



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2022 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Identifisering av resistensspredende bakterier i miljøet ved hjelp av kvalitative og kvantitative metoder

Identification of resistancespreading bacteria in the environment using qualitative and quantitative methods

Kaja Moen

Matvitenskap og ernæring

FORORD

Denne oppgaven utgjør 60 studiepoeng og ble skrevet som et avsluttende prosjekt ved mastergradsstudiet i matvitenskap og ernæring ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Prosjektet har vært både tungt og krevende. Til tross for dette er temaet svært spennende og dagsaktuelt noe som har gjort det til et givende prosjekt.

I løpet av prosjektet har jeg fått god støtte og veiledning på lab og under skriveprosessen. Jeg vil særlig takke veilederen min, professor Bjørn-Arne Lindstedt. Han har støttet meg gjennom hele prosjektet gjennom god veiledning, svart på spørsmål og gjort rettelser på oppgaven. Jeg vil også takke Ahmed Abdelghani for god veiledning på laben, og Misti Dawn Finton for faglig støtte og hjelp med helgenomsekvensering.

I tillegg vil jeg takke en familievenn for hjelp med rettskriving og mine foreldre for hjelp med boring av hull i isen ved vannprøvetaking og god støtte underveis.

Ås, 15 august, 2022

Kaja Moen

ABSTRAKT

Antibiotikaresistens har blitt en av de store helseutfordringene som verden står ovenfor. Stadig økende utvikling av resistente- samt multiresistente bakterier har medført økt behandlingssvikt. På grunn av denne negative utviklingen er det viktig med riktig og kritisk bruk av antibiotika, i tillegg til å kartlegge resistensutviklingen hos bakterier for å kunne gjøre konkrete tiltak for å motvirke denne spredningen (Nord-Norge, 2018). Formålet med denne masteroppgaven var å få kartlagt hvilke resistente bakterier som finnes i miljøet i Norge, identifisere tilstedeværelse av resistente gener og grad av resistens mot de klinisk viktigste antibiotikaene på markedet.

For å kunne kartlegge hvilke resistente bakterier som finnes i Norge ble det tatt opp vannprøver fra fire innsjøer sørøst i Norge, fra tre årstider. Vannprøvene ble filtrert og dyrket opp på ESBL- og CRE-agarskåler, for å dyrke fram bakterier med resistens mot de klinisk viktigste antibiotikaene fra antibiotikagruppen β -laktam. Bakteriekoloniene ble identifisert ved amplifisering og sekvensering av 16S-genet. De identifiserte bakteriene ble testet for ESBL-gener, ved PCR og elektroforering. Videre ble de MIC-testet for grad av resistens mot de klinisk viktige antibiotikagruppene β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Ut ifra resultatene fra 16S- og MIC-verdiene ble prøvene S9, H8 og V6 til slutt helgenomsekvensert, for identifisering av resistente gener av klinisk relevans.

Ved 16S-sekvenseringen ble bakterieslektene *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium*, *Klebsiella* og *Brucella* identifisert. Flere av disse bakterieslektene var assosiert med humanpatogene arter. Ingen av bakterieprøvene fikk identifisert ESBL-gener ved PCR, men alle bakterieprøvene viste en begynnende resistensutvikling mot antibiotikagruppene β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Bakterieprøvene viste også full resistens mot førstegenerasjon av penicillin og makrolider. Prøvene H8 og V6 ble ut ifra MIC-verdiene betegnet som multiresistente. Prøvene S9, H8 og V6 fikk identifisert en rekke resistensgener av klinisk relevans ved helgenomsekvensering, inkludert resistensgener kodet på kromosomet og MGE. I tillegg ble en rekke multiefflukspumper identifisert. I prøve S9 ble blant annet det lignende klinisk relaterte ESBL-genet *blaACT-4* identifisert, og det gjør prøve S9 til en multiresistent bakterie. I tillegg til de antibiotikaresistente genene ble en rekke tungmetallresistente gener identifisert. Disse er relatert til økt spredning av resistente gener på MGE.

Man kan konkludere med at det finnes miljøbakterier i Norge med resistens mot de klinisk viktigste antibiotikagruppene, i tillegg til en rekke resistensgener som kan medføre økt resistens samt spredning av resistens i miljøet.

ABSTRACT

Antibiotic resistance has become one of the major health challenges the world are facing. The increasing development of resistant and multi-resistant bacteria has led to increased treatment failure. Due to this negative development, it is important to use antibiotics correctly and critically, in addition to mapping the development of resistance in bacteria in order to be able to take concrete measures to counteract this spread (Nord-Norge, 2018). The purpose of this master's thesis was to map which resistant bacteria are found in the environment in Norway, to identify the presence of resistant genes and the degree of resistance to the most clinically important antibiotics on the market.

In order to map which resistant bacteria are found in Norway, water samples were taken from four lakes in south-east Norway, from three seasons. The water samples were filtered and grown on ESBL and CRE agar plates, in order to grow bacteria with resistance to the clinically most important antibiotics from the β -lactam antibiotic group. The bacterial colonies were identified by amplification and sequencing of the 16S gene. The identified bacteria were tested for ESBL genes, by PCR and electrophoresis. Furthermore, they were MIC tested for the degree of resistance to the clinically important antibiotic groups β -lactam, quinolones, macrolides and tetracyclines. Based on the results from the 16S and MIC values, the samples S9, H8 and V6 were finally whole genome sequenced, for the identification of resistant genes of clinical relevance.

The 16S sequencing identified the bacterial genera *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium*, *Klebsiella* and *Brucella*. Several of these bacterial genera were associated with human pathogenic species. None of the bacterial samples had ESBL genes identified by PCR, but all the bacterial samples showed an initial development of resistance to the antibiotic groups β -lactam, quinolones, macrolides and tetracyclines. The bacterial samples also showed full resistance to first-generation penicillin and macrolides. Based on the MIC values, the samples H8 and V6 were designated as multiresistant. Samples S9, H8 and V6 had a number of resistance genes of clinical relevance identified by whole genome sequencing, including resistance genes encoded on the chromosome and MGE. In addition, a number of multiefflux pumps were identified. In sample S9, among other things, the similarly clinically related ESBL gene *blaACT-4* was identified, and this makes sample S9 a multiresistant bacterium. In addition to the antibiotic-resistant genes, a number of heavy metal-resistant genes were identified. These are related to increased spread of resistant genes on MGE.

One can conclude that there are environmental bacteria in Norway with resistance to the clinically most important groups of antibiotics, in addition to a number of resistance genes that can lead to increased resistance and the spread of resistance in the environment.

FORKORTELSER

HGT	Horisontal genoverføring
MGE	Mobile genetiske elementer
MDR	Multimedikamentresistens
PTC	Peptidyltransferasesenteret
NPET	Nascent peptide exit tunnel
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
tRNA	Transfer ribonukleinsyre
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
RND	Motstand-nodulasjonsdeling
RPP	Ribosomale beskyttelsesproteiner
MFS	Stor tilrettelegger superfamilie
ABC	ATP-bindende kassett
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
RND	Reistens-nodulation-divisjon
SMR	Liten multidrug resistens
MPH	Makrolidfosfotransferaser
PBP	Pencillinbindende proteiner
CPE	Karbapenemase-produserende Enterobacteriaceae
ESBL	Utvidet spektrum β -laktamase
XDR	Ekstensiv medikamentresistens
PDR	Pandrug resistens
SMR	Den lille multimedikamentresistentens superfamilien
PMQR	Plasmidmediert kinolonresistent

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Abstract	II
Sammendrag	III
Forkortelser	I
1.0 Innledning	11
2.0 Bakgrunnsteori	11
2.1 Antibiotika.....	11
2.1.1 Antibiotikamekanismer	11
2.1.1.1 β -Laktam	12
2.1.1.2 Kinoloner.....	15
2.1.1.3 Makrolider	17
2.1.1.4 Tetrasykliner.....	19
2.2 Antibiotika resistens	20
2.2.1 Grunnlaget for utvikling og spredning av antibiotikaresistens.....	20
2.2.2 Antibiotika resistens mekanismer.....	23
2.2.3 Resistensmekanismer hos de ulike antibiotikaklassene.....	23
2.2.1.1 β -Laktam	23
2.2.1.2 Kinoloner.....	25
2.2.1.3 Makrolider	25
2.2.1.4 Tetracyclines	27
2.3 Miljø og tungmetaller.....	28
4.0 Material og metoder	29
4.1 Flytskjema	29
4.2 Uttak av vannprøver	29
4.3 Filtrering og oppdyrking av vannprøver på agarskåler med antibiotikum	35
4.4 Nedfrysing av AR-bakterier og isolering av DNA.....	36
4.5 Kvantifisering og kvalitetssikring av isolert DNA	37
4.5.1 Qubit Fluorometer	37
4.5.2 Nanodrop	38

4.6 Identifisere bakterieisolater	38
4.6.1 PCR av 16S rRNA sekvens	38
4.6.2 16S PCR produkt rensing og sekvensering	40
4.7.3 16S-data-analysing	40
4.7 Identifisering av ESBL-gener.....	41
4.7.1 Multipleks og Singelpleks PCR.....	41
4.8 Elektroforering og UV analyse av 16S og ESBL-gener.....	44
4.9 Antimikrobiell sensitivitetstesting.....	46
4.10 Helgenomsekvensering	47
5.0 Resultater	48
5.1 Fenotypisk	48
5.2 Kvantifisering og kvalitetsikring	52
5.3 16S sekvensering.....	53
5.4 Multi- og singelpleks av ESBL gener	55
5.5 MIC	57
5.6 Helgenomsekvensering	61
6.0 Diskusjon	66
6.1 Fenotype	66
6.2 16S.....	70
6.3 ESBL-gener	73
6.4 MIC	75
6.5 Helgenomsekvensering	79
6.5.1 β -laktamresistensdeterminanter	79
6.5.2 Kinolonresistensdeterminanter	82
6.5.3 Makrolidresistensdeterminanter	85
6.5.4 Tetrasyklinresistensdeterminanter	86
6.5.5 Efflux resistensgener	87
6.5.6 Tungmetallresistente gener.....	90
7.0 Konklusjon	91
8.0 Referanseliste	93
9.0 Vedlegg	104
Vedlegg 1. 16 S.....	104
1.1 Singelpleks PCR av 16S rRNA genet	104
1.2 Qubit av 16S rRNA genet	105
1.3 BLAST av 16S rRNA genet.....	106
Vedlegg 2. Multi og singelpleks PCR.....	112

2.1 Multipleks PCR	112
2.2 Singelpeks PCR.....	114
Vedlegg 3. MIC.....	114
Vedlegg 4 Helgenomsekvensering.....	117
4.1 Qubit.....	117
4.2 Resistens- og virulensgener.....	117

1.0 Innledning

Antibiotikaresistens har blitt en av de store helseutfordringene som verden står ovenfor. Stadig økende utvikling av resistente samt multiresistente bakterier har medført behandlingssvikt med antibiotika som før har hatt en god medisinsk effekt. Denne utviklingen kan kaste oss mennesker tilbake til tiden før antibiotika fantes hvor enkle infeksjoner kunne være livstruende. Moderne medisin som kirurgisk inngrep, kreftbehandling og transplantasjoner, vil med det bli vanskelig å benytte uten fare for liv og helse (Helsenorge, 2022). På grunn av denne negative utviklingen må vi mennesker finne metoder for å hindre videre utvikling samt spredningen av resistente bakterier (Nord-Norge, 2018). Ettersom dette er et verdensomspennende problem, må hvert enkelt land gjøre konkrete tiltak. Norge, sammenlignet med de fleste andre land, har en gunstig situasjon i forhold til den fremvoksende resistensutviklingen (Otterholt, 2022). Til tross for dette vil denne situasjonen kunne endres med blant annet økt bruk av antibiotika, økt reiseliv og import av matvarer fra land med dårligere antibiotikakontroll. Til sammen vil dette kunne medføre økende spredning av resistente bakterier i alle deler av samfunnet og hvor blant annet miljøet er ansett som et stort reservoar for resistente bakterier. Konkrete tiltak for å forhindre denne utviklingen er derfor viktig. Kartlegging av resistente bakterier samt resistente gener i de ulike delene av samfunnet kan her bidra til utvikling av disse tiltakene (Nord-Norge, 2018).

Formålet med denne masteroppgaven var å få kartlagt hvilke resistente bakterier som finnes i miljøet i Norge, identifisere tilstedeværelse av resistente gener og grad av resistens mot de klinisk viktigste antibiotikaene på markedet. Dette studie kan med det bidra til å få en bredere oversikt og forståelse over dagens situasjon i Norge.

2.0 Bakgrunnsteori

2.1 Antibiotika

2.1.1 Antibiotikamekanismer

Antibiotika defineres som et antimikrobielt legemiddel som benyttes til å behandle bakterielle infeksjoner hos både mennesker og dyr (Vase, 2013). Legemiddelet stammer opprinnelig fra mikroorganismenes naturlige forsvarmekanismer for best mulig å kunne vokse og formere seg under krevende vekstforhold. På jorden utgjør bakterier og andre mikroorganismer den største andelen av biomasse (Vogt, 2016). På grunn av sin mangfoldige utbredelse fører dette til kamp om plassene og næringsstoffene i ulike miljøer på jorden (Vase, 2013). For at

mikroorganismene skal kunne vokse og formere seg i slike områder, har noen av disse utviklet ulike forsvarsmekanismer. Disse forsvarsmekanismene omhandler å vokse og formere seg i et raskt tempo, i tillegg til å kunne drepe eller hemme veksten på de konkurrerende mikroorganismene rundt, blant annet ved bruk av antibiotika. Når mikroorganismene rundt har dødd eller blitt hemmet, vil de få nok plass og næring til å vokse og formere seg videre.

Den sistnevnte forsvarsmekanismen er grunnkonseptet til dagens antibiotikum som blir benyttet i humanmedisin og veterinærmedisin (UiO, 2011; Vase, 2013). Der benytter man de bakteriedrepende eller de bakteriehemmende mekanismene fra hovedsakelig bakterier og sopp til å behandle bakterielle infeksjoner (Vase, 2013). Ved bruk av de bakteriedrepende mekanismene vil disse mikroorganismene kunne ødelegge grunnstrukturen til bakteriecellene. De vil med det angripe og ødelegge celleveggen og cellemembranen til bakteriene. Det medfører at bakteriecellene sprekker (lyseres) og dør (UiO, 2019; Vase, 2013). Ved bruk av de bakteriehemmende mekanismene vil derimot mikroorganismene ikke direkte drepe bakteriene, men forhindre at bakteriecellene vokser og formerer seg sånn at kroppens indre immunforsvar til slutt enkelt kan bryte dem ned (Vase, 2013). Denne mekanismen kan igjen deles inn i to ulike mekanismer. Den ene påvirker bakteriecellens vekst, og den andre påvirker bakteriecellens celledeling. Ved cellevekst kan blant annet dannelse av viktige proteiner bli hemmet, og ved celledeling kan blant annet kopiering av cellens DNA hemmes.

Ut ifra disse virkningsmekanismene til de ulike antibiotikaene blir de ulike antibiotikaene på markedet klassifisert (Kapoor et al., 2017). Virkningsmekanismene deles inn i tre hovedkategorier ut ifra hvor antibiotikaene angriper bakterien. Disse hovedkategoriene består av, celleveggsyntesen, proteinsyntesen og nukleinsyresyntese. I denne oppgaven vil det bli lagt vekt på antibiotikaene β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner som inngår under disse hovedkategoriene.

2.1.1.1 β -Laktam

β -laktam utgjør en gruppe antibiotika som benyttes til å drepe en rekke bakterier ved å hemme celleveggsyntesen (Kapoor et al., 2017; Liabø, 2021). I 1929 ble det første antibiotikumet, penicillin, oppdaget av Alexander Fleming (Øye, 2020). Dette var en revolusjonerende oppdagelse av et β -laktam antimikrobielt middel som gjorde det mulig å behandle bakterielle infeksjoner (Tooke et al., 2019). I senere tid har det blitt utviklet fire kliniske hovedklasser av

β -laktam med fokus på en forbedret aktivitet, sikkerhet og motvirkning av resistens. Disse består av penicilliner, cefalosporiner, monobaktamener og karbapenemer. Felles for disse β -laktamene er den kjemiske grunnstrukturen bestående av en fireleddet betalaktamring, mens sidegruppene til de fire hovedklassene har en varierende struktur (Palzkill, 2013; Tooke et al., 2019; Zeng & Lin, 2013). Penicilliner og cefalosporiner har lignende sidegrupper, hvor penicilliners kjemiske grunnstruktur er koblet til en femledds ring som utgjør en tiazolidinring, mens cefalosporiner er tilkoblet en seksledds ring bestående av dihydrothiazin (Palzkill, 2013; Tooke et al., 2019). Begge ringene har tilkoblet en karkosylgruppe i posisjon C-3 i penicilliner og C-4 i cefalosporiner (Palzkill, 2013). Begge har bredspektrert aktivitet mot både grampositive og gramnegative bakterier (Palzkill, 2013). I motsetning til penicilliner og cefalosporiner består ikke sidegruppen til monobaktamener av en syklisk forbindelse, men kun en sulfonsyre (Palzkill, 2013; Uggerud, 2018). Dette gjør at klassen bare er aktiv mot aerobe gramnegative bakterier (Palzkill, 2013). Den siste klassen er karbapenemer som består av en femleddet pyrrolin sidegruppe (Tooke et al., 2019). Denne sidegruppen gjør karbapenem til den mest potente klassen av β -laktam på grunn av sin bredspektrerte aktivitet mot grampositive og gramnegative bakterier, i tillegg til sin resistens mot en rekke β -laktamaser som kan inaktivere β -laktammedikamentene (Palzkill, 2013). På grunn av disse egenskapene blir denne klassen benyttet til å behandle en rekke multiresistente infeksjoner, og det er gunstig mot en global økende resistensutvikling. I tillegg til karbapenemenes gunstige egenskaper, har de tre andre klassene også gode antibakterielle effekter som gjør β -laktam til det mest benyttede antimikrobielle middelet på markedet, også i Norge (Tooke et al., 2019).

Bakteriers innhold (cytoplasma) omslutes av en eller flere cellemembraner som avskiller det fra det ytre miljøet rundt cellen (Gregers, 2021a). I tillegg til å danne en fysisk barriere mellom det intracellulære og ekstracellulære miljøet rundt cellen, kontrollerer disse alt som fraktes inn og ut av cellen og bidrar til kommunikasjon med andre celler og miljøet rundt. Celleveggen ligger mellom den cytoplasmatiske membranen og den ytre membranen hos gramnegative bakterier, eller på utsiden av den cytoplasmatiske membranen retning det ekstracellulære miljøet hos grampositive bakterier (Radkov et al., 2018). På grunn av den semipermeable cellemembranen som er gjennomtrengelig for hovedsakelig vannmolekyler og ikke gjennomtrengelig for større molekyler som for eksempel sukker, proteiner og salter, kan vannet fritt strømme inn og ut av cellen mens de store molekylene må aktivt transporteres inn i cellene (Kierulf, 2022). Ved opptak av disse store molekylene (næringsstoffene) og et varierende ytre miljø, vil konsentrasjonene mellom det intracellulære og ekstracellulære

miljøet i og rundt cellen variere (Anon, 2021). For å utligne denne konsentrasjonsforskjellen vil vannet forskyve seg inn eller ut av cellen (Kierulf, 2022). Dette medfører et osmotisk trykk inne i cellen. Celleveggen som utgjør en halvstiv struktur styrker opp, og den svake cellemembranen motstår det osmotiske trykket inni cellen (Anon, 2021; Bøhle, 2019). Dermed motvirker celleveggen cellen fra å lysere på grunn av det osmotiske trykket (Anon, 2022). Denne halvstive strukturen bestående av et tett sammensveiset polysakkaridkompleks, peptidoglykan, utgjør selve celleveggen (Anon, 2022). Disse er bygget opp av identiske peptidoglykanmonomer bestående av to glukosederivater N-acetylglukosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM). Glukosederivatet NAM er tilkoblet et pentapeptid bestående av aminosyrene L-alanin, D-glutamin, L-lysin eller meso -diaminopimelinsyre og to D-alanin (Anon, 2021; Anon, 2022). Ved celleveggsyntese av et peptidoglykan blir peptidoglykanmonomerne først syntetisert i cytosolen, videre blir de fraktet over den indre cellermembranen og koblet til et transglykosidaseenzym ved hjelp av et baktoprenol (Anon, 2022). Før peptidoglykanmonomerne kan koble seg til det voksende peptidoglykankomplekset blir deler av peptidoglykanet brutt ned til enkle peptidoglykanmonomerer av autolysiner.

De nysyntetiserte peptidoglykanmonomerene sammen med de gamle monomerene kan så koble seg til det åpne peptidoglykanet. Transglykosidaseenzymene binder disse monomerene til peptidoglykanet hvor det dannes lange tråder av peptidoglykanmonomerer. Trådene blir så koblet sammen ved hjelp av transpeptidaseenzymene til en stabil gitterstruktur via peptidkryssbinding som dannes mellom pentapeptidene i peptidoglykanmonomerene (Anon, 2021; Anon, 2022). I dette siste trinnet av celleveggsyntesen gjenkjenner enzymet aminosyrene D-alanin-D-alanin som danner en alanindimer på enden av pentapeptidet (Sawa et al., 2020). Transpeptidaseenzymet igangsetter samt katalyserer så dannelse av en peptidkryssbinding ved interaksjon mellom den aktive serinresten på enzymet og en karboksylgruppe på den nest ytterste D-alaninet etter at det ytterste D-alaninet har blitt hydrolytisk spaltet av (Lee et al., 2001; Palzkill, 2013; Sawa et al., 2020). Interaksjonen mellom transpeptidaseenzymet og D-alanin, medfører dannelse av et acyl-enzym intermediat som via en esterforbindelse danner en peptidkryssbinding med en aminosyre (L-lysin eller meso-diaminopimelinsyre) på det parallelle pentapeptidet (Lee et al., 2001; Ystenes, 2021). Under denne siste delen av celleveggsyntesen vil antibiotikumet β -laktam kunne binde seg til transpeptidaseenzymene også benevnt som pencillinbindende proteiner (PBP). Det forhindrer dannelse av peptidkryssbinding som medfører en svak cellevegg som ikke vil kunne motstå

det varierende osmotiske trykket inni cellen, og det vil igjen medføre lyserin av cellen (Palzkill, 2013). Denne mulige interaksjonen mellom β -laktam og PBP skyldes fireleddsringen til β -laktam. Fireledds ringen β -laktam har en strukturell likhet med den terminale alanin-dimeren på pentapeptidet som stikker ut av NAM fra peptidoglykanmonomeren (Palzkill, 2013; Sawa et al., 2020). På grunn av denne likheten vil PBP ikke kunne skille mellom β -laktam og pentapeptidet, og det medfører at PBP kan binde seg til β -laktam og blokkere for dannelse av peptidkryssbindingen (Sawa et al., 2020).

2.1.1.2 Kinoloner

Denne antibiotikagruppen forårsaker celledød hos bakterier ved å integrere og hemme type II topoisomerasers (gyrase og topoisomerase IV) sin funksjon til å fjerne vridningsstress og knuter på kromosomene som oppstår under de ulike nukelinsyresyntese prosessene, som medfører permanente dobbeltrådet DNA-brudd som er dødelig for bakteriene (Gibson et al., 2018; Yan & Bryant, 2022). Syntetiske kinoloner ble utviklet på 1960-tallet med en kjemisk grunnstruktur bestående av en bisyklisk ring (Kocsis et al., 2016). På grunn av sin begrensede og smalspektrede antibakterielle effekt ble det på 1980-tallet utviklet en andregenerasjon av kinoloner utviklet som fluorokinoloner (norfloxacin og ciprofloxacin) med et fluoratom festet til C-6 og et syklisk diaminpiperazin festet til C-7 den bisykliske ringen i tillegg til ulike substitusjoner (Gibson et al., 2018; Kocsis et al., 2016). Den andre generasjonen av fluorokinolon hadde en forbedret antibakteriell effekt, men blant disse hadde ciprofloxacin best klinisk effekt med et bedrespektret potensial til å angripe både grampositive og gramnegative bakterier. Dette økte kinoloners sitt potensiale til å benyttes mot en rekke bakterielle infeksjoner utenfor urinveiene som tidligere kinoloner hadde vært begrenset til (Gibson et al., 2018). På grunn av ciprofloxacin sin vellykkede effekt, ble ciprofloxacin videreutviklet til tredje generasjon fluorokinolon (moxifloxacin, gatifloxacin og levofloxacin) som viste en forbedret effekt i tillegg til et utvidet bakterielt spekter. På grunn av undergruppen fluorokinolons gode kliniske effekt, blir kun disse kinolonene benyttet i Norge for å behandle en rekke gramnegative og grampositive bakterielle infeksjoner (legemiddelverk, 2019). Disse infeksjonene inkluderer blant uriveisinfeksjon, pyelonefritt, gastroenteritt, seksuelt overførbare sykdommer, tuberkolose, prostatitt og hud- og bløtdelsinfeksjoner (Bush et al., 2020).

Nukleinsyreplassen inngår i DNA-replikasjon, transkripsjon, rekombinasjon og kondensert DNA remodellering. Under nukelinsyresyntesen åpnes det dobbeltrådet DNAet for

avlesning av templattråden (Frivoll, 2020; Kristensen, 2017; Yan & Bryant, 2022). Ved åpning av denne tråden vil den dobbeltrådede DNAet bli kveilet tettere sammen foran og bak åpningen. Det medfører superkveilet DNA hvor det dobbeltrådede DNAet kveiler rundt seg selv og forårsaker et DNA under stress. Videre avlesning av DNAet blir vanskelig (Frivoll, 2020; UiO, 2020b). For å motvirke denne situasjonen benyttes topoisomeraseenzymer (Frivoll, 2020). De fungerer ved å utføre forbigående enkelt- og dobbeltrådede brudd, som bidrar til å lette deres grunnleggende roller i å fjerne vridningsstress og knuter i bakteriekromosomet som dannes under vanlige nukleinsyrepresesser. Topoisomeraser kan deles inn i to grupper, topoisomerase type I og II. topoisomerase type I er energiavhengig og medfører tilbakekveiling av DNA ved å kutte og lime sammen enkelttrådet DNA. I motsetning til topoisomerase type I, er topoisomerase type II energiavhengig (utnytter ATP) og kan benyttes til både å øke og redusere graden av kveiling ved et dobbeltrådet DNA-brudd. Hos bakterier benyttes det to typer av topoisomerase type II, gyrase og topoisomerase IV (Gibson et al., 2018). Disse enzymene utgjør to A₂B₂ heterotetramer bestående av to underenheter som danner to identiske par. Gyraseenzymet består av underenhetene GyrA₂ og GyrB₂ i både gramnegative og grampositive bakterier, mens topoisomerase IV enzymet består av underenhetene ParC₂ og ParE₂ i gramnegative bakterier og GrlA₂ og GrlB₂ i grampositive bakterier (Correia et al., 2017; Gibson et al., 2018). For å endre den topologiske tilstanden til DNAet forårsaker gyrase og topoisomerase IV enzymene et 4bp forskjøvet dobbeltrådet brudd, hvor de frakter den intakte dobbelhelixen gjennom før bruddet blir limt sammen igjen (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017). Denne prosessen er energiavhengig. Underenhet B som inneholder ATPase-domenet og TOPRIM-domenet, vil under denne prosessen stå for opptak og utnyttelse av energi via ATPase-domenet for utførelse av DNA-spaltning og ligering, som finner sted på TOPRIM-domenet som en del av en ikke-kanonisk to-metallion-mekanisme (Aldred et al., 2014; Gibson et al., 2018). I tillegg vil en tyrosinrest lokalisert på underenhet A kovalent binde seg til de nylig genererte 5'-DNA-terminalene som medfører dannelse av et enzymspaltet DNA-kompleks (spaltningsskompleks) for å opprettholde den genomiske integriteten under prosessen (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017).

Som beskrevet ovenfor har gyrase og topoisomerase IV enzymene en strukturell og funksjonell likhet, men til tross for dette har enzymene unike katalytiske aktiviteter på grunn av den variable C-terminale domenen i underenhet A (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017). Denne domenen tar del i topologigjenkjenning, og medfører at gyraseenzymet kan danne negative supercoiler på DNAet i motsetning til topoisomerase IV (Aldred et al., 2014).

På grunn av denne distingte forskjellen benyttes gyraseenzymet hovedsakelig til superkveiling av DNA-tråden og histonproteiner ved tettpakking av kromosomer og motvirkning av torsjonsspenningen som oppstår foran replikasjongs-gafler og transkripsjonskomplekser under DNA-replikasjon og -transkripsjon (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017; UiO, 2020a). I motsetning til gyrase kan ikke topoisomerase IV enzymet introdusere negativ supercoiler, men kan fjerne positive og negative supercoilere samt floker og knuter som oppstår på DNA-tråden under cellulære prosesser som DNA-replikasjon, -transkripsjon og -rekombinasjon (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017; Gibson et al., 2018). Med dette bidrar topoisomerase IV også til å opprettholde kromosomal superhelisk tetthet og lindre torsjonsstress, men i en midre grad enn gyrase (Aldred et al., 2014).

Ved utnyttelse av antibiotikumet kinolon, vil dette antibiotikumolekylet hemme gyrase eller topoisomerase IV sin funksjon og omdanner disse til giftige enzymer som produserer permanente dobbeltrådede brudd i bakteriekromosomet. Dette skjer ved at kinolonet binde seg reversibelt til gyrase eller topoisomerase IV enzymene som har dannet et spaltningskompleks med en dobbel DNA-tråd (Gibson et al., 2018). C3/C4-ketosyren på grunnstrukturen til kinoloner vil her binde seg til serin- og glutaminsyre/asparaginsyrerestene på type II er topoisomeraseenzymene ved dannelse av en vann-metallionebro bestående av et ikke-katalytisk Mg^{2+} ion bundet til fire vannmolekyler som introduserer hydrogenbindinger mellom enhetene (Correia et al., 2017; Gibson et al., 2018). Interaksjonen mellom spaltningskompleket og kinolonene vil medføre en fysiske blokkering av det aktive spaltningsligeringsstedet på type II topoisomeraseenzymene i underenhet B ved siden av enzym-DNA-grensesnittet i underenhet A (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017). Den fysiske blokkeringen av det aktive spaltnings-ligeringsstedet fører til stabilisering av spaltningskompleket, og som igjen fører til dysfunksjonering av type II topoisomeraseenzymene (Aldred et al., 2014). Dette medfører økt spenning i genomet. I tillegg vil DNA-sporingsystemer (som replikasjongs-gaffel og transkripsjonskomplekser) kollidere med kinolonene som er tilkoblet type II topoisomeraseenzymene som vil medføre dobbeltrådede brudd (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017). DNA-tråden går med det i stykker, noe som overvelder cellens evne til å reparere DNA, fører det til celledød.

2.1.1.3 Makrolider

Makrolider er en gruppe antibiotika som hemmer proteinbiosyntesen hos en rekke bakterier rettet mot underenheten 50S i ribosomene (Forbord, 2021; Kapoor et al., 2017). Gruppen er

bygget opp av den samme kjemiske grunnstrukturen bestående av en makrolaktonring av ulik størrelse (12-16 atomer), med deoksysukker- eller aminosukkerrester tilkoblet som gir makrolidene spesifikke biologiske egenskaper (Dinos, 2017; Forbord, 2021; Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). Av disse er makrolider bestående av 14-15 atomer mest klinisk relevante og benyttet i størst grad mot luftveisinfeksjoner og tilfeller av penicillinallergi, hovedsakelig forårsaket av grampositive bakterier (eks: Staphylococcus, Streptococcus og Diplococcus) og noen tilfeller av gramnegative bakterier (eks: Neisseria gonorrhoea, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis og Neisseria meningitidis) (Dinos, 2017; Forbord, 2021; Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). Det første makrolidet som ble oppdaget var erytromycin (14 atomer) og har blitt benyttet siden 1950 (Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). Til tross for sin gode antibakterielle aktivitet, ble det dannet fem semisyntetiske derivater av erytromycin som utgjorde andregenerasjonen av makrolider (klaritromycin, diritromycin, roxithromycin, fluritromycin og azitromycin) (Dinos, 2017). På grunn av økende resistensutvikling ble det også utviklet en tredje generasjon makrolider, ketolider. På grunn av sin mulige bivirkning i form av irreversibel levertoksitet ble ikke dette medikamentet markedsført, og det stoppet utvikling av nye makrolider. Blant makrolidene som finnes i dag blir kun fire av disse benyttet i Norge, og det er erytromycin, azitromycin, klaritromycin og spiramycin. Av disse er erytromycin den mest anvendte typen (Forbord, 2021).

Proteinsyntesen strekker seg hele veien fra transkripsjon av DNAet til mRNA (budbringer-RNA) i cellekjernen til translasjon av mRNAet til et protein på et ribosom i cytoplasmaet (Gråbøl-Undersrud, 2021). mRNA kopierer et gen fra genomet som koder for et protein, ved å feste seg på ribosomet blir mRNA-tråden avlest (Fossum, 2022; Gråbøl-Undersrud, 2021). Tre og tre baser som danner en triplett som koder for en aminosyre, blir avlest mens ribosomet beveger seg langs mRNAet (Fossum, 2022). Samtidig som mRNA-tråden blir avlest henter tRNAer (transfer-RNA) aminosyrer som matcher triplettene på mRNA-tråden (Gråbøl-Undersrud, 2021). Ribosomene består av tre bindingssteder for tRNAer, A-, P- og E-bindingssted (Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). I det aminoacyl-tRNA ankommer ribosomet fester den seg i bindingssted A. Deretter forflytter aminoacyl-tRNA seg videre til bindingssted P hvor aminosyren blir koblet på den voksende proteinkjeden som blir katalysert i peptidyltransferasesenteret (PTC), før deacylerte tRNAet til slutt blir forflyttet til bindingssted E før det forlater ribosomet. Den voksende proteinkjeden og det ferdig dannede proteinet blir derimot fraktet ut av ribosomet gjennom den begynnende peptidutgangstunnelen (NPET). Alle typer av makrolid antibiotikum vil binde seg til denne peptidutgangen ved å danne en

hydrogenbinding med nukelobasen til A2058 av 23S rRNA på underenheten 50S i ribosomene hvor den voksende proteinkjeden føres ut til cytoplasmaet (Dinos, 2017; Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). Før trodde man denne bindingen medførte total blokkering av NPET, men denne teorien er mer komplisert (Dinos, 2017). Makrolidbindingen til NPET vil medføre at proteinsyntesen avbrytes etter at den voksende proteinkjeden har koblet sammen 5-11 aminosyrer, og dette medfører at peptidyl-tRNA forlater ribosomet før proteinsyntesen av proteinet har blitt fullført slik at proteinsyntesen hemmes.

2.1.1.4 Tetrasykliner

Tetrasykliner er en gruppe antibiotika som hemmer proteinbiosyntesen hos en rekke bakterier rettet mot underenheten 30S i ribosomer (Kapoor et al., 2017). Gruppen er bygget opp av en kjemisk grunnstruktur bestående av fire aromatiske ringer som utgjør et naftalenringsystem (Hobson et al., 2021; UiO, 2021a). Totalt finnes det tre generasjoner av tetrasykliner, hvor førstegenerasjon utgjør antibiotikaene tetracyklin, klortetecyklin, oksytetracyklin og demekloxyklin som er biosyntetisert (Fuoco, 2012). Andregenerasjon utgjør antibiotikaene doxycycline, lymecycline, meclocycline, methacycline, minocycline og rolitetracycline som er semi-syntetisert. Tredjegenerasjon utgjør antibiotikaet tigecyklin som er totalt syntetisert. Til felles for alle antibiotikaklassene er deres bredspektrede effekt å hemme vekst av grampositive og gramnegative bakterier (UiO, 2021a). Tetrasykliners bredspektrede antibiotikum, benyttes blant annet til å behandle en rekke bakterielle infeksjoner som forårsaker blant annet hud-, luftveis-, kjønnsykdom- og gastro infeksjoner (Ali, 2019; Hobson et al., 2021). Hvor av i Norge benyttes tetrasykliner: doxycycline, lymecycline, oksytetracyklin og tetracyklin (Ali, 2019).

Proteinsyntesen som er beskrevet i underkapittel 2.1.1.3 Makrolider, strekker seg hele veien fra DNA-transkripsjon i cellekjernen til RNA-translasjon i cytoplasmaet (Gråbøl-Undersrud, 2021). Tetrasykliner vil under denne prosessen feste seg til 16S rRNA (ribosomalt RNA) som befinner seg i den ribosmale underenheten 30S (Grossman, 2016; Hobson et al., 2021). Tetrasyklinene vil først danne et kompleks sammen med magnesiumioner, og deretter vil de kunne feste seg til 16S rRNA på en nukleobase-uavhengig måte. Ettersom bindingstedet til 16S rRNA befinner seg i nærheten av bindingssete A hvor aminoacyl-tRNA binder ribosomet vil tetrasykliner kunne blokkere for innkommende aminoacyl-tRNA. Det vil medføre at translasjonen stopper opp og bakteriecellenes vekst og formering blir hemmet (Grossman, 2016; Hobson et al., 2021; Shutter & Akhondi, 2022).

2.2 Antibiotika resistens

2.2.1 Grunnlaget for utvikling og spredning av antibiotikaresistens

Livet til mikroorganismer handler om å kunne vokse og formere seg, men for å kunne dette må de også kunne forsvare seg for å kunne overleve. Som nevnt i forrige avsnitt, har noen typer bakterier og sopper utviklet mekanismer for best mulig kunne vokse og formere seg ved å sprøyte ut antibiotikamolekyler som kan dreper eller hemmer bakterier (Munita & Arias, 2016). Bakteriene som har levd blant disse motstandsdyktige mikroorganismene har gjennom evolusjonen utviklet seg for å kunne overleve rundt disse skadelige antibiotikamolekylene. Denne utviklingen benevnes som en iboende resistens hos bakterier, og omhandler genetiske betingede egenskaper som går i arv via vertikal overføring som omhandler at genome fra morcellen overføres videre til dattercellene (Gaustad, 2001; Munita & Arias, 2016). Et eksempel på dette er gramnegative bakteriers doble cellemembran som gjør det vanskelig for antibiotika å trenge inn i bakteriecellen i forhold til grampositive bakterier med kun en cellemembran. Et annet eksempel på dette kan omhandle fravær av et målmolekyl hos en bestemt bakterieart, som gjør at et antibiotikamolekylet ikke klarer å integrere med bakterien (Gaustad, 2001; Munita & Arias, 2016). I tillegg til bakterienes iboende resistens har bakteriene gjennom tidene utviklet ervervet resistens mot ulike typer antibiotikamolekyler for å kunne overleve (Munita & Arias, 2016). Ytterligere forverring av den rådende situasjonen oppsto ved å observere bakterier som gradvis ble resistente mot forskjellige klasser av antibiotika gjennom anskaffelse av resistensgener fra samme og forskjellige slekter av bakterier (Vase, 2013). Dette har resultert i at bakteriene i de fleste miljøer har blitt presset til å forsvare seg selv og som igjen har ført til økt resistensutvikling blant et bredt spekter av bakteriestammer.

Denne ervervingen av motstandsmekanismer mot antibiotikamolekyler skyldes forandring i arvestoffet til bakterier og skjer hovedsakelig via to strategier (Gaustad, 2001; Munita & Arias, 2016). Den første strategien omhandler mutasjon i bakteriens eget gen eller gener, og den andre strategien omhandler erverving av resistente gener fra andre bakterier via horisontal genoverføring (HGT) (Munita & Arias, 2016).

Resistens som oppstår på grunn av mutasjon på eget genom, skyldes hovedsakelig ulike stressfaktorer som bakteriene blir utsatt for (Reygaert, 2018). Dette kan blant annet være mangel på næring, temperatur, oksygenmangel, utsettelse for UV-lys eller kjemikalier og medfører en stressrespons (Anand & Soni, 2020; Reygaert, 2018). Denne stressresponsen hos bakterier kan medføre mutasjoner på bakteriens eget genom. Hvis disse mutasjonene

forekommer i gener som er ansvarlig for respons mot antibiotika i bakterieceller, kan dette medføre resistens (Reygaert, 2018). Disse genene som er ansvarlig for antibiotikarespons, omhandler gener som koder for antibiotikamolekylets mål, antibiotikamodifiserende enzymer, antibiotikatransportører som frakter antibiotika ut og inn av cellen og regulering av transportørene. Ved mutasjon av disse genene blir bakteriene motstandsdyktige mot antibiotikum, og genene benevnes som resistensgener (Otterholt, 2021).

Resistensgener som blant annet har oppstått via mutasjon på genomet hos en bakterie eller tidligere ervervet resistensgener kan videre spre seg til andre bakterier som ikke er motstandsdyktige (Otterholt, 2021). Denne overføringen av resistens gener skjer via HGT ved hjelp av mobile genetiske elementer (MGE), og den er hovedbidragsyteren til spredning og økning i antimikrobiell resistens (Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018; Sultan et al., 2018). HGT er et naturlig fenomen som omhandler (...) «overføring av genmateriale og genetisk informasjon mellom encellede organismer eller mellom encellede og flercellede organismer» (...), som skiller seg fra vertikal genoverføring hvor hele genomet kopieres og overføres fra morcellen over til dattercellene (Aarnes, 2021). Denne overføringen av genmateriale og genetisk informasjon skjer hovedsakelig mellom to bakterier, hvor virus og transposoner kan være bidragsytere. Denne overføringen og opptaket av resistente gener kan skje via tre hovedstrategiene; transduksjon, transformasjon og konjugasjon (Munita & Arias, 2016; Otterholt, 2021). Ved transduksjon overføres de resistente genene til bakterien via bakterieangripende virus (bakteriofager), ved transformasjon tar bakterien opp fritt DNA (kan inneholde resistente gener) fra miljøet rundt, mens ved konjugasjon overføres resistente gener mellom bakterier ved celle-til-celle kontakt (Otterholt, 2021; Tønjum, 2020). Ut ifra disse tre hovedstrategiene for overføring og opptak av resistente gener, er konjugering den vanligste og den mest dominerende strategien for spredning og utvikling av resistente gener blant kommensale og patogene bakterier (Llosa & de la Cruz, 2005; Vrancianu et al., 2020).

Ved konjugering, blir genetisk materiale overført fra en bakteriegiver til en bakteriemottaker. Bakteriegiveren inneholder plasmid med pilikodende gener (Sirevåg, 2021). Disse genene kan uttrykke proteinet pilinråder som danner en “bro” mellom bakteriene, bakteriemottakeren får med det overført gener som koder for pili, og kan videre overføre sine gener videre til nye bakterier. Under konjugeringen av genetisk materiale kan også resistente gener bli utvekslet. Denne utvekslingen skjer hovedsakelig ved hjelp av MGE, men kan også skje ved direkte kontakt mellom to kromosmer (Munita & Arias, 2016). MGE består hovedsakelig av:

plasmider, transposoner og integroner. MGE benyttes som kjøretøy for gentisk viktig materiale som kan gi økt kondisjon hos bakterien, som blant annet resistente gener (Munita & Arias, 2016; Sultan et al., 2018). Disse MGE kan forflytte seg både intracellulært og intercellulært hos bakterier. Intracelleulært kan MGE forflytte seg mellom kromosomet og plasmidene, eller mellom plasmidene innad i en bakteriecelle. Intercellulært kan MGE forflytte seg mellom bakterier innenfor samme art, forskjellige arter eller ulike slekter via kromosomer og plasmider (Vrancianu et al., 2020). Mobiliteten hos MGE har ført til at resistente gener kan forflytte seg raskt innad i sitt eget genom eller mellom bakterier. Dette øker spredningen og utvikling av antibiotikaresistens blant bakterier.

Ved seleksjon for ett resistant gen som overføres mellom bakterien ved hjelp av MGE fører hovedsakelig til utvikling av resistens mot et bestemt antibiotikum, men kan ofte selektere for utvikling av kryss- og ko-resistens mot flere antibiotikum innenfor ulike typer antibiotikaklasser eller underklasser (Emerging & Risks, 2009; Magiorakos et al., 2012). På grunn av at antibiotikumknylene innenfor en antibiotikaklasse som har en lignende struktur og virkemåte, så virker også disse oftest mot samme mål inni bakteriecellene (Emerging & Risks, 2009). Ved overføring av resistant gen mot et antibiotikum innenfor en antibiotikaklasse vil dermed kunne medføre resistens mot alle eller de fleste antibiotikaene innenfor en antibiotikaklasse. Men det kan også medføre resistens mot antibiotika utenom antibiotikaklassen som har lignende mål eller ved uspesifikk resistens. Denne resistensutviklingen benevnes som kryssresistens. I tillegg til at enkelte resistensgener kan medføre kryssresistens, kan resistensgenene være samlokalisert og koblet til andre resistente gener på MGE (Baker-Austin et al., 2006; Emerging & Risks, 2009). Overføring av ett av disse resistente genene vil dermed kunne medføre at de samlokaliserte resistente genene samt andre gener vil kunne bli overført samtidig. Denne mekanismen defineres som ko-resistens og kan medføre resistens mot flere antibiotikaklasser samtidig.

Både kryss- og ko-resistens via HGT med hjelp av MGE har ekspandert spredningen av resistente gener betydelig, og det har ført til utvikling av multiresistente bakterier (MDR) (Vrancianu et al., 2020). Hvor bakterien har utviklet resistens mot tre eller flere antibiotikaklasser, videre utvikling av denne trenden har og vil kunne føre til utvikling av ekstensiv medikamentresistens (XDR) som er resistens mot nesten alle godkjente antimikrobielle midler eller i verste fall pandrug resistens (PDR) hvor bakterier er motstandsdyktige mot alle antimikrobielle midler (Magiorakos et al., 2012).

2.2.2 Antibiotika resistens mekanismer

Bakterier kan både ha iboende eller ervervede resistensmekanismer mot antibiotika. Disse resistensmekanismene kan medføre begrenset opptak av antibiotika, modifisering av antibiotikaets målsete, enzymatisk inaktivering av antibiotikaet og effluks av antibiotika (Bjørg C. Haldorsen, 2012; Reygaert, 2018). Begrenset opptak av antibiotika omhandler endring eller tap av poriner i yttermembranen til bakteriecellene og medfører redusert opptak av antibiotika fra det ytre miljøet (Bjørg C. Haldorsen, 2012). Modifisering av antibiotikaets målsete oppstår ved mutasjon i gen eller genene som koder for målmolekylet, dette medfører at antibiotika ikke klarer å binde seg til målsete og med det får den ikke utført sin funksjon. Enzymatisk inaktivering av antibiotika oppstår hos bakterier med gener som koder for enzymer som kan bryte ned eller modifisere antibiotika. Antibiotikaet blir med det inaktivert og får ikke utført sin funksjon. Effluks av antibiotika oppstår ved økt uttrykk av efflukspumper. Store mengder av antibiotika blir med det pumpet ut av bakteriecellen og forhindrer at cellen blir ødelagt.

2.2.3 Resistensmekanismer hos de ulike antibiotikaklassene

2.2.1.1 β -Laktam

Hos bakterier er det observert en rekke resistensmekanismer rettet mot antibiotikumet β -laktam. Det er modifisering av medikamentmålet PBP og begrense opptak av β -laktam ved modifisering av porinkanaler. Dette må antibiotikumet føres gjennom for å nå PBP som ligger innenfor den ytre membranen hos de gramnegative bakteriene. I tillegg er det aktiv medikamentutstrømning ved bruk av multikomponent legemiddelutstrømningspumpesystemer og enzymatisk inaktivering av et medikamentet β -laktam med β -laktamaser (Bonomo, 2017). Den sistnevnte resistensmekanismen er den vanligste og viktigste mekanismen mot β -laktam hos gramnegative og grampositive bakterier, som medfører hydrolysering av β -laktam ringen (Bjørg C. Haldorsen, 2012; Bonomo, 2017). β -laktam får med det ikke bundet seg til målsete PBP som gjør antibiotikumet inaktivt.

β -laktamaser utgjør en stor familie av enzymer med over 900 ulike β -laktamasevarianter. De kan inndeles ut ifra proteinstruktur, substratspesifisitet evnetuelt bredde av substratspesifisitet (bredspektret eller smalspektret β -laktamase), påvirkning av betalaktamase inhibitorer, plasmid eller kromosomalt bundet β -laktamasegen, og om β -laktamasegenet er konstitutivt eller induserbart (Bjørg C. Haldorsen, 2012; FHI, 2019). Men på grunn av økende utvikling og

spredning av plasmidmediert β -laktamaser og denne uoversiktlige inndelingen av β -laktamaser ble det i 2009 laget en forenklet nomenklatur for betalaktamaser med utvidet spektrum (ESBL) som blir benyttet i Norge.

Benevnelsen ESBL utgjør en gruppe β -laktamaser som inaktiverer både penicilliner, cefalosporiner med utvidet spektrum og/eller karbapenemer (Bjørge C. Haldorsen, 2012). Bakterier med ESBL kan videre bli delt inn i gruppene ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA} (Bjørge C. Haldorsen, 2012; FHI, 2019). ESBL_A utgjør β -laktamaser som kan hydrolysere alle β -laktam klassene med unntak av karbapenemer. De andre klassene inkluderer penicilliner, cefalosporiner og monobakterer (Bjørge C. Haldorsen, 2012). I tillegg kan ESBL_A identifiseres og klinisk hemmes ved bruk av klavulansyre som er en betalaktamsehemmer. De viktigste ESBL_A enzymene inkluderer TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-2 og CTX-M. Blant disse enzymene er CTX-M (1, 2, 8, 9 og 25) de mest globalt utbredte ESBL_A enzymene, som opprinnelig ble identifisert i kromosomet hos *Kluyvera spp.* I senere tid har enzymet blitt plasmidmediert og spredt seg til bakterier innenfor samme familie. ESBL_M β -laktamaser i samsvar med ESBL_A viser også resistens mot penicilliner og cefalosporiner, men ikke mot β -laktamklassene monobakter eller karbapenemer. De viser også tegn til hemming ved bruk av betalaktamsehemmere som kloxacillin og borsyre. De benyttes ved identifisering og ved klinisk hemming av disse enzymene.

Blant ESBL_M enzymene er de plasmidmedierte AmpC- og OXA-enzymene de viktigste. Til tross for dette er AmpC-enzymet langt mer vanlig enn OXA-enzymet på grunn av sin naturlige tilstedeværelse i kromosomet til en rekke bakterieslekter, blant annet *E.coli*, *Enterobacter spp.*, og *Citrobacter spp.* Genet for dette enzymet har videre forflyttet seg til plasmider og har spredt seg til en rekke andre bakterieslekter. Den siste ESBL-gruppen ESBL_{KARBA}, skiller seg fra de andre to ESBL- gruppene ved å hydrolysere de fleste eller alle β -laktamer fra de fire β -laktamklassene. Dette inkluderer karbapenemer. I tillegg blir de ikke hemmet av betalaktamsehemmere som klavulansyre eller tazobaktam som benyttes klinisk for å motvirke β -laktamaser sin effekt. De viktigste ESBL_{KARBA} enzymene som finnes, inkluderer serinkarbapenemasene KPC og OXA og metallo-betalaktamasene VIM, NDM og IMP.

2.2.1.2 Kinoloner

Hos bakterier hvor det oppstår resistens mot antibiotikummedikamentet kinolon, er det observert en rekke ervervede resistensmekanismer (Correia et al., 2017; Yan & Bryant, 2022). Disse består av modifisering av medikamentmålet, begrensning av opptak eller økt utstrømning av medikamenter, inaktivering av medikamenter og beskyttelse av medikamentmålet (Correia et al., 2017; Gibson et al., 2018). Modifisering av medikamentmålet er den vanligste og mest klinisk relevante resistensmekanismen, og det oppstår ved kromosomal mutasjon på et av genene som koder for en av underenhetene til type II topoisomerase enzymene. Av disse underenhetene utgjør mutasjon på underenhet A den vanligste formen for kinolonresistens, grunnet lokasjon av bindingsstedet til kinolonmedikamentene (Correia et al., 2017). Mutasjon av serin- og glutaminsyre/asparaginsyrerestene på type II topoisomeraseenzymene som binder seg til kinolonmedikamentet via en vann-metallionebro, svekker interaksjonen mellom spaltingskomplekset og kinolon (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017). Type II topoisomeraseenzymene kan med det gjenopprette sin katalytiske aktivitet ved at kinolonene mister sin evne til å blokkere for liggering av dobbeltrådet brudd (Aldred et al., 2014). En stadig oppblomstrende spredning av resistensgener via plasmider, og blant har ført til identifisering av en rekke plasmidmediert kinolonresistente (PMQR) gener med mekanismer rettet mot kinolon (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017; Yan & Bryant, 2022). Disse PMQR genene inkluderer *qnr* (*A*, *B*, *S*, *C*, *D*, *VC*), *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* og *oqxAB*, hvor *qnr* medfører målbeskyttelse, *aac(6')-Ib-cr* medfører inaktivering av kinoloner og *qepA* og *oqxAB* medfører utpumping av kinoloner (Aldred et al., 2014; Correia et al., 2017).

2.2.1.3 Makrolider

Hos bakterier som har blitt infisert av antibiotikumet makrolider, har det blitt observert en rekke ulike forsvarsmekanismer. Det er blant annet aktiv medikamentutstrømning, beskyttelse av medikamentmålet, modifisering av medikamentmålet og inaktivering av medikamenter (Golkar et al., 2018). For at bakteriene skal unngå at makrolider skal opphopes inne i cellene og forårsake skade, blir en rekke utstrømningspumper benyttet for å pumpe ut makrolidene. Blant disse utstrømningspumpene har alle fem hovedfamiliene av utstrømningspumper hos prokaryoter blitt observert. Det inkluderer en stor tilretteleggende superfamilie (MFS), ATP-bindende kassett (ABC) superfamilie, multidrug and toxic compound extrusion (MATE) familie, resistens-nodulation-divisjon (RND) superfamilie og liten multidrug resistens (SMR) familie (Golkar et al., 2018; Sharma et al., 2019). Blant disse pumpene utgjør underfamiliene

Mef og Msr av MFS- og ABC-familiene en viktig rolle for utvikling av makrolidresistens (Golkar et al., 2018). Begge er kodet på plasmider og medfører resistens blant de mest klinisk relevante 14- og 15-leddede makrolidene (Dinos, 2017; Golkar et al., 2018). Proteinpumpene Mef er medlemmer av MSF-familien og utgjør en sekundær utstrømningspumpe som pumper ut makrolider i bytte med et proton (Dinos, 2017; Golkar et al., 2018; Sharma et al., 2019). I motsetning Mef-pumpene utgjør Msr-proteinpumpene (medlem av ABC-familien) en primær utstrømningspumpe, som benytter ATP som en energikilde istedenfor proton. I tillegg benyttes ikke Mef-pumpene direkte til å pumpe makrolidene ut av cellen slik man trodde før, men skyver makroliden ut av bindingsstedet sitt på ribosomet (Dinos, 2017; Golkar et al., 2018). Når et makrolidmolekyl har festet seg til NPET som medfører at proteinsyntesen hemmes, vil Msr proteiner kunne binde seg til bindingssted. P med tilstedeværelse av peptidyl-tRNA (Golkar et al., 2018). Msr som benytter ATP som energikilde kan så dytte makroliden ut av bindingsstedet ved hjelp av en nålignende domene som strekker seg hele veien fra P bindingsstedet til NPET, og det medfører gjenoppretting av proteinsyntesen. Makrolidresistens kan også oppstå ved modifisering av medikamentmålene på ribosomet gjennom tre mekanismer som innebærer 23S rRNA metylering, rRNA mutasjoner og rRNA protein mutasjoner. 23S rRNA ligger på underenheten 50S i ribosomene hvor makrolider danner en hydrogenbinding med nukelobasen til nukleotidet A2058. Erm-metyltransferaser er enzymer som kan katalysere metylering av dette nukleotidet i posisjon N6, som forårsaker forstyrrelse av hydrogenbinding mellom makrolide og nukleotidet A2058. Ved mono-metylering vil det fremdeles opprettholdes en svak hydrogenbinding som medfører moderat resistens. Men ved di-metylering vil denne hydrogenbindingen forsvinne og medføre at makroliden mister festet til bindingsstedet som igjen medfører høy makrolidresistens. I tillegg til metylering av bindingsstedet til makrolider vil mutasjon av bindingsstedet A2058 i 23S rRNA også medføre makrolid resistens ved at makrolider ikke klarer å binde seg til det deformerte målstedet. Mutasjon av ribosomale proteiner kan også medføre resistens. Blant disse er L4- og L22- proteiner blitt assosiert med makrolid resistens. Man antar at deformering av disse proteinene vil medføre endringer på strukturen til NPET, og det vil igjen medføre endring av målstedet til makrolider.

Den siste makrolidresistensmekanismen innebærer enzymatisk katalysert modifisering av makrolid antibiotikumkylet, og medfører endring av molekylstrukturen (Golkar et al., 2018). Denne strukturforandringen fører til inaktivering av makrolidene ved at de ikke klarer å binde seg til selve målstedet og gjør at de ikke kan utføre sin handling. Denne typen

modifikasjon av makrolider utføres hovedsakelig av de to enzymatiske klassene makrolidfosfotransferaser (MPH) og erytromycinesteraser (Eres), som begge kan modifisere makrolider (Golkar et al., 2018; Zieliński et al., 2021).

2.2.1.4 Tetracyclines

Resistens som oppstår mot antibiotikumet tetrasykliner skyldes både iboende og ervervet resistens, men de ervervete resistensmekanismer hvor resistente gener overføres via MGEene plasmidene og transposoner står for det største bidraget (Shutter & Akhondi, 2022). De to resistensmekanismene som er mest benyttet mot antibiotikumet tetrasyklin inkluderer medikamentutstrømning og ribosomale beskyttelsesproteiner (modifisering av medikamentmål). I tillegg til disse finnes også resistensmekanismene tetracyklininaktiverende enzymer (inaktivering av medikamentet) og ribosomal mutasjon (modifisering av medikamentmål) som er mindre utbredt (Hobson et al., 2021). Felles for disse er at alle utgjør en trussel for kliniske preparater.

Medikamentutstrømningpumpene som benyttes til å pumpe ut en rekke tetrasykliner finnes både i det iboende forsvaret hos en rekke bakterier, som blant annet RND-pumper (eks: AdeABC eller MexXY-OrpM). Men den kliniske resistensutviklingen domineres hovedsakelig av de ervervede tetracyklinspesifikke utstrømningpumpene. Av disse pumpene er det oppdaget over 30 ulike typer, hvor de fleste av disse er medlemmer av MFS. Ribosomale beskyttelsesproteiner (RPP) utgjør også en stor bidragsyter til utvikling av tetrasyklinresistens og er for det meste utviklet via ervervet resistens gjennom MGE. Under proteinsyntesen er aminoacyl-tRNA avhengig av energi for å bli forflyttet mellom de tre bindingsstedene på ribosomet (A-, P- og E-bindingssted) ved hjelp av forlengelsesfaktorene EF-Tu og EF-G (Moazed et al., 1988; Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). RPP med sin strukturelle likhet med forlengelsesfaktorene EF-G og EF-Tu har et overlappende målsted med EF-G og EF-Tu på ribosomene (Hobson et al., 2021). På grunn av sin overlappende likhet, kan RPP katalysere energiavhengig frigjøring av antibiotikamolekylet tetrasyklin som er bundet til ribosomet. Dette medfører at proteinsyntesen kan gjenoprettes og forsette som vanlig. Et fremvoksende resistensproblem blant tetrasykliner er utviklingen og spredningen av resistente gener tet(X) som koder for tetracyklininaktiverende enzymer (Hobson et al., 2021). Disse enzymene vil medføre oksidering av naftalenringsystemet som utgjør grunnstrukturen til tetrasykliner. Ved permanent ødeleggelse av denne grunnstrukturen vil tetrasykliner miste sin opprinnelige funksjon til å binde seg til ribosomene. Den minst utbredte resistensmekanismen av

tratrasykliner er via ribosomal mutasjon. Blant flere grunner er den nukleobaseuavhengige bindingen til målstedet på ribosomene. Små endringer på målstedet vil ikke ha like stor innvirkning på tetrasyklinmolekylet. I tillegg kan mutasjoner i sentrale funksjoner hos bakterier medføre forhøyet kondisjonskostnad, som gjør at mutasjonen raskt blir fjernet.

2.3 Miljø og tungmetaller

Antibiotikaresistente bakterier kan spres mellom mennesker, dyr og miljø, de kan her også dele resistente gener for å utvikle økt motstand mot omgivelsene rundt (FHI, 2021). Spesigjelt har miljøet blitt en viktig reservoar for utvikling av resistentebakterier samt spredning av resistente genene.

I Norge og en rekke andre land har man gjort tiltak for å begrense utviklingen og spredningen av resistente bakterier, ved blant annet å redusere bruken av antibiotika. Til tross for dette har man sett at resistensutviklingen forsetter til tross for disse tiltakene (Vats et al., 2022). I senere tid har man sett at biocider og tungmetaller kan ha en innvirkning på denne utviklingen (Vats et al., 2022; Wales & Davies, 2015). I denne oppgaven vil det bli lagt vekt på tungmetaller. Tungmetaller finnes naturlig i jordskorpen og finnes med det over alt i miljøet på jorda (Vats et al., 2022). Et resultat av naturlig erosjon av jordskorpen, har medført en økende utvikling av tungmetaller i økosystemet. Spesielt har klimaendringer økt denne prosessen med blant annet sur nedbør og økt antall skogbranner på jorda. I tillegg har vi mennesker økt denne utviklingen ved industri, landbruk og kloakkslam (Vats et al., 2022).

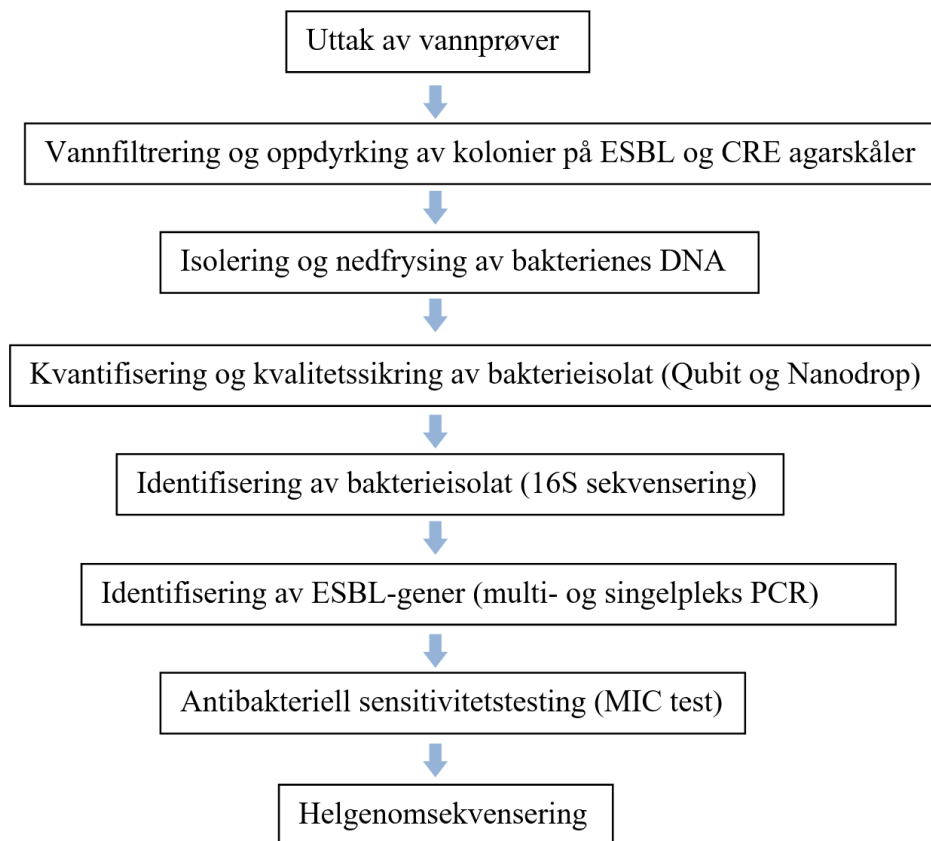
I likhet med antibiotika og andre giftige forbindelser i miljøet, utvikler bakterier forsvarsmekanismer for å motstå det ytre miljøet som kan true dens eksistens (Vats et al., 2022). Tungmetaller er blant disse. En rekke tungmetaller er gunstige samt essensielle for bakterienes grunnleggende metabolske prosesser, mens andre er ikke essensielle og er svært giftige for bakteriene. Selv de gunstige tungmetallene kan bli giftige for bakteriene ved høye konsentrasjoner, og det gjelder spesielt kobber (Cu), sink (Zn) og nikkel (Ni). Bakteriene har med det utviklet seg resistensmekanismer rettet mot tungmetaller. Disse resistensgenene befinner seg på de MGE hvor noe ARG også befinner seg. Denne samlokalisasjonen av resistensgener har medført ko- samt cross-seleksjon mellom tungmetallresistente gener og antibiotikaresistente gener. Etersom det eksisterer mye mer tungmetaller i miljøet enn antibiotika, vil tungmetaller øke seleksjonspresset blant bakterier i miljøet. Dette vil øke seleksjon samt spredningen av tungmetallresistente gener, og det vil igjen øke spredning av

antibiotikaresistente gener på MGE. Ettersom antibiotikaresistente gener på MGE er av klinisk relevans, vil denne økte spredningen av MGE kunne medføre økt utvikling av resistente patogener. Dette kan få katastrofale følger for behandlinger av bakterielle infeksjoner.

4.0 Material og metoder

4.1 Flytskjema

Under i Figur 1. illustreres flytskjema over alle prosessene i labforsøket, fra uttak av vannprøver til helgenomsekvensering.



Figur 1. Flytsjema av hele labforsøket

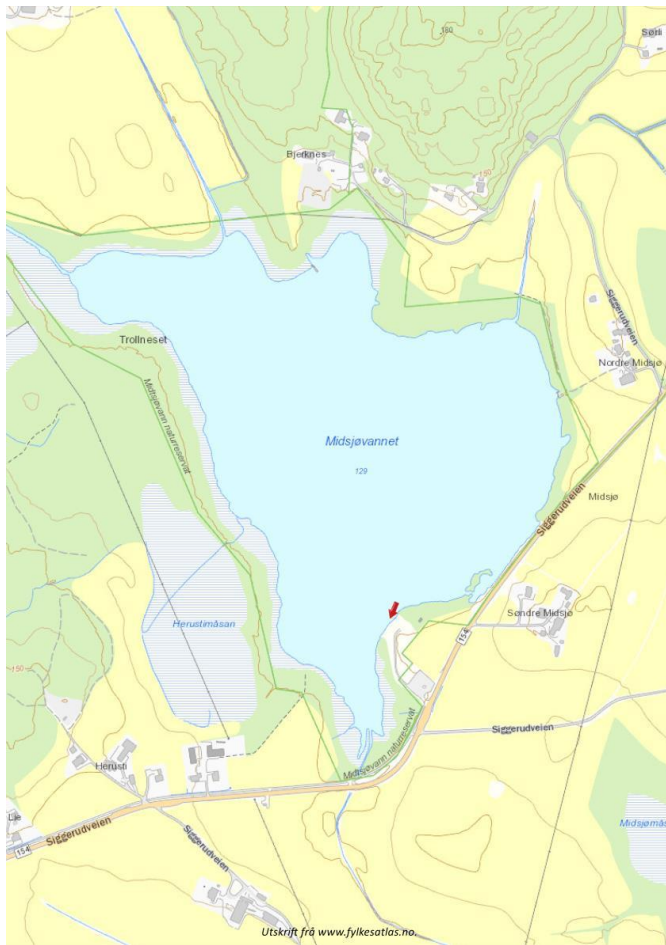
4.2 Uttak av vannprøver

For å kunne bidra med å kartlegge hvilke resistente miljøbakterier som finnes i Norge, ble det tatt vannprøver fra fire ulike innsjøer sørøst i Norge som ble dyrket på vekstmedium med antibiotika. Disse innsjøene inkluderte Langen, Midsjøvannet, Østensjøvannet og

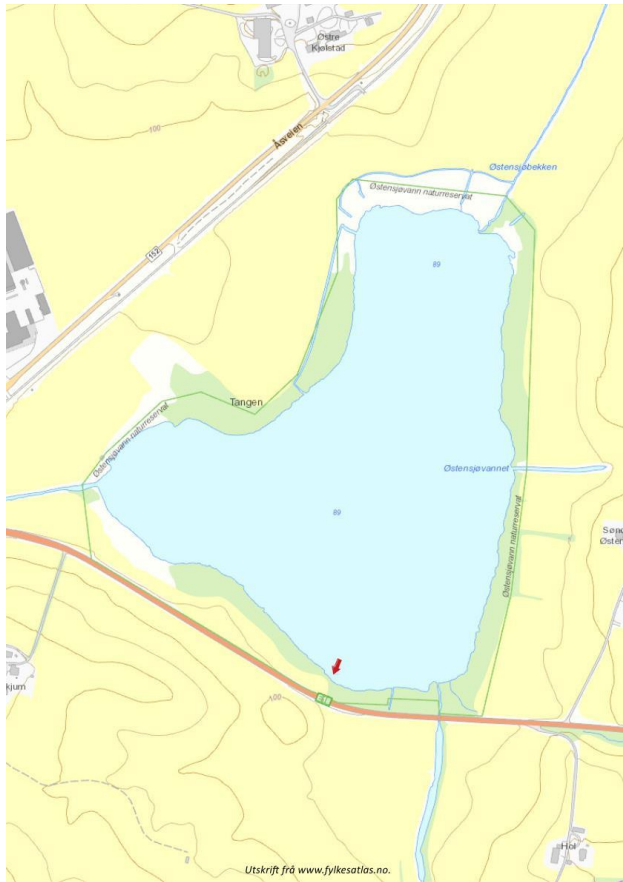
Andedammen. Langen er en langstrakt innsjø på 8,5 km, og ligger på grensen mellom Nordre Follo og Enebakk kommune i Viken (Skiforeningen, 2021). Vannet er et attraktivt sted for vannaktiviteter både på sommer- og vinterstid. Vegetasjonen rundt vannet består hovedsakelig av skog og små områder med dyrket mark. I tillegg er området preget av hytter og boligfelt som ligger tett inntil vannet. Midsjøvannet er et mindre langstrakt vann enn Langen og ligger i Nordre Follo kommune i Viken, øst for byen Ski (Akershus, 2010a). Vannet ble etablert som et naturreservat i 1992, på grunn av sitt naturlige næringsrike vann og dens frodige strand- og vannvegetasjon som tiltrekker fugler, insekter og dyr fra nærområdet, i tillegg til at det også er en rasteplass for noen typer trekkfugler (Akershus, 2010a; Miljødirektoratet, u.å.). I tillegg til strand- og vannvegetasjon består vegetasjon rundt vannet av dyrket mark og skog, som gjøre det lettere for disse dyrene å drive ferdsel til vannet. Til tross for at det er et naturreservat har vannet en tilrettelagt badeplass, som er godt brukt av lokalbefolkningen. Østensjøvannet som ligger i Ås Kommune i Viken, nord-øst for Ås sentrum, har i likhet med Midsjøvannet vært et naturreservat siden 1992 (Akershus, 2010b). Området rundt vannet er relativt åpent med dyrket mark på alle kanter, vannet er næringsrikt med frodig strand- og vannvegetasjon som tiltrekker fugler, insekter og dyr fra nærområdet, men er også en kjent rasteplass for ulike typer trekkfugler. I motsetning til Midsjøvannet er det ingen bademuligheter, ingen tilrettelagt ferdsel og visse områder rundt vannet har begrenset ferdsel i gitte perioder. Til slutt ble det tatt vannprøver fra Andedammen som ligger i Ås kommune i Viken. Vannet er som navnet beskriver et vann for ender, og ligger på NMBU sitt areal med sti, bebyggelse og skog rundt, men i utkanten av vannet befinner det seg også dyrket mark. Kartene nedenfor (se figurer 2-5) viser områdene rundt fire innsjøene, hentet fra fylkesatlas.no. Alle kartene er markert med en rød pil som indikerer uttaksområdet, hvor prøvene ble tatt.



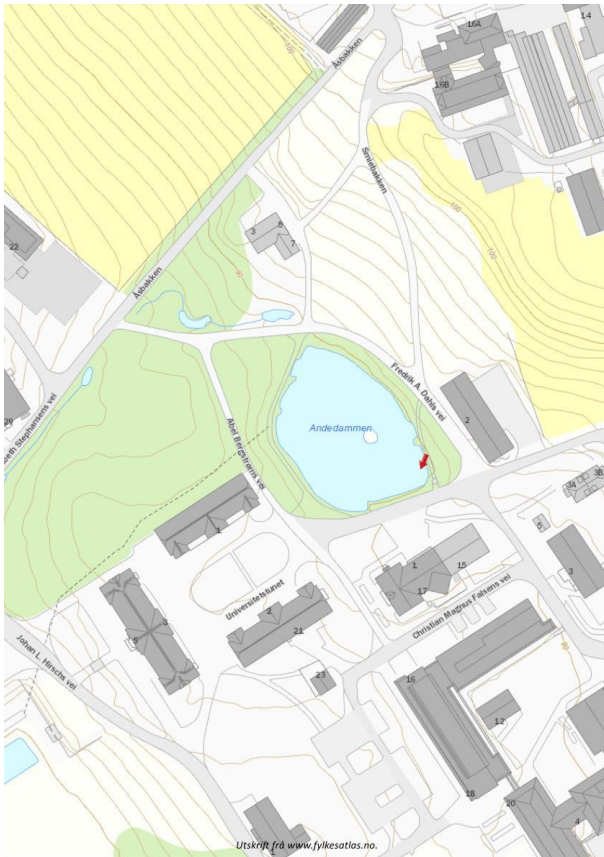
Figur 2. Kart over innsjøen Langen i Enebakk kommune, rød pil indikerer uttaksområdet (Fylkesatlas Vestland, 2010).



Figur 3. Kart over innsjøen Midsjøvannet i Nordre Follo kommune, rød pil indikerer uttaksområdet (Fylkesatlas Vestland, 2010).



Figur 4. Kart over innsjøen Østensjøvannet i Ås kommune, rød pil indikerer uttaksområdet (Fylkesatlas Vestland, 2010).



Figur 5. Kart over innsjøen Andedammen i Ås kommune, rød pil indikerer uttaksområdet (Fylkesatlas Vestland, 2010).

Fra de fire innsjøene ble det tatt ut tre vannprøver per innsjø fra samme uttaksted. Disse tre vannprøvene ble tatt ut gjennom tre ulike årstider, for mulige varierende utvalg av bakterier samt resistente gener. Den første vannprøven ble tatt på sensommeren 01.09.21. Den gjennomsnittlige lufttemperaturen i Ås kommune den dagen var ca. 15,9 grader i Ås Kommune (Yr, 2021). Vannprøve nr. 2 ble tatt på høsten 07.11.21, med en gjennomsnittstemperatur på 3,5 grader i Ås Kommune. Temperaturene før de andre vannprøvene ble tatt hadde ligget under og over null grader. De siste vannprøvene ble tatt i vinterhalvåret 13.01.22 og 14.01.22. Gjennomsnittstemperaturen disse uttaksdatoene var henholdsvis på 6,3 og 3,9 grader i Ås Kommune. På begge uttaksdatoene hadde temperaturen holdt seg over null grader det siste døgnet, men temperaturene dagene før hadde ligget stabilt under null grader, med noen plussgrader.

Var Vannprøvene ble tatt fra de fire innsjøene ved bruk av autoklaverte glassflasker av typen 500 ml Scott Duran, med unntak av høstprøvene hvor glassflaskene ikke var blitt autoklavert. Ved uttak av sommer- og høstprøvene lå det det ikke is på vannet, og vannprøvene ble tatt direkte fra vannkanten som vist med rød pil i Figur 2-5. Ved uttak av vinterprøvene var

vannene islagte og det ble benyttet isbor for å komme seg gjennom isen, og dermed ble vannprøvene tatt litt lengre ut fra vannkanten enn den røde pilen som indikerer i Figur 2-5. Etter at vannprøvene hadde blitt hentet opp ble vannprøvene satt på kjølerom ved 4°C i ca. 48 timer. Dette ble gjort for å la de store segmentene i vannprøvene samle seg i bunnen av glassflaskene, sånn at de ikke skulle fortette filteret ved senere vannfiltrering. Denne prosedyren ble benyttet for sommer- og høstprøvene, men på grunn av rene vinterprøver så ble denne prosedyren ikke benyttet. I tillegg ble høstprøvene lagret på kjølerommet i to uker grunnet sykdom.

4.3 Filtrering og oppdyrking av vannprøver på agarskåler med antibiotikum

Etter at segmentene hadde lagt seg i bunnen av glassflaskene, ble vannprøvene grovfiltrert gjennom et filterpapir av typen «Whatmann® Quantity filter paper 589/1 Black ribbon 150 mm i diameter» (GE Healthcare, VWR™ Life Science, Pittsburg USA). Filteret ble plassert oppi en plasttrakt, og de ble sammen autoklavert før filtreringsprosessen. De ble deretter plassert oppi autoklaverte 500 ml Scott Duran glassflasker. Vannprøvene fra de fire innsjøene ble så helt over i disse glassflaskene gjennom grovfilteret. Det ble jobbet ved en åpen flamme, for å unngå kontaminering fra omgivelsene rundt. 1000 µl av de ferdigfiltrerte vannprøvene ble pipetert over til to ulike typer antibiotika vekstmedium bestående av «Oxoid Brilliance™ ESBL» (Thermo Fisher Scientific, Hampshire, Storbritannia) og «Oxoid Brilliance™ CRE» (Thermo Fisher Scientific). De ble så strøket utover agarskålene til vannet størknet ved bruk av Sterile «Spreaders» (Thermo Fisher Scientific). Det ble jobbet under avtrekkskap for å unngå kontaminering. For å fremme vekst av de resistente bakteriene, med vekt på de som kan vokse og formere seg hos mennesker, ble de ferdigstrøkede agarskålene inkubert ved 37 °C i 48 timer inne på patogenlabben. Denne prosessen ble gjennomført for alle vannprøvene, men på grunn av at høstprøvene hadde blitt stående i kjøleromtemperatur på 4°C i to uker, viste disse ingen tegn til vekst ved direkte utplating på ESBL- og CRE-skåler. De filtrerte høstprøvene ble dermed overført til mildere vekstmedium for å skape mildere vekstvilkår for bakteriene, men de allerede utplatede ESBL- og CRE-skålene ble stående videre til inkubasjon for mulig vekst. Blodagar «Tryptone soya agar with sheep blood» (OXOID, Tyskland) og BHI buljong «Brain Heart Infusjon» (OXOID Ltd., Loughborough, Storbritannia) ble benyttet som mildere vekstmedium. 1000 µl av hver av høstprøvene ble pipetert og strøket utover på blodagarskåler, mens 100 µl av høstprøvene ble pipetert over i sterilt BHI-medium (BHI buljong pulver ble blandet ut med destillert vann som

ble oppvarmet til 100 °C, i forholdet: 37g per 1L 5ml av løsningen ble pipetert over i reagensrør som ble autoklavert) hvor prøvene ble blandet godt med vortexer. Blodagarskålene og BHI mediumet med høstprøver ble satt til inkubasjon ved 37 °C i 24 t inne på patogenlabben. Blodagarskålene med bakterievekst ble podet sterilt over til ESBL-skåler under avtrekkskap, mens BHI-mediumet som viste tegn til vekst (grumsete løsning) ble vortexert, før den ble pipetert (1000 µl) og strøket utover på ESBL-skåler. ESBL-skålene med høstprøvene ble så inkubert ved 37 °C i 24 t. Bakteriene som vokste fram på disse skålene ble videre overført til både ESBL- og CRE-skåler for videre dyrking. I tillegg ble det observert vekst etter 97 timers inkubasjon av høstprøvene med direkte utplating på ESBL- og CRE-skåler. Disse ble også dyrket videre på nye ESBL- og CRE-skåler.

Bakteriekolonier som vokste fram på ESBL- og CRE-skålene fra sommer-, høst- og vinterprøvene ble strøket over til nye ESBL- og CRE-skåler for å få dannet rene bakteriestammer for videre isolering av DNA. Det ble her plukket grønne, brune og rosa kolonier på ESBL-skålene, og blå, grønne og blekrosa kolonier på CRE-skålene. Prosessen ble gjort sterilt under avtrekkskap, med bruk av sterile podenåler. For hver overdyrking av koloniene, ble de nye skålene satt til inkubasjon ved 37°C i 48 timer. Når alle de utvalgte bakteriekoloniene på ESBL- og CRE-skålene hadde fått dannet rene bakteriestammer, ble bakteriene nedfrost og DNA isolert.

4.4 Nedfrysing av AR-bakterier og isolering av DNA

De rene bakteriestammene ble fryst ned til -80 °C. Dette ble gjort for at bakteriene skulle gå i dvale for å kunne landtidslagre bakteriene til senere bruk. Bakteriekoloniene som ble plukket for nedfrysning, ble først dyrket i BHI-medium for å få oppkonsentrert mengden bakterier. Bakteriestammen ble dermed overført til BHI mediumet med en steril podenål og satt til inkubasjon ved 37°C i 24 timer. Ved tilfeller uten synlig vekst i BHI-mediumet ble løsningen inkubert i totalt 48 timer. Etter at bakteriestammen hadde vist synlig vekst ved inkubasjon (grumsete løsning), ble 1000 µl av denne løsningen sammen med 500 µl glyserol (50%) pipetert over i 2 ml kryorør (Nunc™ CryoTubes™, Thermo Fisher Scientific Inc., Hampshire, Storbritannia). Kryorørene ble så satt i en fryser ved -80 °C.

I tillegg til nedfrysing ble de rene bakteriestammenes DNA isolert for videre analysing. Det ble her benyttet et «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). Isoleringen ble utført ut ifra den gramnegative protokollen, med unnatak av eluerings

bufferen som ble benyttet for sommerprøvene. Det ble her benyttet elueringsbufferen «Buffer AE Elution buffer 15 ml» (QIAGEN) istedenfor kittets elueringsbuffer. I tillegg ble det kun tilsatt 100 µl elueringsbuffer istedenfor 200 µl som beskrevet i protokollen. Denne utskiftningen ble kun benyttet for sommerprøvene, og ikke for høst- eller vinterprøvene ettersom at det ikke hadde så stor betydning for det isolerte DNAet. Etter at bakterienes DNA hadde blitt isolert ble løsningen samlet oppi 1,5 ml eppendorfrør, før de ble satt til nedfrysing i en fryser på -20 °C. Sommerprøvene ble ikke nedfryst rett etter at DNAet hadde blitt isolert, de ble lagret i kjøleskap på 4°C i 2-3 måneder før de ble dyrket over til nye ESBL- og CRE-skåler og videre nedfryst til -20 °C. Sommerprøvene S9, S10, S11 og S12, som ble dyrket på CRE-skåler viste ingen tegn til vekst ved redyrking etter 2-3 måneder og ble med det ikke nedfryst. Sommerprøve S3, S6 og S7 som ble dyrket på ESBL skåler viste gode tegn til vekst, og ble med det nedfryst for videre analysering.

4.5 Kvantifisering og kvalitetssikring av isolert DNA

For å forsikre seg at isoleringen av DNAene hadde vært vellykket før videre analyse, ble DNAet til bakteriene kvantifisert og kvalitetssikret ved bruk av «Qubit® 2.0 Fluorometer» (Invitrogen™ Life Technologies Corporation, Wilmington, USA) og «NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer» (Thermo Fisher Scientific Inc., Grand Island, USA).

4.5.1 Qubit Fluorometer

Qubit® 2.0 Fluorometeret ble benyttet for å kvantifisere de isolerte DNAprøvene. Før maskinen kunne bli tatt i bruk, måtte det bli laget et intervall for DNA-målingene, i tillegg til at DNA-prøvene måtte bli preparert. Det ble her benyttet et «Qubit® dsDNA BR Assay Kit» (Invitrogen™ Life Technologies Corporation, Eugene, USA). For at det skulle bli laget et intervall, ble det laget to standarder ut ifra protokollen til Qubit kitte. I den første standarden ble 10 µl standard (0 ng/µl) blandet ut med 190 µl iQuant™ Working Solution (1 µl iQuant™ Reagent + 199 µl iQuant™ Buffer) og i standard nummer to ble 10 µl standard (10 ng/µl) blandet med 190 µl iQuant™ Working Solution (Scientifics, u.å.-a; Scientifics, u.å.-b). Standard nummer én ble først kjørt på Qubit Fluorometeret, etterfulgt av standard nummer to. Maskinen hadde dermed fått laget et intervall for prøvene. Prøvene ble så preparert, 3 µl isolert DNA ble blandet sammen med 197 iQuant™ Working Solution. Maskinen ble innstilt på 3 µl prøve før de ferdigpreparerte prøvene ble kjørt på Qubit Fluorometeret. Qubit verdien

til de isolerte DNA prøvene indikerte hvor høy konsentrasjon av DNA som hadde blitt isolert. For å gjøre det enklere for videre arbeid ble det bestemt at prøvene med en verdi over 80 ng/μl skulle bli fortynnet. Både prøve S9 og V5 overskred 80 ng/μl, 1 μl av S9-prøven ble blandet med 199 iQuant™ Working Solution, og 1 μl av prøve V5 ble blandet med 197 iQuant™ Working Solution.

4.5.2 Nanodrop

Et NanoDrop™ 2000/2000C Spektrofotometer sammen med programvaren «NanoDrop 2000/2000C software 40 versjon 1.0» (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) ble benyttet for å kvalitetssikre og kvantifisere de isolerte DNA-prøvene. Før maskinen kunne bli benyttet måtte den bli kalibrert. Dette ble gjort ved å pipetere 2 μl av eluerings bufferen som hadde blitt benyttet under isoleringsprosessen av DNAene på maskinen. Sommerprøvene benyttet dermed eluerings bufferen «Buffer AE Elution buffer 15 ml» (QIAGEN), mens høst- og vinterprøvene benyttet eluerings bufferen fra «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). Etter at maskinen hadde blitt kalibrert ble hver av prøvene kjørt på maskinen, hvor hver av prøvene ble tørket bort med et papir mellom målingene. Når alle målingen hadde blitt gjennomført, ble maskinen rensert ved å pipetere på 2 μl nukleasefritt vann.

4.6 Identifisere bakterieisolater

Etter at bakterienes DNA hadde blitt kvantifisert og kvalitetssikret som bekreftet vellykket isolering, ble 16S ribosomal RNA-genet (rRNA) til de ulike bakterieprøvene amplifisert via PCR før videre gensekvensering for å identifisere bakterienenes art og slekt (Cox et al., 2013). 16S rRNAet er et svært konservert gen som finnes i transkripsjonsmaskineriet hos alle eukaryote og prokaryote celler. På grunn av denne egenskapen kunne man ved amplifisering og avlesning av baserekkefølgen til de variable regionene av dette genet, skille mellom de ulike mikroorganismene (Cox et al., 2013; Haugen, 2019b).

4.6.1 PCR av 16S rRNA sekvens

Før 16S rRNA genet fra bakterieprøvene kunne bli amplifisert på PCR-maskinen, måtte prøvene først bli preparert. En reaksjonsblanding ble først laget. Denne inneholdt reagenetene

QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2x (QIAGEN, Tyskland), «Nuclease-free Water» (Thermo Fisher Scientific Inc., Austin, USA) samt forover- og revers- primerne for 16S-genet. Primersekvensene til 16S-genet og blandingsforholdet til reaksjonsblandingen er presentert i tabell 1 og 2. Reaksjonsblandingen ble samlet oppi et eppendorfrør, 24 µl av løsningen ble så pipettert oppi et PCR-rør og tilsatt 1 µl templat, med unntak én av negativ kontroll som bestod kun av 24 µl reaksjonsblanding. Løsningen i PCR-rørene ble så blandet med utvendig knipsing på rørene etterfulgt av nedspinn ved bruk av sentrifuge. PCR-rørene ble deretter plassert i PCR-maskinen «SimpliAmp™ Thermal Cycler» (Thermo Fisher Scientific). Programmet som ble benyttet er vist nedenfor i Tabell 3. Etter at PCR-analysene var kjørt ble 16S PCR-produktene analysert for vellykket amplifisering av 16S rRNA genen ved bruk av elektroforese og UV-avbildning. Se protokollen under i avsnitt 4.8.

Tabell 1. Oversikt over primersekvensene (5`-3`) og antall basepar 16S målgenet består av.

Primer	Primersekvens (5`-3`)	Målgen	Basepar (bp)
F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S rRNA	1505
R	GYTACCTTGTTACGACTT	16S rRNA	

Tabell 2. Reagent, konsentrasjon og blandingsforholdene til 16S primermiks, for hver enkelt reaksjon.

Reagent	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2x	2x	1x	12,5
16S primer F	10 µM	0,2 µM	0,5
16S primer R	10 µM	0,2 µM	0,5
Nuclease-Free Water			10,5
Templat			1,0
Totalt			25

Tabell 3. PCR-program for 16S rRNA.

Stegene i PCR programmet	Temperatur (°C)	Tid (min)	Sykluser (antall)
	98	00:30	1
	98	00:10	32
	55	00:30	
	72	01:00	
	72	02:00	1
	4	∞	

4.6.2 16S PCR produkt rensing og sekvensering

Ved vellykket amplifisering av 16S rRNA-genet, ble PCR-produktene først rensset før de videre ble sendt til sanger-sekvensering. 16S-genet ble med det rensset fra de andre komponentene i PCR-løsningen. Det ble her benyttet et «GenElute™ PCR Clean-Up Kit» (SIGMA-ALDRICH™, USA), som rensset både enkelt- og dobbelttrådet PCR-amplifikasjonsprodukter mellom 100 bp og 10 kb. Protokollen til PCR clean-up kitte ble benyttet (Merck, u.å.).

Rensede PCR-produkter ble så sendt til sekvensering for å identifisere bakterieisolatene som hadde blitt dyrket opp. Før prøvene ble sendt, måtte de først bli kvantifisert ved hjelp av Qubit® 2.0 Fluorometer (se avsnitt 4.5.1, for utførelse). For å sikre riktig mengde med genmaterialet til sekvenseringen ble det bestemt at prøvene skulle inneholde mellom 20-80 ng/μl. Etter at prøvene var kvantifisert ble 5 μl av hver prøve overført til to ependorfrør, ett for forover og ett for revers primer. 5 μl 16S-primer (5 μM) ble så tilsatt hvert av rørene. Rørene ble markert med en strekkode og et ID-nummer for senere identifisere prøvene. Prøvene ble så sendt til sekvensering hos Eurofins Genomics i Tyskland.

4.7.3 16S-data-analysering

Dataene fra forover- og revers-sekvenseringen av 16S-rRNA-genet, som bestemte rekkefølgen av basene til 16S-rRNA-genet, ble videre analysert og sammenlignet med andre 16S-DNA-sekvenser ved hjelp av dataprogrammet «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST) (NIH, u.å.-a; UiO, 2021b). Ved å sammenligne nukleotidsekvensen til prøvene med sekvensdatabaser kunne man få identifisert de ulike bakterieartene ut ifra en statistisk signifikans blant de lokale likhetene mellom sekvenstreffene som ble gjort. Før sekvensene kunne bli analysert ble det benyttet bioinformatiske verktøy (Haugen, 2019b). Dataprogrammet «BioEdit Sequence Alignment Editor» (BioEdit) ble her benyttet for å redigere nukleotidsekvensene (Nucleics, u.å.).

De grafiske sekvensene ble først analysert, før den skiftlige sekvensen kunne bli redigert. De grafiske sekvensene viste topper for de ulike basene adenin, tymin, cytosin og guanin, de grønne toppene representerte adenin, de røde representerte tymin, de blå representerte cytosin og de svarte representerte guanin (Martinsen, 2020b). Grafiske sekvensene som viste tegn til tydelige topper uten for mye overlapp av andre basetopper ble definert som god sekvens

(kvalitet $x \leq 30$), mens topper med utydelig topp og med mye overlapp av andre baser ble betegnet som en dårlig sekvens (kvalitet $x \leq 19$), i henhold til metoden beskrevet av Kleppen (Kleppen, 2009). Etter at de grafiske sekvensene hadde blitt analysert, ble de skriftlige sekvensene redigert. Sekvensene i N-terminal som hadde dårlig sekvens ble først fjernet, etterfulgt av C-terminal. Dette ble gjort for både forover og revers sekvensene fra alle prøvene. Forover- og revers-sekvensen fra samme prøve ble så slått sammen, ved å markere prøvene etterfulgt av å kjøre «contig assembly program» (CAP). Sekvensen «Contig-0» representerte sekvensen for den sammenslåtte sekvensen, som ble kjørt på analyseprogrammet Nucleotide BLAST (NBLAST) (NIH, u.å.-a).

4.7 Identifisering av ESBL-gener

De identifiserte bakteriene ble videre testet for tilstedeværelse av ESBL-gener. ESBL-genene var av interesse grunnet deres evne til å forårsake resistens mot de viktigste antibiotikaene på markedet, og spesielt med tanke på humanmedisin (FHI, 2015). For at ESBL-genene skulle bli identifisert, ble de isolerte DNA-prøvene kjørt på PCR sammen med primere for ESBL-gener, etterfulgt av analysering på agarosegel. Det ble her benyttet multipleks- samt singelpleks-PCR.

4.7.1 Multipleks og Singelpleks PCR

Det ble førts utført multipleks-PCR, templatet fra bakterieprøvene ble blandet sammen med fire ulike multipleks primermikser og en kontroll primermiks før de ble kjørt på PCR. Hver av multipleks primermiksene (M1-4) bestod av tre primerpar for tre ulike ESBL-gener. En oversikt over de ulike multipleks-primermiksene er vist nedenfor i Tabell 4. Kontroll primermiksen bestod av 16S- og rpoB-genet (gener som er tilstede i alle bakterier) benyttet for å få bekreftet vellykket PCR. En oversikt over kontroll-primermiksen er også vist i Tabell 4. I tillegg til at templatene ble blandet sammen med multipleks primermikser og kontroll primermiks, ble også «QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2x» (QIAGEN, Tyskland) og «Nuclease-free Water» (Thermo Fisher Scientific Inc., Austin, USA) tilsatt (se blandingsforhold i Tabell 5). Hver av primermiksene ble overført til hvert sitt eppendorf, før master mix og nukleasefritt vann ble tilsatt i hvert av rørene. Løsningen ble så vortexet til en homogen løsning. 24 μ l fra hver reaksjonsblandingene ble overført til hvert sitt PCR-rør, som til slutt ble tilsatt 1 μ l templat. Ved siden av prøvene ble det kjørt en negativ kontroll for

hver av primermiksene. Disse ble kjørt uten templat (24 µl reaksjonsblanding) for å utelukke urene prøver. Løsningene i PCR-rørene ble blandet sammen ved knipsing på rørene, etterfulgt av nedspinn ved bruk av sentrifuge. PCR-rørene ble deretter plassert i PCR-maskinen «SimpliAmp™ Thermal Cycler» (Thermo Fisher Scientific). Programmet som ble benyttet er vist nedenfor i Tabell 7. Etter at PCR var kjørt, ble PCR-produktene analysert videre gjennom en DNA-elektroforese. Resultatene fra elektroforesen ble analysert ved bruk av en UV-maskin, som viste bånd ved tilstedeværelse av ESBL, 16S- og rpoB-gener (se protokollen i avsnitt 4.8). Prøve V6 viste tegn til et ESBL-gen fra multipleks primermiks 2 (M2) (se vedlegg 2.1). Det ble dermed utført Singelpleks-PCR for disse tre ESBL-genene fra M2, på prøve V6. Prosedyren ble også gjennomført for resterende vinterprøver, til tross for at det ikke var nødvendig. Forover- og revers-primerene for hver av disse enkle ESBL-genene ble blandet sammen i hvert sitt eppendorfrør før den resterende reaksjonsblandingen ble tilført (se blandingsforhold i Tabell 6). 24 µl av reaksjonsblandingen for enkle ESBL-gener ble overført til hvert sitt PCR-rør, før 1 µl templat fra prøve V6 ble tilsatt i alle PCR-rørene. Tilsvarende ble også gjort for resterende vinterprøver. Prøvene ble så kjørt på PCR-maskinen med samme program som for multipleks-PCR, etterfulgt av DNA-elektroforering og analysering av agarosegel (se protokollen i avsnitt 4.8). Resultatene fra elektroforeringen fortalte hvilket ESBL gen fra M2 som hadde blitt observert i V6 og resterende vinterprøver.

Tabell 4. Oversikt over primersekvensene (5`-3`) for primerne til ESBL-målgenene for de fire ulike multipleks primermiksene og for de to kontroll målgenene 16S og rpoB, i tillegg til oversikt over antall basepar hvert enkelt målgen består av.

Målgen	Primersekvenser (5`-3`)	Basepar (bp)
M1 (multipleks primermiks 1)		
<i>blaCTX-M2-F</i>	F- CGTTAACGGCACGATGAC	404
<i>blaCTX-M2-R</i>	R- CGATATCGTTGGTGGTTCCAT	
<i>blaOXA-F</i>	F- GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
<i>blaOXA-R</i>	R- GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
<i>blaSHV-F</i>	F- AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
<i>blaSHV-R</i>	R- ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
M2		
<i>blaCTX-M9-F</i>	F- TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
<i>blaCTX-M9-R</i>	R- TGATTCTCGCCGCTGAAG	
<i>blaCTX-M1-F</i>	F- TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688
<i>blaCTX-M1-R</i>	R- CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>blaTEM-F</i>	F- CATTTCGGTGTCGCCCTTATTC	800
<i>blaTEM-R</i>	R- CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	

M3		
<i>blaNDM-F</i>	F- TGGCCCGCTCAAGGTATTTT	157
<i>blaNDM-R</i>	R- GTAGTGCTCAGTGTCCGGCAT	
<i>blaVIM-F</i>	F- ATAGAGCTCAGTGTGTCGGCAT	564
<i>blaVIM-R</i>	R- TTATTGGTCTATTTGACCGCGT	
<i>blaKPC-F</i>	F- TCCGTTACGGCAAAAATGCG	460
<i>blaKPC-R</i>	R- GCATAGTCATTTGCCGTGCC	
M4		
<i>blaCMY-F</i>	F- GCATCTCCCAGCCTAATCCC	188
<i>blaCMY-R</i>	R- TTCTCCGGGACAACTTGACG	
<i>blaOXA-48-F</i>	F- GCTTGATCGCCCTCGATT	281
<i>blaOXA-48-R</i>	R- GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	
<i>blaIMP-F</i>	F- ACAGGGGGAATAGAGTGGCT	393
<i>blaIMP-R</i>	R- AGCCTGTTCCCATGTACGTT	
K (kontroll)		
<i>rpoB-F</i>	F- CAGGTCGTCACACGGTAACAAG	512
<i>rpoB-R</i>	R- GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC	
<i>16S-F</i>	F- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1505
<i>16S-R</i>	R- GYTACCTTGTTACGACTT	

Tabell 5. Reagent, konsentrasjon og blandingsforholdene til multipleks primermiks og kontroll primermiks, for hver enkelt reaksjon.

Reagent	Startkonsentrasjon	sluttkonsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2x	2x	1x	12,5
10x Primermix	2 µM av hver primer	0,2 µM	2,5
Nuclease-Free Water			9,0
Templat			1,0
Totalt			25

Tabell 6. Reagent, konsentrasjon og blandingsforholdene til Singelpleks primermiks, for hver enkelt reaksjon.

Reagent	Startkonsentrasjon	sluttkonsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2x	2x	1x	12,5
Primer F	10 µM	0,2 µM	0,5
Primer R	10 µM	0,2 µM	0,5
Nuclease-Free Water			10,5
Templat			1,0
Totalt			25

Tabell 7. PCR-program for multipleks- og singelpleks-PCR

Stegene i PCR programmet	Temperatur (°C)	Tid (min)	Sykluser (antall)
Aktivering	95	15:00	1
Denaturering	94	00:30	28
Annealing	62	01:30	
Elongering	72	01:30	
Endelig elongering	72	10:00	1
Avkjøling	4	∞	

4.8 Elektroforering og UV analyse av 16S og ESBL-gener

PCR-produktene fra 16S- og multipleks- og singelpleks-PCR ble videre analysert for tilstedeværelser av 16S- og ESBL-gener, i tillegg til kontroll genene 16S og rpoB. PCR-produktene ble dermed først kjørt gjennom en DNA-elektroforese, etterfulgt av UV-analysering av gelen. DNA-elektroforesen separere ESBL-, 16S- og rpoB-genene ut ifra deres lengde (antall basepar). Ved å analysere lengden på båndene som blir synliggjort ved UV-lys kunne man identifisere vellykket 16S-amplifikasjon og identifisere hvilke ESBL-gener som var tilstede i de ulike bakteriene.

Før elektroforeringen av PCR-produktene, ble det preparert en 1,5% agarosegel. Først ble gelstøpningsutstyret satt sammen, et gelkar ble satt i klem oppi et kar med gummivegger og så ble to kammer for 8-15 prøver plassert oppi gelkaret (Didakt, u.å.; UiO, u.å.). For å unngå en skeiv gel, ble gelkaret målt i vater. Etter at støpeformen til gelen var ferdig ble gelløsningen preparert, blandingsforholdene for liten gel er vist under i tabell 8. «SeaKem® LE Agarose» (LONZA, Rockland, ME USA) ble først blandet sammen med 1x TEA bufferløsning oppi en 500 ml Scott Duran glassflaske. Agarosepulveret ble løst opp i bufferløsningen ved å varme opp løsningen i en mikrobølgeovn på maks varme. Etter at pulveret hadde blitt løst opp ble løsningen kjølt ned til ca. 70 °C før «peqGREEN DNA/RNA Dye» (Peqlab) ble tilsatt, løsningen ble så helt forsiktig oppi gelkaret for å unngå luftbobler. For 16S sommerprøver, ble det benyttet «GelRed™ Nucleic Acid Stain» (BIOTIUM) istedenfor peqgreen dye. Både peqgreen og gelred dye, farger ds- og ss-DNA, som gjør prøvene synlig ved UV-lys (Biotium, u.å.; Geneon, u.å.). Gelen stivnet på ca. 30 minutter, gelkaret ble med det løsnet fra støpeformen og plassert oppi elektroforesekaret. Kammene i gelen ble så fjernet forsiktig, gelen var så klar for elektroforering.

For at PCR-produktene skulle kunne synke ned i agarosebrønnene og bli synliggjort under elektroforeringsprosessen, ble PCR-produktene tilsatt «AGAROSE GEL LOADING DYE, 6x» (VWR) i tillegg til «Nuclease-Free Water» (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA) for å tynne ut løsningen (Ampliqon, u.å.). Blandingsforholdene er vist nedenfor i tabell 9. 9 µl fra hver av løsningene med PCR-produktene ble pipetert over i brønnene til agarosegelen. I tillegg ble det pipetert over 2 µl «Quick-Load® 100 bp DNA Ladder» (NEW ENGLAND BioLabs Inc, United Kingdom) i den første og siste brønnen på agarosegelen. Denne ladderens ble benyttet for både 16S- og ESBL-prøvene, men det ble benyttet «100 bp DNA Ladder» (NEW ENGLAND BioLabs Inc, United Kingdom) for 16S-sommerprøvene. I motsetning til «Quick-Load® 100 bp DNA Ladder» måtte «100 bp DNA Ladder» bli fortynnet før den ble benyttet. I tillegg ble 6 µl av ladderløsningen pipetert over i gelen. Oversikt over reagent, konsentrasjon og blandingsforholdene til ladderene er vist i Tabell 10 og 11 nedenfor. Ladderne ble benyttet under elektroforeringsprosessen som en molekylstandard, som besto av 12 bånd mellom 100-1517 bp med økt intensitet på 500 og 1000 bp som referansebånd (Biocompare, u.å.; Biolabs, u.å.).

Etter at alle prøvene og ladderne hadde bli overført til gelen, ble elektroforesekaret koblet til strøm for at de amplifiserte ESBL-, 16S- og rpoB-genene skulle vandre ned i gelen. Karet ble tilsatt 80 volt. Ved å følge fargen til loading dyen, kunne man identifisere når genene hadde vandre langt nok i gelen (reagents, 2020). Elektroforesekaret ble så slått av og gelen ble videre avbildet med UV-lys. Det ble her benyttet «Molecular Imager® Gel Doc™ XR» (BIO-RAD) for avbildning, med hjelp av programvaren Quantity One. Bildene ble videre analysert for synlige bånd og deres lengde for å identifisere hvilke gener som ble observert.

Tabell 8 (5). Reagent og blandingsforhold for liten 1,5% agarosegel

Reagent	Volum per gel
Agarosepulver	0,75 g
1x TEA bufferløsning	50 ml
peqGREEN dye	1 µl

Tabell 9 (6). Reagent og blandingsforhold for preparering av PCR-produkt for elektroforering

Reagent	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
Nukleasefritt vann	2x	1x	6 µl

Agarose gel loading dye, 6x	6x	1x	2 µl
PCR produkt			3 µl
Totalt			11 µl

Tabell 10 (7). Reagent, konsentrasjon og blandingsforholdene til 100 bp DNA Ladder

Reagent	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
100 bp DNA Ladder	500 µg/ml	20 µg/ml	2 µl
Dye			8 µl
1x TEA bufferløsning	1x	0,8x	40 µl
Totalt			50 µl

Tabell 11 (8). Reagent, konsentrasjon og blandingsforholdene til Quick-Load® 100 bp DNA Ladder

Reagent	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
Quick-Load® 100 bp DNA Ladder	50 µg/ml	50 µg/ml	2 µl

4.9 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Etter at bakteriene hadde blitt identifisert og testet for ESBL-gener ble de videre testet for grad av antibiotikumresistens mot de fire klinisk viktigste antibiotikagruppene β-Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Det ble benyttet en «Minimum Inhibitory Concentration» (MIC) test (Eurolab, u.å.) som måler den laveste konsentrasjon et medikament må ha for at den skal ha en effekt. Oversikt over hvilke antibiotikum, og deres konsentrasjoner som de ulike prøvene ble testet for er vist i tabell 12 nedenfor. Før prøvene kunne bli MIC-testet måtte prøvene fortynnes i Ringers løsning til en konsentrasjon på 0,5 MCFariand. Kolonier fra de rendyrkede bakteriekulturene ble først podet sterilt over til en ringersløsning. Løsningen ble så vortekset og sammenlignet med konsentrasjonen til MCFariand 0,5. Når løsningen til de ulike bakterieprøvene hadde samme konsentrasjon som MCFariand 0,5, ble de videre strøket utover «Muller Hinton agar» (MH-agar) med sterile vattpinner. Vattpinnen ble dyppet en gang i løsningen, før den ble strøket gjevnt utover hele MH-agaren. Når løsningen hadde tørket, ble en MIC-strips fra de ulike antibiotikumene lagt forsiktig på en skål med en steril pinsett. Det ble kjørt parallellt for hvert antibiotikum. Agarskålene ble så lagt opp ned i plastposer, i et varmeskap på 37 °C, i 24t. Det ble kjørt

MIC-test for alle høst- og vinterprøvene, men på grunn av at sommerprøvene ble nedfrost for sent ble kun sommerprøve S3, S6 og S7 MIC-testet. I stedet for å MIC-teste høst- og vinterprøvene etter at bakteriene var identifisert og testet for ESBL-gen, ble disse prøvene MIC-testet samtidig som de ble isolert. For å effektivisere labforsøket, slik ble alle bakteriene MIC-testet og ikke kun de av interesse.

Tabell 12. Oversikt over hvilket antibiotikum det ble kjørt MIC-test for og deres konsentrasjoner

Antibiotika gruppe	Antibiotika undergruppe	Antibiotikum type	Konsentrasjon (mg/L)	Mekanisme
β-Laktam	Kefalosporin	Cefepime (FEP)	0,002-32	Inhiberer cellevegg syntese
		Cefotaxime (CTX)	0,016-256	
	Penicillin	Ampicillin (AMP)	0,016-256	
		Penicillin G (P)	0,016-256	
		Amoxicillin* Clavulanic acid (AUG)	0,016-256*	
Karbapenem	Meropenem (MRP)	0,002-32		
Kinoloner	Andre generasjon quinolones	Ciprofloxacin (CIP)	0,002-32	Inhiberer nuklease syre syntese
Makrolider		Erythromycin (E)	0,016-256	Inhiberer protein syntese (binder seg til 50S Ribosomal subunit)
Tetrasykliner		Tetracycline (TE)	0,016-256	Inhiberer protein syntese (binder seg til 30S Ribosomal subunit)

(for & spesialisthelsetjenesten, 2019; Reygaert, 2018; Riaz et al., 2020)

4.10 Helgenomsekvensering

Ut fra 16S-sekvensering og MIC-testene, ble de tre mest interessante bakteriene valgt for videre helgenomsekvensering. Dette ble gjort for å identifisere resistens- og virulensgener av interesse, i tillegg til å identifisere bakteriens artsnavn. Bakterierprøve S9, H8 og V6, ble her valgt. DNA prøvene av disse bakteriene ble målt med qubit før de ble sendt til Novogene hvor de så ble helgenomsekvensert. Rådata fra Illumina-sekvenseringen ble satt sammen (assembled) i Galaxy-plattformen med verktøyene Trimmomatic og SPADIS (Europa,

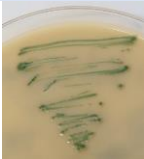


u.å.). De assemblede helgenomene ble annotert ved hjelp av PROKKA, og tilstedeværelsen av resistens- og virulens- gener ble undersøkt med Galaxy-tjenesten ABRicate som undersøkte sekvensene opp i mot databasene CARD, NDARO (NCBI) og VFDB (NIH, u.å.-c; Seemann, 2014).

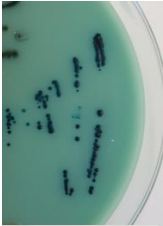



5.0 Resultater

5.1 Fenotypisk




Fra innsjøene (Langen, Midsjøvannet, Østensjøvannet og Andedammen) ble det hentet ut henholdsvis én vannprøve per årstid (sommer, høst og vinter). Disse vannprøvene ble filtrert og dyrket på Brilliance-ESBL og -CRE-agar ved 37 °C i 48 timer. Grønne, brune og rosa kolonier fra ESBL-skålene og blå, grønne og blekrosa kolonier fra CRE-skålene ble valgt for videre rendyrking og analysering. Ut ifra type vekstmedium og farge på koloniene til bakteriene som ble dyrket opp, kunne man gjøre en antagelse om hvilken bakterieslekt som hadde blitt dyrket opp på ESBL og CRE skålene ved bruk av agarprotokollene. Oversikt over uttaksted, vekstmedium, kolonifarge og antakelse av bakteriens slekt er vist i Tabell 13.





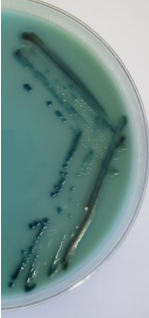
Tabell 13. Fenotypisk deteksjon av sommer-, høst- og vinterprøvene dyrket på ESBL- og CRE-skåler, ut ifra koloniens vekstmedium og farge

Prøve	Uttakssted	Vekst medium	Bilde av bakteriene på ESBL- og CRE skåler	Kolonifarge	Fargescreeing Bakterie slekt
Sommerprøver					
S3	Midsjø	ESBL		Grønn	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> eller <i>Citrobacter</i>
S6	Andedammen	ESBL		Brun	<i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
S7	Felleskjøpet	ESBL		Brun	<i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>

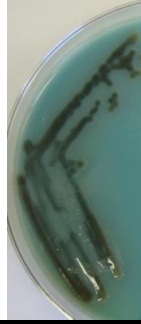
S9	Langen	CRE		Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia eller Citrobacter (KESC)</i>
S10	Langen	CRE		Grønn	<i>Udefinert</i>
S11	Langen	CRE		Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia eller Citrobacter (KESC)</i>
S12	Midsjø	CRE		Blekrosa	<i>E.coli</i>

Høstprøver

H1	V2 Midsjø	ESBL		Brun	<i>Proteus, Morganella eller Providencia</i>
H2	V2 Midsjø	ESBL		Brun	<i>Proteus, Morganella eller Providencia</i>
H3	V3 Felleskjøpet	ESBL		Rosa	<i>E. coli</i>

H4	V4 Andedammen	ESBL		Rosa	<i>E. coli</i>
H8	V2 Midsjø	CRE		Blekrosa	<i>E. coli</i>
Vinterprøver					
V1	Andedammen	ESBL		Rosa	<i>E. coli</i>
V3	Felleskjøpet	ESBL		Brun	<i>Proteus,</i> <i>Morganella</i> eller <i>Providencia</i>
V5	Andedammen	CRE		Blå/grønn	Udefinert

V6 Andedammen CRE



Grønn

Udefinert

(Oxoid, u.å.-a; Oxoid, u.å.-b; Oxoid, u.å.-c)

Resultatene vist i Tabell 13, viser at sommerprøvene S3, S6 og S7, høstprøvene H1, H2, H3 og H4, og vinterprøvene V1 og V3 som vokste på ESBL-skåler, produserer bakteriene extended spectrum β -Lactamase (Oxoid, u.å.-c). Bakteriene dannet grønne, brune og rosa kolonier, ut ifra protokollen tydet tilstedeværelse av grønne kolonier på ESBL-skåler vekst av bakterieslektene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter*, mens tilstedeværelse av brune kolonier tydet på vekst av bakterieslektene *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*, og tilstedeværelse av rosa koloner tydet på vekst av bakterieslekten *E.coli*. Prøve S3, viste grønne kolonier på ESBL-skålene, som tydet på vekst av bakterieslektene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter*. I motsetning til de grønne koloniene på ESBL-skålene var de brune og de rosa koloniene vanskeligere å skille mellom, på grunn av lignende fargenyanser. Til tross for dette ble prøve S6, S7, H1, H2 og V3, deffinert som brune kolonier, som tydet på vekst av bakteriestammene *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*. Prøve H3, H4, V1 og V3 ble deffinert som rosa, som tydet på vekst av *E.coli*.

Sommerprøvene S9, S10, S11 og S12, høstprøve H8, og vinterprøvene V5 og V6 vokste på CRE-skåler. Disse skålene fremmet vekst av karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae*. Rosa kolonier tydet på vekst av karbapenem-resistente *E.coli* bakterier og blå kolonier tydet på vekst av karbapenem resitente *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* (KESC) (Oxoid, u.å.-b). Koloniene som avvek fra fargene rosa eller blå, var ikke CRE-bakterier. Prøvene S9 og S11 viste en tydelig blå farge på koloniene sine, som tydet på vekst av karbapenem-resistente *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* (KESC) på disse prøvene. Prøvene S12 og H8 vist en svak rosa-farge, som kunne tyde på tilstedeværelse av karbapenem-resistente *E.coli* bakterier. Til forskjell fra de andre prøvende dyrket på CRE-medium, viste prøvene S10, V5 og V6 en grønn/blå fargetone som tydet på vekst av andre karbapenem resistene bakterier enn fra *Enterobacteriaceae*.

5.2 Kvantifisering og kvalitetsikring

Etter at alle bakteriekolonierne fra ESBL- og CRE-skålene hadde blitt isolerte, måtte prøvene bli kvantifisert og kvalitetssikret for å sikre at isoleringen av DNAene hadde vært vellykket. Det ble gjort ved å hjelp av Qubit og Naondrop, hvor Qubit kvantifiserte prøvene mens Nanodrop både kvantifiserte og kvalifiserte prøvene. Resultatene fra målingen er vist under i tabell 14.

Tabell 14. Kvantifisering og kvalitetsikring av isolerte sommer-, høst- og vinterprøvene, ved bruk av instrumentene Qubit og Nanodrop.

Prøve:	Qubit DNA konsentrasjon (ng/μl)	Nanodrop DNA konsentrasjon (ng/μl)	Renhet A _{260/280}	Renhet A _{260/230}
Sommerprøver				
S3	21,3	32,0	1,76	2,27
S6	2,63	13,9	1,38	1,36
S7	5,99	10,8	1,61	6,92
S9	81,4	84,3	1,83	2,25
S10	35,5	49,4	1,77	2,50
S11	2,62	17,4	1,69	2,62
S12	8,2	13,6	1,64	4,08
Høstprøver				
H1	15,7	20,8	1,45	0,76
H2	31,0	20,9	1,73	2,11
H3	14,2	5,9	1,98	-0,91
H4	10,7	15,7	1,63	1,96
H8	11,8	12,3	1,83	-1,85
Vinterprøver				
V1	6,67	11,0	1,37	0,65
V3	28,8	22,1	1,88	5,19
V5	41,6	45,2	1,82	2,55
V6	36,7	33,9	1,72	1,36

Renhetsmålingene (A_{260/280} og A_{260/230}) fra nanodrop med for høye eller for lave verdier er markert i rødt.

Qubit kvantifiserte de isolerte sommer-, høst- og vinterprøvene ved å måle deres DNA-konsentrasjonen. Målingene viser et stort spekter fra 2,62 ng/μl til 81,4 ng/μl. Da ingen qubit-verdier var negative indikerer dette at isolering av alle bakterieprøvene var vellykket. Dette funnet blir også underbygget av nanodrops konsentrasjonsmålinger av DNA som heller ikke viser tegn til negative verdier, og som strekker seg fra 5,9 ng/μl til 84,3 ng/μl. Dermed er de kvantitative resultatene fra qubit- og nanodrop-målingene relativt like, kun med et lite avvik

tilsom skiller dem, til tross for at qubits målingene er mer spesifikke enn nanodrop sine målinger (TTB, u.å.-b). Nanodrop kvalifiserte også alle bakterieprøvene ved vurdering av DNAets renhet, ved å se på absorbansforholdet til 260/280 nm og 260/230 nm (Scientific, u.å.). Absorbansforholdet til bakterieprøvene mellom 260 nm og 280 nm viser målinger mellom 1,37-1,98. For et rent DNA som absorberes ved 260 nm skulle disse verdiene ligge på ~1,8. Mye lavere verdier kan indikere forurensinger av proteiner, fenoler eller annet som absorberes ved 280 nm (Scientific, u.å.). Bland alle prøvene viste prøve S6, H1 og V1 mye lavere verdier enn 1,8, med verdiene 1,38 for prøve S6, 1,45 for prøve H1 og 1,37 for prøve V1. Dette tydet på mulig forurensinger av proteiner, fenoler eller annet som absorberes ved 280 nm. De resterende prøvene viste verdier rundt 1,8, som indikerte at disse prøvene hadde et rent og vellykket isolert DNA med fravær av forurensinger med absorbans ved 280 nm. Resultatene fra absorbansmålingene av absorbansforholdet mellom 260 nm og 230 nm viste et mye bredere spekter av målinger enn målingene ved $A_{260/280}$, med verdier som strekker seg fra 0,65 til 6,92. Målingene av absorbansforholdet mellom 260 nm og 230 nm, skulle ligge på en verdi mellom 2,0-2,2 eller høyere for et rent DNA (Scientific, u.å.; TTB, u.å.-a). Mye lavere verdier kan indikere forurensinger med absorbans ved 230 nm, som EDTA, karbohydrater og fenoler. Bakterieprøve S6, H1, H4, V1 og V6 viser verdier under 2, som indikerer at disse prøvene er forurenset med molekyler som beskrevet over. De resterende prøvene viser verdier over 2, som indikerer rene DNA prøver.

5.3 16S sekvensering

For å indentifisere bakttereisolatene som hadde blitt dyrket opp på CRE- og ESBL-skålene, ble 16S rRNA-genet i sommer-, høst- og vinterprøvene først sekvensert, før videre analyse via analyseprogrammet Nucleotide BLAST. Før prøvene kunne bli sekvensert måtte 16S rRNA-genet først bli amplifisert. Dette ble gjort via PCR. For å sikre vellykket amplifisering, ble prøvene kjørt på gelelektroforese som ble avbildet av «Molecular Imager® Gel Doc™ XR» (BIO-RAD). Gelbildene ble undersøkt for synlige bånd av 16S rRNA-genet med en baseparlengde på 1505 pb, mot en 100 bp DNA-ladder. Resultatene fra gelelektroforesen er vist i vedlegg 1.1, og bekrefter vellykket amplifisering av alle prøvene. PCR-produktene ble videre rensert før de kunne bli sendt til sekvensering. For å kunne sende prøvene måtte DNA-konsentrasjonen av prøvene bli målt for å bekrefte tilstedeværelse av 16S rRNA genet. Qubit ble her benyttet, resultatene fra qubit-målingen er vist i vedlegg 1.2. Den foretrukede DNA-konsentrasjonen lå på mellom 20-80 ng/μl, og resultatene fra qubit-målingen viser at alle med

unntak av prøve S7 og S12 lå innenfor dette intervallet. Prøve S7 lå på 15,4 og prøve S12 lå på 7,67, men til tross for dette viste ingen av prøvene negative verdier som bekreftet tilstedeværelse av 16S rRNA-genet. Vellykket amplifisering og rensing av 16S rRNA genet, ble videre sendt til sekvensering.

Ferdig sekvensert 16S rRNA gen ble sendt som rådata, og nukleotidsekvensene måtte derfor bli redigert for å fjerne dårlige sekvenser i start- og sluttstykket av både forover og revers sekvensene til alle bakterieprøvene. Forover og revers sekvensene ble så slått sammen før de så ble kjørt på analyseprogrammet Nucleotide BLAST (NBLAST). Rådataen for alle bakterieprøvene er vist i vedlegg 1.3, og resultatene er oppsummert i tabell 14.

Tabell 14. Sekvens screening av 16S rRNA genet til sommer, høst og vinterprøvene, ved bruk av analyseprogrammet NBLAST.

Prøve:	16S rRNA gen screening fra BLAST	Identitet (%)	Query coverage (%)
Sommerprøver			
S3	<i>Erwinia persicina/ rhapontici</i>	99,86%	100%
S6	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	100%
S7	<i>Pseudomonas protegens</i>	100%	100%
S9	<i>Enterobacter ludwigii</i>	100%	100%
S10	<i>Aeromonas caviae/ hydrophila</i>	100%	100%
S11	<i>Enterobacter ludwigii/ mori</i>	99,93- 99,86%	100%
S12	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	99,93%	100-99%
Høstprøver			
H1	<i>Pseudomonas protegens</i>	99,86%	100%
H2	<i>Pseudomonas protegens</i>	99,86%	100%
H3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,93%	100-99%
H4	<i>Pseudomonas koreensis</i>	100%	100%
H8	<i>Pseudomonas protegens</i>	100%	100%
Vinterprøver			
V1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> eller <i>Klebsiella oxytoca</i>	99,71%	100%
V3	<i>Pseudomonas sp.</i>	99,57%	99%
V5	<i>Rhizobium miluonense</i>	99,85%	100%
V6	<i>Brucella ciceri/ intermedia, Aureimonas altamirensis</i> eller <i>Ochrobactrum ciceri/intermedium</i>	99,56%	100%

Sekvens sceeningen av 16S rRNA genene til sommer, høst og vinterprøvene ved bruk av analyseprogrammet Nucleotide BLAST identifiserte de ulike bakterieartene som var målt opp mot identitet- og query coverage posent. I sommerprøvene ble det identifisert bakttereartene

Erwinia persicina/ rhapontici, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas protegens*, *Enterobacter ludwigii*, *Aeromonas caviae/ hydrophila*, *Enterobacter ludwigii/ mori* og *Herbaspirillum frisingense*, i høstprøvene ble det identifisert bakterieartene *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas fluorescens* og *Pseudomonas koreensis*, og i vinterprøvene ble det identifisert bakterieartene *Pseudomonas fluorescens* eller *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium miluonense* og *Brucella ciceri/ intermedia*, samt *Aureimonas altamirensis* eller *Ochrobactrum ciceri/intermedium*. Rådataen presentert i Vedlegg 1.3, viser at det var disse bakterieartene innenfor hver prøve som hadde høyest prosent innenfor identitet og query coverage, med en identitets-prosent på mellom 99,56-100% og en query-coverage prosent på 99-100%. Det vil si at disse bakterieartenes sekvens viste 99,56-100% likhet med 99-100% av lengden til 16S rRNA genet som hadde blitt analysert, som viser at resultatene er robuste.

5.4 Multi- og singelpleks av ESBL gener

Det ble utført multipleks-PCR på de isolerte bakterieprøvene fra henholdsvis sommer, høst og vinter. Hver av prøvene ble kjørt sammen med fire forskjellige multipleks primermikser (M1-4) og en kontroll primermiks. Primermiksene inneholdt tre primerpar for tre ulike ESBL-gener og kontroll primermiksen inneholdt to primerpar for 16S og rpoB-genet. Etter at prøvene sammen med primermiksen hadde blitt kjørt på PCR, ble PCR-produktene videre elektroforert gjennom en 1,5% agarosegel. Gelen ble videre avbildet med «Molecular Imager® Gel Doc™ XR» (BIO-RAD). Rådataen av gelbildene fra elektroforeringen er vist i Vedlegg 2.1. Gelbildene ble analysert for synlige bånd. Identifiserte bånd ble videre målt opp mot en 100 bp DNA-ladder for å identifisere båndets lengde (bp). Båndets lengde ble så sammenlignet med lengden til ESBL-, 16S- og rpoB-genene til primermiksen som hadde blitt benyttet for å identifisere hvilket gen som hadde blitt observert. Se Tabell 4, for genes lengde. Tabell 15 viser en oversikt over hvilke gener som ble observert fra de isolerte bakterieprøvene.

Tabell 15. Resultater fra multipleks-PCR, oversikt over tilstedeværelse av ESBL-gener og kontroll genene 16S- og rpoB i sommer-, høst- og vinterprøvene.

Prøve	M1			M2			M3			M4			K	16S
	CTX-M2	OXA	SHV	CTX-M9	CTX-M1	TEM	NDM	VIM	KP C	CMY	OXA	IMP		
Sommerprøver														
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Høstprøver														
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vinterprøver														
V1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
V3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
V5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
V6	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-identifisert negative prøver

+ identifisert positiv prøver

(+) mulig identifisert positiv prøve

Alle prøvene hadde fått identifisert ett av kontrollgenene, men ingen av prøvene fikk identifisert begge kontrollgenene samtidig. Av sommerprøvene ble det observert rpoB-gen for prøver S7, S9, S10 og S11, mens for prøvene S3, S6 og S12 ble det observert 16S-gen. For høstprøvene ble det observert rpoB-gen for prøve H1, H2 og H8, og 16S-gen for prøve H3 og H4. Av vinterprøvene ble det kun observert rpoB-gen for prøve V3, mens for de resterende prøvene V1, V5 og V6 ble det observert 16S-gen. Av ESBL-gene ble det kun observert ett ESBL-bånd i vinterprøve V6 fra multipleks primermiks M2. På grunn av at alle ESBL-gene til M2 lå mellom referansebåndene på 500 og 1000 bp, ble det vanskelig å skille hvilket ESBL-gen som hadde blitt observert. Man kunne derfor ikke avkrefte noen av ESBL-genene i M2 for prøve V6. For å kunne identifisere hvilket av ESBL-genene i M2 som hadde blitt observert i prøve V6, ble det kjørt singelpleks-PCR for disse tre genene (CTX-M9-, CTX-M1- og TEM-gen). I tillegg til disse gene ble det også kjørt singelpleks-PCR for 16S-genet for å bekrefte vellykket PCR. Etter at prøve V6, sammen med de enkle forover- og revers-primerne, hadde blitt kjørt på PCR, ble PCR-produktene videre elektroforeert og avbildet med «Molecular Imager® Gel Doc™ XR» (BIO-RAD). Rådataen av gelbildene fra elektroforeringen er vist i Vedlegg 2.2. Gelbildene ble analysert for synlige bånd for CTX-

M9-, CTX-M1- og TEM-genet. Resultatet fra singelpleks-PCR for gene i M2 fra V6 er vist i tabell 16.

Tabell 16. Resultater fra singelpleks PCR, oversikt over tilstedeværelse av ESBL-genen CTX-M9, CTX-M1 og TEM, og 16S-genet i vinterprøve 6.

Prøve:	M2			
	CTX-M9	CTX-M1	TEM	16S
V6	+	-	-	+
Negativ	-	-	-	-

Resultatene fra singelpleks-PCR i Tabell 15, viser at CTX M9-genet ble identifisert i vinterprøve 6. I tillegg ble 16S-genet identifisert for V6, som bekreftet vellykket PCR.

5.5 MIC

Alle de arts/slekts-identifiserte bakterieprøvene fra høst- og vinter-, og sommerprøve S3, S6 og S7 ble videre testet for grad av antibiotikumresistens mot de fire klinisk viktigste antibiotikagruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Det ble her benyttet MIC-tester. Hver av bakteriene ble først blandet sammen med ringers løsning til en konsentrasjon på MCFariand 0,5. Løsningen ble deretter strøket utover på MH-skåler før en MIC-strips ble lagt midt på skålen og inkubert ved 37 °C i 24t. MIC-stripsene som ble benyttet besto av ulike antibiotikum fra de fire antibiotika-klassene, (se Tabell 12). For hver bakterieprøve ble det kjørt parallellt med MIC-strips for hvert antibiotikum. Etter at prøvene hadde blitt inkubert, ble sonen som ble dannet rundt stripsen avlest. Rådataen fra MIC-testingen er vist i Vedlegg 3, og resultatene fra gjennomsnittsmålingene av rådataen og klinisk MIC-bruddpunkt for *Pseudomonas* spp. er vist i tabellene 17, 18 og 19 nedenfor. Er ikke klinisk MIC-bruddpunkt for de resterene bakterie slektende på grunn av manglende data om disse bakteriene.

Tabell 17. MIC konsentrasjon (mg/L) av antibiotika gruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner på sommerprøve S3, S6 og S7, og klinisk MIC bruddpunkt av de fire antibiotikaklassene for *Pseudomonas* spp (prøve S6 og S7).

Antibiotika gruppe	Antibiotika undergruppe	Antibiotika	S3 (<i>Erwinia</i> spp.) (mg/L)	S6 (<i>Pseudomonas</i> spp.) (mg/L)	S7 (<i>Pseudomonas</i> spp.) (mg/L)	EUCAST Klinisk MIC bruddpunkt	EUCAST Klinisk MIC bruddpunkt

						for <i>Pseudomonas spp.</i> (mg/L)	for <i>Pseudomonas spp.</i> (mg/L)
						S _≤	R _{>}
β-Laktam	Kefalosporin	Cefepime	0,25	0,875	1,0	0,001	8
		Cefotaxime	1,75	20	11	-	-
	Penicillin	Ampicillin	≥ 256	≥ 256	-	-	-
		Penicillin G	≥ 256	-	≥ 256	-	-
		Amoxicillin	-	144	144	-	-
	Karbapenem	Clavulanic acid	*				
Meropenem		0,02	1,5	0,094	2	8	
Kinoloner	Andre generasjon quinolones	Ciprofloxacin	X	0,047	0,064	0,001	0,5
Makrolider		Erythromycin	-	≥ 256	-	-	-
Tetrasykliner		Tetracycline	-	1,5	-	-	-

(-) ikke resistent, (X) for dårlig vekst til å ta målinger. Overskridende verdier er markert i **rødt**. S står for standard doseringsregime, verdier lik eller under S medfører terapeutisk suksess ved bruk av vanlig dosering av medikamentet. R står for resistens, ved verdier over R vil ingen form for økt dosering føre til terapeutisk suksess (Eucast, 2022)

Ingen av prøvene viste tegn til multiresistens, men prøve S6 var resistent mot to antibiotika klasser (penicillin og makrolider) i motsetning til prøvene S3 og S7 som kun viste resistens mot én antibiotika klasse (penicillin). Ved sammenligning av klinisk MIC-bruddpunkt-verdier for prøvene S6 og S7, visten ingen av disse tegn til resistens.

Tabell 18. MIC konsentrasjon (mg/L) og klinisk MIC bruddpunkt for antibiotikagruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner for høstprøve H1, H2, H3, H4 og H8.

Antibiotika gruppe	Antibiotika undergruppe	Antibiotika	H1 (<i>Pseudomonas spp.</i>) (mg/L)	H2 (<i>Pseudomonas spp.</i>) (mg/L)	H3 (<i>Pseudomonas spp.</i>) (mg/L)	H4 (<i>Pseudomonas spp.</i>) (mg/L)	H8 (<i>Pseudomonas protegens</i>) (mg/L)	EUCAS T Klinisk MIC bruddpunkt for <i>Pseudomonas spp.</i> (mg/L)	EUCAS T Klinisk MIC bruddpunkt for <i>Pseudomonas spp.</i> (mg/L)
								S \leq	R $>$
β -Laktam	Kefalosporin	Cefepime	1,5	0,25	0,375	0,875	4,5	0,001	8
		Cefotaxime	56	40	7	14	96	-	-
	Penicillin	Ampicillin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	-	-
		Penicillin G	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	-	-
		Amoxicillin* Clavulanic acid	$\geq 256^*$	$\geq 256^*$	$\geq 256^*$	$\geq 256^*$	$\geq 256^*$	-	-
Karbapenem	Meropenem	0,25	0,44	0,25	0,157	≥ 32	2	8	
Kinoloner	Andre generasjon quinolones	Ciprofloksacin	0,109	0,094	0,032	0,047	1	0,001	0,5
Makrolider		Erythromycin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	-	-
Tetrasykliner		Tetracycline	0,5	1,125	1,0	1,125	8,25	-	-

(-) ikke resistent, (X) for dårlig vekst til å ta målinger. Overskridende verdier er markert i **rødt**. S står for standard doseringsregime, verdier lik eller under S medfører terapeutisk suksess ved bruk av vanlig dosering av medikamentet. R står for resistens, ved verdier over R vil ingen form for økt dosering føre til terapeutisk suksess (Eucast, 2022).

Prøve H8 er multiresistent, og viser resistens mot antibiotika klassene penicillin, karbapenem, kinoloner og makrolid. De resterende prøvene er ikke multiresistente men er resitente mot to antibiotika klasser (penicillin og makrolid). Ut ifra EUCAST verdiene viser ingen av prøvene

tegn til resistens med unntak av prøve H8 med en overskridende klinisk MIC-bruddpunktsverdi for antibiotikumet meropenem og ciprofloxacin.

Tabell 19. MIC konsentrasjon (mg/L) av antibiotika gruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner på vinterprøve V1, V3, V5 og V6, og klinisk MIC bruddpunkt av de fire antibiotikaklassene for *Pseudomonas spp* (prøve V1 og V3).

Antibiotika gruppe	Antibiotika undergruppe	Antibiotika	V1 (<i>Pseudomonas spp.</i>) (mg/L)	V3 (<i>Pseudomonas spp.</i>) (mg/L)	V5 (<i>Rhizobium spp.</i>) (mg/L)	V6 (<i>Brucella intermedia</i>) (mg/L)	EUCAST Klinisk MIC bruddpunkt for <i>Pseudomonas spp.</i> (mg/L)	EUCAST Klinisk MIC bruddpunkt for <i>Pseudomonas spp.</i> (mg/L)
							S \leq	R $>$
β -Laktam	Kefalosporin	Cefepime	0,875	3,5	0,125	≥ 32	0,001	8
		Cefotaxime	28	64	0,44	≥ 256	-	-
	Penicillin	Ampicillin	-	≥ 256	0,44	≥ 256	-	-
		Penicillin G	≥ 256	128	10	≥ 256	-	-
		Amoxicillin* Clavulanic acid	$\geq 256^*$	$\geq 256^*$	0,064	$\geq 256^*$	-	-
Karbapenem	Meropenem	0,5	1,25	0,0035	0,75	2	8	
Kinoloner	Andre generasjon quinolones	Ciprofloxacin	0,035	0,032	0,625	0,875	0,001	0,5
Makrolider		Erythromycin	14	256	20	≥ 256	-	-
Tetrasykliner		Tetracycline	-	1,5	3	0,315	-	-

(-) ikke resistent, (X) for dårlig vekst til å ta målinger. Overskridende verdier er markert i **rødt**. S står for standard doseringsregime, verdier lik eller under S medfører terapeutisk suksess ved bruk av vanlig dosering av medikamentet. R står for resistens, og ved verdier over R vil ingen form for økt dosering føre til terapeutisk suksess (Eucast, 2022).

Vinterprøve V6 viste tegn til multiresistens, med resistens mot antibiotika klassene kefalosporin, penicillin og makrolid. De resterende vinterprøvene viste ikke tegn til multiresistens, men prøve V3 var resistent mot to antibiotikaklasser (penicillin og makrolider)

og prøve V1 var resistent mot én antibiotikaklasse (penicillin). Den siste vinterprøven V5 var ikke resistent mot noen av de fire antibiotika gruppene. I tillegg viste ingen av *Pseudomonas spp.* (V1 og V3) tegn til overskridene verdier for klinisk MIC-bruddpunkt av EUCAST.

5.6 Helgenomsekvensering

Prøvene S9, H8 og V6 ble sent til helgenomsekvensering for å identifisere bakterienes artsnavn via online tjenesten til pubMLST (Identify species) i tillegg til resistens- og virulensgener av interesse (Jolley et al., 2018). Alle genene til bakteriene ble annotert i PROKKA. Resistensgenene ble også identifisert i PROKKA, men også ved hjelp av resistensdatabasene CARD og NDARO (NCBI). I tillegg ble virulensgenene identifisert ved hjelp av virulensdatabasen VFDB. Resultatene fra helgenomsekvenseringen er vist i Tabell 20-26. Tabell 20 tar for seg artsnavnet, Tabell 21-24 tar for seg resistensdeterminantene knyttet til antibiotikagruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner, Tabell 25 tar for seg multiefflukspumper og Tabell 26 tar for seg tungmetallresistensgener.

Tabell 20. Identifisert bakterieart i prøve S9, H8 og V6.

Bakterieart	Support
Sommerprøve S9	
<i>Enterobacter asburiae</i>	100%
Høstprøve H8	
<i>Pseudomonas protegens</i>	100%
Vinterprøve V6	
<i>Brucella intermedia</i>	100%

Fra prøve S9 ble bakteriearten *Enterobacter asburiae* identifisert, fra prøve H8 ble bakteriearten *Pseudomonas protegens* identifisert og fra prøve V6 ble *Brucella intermedia* identifisert. De viste alle en 100% support, som betyr at artsnavnet stemte 100% overens med den identifiserte bakterien.

Tabell 21. β -Lactamase resistensdeterminanter i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI).

β-Lactamase resistensdeterminanter	Produkt	Database
Sommerprøve S9		
<i>oprD</i>	Porin D	PROKKA
<i>ampC</i>	Beta-lactamase	PROKKA
<i>blaACT-4</i>	cefalosporin-hydrolyserende klasse C beta-laktamase ACT-4	CARD og NDARO (NCBI)
Høstprøve H8		
<i>ampC</i>	beta-lactamase	PROKKA
<i>oprD</i>	Porin D	PROKKA
Vinterprøve V6		
<i>ampC</i>	Beta-lactamase	PROKKA
<i>blaOCH-2</i>	klasse C utvidet spektrum beta-laktamase OCH-2	CARD og NDARO (NCBI)
<i>blh</i>	Beta-lactamase hydrolase-like protein	PROKKA

Ut ifra helgenomsekvensene av prøvene S9, H8 og V6 ble det identifisert en rekke β -lactamaseresistensdeterminanter fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI). I alle tre prøvene ble β -lactamaseresistensdeterminantene *oprD* og *ampC* identifisert. I tillegg ble betalaktamase lignende gen *blaACT-4* identifisert i prøve S9 og betalaktamasegenet *blaOCH-2* identifisert i prøve V6.

Tabell 22. Kinolon resistensdeterminanter i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI).

Kinolon resistensdeterminanter	Produkt	Database
Sommerprøve S9		
<i>gyr (A, B)</i>	DNA gyrase subunit (A, B)	PROKKA

<i>pat (A)</i>	Putrescine aminotransferase	PROKKA
<i>par (C, E)</i>	DNA topoisomerase 4 subunit (A, B)	PROKKA
<i>emr (A, B)</i>	Colistin resistance protein EmrA	PROKKA og CARD
<i>mfd</i>	Transcription-repair-coupling factor	PROKKA
<i>qnr (E1)</i>	quinolone resistance pentapeptide repeat protein QnrE1	CARD og NDARO (NCBI)
<i>omp (F, C, D, A, X)</i>	Outer membrane protein	PROKKA
Høstprøve H8		
<i>gyr (A, B)</i>	DNA gyrase subunit (A, B)	PROKKA
<i>pat (B)</i>	Cystathionine beta-lyase PatB	PROKKA
<i>par (C, E)</i>	DNA topoisomerase 4 subunit (A, B)	PROKKA
<i>emr (A, B)</i>	Colistin resistance protein EmrA	PROKKA
<i>mfd</i>	Transcription-repair-coupling factor	PROKKA
<i>omp (A)</i>	Outer membrane protein	PROKKA
Vinterprøve V6		
<i>gyr (A, B)</i>	DNA gyrase subunit (A, B)	PROKKA
<i>Par (C)</i>	DNA topoisomerase 4 subunit A	PROKKA
<i>emr (A, B)</i>	Colistin resistance protein Emr (A, B)	PROKKA
<i>mfd</i>	Transcription-repair-coupling factor	PROKKA
<i>omp (A)</i>	Outer membrane protein	PROKKA

En rekke kinolonresistensdeterminant ble identifisert i prøvene S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI). Av disse ble kinolonresistensdeterminantene *gyr (A, B)*, *par (C, E)*, *emr (A, B)*, *mfd* og *omp (A)* identifisert i alle tre bakterieprøvene med unntak av at kun *par (C)* genet ble identifisert i prøve V6. Det ble identifisert flere varianter av *omp (A)* genet som *omp (F, C, D, X)* i prøve S9. I tillegg ble *pat*-genet identifisert i både prøve S9 og H8, hvor *pat (A)* ble identifisert i prøve S9 og *pat (B)* i prøve H8. Til slutt ble det identifisert et siste resistensgen rettet mot kinoloner i prøve S9, *qnr (E1)*.

Tabell 23. Makrolid resistensdeterminanter i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA.

Makrolid resistensdeterminanter	Produkt	Database
Sommerprøve S9		
MacAB-TolC	Macrolide export protein	PROKKA
<i>car (A)</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	PROKKA
<i>msr (A)</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	PROKKA
Høstprøve H8		
MacAB-TolC	Macrolide export protein	PROKKA
<i>car (A)</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	PROKKA
<i>msr (A)</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	PROKKA
Vinterprøve V6		
MacAB-TolC	Macrolide export protein	PROKKA
<i>car (A)</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	PROKKA
<i>msr (A)</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	PROKKA

Makrolidresistensdeterminantene *car (A)* og *msr (A)*, ble identifisert i prøvene S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA. I tillegg ble også resistensgenene for makrolideffluxpumpen MacAB-TolC identifisert i alle prøvene.

Tabell 24. Tetrasyklin resistensdeterminanter i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA.

Tetrasyklin resistensdeterminanter	Produkt	Database
Sommerprøve S9		
-	-	-
Høstprøve H8		
<i>tet (A)</i>	Tetracycline resistance protein, class C	PROKKA
Vinterprøve V6		
<i>tet (A)</i>	Tetracycline resistance protein, class C	PROKKA

Ingen Tetrasyklinresistensdeterminanter ble identifisert i prøve S9 fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI). I motsetning til dette ble *tet (A)* genet identifisert i både prøve H8 og V6.

Tabell 25, Multiefflukspumper i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI).

Multiefflukspumper	Produkt	Database
Sommerprøve S9		
MexAB-OprM	Multidrug resistance protein	PROKKA
OqxAB	RND efflux pump conferring resistance to fluoroquinolone	CARD, NDARO (NCBI) og PROKKA
AcrAB-TolC	AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux complex	CARD og PROKKA
EmrAB-TolC	emrB -TolC efflux protein in E. coli.	CARD og PROKKA
MacAB-TolC	Macrolide export ATP-binding/permease protein Mac (A, B)	PROKKA
Høstprøve H8		
MexAB-OprM	Multidrug resistance protein	PROKKA og CARD
EmrAB-TolC	emrB -TolC efflux protein in E. coli.	PROKKA
MacAB-TolC	Macrolide export ATP-binding/permease protein Mac (A, B)	PROKKA
Vinterprøve V6		
EmrAB-TolC	emrB -TolC efflux protein in E. coli.	PROKKA
EmrE	Multidrug transporter EmrE	PROKKA
MacAB-TolC	Macrolide export ATP-binding/permease protein Mac (A, B)	PROKKA

Resistensgener benyttet i multiefflukspumper ble identifisert i alle tre bakterieprøvene. Dette tilsier en mulig tilstedeværelse av en rekke multiefflukspumper. Disse resistensgenene var

identifisert fra dataprogrammet PROKKA og databasen CARD. Til felles for alle prøvene var en tilstedeværelse av multiefflukspumpene EmrAB-TolC og MacAB-TolC. I tillegg ble multiefflukspumpen MexAB-OprM identifisert i både prøve S9 og H8. Utenom disse ble multiefflukspumpen EmrE identifisert i prøve V6 og multiefflukspumpene OqxAB og AcrAB-TolC i prøve S9.

Tabell 26. Tungmetall resistensgener i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA.

Tungmetallresistensgener	Produkt	Database
Sommerprøve S9		
<i>cnr (A)</i>	Nikkel- og koboltresistensprotein CnrA	PROKKA
<i>czc (A)</i>	Kobolt-sink-kadmium-resistensprotein CzcA	PROKKA
Høstprøve H8		
<i>mer (R)</i>	Kvikksølvresistens operon regulatorisk protein	PROKKA
<i>cop (A, B)</i>	Kobberresistensprotein A og protein B	PROKKA
<i>pco (C)</i>	Kobberresistens protein C	PROKKA
<i>czc (A, B, C)</i>	Kobolt-sink-kadmium-resistensprotein Czc	PROKKA
Vinterprøve V6		
-	-	-

Det ble ikke identifisert noen tungmetallresistensgenene i prøve V6, men både i prøve S9 og H8 fra dataprogrammet PROKKA. I prøve S9 ble tungmetallresistensgenene *cnr (A)* og *czc (A)* identifisert. Dette medførte tilstedeværelse av resistens mot tungmetallene nikke, kobolt, sink og kadmium i prøve S9. Iprøve H8 ble tungmetallresistensgenene *mer (R)*, *cop (A, B)*, *pco (C)* og *czc (A, B, C)* identifisert. Summen av disse resistensgenene peker mot en mulig resistens mot kvikksølv, kobber, kobolt, sink og kadmium i prøve H8. Til felles for prøve S9 og H8 var tilstedeværelsen av tungmetallresistensgenet *czc (A)*.

6.0 Diskusjon

6.1 Fenotype

Vannprøvene fra sommer, høst og vinter, ble rendyrket på ESBL- og CRE skåler. Bakteriene fra vannprøvene S3, S6, S7, H1, H2, H3, H4, V1 og V3 har vokst på ESBL- skåler, mens bakteriene fra vannprøvene S9, S10, S11, S12, H8, V5 og V6 har vokst på CRE- skåler.

ESBL står for “betalaktamaser med utvidet spektrum”, og de utgjør en stor gruppe enzymer som kan inaktivere β -laktamantibiotika fra β -laktamklassene penicillin, cefalosporin og/eller karbapenem (Björg C. Haldorsen, 2012; FHI, 2019). ESBL- gener kan spre seg til en rekke andre bakterier via horisontal genoverføring ved hjelp av mobile genetiske elementer. Kliniske bakterier relatert til ESBL utgjør i hovedsak gramnegative tarmbakterier fra familien *Enterobacteriaceae* og ikke-fermentative bakterier som *Pseudomonas spp.* (FHI, 2019). CRE står for “Karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae*” og utgjør en gruppe multiresistente gramnegative, fakulativt anaerobe og stavformede tarmbakterier fra familien *Enterobacteriaceae* som viser resistens mot en eller flere av antibiotikaene fra karbapenemklassen ved produksjon av karbapenemase enzymer eller andre resistensmekanismer (Bøvre, 2021; CDC, 2019).

Ut ifra vekst av bakterier fra vannprøvene dyrket på ESBL- skåler får man bekreftet at det finnes ESBL-miljøbakterier i Norge med resistensmekanismer som kan hemme de klinisk viktige antibiotikaklassene penicillin, cefalosporin og/eller karbapenem (FHI, 2019). På samme måte får man bekreftet at det også finnes miljøbakterier med resistensmekanismer som kan hemme effekten av karbapenem ved vekst på CRE-skåler. Dette ble bekreftet på grunn av agarenes sammensetning, Oxoid Brilliance ESBL-agarene inneholdt tredje generasjons cefalosporin, cefpodoxim i tillegg til antibakterielle midler (Frampton et al., 1992; Oxoid, u.å.-c). Etersom bakterier med ESBL kan hydrolysere både tredje og fjerde generasjon cefalosporiner, er vekst på en agar med tredje-generasjons cefalosporin en god indikator på tilstedeværelse av ESBL-bakterier. I tillegg vil de antibakterielle midlene bidra til å hemme veksten av bakterier uten ESBL. Til tross for dette kan man ikke utelukke tilstedeværelse av bakterier uten ESBL, ettersom det finnes en rekke resistensmekanismer rettet mot cefalosporiner. I motsetning til ESBL agaren, inneholdt Brilliance CRE agaren modifisert karbapenem (Fisher, u.å.). Ved vekst på CRE-skålene indikerte at bakteriene som vokste der hadde iboende eller ervervede resistensmekanismer som kunne bryte ned β -laktamklassen karbapenem.

ESBL- og CRE- agarskålene med rendyrkede kolonier fra vannprøvene, ble videre analysert ut ifra farge på koloniene. Dette ble utført for å indikere hvilke mulige bakterieslekter som hadde blitt dyrket opp. Protokollene til ESBL og CRE skålene ble her benyttet som fargereferanse. Ut ifra protokollen til Oxoid Brilliance ESBL Agar, ble prøve S3 som viste grønne kolonier antatt å tilhøre bakterieslektene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* (KESC-gruppen). De resterende vannprøvene dyrket på ESBL skålene hadde

brune og rosa kolonier, men i motsetning til den tydelige grønnfargen hadde disse koloniene en lignende farge som gjorde det vanskelig å skille dem fra hverandre. Til tross for dette ble prøvene S6, S7, H1, H2 og V3 definert som brune kolonier, og prøvene H3, H4, V1 og V3 definert som rosa. Ut ifra protokollen tyder dette på at prøvene S6, S7, H1, H2 og V3 kunne tilhøre bakterieslektene *Proteus*, *Morganella* eller *Providencia*, mens prøvene H3, H4, V1 og V3 kunne tilhøre bakteriearten *E. coli*.

Bakterieprøvene som vokste på CRE-skålene ble også analysert uti fra farge på koloniene ved hjelp av protokollen til Brilliance CRE Agar. Koloniene fra prøvene S9 og S11 viste en tydelig blå farge som indikerte mulig tilstedeværelse av bakterieslektene *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* eller *Citrobacter* (KESC). Prøvene S12 og H8 viste en svak rosafarge, som indikerte mulig tilstedeværelse av bakteriearten *E. coli*. De resterende bakterieprøvene S10, V5 og V6 som ble dyrket opp på CRE-skåler avvok fra fargereferansene til protokollen med en blå/grønn fargetone, og det indikerte tilstedeværelse av karbapenemresistente bakterier av en annen bakteriefamilie enn *Enterobacteriaceae*.

Oxoid Brilliance ESBL Agar og Brilliance CRE Agar inneholder i tillegg til antibiotikumet fra β -laktam også en rekke grunnstoffer. Nedbrytelse av disse grunnstoffene kan utløse en spesifikk indikatorfarge. Spesifikke bakterier av klinisk relevans vil kunne bryte ned noen av disse grunnstoffene, og vil utløse en indikatorfarge. Denne indikatorfargen vil farge bakteriens kolonier. Oxoid Brilliance ESBL Agar er spesialisert for å dyrke fram klinisk relevante tarmbakterier fra familien *Enterobacteriaceae*, som viser resistens mot betalaktamaser med utvidet spektrum (FHI, 2019). Bakteriene fra KESC-gruppen inneholder galaktosidase enzymer som medfører dannelsen av grønne kolonier på ESBL-agarene (Oxoid, u.å.-c). *E. coli*, i motsetning til KESC-gruppen, kan danne både blå og rosa kolonier. Dette skyldes at *E. coli* bakterier kan inneholde både galaktosidase- og glukuronidaseenzymer som til sammen danner blå kolonier. I tillegg produserer noen *E. coli* bakterier kun glukuronidaseenzymer som medfører dannelsen av rosa kolonier. De resterende bakteriene *Proteus*, *Morganella* og *Providencia* som kan bli identifisert på ESBL-agaren, danner brune kolonier ved deaminering av aminosyren tryptofan (Hauge, 2019; Oxoid, u.å.-c; VKM, 2016). Brilliance CRE Agar er i samsvar med Oxoid Brilliance ESBL Agar spesialisert for å dyrke fram klinisk relevante tarmbakterier fra *Enterobacteriaceae* familien (Fisher, u.å.). I motsetning til å identifisere kliniske tarmbakterier med ESBL, identifiseres bakterier med karbapenemresistens. De klinisk relevante bakteriene på CRE skålene blir uti fra et to-kromogensystem inndelt i fargene blekrosa og blå. Koloniene av *E. coli* bakterier får en

blekrosa farge, mens bakteriene fra KESC-gruppen får en blå farge. Karbapenemresistente bakterier fra andre bakterielle famili, danner hvite og lyse kolonier.

Sammenligner man resultatene fra fargeanalysingen av bakteriene dyrket på ESBL og CRE-skåler med resultatene fra 16S og helgenomsekvenseringen, ser man at de færreste av bakterieslektesom er identifisert med fargeanalyseirng stemmer overens med disse resultatene. Fra fargeanalysingen av ESBL agarene stemmer ingen av prøvene overens med 16S eller helgenomsekvenseringen. Koloniene fra prøve S3 ble definerte som grønne, til tross for dette hørte ikke prøve S3 til KESC-gruppen. *Erwinia* som ble identifisert i prøve S3 fra 16S sekvenseringen, tilhører samme bakteriefamilie som KESC-gruppen, *Enterobacteriaceae* (health, 2018; Xia et al., 2018). *Enterobacteriaceae* familien i likhet med KESC-gruppen, danner β -galaktosidase. På grunn av dannelse av β -galaktosidaseenzymer har *Erwinia* bakterien fått dannet grønne kolonier på ESBL-skålene. De resterende prøvene fra ESBL-agarene ble alle identifiserte som bakteriestammen *Pseudomonas* fra *Pseudomonadaceae* familien ved 16S og helgenomsekvensering (Behera & Pattnaik, 2019). Vanskeligheten med å skille de “lyserosa” og de “brune” koloniene på ESBL-agarene skyldes antakelig på grunn av at koloniene verken var brune eller rosa men var en blanding av brunrosa som tilhørte en bakteriestamme avvikende fra protokollen. Til tross for at både *Erwinia* og *Pseudomonas* stammene avviket fra Oxoid Brilliance ESBL Agar protokollen, ble de begge dyrket opp på ESBL-skåler som indikerer at de er ESBL-produserende bakterier. Som nevnt ovenfor er bakterieslekten *Pseudomonas* spp. anerkjent som kliniske bakterier relatert til ESBL, noe som stemmer godt med denne identifiseringen av *Pseudomonas* stammen (FHI, 2019).

Fra fargeanalysingen av CRE-agarene stemte flere av prøvene overens med 16S og/eller helgenomsekvenseringen. De blå koloniene som ble dyrket opp på CRE-skålene indikerte ut ifra Brilliance CRE Agar protokollen tilstedeværelse av bakterier fra KESC-gruppen. Dette stemte godt med resultatene fra 16S og helgenomsekvenseringen, som identifiserte bakterieslekten *Enterobacter* spp. i begge bakterieprøvene S9 og S11. I motsetning til dette ville tilstedeværelse av rosa kolonier på CRE-skålene indikere tilstedeværelse av *E. coli* stammen. Dette stemte ikke overens med resultatene fra 16S og helgenomsekvenseringen, hvor bakterieslekten *Herbaspirillum* i prøve S12 og *Pseudomonas* i prøve H8 ble identifisert. Bakteriekolonier avvikende fra bakteriefamilien *Enterobacteriaceae*, ville ut ifra protokollen medføre hvite og lyse kolonier. Denne teorien stemte ikke overens med observasjonene som ble gjort. Dette skyltes at det ble observert blå/grønne kolonier fra prøvene S10, V5 og V6. Disse prøvene tilhørte ikke bakteriefamilien *Enterobacteriaceae*, ut ifra resultatene fra 16S og

helgenomsekvenseringen. På en annen side stemte den blå/grønne fargen med protokollen ettersom fargetoner utenom blå og rosa tilhørte bakterier fra andre bakteriefamilier enn *Enterobacteriaceae*. Noe som stemte godt ettersom det ble identifisert bakterieslektene *Aeromonas* fra prøve S10, *Rhizobium* fra prøve V5 og *Brucella* i prøve V6 ved 16S og helgenomsekvensering.

Teorinene fra protokollene til Oxoid Brilliance ESBL Agar og Brilliance CRE Agar stemmer, men denne sammenligningen av fargene på koloniene og de identifiserte bakterieslektene med 16S og helgenomsekvensering understøtter at fargeanalyse av kolonier på ESBL- og CRE-skåler er en usikker metode for å identifisere bakterienes slekt. For å kunne identifisere bakteriene på en sikker måte, må man se på genene i arvematerialet til bakteriene som blir gjort under 16S og helgenomsekvenseringen og vil bli diskutert lengre ned (Martinsen, 2020c).

6.2 16S

For å kunne identifisere de isolerte miljøbakteriene ble 16S rRNA-genene sekvensert og kjørt på analyseprogrammet NBLAST. Resultatene fra 16S-sekvenseringen identifiserte bakterieartene *Erwinia persicina/ rhapontici*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas protegens*, *Enterobacter ludwigii*, *Aeromonas caviae/ hydrophila*, *Enterobacter ludwigii/ mori*, *Herbaspirillum frisingense*, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium miluonense*, *Brucella ciceri/ intermedia*, *Aureimonas altamirensis* og *Ochrobactrum ciceri/intermedium*. Som nevnt tidligere er 16S rRNA et svært konservert gen som finnes i transkripsjonsmaskineriet hos alle eukaryote- og prokaryote celler (Cox et al., 2013; Haugen, 2019b). Ved å avlese samt sammenligne de variable regionene av dette genet med en sekvensdatabase NDARO (NCBI), kunne man få indentifisert bakteriene ut ifra en statistisk signifikant (Cox et al., 2013; Haugen, 2019a; NIH, u.å.-b). Til tross for dette inneholder ikke 16S genet nok informasjon til å kunne skille mellom beslektede bakteriarter (García-López et al., 2014). 16S rDNA sekvensering egner seg bedre til identifisering av bakteriens slekt enn bakteriens art. Ved å se på resultatene fra NBLAST (tabell 14, og vedlegg 1.2) med vekt på indetitets- og query coverage prosentene ser man at dette stemmer. Dette blir spesielt understøttet av resultatene fra sommerprøve S3 som ut ifra NBLAST blir identifisert som to bakteriearter, *persicina* og *rhapontici*, fra bakteriestammen *Erwinia*. Fordi begge bakterieartene har lik prosentandel for indetitets- og query coverage, så kan man ikke utelukke noen av bakterieartene. Men ettersom de deler samme bakterieslekt, kan man med

sikkerhet si hvilken slekt som har blitt identifisert. Et annet eksempel er vinterprøvene V1 og V6. Her det blir identifisert to til tre ulike slekter for hver av prøvene med lik identitets- og query coverage verdier. Man kan i motsetning til prøve S3 ikke identifisere hvilken bakterieslekt som bakterieprøvene tilhører. For hver av disse prøvene har ingen 100% identitetsprosent av 100% query coverage. Det gjør at man ikke med sikkerhet kan si hvilke baktterslekter som har blitt identifisert. Det kan være flere grunner til dette. Ser man på resultatene fra Nanodrop for disse to prøvene, ser man at begge har under 2,0 i verdi for absorbanmålingen ved 260/230 nm, noe som kan tyde på forurensinger (EDTA, karbohydrater og fenoler) under DNA-isoleringen. Til tross for dette ble 16S rRNA-prøvene rensert for både enkelt- og dobbeltrådet PCR-amplifikasjonsprodukter mellom 100 bp til 10 kb ved bruk av «GenElute™ PCR Clean-Up Kit» (SIGMA-ALDRICH™, USA). Det er noe som mest sannsynlig ville ha rensert dette bort fra 16S prøvene. Generell identifisering av bakterier med identitets- og query coverage prosent under 100 %, kan gjøre det vanskelig å identifisere bakteriers slekt om det finnes flere lignende bakterieslekter i databasen, i likhet med bakteriens art. For å kunne få 100 % sikker identifisering av bakterienes slekt og art måtte det bli benyttet en bredere identifiseringsmetode som helgenomsekvensering.

Fra bakterieprøve V6 ble det ved helgenomsekvensering identifisert bakterieslekten *Brucella*, og man kunne med det utelukke bakterieslektene *Ochrobactrum* og *Aureimonas*. Disse blir dermed ikke videre diskutert. I motsetning til prøve V6 som ble helgenomsekvensert, ble ikke prøve V1 helgenomsekvensert, og man kunne ikke utelukke bakterieslekten *Klebsiella* selv om det var flere indikasjoner for slekten *Pseudomonas*. De resterende bakterieslektene som ikke hadde blitt utelukket ved helgenomsekvensering besto av *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium*, *Klebsiella* og *Brucella*. Alle disse bakterieslektene var derfor av relevans, og de vil bli beskrevet. *Erwinia* utgjør en bakterieslekt relatert til plantesykdommer, blant annet pærebrann forårsaket av *Erwinia amylovora* (Sletten, 2021). Slekten *Pseudomonas* lever i hovedsak i jord og vann, men kan også befinne seg i tarmen hos mennesker, og i vevet til planter og dyr (Andreolli et al., 2019; Tone Tønjum, 2020). Noen arter av slekten kan også forårsake sykdom hos mennesker og dyr blant annet *P. aeruginosa*, mens andre kan forårsake sykdom hos planter som *P. Syringae* (Haenni et al., 2017; Tone Tønjum, 2020). I motsetning til å forårsake sykdom, kan noen *P ssp.* som befinner seg i plantenes vev bidra til blant annet gunstig vekst hos planten (Tone Tønjum, 2020). Denne egenskapen har videre blitt benyttet til å kontrollere en rekke plantesykdommer, hvor *P ssp.* fungerer som et plantevernmiddel (Andreolli et al., 2019; Tone Tønjum, 2020).

Pseudomonas protegens som ble indentifisert i prøve H8 ved helgenomsekvensering, utgjør en slik type bakterie. *P. protegens* er med det ikke en humanpatogen bakterieart.

Bakterieslekten *Enterobacter* befinner seg i jord, vann og kloakk fra mennesker og dyr (Sass & Fisher, 2009). De fleste av disse bakteriene er opportunistiske og vil kunne medføre sykdom hos mennesker (Tønjum, 2022a). Bakteriearten *Enterobacter asburiae* fra prøve S9 utgjør en slik bakterie (Koth et al., 2012). *E. Asburiae* finnes blant annet i jord og vann og kan medføre en rekke humane sykdommer. Bakteriestammen *Aeromonas* befinner seg i marine miljøer som innsjøer og elver (J Glenn Morris, 2021). En rekke bakteriearter av *Aeromonas* anses som patogener, og de kan medføre sykdom hos blant annet dyr og mennesker. Hos mennesker forårsaker de infeksjoner av *Aeromonas* i hovedsak diare, men kan også forårsake blant annet sårinfeksjon og sepsis. *Herbaspirillum* utgjør en nitrogenfikserende bakterieslekt som lever i symbiose med en rekke planter som mais, hvete og ris (landbruksrådgiving, 2022; Spilker et al., 2008). Ingen av bakterieartene fra *Herbaspirillum* slekten er relatert som humanpatogen (Spilker et al., 2008). I samsvar med bakterieslekten *Herbaspirillum* utgjør *Rhizobium* også en nitrogenfikserende bakterieslekt (Serikstad, 2020). Denne bakterieslekten danner symbiose med en rekke belgvekster, og i Norge består disse av erter og åkerbønner som i hovedsak benyttes til dyrefôr (NIBIO, 2022; Serikstad, 2020). *Rhizobium* finnes naturlig i jorda, men tilsettes også ved såing som et miljøvennlig alternativ for nitrogengjødning (jr., 2022; Serikstad, 2020). Slekten er ikke assosiert som humanpatogen (Spilker et al., 2008).

Klebsiella, i samsvar med både *Herbaspirillum* og *Rhizobium* finnes i symbiose med planter og er nitrogenfikserende (Sirevåg, 2022). I motsetning til disse er ikke alle bakterieartene av *Klebsiella* slekten nitrogenfikserende bakterier. *Klebsiella* bakteriearter finnes i tillegg på planter også i jord, vann og i tarmen hos dyr og mennesker. Blant disse artene utgjør noen humanpatogener, som for eksempel *Klebsiella oxytoca*. Bakterien *Brucella intermedia* ble indentifisert fra den siste bakterieslekten fra prøve V6. Generelt er *Brucella* slekten kjent for sin zoonotiske egenskap til å forårsake sykdommen brucellose hos mennesker og dyr, (Nemhauser, 2020; Scholz et al., 2008). *Brucella intermedia* forårsaker ikke brucellose, men utgjør et nylig oppdaget humanpatogen av lav virulens (Scholz et al., 2008). Til tross for dette er det ansett for å være et fremvoksende miljøopportunistisk humanpatogen som kan forårsake sykdom hos immunsvake mennesker (Aujoulat et al., 2014; Kassab et al., 2021). I tillegg er bakteriearten kjent for sin multiresistens, som kan gjøre det vanskelig å behandle eventuelle infeksjoner.

Ut ifra de identifiserte bakteriene kan flere av bakterieslektene medføre sykdom hos mennesker, som blant annet *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella* og *Brucella*. Dette er svært urovekkende ettersom bakteriene har blitt dyrket opp på ESBL- og CRE-skåler. De identifiserte bakteriene har med det en rekke resistensgener rettet mot de klinisk viktigste antibiotikaene på markedet, og det kan gjøre det vanskelig å behandle disse bakteriene. I tillegg kan disse resistensgenene ligge på MGE og medføre økt spredning av resistens (Bjørg C. Haldorsen, 2012). Denne spredningen kan også finne sted hos bakteriestammene som ikke var relatert til menneskelige sykdommer. Eksempler på slike sykdommer er *Erwinia*, *Herbaspirillum* og *Rhizobium*. Disse bakterienesom i likhet med de sykdomsfremkallende bakteriestammene, kan bidra til utvikling av multiresistente bakterier i og utenfor miljøet. Denne utviklingen er svært kritisk ettersom dette vil øke utvikling av multiresistente bakterier blant humanpatogener og kan medføre behandlingssvikt. Spesielt er ESBL-gener fra subgruppen ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{CARBA} relatert til utvikling av multiresistente bakterier med blant annet utvidet resistens mot den klinisk viktige β -laktamgruppen (Bjørg C. Haldorsen, 2012). Grunnet dette ble alle bakteriene testet for disse resistensgenene.

6.3 ESBL-gener

De identifiserte miljøbakteriene ble testet for tilstedeværelse av klinisk relevante gener fra subgruppen ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{CARBA}. Genene inkluderer *CTX-M2*, *CTX-M1*, *CTX-M9*, *OXA*, *SHV*, *TEM*, *NDM*, *VIM*, *KPC*, *CMY*, *OXA* og *IMP* (Bjørg C. Haldorsen, 2012). Disse genene kodet med bredspektret betalaktamaser som hydrolyserer antibiotika fra gruppen β -laktam, som tidligere nevnt, utgjør de viktigste og mest benyttede antibiotikaene på markedet globalt og i Norge (Arnfinn Sundsfjord, 2008). Fordi disse genene befinner seg på MGE, kan disse genene via HGT lett spre seg mellom bakterier fra samme eller forskjellige bakterieslekter (Bjørg C. Haldorsen, 2012). I tillegg til at disse ESBL-genene lett spres mellom bakterier som medfører utvikling av resistens mot den viktigste antibiotikagruppen MGE, er de oftest også bærere for andre resistensgener som kan overføres samtidig. Denne resistensoverføringen blir benevnt som ko-resistens og øker sjansen for utvikling av multiresistente MDR-bakterier betraktelig ved mottakelse av MGE med ESBL-gener (Baker-Austin et al., 2006; Bjørg C. Haldorsen, 2012).

Ut ifra multi- og singelpleks PCR av de klinisk relevante ESBL genene ble det identifisert betalaktamasegenet *CTX-M9* fra subgruppen ESBL_A hos vinterprøve V6. Dette betalaktamasegenet er det mest utbredte genet fra subgruppen ESBL_A som også dominerer i

Norge (Bjørng C. Haldorsen, 2012). Derfor er det ikke overaskende å få identifisert dette genet hos en miljøbakterie i Norge. Til tross for dette ble ikke genet identifisert ved helgenomsekvenseringen av vinterprøve V6. I stedet for *CTX-M9*-genet ble ESBL-genet *OCH-2* identifisert ved helgenomsekvensering av prøve V6, med det kan ESBL genet *OCH-2* ha blitt forvekslet med *CTX-M9* som også er et ESBL-gen. Resultatene fra helgenomsekvenseringen av prøve V6 viser dermed at det ikke ble identifisert noen ESBL gener hos miljøbakteriene fra multi- og singelpleks PCR.

Selv om det ikke ble identifisert ESBL-gener ved multi- og singelpleks PCR, ble det identifisert ESBL-gen i sommerprøve S9 i tillegg til vinterprøve V6 ved helgenomsekvensering. ESBL-genet *blaACT-4* fra prøve S9 ble som nevnt ikke identifisert ved multi- og singelpleks PCR, men ved helgenomsekvensering. Dette skyldes at det ikke finnes primere for *blaACT* i PCR multiplexene (Bjørng C. Haldorsen, 2012). I motsetning til *blaACT-4*-genet ble det mest utbredte plasmidmedierte AmpC-betalaktamase genet *CMY* testet på miljøbakteriene. De resterende åtte familiene fra denne betalaktamasegruppen ble det ikke testet for. Etersom det ikke ble kjørt helgenomsekvensering på alle bakterieprøvene grunnet omfattende og dyr metode, burde man ved et senere tidspunkt også inkludert disse genene i tillegg til alle gruppene av CTX-M gruppene for ikke å utelukke noen av de klinisk viktige ESBL genene (Bjørng C. Haldorsen, 2012).

De resterende miljøbakteriene som ble isolert fra ESBL- og CRE-skålene, viste ut ifra multi- og singelpleks PCR av de klinisk relevante ESBL-genene ingen tegn på ESBL-gener. Etersom disse bakteriene vokste på ESBL- og CRE-skåler, tyder dette på at disse bakteriene inneholdt gener for andre resistensmekanismer enn β -laktamaseenzymer og som har brutt ned β -laktam antibiotikaen i agarene. Disse resistensmekanismene kan inkludere modifisering av medikamentmålet til β -laktam (PBP), begrensning av opptaket av antibiotikum β -laktam ved modifisering av porinkanaler og aktiv medikamentutstrømning ved bruk av multikomponente pumpesystemer for legemiddelutstrømning (Bonomo, 2017). På grunn av at ikke alle miljøbakteriene ble kjørt gjennom helgenomsekvensering, kan man ikke få definert disse resistensmekanismene. Men ser man på helgenomresultatene fra høstprøve H8 som ikke fikk påvist klinisk viktige ESBL-gener, ser man at denne bakterien har andre resistensmekanismer som gjør den mottakelig for vekst på CRE-skåler. Disse resistensmekanismene inkluderer blant annet β -laktamaseenzymet AmpC, porin OprD og multiefflukspumpe MexAB-OprM (Agah Terzi, 2015; Bjørng C. Haldorsen, 2012; Pesingi et al., 2019; Smith & Kendall, 2022).

6.4 MIC

De identifiserte miljøbakteriene, med unntak av sommerprøvene S9, S10, S11 og S12, ble testet for grad av resistens mot de fire viktigste humane antibiotikagruppene β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Disse gruppene har alle ulike virkningsmekanismer hos bakterier. β -laktam hemmer celleveggsyntese, kinoloner hemmer nukleinsyresyntese prosessene, makrolider hemmer proteinbiosyntesen rettet mot underenhet 50S i ribosomet og tetrasykliner hemmer proteinbiosyntesten rettet mot underenhet 30S i ribosomet (Gibson et al., 2018; Kapoor et al., 2017). Ved identifisering av resistens mot disse antibiotikagruppene, indikerer tilstedeværelse samt uttrykk av resistensmekanismer hos bakteriene.

Resultatene fra MIC målingene viser at alle miljøbakteriene har en begynnende resistensutvikling mot alle fire antibiotikagruppene. Dette er urovekkende. I tillegg til dette ser man at de aller fleste viser full resistens mot antibiotikaklassene penicillin samt makrolider. Denne observasjonen er ikke overraskende ettersom at penicillin er det første oppdagede antibiotikumet, og det blir/har blitt benyttet i stor grad i Norge mot en rekke bakterielle infeksjoner (Øye, 2020). Makrolider er også et kjent antibiotika og blir/ har blitt benyttet i Norge for eksempel i tilfeller av penicillinallergi (Forbord, 2021).

Makrolidantibiotikumet som miljøbakteriene ble MIC-testet for, var et førstegenerasjonsmakrolid, og erytromycin, utgjør det mest benyttede makrolidantibiotikumet i Norge (Forbord, 2021; Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). Resistens generelt mot første generasjon antibiotikum er ikke overraskende ettersom disse antibiotikaene har blitt benyttet lengst. Bakterier har med det rukket å utvikle samt erverve seg resistensmekanismer mot disse antibiotikaklassene.

Av alle miljøbakteriene som ble MIC-testet, var det kun prøvene H8 og V6 som viste tegn til multiresistens, og det medførte videre helgenomsekvensering av disse prøvene. Som nevnt ovenfor ble det kun identifisert ett klinisk relevante ESBL-gene blant alle miljøbakteriene. Dette genet fra *CTX-M-9* gruppen tilhørte prøve V6. Til tross for dette så man ved helgenomsekvensering at genet hadde blitt forvekslet med ESBL-genet *OCH-2*. *OCH-2* genet er i motsetning til genet fra *CTX-M-9* gruppen et kromosomalt kodet β -laktamasegen, og det tilhører ikke de klinisk viktige ESBL-genene fra subgruppene *ESBL_A*, *ESBL_M* og *ESBL_{CARBA}* (Björg C. Haldorsen, 2012). Selv om genet ikke var blant de viktigste ESBL-gene, kan *OCH-2* medføre resistens mot både penicilliner og de fleste cefalosporiner (Alcock et al., 2020; Yagel et al., 2020). Ettersom MIC-verdiene for V6 viste full resistens mot alle antibiotikaene fra antibiotika klassene penicillin og cefalosporin, kan det tyde på at *OCH-2* genet har

medført denne graden av resistens hos disse klassene. Likevel vet man ikke om *OCH-2* genet er uttrykt. Ettersom det også ble observert β -laktamseresistensgenene *ampC* og *blh*, kan disse genene også ha påvirket utvikling av full resistens mot antibiotikaklassene penicillin og cefalosporin (Björg C. Haldorsen, 2012). I tillegg ble multiefflukspumpen EmrE identifisert. Det blant annet medføre ampicillin ampicillinresistens og kan også ha bidratt til denne resistensutviklingen (Jurasz et al., 2021; Ovchinnikov et al., 2018).

I prøve H8 ble det også observert full resistens mot antibiotikaklassen penicillin, men ut ifra klinisk MIC-bruddpunkt for *Pseudomonas spp.* ble det kun observert høy resistens mot cefalosporiner, ikke full resistens. I tillegg til resistens mot antibiotikaklassene penicillin og cefalosporiner ble det også påvist full resistens mot antibiotikaklassen karbapenem (antibiotika meropenem). Denne graden av resistens mot antibiotikaklassene penicillin, cefalosporiner og karbapenem skyldes mest sannsynlig β -laktamresistensgenene *ampC*, *oprD* og multiefflukspumpen MexAB-OprM. *ampC* vil kunne medføre resistens mot penicillin og cefalosporiner. Porin OprD vil spesielt kunne medføre resistens mot karbapenem, og multiefflukspumpen MexAB-OprM vil kunne medføre resistens generelt mot β -laktam (Agah Terzi, 2015; Björg C. Haldorsen, 2012; Pesingi et al., 2019). OprD og MexAB-OprM har mest sannsynlig stått for karbapenemresistensen.

I tillegg til β -laktamresistens som ble observert i prøvene V6 og H8, ble det også observert full resistens mot makrolider (erythromycin) i begge prøvene. Dette skyldes mest trolig MacAB-TolC efflukspumpen som medfører utpumping av makrolider, i tillegg til makrolid målbeskyttelsesproteinene MsrA og CarA (Dinos, 2017; Fitzpatrick et al., 2017; Huang et al., 2022; Ousalem et al., 2019; Schoner et al., 1992; Sharkey & O'Neill, 2018; Xu et al., 2010). Multiefflukspumpen MexAB-OprM kan også ha medført makrolidresistens i prøve H8, og multiefflukspumpen Emr kan ha medført makrolidresistens rettet mot erytromycin i prøve V6 (Jurasz et al., 2021; Ovchinnikov et al., 2018; Pesingi et al., 2019).

Av MIC-verdiene for antibiotikaklassen kinolone (ciprofloxacin) hos disse bakteriene, ser man at prøve V6 har en forhøyet resistens mot kinoloner mens prøve H8 har full resistens. Hos begge bakterieprøvene ble det observert en rekke resistensgener rettet mot kinoloiner. Ut ifra teorien utgjør målmutasjon den vanligste samt høyest grad av resistens mot kinoloiner (Poole, 2007). Denne typen mutasjon skjer på underenhetene til type II topoisomerase (Correia et al., 2017; Gibson et al., 2018). Som blir nevnt nedenfor, mangler prøve V6 underenhetsgenet ParE av topoisomerase IV. Dette skyldes at kun underenhetsgenet ParC ble identifisert ved hjelp av dataprogrammet PROKKA. Det kan tyde på at det har forekommet en

delesjon på dette genet. Til tross for at målmutasjon medfører høy grad av kinoloinresistens, er det prøve H8, ikke prøve V6, som viser høyest grad av resistens. Ser man videre på de identifiserte resistensgenene, ser man at H8 har fått identifisert flere resistensgener enn V6, og det tyder på at disse har hatt stor påvirkning av resistensutviklingen. Disse genene inkluderer spesielt efflukspumpene PatB og multiefflukspumpen MexAB-OprM, som begge kan pumpe ut ciprofloxacin (Garvey et al., 2011; Gibson et al., 2018; Pesingi et al., 2019). I tillegg til disse pumpene, ser man at både prøvene V6 og H8, kun har ett Omp (OmpA) porin. Ettersom kinoloner må transporteres gjennom poriner for å kunne trenge seg inn i gramnegative celler, vil fravær av de resterende Omp-porinene medføre kinolonresistens (Correia et al., 2017). En “sammenkobling” av alle disse resistensgenene vil kunne ha medført kinolonresistens.

Begge prøvene, V6 og H8, viste også tegn til tetrasyklinresistens. Men ettersom det ikke fantes klinisk MIC-bruddpunkt for tetrasykliner hos disse bakteriene, ble det vanskelig å bedømme om disse verdiene var høye eller lave. Bland de identifiserte resistensgene rettet mot tetrasykliner, kan man anta at tetrasyklinspesifikk efflukspumpen TetA har spilt en viktig rolle (Hobson et al., 2021). I tillegg er det tenkelig at multiefflukspumpen MexAB-OprM også har bidratt til tetrasyklinresistens hos prøve H8, og multiefflukspumpen EmrE har bidratt til tetrasyklinresistens i prøve V6 (Jurasz et al., 2021; Ovchinnikov et al., 2018).

I motsetning til prøvene H8 og V6 ble den siste helgenomsekvenserte prøven S9 ikke MIC-testet. Til tross for dette ble det klinisk resistente genet *blaACT-4* fra subgruppene ESBL_M identifisert ved helgenomsekvensering (Björg C. Haldorsen, 2012). Siden genene fra subgruppene ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{CARBA} er relatert til multiresistens, er det tenkelig at prøve S9, i likhet med prøvene V6 og H8, er multiresistent. Databasen fra CARD bekrefter denne mulige hypotesen, som indikerer at *blaACT-4* genet medfører resistens mot karbapenem i tillegg til penicilliner og cefalosporiner (Alcock et al., 2020). Resistens mot disse tre antibiotikaklassene gjør prøve S9 multiresistent. *BlaACT-4* genet medfører med det forhøyet resistens mot penicillin, cefalosporiner og karbapenemer i prøve S9. I tillegg ble poringenet *oprD* identifisert og som ved mutasjon kan medføre karbapenem resistens (Agah Terzi, 2015; Smith & Kendall, 2022). Ut ifra dette kan det tenkes at disse to genene ville ha fått utslag på MIC-testen, men ettersom man ikke vet om *oprD*-genet er mutert, kan man ikke med sikkerhet si at dette genet ville hatt en innvirkning på karbapenemresistensen.

I tillegg til β -laktamresistens er det tenkelig at prøve S9 også ville fått utslag for de tre andre antibiotikagruppene kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Dette skyldes tilstedeværelse av en rekke resistente gener rettet mot disse gruppene. I prøve S9 ble det blant annet identifisert

poringenet *ompX* i tillegg til en rekke *omp* gener. Ettersom at overekspresjon av *ompX* genet vil kunne medføre reduksjon av *omp*-genene, vil tilstedeværelse av *omp-X* genet ha medført økt kinoloinresistens (Correia et al., 2017). I tillegg ble målbeskyttelsesgenet *qnrE1* og en rekke effluks-/multiefflukspumper (PatA, MexAB-OprM, AcrAB-TolC og OqxAB) identifisert som kan ha medført forhøyet kinoloinresistens i prøve S9 (Correia et al., 2017; Garvey et al., 2011; Gibson et al., 2018; Pérez et al., 2007; Pesingi et al., 2019). I likhet med prøvene V6 og H8 ble også efflukspumpen MacAB-TolC og makrolid målbeskyttelsesproteinene MsrA og CarA identifisert (Dinos, 2017; Fitzpatrick et al., 2017; Huang et al., 2022; Ousalem et al., 2019; Schoner et al., 1992; Sharkey & O'Neill, 2018; Xu et al., 2010). Disse genene i tillegg til multiefflukspumpene MexAB-OprM og AcrAB-TolC, kan ha medført makrolidresistens. Til slutt ble det ikke identifisert noen resistensgener direkte rettet mot terasykliner, men det ble identifisert tre multiefflukspumper (MexAB-OprM, AcrAB-TolC og OqxAB) som kan ha medført forhøyet tetrasyklinresistensen hos denne bakterien.

Ser man på MIC-verdiene ut ifra hvilken type agarskål bakteriene ble dyrket opp på, ser man at resistens mot pencillin er den dominerende faktoren for vekst i ESBL-skålene. Ut ifra MIC-verdiene som er målt opp mot klinisk MIC bruddpunkt (kun for *Pseudomonas*), ser man at resistens mot cefalosporiner også har spilt en viktig rolle her. I motsetning til cefalosporiner ligger verdiene under klinisk MIC-bruddpunkt for antibikumet karbapenem og har ikke hatt en innvikning på vekst på ESBL-skålene. Går man videre til MIC-verdiene for bakteriene dyrket på CRE-skålene, skulle man antatt tilstedeværelse av høye verdier for karbapenemresistens. Sommerprøvene S9, S10, S11 og S12, som vokste på CRE skålene kunne ikke bli sammenlignet med teorien fordi de ikke ble MIC-testet. Til tross for dette kunne man anta at prøve S9 hadde fått forhøyet karbapenemresistens på grunn av identifisering av *blaACT-4* genet ved helgenomsekvenseringen. Utenom disse bakteriene viste prøve H8 full karbapenemresistens. Prøvene V6 og V5 viste i motsetning til H8 lave verdier for karbapenemresistens. Dette kan skyldes at det kun ble MIC-testet for en type karbapenemklasse, meropenem. Prøvene V6 og V5, som ikke viser stor grad av resistens mot meropenem, kan med det ha vært resistente mot andre karbapenemklasser som har medført vekst på CRE-skålene.

6.5 Helgenomsekvensering

Ved helgenomsekvensering får man identifisert alle genene som eksisterer hos en bakterie, både de som er uttrykt og ikke uttrykt. Prøvene S9, H8 og V6 ble i denne oppgaven helgenomsekvensert ut ifra tilstedeværelse av ESBL-gen og resultatene fra MIC-testingen. På grunn av at prøve V6 indikerte tilstedeværelse av et ESBL-gen i CTX-M-9 gruppen i tillegg til å vise tegn til multiresistens ved MIC-testing ble denne miljøbakterien valgt for videre helgenomsekvensering. Prøve H8 ble også valgt for helgenomsekvensering på grunn av tegn til multiresistens ved MIC-testing. Den siste prøven som ble valgt til helgenomsekvensering, var prøve S9. Denne prøven viste ingen tegn til ESBL-gener i tillegg til at den ikke ble MIC-testet på grunn av at bakteriene hadde dødd før de skulle bli MIC-testet. Til tross for dette ble prøve S9 valgt ettersom bakteriestammen *Enterobakter* ble identifisert på en CRE-skål ved 16S-sekvensering. Med det ble det indentifisert en karbapenemresistent *Enterobacteriaceae* som kan forårsake alvorlige infeksjoner som urinveisinfeksjon, sårinfeksjon eller lungebetennelse hos mennesker og dyr (Australia, u.å.; Sinai, 2022). På grunn av at denne mulige patogene bakterien er resistent mot karbapenem som er blant de siste behandlingsalternativene vi har til å bekjempe bakterielle infeksjoner, er resistens mot denne typen antibiotika svært alvorlig. Derfor burde det undersøkes videre med helgenomsekvensering (Veterinærinstituttet, 2021). Med denne begrunnelsen kunne også prøve S11 blitt helgenomsekvensert ettersom dette også var en karbapenemresistent *Enterobacteriaceae*.

Fra helgenomsekvenseringen av miljøprøvene S9, H8 og V6, ble det indentifisert en rekke resistentgener som vil bli diskutert under. Det blir her lagt vekt på resistensdeterminanter direkte rettet mot de fire antibiotikaklassene β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner, i tillegg til multiefflukspumper som kan øke utvikling av multiresistente bakterier. Til slutt vil det bli lagt vekt på metallresistente gener som har blitt et viktig tema blant miljøbakterier grunnet deres tilstedeværelse på MGE. De kan medføre koeksistens av antibiotikaresistente bakterier og øke spredningen (Imran et al., 2019).

6.5.1 β -laktamresistensdeterminanter

Fra alle tre bakteriene S9, H8 og V6 ble det identifisert β -laktamasegenet *ampC* som utgjør et β -laktamaseenzym som kan bryte ned de klinisk viktige antibiotikaklassene penicillin og cefalosporiner fra antibiotikagruppen β -laktam (Björg C. Haldorsen, 2012). *AmpC*-genet kan kodes både kromosomalt og på plasmider. Kromosomalt kodet *ampC*-gen finnes hos en rekke

bakterier blant annet hos *Enterobacter spp.* og *Pseudomonas aeruginosa*, men på grunn av sin lokasjon medfører det redusert uttrykkelse og spredningsevne (Bjørge C. Haldorsen, 2012; Ørjan Samuelsen*, u.å.). Kromosomalt *ampC*-gen benevnes på grunn av disse egenskapene ikke som et ESBL-gen, men ved noen tilfeller kan *ampC*-genet forflytte seg til MGE og utvikle seg til et ESBL-gen. I motsetning kromosomalkodet *ampC*-gen utgjør plasmidkodete *ampC*-genet et ESBL-gen som finnes seg hos bakterieslekten *Enterobacteriaceae* (Bjørge C. Haldorsen, 2012). Denne benevnelsen skyldes i hovedsak mobiliteten den har til å kunne spre resistens mot de klinisk viktige antibiotikaklassene penicillin og cefalosporiner via HGT som øker utviklingen av multiresistente bakterier.

Siden prøve S9 er assosiert med iboende *ampC*-gen er det tenkelig at dette genet som er funnet via helgenomsekvensering ikke er plasmidmediert. *AmpC*-genet medfører med det ikke økt spredning av β -laktamasegenet mot antibiotikaklassene penicillin og cefalosporiner hos prøve S9. Til tross for dette medfører det kromosomale *ampC*-genet fremdeles resistens mot penicillin og cefalosporiner, og selv om de fleste kromosomale *ampC*-genene blir uttrykt i lav grad er bakteriestammen *Enterobacter spp.* relatert til et stabilt og forhøyet uttrykk av dette genet (Ørjan Samuelsen*, u.å.). Dermed vil det kromosomale *ampC*-genet i prøve S9 medføre en stabil resistens mot penicillin og cefalosporiner imotsetning til andre bakteriestammer som har lav samt regulert uttrykk av dette genet. Ser man videre på de resterende resistensgenene rettet mot β -laktam som ble identifisert i prøve S9, ser man at et lignende plasmidmediert *ampC*-gen, *blaACT-4* har blitt identifisert (Bjørge C. Haldorsen, 2012). Genet som ble idnetifisert hadde litt under 100% i identitetsprosenten, med det har man ikke fått identifisert *blaACT-4* genet men et svært lignende gen. Det er med det tenkelig at det identifiserte genet har samme egenskaper som *blaACT-4* genet. *BlaACT-4* er en familie av *ampC* genet og tilhører med det subgruppen *ESBL_M* som er relatert til økt spredning via MGE og forhøyet resistens mot antibiotikaklassene penicillin og cefalosporine blant bakteriefamilien *Enterobacteriaceae*. På grunn av sin tilstedeværelse på MGE kan spredning av dette genet også medføre spredning av andre nærliggende resistensgener på de MGE. Tilstedeværelse av *blaACT-4* genet vil med dette kunne medføre utvikling av multiresistente *Enterobacteriaceae* bakterier. Etersom en rekke bakterieslekter av denne familien er relatert som kliniske inkludert prøve S9, er tilstedeværelse av et slikt gen svært urovekkende. Det kan medføre behandlingssvikt hos pasienter. Ser man videre på dette spesifikke ESBL-genet *blaACT-4* ut ifra databasen til CARD, ser man at dette genet i tillegg til å medføre resistens mot penicilliner og cefalosporiner også kan medfører resistens mot karbapenemer (Alcock et

al., 2020). Dette kan tyde på mutasjoner av *ACT*-genet, og har medført utvidet resistens hos disse enzymene. Med det burde dette genet blitt flyttet til subgruppen *ESBL_{CARBA}*. Den består av *ESBL*-enzymmer som medfører spredning og utvikling av resistens mot de tre β -laktamklassene penicilliner, cefalosporiner og karbapenem (Björg C. Haldorsen, 2012). Prøve S9 vil med det kunne bli betegnet som en multiresistent bakterie til tross for ingen MIC-målinger, grunnet *blaACT-4* genets evne til å medføre resistens mot tre antibiotikaklasser.

I motsetning til prøve S9 er verken prøvene H8 eller V6 assosiert med iboende *ampC*-gen. Derfor er det tenkelig at prøvene H8 og V6 har fått identifisert et plasmidmediert *ampC*-gen. Som nevnt ovenfor er dette genet betegnet som et *ESBL* gen fra subgruppen *ESBL_M*, som medfører resistens mot et utvidet spektrum av penicillin og cefalosporiner (Björg C. Haldorsen, 2012). I tillegg er den assosiert med høy virulens, konstant genuttrykk og økt spredningsevne via MGE (Björg C. Haldorsen, 2012; Ørjan Samuelsen*, u.å.).

Ser man videre på resistensgene hos disse to bakterieprøvene relatert til β -laktamresistens, blir det oppdaget et kromosomalt betalaktamasegen *blaOCH-2* hos bakterieprøve V6. Dette genet er ikke blant de klinisk viktigste *ESBL*-genene fra subgruppene *ESBL_A*, *ESBL_M* og *ESBL_{CARBA}* (Björg C. Haldorsen, 2012). Til tross for dette ligner *blaOCH-2* genet på β -laktamasegenet *ampC*, hvor antibiotikaklassene penicillin samt de fleste cefalosporiner blir hydrolysert av et β -laktamaseenzym (Alcock et al., 2020; Yagel et al., 2020). Denne likheten skyldes at *blaOCH-2* genet utgjør en resistensfenotype av *ampC*-genet og er relatert til bakterieslekten *Brucella* (Yagel et al., 2020). Tilstedeværelse av dette genet i prøve V6 er derfor ikke overraskende.

Til tross for at *blaOCH-2* genet medfører resistens mot to klinisk viktige antibiotikaklasser av gruppen β -laktam, kodes genet kromosomalt, og med det utgjør den en mindre trussel i forhold til resistensgenene kodet på MGE (Ørjan Samuelsen*, u.å.). I tillegg til *ampC* samt *blaOCH-2* genet som ble identifisert i prøve V6, ble det i tillegg identifisert et siste resistensgen rettet mot antibiotikagruppen β -laktam. Dette genet utgjør genet *blh*, som er et Beta-laktamase hydrolase-lik protein. Blh vil i samsvar med AmpC samt *BlaOCH-2*, øke nedbrytelsen av antibiotika fra gruppen β -laktam.

Det siste genet som var rettet mot β -laktamresistens besto av genet *oprD*, og ble identifisert i prøvene S9 og H8. *OprD*-genet står for porin. I likhet med andre poriner bidrar disse til å transportere en rekke stoffer over cellemembran hos gramnegative bakterier (Agah Terzi, 2015; Smith & Kendall, 2022). I tillegg til å transportere viktige komponenter til bakteriens

metabolisme, kan disse porinene også transportere en rekke hydrofile antibiotikaer som β -laktam (Agah Terzi, 2015). *OprD*-genet er spesielt relatert til transport av antibiotikaklassen karbapenem, i tillegg til en rekke aminosyrer og peptider. OprD letter med det penetrasjon av karbapenem som medfører lysing av bakterien. I motsetning til dette gjør denne egenskapen også OprD svært sensitiv for sin ekspresjon som ved svekket tilstand vil kunne medføre resistens for hydrofile antibiotika som karbapenem (Agah Terzi, 2015; Smith & Kendall, 2022). *OprD*-genet kan medføre mediert resistens hos bakterier via redusert transkripsjon eller ved funksjonstap ved mutasjon.

6.5.2 Kinolonresistensdeterminanter

En rekke kinolonresistensdeterminanter ble observert fra prøvene S9, H8 og V6, men blant disse ble det observert flest i prøve S9 etterfulgt av prøve H8 og minst i V6. Felles for alle er at det ble det observert resistensdeterminantene *gyr (A,B)*, *parC*, *ompA*, *emr (A,B)* og *mfd*. Blant alle resistensmekanismene rettet mot kinoloner, utgjør målmutasjoner den vanligste resistensmekanismen og medfører som oftest høy grad av resistens (Poole, 2007). Ved at kinoloner binder seg til type II topoisomerase enzymene gyrase og topoisomerase IV, vil mutasjoner på deres underenheter GyrA₂ og GyrB₂ (hos gyrase) og/eller ParC₂ og ParE₂ (hos topoisomerase IV av gramnegative bakterier) medføre resistens mot kinoloner på grunn av redusert bindingsaffinitet (Correia et al., 2017; Gibson et al., 2018). Hos alle tre miljøbakteriene ble det identifisert gener av underenheten gyrase (GyrA og GyrB). I motsetning til dette ble det kun identifisert gener for begge underenhetene av topoisomerase IV (ParC og ParE) i prøvene S9 og H8, mens i prøve V6 ble kun underenhet ParC av topoisomerase IV identifisert. Ettersom type II topoisomeraseenzymer er en vesentlig faktor under nukleinsyresynteseprosesser som motvirker vridningsstress og knuter på kromosomet hos alle typer bakterier, vil tilstedeværelse av disse genene hos alle tre miljøbakteriene være en "selvfølge" (Gibson et al., 2018; Yan & Bryant, 2022). Til tross for dette ser man at det manglet et underenhetsgen av topoisomerase IV hos prøve V6, og det kan tyde på at det har oppstått en delesjon på kromosomet i nærheten eller på dette genet (Martinsen, 2020a). Slik kan med det ha oppstått en målmutasjon hos prøve V6 som kan ha medført forhøyet kinoloinresistens. På en annen side ville ikke bakterien klart å overleve så godt uten dette genet, og med det er det liten sansynelighet at prøve V6 har denne typen målmutasjon. Det er mer tenkelig at dataprogramet PROKKA har ikke klart å navnsatte dette genet riktig. Hos de resterende prøvene S9 eller H8, hvor alle underenhetene til gyrase og topoisomerase IV er til

stede, tyder det på at det ikke har oppstått målmutasjon hos disse bakteriene heller. Denne resistensmekanismen har med det mest sannsynlig ikke forhøyet kinoloinresistens hos noen av disse bakteriene.

Det ble identifisert en rekke ervervede resistensmekanismer rettet mot kinoloner, inkludert begrenset opptak av antibiotika, økt medikamentutstrømning av efflukspumper og målbeskyttelse (Björg C. Haldorsen, 2012; Correia et al., 2017; Reygaert, 2018). Disse resistensmekanismene, i motsetning til målmutasjoner, medfører lavere grad av resistens av klinisk relevans (Correia et al., 2017). Til tross for dette ble det identifisert plasmidkodete gener blant noen av disse genene. Det kan medføre økt resistens mot kinoloner samt øke spredning av andre resistensgener (Correia et al., 2017). I prøve S9 ble det observert poringenene *ompF*, *ompC*, *ompD* og *ompA* som er relatert til forhøyet kinoloinresistens ved redusert eller tap av deres ekspresjon. I tillegg ble poringenet *ompX* også identifisert, som er relatert til redusert ekspresjon av poringenene: *ompC*, *ompD*, *ompF*, *lambB* og *tsx* ved overekspresjon av dette genet. Til tross for observasjon av disse poringenene kan man ikke konkludere med at tilstedeværelse av disse genene hos prøve S9 medfører forhøyet resistens mot kinoloner, selv om dette er tenkelig. Tap av disse porinene er relatert til kinoloninresistens hos gramnegative bakterier på grunn av at kinoloner er avhengige av poriner for å kunne trenge seg gjennom den doble cellemembranen (Correia et al., 2017). Ut ifra denne teorien er det tenkelig at porintap kan ha bidratt til kinoloinresistens i prøvene S9, men også i H8 og V6 hvor det ble identifisert *omp* gener.

Av kinoloinrelaterte resistensmekanismer rettet mot økt medikamentutstrømning av efflukspumper, ble genene *emrAB-tolC* og *pat (A, B)* identifisert. *EmrAB-tolC* ble identifisert i alle tre prøvene. *EmrAB-TolC* efflukspumpen har ikke blitt forsket så mye på. Til tross for dette utgjør den en tredelt multimedikamentutstrømningssystem fra den store tilrettelegger-superfamilien (MFS), som utgjør en iboende resistens hos *E. coli* bakterier ved å pumpe ut karbonyl-cyanid m-klorfenylhydrazon (CCCP) og nalidiksinsyre (smalspektret kinolon antibiotikum) (Aly et al., 2021; Madej, 2015; Tanabe et al., 2009; Yousefian et al., 2021). Ved overekspresjon av effluksgenet ved en mutasjon kan i tillegg øke resistensen mot den smalspektrede kinolonnalidiksinsyren, og en rekke andre kjemiske forbindelser (Aly et al., 2021; institute, 2022; Yousefian et al., 2021). Tilstedeværelse av denne efflukspumpen hos *E. coli* bakterier har ikke stor grad av klinisk relevans. Den koder for kinoloin med smalspektret samt begrenset antibakteriell effekt, i motsetning til andre og tredje generasjon fluorokinoloner med bredspektret potensial (unntak av norfloxacin) og forbedret antibakteriell effekt (Gibson

et al., 2018; Kocsis et al., 2016). Til tross for dette kan nalidiksinsyre bli benyttet i tilfeller av ukompliserte urinveisinfectionsjoner (Aly et al., 2021). Tilstedeværelse av denne efflukspumpen hos de identifiserte miljøbakteriene har heller ikke stor grad av interesse siden dette genet kun medfører liten grad av resistens mot smalspekret kinoloin. På en annen side påvirker alle former for resistens resistensutviklingen hos hver enkelt bakterie og den økende resistensutviklingen på jorda.

I prøve S9 ble efflukspumpegenet *patA* identifisert, og i prøve H8 ble genet *patB* identifisert. PatA samt PatB utgjør en ABC-transportør, hvor det er rapportert resistens mot andregenerasjon av fluorokinolonene, ciprofloksacin og norfloksacin ved overekspresjon (Garvey et al., 2011; Gibson et al., 2018). Av klinisk relevans er disse pumpene identifisert i bakterien *Streptococcus pneumoniae*, som kan medføre sykdom som blant annet bihulebetennelse, ørebetennelse og lungebetennelse (Garvey et al., 2011). Identifiseringen av disse genene i prøvene S9 og H8 kan med dette ha medført forhøyet resistens mot fluorokinolonene, ciprofloksacin og norfloksacin. Ettersom ABC-transportørgener i hovedsak ligger kromosmalt, vil tilstedeværelse av disse genene ikke øke spredning av resistens.

Bland resistensmekanismene rettet mot målbeskyttelse, ble resistensgene *mfd* og *qnrE1* identifisert (Alcock et al., 2020). Målbeskyttelsesgenet *mfd* ble observert i alle tre miljøbakteriene. Proteinet Mfd står for mutasjonsfrekvensnedgang på grunn av sin funksjon til å fjerne polymeraseenzymer som har stanset på grunn av DNA-skade under transkripsjonsprosessen (Smith & Fratamico, 2010). Ved fjerning av stanset polymeraseenzymer kan reparasjonsenzymer utføre sin funksjon raskt, som medfører reduserte genmutasjoner. Tidligere forskning viser at tilstedeværelse av dette genet også kan fremme utvikling av fluorokinoloinresistens. Dette er vist hos blant annet *Campylobacter spp.* relatert til matbårne patogener (Han et al., 2008). Tilstedeværelse av *mfd*-genet hos miljøbakterier kan med det ha medført en liten grad av resistens mot fluorokinoloner spesielt på grunn av den forhøyede resistensen ved tilstedeværelse av antibiotikumet kinoloin (Han et al., 2008).

I motsetning til målbeskyttelsesgenet *mfd* som er kodet kromosmalt, er *qnrE1* et plasmidmediert gen relatert til kinoloinresistens (Correia et al., 2017). QnrE1 medfører en fysisk beskyttelse av målenzymene gyrase og topoisomerase IV og som medfører at kinoloinene ikke får festet seg og utført sin funksjon. Genet er antatt å tilhøre en ny qnr-familie som antagelig har kommet fra kromosmet til *Enterobacter spp.* og videre mobilisert seg i plasmider (Albornoz et al., 2017). *QnrE1* er med det funnet i kliniske isolater som

Klebsiella Pneumoniae (Correia et al., 2017; Martínez-Martínez et al., 1998). I likhet med *mfd*-genet kan *qnrE1* også medføre fluorokinoloinresistens, men i motsetning vil *qnrE1* genet kunne medføre økt resistens samt spredning av de resistente genene (Alcock et al., 2020). Prøve S9 som inneholder dette genet kan med det ha økt fluorokinoloinresistens.

6.5.3 Makrolidresistensdeterminanter

Alle tre bakterieprøvene S9, H8 og V6 viste tilstedeværelse av genene *mac* (*A*, *B*), *carA* og *msrA* som tilhører ABC-efflukspumpefamilien eller underfamilien ABC-F familien (Alcock et al., 2020; Ousalem et al., 2019). Membranproteinet MacB utgjør en ABC-efflukspumpe som sammen med membranfusjonsproteinet MacA og multifunksjonell ytre membrankanale TolC, danner en tredelt transmembranmaskin (Fitzpatrick et al., 2017; Gregers, 2021a; Kobayashi et al., 2003; Webber & Piddock, 2003; Xu et al., 2010). Transmembranmaskinen strekker seg med det gjennom den indre og ytre cellemembranen hos gramnegative bakterier, hvor MacB-protein via ATP-hydrolyse pumper ut en rekke substrater inkludert antibiotikumet makrolider av klinisk relevans (14- og 15-leddede) (Gregers, 2021b; Kobayashi et al., 2003; Vázquez-Laslop & Mankin, 2018; Webber & Piddock, 2003). MacAB-TolC transmembranmaskin er en iboende resistensmekanisme hos *E. coli* bakterier samt en rekke andre gramnegative bakterier inkludert patogene (Fitzpatrick et al., 2017; Huang et al., 2022; Xu et al., 2010). Denne resistensmekanismen bidrar til makrolidresistens hos disse bakteriene, ved å motvirke opphopningen av makrolider inni cellen. Ettersom alle tre bakterieprøvene er gramnegative, stemmer tilstedeværelsen av denne transmembranmaskinen godt med teorien. Tilstedeværelse av denne iboende efflukspumpen vil kunne medføre økt resistens mot 14- og 15-leddet makrolider i prøvene S9, H8 og V6.

I tillegg til MacAB-TolC efflukspumpen ble genene *msrA* og *carA* indentifisert, og de tilhører ABC-F proteinunderfamilien (Alcock et al., 2020; Ousalem et al., 2019). *MsrA*-genet har blitt mer forsket på enn *carA*-genet, og derfor finnes det ikke så mye informasjon om *carA*-genet i forhold til *msrA*. Til tross for dette tilhører de begge ABC-F proteinunderfamilien som i en fellesbetegnelse koder for proteiner rettet mot målbeskyttelse av ribosomer (Ousalem et al., 2019; Sharkey & O'Neill, 2018). ABC-F proteinunderfamilien medfører antibiotikaresistens blant ribosommålrettede antibiotika. Dette gjør de ved å feste seg til ribosomet hvor de ved hjelp av ATP-hydrolyse får frigjort antibiotika som hemmer proteinsyntesen. Proteinsyntesen kan med det fortsette som vanlig.

Blant disse to identifiserte genene hos miljøbakteriene, har *msr*-genet fra tidligere av blitt identifisert i både grampositive og gramnegative bakterier (Dinos, 2017). Dette kan skyldes dens tilstedeværelse på MGE (Feßler et al., 2018; Poole, 2005). Msr kan medføre resistens mot antibiotikaene makrolid og streptogramin B, hvor begge er relaterte til forstyrrelse av proteinsyntesen ved å binde seg til 50S-delen av ribosomet (Allison & Lambert, 2015; Dinos, 2017; Feßler et al., 2018). Ettersom begge disse antibiotikaene er mest aktive mot grampositive bakterier vil resistens hos de grampositive bakteriene medføre størst klinisk trussel. Til tross for dette ble genet identifisert hos alle tre miljøbakteriene som utgjør gramnegative bakterier. Tilstedeværelse av genet hos disse bakteriene vil også kunne medføre en klinisk trussel med tanke på at både prøvene S9 og V6 er humanpatogene. Makrolid antibiotikum vil med det ha en redusert effekt på disse bakteriene og prøve H8. I tillegg er genet kodet på MGE, noe som kan medføre økt spredning av genet selv og andre resistensgener. Ettersom alle tre miljøbakteriene har fått identifisert genet, tyder dette på at genet allerede er vidt spredt i miljøet. I motsetning til *msr*-genet er *carA*-genet som nevnt tidligere ikke forsket så mye på. Likevel vet man at genet i samråd med *msr*-genet, medfører makrolidresistens (Schoner et al., 1992). Tilstedeværelse av dette samt *msr*-genet i miljøbakteriene vil kunne medføre makrolidresistens. Men på grunn av lite informasjon kan man ikke bekrefte eller avkrefte om genet befinner seg på MGE slik det gjør hos *carA*-genet. Med det vet man ikke om Msr medfører økt spredning av makrolidresistens og andre resistente gener, men på en annen side er genet kodet hos alle tre miljøbakteriene. Det kan tyde på at genet befinner seg på et MGE.

6.5.4 Tetrasyklinresistensdeterminanter

Det ble ikke identifisert tetrasyklinresistensdeterminanter i prøve S9, men i prøvene H8 og V6. Det ble her identifisert et *tetA*-gen i begge prøvene. De to mest benyttede resistensmekanismene rettet mot antibiotikumet tetrasyklin av klinisk relevans, inkluderer medikamentu-strømning og ribosomale beskyttelsesproteiner (Hobson et al., 2021). *TetA*-genet utgjør en tetrasyklinspesifikk efflukspumpe og er med det blant de vanligste resistensmekanismene rettet mot tetrasykliner (Alcock et al., 2020; Hobson et al., 2021; Roberts, 2005). Genet tilhører gruppe to fra MFS-familien og utgjør en tetrasyklin-proton-antiporter bestående av tolv transmembransegmenter, som aktivt pumper ut tetrasykliner fra bakteriens cytoplasma (Hobson et al., 2021). Uttrykkelse av *tetA*-genet vil med det pumpe ut tetrasykliner fra bakteriecellen før de rekker å få utført sin proteinbiosyntesehemmende

funksjon som vil medføre tetrasyklinresistens (Kapoor et al., 2017). I tillegg ligger dette genet på MGE, og det vil øke spredningen av dette tetrasyklinresistente genet sammen med andre resistente gener som ligger på MGE (Poole, 2007). Tilstedeværelse av *tetA*-genet i prøvene H8 og V6 vil kunne medføre tetrasyklinresistens. I tillegg kan genet medføre økt spredning av resistensgenet selv samt andre resistente gener lokalisert på MGE. I likhet med andre resistente gener lokalisert på MGE, kan spredning av disse medføre utvikling av multiresistente bakterier i miljøet rundt.

6.5.5 Efflux resistensgener

Fra alle tre bakterieprøvene S9, H8 og V6 ble det identifisert en rekke resistensgener for efflukspumper. Det er en resistensmekanisme som medfører at store mengder av antibiotika kan bli pumpet ut av bakteriecellene og forhindrer at den ødelegger cellen (Björg C. Haldorsen, 2012). Blant efflukspumpene som finnes i dag, kan ca. alle antibiotikaklasser av klinisk relevans bli transportert ut av cellene (Webber & Piddock, 2003). Dette kan skje ved utpumping av en enkel, spesifikk antibiotikaklasse eller ved en samlet utpumping av en rekke antibiotikaklasser, og det er en bidragsyter til utviklingen av MDR-bakterier (Poole, 2007; Webber & Piddock, 2003). Begge metodene er viktige bidragsytere for iboende og/eller ervervet antibiotikaresistens hos bakterier (Poole, 2007). De medikamentspesifikke efflukspumpene er direkte utviklet for å forsvare bakteriene mot spesifikk antibiotika, og de befinner seg i hovedsak på MGE som kan spres mellom bakterier. I motsetning til disse efflukspumpene er de multimedikamentefflukspumpene utviklet for å forsvare bakteriene mot det varierende miljøforholdet rundt dem. Dette gjør at de kan pumpe ut et bredt spekter av antibiotikaklasser i tillegg til en rekke andre ikke-antibiotiske substrater som: fargestoffer, vaskemidler, tungmetaller og organiske løsemidler (Blanco et al., 2016; Poole, 2007). På grunn av denne egenskapen er de multimedikamentefflukspumpene kodet på kromosomet hos de fleste bakterier (Poole, 2007). Disse uttrykkes i hovedsak ved mutasjon på efflukspumpenes regulatoriske gener, men som også kan uttrykkes konstitutivt (Poole, 2007).

Som nevnt ble det identifisert en rekke resistensgener rettet mot efflukspumper i bakterieprøvene S9, H8 og V6. Noen av disse er allerede beskrevet lengre opp i teksten i underavsnittene til delkapittelet 6.5 Helgenomsekvensering. Den medikamentspesifikke efflukspumpen TetA ble blant annet nevnt, samt multimedikamentefflukspumpene MacAB-TolC og EmrAB-TolC. Disse efflukspumpene var alle spesifikke eller mer spesifikke til en bestemt antibiotikaklasse til tross for at de fleste multimedikamentefflukspumpene er rettet

mot flere enn en spesifikk antibiotikaklasse. I tillegg til disse ble en rekke andre multiefflukspumper identifisert fra helegenomsekvenseringen, som besto av MexAB-oprM, AcrAB-TolC, OqxAB og EmrE. MexAB-OprM ble identifisert i prøvene S9 og H8, mens AcrAB-TolC kun ble identifisert i prøve S9. Både MexAB-OprM og AcrAB-TolC tilhører RND efflukspumpefamilien som utgjør den mest klinisk relevante efflukspumpefamilien, og er assosiert med MDR (Piddock Laura, 2006; Weston et al., 2018). MexAB-OprM efflukspumpen kan medføre resistens mot alle fire antibiotikagruppene som det har blitt lagt vekt på i denne oppgaven. Dette inkluderer β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner, i tillegg til antibiotikagruppene kloramfenikol, novobiocin og lincomycin (Pesingi et al., 2019). Etersom MexAB-OprM utgjør en multimedikamentefflukspumpe, er genene kodet på kromosomet til bakteriene. Den er blant annet identifisert i det opportunistiske patogenet *Pseudomonas aeruginosa* som kan medføre alvorlige infeksjoner hos mennesker, og det er assosiert med en høy iboende antibiotikaresistens (FHI, 2018; López et al., 2017). AcrAB-TolC efflukspumpen kan i likhet med MexAB-oprM medføre resistens mot antibiotikagruppene β -laktam, kinoloiner (fluorokinoloiner), makrolider (erytromycin) og tetrasykliner, i tillegg til antibiotikaene kloramfenikol og fusidinsyre (Pérez et al., 2007). I likhet med MexAB-OprM og andre multimedikamentefflukspumper er også genene til efflukspumpen AcrAB-TolC kodet på kromosomet (Weston et al., 2018). AcrAB-TolC er spesielt identifisert i *Enterobacteriaceae* familien, hvor bakteriene *E. coli*, *Salmonella spp.* og *Klebsiella pneumoniae* er av klinisk relevans (Perez et al., 2013; Weston et al., 2018).

Etersom multiefflukspumpen MexAB-OprM ble identifisert i prøve S9 *Enterobacter asburiae*, kan det tyde på at MexAB-OprM efflukspumpen hos denne bakterien utgjør en homolog av RND-pumpen (Piddock Laura, 2006). Dette kan tenkes ettersom homologer av MexAB-OprM har blitt observert i familien *Enterobacteriaceae*. Prøve H8 *Pseudomonas protegens* fikk også identifisert multiefflukspumpen MexAB-OprM, men siden denne efflukspumpen har blitt identifisert hos bakterier fra bakterieslekten *Pseudomonas*, er det tenkelig at denne efflukspumpen utgjør den originale pumpen. Som nevnt vil tilstedeværelse av denne efflukspumpen kunne medføre forhøyet resistens mot antibiotikagruppene β -laktam, kinoloiner, makrolider og tetrasykliner, som i dette tilfellet gjelder hos prøvene S9 og H8.

Multiefflukspumpen AcrAB-TolC ble kun identifisert i prøve S9 *Enterobacter asburiae*, noe som også stemmer godt overens med teorien ettersom denne efflukspumpen er identifisert i bakteriefamilien *Enterobacteriaceae*. I samsvar med MexAB-OprM efflukspumpen, vil denne

efflukspumpen også kunne øke resistens mot antibiotikagruppene β -laktam, kinoloiner, makrolider og tetrasykliner i prøve S9.

Multiefflukspumpen OqxAB tilhører også den kliniske relevante RND familien. I motsetning til de to ovenfornevnte efflukspumpene, er OqxAB et plasmidkodet (Correia et al., 2017). OqxAB medfører spesielt resistens mot antibiotikagruppen kinoloiner i tillegg til tetrasykliner. Utenom de fire antibiotikagruppene som det har blitt lagt vekt på i denne oppgaven, kan OqxAB efflukspumper også medføre resistens mot antibiotikagruppene kloramfenikol og trimetoprim. Pumpen er hovedsakelig identifisert i *E. coli* bakterier, men er også identifisert i *Salmonella spp.* (Kim Hong et al., 2009). OqxAB-pumpen ble identifisert i prøve S9, som i likhet med *E. coli* og *Salmonella* tilhører familien Enterobacteriaceae. Etersom OqxAB befinner seg på MGE, kan dette genet også spre seg mellom bakterier. Tilstedeværelse av dette genet hos en nært beslektet bakterie som prøve S9 *Enterobacter asburiae* er derfor ikke uventet. I tillegg vil tilstedeværelse av dette genet hos prøve S9 kunne medføre økt resistens mot spesielt kinoloner og tetrasykliner.

EmrE multiefflukspumpen ble identifisert i prøve V6 (Ovchinnikov et al., 2018). Denne efflukspumpen tilhører den lille multimedikamentresistente superfamilien (SMR) og forårsaker økt resistens mot antibiotika fra gruppen β -laktam (ampicillin), makrolider (erytromycin) og tetrasykliner (Jurasz et al., 2021; Ovchinnikov et al., 2018). I motsetning til de fleste efflukspumper fra RND som utgjør et tredelt efflukskompleks, utgjør EmrE efflukspumpen kun en av disse delene (Jaida Kenana, 2018; Venter et al., 2015). EmrE befinner seg i den indre membranen og pumper substrater inn i periplasma. Der benytter den seg av andre efflukspumper som RND for å frakte substratene over den ytre membranen og ut til det ytre miljøet utenfor cellen (Jaida Kenana, 2018). Efflukspumpen EmrE er i hovedsak identifisert i *E. coli* bakterier, men SMR efflukspumper er generelt identifisert i blant annet *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitis*, *Bacillus anthracis* og *Staphylococcus aureus* bakterier (Ovchinnikov et al., 2018). Etersom *emrE* genet kan både kodes på kromosomet og MGEer, er tilstedeværelse av *emrE* genet hos miljøbakterien *Brucella intermedia* ikke overraskende grunnet genets mobilitet (Jaida Kenana, 2018). I tillegg vil tilstedeværelse av dette genet kunne medføre forhøyet resistens mot antibiotikagruppene β -laktam, makrolider og tetrasykliner i prøve V6.

Alle de ovenfornevnte efflukspumpene i tillegg til de resterende resistensdeterminante som ble identifisert i prøvene S9, H8 og V6, har bidratt til å øke resistens mot antibiotikagruppene β -laktam, kinoloiner, makrolider og tetrasykliner. Dette er blant annet vist ved MIC-testing

for prøvene H8 og V6. Ettersom både prøve S9 og V6 kan medføre sykdom hos mennesker er denne tilstedeværelsen svært urovekkende, grunnet begrensede behandlingsmuligheter (Nemhauser, 2020; Scholz et al., 2008; Tønjum, 2022b).

6.5.6 Tungmetallresistente gener

I prøvene S9 og H8 ble det i tillegg til antibiotikaresistensgener identifisert resistensgener rettet mot tungmetaller. Siden tungmetallresistensgener er assosiert med å øke spredningen av antibiotikaresistente gener som ligger på de MGEene, er denne identifiseringen svært alarmerende (Vats et al., 2022). Spesielt er det alarmerende at prøve S9 har fått identifisert tungmetallresistente gener ettersom den også er bærer av *blaACT-4* genet. Som nevnt ovenfor er *blaACT-4* genet kodet på MGE og medfører forhøyet resistens mot penicillin og cefalosporiner (Bjørn C. Haldorsen, 2012). I tillegg er genet assosiert med utvikling av multiresistens, spesielt blant kliniske bakterier fra *Enterobacteriaceae* familien. Økt spredning av et slikt ESBL-gen er med det ikke ønskelig. I tillegg til *blaACT-4* genet, ble det identifisert en rekke andre resistensgener kodet på de MGE i prøve S9. Blant annet ble målbeskyttelsesgenet *qnrE1* og multiefflukspumpen *oqxAB* identifisert (Albornoz et al., 2017; Correia et al., 2017). Økt spredning av disse genene vil kunne medføre i hovedsak økt kinoloin- samt tetrasyklinresistens blant bakterier i miljøet (Correia et al., 2017). I prøve H8 ble det i hovedsak kun identifisert ett resistent gen som er kodet på MGEer, *tetA* genet (Poole, 2007). Ved tilstedeværelse av tetrasyklinspesifikk effluxpumpegenet *tetA* og tungmetallresistensgener på MGEene hos prøve H8, vil dette kunne medføre økt spredning av tetrasyklinresistens blant bakterier i miljøet (Alcock et al., 2020; Hobson et al., 2021; Roberts, 2005). Sammenligner man de resistente genene som er kodet på de MGE til prøvene S9 og H8, utgjør S9 sine resistente gener en større trussel ved spredning enn H8. Til tross for dette vil alle typer resistensgener som spres via MGE, og som nevnt tidligere kunne det medføre spredning av en rekke andre resistensgener som også befinner seg på det MGE. Begge bakteriprøvene kan med det bidra til utvikling av multiresistente bakterier i miljøet, men på grunn av tilstedeværelse av tungmetallresistensgener vil denne prosessen kunne bli forskyndet.

Av tungmetallresistensgenene som ble identifisert, ble *cnr (A)* og *czc (A)* genene identifisert i prøve S9 og *mer (R)*, *cop (A, B)*, *pco (C)* og *czc (A, B, C)* i prøve H8.

Tungmetallresistensgenene i prøve S9, *cnr (A)* og *czc (A)*, medfører til sammen resistens mot de essensielle tungmetallene nikkel (Ni), kobolt (Co), sink (Zn) og det ikke-essensielle

tungmetallet kadmium (Cd) (Vats et al., 2022). Mens genene fra prøve H8 *mer (R)*, *cop (A, B)*, *pco (C)* og *czc (A, B, C)* medfører til sammen resistens mot de essensielle tungmetallene kobber (Cu), kobolt (Co) og sink (Zn), i tillegg til de ikke-essensielle tungmetallene kvikksølv (Hg) og kadmium (Cd). Generell tilstedeværelse av tungmetallresistensgener, sier noe om mengden samt type tungmetaller som finnes i miljøet og rundt miljøet som ble testet. Tilstedeværelse av flere tungmetallgener i prøve H8 i forhold til prøve S9, kan skyldes bakteriens habitat. Vannprøven for prøve H8 ble tatt fra Midsjø, en innsjø omringet av landbruk. Derfor er det tenkelig at tungmetaller fra blant annet dyrefôrtilskudd og plantegjødsel kan ha påvirket utviklingen av tungmetallresistente gener (Vats et al., 2022). Ettersom tungmetallene Cu, Zn, Hg og Cd er assosiert med denne typen “forurensing” er det tenkelig at dette er grunnlaget til denne type utvikling. I tillegg er også gjødsel en stor spredder av resistente bakterier, som i nærvær av metaller vil øke spredningen av resistente gener via HGT. Områder rundt jordbruk gir med det bakterier gunstige forhold for utvikling og spredning av resistente gener. Ser man videre på resistensgener for tungmetaller hos prøve S9, ser man at disse genene også kan medføre resistens mot blant annet Zn og Cd som finnes i dyrefôr og plantegjødsel. I motsetning til prøve H8, ble vannprøve S9 tatt fra Langen. Vannet er i hovedsak omringet av store deler skog, men har også noe landbruk i nær beliggenhet langs vannet. Gjødsel fra denne type landbruk kan ha påvirket utviklingen av resistente gener rettet mot disse tungmetallene.

7.0 Konklusjon

Alle miljøbakteriene som hadde blitt isolert og MIC-testet i dette studie, viste tegn til en begynnende resistensutvikling mot alle de fire klinisk viktige antibiotikagruppene: β -laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. I tillegg viste de fleste også full resistens mot førstegenerasjonspenicillin og makrolider. Blant disse bakteriene ble prøvene H8 og V6 anerkjent som multiresistente, i tillegg til prøve S9 som fikk identifisert et lignende *blaACT-4* gen fra subgruppen ESBL_M ved helgenomsekvensering.

At flere av miljøbakteriene man fant, ble identifisert som humanpatogene er svært utovekkende. Dette fordi det på sikt vil kunne føre til begrensende behandlingsmuligheter. Spesielt er det urovekkende at det ble identifisert en rekke resistensgener hos prøvene S9, H8 og V6 kodet på MGE, som kan medføre økt spredning av resistens og økt utvikling av multiresistente bakterier. Svært urovekkende er det også med identifisering av det lignende

plasmidkodede ESBL-genet *blaACT-4* på en humanpatogen prøve S9, som er relatert til økt spredning av multiresistente bakterier fra *Enterobacteriaceae* familien. I tillegg til dette ble det også identifisert en rekke tungmetallresistente gener.

Man kan ut ifra dette konkludere med at det finnes miljøbakterier i Norge med resistens mot de klinisk viktigste antibiotikagruppene. I tillegg finnes det også en rekke resistensgener som kan medføre økt resistens samt medføre spredning av resistens i miljøet.

Det er derfor viktig med videre kontroll av antibakteriell bruk, spesielt bruk av klinisk viktige antibiotikaer for mennesker. Disse burde kun benyttes i en begrenset grad og kun for mennesker. Man har sett at selv ved begrenset bruk av antibiotika i Norge og i en rekke andre land, har resistens i miljøet og eksempelvis på sykehus økt. Dette har i høy grad blitt relatert til tidligere overforbruk av antibiotika. Ko-resistens av tungmetaller ved økt seleksjonspress hos bakterier i miljøet, vil ytterligere øke spredningen av antibiotikaresistente gener som befinner seg på MGE.

Det er derfor viktig med overvåking av utviklingen når det gjelder spredningen av antibiotikaresistente gener og tungmetallresistente gener. For å holde følge med utviklingen vil regelmessig prøvetaking med oppfølgende tiltak være nødvendig. I tillegg burde man utvikle nye metoder for å behandle antibakterielle infeksjoner, hvor man drar nytte av både gammel og nymoderne forskningen for å bekjempe trusselen som er belyst i denne oppgaven.

8.0 Referanseliste

- Agah Terzi, H., Canan Kulah, Ali Riza Atasoy and Ihsan Hakki Ciftci. (2015). Investigation of OprD Porin Protein Levels in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8.
- Akershus, F. i. O. o. (2010a). Midtsjøvann, Nærevann og Rullestad tjern naturreservater. Tilgjengelig fra: https://www.statsforvalteren.no/siteassets/utgatt/fm-oslo-og-akershus/dokument-fmoa/miljo-og-klima/verneomrader/informasjonsplakater/midtsjovann_narevann_og_rullestad_tjern_naturreservater.pdf.
- Akershus, F. i. O. o. (2010b). Østensjøvann naturreservat. Tilgjengelig fra: https://www.statsforvalteren.no/siteassets/utgatt/fm-oslo-og-akershus/dokument-fmoa/miljo-og-klima/verneomrader/informasjonsplakater/ostensjovann_naturreservat_i_as.pdf.
- Albornoz, E., Tijet, N., De Belder, D., Gomez, S., Martino, F., Corso, A., Melano, R. G. & Petroni, A. (2017). qnrE1, a Member of a New Family of Plasmid-Located Quinolone Resistance Genes, Originated from the Chromosome of Enterobacter Species. *Antimicrob Agents Chemother*, 61 (5). doi: 10.1128/aac.02555-16.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. V., Cheng, A. A., Liu, S., et al. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*, 48 (D1): D517-d525. doi: 10.1093/nar/gkz935.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J. & Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53 (10): 1565-1574. doi: 10.1021/bi5000564.
- Ali, L. I. o. A. M. (2019). *tetrasykliner*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/tetrasykliner> (lest 05.05.2022).
- Allison, D. G. & Lambert, P. A. (2015). Chapter 32 - Modes of Action of Antibacterial Agents. I: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. & Schwartzman, J. (red.) *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, s. 583-598. Boston: Academic Press.
- Aly, A. A., Ramadan, M., Abu-Rahma, G. E.-D. A., Elshaier, Y. A. M. M., Elbastawesy, M. A. I., Brown, A. B. & Bräse, S. (2021). Chapter Three - Quinolones as prospective drugs: Their syntheses and biological applications. I: Scriven, E. F. V. & Ramsden, C. A. (red.) b. 135 *Advances in Heterocyclic Chemistry*, s. 147-196: Academic Press.
- Ampliqon. (u.å.). *Loading Buffers*. Tilgjengelig fra: <https://ampliqon.com/en/pcr-enzymes/pcr-enzymes/loading-buffers/> (lest 10.06.2022).
- Anand, A. & Soni, V. (2020). Chapter 13 - RNA and bacterial infection. I: Pandey, R. (red.) b. 19 *Rna-Based Regulation in Human Health and Disease*, s. 307-326: Academic Press.
- Andreolli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S. & Vallini, G. (2019). *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiological Research*, 219: 123-131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.003>.
- Anon. (2021). *Bacteria - Cell Walls*. Tilgjengelig fra: <https://bio.libretexts.org/@go/page/10632> (lest 24.05.2022).
- Anon. (2022). *The Peptidoglycan Cell Wall*. Tilgjengelig fra: <https://bio.libretexts.org/@go/page/3110> (lest 29.04.2022).
- Arnfinn Sundsfjord, G. S. S., Bjørg Haldorsen, Eirik Wasmuth Lundblad, Ørjan Samuelsen (2008). Bredspektrede betalaktamaser hos gramnegative stavbakterier. *Den norske legeförening*.
- Aujoulat, F., Romano-Bertrand, S., Masnou, A., Marchandin, H. & Jumas-Bilak, E. (2014). Niches, population structure and genome reduction in *Ochrobactrum intermedium*: clues to technology-driven emergence of pathogens. *PLoS One*, 9 (1): e83376. doi: 10.1371/journal.pone.0083376.

- Australia, G. o. W. (u.å.). *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)*. Tilgjengelig fra: https://www.healthywa.wa.gov.au/Articles/A_E/Carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae-CRE (lest 07.07.2022).
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14 (4): 176-182. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>.
- Behera, S. & Pattnaik, S. (2019). Persister cell development among Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Mycobacteriaceae and Staphylococcaceae biotypes: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22: 101401. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101401>.
- Biocompare. (u.å.). *100 bp DNA Ladder from New England Biolabs*. Tilgjengelig fra: <https://www.biocompare.com/9224-100-bp-Ladders/58544-100-bp-DNA-Ladder/> (lest 10.06.2022).
- Biolabs. (u.å.). *Quick-Load® 100 bp DNA Ladder*. Tilgjengelig fra: <https://international.neb.com/products/n0467-quick-load-100-bp-dna-ladder#Product%20Information> (lest 10.06.2022).
- Biotium. (u.å.). *PAGE GelRed® Nucleic Acid Gel Stain*. Tilgjengelig fra: <https://biotium.com/product/page-gelred-nucleic-acid-gel-stain/> (lest 10.06.2022).
- Bjørg C. Haldorsen, Ø. S. (2012). Multiresistente Gram-negative bakterier – et økende globalt helseproblem. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/34e02e26a0b349d385378cfb103aa4c4/multiresistente-gram-negative-bakterier--et-okende-globalt-helseproblem.pdf>.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. & Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4 (1). doi: 10.3390/microorganisms4010014.
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7 (1): a025239. doi: 10.1101/cshperspect.a025239.
- Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R. & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25 (23): 5662. doi: 10.3390/molecules25235662.
- Bøhle, K. (2019). *Bakteriers ytre strukturer*. Tilgjengelig fra: <https://ndla.no/nb/subject:1:22dee9ab-5b1a-4c23-8c97-c68107b881bb/topic:2:77161/topic:2:188370/resource:1:134777> (lest 25.05.2022).
- Bøvre, K. (2021). *Enterobacteriaceae*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Enterobacteriaceae> (lest 29.06.2022).
- CDC. (2019). *CRE Technical Information*. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#Definition> (lest 29.06.2022).
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L. & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol*, 66 (5): 551-559. doi: 10.1099/jmm.0.000475.
- Cox, M. J., Cookson, W. O. C. M. & Moffatt, M. F. (2013). Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 22 (R1): R88-R94. doi: 10.1093/hmg/ddt398.
- Didakt, L. (u.å.). *Elektroforese, sett med spenningskilde og elektroforesekar*. Tilgjengelig fra: <https://www.labdidakt.no/biologi/bioteknologi/elektroforese-sett-med-spenningskilde-og-elektroforesekar> (lest 10.06.2022).
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British journal of pharmacology*, 174 (18): 2967-2983. doi: 10.1111/bph.13936.

- Emerging, S. C. o. & Risks, N. I. H. (2009). *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*: Directorate-General for Health & Consumers Brussels, Belgium.
- Eucast. (2022). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12. . Tilgjengelig fra: <http://www.eucast.org> (lest 14.06.2022).
- Eurolab. (u.å.). *MIC / MBC-test*. Tilgjengelig fra: <https://www.laboratuvar.com/no/testler/kozmetik/mic-mbc-testi/> (lest 10.06.2022).
- Europa, G. (u.å.). . Tilgjengelig fra: <https://usegalaxy.eu/> (lest 15.08.2022).
- Feßler, A. T., Wang, Y., Wu, C. & Schwarz, S. (2018). Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. *Plasmid*, 99: 2-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.05.001>.
- FHI. (2015). *ESBL-holdige gramnegative stavbakterier - smitteverntiltak i helseinstitusjoner*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/forebygging-i-helsetjenesten/smittevern-i-institusjoner/tiltak/esbl-holdige-gramnegative-stavbakte/> (lest 06.06.2022).
- FHI. (2018). *Pseudomonasinfeksjon - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon--veileder-for/> (lest 28.07.2022).
- FHI. (2019). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/> (lest 21.06.2022).
- FHI, f. (2021). *Antibiotikaresistens i Norge*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/> (lest 15.08.2022).
- Fisher, T. (u.å.). *Brilliance CRE AGAR*. Tilgjengelig fra: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1226#:~:text=Brilliance%20CRE%20Agar%20can%20be%20inoculated%20direct%20from,before%20inoculation.%20Incubate%20for%2018-24%20hours%20at%2037%C2%BAC. (lest 29.06.2022).
- Fitzpatrick, A. W. P., Lladrés, S., Neuberger, A., Blaza, J. N., Bai, X. C., Okada, U., Murakami, S., van Veen, H. W., Zachariae, U., Scheres, S. H. W., et al. (2017). Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat Microbiol*, 2: 17070. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.70.
- for, N. k. & spesialisthelsetjenesten, a. i. (2019). *Plakater for inndeling av bred- og smalspektrede antibiotika*. Tilgjengelig fra: <https://www.antibiotika.no/2019/07/17/plakater-for-inndeling-av-bred-og-smalspektrede-antibiotika/> (lest 12.08.2022).
- Forbord, K. M. (2021). *makrolider*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/makrolider> (lest 02.05.2022).
- Fossum, S. (2022). *ribosom*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/ribosom> (lest 29.04.2022).
- Frampton, J. E., Brogden, R. N., Langtry, H. D. & Buckley, M. M. (1992). Cefpodoxime proxetil. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs*, 44 (5): 889-917. doi: 10.2165/00003495-199244050-00011.
- Frivoll, Å. (2020). *topoisomerase*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/topoisomerase> (lest 18.05.2022).
- Fuoco, D. (2012). Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 1 (1): 1-13. doi: 10.3390/antibiotics1010001.
- Fylkesatlas Vestland*. (2010). Statsforvaltaren i Vestland og Vestland fylkeskommune. Tilgjengelig fra: <https://www.fylkesatlas.no/>.
- García-López, M. L., Santos, J. A., Otero, A. & Rodríguez-Calleja, J. M. (2014). Psychrobacter. I: Batt, C. A. & Tortorello, M. L. (red.) *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, s. 261-268. Oxford: Academic Press.
- Garvey, M. I., Baylay, A. J., Wong, R. L. & Piddock, L. J. (2011). Overexpression of patA and patB, which encode ABC transporters, is associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (1): 190-6. doi: 10.1128/aac.00672-10.

- Gaustad, P. (2001). *Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier*. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2001/10/tema-infeksjoner/mekanismer-utvikling-av-antibiotikaresistente-bakterier> (lest 15.04.2022).
- Geneon. (u.å.). *GREEN DNA-RNA-dye (delisted - not available anymore)*. Tilgjengelig fra: <https://www.geneon.net/products/fluorescent-dyes/green-dna-rna-dye/> (lest 10.06.2022).
- Gibson, E. G., Ashley, R. E., Kerns, R. J. & Osheroff, N. (2018). Bacterial Type II Topoisomerases and Target-Mediated Drug Resistance. I: Fong, I. W., Shlaes, D. & Drlica, K. (red.) *Antimicrobial Resistance in the 21st Century*, s. 507-529. Cham: Springer International Publishing.
- Golkar, T., Zieliński, M. & Berghuis, A. M. (2018). Look and Outlook on Enzyme-Mediated Macrolide Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01942.
- Gregers, T. F. (2021a). *cellemembraner*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/cellemembraner> (lest 24.05.2022).
- Gregers, T. F. (2021b). *cellemembraner: SML*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/cellemembraner> (lest 19.07.2022).
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6 (4): a025387-a025387. doi: 10.1101/cshperspect.a025387.
- Gråbøl-Undersrud, E. (2021). *proteinsyntese*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/proteinsyntese> (lest 04.05.2022).
- Haenni, M., Bour, M., Châtre, P., Madec, J.-Y., Plésiat, P. & Jeannot, K. (2017). Resistance of Animal Strains of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenems. *Frontiers in microbiology*, 8: 1847-1847. doi: 10.3389/fmicb.2017.01847.
- Han, J., Sahin, O., Barton, Y.-W. & Zhang, Q. (2008). Key Role of Mfd in the Development of Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni*. *PLOS Pathogens*, 4 (6): e1000083. doi: 10.1371/journal.ppat.1000083.
- Hauge, J. G. (2019). *deaminering*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/deaminering> (lest 01.07.2022).
- Haugen, M. N. (2019a). *Sanger-sekvensering*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Sanger-sekvensering> (lest 10.06.2022).
- Haugen, M. N. (2019b). *Sanger-sekvensering*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Sanger-sekvensering> (lest 09.06.2022).
- health, D. o. (2018). Enterobacteriaceae Tilgjengelig fra: <https://ldh.la.gov/assets/oph/Center-PHCH/Center-CH/infectious-epi/EpiManual/EnterobacteriaceaeManual.pdf> (lest 01.07.2022).
- Helsenorge. (2022). *Om antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsenorge.no/medisiner/antibiotika-og-resistens/om-antibiotikaresistens/> (lest 12.08.2022).
- Hobson, C., Chan, A. N. & Wright, G. D. (2021). The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents. *Chem Rev*, 121 (6): 3464-3494. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01214.
- Huang, L., Wu, C., Gao, H., Xu, C., Dai, M., Huang, L., Hao, H., Wang, X. & Cheng, G. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics*, 11 (4). doi: 10.3390/antibiotics11040520.
- Imran, M., Das, K. R. & Naik, M. M. (2019). Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere*, 215: 846-857. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.114.
- institute, N. h. g. r. (2022). *Repressor*. Tilgjengelig fra: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Repressor> (lest 24.07.2022).
- J Glenn Morris, J., MD, MPHTMAmy Horneman, PhD, MS, SM (ASCP). (2021). *Aeromonas infections*. Tilgjengelig fra: <https://www.uptodate.com/contents/aeromonas-infections#disclaimerContent>.
- Jaida Kenana, B. L., Colin Kalicki, Emily Inthavong, Arrihant Kanna. (2018). The Structure of EmrE and Its Role in Antibiotic Resistance.

- Jolley, K. A., Bray, J. E. & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3: 124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
- jr., E. B. (2022). *belgplantebakterier*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/belgplantebakterier> (lest 07.08.2022).
- Jurasz, J., Bagiński, M., Czub, J. & Wieczór, M. (2021). Molecular mechanism of proton-coupled ligand translocation by the bacterial efflux pump EmrE. *PLOS Computational Biology*, 17 (10): e1009454. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009454.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 33 (3): 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- Kassab, I., Sarsam, N., Affas, S., Ayas, M. & Baang, J. H. (2021). A Case of Ochrobactrum intermedium Bacteremia Secondary to Cholangitis With a Literature Review. *Cureus*, 13 (4): e14648. doi: 10.7759/cureus.14648.
- Kierulf, P. (2022). *osmose (fysiologi)*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/osmose - fysiologi> (lest 25.05.2022).
- Kim Hong, B., Wang, M., Park Chi, H., Kim, E.-C., Jacoby George, A. & Hooper David, C. (2009). oqxAB Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (8): 3582-3584. doi: 10.1128/AAC.01574-08.
- Kleppen, H. P. (2009). *A short introduction to some Bioinformatics. MVI 220 Næringsmiddelmikrobiologi*.
- Kobayashi, N., Nishino, K., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2003). Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in Escherichia coli. *FEBS Lett*, 546 (2-3): 241-6. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00579-9.
- Kocsis, B., Domokos, J. & Szabo, D. (2016). Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, finafloxacin, zabofloxacin and nemonoxacin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15 (1): 34. doi: 10.1186/s12941-016-0150-4.
- Koth, K., Boniface, J., Chance, E. A. & Hanes, M. C. (2012). Enterobacter asburiae and Aeromonas hydrophila: soft tissue infection requiring debridement. *Orthopedics*, 35 (6): e996-9. doi: 10.3928/01477447-20120525-52.
- Kristensen, J. G. H. o. T. (2017). *nukleinsyrer*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/nukleinsyrer> (lest 29.04.2022).
- landbruksrådgiving, N. (2022). *Nitrogenfiksering*. Tilgjengelig fra: <https://www.nlr.no/7-okologisk-jordkultur/nitrogenfiksering> (lest 07.08.2022).
- Lee, W., McDonough, M. A., Kotra, L., Li, Z. H., Silvaggi, N. R., Takeda, Y., Kelly, J. A. & Mobashery, S. (2001). A 1.2-A snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (4): 1427-1431. doi: 10.1073/pnas.98.4.1427.
- legemiddelverk, S. (2019). *Kinoloner skal kun brukes ved alvorlige infeksjoner*. Statens legemiddelverk. Tilgjengelig fra: <https://legemiddelverket.no/nyheter/kinoloner-risiko-for-invalidiserende-og-langvarige-bivirkninger> (lest 16.05.2022).
- Liabø, V. (2021). *betalaktam-antibiotika*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/betalaktam-antibiotika> (lest 23.05.2022).
- Llosa, M. & de la Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Research in Microbiology*, 156 (1): 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.07.008>.
- López, C. A., Travers, T., Pos, K. M., Zgurskaya, H. I. & Gnanakaran, S. (2017). Dynamics of Intact MexAB-OprM Efflux Pump: Focusing on the MexA-OprM Interface. *Scientific Reports*, 7 (1): 16521. doi: 10.1038/s41598-017-16497-w.
- Madej, M. G. (2015). Chapter Twenty-Four - Comparative Sequence-Function Analysis of the Major Facilitator Superfamily: The "Mix-and-Match" Method. I: Shukla, A. K. (red.) b. 557 *Methods in Enzymology*, s. 521-549: Academic Press.

- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (3): 268-281. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A. & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351 (9105): 797-9. doi: 10.1016/s0140-6736(97)07322-4.
- Martinsen, L. (2020a). *delesjon (genetikk)*. SNL. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/delesjon_-_genetikk (lest 23.07.2022).
- Martinsen, L. (2020b). *DNA*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/DNA> (lest 06.06.2022).
- Martinsen, L. (2020c). *genotype*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/genotype>.
- Merck. (u.å.). *GenElute™ PCR Clean-Up Kit*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/na1020> (lest 10.06.2022).
- Miljødirektoratet. (u.å.). *Midtsjøvann naturreservat*. Tilgjengelig fra: <http://faktaark.naturbase.no/?id=VV00000968> (lest 10.06.2022).
- Moazed, D., Robertson, J. M. & Noller, H. F. (1988). Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature*, 334 (6180): 362-4. doi: 10.1038/334362a0.
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Nemhauser, G. W. B. o. J. B. (2020). *CDC Yellow Book 2020*.
- NIBIO. (2022). *Belgvekster*. Tilgjengelig fra: <https://nibio.no/tema/mat/korn-og-frovekster/belgvekster> (lest 07.08.2022).
- NIH, N. L. o. M. (u.å.-a). *Basic Local Alignment Search Tool*. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest 10.06.2022).
- NIH, N. L. o. M. (u.å.-b). *Basic Local Alignment Search Tool*. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (lest 04.07.2022).
- NIH, N. L. o. M. (u.å.-c). *Nasjonal database over antibiotikaresistente organismer (NDARO)*. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/> (lest 15.08.2022).
- Nord-Norge, U. (2018). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://unn.no/fag-og-forskning/antibiotikaresistens> (lest 12.08.2022).
- Nucleics. (u.å.). *BioEdit Review*. Tilgjengelig fra: https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/Trace_viewer_reviews/BioEdit/ (lest 10.06.2022).
- Otterholt, T. T. o. E. (2021). *antibiotikaresistens*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antibiotikaresistens> (lest 22.04.2022).
- Otterholt, T. T. o. E. (2022). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antibiotikaresistens> (lest 12.08.2022).
- Ousalem, F., Singh, S., Chesneau, O., Hunt, J. F. & Boël, G. (2019). ABC-F proteins in mRNA translation and antibiotic resistance. *Research in Microbiology*, 170 (8): 435-447. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.09.005>.
- Ovchinnikov, V., Stone, T. A., Deber, C. M. & Karplus, M. (2018). Structure of the EmrE multidrug transporter and its use for inhibitor peptide design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (34): E7932-E7941. doi: 10.1073/pnas.1802177115.
- Oxid. (u.å.-a). *Brilliance CRE AGAR*. Tilgjengelig fra: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1226&c=UK&lang=EN (lest 12.06.2022).
- Oxid. (u.å.-b). *Brilliance*
- CRE. Tilgjengelig fra: <file:///C:/Users/Eier/Documents/Kaja%20sin%20masteropgave/artikler/Fra%20Bj%C3%B8rn>

- %20Arne/lab%20fakta/28178%20oxoid_Brilliance%20CRE%20data.indd.pdf (lest 12.06.2022).
- Oxoid. (u.å.-c). Brilliance™
- ESBL. Tilgjengelig fra: <http://www.oxoid.com/pdf/oxoid-Brilliance-ESBL.pdf> (lest 12.06.2022).
- Palzkill, T. (2013). Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277: 91-104. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.
- Pérez, A., Canle, D., Latasa, C., Poza, M., Beceiro, A., del Mar Tomás, M., Fernández, A., Mallo, S., Pérez, S., Molina, F., et al. (2007). Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the AcrAB-TolC Efflux Pump of *Enterobacter cloacae* and Determination of Its Involvement in Antibiotic Resistance in a Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (9): 3247-3253. doi: 10.1128/AAC.00072-07.
- Perez, F., Rudin Susan, D., Marshall Steven, H., Coakley, P., Chen, L., Kreiswirth Barry, N., Rather Philip, N., Hujer Andrea, M., Toltzis, P., van Duin, D., et al. (2013). OqxAB, a Quinolone and Olaquinox Efflux Pump, Is Widely Distributed among Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Human Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (9): 4602-4603. doi: 10.1128/AAC.00725-13.
- Pesingi, P. V., Singh, B. R., Pesingi, P. K., Bhardwaj, M., Singh, S. V., Kumawat, M., Sinha, D. K. & Gandham, R. K. (2019). MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Offers Resistance to Carvacrol: A Herbal Antimicrobial Agent. *Front Microbiol*, 10: 2664. doi: 10.3389/fmicb.2019.02664.
- Piddock Laura, J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (2): 382-402. doi: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1): 20-51. doi: 10.1093/jac/dki171.
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 39 (3): 162-176. doi: 10.1080/07853890701195262.
- Radkov, A. D., Hsu, Y.-P., Booher, G. & VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 87: 991-1014. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012921.
- reagents, A. P. e. (2020). *Laster buffere*. Tilgjengelig fra: <https://ampliqon.com/en/pcr-enzymes/pcr-enzymes/loading-buffers/> (lest 15.08.2022).
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 4 (3): 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
- Riaz, L., Yang, Q., Sikandar, A., Safeer, R., Anjum, M., Mahmood, T., Rehman, M. S. U., Rashid, A. & Yuan, W. (2020). Antibiotics Use in Hospitals and Their Presence in the Associated Waste. I: Hashmi, M. Z. (red.) *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes: Environmental Occurrence and Treatment Technologies*, s. 27-49. Cham: Springer International Publishing.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245 (2): 195-203. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.034.
- Sass, L. A. & Fisher, R. G. (2009). CHAPTER 113 - ENTEROBACTER. I: Feigin, R. D., Cherry, J. D., Demmler-Harrison, G. J. & Kaplan, S. L. (red.) *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases (Sixth Edition)*, s. 1519-1525. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Sawa, T., Kooguchi, K. & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8 (1): 13. doi: 10.1186/s40560-020-0429-6.
- Scholz, H. C., Pfeffer, M., Witte, A., Neubauer, H., Al Dahouk, S., Wernery, U. & Tomaso, H. (2008). Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the recA gene. *J Med Microbiol*, 57 (Pt 1): 64-71. doi: 10.1099/jmm.0.47507-0.

- Schoner, B., Geistlich, M., Rosteck, P., Rao, R. N., Seno, E., Reynolds, P., Cox, K., Burgett, S. & Hershberger, C. (1992). Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. *Gene*, 115 (1): 93-96. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90545-Z](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90545-Z).
- Scientific, T. (u.å.). *260/280 and 260/230 Ratios* Tilgjengelig fra: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf (lest 09.06.2022).
- Scientifics, T. F. (u.å.-a). *Qubit 2.0 fluorometer*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobables-journal-of-cell-biology-applications/bioprobables-issues-2011/bioprobables-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html> (lest 09.06.2022).
- Scientifics, T. F. (u.å.-b). *Qubit Protein Assays*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays/qubit-protein-assays.html> (lest 09.06.2022).
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30 (14): 2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Serikstad, G. L. (2020). *Underjordisk gjødsselfabrikk - Biologisk nitrogen-fiksering*. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/underjordisk-gjodselfabrikk-biologisk-nitrogen-fiksering> (lest 07.08.2022).
- Sharkey, L. K. R. & O'Neill, A. J. (2018). Antibiotic Resistance ABC-F Proteins: Bringing Target Protection into the Limelight. *ACS Infectious Diseases*, 4 (3): 239-246. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00251.
- Sharma, A., Gupta, V. K. & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian journal of medical research*, 149 (2): 129-145. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2079_17.
- Shutter, M. C. & Akhondi, H. (2022). Tetracycline. I: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Sinai, C. (2022). *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. Tilgjengelig fra: <https://www.cedars-sinai.org/health-library/diseases-and-conditions/c/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae.html> (lest 07.07.2022).
- Sirevåg, L. M. o. R. (2021). *Plasmid*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/plasmid> (lest 23.04.2022).
- Sirevåg, R. (2022). *Klebsiella*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Klebsiella> (lest 07.08.2022).
- Skiforeningen. (2021). *Skøyting sørover Langen*. Tilgjengelig fra: <https://www.skiforeningen.no/marka/bilder/?id=9798> (lest 06.06.2022).
- Sletten, A. (2021). *Erwinia*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/Erwinia> (lest 05.08.2022).
- Smith, H. Z. & Kendall, B. (2022). Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. I: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Smith, J. L. & Fratamico, P. M. (2010). Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*, 73 (6): 1141-1152. doi: 10.4315/0362-028X-73.6.1141.
- Spilker, T., Uluer, A. Z., Marty, F. M., Yeh, W. W., Levison, J. H., Vandamme, P. & Lipuma, J. J. (2008). Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 46 (8): 2774-7. doi: 10.1128/jcm.00460-08.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H. & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02066.

- Tanabe, M., Szakonyi, G., Brown, K. A., Henderson, P. J. F., Nield, J. & Byrne, B. (2009). The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from *Escherichia coli* forms a dimer in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380 (2): 338-342. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.081>.
- Tone Tønjum, K. B. o. A. S. (2020). *Pseudomonas*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Pseudomonas> (lest 05.08.2022).
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y. & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431 (18): 3472-3500. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.
- TTB. (u.å.-a). *The Nanodrop Results Explained*. Tilgjengelig fra: <https://toptipbio.com/the-nanodrop-results-explained/> (lest 09.06.2022).
- TTB. (u.å.-b). *Qubit vs Nanodrop: Which Is Better?* Tilgjengelig fra: <https://toptipbio.com/qubit-vs-nanodrop/> (lest 10.06.2022).
- Tønjum, T. (2020). *bakteriofag*. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/bakteriofag> (lest 22.04.2022).
- Tønjum, T. (2022a). *Enterobacter*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Enterobacter> (lest 07.08.2022).
- Tønjum, T. (2022b). *Enterobacter*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Enterobacter> (lest 05.08.2022).
- Uggerud, E. (2018). *sykkelige forbindelser*. Tilgjengelig fra: https://snl.no/sykkelige_forbindelser (lest 03.06.2022).
- UiO. (2011). *Antibiotika*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/antibiot.html> (lest 14.04.2022).
- UiO. (2019). *Dyreceller*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/d/dyreceller.html> (lest 14.04.2022).
- UiO. (2020a). *Kromosom*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/kromosom.html> (lest 21.05.2022).
- UiO. (2020b). *Superkveilet DNA*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/superkveilet.html> (lest 18.05.2022).
- UiO. (2021a). *Antibiotika*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/antibiot.html> (lest 06.05.2022).
- UiO. (2021b). *Sekvensering*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sekvensering.html> (lest 10.06.2022).
- UiO. (u.å.). *Agarose gel-elektroforese*.
- Vase, P. S. (2013). *Antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.biotechacademy.dk/undervisning/grundskole/bakterier-vira-antibiotikaresistens/antibiotika-og-resistens/> (lest 13.04.2022).
- Vats, P., Kaur, U. J. & Rishi, P. (2022). Heavy metal-induced selection and proliferation of antibiotic resistance: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 132 (6): 4058-4076. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.15492>.
- Vázquez-Laslop, N. & Mankin, A. S. (2018). How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in biochemical sciences*, 43 (9): 668-684. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.011.
- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T. & Ma, S. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front Microbiol*, 6: 377. doi: 10.3389/fmicb.2015.00377.
- Veterinærinstituttet. (2021). *Resistens mot karbapenemer hos Enterobacterales*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/resistens-mot-karbapenemer-hos-enterobacterales> (lest 07.07.2022).

- VKM. (2016). *L-tryptofan i kosttilskudd*. Tilgjengelig fra: <https://vkm.no/risikovurderinger/allevurderinger/andrestoffer/ltryptofanikosttilskudd.4.761cd04215dabef8a9e83e10.html> (lest 01.07.2022).
- Vogt, Y. (2016). *Bakterier på godt og vondt*. Tilgjengelig fra: https://www.apollon.uio.no/artikler/2016/3_bakterier_intro.html (lest 13.04.2022).
- Vrancianu, C. O., Popa, L. I., Bleotu, C. & Chifiriuc, M. C. (2020). Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00761.
- Wales, A. D. & Davies, R. H. (2015). Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel)*, 4 (4): 567-604. doi: 10.3390/antibiotics4040567.
- Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (1): 9-11. doi: 10.1093/jac/dkg050.
- Weston, N., Sharma, P., Ricci, V. & Piddock, L. J. V. (2018). Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, 169 (7): 425-431. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.10.005>.
- Xia, Y., He, L., Mao, J., Fang, P., Ma, X. & Wang, Z. (2018). Purification, characterization, and gene cloning of a new cold-adapted β -galactosidase from *Erwinia* sp. E602 isolated in northeast China. *J Dairy Sci*, 101 (8): 6946-6954. doi: 10.3168/jds.2018-14605.
- Xu, Y., Sim, S.-H., Song, S., Piao, S., Kim, H.-M., Jin, X. L., Lee, K. & Ha, N.-C. (2010). The tip region of the MacA α -hairpin is important for the binding to TolC to the *Escherichia coli* MacAB-TolC pump. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394 (4): 962-965. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.097>.
- Yagel, Y., Sestito, S., Motro, Y., Shnaiderman-Torban, A., Khalfin, B., Sagi, O., Navon-Venezia, S., Steinman, A. & Moran-Gilad, J. (2020). Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance, Virulence, and Phylogeny of the Genus *Ochrobactrum*. *Antibiotics*, 9 (4). doi: 10.3390/antibiotics9040177.
- Yan, A. & Bryant, E. E. (2022). *Quinolones. I: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Yousefian, N., Ornik-Cha, A., Poussard, S., Decossas, M., Berbon, M., Daury, L., Taveau, J.-C., Dupuy, J.-W., Đorđević-Marquardt, S., Lambert, O., et al. (2021). Structural characterization of the EmrAB-TolC efflux complex from *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863 (1): 183488. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183488>.
- Yr. (2021). Tilgjengelig fra: <https://www.yr.no/nb>.
- Ystenes, M. (2021). *intermediat*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/intermediat> (lest 02.06.2022).
- Zeng, X. & Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00128.
- Zieliński, M., Park, J., Sleno, B. & Berghuis, A. M. (2021). Structural and functional insights into esterase-mediated macrolide resistance. *Nat Commun*, 12 (1): 1732. doi: 10.1038/s41467-021-22016-3.
- Ørjan Samuelsen*, B. C. H., Bettina Aasnæs og Arnfinn Sundsfjord*. (u.å.). Oppsummering og analysering av Enterobacteriaceae isolater
- med kromosomal (cAmpC) eller plasmid-mediert AmpC (ESBLM-C)
- innsendt til K-res i perioden 2010 - 2012. Tilgjengelig fra: [https://unn.no/Documents/Kompetansetjenester,%20-sentre%20og%20fagr%C3%A5d/K-res%20Nasjonal%20kompetansetjeneste%20for%20p%C3%A5visning%20av%20antibiotikaresistens/Rapporter%20K-res/Enterobacteriaceae_isolater_kromosomal_\(cAmpC\)_plasmid-mediert_AmpC_\(ESBLM-C\)_innsendt_K-res_2010-2012.pdf](https://unn.no/Documents/Kompetansetjenester,%20-sentre%20og%20fagr%C3%A5d/K-res%20Nasjonal%20kompetansetjeneste%20for%20p%C3%A5visning%20av%20antibiotikaresistens/Rapporter%20K-res/Enterobacteriaceae_isolater_kromosomal_(cAmpC)_plasmid-mediert_AmpC_(ESBLM-C)_innsendt_K-res_2010-2012.pdf) (lest 14.07.2022).
- Øye, I. (2020). *penicillin*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/penicillin> (lest 03.06.2022).

Aarnes, H. (2021). *horisontal genoverføring*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: https://snl.no/horisontal_genoverf%C3%B8ring (lest 22.04.2022).

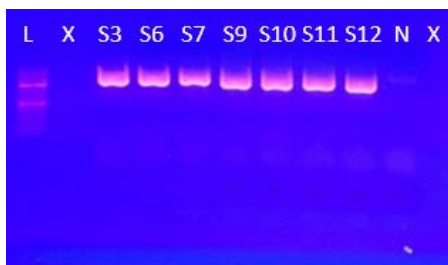
9.0 Vedlegg

Vedlegg 1. 16 S

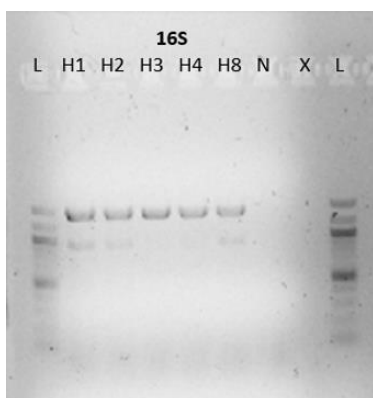
Datene fra PCR, Qubit og BLAST av 16S rRNA genet til sommer, høst og vinterprøvene er vist under i vedlegg 1.1, 1.2 og 1.3.

1.1 Singelpleks PCR av 16S rRNA genet

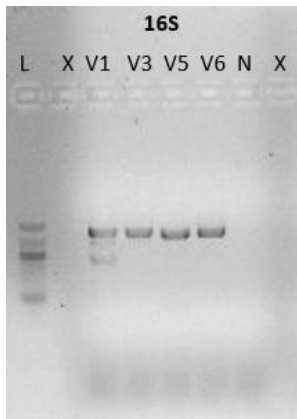
16S rRNA genet til sommer, høst og vinterprøvene ble amplifisert via PCR. For å bekrefte vellykket amplifisering av genet, ble PCR-produktene kjørt på 1,5% agarosegel. Gelen ble så avbildet under UV-lys av «Molecular Imager® Gel Doc™ XR» (BIO-RAD), før videre avlesning. Gelene ble avlest for tilstedeværelse 16S rRNA genet med bånd størrelse på 1505 bp, mot en 100 bp DNA ladder. Resultetene fra gelbildene er vist under i figur 6, 7 og 8.



Figur 6. UV-bilde av 16S rRNA gene til sommerprøvene, på en 1,5% agarosegel.



Figur 7. UV-bilde av 16S rRNA genet til høstprøvene, på en 1,5% agarosegel.



Figur 8. UV-bilde av 16S rRNA genotil vinterprøvene, på en 1,5% agarosegel.

1.2 Qubit av 16S rRNA genot

Renset og amplifisert 16S rRNA gen til sommer, høst og vinterprøvene ble målt for DNA-konsentrasjon ved bruk av qubit instrumente. Ønsket verdier lå på mellom 20-80 ng/μl. Resultatene fra målingene er vist under i tabell 27, hvor avvikende verdier fra 20-80 ng/μl intervallet er markert i rød.

Tabell 27. DNA konsentrasjons mållinger av 16S rRNA genotil sommer, høst og vinterprøvene, ved bruk av qubit.

Prøve: Qubit 16S	
DNA konsentrasjonen (ng/μl)	
Sommerprøver	
S3	20,9
S6	20,3
S7	15,4
S9	22,1
S10	23,5
S11	19,5
S12	7,67
Høstprøver	
H1	32,6

H2	28,5
H3	30,3
H4	27,1
H8	31,9

Vinterprøver

V1	25,3
V3	22,6
V5	26,1
V6	24,1

Prøver som avviket fra 20-80 ng/µl intervallet er markert med **rød** skrift.

1.3 BLAST av 16S rRNA genet

16S rRNA genet til sommer, høst og vinterprøvene ble sekvensert. Sekvensene fra denne sekvenseringen ble kjørt på analyseprogrammet Nucleotide BLAST (NBLAST), for å identifisere art og slekten til de isolerte bakterieprøvene. Resultatene fra BLAST er vist under i tabell 28.

Tabell 28. Sekvens screening av 16S rRNA genet av sommer, høst og vinterprøvene, ved bruk av analyseprogrammet NBLAST

Prøve:	nBLAST	Identitetscore (%)	Query coverage (%)	«Query» lengde (bp)
Sommerprøver				
S3	<i>Erwinia sp. strain KUDC3021</i>	99.86%	100%	1393
	<i>Erwinia persicina strain B64</i>	99.86%	100%	
	<i>Erwinia persicina strain WZ016</i>	99.86%	100%	
	<i>Erwinia persicina strain Cp2</i>	99.86%	100%	
	<i>Erwinia rhapontici strain DG-01</i>	99.86%	100%	
	<i>Erwinia rhapontici strain CPB 21621</i>	99.86%	100%	
	<i>Erwinia rhapontici strain CPB 21620</i>	99.86%	100%	

	<i>Erwinia rhapontici</i> strain CPB 21619	99.86%	100%	
	<i>Erwinia rhapontici</i> strain CPB 21618	99.86%	100%	
	<i>Erwinia persicina</i> strain CPB 21616	99.86%	100%	
S6	<i>Pseudomonas putida</i> JCM 13063	100.00%	100%	1371
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain SNH-K37	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas putida</i> strain B1	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain S 12	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas putida</i> strain CH-72	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain YNDCB3	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain DC B1	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas putida</i> strain PSDM3	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas putida</i> culture DSM:7314	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas putida</i> strain: KF715	100.00%	100%	
S7	<i>Pseudomonas protegens</i> strain L21	100.00%	100%	1372
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain DA1.2	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain H407	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas</i> sp. strain EB304	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain EB285	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain ISKA 01	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain SN15-2	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain pf5-k2	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain pf5-k3	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens</i> strain pf5	100.00%	100%	
S9	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain DST54	100.00%	100%	1353
	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain SC1	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1292	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1289	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1256	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1227	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1225	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1213	100.00%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1140	100.00%	100%	
	<i>Enterobacter</i> sp. strain P2	100.00%	100%	

S10	<i>Aeromonas caviae</i> strain YPL5-62	100.00%	100%	1383
	<i>Aeromonas</i> sp. strain JF12	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas</i> sp. strain H2014	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas</i> sp. strain AA200	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas caviae</i> strain BTNGPSA3	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas</i> sp. strain ZCGG04	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> JCM 3975	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas</i> sp. strain 1709048444	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas caviae</i> strain R25-6	100.00%	100%	
	<i>Aeromonas</i> sp. ASNIH1	100.00%	100%	
S11	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain SC1	99.93%	100%	1382
	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain IHB B 1518	99.93%	100%	
	Uncultured bacterium clone AN3E2	99.93%	100%	
	<i>Enterobacter mori</i> strain AL	99.93%	99%	
	<i>Enterobacter asburiae</i> str. AEB30	99.86%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS1822	99.86%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS0324	99.86%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS0307	99.86%	100%	
	<i>Bacterium</i> strain BS0249	99.86%	100%	
	<i>Enterobacter</i> sp. strain DB041	99.86%	100%	
S12	<i>Herbaspirillum frisingense</i> strain AU9870	99.93%	100%	1375
	<i>Herbaspirillum</i> sp. AU2339	99.85%	100%	
	<i>Herbaspirillum frisingense</i> strain IFRO- Hf1	99.71%	100%	
	<i>Herbaspirillum</i> sp. strain AP21	99.64%	100%	
	<i>Herbaspirillum</i> sp. strain AP02	99.64%	100%	
	<i>Herbaspirillum frisingense</i> strain RE3-3	99.64%	100%	
	<i>Herbaspirillum frisingense</i> strain AU14559	99.64%	100%	
	<i>Herbaspirillum frisingense</i> strain NBRC 102522	99.64%	99%	

	<i>Uncultured Herbaspirillum sp. clone 16MA</i>	99.56%	100%	
	<i>Herbaspirillum sp. NR 3-04</i>	99.64%	99%	
Høstprøver				
H1	<i>Bacterium strain G12</i>	99.86%	100%	1381
	<i>Pseudomonas sp. Eqa60</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain 58B7</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain PS1</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. Eqa60</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain CP-M2-7</i>	99.86%	100%	
	<i>Bacterium PS-1</i>	99.86%	100%	
	<i>Uncultured gamma proteobacterium clone ATB-LH-6362</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain Pf3</i>	99.78%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain Pf1</i>	99.78%	100%	
H2	<i>Bacterium strain G12</i>	99.86%	100%	1380
	<i>Pseudomonas sp. Eqa60</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain 58B7</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain PS1</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. Eqa60</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain CP-M2-7</i>	99.86%	100%	
	<i>Bacterium PS-1</i>	99.86%	100%	
	<i>Uncultured gamma proteobacterium clone ATB-LH-6362</i>	99.86%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain Pf3</i>	99.78%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain Pf1</i>	99.78%	100%	
H3	<i>Pseudomonas fluorescens strain LBUM677</i>	99.93%	100%	1371
	<i>Pseudomonas sp. BM-1(2011)</i>	99.93%	99%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain 96E27</i>	99.85%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain 96C1</i>	99.85%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. strain Agri-2</i>	99.85%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain EMP18.2</i>	99.85%	100%	

	<i>Pseudomonas sp. strain AO-1</i>	99.85%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain shebah-500</i>	99.85%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. strain A1</i>	99.85%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. strain efl</i>	99.85%	100%	
H4	<i>Pseudomonas koreensis strain shebah-500</i>	100.00%	100%	1371
	<i>Pseudomonas fluorescens strain LBUM677</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. S150</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain PgBE267</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain PgBE27</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain Y5</i>	100.00%	100%	
	<i>Uncultured Pseudomonas sp. clone V221</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain PgBe202</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain PRGB</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain PMC7</i>	100.00%	100%	
H8	<i>Bacterium strain G12</i>	100.00%	100%	1374
	<i>Pseudomonas sp. Eqa60</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain 58B7</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain PS1</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. Eqa60</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain CP-M2-7 sequence</i>	100.00%	100%	
	<i>Bacterium PS-1</i>	100.00%	100%	
	<i>Uncultured gamma proteobacterium clone ATB-LH-6362</i>	100.00%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain Pf3</i>	99.93%	100%	
	<i>Pseudomonas protegens strain Pfl</i>			
Vinterprøver				
V1	<i>Pseudomonas sp. strain GZ21</i>	99.71%	100%	1366
	<i>Pseudomonas fluorescens strain A4b40</i>	99.71%	100%	
	<i>Pseudomonas sp. strain PS6</i>	99.71%	100%	

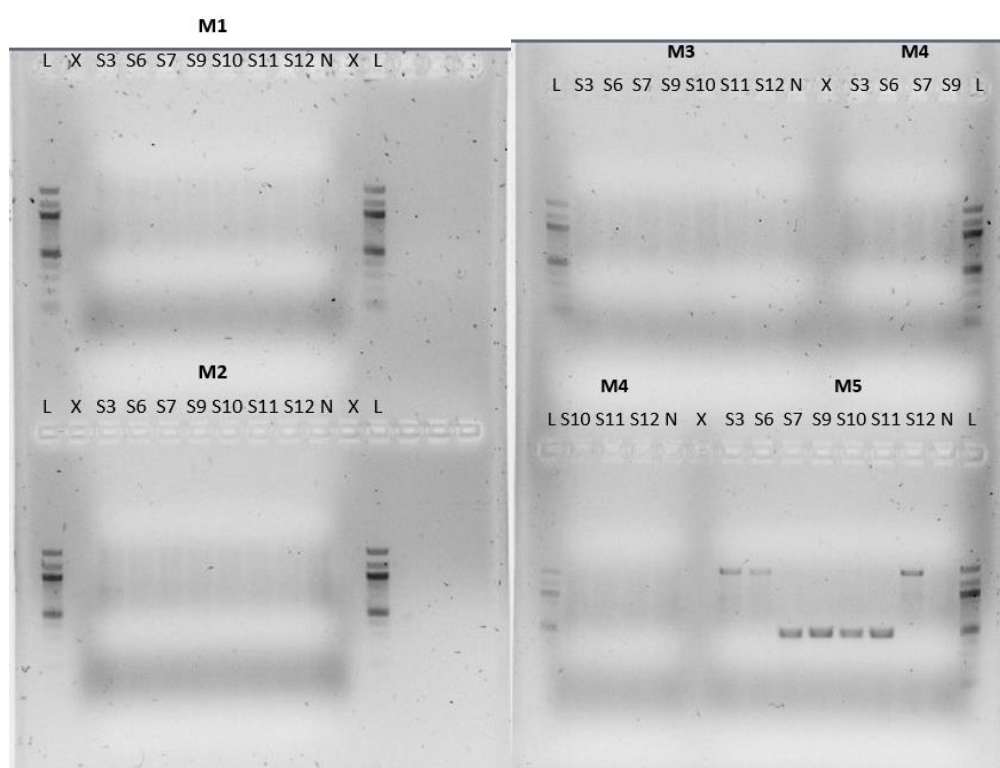
	<i>Pseudomonas sp. strain D3_APO</i>	99.71%	100%	
	<i>Klebsiella oxytoca strain PF 104</i>	99.71%	100%	
	<i>Pseudomonas rhodesiae strain 15D2</i>	99.71%	100%	
	<i>Pseudomonas fluorescens strain KBL29</i>	99.71%	100%	
	<i>Pseudomonas rhodesiae strain KBL5</i>	99.71%	100%	
	<i>Pseudomonas rhodesiae strain KBL1</i>	99.71%	100%	
	<i>Gamma proteobacterium BIWA53</i>	99.71%	100%	
V3	<i>Pseudomonas sp. SIIA_Cu_E4</i>	99.57%	99%	1382
	<i>Pseudomonas sp. B3(2011b)</i>	99.49%	99%	
	<i>Bacterium OC50(2011)</i>	99.49%	99%	
	<i>Pseudomonas sp. 23K32a1</i>	99.42%	99%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain EMP18.2</i>	99.42%	99%	
	<i>Pseudomonas sp. strain PS13</i>	99.42%	99%	
	<i>Pseudomonas sp. strain PS11</i>	99.42%	99%	
	<i>Pseudomonas sp. strain PS5</i>	99.42%	99%	
	<i>Pseudomonas koreensis strain 4G88</i>	99.42%	99%	
	<i>Pseudomonas sp. strain 3.2</i>	99.42%	99%	
V5	<i>Rhizobium miluonense strain 5502G</i>	99.85%	100%	1327
	<i>Rhizobium sp. strain 149</i>	99.85%	100%	
	<i>Rhizobium sp. strain F9A</i>	99.85%	100%	
	<i>Rhizobium sp. AB2/73</i>	99.85%	100%	
	<i>Rhizobium sp. 1003</i>	99.70%	100%	
	<i>Rhizobium sp. SEFSRK3</i>	99.70%	100%	
	<i>Rhizobium sp. AB2/73</i>	99.70%	100%	
	<i>Rhizobium sp. NY11</i>	99.70%	100%	
	<i>Rhizobium sp. strain S19</i>	99.62%	100%	
	<i>Rhizobium sp. E-ITORMR-150-93</i>	99.62%	100%	
V6	<i>Ochrobactrum ciceri strain L22</i>	99.56%	100%	1135
	<i>Ochrobactrum intermedium strain CCI5</i>	99.56%	100%	
	<i>Ochrobactrum intermedium strain SK09</i>	99.56%	100%	
	<i>Aureimonas altamirensis strain AM18</i>	99.56%	100%	
	<i>Brucella intermedia strain PDW662</i>	99.56%	100%	
	<i>Brucella intermedia strain PDW57</i>	99.56%	100%	

<i>Brucella intermedia</i> strain PDW183	99.56%	100%
<i>Brucella intermedia</i> strain PDW741	99.56%	100%
<i>Brucella intermedia</i> strain PDW738	99.56%	100%
<i>Brucella intermedia</i> strain PDW663	99.56%	100%

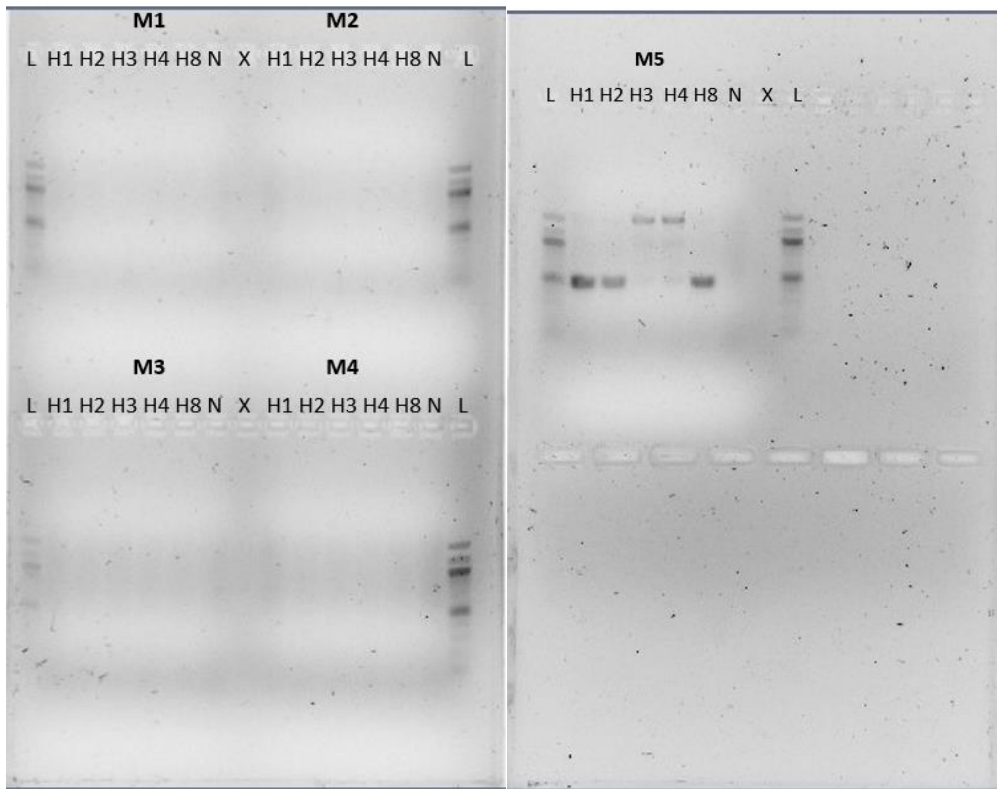
Vedlegg 2. Multi og singelpleks PCR

2.1 Multipleks PCR

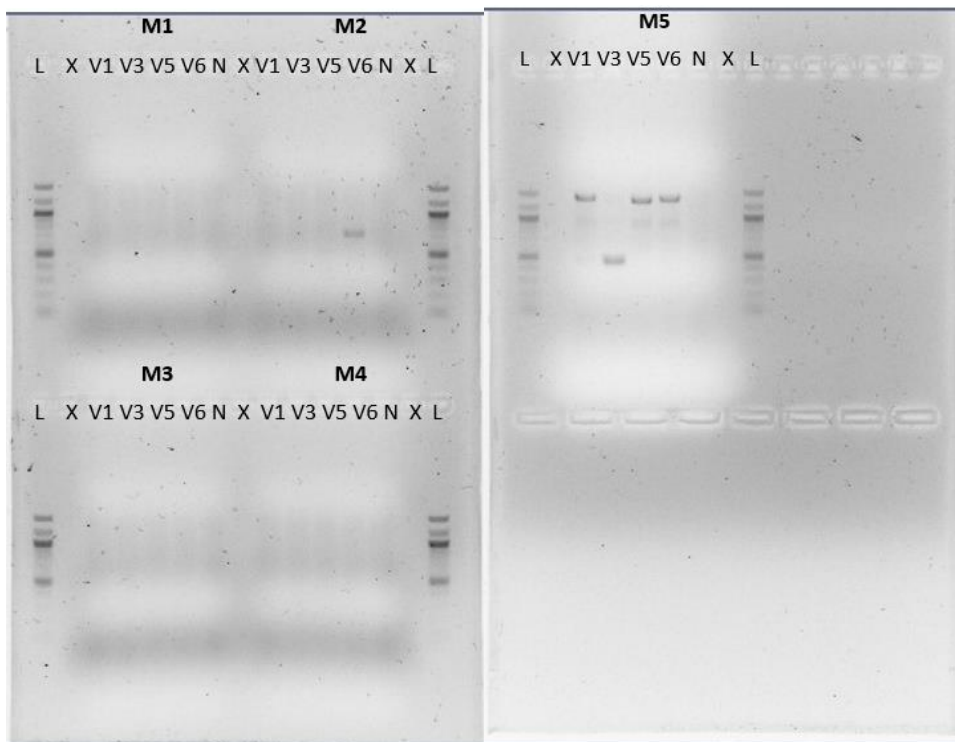
Gelbilder fra multipleks PCR av sommer, høst og vinterprøvene, for identifisering av ESBL gener. Resultatene fra gelbildene er vist under i figur 9-11.



Figur 9. Multipleks PCR gelbilde av sommerprøve S3, S6, S7, S9, S10, S11 og S12, av ESBL gener.



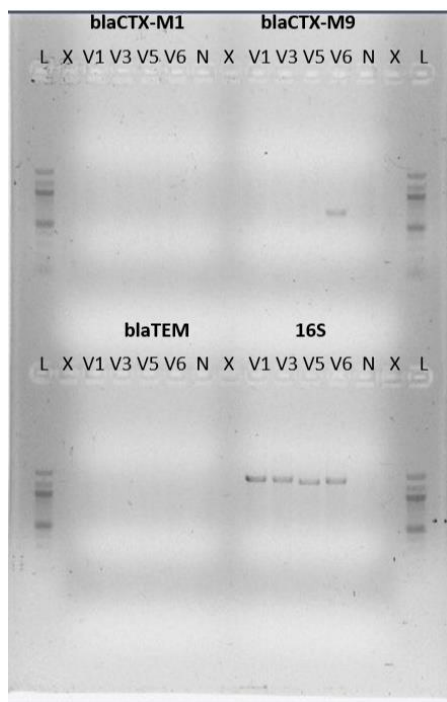
Figur 10. Multipleks PCR gelbilde av høstprøve H1, H2, H3, H4 og H8, av ESBL gener.



Figur 11. Multipleks PCR gelbilde av vinterprøve V1, V3, V5 og V6, av ESBL gener.

2.2 Singelpeks PCR

Gelbilder fra singelpeks PCR av vinterprøvene, for identifisering av ESBL genene *blaCTX-M1*, *blaCTX-M9*, *blaTEM*. Resultatene fra gelbilde er vist under i figur 12.



Figur 12. Singelpeks PCR gelbilde av vinterprøve V1, V3, V5 og V6, av ESBL gen *blaCTX-M1*, *blaCTX-M9*, *blaTEM*.

Vedlegg 3. MIC

Høst, vinter og sommerprøvene S3, S6 og S7 ble MIC testet for grad av antibiotikumresistens mot de fire klinisk viktigste antibiotikagrupperne β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner. Resultatene fra MIC målingene med paralleller er vist under i tabell 29.

Tabell 29. MIC test paralleller av prøve S3, S6 og S7, for antibiotikagrupperne β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner.

Prøve:	S3	S6	S7
Cefepime	0,25	0,75	1,0
Cefepime	0,25	1,0	1,0
Cefotaxime	1,5	16	16
Cefotaxime	2	24	6
Ampicillin	≥ 256	≥ 256	≥ 256

Ampicillin	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Meropenem	0,008	1	0,064
Meropenem	0,032	2	0,125
Penicillin G	≥ 256	-	≥ 256
Penicillin G	≥ 256	-	≥ 256
Amoxicillin* Clavulanic acid	-	96	32
Amoxicillin* Clavulanic acid	-	192	≥ 256*
Ciprofloxacin	X	0,047	0,064
Ciprofloxacin	X	0,047	0,064
Tetracycline	-	1,5	-
Tetracycline	-	1,5	-
Erythromycin	-	≥ 256	-
Erythromycin	-	≥ 256	-

(-) ikke resistent, (X) for dårlig vekst til å ta måling.

Tabell 30. MIC test paralleller av prøve H1, H2, H3, H4 og H8, for antibiotikagruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner.

Prøve:	H1	H2	H3	H4	H8
Cefepime	1,5	0,5	0,5	0,75	6
Cefepime	1,5	-	0,25	1	3
Cefotaxime	48	32	6	16	96
Cefotaxime	64	48	8	12	96
Ampicillin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Ampicillin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Meropenem	-	0,5	0,25	0,19	≥ 32
Meropenem	0,5	0,38	0,25	0,125	≥ 32
Penicillin G	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Penicillin G	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Amoxicillin* Clavulanic acid	≥ 256*	≥ 256*	≥ 256*	≥ 256*	≥ 256*

Amoxicillin*	≥ 256*	≥ 256*	≥ 256*	≥ 256*	≥ 256*
Clavulanic acid					
Ciprofloxacin	0,125	0,094	0,032	0,047	1
Ciprofloxacin	0,094	0,094	0,032	0,047	1
Tetracycline	-	0,75	1,0	1,0	3,5
Tetracycline	1,0	1,5	1,0	1,25	13
Erythromycin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Erythromycin	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256

(-) ikke resistent, (X) for dårlig vekst til å ta måling.

Tabell 31. MIC test paralleller av prøve V1, V3, V5 og V6, for antibiotikagruppene β -Laktam, kinoloner, makrolider og tetrasykliner.

Prøve:	V1	V3	V5	V6
Cefepime	1	4	0,125	≥ 32
Cefepime	0,75	3	0,125	≥ 32
Cefotaxime	24	64	0,5	≥ 256
Cefotaxime	32	64	0,38	≥ 256
Ampicillin	-	≥ 256	0,5	≥ 256
Ampicillin	-	≥ 256	0,38	≥ 256
Meropenem	0,5	1,0	0,003	0,75
Meropenem	0,5	1,5	0,004	0,75
Penicillin G	≥ 256	≥ 256	12	≥ 256
Penicillin G	≥ 256	-	8	≥ 256
Amoxicillin*	≥ 256*	≥ 256*	0,064	≥ 256*
Clavulanic acid				
Amoxicillin*	≥ 256*	≥ 256*	0,064	≥ 256*
Clavulanic acid				
Ciprofloxacin	0,047	0,032	0,5	0,75
Ciprofloxacin	0,023	0,032	0,75	1,0
Tetracycline	-	1,5	3	0,38
Tetracycline	-	1,5	3	0,25
Erythromycin	16	256	32	≥ 256

Erythromycin	12	≥ 256	8	≥ 256
--------------	----	-------	---	-------

(-) ikke resistent, (X) for dårlig vekst til å ta måling.

Vedlegg 4 Helgenomsekvensering

4.1 Qubit

Fra prøve S9, H8 og V7, ble det tatt Qubit målinger før helgenomsekvenseringen. Resultatene fra qubit målingene er vist under i tabell 32.

Tabell 32. Qubit målinger (ng/μl) av prøve S9, H8 og V6.

Prøve: Qubit helgenomsekvensering DNA konsentrasjonen (ng/μl)	
Sommerprøve	
S9	81,4
Høstprøve	
H8	11,8
Vinterprøve	
V6	36,7

4.2 Resistens- og virulensgener

Prøve S9, H8 og V6, ble helgenomsekvensert. Rådataen fra artsidentifisering er vist under i tabell 33, rådata fra resistensgenene identifisert med Card, Ncbi databasene er vist under i tabell 34, rådata fra virulensgenene identifisert med vfdb databasen er vist under i tabell 35 og rådata fra resistensgenene identifisert med Card, Ncbi databasene er vist under i tabell 36.

Tabell 33. Bakterieart identifisering ved helgenomsekvensering, av prøve S9, H8 og V6.

Rank	Taxon	Support	Taxonomy
Sommerprøve S9			
SPECIES	Enterobacter asburiae	100 %	Proteobacteria > Gammaproteobacteria > Enterobacterales > Enterobacteriaceae > Enterobacter > Enterobacter asburiae

Høstprøve H8			
SPECIES	Pseudomonas protegens	100 %	Proteobacteria > Gammaproteobacteria > Pseudomonadales > Pseudomonadaceae > Pseudomonas > Pseudomonas protegens
Vinterprøve V6			
SPECIES	Brucella intermedia	100 %	Proteobacteria > Alphaproteobacteria > Hyphomicrobiales > Brucellaceae > Brucella > Brucella intermedia

Tabell 34. Resistensgener i prøve S9, H8 og V6, fra databasen Card og Ncbi.

RESISTENS GENE	COVERAGE	%COVER AGE	%IDENT ITY	DATABA SE	ACCESSI ON	PRODUCT
Sommerprøve S9						
msbA	1-1746/1749	99.83	83.85	card	U00096.3:966620-968369	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.
oqxA	1-1176/176	100.00	86.73	card	EU370913.1:46651-47827	RND efflux pump conferring resistance to fluoroquinolone
oqxB	1-3125/153	99.11	89.73	card	EU370913.1:47850-51003	RND efflux pump conferring resistance to fluoroquinolone
acrB	1-3150/150	99.87	85.50	card	U00096.3:484403-481253	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.
Enterobacter_cloacae_acrA	1-1194/194	100.00	95.31	card	DQ679966:299-1493	AcrA is a subunit of the AcrAB-TolC multidrug efflux

						system that in E. cloacae.
ramA	13-375/375	96.80	89.81	card	JQ727668:0-375	RamA (resistance antibiotic multiple) is a positive regulator of AcrAB-TolC and leads to high level multidrug resistance in Klebsiella pneumoniae Salmonella enterica and Enterobacter aerogenes increasing the expression of both the mar operon as well as AcrAB. RamA also decreases OmpF expression.
mdtB	1-3123/3123	99.94	81.38	card	U00096:2155262-2158385	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.
mdtC	1-3078/3078	100.00	81.94	card	U00096:2158385-2161463	MdtC is a transporter that forms a heteromultimer complex with MdtB

						to form a multidrug transporter. MdtBC is part of the MdtABC-TolC 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.
baeR	1-711/72 3	98.34	82.14	card	AP009048 .1:216641 2-2167135	BaeR is a response regulator that promotes the expression of MdtABC and AcrD efflux complexes.
FosA2	1-426/42 6	100.00	91.55	card	EU487198 :216-642	An enzyme that confers resistance to fosfomycin in <i>Enterobacter cloacae</i> by breaking the epoxide ring of the molecule. It depends

						on the cofactors Manganese (II) and Potassium and uses Glutathione (GSH) as the nucleophilic molecule.
emrR	1-531/531	100.00	84.56	card	U00096.3: 2810769-2811300	EmrR is a negative regulator for the EmrAB-TolC multidrug efflux pump in E. coli. Mutations lead to EmrAB-TolC overexpression.
Klebsiella_pneumoniae_KpnG	1-1173/1173	100.00	82.95	card	ACWO01 000051.1: 22092-23265	KpnG consists of ~390 residues and resembles EmrA of E. coli. 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
emrB	9-1538/1539	99.42	84.44	card	U00096:2812615-2814154	emrB is a translocase in the emrB -TolC efflux protein in E. coli. It recognizes substrates including carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) nalidixic acid and thioloactomycin.
H-NS	1-414/414	100.00	87.20	card	BA000007.3:1738104-1737690	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 acrE mdtE and emrK as well as nearby genes of many RND-type multidrug exporters.
qnrE1	1-644/645	99.84	92.86	card	KY073238.1:1678-2323	qnrE1 is a member of the qnrE family of plasmid-borne (fluoro)quinolone-resistance genes with chromosomal origins from Enterobacter spp.

marA	1-371/384	96.61	84.64	card	AP009048 .1:162128 7-1621671	In the presence of antibiotic stress E. coli overexpresses the global activator protein MarA which besides inducing MDR efflux pump AcrAB also down-regulates synthesis of the porin OmpF.
acrD	1-3099/3114	99.39	80.83	card	AP009048 .1:258625 0-2589364	AcrD is an aminoglycoside efflux pump expressed in E. coli. Its expression can be induced by indole and is regulated by baeRS and cpxAR.
CRP	1-633/633	100.00	88.31	card	AP009048 .1:415429 6-4153663	CRP is a global regulator that represses MdtEF multidrug efflux pump expression.
cpxA	1-1367/1374	99.49	82.95	card	BA000007 .3:490506 2-4903688	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.
bacA	1-818/82 2	99.51	82.89	card	U00096.3: 3204131- 3203309	The bacA gene product (BacA) recycles undecaprenyl pyrophosphate during cell wall biosynthesis which confers resistance to bacitracin.
tolC	1-1383/1 488	92.34	80.04	card	FJ768952: 0-1488	TolC is a protein subunit of many multidrug efflux complexes in Gram negative bacteria. It is an outer membrane efflux protein and is constitutively open. Regulation of efflux activity is often at its periplasmic entrance by other components of the efflux complex.
ACT-4	1-1143/1 143	100.00	96.85	card	EU427302 :1475- 2618	ACT-4 is a beta-lactamase. From the Lahey list of ACT beta-lactamases.
oqxA10	1-1176/1 176	100.00	86.99	ncbi	NG_0504 18.1	multidrug efflux RND transporter

						periplasmic adaptor subunit OqxA10
oqxB9	1- 3125/3 153	99.11	90.37	ncbi	NG_0504 58.1	multidrug efflux RND transporter permease subunit OqxB9
fosA	1- 426/42 6	100.00	95.07	ncbi	NG_0504 05.1	fosfomycin resistance glutathione transferase FosA
qnrE1	1- 644/64 5	99.84	92.86	ncbi	NG_0546 77.1	quinolone resistance pentapeptide repeat protein QnrE1
blaACT-4	1- 1143/1 143	100.00	96.85	ncbi	NG_0486 27.1	cephalosporin-hydrolyzing class C beta-lactamase ACT-4
Høstprøve H8						
arnA	10- 1962/1 989	97.84	80.69	card	AE004091 .2:398202 0-3984009	arnA modifies lipid A with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) which allows gram-negative bacteria to resist the antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides and antibiotics such as polymyxin. arnA is found in E. coli and P. aeruginosa.

mexK	7-3059/3078	98.90	82.58	card	AE004091.2:4119265-4116187	mexK is the inner membrane resistance-nodulation-cell division (RND) transporter in the MexJK multidrug efflux protein.
MexB	1-3074/3141	97.74	80.75	card	L11616:1569-4710	MexB is the inner membrane multidrug exporter of the efflux complex MexAB-OprM.
MexF	1-3156/3189	98.75	87.36	card	AE004091.2:2810008-2813197	MexF is the multidrug inner membrane transporter of the MexEF-OprN complex. mexF corresponds to 2 loci in Pseudomonas aeruginosa PAO1 (gene name: mexF/mexB) and 4 loci in Pseudomonas aeruginosa LESB58 (gene name: mexD/mexB).
TriC	13-3039/3048	98.92	81.29	card	AE004091.2:179521-182569	TriC is a resistance nodulation cell division (RND) transporter that is a part of TriABC-

						OpmH a triclosan-specific efflux protein.
Pseudomonas_aeruginosa_CpxR	1-678/678	99.41	81.67	card	LT673656.1:188502-1884344	CpxR is directly involved in activation of expression of RND efflux pump MexAB-OprM in P. aeruginosa. CpxR is required to enhance mexAB-oprM expression and drug resistance in the absence of repressor MexR.
Vinterprøve V6						
OCH-2	1-1168/173	99.49	82.79	card	AJ295340:0-1173	OCH-2 beta-lactamase is an Ambler class C chromosomal-encoded beta-lactamases in Ochrobactrum anthropi
blaOCH-2	1-1168/173	99.49	82.79	ncbi	NG_049345.1	class C extended-spectrum beta-lactamase OCH-2

Tabell 35. Virulensgener i prøve S9, H8 og V6, fra databasen vfdb.

VIRULENCE GENE	COVERAGE	%COVERAGE	%IDENTITY	DATABASE	ACCESSION	PRODUCT
Sommerprøve S9						
ompA	1-1031/1041	99.04	85.09	vfdb	AAF37887	(ompA) outer membrane protein A [OmpA (VF0236)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]
csgG	1-834/834	100.00	80.94	vfdb	NP_460110	(csgG) curli production assembly/transport protein CsgG [Agf (VF0103)] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
entB	1-854/858	99.07	80.70	vfdb	NP_752613	(entB) isochorismatase [Enterobactin (VF0228)] [Escherichia coli CFT073]
entA	2-747/747	99.87	80.30	vfdb	NP_752614	(entA) 23-dihydro-23-dihydroxybenzoate dehydrogenase [Enterobactin (VF0228)]

						[Escherichia coli CFT073]
Høstprøve H8						
mbtH-like	1-214/219	97.72	86.45	vfdb	NP_251102	(mbtH-like) MbtH-like protein from the pyoverdine cluster [pyoverdine (IA001)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
pvdH	61- 1369/1410	92.77	82.44	vfdb	NP_251103	(pvdH) diaminobutyrate- 2-oxoglutarate aminotransferase PvdH [pyoverdine (IA001)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
pvdS	1-526/564	93.26	84.41	vfdb	NP_251116	(pvdS) extracytoplasmic- function sigma-70 factor [Pyoverdine (VF0094)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
flgC	1-441/441	99.55	84.08	vfdb	NP_249769	(flgC) flagellar basal-body rod

						protein FlgC [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
algA	1-1404/1446	97.10	82.55	vfdb	NP_252241	(algA) phosphomannose isomerase / guanosine 5'- diphospho-D- mannose pyrophosphorylas e [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
algI	1-1563/1563	98.59	82.24	vfdb	NP_252238	(algI) alginate o- acetyltransferase AlgI [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
alg8	100- 1473/1485	92.32	85.26	vfdb	NP_252231	(alg8) alginate- c5-mannuronan- epimerase AlgG [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

algD	1-1310/1311	99.62	80.45	vfdb	NP_252230	(algD) GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
algU	1-582/582	100.00	81.44	vfdb	NP_249453	(algU) alginate biosynthesis protein AlgZ/FimS [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
hcp1	1-471/489	96.11	82.20	vfdb	NP_248775	(hcp1) type VI secretion system substrate Hcp1 [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
hsiC1/vipB	44-1495/1497	96.99	89.94	vfdb	NP_248774	(hsiC1/vipB) type VI secretion system tubule-forming protein VipB [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

hsiB1/vipA	21-519/519	96.15	87.17	vfdb	NP_248773	(hsiB1/vipA) type VI secretion system tubule-forming protein VipA [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
dotU1	54-1340/1350	94.07	82.20	vfdb	NP_248768	(dotU1) type VI secretion system protein DotU [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
tagR	84-1706/1713	94.45	80.65	vfdb	NP_248761	(tagR) type IV secretion associated protein TagR positively regulates PpkA [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
algC	28-1358/1392	94.76	80.94	vfdb	NP_254009	(algC) phosphomannomutase AlgC [Alginate biosynthesis (CVF522)] [Pseudomonas

						aeruginosa PAO1]
pilG	1-377/408	92.40	86.47	vfdb	NP_249099	(pilG) twitching motility protein PilG [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
pilH	1-366/366	100.00	86.07	vfdb	NP_249100	(pilH) twitching motility protein PilH [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
pilJ	40- 2029/2049	97.07	81.27	vfdb	NP_249102	(pilJ) twitching motility protein PilJ [Type IV pili (VF0082)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
waaF	1-1008/1038	96.92	81.09	vfdb	NP_253699	(waaF) heptosyltransferas e I [LPS (VF0085)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
pvdA	1-1278/1332	95.50	80.37	vfdb	NP_251076	(pvdA) L- ornithine N5- oxygenase PvdA

						[Pyoverdine (VF0094)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
algB	16-1350/1350	98.59	81.51	vfdb	NP_254170	(algB) two-component response regulator AlgB [Alginate (VF0091)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
clpV1	1-2700/2709	98.45	85.19	vfdb	NP_248780	(clpV1) type VI secretion system AAA+ family ATPase [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
hsiG1	1-1860/1860	99.68	83.23	vfdb	NP_248778	(hsiG1) type VI secretion system hcp secretion island protein HsiG1 [HSI-I (VF0334)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
flgG	8-782/786	98.35	84.30	vfdb	NP_249773	(flgG) flagellar basal-body rod protein FlgG

						[Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
flgH	64-694/696	90.37	81.67	vfdb	NP_249774	(flgH) flagellar L-ring protein precursor FlgH [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
flgI	6-1110/1110	99.28	85.02	vfdb	NP_249775	(flgI) flagellar P-ring protein precursor FlgI [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliG	1-1015/1017	99.80	85.95	vfdb	NP_249793	(fliG) flagellar motor switch protein G [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliI	1-1286/1356	94.62	82.16	vfdb	NP_249795	(fliI) flagellum-specific ATP synthase FliI [Flagella

						(VF0273) [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliM	1-963/972	99.07	86.19	vfdb	NP_250134	(fliM) flagellar motor switch protein FliM [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliN	28-472/474	90.51	80.97	vfdb	NP_250135	(fliN) flagellar motor switch protein FliN [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliP	49-758/768	92.32	85.80	vfdb	NP_250137	(fliP) flagellar biosynthetic protein FliP [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
flhA	1-2114/2124	99.29	81.15	vfdb	NP_250143	(flhA) flagellar biosynthesis protein FlhA [Flagella (VF0273)]

						[Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fleN	4-818/843	96.68	81.96	vfdb	NP_250145	(fleN) flagellar synthesis regulator FleN [Flagella (VF0273)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
fliA	54-734/744	91.26	80.61	vfdb	NP_250146	(fliA) flagellar biosynthesis sigma factor FliA [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
motC	1-741/741	99.73	81.83	vfdb	NP_250151	(motC) flagellar motor protein [Deoxyhexose linking sugar 209 Da capping structure (AI138)] [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
Vinterprøve V6						
ricA	1-528/528	100.00	80.68	vfdb	NP_539653	(ricA) Rab2 interacting

						conserved protein A [RicA (VF0414)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
fabZ	1-522/522	100.00	82.95	vfdb	NP_539749	(fabZ) (3R)-hydroxymyristoyl ACP dehydratase [LPS (CVF383)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
kdsA	8-834/834	99.16	81.74	vfdb	NP_539767	(kdsA) 2-dehydro-3-deoxyphosphoacetate aldolase [LPS (CVF383)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
acpXL	1-282/282	100.00	93.26	vfdb	NP_540028	(acpXL) acyl carrier protein [LPS (CVF383)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
htrB	1-924/924	100.00	86.47	vfdb	NP_540032	(htrB) lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [LPS (CVF383)] [Brucella

						melitensis bv. 1 str. 16M]
acpXL	1-235/237	99.16	96.60	vfdb	NP_540392	(acpXL) acyl carrier protein [LPS (CVF383)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
cgs	58-8604/8604	99.20	86.16	vfdb	NP_540754	(cgs) cyclic beta 1-2 glucan synthetase [C<beta>G (VF0366)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
pgm	1-1701/1701	100.00	86.13	vfdb	NP_540803	(pgm) phosphoglucomutase [LPS (VF0367)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]
kdsB	132-857/888	81.76	84.85	vfdb	NP_540821	(kdsB) 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase [LPS (CVF383)] [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]

Tabell 36. Resistensgener i prøve S9, H8 og V6, fra dataprogrammet PROKKA og databasene CARD og NDARO (NCBI).

Resistensgener	Product	Database
Sommerprøve S9		
Ars (R2)	Arsenresistens transkripsjonsregulator ArsR2	PROKKA
Ipr (A)	Inhibitor av hydrogenperoksidresistens	PROKKA
Mdt (A, B, C, D, G, H, K, L)	Multiresistensprotein	PROKKA
Bhs (A)	Multippel stressresistens protein BhsA	PROKKA
Mex (A, B)	Multiresistensprotein	PROKKA
Mar (A, R)	Multippel antibiotikaresistens protein MarA. I nærvær av antibiotikastress overuttrykker E. coli det globale aktivatorproteinet MarA som i tillegg til å indusere MDR-utstrømningspumpe AcrAB også nedregulerer syntesen av porinet OmpF	PROKKA
YheI	antatt multimedikamentresistens ABC-transportør	PROKKA
Mdl (B)	Multimedikamentresistenslignende ATP-bindende protein	PROKKA
Fsr	Fosmidomycinresistensprotein	PROKKA
Stp	Multiresistensprotein Stp	PROKKA
Emr (A, D, K)	Kolistinresistensprotein EmrA	PROKKA
Czc (A)	Kobolt-sink-kadmium-resistensprotein CzcA	PROKKA
Aba (F)	Fosfomycinresistensprotein AbaF	PROKKA
Bcr	Bicyklomycinresistensprotein	PROKKA
Yaa (A)	Peroksid-stressmotstandsprotein YaaA	PROKKA
Ohr (B, R)	Transkripsjonell motstand mot organisk hydroperoksid	PROKKA
PasI	Persistens og stressresistens antitoksin PasI	PROKKA
Pas (T)	Persistens og stress-resistens toksin PasT	PROKKA
Smv (A)	Metylviologenresistensprotein SmvA	PROKKA
Cnr (A)	Nikkel- og koboltresistensprotein CnrA	PROKKA
Arn (A)	Bifunksjonelt polymyxinresistensprotein ArnA	PROKKA

Gnt (K)	Termobestendig glukonokinase	PROKKA
Far (B)	Fettsyreresistensprotein FarB	PROKKA
Msb (A)	MsbA er en multiresistenstransportørhomolog fra <i>E. coli</i> og tilhører en superfamilie av transportører som inneholder en adenosintrifosfat (ATP) bindende kassett (ABC) som også kalles et nukleotidbindende domene (NBD).	CARD
Oqx (A, A10, B9)	RND efflukspumpe som gir resistens mot fluorokinolon	CARD
Acr (A, B)	Proteinunderenhet av AcrA-AcrB-TolC multimedikamentutstrømningskompleks.	CARD
Ram (A)	RamA (resistens antibiotikum multiple) er en positiv regulator av AcrAB-TolC og fører til høyt nivå av multimedikamentresistens i <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enterica</i> og <i>Enterobacter aerogenes</i>	CARD
Bae (R)	BaeR er en responsregulator som fremmer uttrykket av MdtABC- og AcrD-utstrømningskomplekser	CARD
Fos (A2)	Et enzym som gir resistens mot fosfomycin i <i>Enterobacter cloacae</i> ved å bryte epoksidringen til molekylet.	CARD
Emr (B, R)	EmrR er en negativ regulator for EmrAB-TolC multimedikamentutstrømningspumpe i <i>E. coli</i> .	CARD
Kpn (G)	Forstyrrelse av pumpekomponentene KpnG-KpnH.	CARD
H-NS	H-NS er et histonlignende protein involvert i global genregulering i gramnegative bakterier. Det er en repressor av membranfusjonsproteingenene <i>acrE</i> <i>mdtE</i> og <i>emrK</i> , så vel som nærliggende gener fra mange multilegemiddeleksportører av RND-type.	CARD

Qnr (E1)	qnrE1 er medlem av qnrE-familien av plasmidbårne (fluor)kinolonresistensgener med kromosomal opprinnelse fra Enterobacter spp.	CARD
Acr (D)	AcrD er en aminoglykosid efflukspumpe uttrykt i E. coli.	CARD
CRP	CRP er en global regulator som undertrykker MdtEF multidrug efflux pumpe uttrykk.	CARD
Cpx (A)	CpxA er en membranlokalisert sensorkinase som aktiveres av envelope stress.	CARD
Bac (A)	BacA-genproduktet (BacA) resirkulerer undecaprenylpyrofosfat under celleveggbiosyntese som gir resistens mot bacitracin.	CARD
Tol (C)	TolC er en proteinunderenhet av mange multimedikamentutstrømningskomplekser i gramnegative bakterier.	CARD
blaACT-4	cefalosporin-hydrolyserende klasse C beta-laktamase ACT-4	NDARO (NCBI)
Høstprøve H8		
Ohr (B, R)	Transkripsjonell motstand mot organisk hydroperoksid	PROKKA
Bmr (A)	Multiresistens ABC-transportør	PROKKA
Mdt (A, B, C, K, L)	Multiresistensprotein Mdt	PROKKA
fsr	Fosmidomycinresistensprotein	PROKKA
Czc (A, B, C)	Kobolt-sink-kadmium-resistensprotein Czc	PROKKA
Arn (A)	Bifunksjonelt polymyxinresistensprotein ArnA	PROKKA
stp	Multiresistensprotein Stp	PROKKA
Cop (A, B)	Kobberresistensprotein A og protein B	PROKKA
Pco (C)	Kobberresistens protein C	PROKKA
Emr (A, B, Y)	Kolistinresistensprotein Emr	PROKKA
Aba (F)	Fosfomycinresistensprotein Aba	PROKKA
Mer (R)	Kvikksølvresistens operon regulatorisk protein	PROKKA
Yaa (A)	Peroxide stress motstand protein Yaa	PROKKA
Tet (A)	Tetracyklinresistensprotein, klasse C	PROKKA

Mex (A, B)	Multiresistensprotein Mex	PROKKA
Lnr (L)	Linearmycinresistens ATP-bindende protein Lnr	PROKKA
Bcr	Bicyklomycinresistensprotein	PROKKA
Ehp (R)	Fenazin antibiotikaresistensprotein Ehp	PROKKA
Nor (M)	Multiresistensprotein Nor	PROKKA
Arn (A)	arnA modifiserer lipid A med 4-amino-4-deoksy-L-arabinose (Ara4N) som lar gram-negative bakterier motstå den antimikrobielle aktiviteten til kationiske antimikrobielle peptider og antibiotika som polymyxin.	CARD
Mex (B, F, K)	MexB er den indre membranen multidrug eksportør av efflux komplekset MexAB-OprM. MexF er multimedikamentets indre membrantransportør av MexEF-OprN-komplekset. MexK er transportøren for indre membranresistens-nodulasjonscelledeling (RND) i MexJK multidrug efflux-proteinet.	CARD
Tri (C)	TriC er en resistensnodulasjonscelledeling (RND) transportør som er en del av TriABC-OpmH, et triklosanspesifikt effluxprotein.	CARD
Cpx (R)	CpxR er direkte involvert i aktivering av ekspresjon av RND efflukspumpe MexAB-OprM i <i>P. aeruginosa</i> . CpxR er nødvendig for å forbedre mexAB-oprM-ekspresjon og medikamentresistens i fravær av repressor MexR.	CARD
Vinterprøve V6		
Bmr (3)	Multiresistensprotein 3	PROKKA
Ohr (R, B)	Organisk hydroperoksid-resistens transkripsjonsregulator	PROKKA
Emr (A, B)	Kolistinresistensprotein EmrA	PROKKA
Pas (T)	Persistens og stress-resistens toksin PasT	PROKKA
Ehp (R)	Fenazin antibiotikaresistensprotein EhpR	PROKKA
Acr (3)	Arsen-resistens protein Acr3	PROKKA

Bcr	Bicyklomycinresistensprotein	PROKKA
Fsr	Fosmidomycinresistensprotein	PROKKA
Nor (M)	Multiresistensprotein NorM	PROKKA
Mdt (A, E, L)	Multiresistensprotein MdtA	PROKKA
Tet (A)	Tetracyklinresistensprotein, klasse C	PROKKA
Stt (H)	Streptothricin hydrolase	PROKKA
Smv (A)	Metylviologenresistensprotein SmvA	PROKKA
blaOCH-2	klasse C utvidet spektrum beta-laktamase OCH-2	NDARO (NCBI)



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway