenomsekvenserings-resultater gjennom søk i databasen VFDB for prøve 2 og 5.

GENE	COVERA GE	%COVERA GE	%IDENTI TY	ACCESSION	PRODUCT
Prøve 2					
flgJ	94- 260/924	18.07	75.29	YP_0010067 56	(flgJ) flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgH	127- 678/684	80.70	78.80	YP_0010067 58	(flgH) flagellar L-ring protein precursor FlgH [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgG	7- 654/654	98.93	75.50	YP_0010067 59	(flgG) flagellar basal-body rod protein FlgG [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgE	1- 402/126 0	31.75	77.23	YP_0010067 61	(flgE) flagellar hook protein FlgE [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgM	91- 227/258	53.10	80.29	YP_0010067 66	(flgM) negative regulator of flagellin synthesis [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
entD	3- 114/771	14.40	87.61	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
csgB	1- 456/456	99.78	83.59	NP_460114	(csgB) minor curlin subunit precursor curli nucleator protein CsgB [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
csgD	1- 651/651	100.00	81.26	NP_460113	(csgD) DNA-binding transcriptional regulator CsgD [curli fibers/thin aggregative fimbriae (AGF) (AI094)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
csgE	1- 396/396	98.48	79.29	NP_460112	(csgE) curli production assembly/transport protein CsgE [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]

csgF	1- 417/417	99.04	80.76	NP_460111	(csgF) curli production assembly/transport protein CsgF [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
csgG	1- 834/834	100.00	83.33	NP_460110	(csgG) curli production assembly/transport protein CsgG [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
ompA	1- 1041/10 41	100.00	99.52	AAF37887	(ompA) outer membrane protein A [OmpA (VF0236)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]
entD	14- 132/771	15.30	82.50	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	15- 132/771	15.18	83.90	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	14- 137/771	15.95	91.20	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entA	1- 747/747	100.00	98.39	NP_752614	(entA) 23-dihydro-23-dihydroxybenzoate dehydrogenase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entB	1- 858/858	100.00	99.18	NP_752613	(entB) isochorismatase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entE	1- 1611/16 11	100.00	99.13	NP_752612	(entE) 23-dihydroxybenzoate-AMP ligase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entC	1- 1188/11 88	100.00	99.66	NP_752611	(entC) isochorismate synthase 1 [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fepB	1- 957/957	100.00	99.79	NP_752610	(fepB) ferrienterobactin ABC transporter periplasmic binding protein [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entS	1- 1251/12 51	100.00	98.80	NP_752609	(entS) enterobactin exporter iron-regulated [enterobactin (IA019)] [Escherichia coli CFT073]

	1- 1017/10				(fepD) ferrienterobactin ABC transporter permease [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fepD	17	100.00	99.51	NP_752608	
	1- 993/993				(fepG) iron-enterobactin ABC transporter permease [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fepG	993	100.00	99.80	NP_752607	
	1- 816/816				(fepC) ferrienterobactin ABC transporter ATPase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fepC	816	100.00	99.39	NP_752606	
	1- 3854/38				(entF) enterobactin synthase multienzyme complex component ATP-dependent [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entF	82	99.28	98.36	NP_752604	
	1- 1203/12				(fes) enterobactin/ferric enterobactin esterase [enterobactin (IA019)] [Escherichia coli CFT073]
fes	03	100.00	99.83	NP_752602	
	1- 2241/22				(fepA) ferrienterobactin outer membrane transporter [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fepA	41	100.00	98.88	NP_752600	
	1- 662/771				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	662	85.86	92.75	NP_752599	
	1- 1305/13				(ybtS) salicylate synthase Irp9 [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtS	05	100.00	99.77	NP_405477	
	1- 1281/12				(ybtX) putative signal transducer [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtX	81	100.00	99.61	NP_405476	
	1- 1803/18				(ybtQ) inner membrane ABC-transporter YbtQ [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtQ	03	100.00	99.78	NP_405475	
	1- 1803/18				(ybtP) lipoprotein inner membrane ABC-transporter [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtP	03	100.00	99.61	NP_405474	

ybtA	1- 960/960	100.00	99.48	NP_405473	(ybtA) transcriptional regulator YbtA [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
irp2	1- 6106/6108	99.95	98.87	NP_405472	(irp2) yersiniabactin biosynthetic protein Irp2 [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
irp1	1- 9492/9492	100.00	99.33	NP_405471	(irp1) yersiniabactin biosynthetic protein Irp1 [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtU	1- 1101/1101	100.00	99.73	NP_405470	(ybtU) yersiniabactin biosynthetic protein YbtU [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtT	1- 804/804	100.00	99.50	NP_405469	(ybtT) yersiniabactin biosynthetic protein YbtT [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
ybtE	1- 1578/1578	100.00	99.81	NP_405468	(ybtE) yersiniabactin siderophore biosynthetic protein [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
fyuA	1- 2022/2022	100.00	99.95	NP_405467	(fyuA) pesticin/yersiniabactin receptor protein [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
entD	3- 133/771	16.86	84.85	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	14- 127/771	14.66	82.76	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	1- 136/771	17.38	81.75	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	1- 136/771	17.51	91.97	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	1- 7-98/771	11.80	87.10	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]

	795- 1518/16			YP_0010067	(cheD) methyl-accepting chemotaxis protein CheD [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheD	74	43.25	77.21	78	
	1-				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase
entD	141/771	18.03	86.62	NP_752599	multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
	1-				
fimH	912/912	100.00	97.15	NP_757248	(fimH) FimH protein precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
	1-				
fimG	504/504	100.00	98.02	NP_757247	(fimG) FimG protein precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
	1-				
fimF	534/534	100.00	97.38	NP_757245	(fimF) FimF protein precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
	1-				
	2637/26				(fimD) Outer membrane usher protein fimD precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
fimD	37	100.00	98.26	NP_757244	
	1-				(fimC) Chaperone protein fimC precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
fimC	726/726	100.00	98.48	NP_757243	
	1-				(fimI) Fimbrin-like protein fimI precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
fimI	540/540	100.00	98.33	NP_757242	
	1-				(fimA) Type-1 fimbrial protein A chain precursor [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
fimA	606/606	100.00	92.24	NP_757241	
	1-				(fimE) Type 1 fimbriae Regulatory protein fimE [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
fimE	597/597	100.00	98.66	NP_757240	
	1-				(fimB) Type 1 fimbriae Regulatory protein fimB [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
fimB	603/603	100.00	98.18	NP_757239	
	1-				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase
entD	137/771	17.64	87.68	NP_752599	multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
	10-				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase
entD	140/771	16.60	79.39	NP_752599	multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
	14-				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase
entD	117/771	13.36	88.57	NP_752599	multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]

entD	10- 132/771 1667- 1899/18	15.82	81.45	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
espL1	99 1- 797/189	12.22	94.42	NP_288154	(espL1) Type III secretion system effector espL1 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
espL1	9 1- 1677/16	41.92	95.23	NP_288154	(espL1) Type III secretion system effector espL1 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
kpsD	77 1-	100.00	99.05	AAA21682	(kpsD) KpsD [K1 capsule (VF0239)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]
kpsT	660/660 1-	100.00	100.00	AAA24047	(kpsT) KpsT [K1 capsule (VF0239)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]
kpsM	777/777 1-	100.00	99.87	AAA24046	(kpsM) KpsM [K1 capsule (VF0239)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]
gspM	422/423 1-	99.76	93.60	YP_404609	(gspM) general secretion pathway protein M [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspL	861/861 1-	100.00	94.77	YP_404608	(gspL) general secretion pathway protein L [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspK	978/978 1-	100.00	96.63	YP_404607	(gspK) general secretion pathway protein K [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspJ	570/570 1-	100.00	94.39	YP_404606	(gspJ) general secretion pathway protein J [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspI	372/372 1-	100.00	92.20	YP_404605	(gspI) general secretion pathway protein I [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspH	531/531 1-	100.00	94.73	YP_404604	(gspH) general secretion pathway protein H [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspG	456/456	100.00	96.05	YP_404603	(gspG) general secretion pathway protein G [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]

	1- 1200/12				(gspF) general secretion pathway protein F [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspF	00	100.00	94.17	YP_404602	
	1- 1494/14				(gspE) general secretion pathway protein E [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspE	94	100.00	94.91	YP_404601	
	1- 1836/18				(gspD) general secretion pathway protein D [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspD	36	100.00	96.06	YP_404600	
	1- 831/831				(gspC) general secretion pathway protein C [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
gspC	831/831	100.00	93.86	YP_404599	
	1- 136/771				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	136/771	17.51	79.56	NP_752599	
	1- 140/771				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	140/771	18.03	86.53	NP_752599	
	15- 132/771				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	132/771	15.18	85.71	NP_752599	
	1- 126/771				(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	126/771	16.21	88.98	NP_752599	
	1- 801/801				(chuV) ATP-binding hydrophilic protein ChuV [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuV	801/801	100.00	99.75	NP_756180	
	1- 993/993				(chuU) heme permease protein ChuU [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuU	993/993	100.00	99.50	NP_756179	
	1- 624/624				(chuY) ChuY [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuY	624/624	100.00	98.40	NP_756178	
	1- 495/495				(chuX) putative heme-binding protein ChuX [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuX	495/495	100.00	100.00	NP_756177	
	1- 1338/13				(chuW) Putative oxygen independent coproporphyrinogen III oxidase [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuW	38	100.00	99.10	NP_756176	

chuT	1- 993/993	100.00	99.70	NP_756175	(chuT) periplasmic heme-binding protein ChuT [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuA	1- 1947/19 47	100.00	99.69	NP_756170	(chuA) Outer membrane heme/hemoglobin receptor ChuA [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
chuS	1- 1029/10 29	100.00	99.51	NP_756169	(chuS) heme oxygenase ChuS [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
entD	11- 114/771	13.36	85.85	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	11- 140/771	16.73	85.61	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	15- 126/771	14.40	92.92	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
cheY	1- 388/390	99.49	77.06	YP_0010067 74	(cheY) chemotaxis regulatory protein CheY [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheD	847- 1518/16 74	40.14	75.00	YP_0010067 78	(cheD) methyl-accepting chemotaxis protein CheD [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheW	19- 468/498	90.36	75.11	YP_0010067 79	(cheW) purine-binding chemotaxis protein CheW [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheA	1- 389/205 5	18.93	75.06	YP_0010067 80	(cheA) chemotaxis protein CheA [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
entD	15- 124/771	14.01	87.50	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fliC	7- 320/114 6	27.40	79.30	YP_0010067 28	(fliC) flagellin [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]

fliG	6- 993/993	99.50	78.85	YP_0010067 42	(fliG) flagellar motor switch protein G [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
fliI	43- 1281/13 32	92.64	75.30	YP_0010067 44	(fliI) flagellum-specific ATP synthase FliI [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
fliM	1- 1005/10 05	99.50	76.63	YP_0010067 48	(fliM) flagellar motor switch protein FliM [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
fliN	157- 416/417	62.35	78.46	YP_0010067 49	(fliN) flagellar motor switch protein FliN [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
fliP	10- 686/687	98.40	77.14	YP_0010067 51	(fliP) flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
entD	1- 137/771	17.64	90.65	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	1- 137/771	17.38	81.16	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	2- 114/771	14.53	88.60	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	1- 129/771	16.60	83.85	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	10- 132/771	14.53	84.68	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
fliP	530- 743/768	27.86	79.44	NP_250137	(fliP) flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
entD	5- 125/771	15.56	80.99	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
vat	1- 4131/41 31	100.00	99.69	NP_752330	(vat) Haemoglobin protease [Tsh (VF0233)] [Escherichia coli CFT073]

yagV/ecpE	1- 754/756	99.74	98.41	NP_286006	(yagV/ecpE) E. coli common pilus chaperone EcpE [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
yagW/ecpD	1- 1644/1644	100.00	99.15	NP_286007	(yagW/ecpD) polymerized tip adhesin of ECP fibers [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
yagX/ecpC	2526/2526	100.00	97.66	NP_286008	(yagX/ecpC) E. coli common pilus usher EcpC [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
yagY/ecpB	1- 669/669	100.00	98.06	NP_286009	(yagY/ecpB) E. coli common pilus chaperone EcpB [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
yagZ/ecpA	1- 588/588	100.00	98.47	NP_286010	(yagZ/ecpA) E. coli common pilus structural subunit EcpA [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
ykgK/ecpR	1- 591/591	100.00	99.32	NP_286011	(ykgK/ecpR) regulator protein EcpR [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
fdeC	1- 4251/4251	100.00	99.62	YP_002390132	(fdeC) adhesin FdeC [FdeC (VF0506)] [Escherichia coli O45:K1:H7 str. S88]
fimE	400- 537/597	23.12	82.61	NP_757240	(fimE) Type 1 fimbriae Regulatory protein fimE [Type 1 fimbriae (VF0221)] [Escherichia coli CFT073]
entD	15- 124/771	14.14	88.29	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
katB	1231- 1343/21	5.15	80.53	YP_096397	(katB) catalase-peroxidase KatB [KatAB (VF0168)] [Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1]
entD	1- 131/771	16.86	84.85	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
aslA	1- 1428/1428	100.00	98.46	AAG10151	(aslA) putative arylsulfatase [AsIA (VF0238)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]

entD	1- 119/771	15.30	86.67	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	3- 136/771	17.25	85.19	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	1- 113/771	14.14	82.30	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	15- 131/771	15.05	86.56	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entD	11- 114/771	13.36	93.33	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
gspG	37- 233/456	43.20	79.19	YP_404603	(gspG) general secretion pathway protein G [T2SS (VF0333)] [Shigella dysenteriae Sd197]
entD	1- 141/771	18.03	83.80	NP_752599	(entD) phosphopantetheinyl transferase component of enterobactin synthase multienzyme complex [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
sat	1- 3900/3900	100.00	99.49	NP_755494	(sat) Acreted auto transpoter toxin [Sat (VF0231)] [Escherichia coli CFT073]
iutA	1- 2280/2280	99.96	88.36	NP_755498	(iutA) ferric aerobactin receptor precursor IutA [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]
iucD	1- 1323/1323	98.80	96.30	NP_755499	(iucD) L-lysine 6-monooxygenase IucD [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]
iucC	1- 1743/1743	100.00	98.16	NP_755500	(iucC) aerobactin siderophore biosynthesis protein IucC [Aerobactin (VF0229)] [Escherichia coli CFT073]
iucB	1- 948/948	100.00	99.79	NP_709455	(iucB) aerobactin synthesis protein IucB [Aerobactin (VF0123)] [Shigella flexneri 2a str. 301]

iucA	1- 1782/17	100.00	99.83	NP_709454	(iucA) aerobactin synthesis protein IucA [Aerobactin (VF0123)] [Shigella flexneri 2a str. 301]
senB	2- 1140/11	99.91	99.74	YP_406304	(senB) enterotoxin [ShET2 (VF0258)] [Shigella flexneri 2a str. 301]
papI	1- 234/234	100.00	94.87	NP_755468	(papI) regulatory protein PapI [P fimbriae (VF0220)] [Escherichia coli CFT073]
papB	1- 315/315	99.68	98.41		(papB) regulatory protein PapB [P fimbriae (VF0220)] [Escherichia coli CFT073]
papA	1- 216/600	35.50	88.58	NP_755467	(papA) P pilus major subunit PapA [P fimbriae (VF0220)] [Escherichia coli CFT073]
papX	1- 552/552	100.00	97.46	NP_755457	(papX) PapX protein regulates flagellum synthesis to repress motility [P fimbriae (CVF425)] [Escherichia coli CFT073]
Prøve 5					
chuW	19- 1293/133	94.99	75.45	NP_756176	(chuW) Putative oxygen independent coproporphyrinogen III oxidase [Chu (VF0227)] [Escherichia coli CFT073]
ompA	1- 1036/104	99.42	76.46	AAF37887	(ompA) outer membrane protein A [OmpA (VF0236)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]
tssH-5/clpV	2193- 2369/303	5.82	76.84	YP_111509	(tssH-5/clpV) Clp-type ATPase chaperone protein [T6SS-1 (VF0429)] [Burkholderia pseudomallei K96243]
hcp-2	1- 519/519	100.00	75.34	NP_232418	(hcp-2) type VI secretion system substrate Hcp-2 [VAS (SS181)] [Vibrio cholerae O1 biovar El Tor str. N16961]
fha1	780- 855/1494	5.09	92.31	NP_248771	(fha1) type VI secretion system forkhead-associated protein Fha1 [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliA	1- 708/723	97.79	78.98	YP_00100672 6	(fliA) flagellar biosynthesis sigma factor [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]

	937- 1146/114			YP_00100672	
fliC	6	18.32	78.57	8	(fliC) flagellin [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
	7-			YP_00100672	
fliC	411/1146	35.34	76.79	8	(fliC) flagellin [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
	1-			YP_00100674	(fliG) flagellar motor switch protein G [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliG	993/993	100.00	80.97	2	enterocolitica 8081]
	312-			YP_00100674	(fliH) flagellar assembly protein H [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliH	716/723	55.74	75.68	3	enterocolitica 8081]
	43-				
	1307/133			YP_00100674	(fliI) flagellum-specific ATP synthase FliI [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliI	2	94.97	79.05	4	enterocolitica 8081]
	784-				
	1058/122			YP_00100674	(fliK) flagellar hook-length control protein FliK [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica
fliK	7	22.25	76.00	6	subsp. enterocolitica 8081]
	1-				
	1005/100			YP_00100674	(fliM) flagellar motor switch protein FliM [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliM	5	99.90	81.51	8	enterocolitica 8081]
	1-			YP_00100674	(fliN) flagellar motor switch protein FliN [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliN	417/417	99.28	78.42	9	enterocolitica 8081]
	8-			YP_00100675	(fliP) flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliP	686/687	98.84	78.94	1	enterocolitica 8081]
	1-			YP_00100675	(fliQ) flagellar biosynthetic protein FliQ [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp.
fliQ	270/270	100.00	75.19	2	enterocolitica 8081]
	25-				
	1075/107			YP_00100675	(flgI) flagellar P-ring protein precursor FlgI [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica
flgI	7	97.49	78.52	7	subsp. enterocolitica 8081]
	46-			YP_00100675	(flgH) flagellar L-ring protein precursor FlgH [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica
flgH	684/684	93.42	77.47	8	subsp. enterocolitica 8081]
	2-			YP_00100675	(flgG) flagellar basal-body rod protein FlgG [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica
flgG	654/654	99.85	80.55	9	subsp. enterocolitica 8081]

	895- 1260/126			YP_00100676	(flgE) flagellar hook protein FlgE [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgE	0	29.05	76.23	1	
	1-			YP_00100676	(flgC) flagellar basal-body rod protein FlgC [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgC	405/405	100.00	78.03	3	
	1-			YP_00100676	(flgB) flagellar basal-body rod protein FlgB [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgB	414/414	99.52	79.33	4	
	62-			YP_00100676	(flgM) negative regulator of flagellin synthesis [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flgM	222/258	62.40	75.78	6	
	1-			YP_00100677	(flhA) flagellar biosynthesis protein FlhA [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flhA	2079/207			0	
	9	99.66	77.28	0	
	12-			YP_00100677	(cheZ) chemotaxis regulator CheZ [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheZ	641/645	97.67	76.35	3	
	1-			YP_00100677	(cheY) chemotaxis regulatory protein CheY [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheY	390/390	100.00	78.72	4	
	1-			YP_00100677	(cheB) chemotaxis-specific methylesterase CheB [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheB	1046/105			5	
	0	99.62	77.06	5	
	7-			YP_00100677	(cheR) chemotaxis methyltransferase CheR [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheR	826/828	98.55	75.48	6	
	859-			YP_00100677	(cheD) methyl-accepting chemotaxis protein CheD [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheD	1523/167			8	
	4	39.73	75.79	8	
	1-			YP_00100677	(cheW) purine-binding chemotaxis protein CheW [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheW	470/498	94.38	79.79	9	
	838-			YP_00100678	(cheA) chemotaxis protein CheA [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
cheA	2032/205			0	
	5	58.05	78.61	0	
	10-			YP_00100678	(motB) flagellar motor protein MotB [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
motB	828/1245	65.14	75.00	1	
	1-			YP_00100678	(motA) flagellar motor protein MotA [peritrichous flagella (AI145)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
motA	888/888	100.00	78.00	2	

flhC	6- 582/582	99.14	77.99	YP_00100678 (flhC) flagellar biosynthesis transcription activator FlhC [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]
flhD	7- 360/360	97.50	78.71	YP_00100678 (flhD) flagellar transcriptional activator FlhD [Flagella (VF0394)] [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]

Tabell E.1: Resistensgener identifisert gjennom søk i databasene NCBI og CARD.

GENE	COVERAGE	%COVE RAGE	%IDENTITY	DATA BASE	ACCESSION	PRODUCT	RESISTANCE
PRØVE 2							
blaEC-5	1- 1134/1134	100.00	99.82	ncbi	NG_049085.1	cephalosporin-hydrolyzing class C beta-lactamase EC-5	CEPHALOSPORIN
blaCTX-M-15	1-876/876	100.00	100.00	ncbi	NG_048935.1	class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15	CEPHALOSPORIN
tet(B)	1- 1206/1206	100.00	100.00	ncbi	NG_048163.1	tetracycline efflux MFS transporter Tet(B)	TETRACYCLINE
erm(B)	1-738/738	100.00	99.86	ncbi	NG_047804.1	23S rRNA (adenine(2058)-N(6))-methyltransferase Erm(B)	MACROLIDE
mph(A)	1-921/921	100.00	98.71	ncbi	NG_047986.1	Mph(A) family macrolide 2'-phosphotransferase	MACROLIDE
dfrA17	1-474/474	100.00	99.79	ncbi	NG_047710.1	trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase DfrA17	TRIMETHOPRIM
mdtH	1- 1209/1209	100.00	98.02	card	U00096:1124 118-1125327	Multidrug resistance protein MdtH	MDR
mdtG	1- 1227/1227	100.00	98.37	card	CP000800.1:1 191728- 1192955	The MdtG protein also named YceE appears to be a member of the major facilitator superfamily of transporters and it has been reported when overexpressed to increase fosfomycin and deoxycholate resistances. mdtG is a member of the marA-soxS-rob regulon.	MDR
msbA	1- 1749/1749	100.00	98.06	card	U00096.3:966 621-968370	MsbA is a multidrug resistance transporter homolog from E. coli and belongs to a superfamily of transporters that contain an	MDR

						adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) which is also called a nucleotide-binding domain (NBD). MsbA is a member of the MDR-ABC transporter group by sequence homology. MsbA transports lipid A a major component of the bacterial outer cell membrane and is the only bacterial ABC transporter that is essential for cell viability.	
Escherichia coli_mdfA	1-1233/1233	100.00	96.35	card	JQ394987:1-1234	Multidrug efflux pump in E. coli. This multidrug efflux system was originally identified as the Cmr/CmlA chloramphenicol exporter.	MDR
kdpE	1-673/678	99.26	95.84	card	U00096.3:721056-721734	kdpE is a transcriptional activator that is part of the two-component system KdpD/KdpE that is studied for its regulatory role in potassium transport and has been identified as an adaptive regulator involved in the virulence and intracellular survival of pathogenic bacteria. kdpE regulates a range of virulence loci through direct promoter binding.	aminoglycoside
mdtK	1-1409/1425	98.74	75.05	card	CP014358.1:2161326-2162751	A multidrug and toxic compound extrusions (MATE) transporter conferring resistance to norfloxacin doxorubicin and acriflavine.	glycylcycline/fluoroquinolone/tetracycline/acridine_dye
ugd	1-1167/1167	100.00	97.00	card	U00096:2098447-2099614	PmrE is required for the synthesis and transfer of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) to Lipid A which allows gram-negative bacteria to resist the antimicrobial	peptide

mdtA	1- 1248/1248	100.00	95.75	card	U00096:2154 016-2155264	activity of cationic antimicrobial peptides and antibiotics such as polymyxin MdtA is the membrane fusion protein of the multidrug efflux complex mdtABC.	MDR
mdtB	1- 3123/3123	100.00	95.90	card	U00096:2155 263-2158386	MdtB is a transporter that forms a heteromultimer complex with MdtC to form a multidrug transporter. MdtBC is part of the MdtABC-ToIC efflux complex.	MDR
mdtC	1- 3078/3078	100.00	93.92	card	U00096:2158 386-2161464	MdtC is a transporter that forms a heteromultimer complex with MdtB to form a multidrug transporter. MdtBC is part of the MdtABC-ToIC efflux complex. In the absence of MdtB MdtC can form a homomultimer complex that results in a functioning efflux complex with a narrower drug specificity. mdtC corresponds to 3 loci in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (gene name: muxC/muxB) and 3 loci in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58.	MDR
baeS	1- 1404/1404	100.00	90.60	card	AP009048:21 65013- 2166417	BaeS is a sensor kinase in the BaeSR regulatory system. While it phosphorylates BaeR to increase its activity BaeS is not necessary for overexpressed BaeR to confer resistance.	MDR
baeR	1-722/723	99.86	96.68	card	AP009048.1:2 166413- 2167136	BaeR is a response regulator that promotes the expression of MdtABC and AcrD efflux complexes.	MDR
yojI	1- 1644/1644	100.00	97.93	card	U00096.3:230 6972-2308616	YojI mediates resistance to the peptide antibiotic microcin J25 when it is expressed from a multicopy vector. YojI is capable of	peptide/nitroimidazole/rif amycin/pleuromutilin/pen am/fluoroquinolone/cepha

						pumping out microcin molecules. The outer membrane protein TolC in addition to Yojl is required for export of microcin J25 out of the cell. Microcin J25 is thus the first known substrate for Yojl.	losporin/macrolide/tetracycline/acridine_dye
pmrF	1-969/969	100.00	97.73	card	U00096:2367071-2368040	PmrF is required for the synthesis and transfer of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) to Lipid A which allows gram-negative bacteria to resist the antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides and antibiotics such as polymyxin. pmrF corresponds to 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58.	peptide
acrD	1-3114/3114	100.00	98.52	card	AP009048.1:2586251-2589365	AcrD is an aminoglycoside efflux pump expressed in <i>E. coli</i> . Its expression can be induced by indole and is regulated by baeRS and cpxAR.	MDR
evgS	1-3594/3594	100.00	99.44	card	U00096:2484374-2487968	EvgS is a sensor protein that phosphorylates the regulatory protein EvgA. evgS corresponds to 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58.	MDR
evgA	1-615/615	100.00	100.00	card	BA000007.3:3212026-3212641	EvgA when phosphorylated is a positive regulator for efflux protein complexes emrKY and mdtEF. While usually phosphorylated in a EvgS dependent manner it can be phosphorylated in the absence of EvgS when overexpressed.	MDR

emrK	1-1056/1056	100.00	97.35	card	D78168:537-1593	emrK is a membrane fusion protein that is a homolog of EmrA. Together with the inner membrane transporter EmrY and the outer membrane channel TolC it mediates multidrug efflux.	MDR
emrY	1-1539/1539	100.00	97.73	card	D78168:1592-3131	emrY is a multidrug transport that moves substrates across the inner membrane of the Gram-negative E. coli. It is a homolog of emrB.	MDR
Klebsiella pneumoniae_KpnE	5-363/363	98.62	76.11	card	AP006725.1:2483890-2484253	KpnE subunit of KpnEF resembles EbrAB from E. coli. Mutation in KpnEF resulted in increased susceptibility to cefepime ceftriaxon colistin erythromycin rifampin tetracycline and streptomycin as well as enhanced sensitivity toward sodium dodecyl sulfate deoxycholate dyes benzalkonium chloride chlorhexidine and triclosan	MDR
Klebsiella pneumoniae_KpnF	6-330/330	98.48	75.39	card	AP006725.1:2484239-2484569	KpnF subunit of KpnEF resembles EbrAB from E. coli. Mutation in KpnEF resulted in increased susceptibility to cefepime ceftriaxon colistin erythromycin rifampin tetracycline and streptomycin as well as enhanced sensitivity toward sodium dodecyl sulfate deoxycholate dyes benzalkonium chloride chlorhexidine and triclosan.	MDR
tolC	1-1488/1488	100.00	100.00	card	FJ768952:1-1489	TolC is a protein subunit of many multidrug efflux complexes in Gram negative bacteria. It is an outer membrane efflux	MDR

						protein and is constitutively open. Regulation of efflux activity is often at its periplasmic entrance by other components of the efflux complex.	
bacA	1-822/822	100.00	100.00	card	U00096.3:320 3310-3204132	The bacA gene product (BacA) recycles undecaprenyl pyrophosphate during cell wall biosynthesis which confers resistance to bacitracin.	peptide
Escherichia coli_ acrA	1-1194/1194	100.00	99.16	card	U00096.3:484 426-485620	AcrA is a subunit of the AcrAB-TolC multidrug efflux system that in E. coli.	MDR
acrB	1-3150/3150	100.00	98.79	card	U00096.3:481 254-484404	Protein subunit of AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux complex. AcrB functions as a heterotrimer which forms the inner membrane component and is primarily responsible for substrate recognition and energy transduction by acting as a drug/proton antiporter.	MDR
Escherichia coli_ ampH	1-1158/1158	100.00	97.24	card	AP012030.1:3 95554-396712	AmpH is a class C ampC-like beta-lactamase and penicillin-binding protein identified in Escherichia coli.	cephalosporin/penam
gadX	1-825/825	100.00	93.82	card	AP009048.1:3 974605-3975430	GadX is an AraC-family regulator that promotes mdtEF expression to confer multidrug resistance.	MDR
gadW	1-729/729	100.00	99.73	card	CP015085.1:2 551712-2552441	GadW is an AraC-family regulator that promotes mdtEF expression to confer multidrug resistance. GadW inhibits GadX-dependent activation. GadW clearly represses gadX and in situations where GadX is missing activates gadA and gadBC.	MDR

mdtF	1-3114/3114	100.00	97.30	card	U00096:3660 414-3663528	MdtF is the multidrug inner membrane transporter for the MdtEF-ToIC efflux complex.	MDR
mdtE	1-1158/1158	100.00	98.45	card	AP009048.1:3 980026- 3981184	MdtE is the membrane fusion protein of the MdtEF multidrug efflux complex. It shares 70% sequence similarity with AcrA.	MDR
CRP	1-633/633	100.00	99.05	card	AP009048.1:4 153664- 4154297	CRP is a global regulator that represses MdtEF multidrug efflux pump expression.	MDR
Escherichia_coli_emrE	1-333/333	100.00	92.19	card	Z11877.1:486- 819	Member of the small MDR (multidrug resistance) family of transporters; in Escherichia coli this protein provides resistance against a number of positively charged compounds including ethidium bromide and erythromycin; proton-dependent secondary transporter which exchanges protons for compound translocation	tetracycline/aminocoumarin/macrolide/aminoglycoside/phenicol
eptA	1-1644/1644	100.00	91.12	card	AP009048:43 38625- 4340269	PmrC mediates the modification of Lipid A by the addition of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) and phosphoethanolamine resulting in a less negative cell membrane and decreased binding of polymyxin B.	peptide
mdtN	1-1032/1032	100.00	94.86	card	AP009048.1:4 306557- 4307589	Multidrug resistance efflux pump. Could be involved in resistance to puromycin acriflavine and tetraphenylarsonium chloride.	MDR

mdtO	1- 2052/2052	100.00	97.08	card	AP009048.1:4 304506- 4306558	Multidrug resistance efflux pump. Could be involved in resistance to puromycin acriflavine and tetraphenylarsonium chloride	MDR
mdtP	1- 1467/1467	100.00	97.68	card	AP009048.1:4 303043- 4304510	Multidrug resistance efflux pump. Could be involved in resistance to puromycin acriflavine and tetraphenylarsonium chloride	MDR
Escherichia_coli_ampC	1- 1134/1134	100.00	97.97	card	NC_000913.3: 4377811- 4378945	A class C ampC beta-lactamase (cephalosporinase) enzyme described in Escherichia coli shown clinically to confer resistance to penicillin-like and cephalosporin-class antibiotics.	cephalosporin/penam
acrS	1-663/663	100.00	98.34	card	U00096:3412 803-3413466	AcrS is a repressor of the AcrAB efflux complex and is associated with the expression of AcrEF. AcrS is believed to regulate a switch between AcrAB and AcrEF efflux.	MDR
acrE	1- 1158/1158	100.00	98.70	card	U00096:3413 864-3415022	AcrE is a membrane fusion protein similar to AcrA.	MDR
acrF	1- 3105/3105	100.00	96.55	card	U00096:3415 033-3418138	AcrF is a inner membrane transporter similar to AcrB.	MDR
cpxA	1- 1368/1374	99.56	98.61	card	BA000007.3:4 903689- 4905063	CpxA is a membrane-localized sensor kinase that is activated by envelope stress. It starts a kinase cascade that activates CpxR which promotes efflux complex expression.	MDR
H-NS	1-414/414	100.00	99.28	card	BA000007.3:1 737691- 1738105	H-NS is a histone-like protein involved in global gene regulation in Gram-negative bacteria. It is a repressor of the membrane	MDR

emrB	1-1539/1539	100.00	98.12	card	U00096:2812616-2814155	fusion protein genes <i>acrE</i> <i>mdtE</i> and <i>emrK</i> as well as nearby genes of many RND-type multidrug exporters. <i>emrB</i> is a translocase in the <i>emrB</i> -TolC efflux protein in <i>E. coli</i> . It recognizes substrates including carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone (CCCP) nalidixic acid and thioloactomycin.	MDR
emrA	1-1173/1173	100.00	98.12	card	AP009048:2810083-2811256	<i>EmrA</i> is a membrane fusion protein providing an efflux pathway with <i>EmrB</i> and TolC between the inner and outer membranes of <i>E. coli</i> a Gram-negative bacterium.	MDR
emrR	1-531/531	100.00	98.49	card	U00096.3:2810770-2811301	<i>EmrR</i> is a negative regulator for the <i>EmrAB</i> -TolC multidrug efflux pump in <i>E. coli</i> . Mutations lead to <i>EmrAB</i> -TolC overexpression.	MDR
marA	1-384/384	100.00	98.44	card	AP009048.1:1621288-1621672	In the presence of antibiotic stress <i>E. coli</i> overexpresses the global activator protein <i>MarA</i> which besides inducing MDR efflux pump <i>AcrAB</i> also down-regulates synthesis of the porin <i>OmpF</i> .	MDR
Nocardia_rifampin_resistant_beta-subunit_of_RNA_polymerase_(rpoB2)	2980-3332/3489	10.03	75.84	card	AP006618.1:4835200-4838689	Due to gene duplication the genomes of <i>Nocardia</i> species include both rifampin-sensitive beta-subunit of RNA polymerase (<i>rpoB</i>) and rifampin-resistant beta-subunit of RNA polymerase (<i>rpoB2</i>) genes with ~88% similarity between the two gene products. Expression of the <i>rpoB2</i> variant	rifamycin

AAC(6')-Ib7	1-249/980	25.41	99.60	card	Y11946.1:1-981	results in replacement of rifampin sensitivity with rifampin resistance. AAC(6')-Ib7 is a plasmid-encoded aminoglycoside acetyltransferase in <i>E. cloacae</i> and <i>C. freundii</i>	aminoglycoside
PRØVE 5							
blaFONA-5	1-888/888	100.00	99.32	ncbi	NG_049096.1	class A beta-lactamase FONA-5	beta-lactam
H-NS	1-402/414	97.10	80.85	card	BA000007.3:1737691-1738105	H-NS is a histone-like protein involved in global gene regulation in Gram-negative bacteria. It is a repressor of the membrane fusion protein genes <i>acrE</i> , <i>mdtE</i> and <i>emrK</i> as well as nearby genes of many RND-type multidrug exporters.	MDR
mdtB	28-3068/3123	97.15	76.77	card	U00096:2155263-2158386	MdtB is a transporter that forms a heteromultimer complex with MdtC to form a multidrug transporter. MdtBC is part of the MdtABC-TolC efflux complex.	MDR
acrD	1-3092/3114	99.04	75.03	card	AP009048.1:2586251-2589365	AcrD is an aminoglycoside efflux pump expressed in <i>E. coli</i> . Its expression can be induced by indole and is regulated by <i>baeRS</i> and <i>cpxAR</i> .	MDR
CRP	1-633/633	100.00	84.99	card	AP009048.1:4153664-4154297	CRP is a global regulator that represses MdtEF multidrug efflux pump expression.	MDR
macB	1547-1728/1935	9.41	75.82	card	AY768532:1-1936	MacB is an ATP-binding cassette (ABC) transporter that exports macrolides with 14- or 15- membered lactones. It forms an antibiotic efflux complex with MacA and TolC. <i>macB</i> corresponds to 1 locus in	macrolide/cephalosporin/fluoroquinolone/penam/acrifidine_dye/tetracycline/plauromutilin/rifamycin/nitroimidazole/peptide

msbA	7- 1745/1749	99.03	77.62	card	U00096.3:966 621-968370	Pseudomonas aeruginosa PAO1 and 1 locus in Pseudomonas aeruginosa LESB58. MsbA is a multidrug resistance transporter homolog from E. coli and belongs to a superfamily of transporters that contain an adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) which is also called a nucleotide-binding domain (NBD). MsbA is a member of the MDR-ABC transporter group by sequence homology. MsbA transports lipid A a major component of the bacterial outer cell membrane and is the only bacterial ABC transporter that is essential for cell viability.	peptide/rifamycin/pleuro mutilin/nitroimidazole/tetr acycline/acridine_dye/cep halosporin/macrolide/pen am/fluoroquinolone
bacA	37- 815/822	94.65	75.70	card	U00096.3:320 3310-3204132	The bacA gene product (BacA) recycles undecaprenyl pyrophosphate during cell wall biosynthesis which confers resistance to bacitracin.	peptide
mdtK	40- 1409/1425	96.14	75.25	card	CP014358.1:2 161326- 2162751	A multidrug and toxic compound extrusions (MATE) transporter conferring resistance to norfloxacin doxorubicin and acriflavine.	glycylcycline/fluoroquinolo ne/tetracycline/acridine_d ye
cpxA	1- 1367/1374	99.42	77.85	card	BA000007.3:4 903689- 4905063	CpxA is a membrane-localized sensor kinase that is activated by envelope stress. It starts a kinase cascade that activates CpxR which promotes efflux complex expression.	MDR
rosA	70- 1229/1233	93.59	76.33	card	U46859.1:242 95-25528	rosA is part of an efflux pump/potassium antiporter system (RosAB) in Yersinia that	MDR

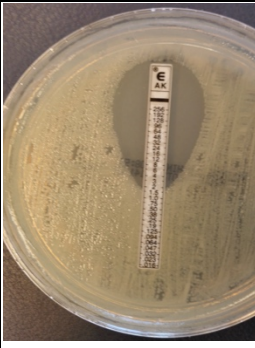
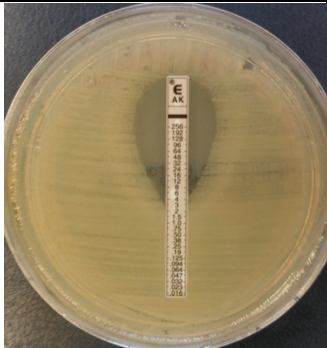

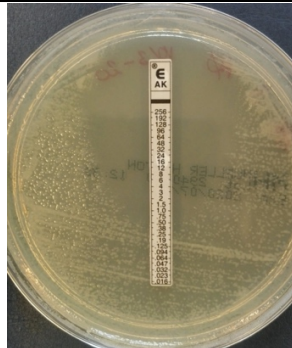
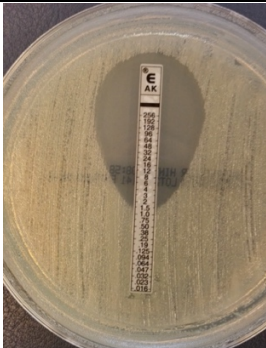
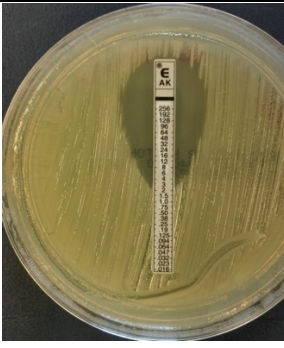
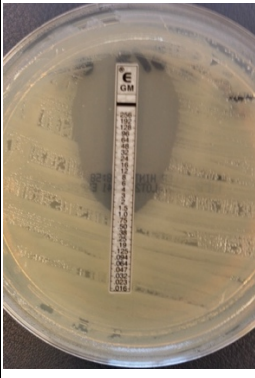
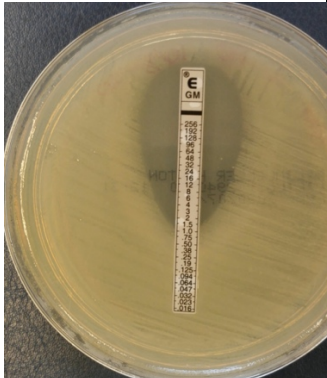
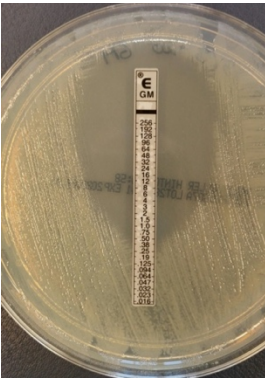
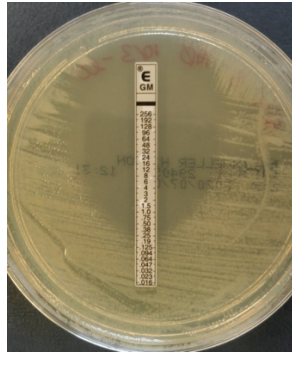
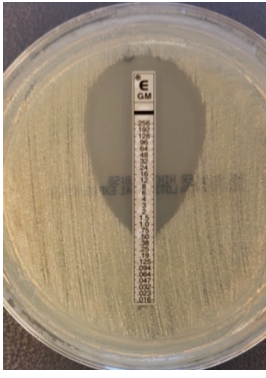
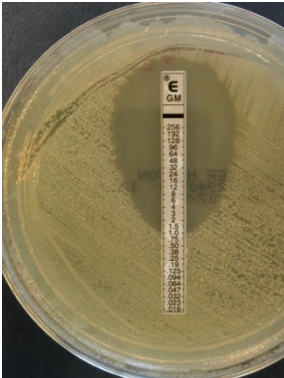
acrB	1-3150/3150	99.87	79.59	card	U00096.3:481254-484404	confers resistance to cationic antimicrobial peptides such as polymyxin B. Protein subunit of AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux complex. AcrB functions as a heterotrimer which forms the inner membrane component and is primarily responsible for substrate recognition and energy transduction by acting as a drug/proton antiporter.	MDR
Klebsiella pneumoniae_KpnH	10-1537/1539	99.16	77.25	card	ASTU01000063.1:61249-62788	KpnH consists of ~511 residues, resembles EmrB of E. coli and is probably a translocase in the KpnGH-TolC efflux protein in K. pneumoniae. Disruption of the pump components KpnG-KpnH significantly decrease resistance to azithromycin ceftazidime ciprofloxacin ertapenem erythromycin gentamicin imipenem ticarcillin norfloxacin polymyxin-B piperacillin spectinomycin tobramycin and streptomycin.	MDR
emrR	1-498/531	93.41	76.20	card	U00096.3:2810770-2811301	EmrR is a negative regulator for the EmrAB-TolC multidrug efflux pump in E. coli. Mutations lead to EmrAB-TolC overexpression.	MDR

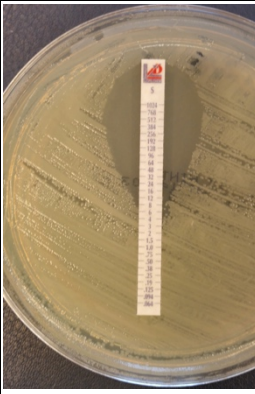
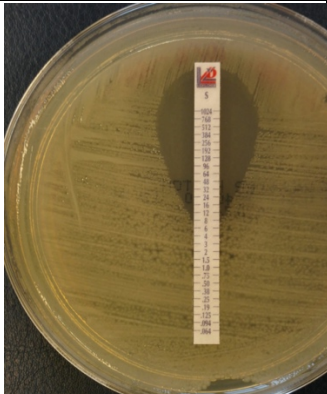
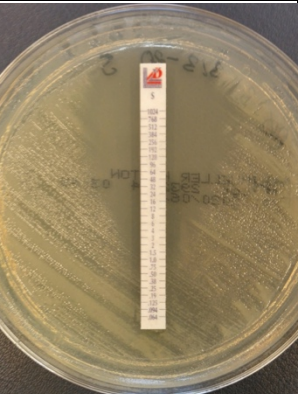
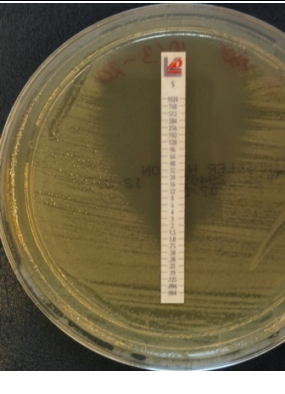
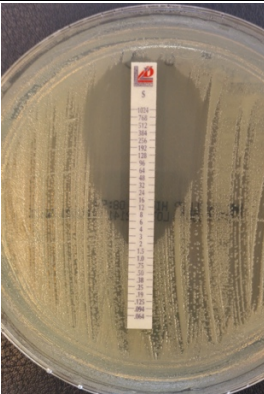
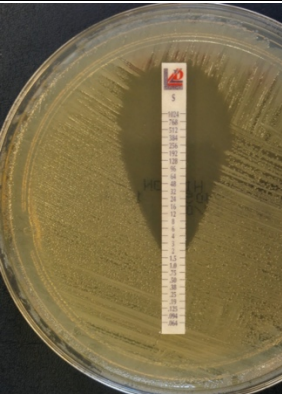
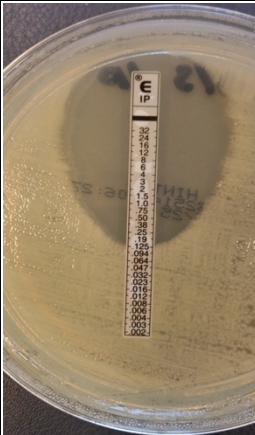
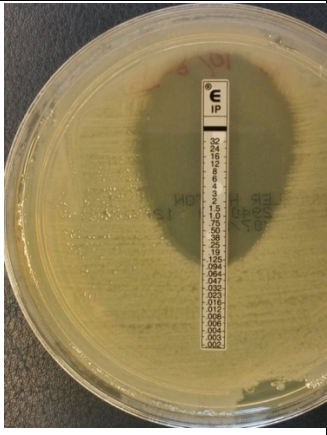
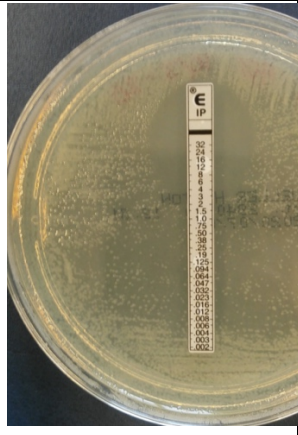

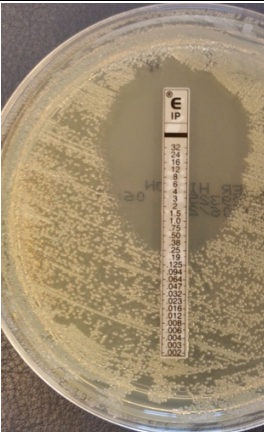
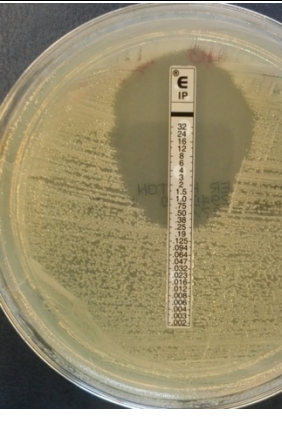
Tabell E.2: Mutasjoner i *gyrA*, *parC* og *parE* funnet i *E. coli*-stammen fra prøve 2 med verktøyet ResFinder gjennom NCBI.

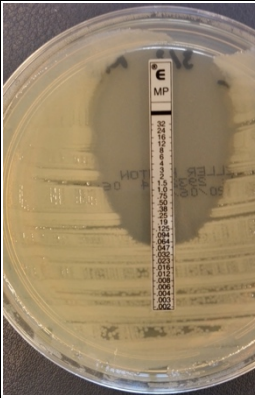
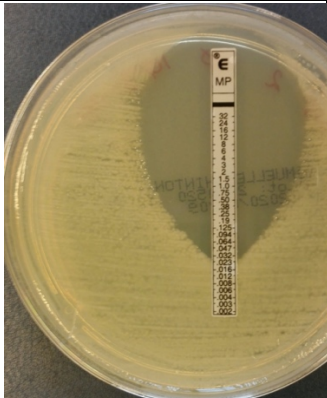
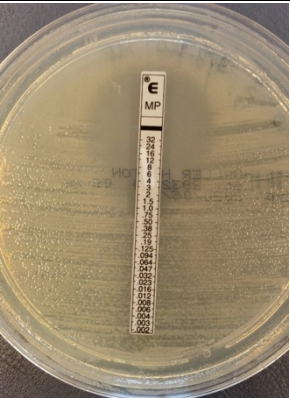
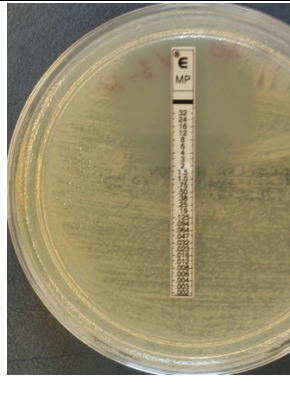
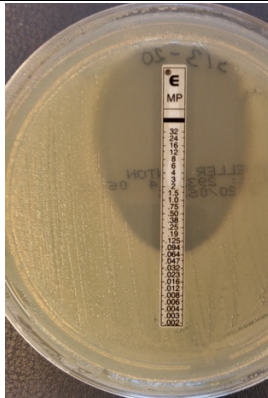
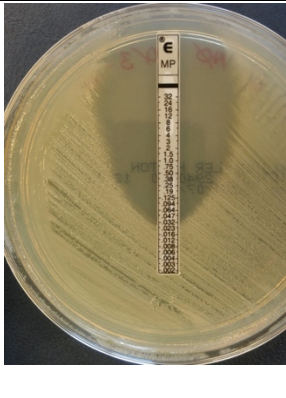
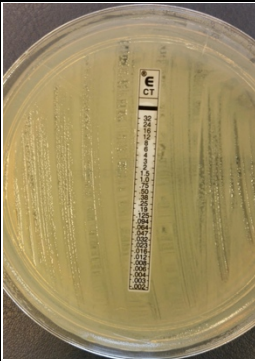
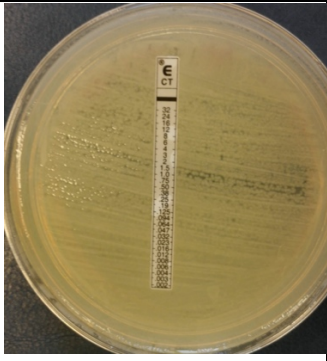
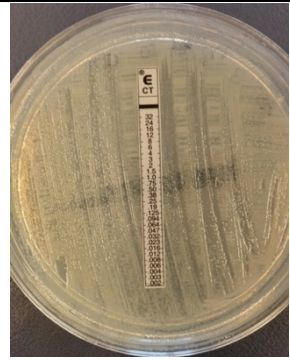
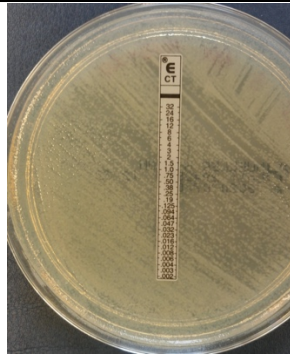
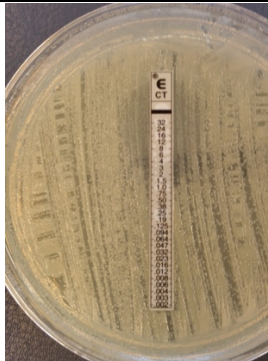
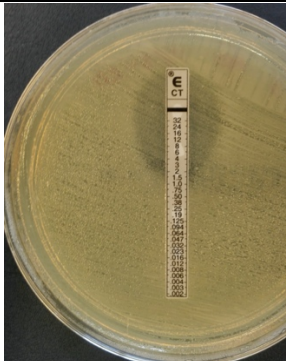
gyrA				
Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	Resistance	PMID
gyrA p.S83L	TCG → TTG	S → L	Nalidixic acid,Ciprofloxacin	8891148
gyrA p.D87N	GAC → AAC	D → N	Nalidixic acid,Ciprofloxacin	12654733
parE				
Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	Resistance	PMID
parE p.L416F	CTT → TTT	L → F	Nalidixic acid,Ciprofloxacin	14510643
parC				
Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	Resistance	PMID
parC p.S80I	AGC → ATC	S → I	Nalidixic acid,Ciprofloxacin	8851598

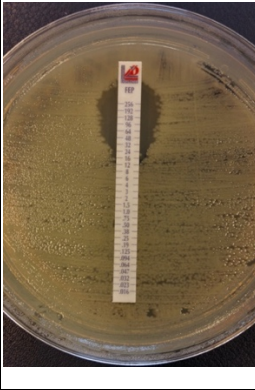
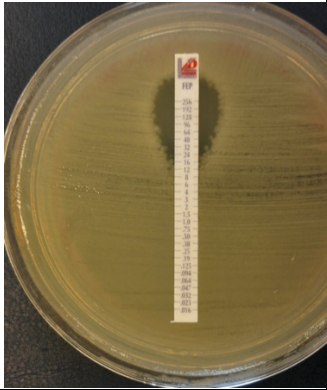
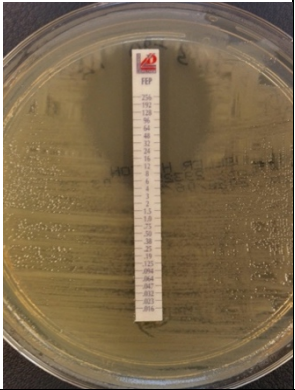
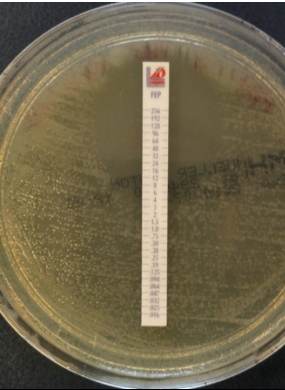
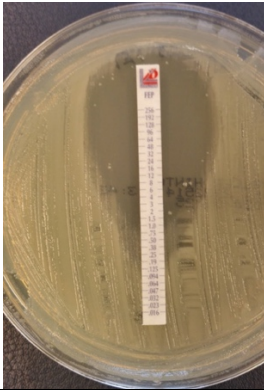
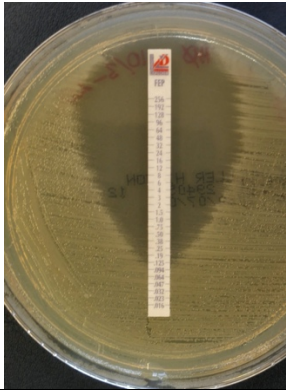
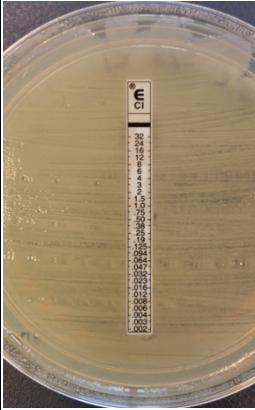
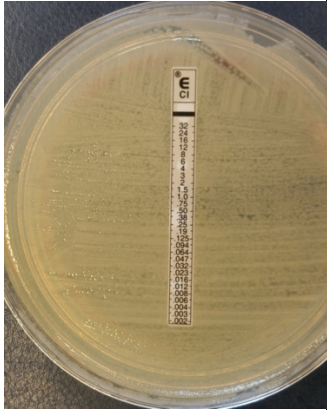
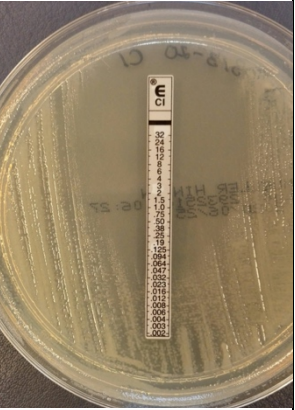

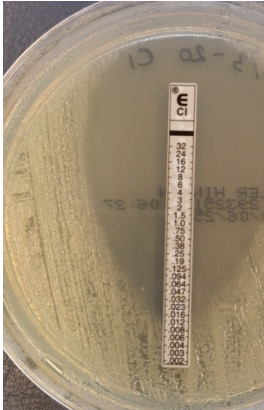
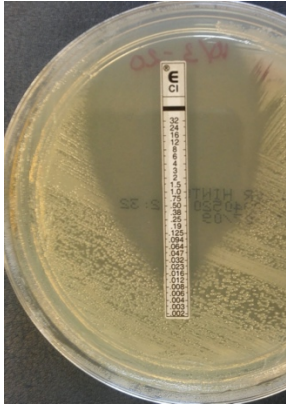
VEDLEGG E

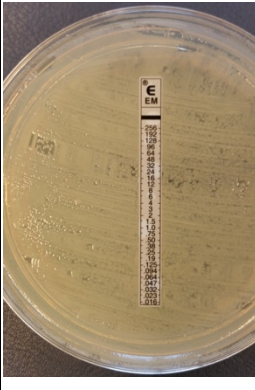
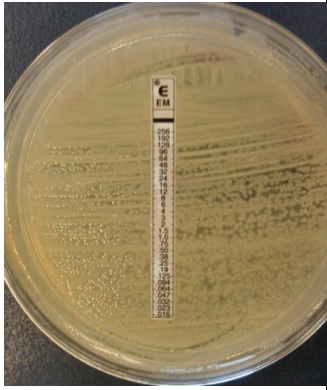
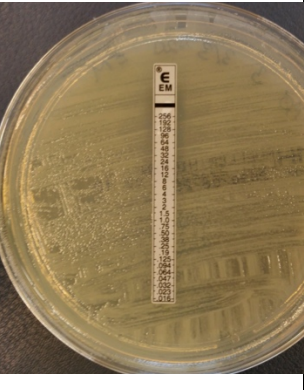
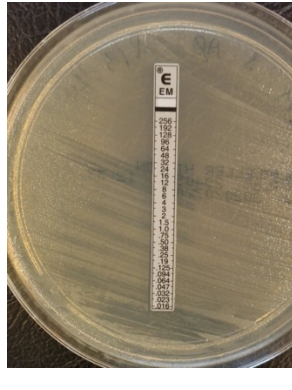
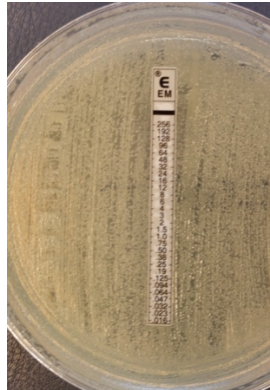
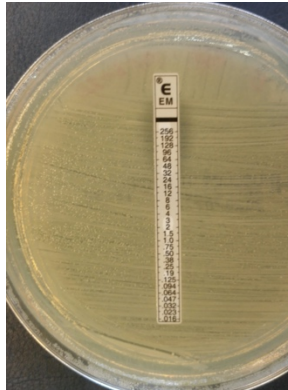
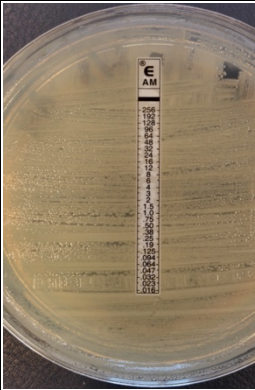
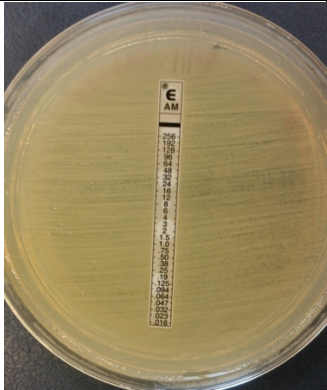
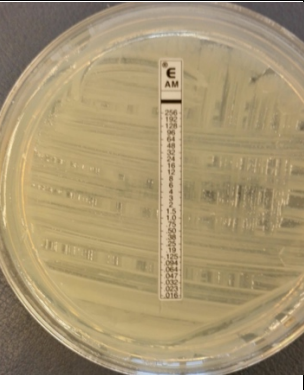
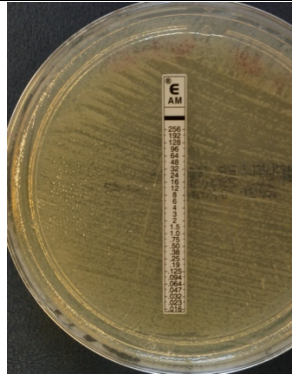
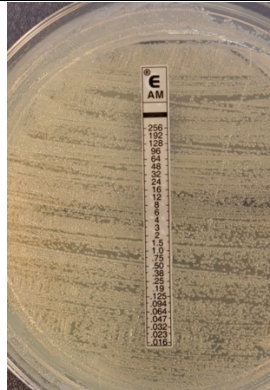
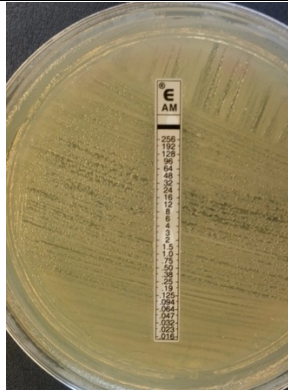
Tabell E.1: Resultater fra hver to runder av AST av prøve 2, 3 og 5. Viser bilder av skålene med antibiotika-strips og avlest MIC-verdi for hver runde, samt beregnet gjennomsnittlig MIC-verdi.

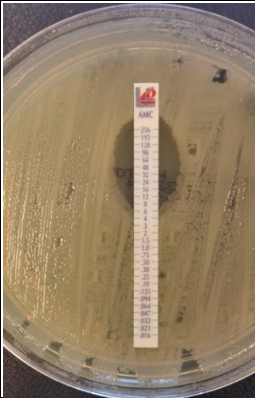
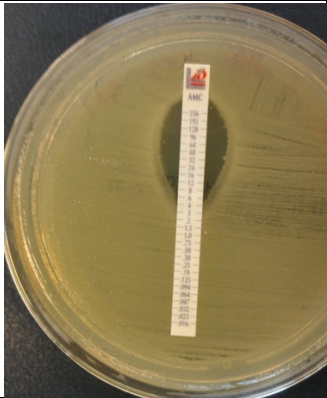
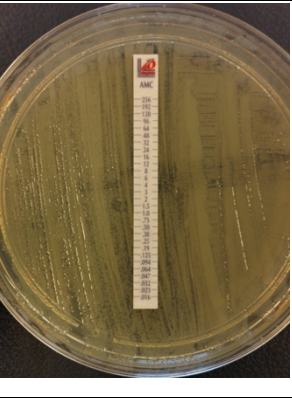
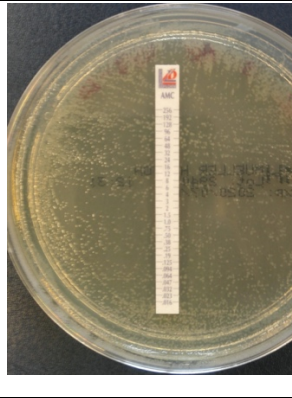
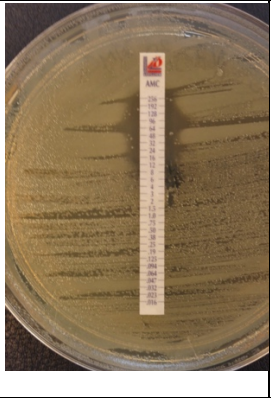
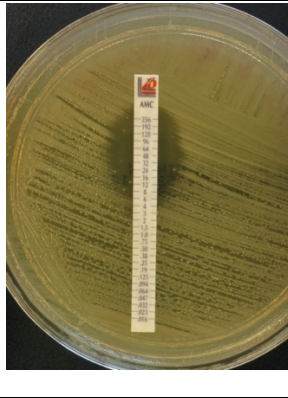
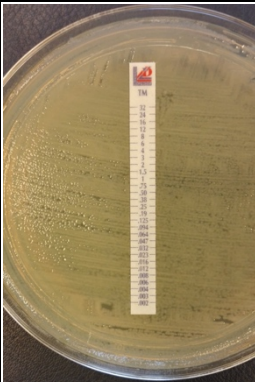
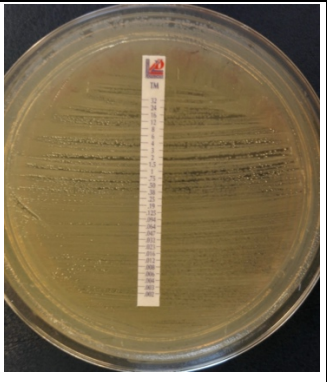
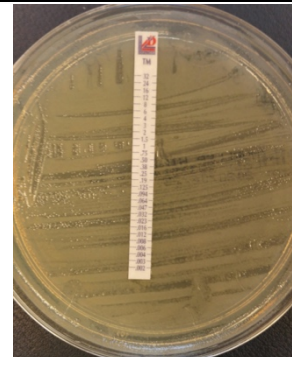
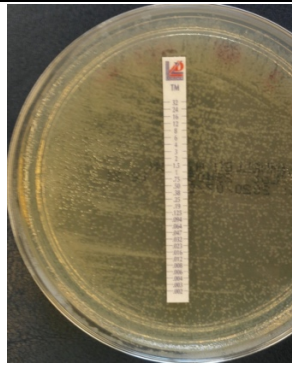
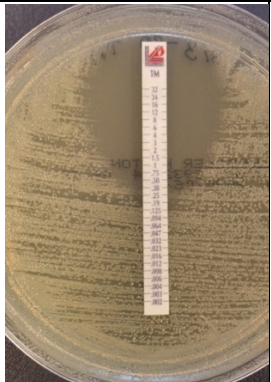
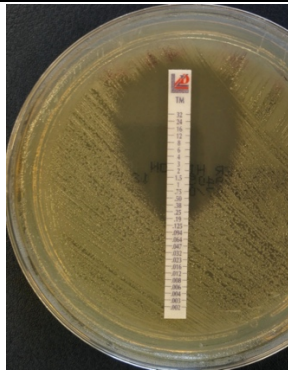
	Prøve 2		Prøve 3		Prøve 5	
	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2	Runde 1	Runde 2
Amikacin (AK)						
MIC-verdi	2	3 Gjennomsnitt: 2,5	0,75	0,5 Gjennomsnitt: 0,625	2	2 Gjennomsnitt: 2
Gentamicin (GM)						

MIC-verdi	1,0	1,0 Gjennomsnitt: 1,0	0,38	0,19 Gjennomsnitt: 0,285	0,75	1,0 Gjennomsnitt: 0,875
Streptomycin (S)						
MIC-verdi	8	8 Gjennomsnitt: 8	1,5	1,0 Gjennomsnitt: 1,25	2	2 Gjennomsnitt: 2
Imipenem (IP)						
MIC-verdi	0,125	0,094 Gjennomsnitt: 0,12	1,5	1,5 Gjennomsnitt: 1,5	0,19	0,25 Gjennomsnitt: 0,22

Meropenem (MP)						
MIC-verdi	0,047	0,023 Gjennomsnitt: 0,035	1,5	1,0 Gjennomsnitt: 1,25	0,094	0,032 Gjennomsnitt: 0,063
Cefotaxim (CT)						
MIC-verdi	≥ 32	≥ 32 Gjennomsnitt: ≥ 32	≥ 32	≥ 32 Gjennomsnitt: ≥ 32	0,5	1,5 Gjennomsnitt: 1,0

Cefepime (FEP)						
MIC-verdi	16	16 Gjennomsnitt: 16	4	3 Gjennomsnitt: 3,5	0,19	0,125 Gjennomsnitt: 0,158
Ciprofloxacin (CI)						
MIC-verdi	≥ 32	≥ 32 Gjennomsnitt: ≥ 32	0,032	0,032 Gjennomsnitt: 0,032	0,016	0,012 Gjennomsnitt: 0,014

Erytromycin (EM)						
MIC-verdi	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256
Ampicillin (AM)						
MIC-verdi	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256

Amoxicillin med klavulansyre (AMC)						
MIC-verdi	6	4 Gjennomsnitt: 5	≥ 256	≥ 256 Gjennomsnitt: ≥ 256	3	4 Gjennomsnitt: 3,5
Trimetoprim (TM)						
MIC-verdi	≥ 32	≥ 32 Gjennomsnitt: ≥ 32	≥ 32	≥ 32 Gjennomsnitt: ≥ 32	0,19	0,125 Gjennomsnitt: 0,158



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway