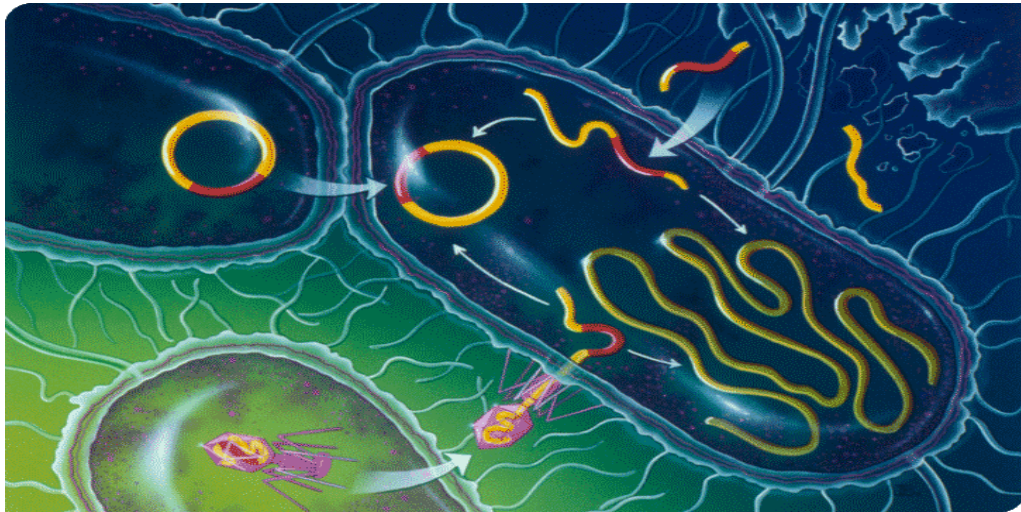


---

Kanamycin resistens i det naturlige miljø i Sør-vest Norge;  
naturlig forekomst av aminoglykosid fosfotransferase (3)  
benyttet som markører i genmodifiserte organismer (GMO)

---



Masteroppgave i mikrobiologi

Av

Susanne Vestvik Halvorsen



Institutt for biologi  
Universitetet i Bergen

april 2014

## **FORORD**

Det praktiske arbeidet ble utført ved Klinisk institutt 2, UIB tidsrommet april 2012 til august 2013. Dette ble mulig gjennom tverrfaglig samarbeid mellom institutt for biologi og klinisk institutt ved UIB. Først og fremst vil jeg takke for muligheten til å jobbe med antibiotikaresistens problematikk som gjennom hele min studietid, har vært min hovedinteresse.

Stor takk til Audun H Nerland (professor UIB) for hjelp med utstyr, reagenser, problemløsning og ikke minst for oppmuntring og forståelse.

Takk til professor Vigdis Lid Torsvik for hjelp med tilrettelegging og for kritisk vurdering av mitt arbeid. Takk til alle som har tatt seg tid til å svare på mine mange spørsmål i en travel laboratorie hverdag. Da spesielt Øyunn Nilesen ved klinisk institutt 2. Takk til Cristoffer Lindemann ved klinisk institutt 2, for bidrag med DNA fra mikrober isolert fra kliniske prøver fra mennesker.

Det har vært en lærerik tid med mye prøving og feiling som jeg kommer til å ta med meg videre. Dette arbeidet var ble støttet økonomisk av norsk overvåkning for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM).

Helt til slutt må jeg si takk til min kjære tålmodige sønn David Alexander. Nå skal ikke mamma være på laboratoriet hver helg lengre.

Bergen, april 2014

Susanne Vestvik Halvorsen

## Sammendrag

Genmodifiserte organismer er vidt utbredt blant verdens ledende matprodusenter. Bruk av markørgener som koder for antibiotikaresistens er vidt utbredt, særlig bruk av *aph(3)-II/(npt-II)*.

Det er bred enighet om at *aph(3)-II* markørgener ikke er noen trussel for humanhelse. Dette på bakgrunn av at *aph(3)-II* koder for kanamycin resistens, som ikke er på listen av viktige antimikrobielle midler og fordi kanamycin resistens er vidt utbredt i naturen.

Debatten har på tross av dette pågått i to ti år og motstanden mot GMO har vært økende. Påstander om at overføring av resistensgener fra GMO til miljøbakterier ved transformasjon er mulig, både i det gastrointestinale systemet og fritt i jord, har skapt splid både mellom vitenskapelige miljøer og på det politiske plan.

I denne studien ble 237 kanamycin resistente bakterieisolater undersøkt for forekomst av *aph(3)-II* genet. Bakterieisolatene var fordelt mellom 60 fekale bakterieisolater (fra sau, kalv og ku), 52 isolater fra jord og 177 isolater fra blodkulturer og urinveisinfeksjoner. Undersøkelsene ble utført ved hjelp av PCR på ekstrahert DNA både direkte fra miljøprøver og fra dyrkede bakterieisolater. 20 bakterieisolatet fra hver dyregruppe og 20 bakterieisolater fra jord ble undersøkt for andre aminoglykosid resistensgener *aac(3)-IIa/c*, *aac(6)-Ib-Cr* og *aph(3)-I*.

Sekvensering av 16S rRNA gener fra kanamycin resistente bakterieisolater fra feces viste tilhørighet til enterobacteriaceae, *Sphingobacterium daejeonense* og *Paenibacillus tarimensis* jord-isolater viste taksonomisk tilhørighet til *Actinobacter*, *Firmicutes*, *beta-proteobacteria*, *gamma-proteobacteria* og *Bacterioidetes*. Kanamycin resistens ble påvist i alle miljøene, men prosentandelen var lav.

*aph(3)-II* gener kunne ikke påvises i isolater fra jordbakterier og kun i 5 bakterieisolater fra dyrefeces. Et av disse isolatene kun viste positive resultater 2 av 3 paralleller, men ble regnet som positiv. 16S rRNA sekvensering av *aph(3)-II* positive isolater, viste at 4 av 5 viste høyest likhet med *Empedobacter brevis*. Denne undersøkelsen tyder på at forekomsten av dette genet i det naturlige miljøet er liten.

## **ORDFORKLARINGER**

**AAC= Aminoglykosid acetyltransferase**

**AFA= Arbeidsgruppe for antibiotikaspørsmål**

**ANT= Aminoglykosid nukleotidtransferase**

**APH= Aminoglykosid fosfotransferase**

**CFU= Colony forming unit**

**EFSA = European food safety authority**

**ESBL= Extended specter beta-lactamase**

**FDA= Food and drug authority**

**GMP= Genmodifiserte planter**

**GMO = Genmodifiserte organismer**

**HGO= Horisontal genoverføring**

**MSIS= Meldesystem for infeksjonssykdommer**

**NARMS= National antimicrobial resistance monitoring systems**

**NORM= Norsk overvåkning av resistente mikrober**

**PCR= Polymerase chain reaction**

**TBE= Tris-Borat-EDTA**

**TE= Tris-EDTA**

**TSA = Tryph-soy-agar**

**VRE= Vankomycin resistente Enterokokker**

**WHO= World health organisation**

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>2</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Ordforklaringer</b> .....	<b>4</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>5- 7</b>

## 1.INTRODUKSJON

<b>1.1 Genmodifiserte organismer (GMO) og risiko for miljø og helse</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 GMO i matvarer.....	9-10
1.1.2 GMO i vaksine og medisin produksjon.....	10-12
1.1.3 Introduksjon av nye egenskaper hos mikroorganismer, dyr og planter til matproduksjon og industrielle formål.....	12-15
1.1.4 Risiko ved bruk av GMO.....	16-19
<b>1.2 Antibiotika resistens markører i GMO</b> .....	<b>20</b>
1.2.1 Aminoglykosider og deres virkemåte.....	20-22
1.2.2 Aminoglykosidenes kliniske bruksområde.....	22-23
1.2.3 Resistens mot aminoglykosider.....	23-27
1.2.4 Aminoglykosid modifierende enzymer: aminoglykosid fosfotransferase.....	27-28
1.2.5 Opphav og funksjon av APH(3) enzymene.....	28-29
1.2.6 <i>APH</i> enzymene og deres geners betydning og utbredelse.....	30-31
1.2.7 <i>aph(3)-II</i> og <i>aph(3)-I</i> genenes utbredelse.....	31-35
<b>1.3 Horisontal genoverføring (HGO)</b> .....	<b>36</b>
1.3.1 Horisontal genoverføringsmekanismer og genoverføring fra GMO til bakterier i ulike miljø. ....	36-38
1.3.2 Transformasjon.....	38-41

1.3.3 Barrierer for suksessfull HGO.....	41-42
1.3.4 Horisontal genoverføring fra planter (GMO) til bakterier i jord.....	42-45
<b>1.4 Bruk av antibiotika og risiko for miljø og helse.....</b>	<b>45</b>
1.4.1 Antibiotika og seleksjonspress.....	45-46
1.4.2 Utslipp av antibiotika i det naturlige miljø.....	46-50
1.4.3 Antibiotikaforbruk og resistens i Norge.....	51-52
<b>1.5 Risikovurdering ved bruk av <i>aph(3)-II</i> som markører i GMO.....</b>	<b>53-55</b>
<b>1.6 Målsetninger for masteroppgaven.....</b>	<b>56</b>

## 2 MATERIALE OG METODE.

<b>2.1. Innhenting og oppbevaring av prøvemateriale.....</b>	<b>57-58</b>
<b>2.2. Bakteriedyrkning og kimtallsbestemmelse.....</b>	<b>58-59</b>
<b>2.3 DNA ekstraksjon og kvantifisering av DNA fra jord og dyrefeces.....</b>	<b>59-60</b>
<b>2.4 Påvisning av aminoglykosid resistensgener.....</b>	<b>60-61</b>
2.4.1 Undersøkelse av <i>aph(3)-II</i> gener i DNA ekstrahert fra jord .....	61-62
2.4.2 Undersøkelse av <i>aph(3)-II</i> i bakterieisolater.....	62
2.4.3 Undersøkelse av andre aminoglykosid resistensgener, <i>aph (3)-I</i> , <i>aac (3)-IIa/c</i> og <i>acc (6)Ib-Cr</i> i bakterieisolater fra dyrefeces og jord.....	63
<b>2.5 Isolering av plasmider fra kanamycin resistente isolater fra dyrefeces og jord.....</b>	<b>63-64</b>
<b>2.6 Agarose gelelektroforese.....</b>	<b>64-65</b>
<b>2.7 Transformasjon av kompetente celler.....</b>	<b>65</b>
<b>2.8 16S rRNA PCR reaksjon, rensing av av PCR produkt og identifisering av bakterie isolater ved sekvensering av 16S rRNA gener.....</b>	<b>65-67</b>

<b>3. RESULTATER</b>	
<b>3.1 Dyrkning av bakterier og kimtallsbestemmelse.....</b>	<b>68</b>
3.1.1 Dyrkning og kimtallsbestemmelse på media med og uten kanamycin.....	68-71
3.1.2 Dyrkning av isolater på ulike konsentrasjoner av kanamycin og vankomycin.....	72
<b>3.2 Ekstraksjon og kvantifisering av DNA fra jord, dyrefeces og bakterieisolater.....</b>	<b>73-75</b>
<b>3.3 Forekomst av <i>aph(3)-II</i> gener .....</b>	<b>75</b>
3.3.1 Forekomst av <i>aph(3)-II</i> gener i DNA og bakterieisolater fra miljøprøver.....	75
3.3.2 Forekomst av <i>aph(3)-II</i> gener i bakterieisolater fra fecesprøver (ku, kalv og sau).....	76
3.3.3 Forekomst av <i>aph(3)-II</i> gener i bakterieisolater fra blodkultur og urinveisinfeksjoner hos mennesker.....	77
<b>3.4 Forekomst av genene <i>aph(3)-I</i>, <i>aac(3)-Ia/c</i>, <i>aac(6)Ib-Cr</i> i bakterieisolater fra dyrefeces og jord.....</b>	<b>78-80</b>
<b>3.5 16S rRNA PCR og sekvensering.....</b>	<b>80-84</b>
<b>3.6 Isolering av plasmider i bakterieisolater og forsøk på transformasjon med plasmidene.....</b>	<b>84-86</b>
<b>4 DISKUSJONER OG KONKLUSJONER</b>	
4.1 Diskusjon av metoder.....	87-90
4.2 Diskusjon av resultater.....	90-97
4.3 Konklusjoner.....	98
4.4 Videre arbeid.....	98-99
<b>5. LITTERATURLISTE.....</b>	<b>100-104</b>
<b>APPENDIKS 1: Utstyr og reagenser.....</b>	<b>106-107</b>
<b>APPENDIKS 2: Supplerende data.....</b>	<b>108-110</b>

# 1. INTRODUKSJON

## 1.1 Genmodifiserte organismer (GMO) og miljørisiko

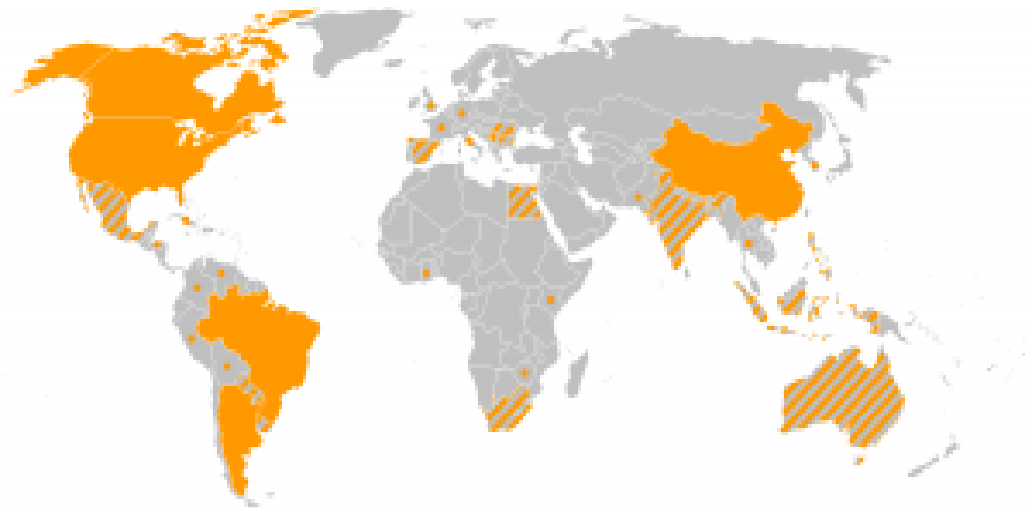
DNA strukturen ble for første gang beskrevet i 1953 av Watson og Crick. Siden den gang har det åpnet seg store muligheter innenfor molekylær genetikk og genteknologi. Genteknologi går ut på å isolere og studere gener og deres funksjon, endre og erstatte gener, sette dem inn i og dermed forandre organismer på et molekylærbiologisk nivå [2]. I 1982 ble den første genmodifiserte plantecellen (soya, Monsanto) [3] laget og i 1990 ble genterapi for første gang benyttet i et forsøk på å kurere en døende pasient [4]. Begrepet genmodifisert er vidt og omhandler i prinsippet alle typer organismer, både dyr, planter og mikroorganismer for ulike formål. GMO er definert som mikroorganismer, dyr eller planter som har fått sitt genetiske materiale endret ved hjelp av genteknologi. Listen over mulige anvendelser og gunstige effekter av de genteknologiske fremskrittene er lang, men i kjølvannet av utviklingen kommer spørsmålene om teknologien er bærekraftig i det lange løp. Den unge teknologien kan skjule effekter som en ikke har kunnet forutsi og skeptikerne er mange også blant vanlige forbrukere. Usikkerheten har ført til opphetede debatter, både politisk og i det vitenskapelige miljøet og egne lovgivninger om genteknologi er innført internasjonalt og nasjonalt. Interessene knyttet til teknologien er mange og det er viktig å innhente så mye vitenskapelig dokumentasjon som om mulig om eventuelle risikofaktorer for å sikre en trygg bruk som ikke har uheldige konsekvenser for miljø og helse [5].

Bruksområder av GMO er mange og inkluderer blant annet genetiske studier og introduksjon av nye egenskaper hos organismen til bruk innenfor produksjon av mat eller til industrielle formål.



### 1.1.1 GMO i matvarer.

Genmodifisert mat er planter, dyr eller andre næringsmiddel produkter som har fått endret sitt genmateriale for å få nye forbedrede egenskaper. Hensikten kan være å forbedre næringssammensetningen til produktet eller forenkle produksjonen. Eksempler på forbedret næringssammensetning vil være endring i produktene som øker mengden av vitaminer, proteiner og gunstige fettsyrer. Et eksempel er økt vitamin A mengder i ris av typen «golden rice». Eksempler på egenskaper som forenkler produksjonen er resistens mot herbicider (kjemikalier som dreper ugress) hos HT (herbicid tolerant) soya og stresstoleranse. Stresstoleranse åpner for at planter som har vært geografisk begrenset til et klimaområde, kan plantes i andre områder og dermed øke den totale matproduksjonen i verden. Dette gir muligheter til å bidra til en positiv utvikling i den globale matsituasjonen. Det er allikevel store forskjeller i anvendelse av GMO i ulike land særlig når det gjelder matproduksjon til mennesker (figur 1.1). I USA er ca 80 % av all dyrket mais genmodifisert, mens det i Norge er forbud mot matprodukter som er genmodifiserte. Produsenter kan imidlertid anledning til å søke om godkjenning. [2, 5, 6]. På globalt plan er 56 % av soya, 28 % av bomull, 19% av raps og 14% av mais produksjonen GMO [ 7 ]. Forskjellene kommer av økonomiske, etiske, helse, miljø og samfunnshensyn og hvordan disse vurderes på nasjonalt nivå.



*Figur 1.1: Distribusjon av GMO produserende land i verden. Land i sterk oransje farge viser land med stor GM plante produksjon, striped land viser moderat produksjon mens gule prikker viser land hvor det finnes en liten andel GM plante produksjon. Figuren viser tydelig at det amerikanske kontinentet står for den største andelen av den globale produksjonen [8]*

### 1.1.2 GMO i vaksiner og medisinproduksjon.

Vaksiner har hindret spredning av mange patogene virus og bakterier. Et eksempel er utryddelsen av det dødelige koppeviruset i 1977. Dette skjedde gjennom en verdensomspennende massevaksinasjon iverksatt av WHO.

Den tradisjonelle vaksinen har vært døde eller inaktiverte virus eller bakterier som injiseres muskulært eller under huden og skaper en aktiv immunisering. Alternative vaksiner i form av rekombinante vaksiner, DNA vaksiner og vaksiner som kan tilsettes matvarer er de mest fremtidsrettede (tabell 1.1). Disse er basert på at gener for proteiner fra patogene agens blir introdusert i mennesker eller dyr ved hjelp av en virus vektor (f.eks. vaccinia virus) eller plasmider eller ved at nakent DNA fra patogene virus og bakterier isoleres og settes inn i humane celler. Når det introduserte genet uttrykkes produseres et protein som gir humoral og cellulær immunrespons.

DNA vaksiner kan lages mot en eller flere patogene organismer ved å kombinere gener for flere ulike antigener i plasmider som så injiseres i humane muskelceller ved bruk av sprøyte eller genkanon. Det er flere fordeler med denne type vaksiner, en av dem er at de ikke har evne til å skape sykdom. Transgene planter gir også store muligheter for produksjon og administrasjon av vaksiner på en enkel, økonomisk og trygg måte. Dette er hovedsakelig planter f.eks. poteter som har fått tilført gener for mikrobielle proteiner eller proteinfragmenter som stimulerer til en immunrespons (adjuvans). Poteter med et proteinfragment (b-subenhet) av kolera toksin kalt CT-B har gitt lovende resultater i dyreforsøk. Liknende forsøk har blitt gjort med proteiner fra enterotoksin- produserende *Escherichia coli* (ETEC) og norovirus som gir alvorlig gastroenteritt i utviklingsland. Målet er å lage transgene bananer med mikrobielle proteiner for oral immunisering. Dette gjør produksjon og distribusjon i utviklingsland enklere og mer kostnadseffektiv. I tillegg kan motstanden mot tradisjonelle vaksiner i mange land i Afrika bli redusert. 40 DNA vaksiner er hittil produsert. Utprøving av vaksiner er en lang prosess og kun få av disse vaksinene er kommet videre til kliniske utprøvinger. Hepatitt-B, herpes simplex, HIV, influensa, malaria og andre tropiske parasittsykdommer er under utprøving. Vaksiner mot rotavirus, cytomegalovirus, miltbrann, borrelia og rabies er andre vaksiner som er under produksjon ved hjelp av denne teknologien. Denne type vaksine rettes også mot maligne tilstander f.eks. prostatakreft og malign melanoma [9, 10].

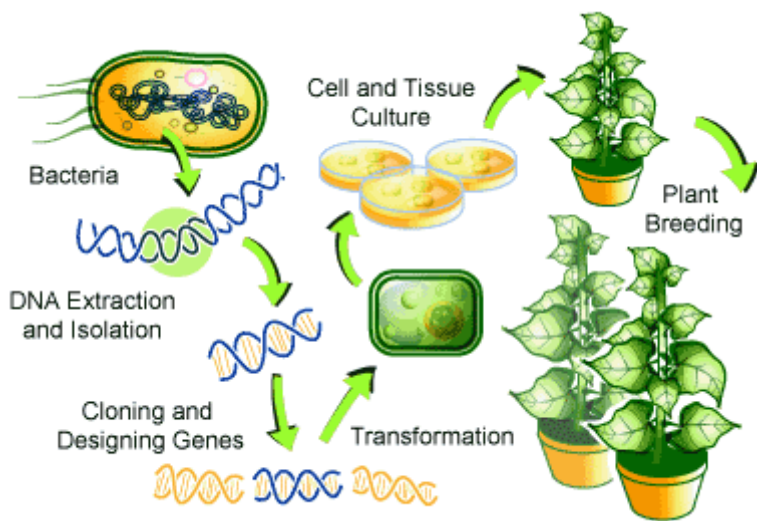
Tabell 1.1: Eksempler på vaksiner produsert ved genteknologi [9, 10]

Cytomegalovirus	Levende/svekket virus med delesjoner av virulens gener. Glykoproteiner fra CMV kombinert med en Vaccinia virus vektor.
HIV	Sub-enhet vaksine med glykoprotein gp120 evt sammen med gag proteiner gp24 og gp17. Proteiner ekstrahert eller laget ved rekombinant DNA teknologi. Vaccinia virus som vektor.
Miltbrann	Vaksine basert på proteiner produsert ved rekombinant – DNA
Borrelia	Outer surface protein A (OspA) protein fremstilt ved rekombinant DNA teknikk. Godkjent i USA av FDA.
Rotavirus	Humane stammer med manipulasjoner eller naturlig svekket . DNA vaksiner basert på utvalgte rotavirus gener eller syntetiske peptider. Oral vaksine.

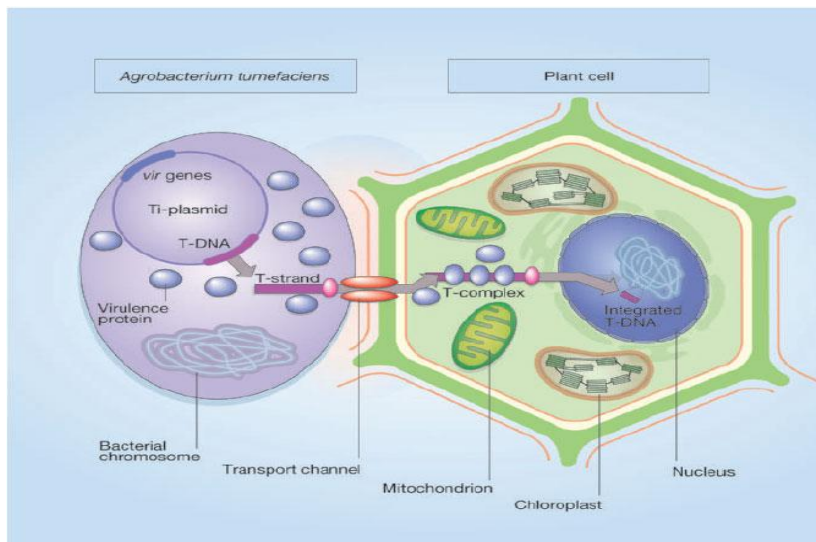
1.1.3 Introduksjon av nye egenskaper hos mikroorganismer, dyr og planter til matproduksjon og industrielle formål.

Mikroorganismer i matprodukter er den eldste formen for bioteknologi og det benyttes bakterier, sopp og alger som har en gunstig effekt på produktet uten å medføre noen risiko for helsen til konsumentene. Melkesyre kulturer er eksempler på enkel bioteknologi. I løpet av de siste 30 årene har bioteknologiske metoder utviklet seg til en storindustri med muligheter innenfor mange fagfelt. Benyttelse av mikroorganismer til å produsere humane proteiner ble for første gang forsøkt med *E.coli* som hadde fått tilført humant gen for insulin, ved transformasjon. GMO *E.coli* produserte insulin som kunne benyttes terapeutisk hos mennesker med diabetes. De fleste GM planter produseres ved å overføre DNA som koder for ønskede egenskaper til planteceller via plante

patogene mikroorganismer f.eks. *Agrobacterium tumefaciens* eller ved å bombardere planteceller eller plantevev med mikropartikler kledd med DNA fragmenter med ønskede gener (fig 1.2). *Agrobacterium tumefaciens* metoden innebærer å bruke et Ti (tumor inducing plasmid) plasmid som også bærer i et antibiotikaresistensgen som gjør det enklere å selektere ut de plantecellene som har mottatt Ti plasmidet. Plasmidet isoleres fra *Agrobacterium tumefaciens* og ønskede gener klones inn i T-DNA regionen av plasmidet. Deretter overføres Ti plasmidet fra bakteriecellen til plantecellen ved konjugasjon. I denne prosessen deltar en rekke proteiner som kodes for i T-DNA i plasmidet. En bro dannes mellom cellene ved hjelp av en pilus (T-pilus), før T-DNA regionen kuttes ut av Ti-plasmidet og overføres til plantecellen. DNA blir satt inn i plantecellens DNA ved re-kombinasjon (fig 1.3) [11, 12].



Figur 1.2: Produksjon av GM planter utføres ved å overføre DNA med ønskede egenskaper plantemateriale. Suksessfull overføring visualiseres ved vekst på medium med kanamycin [12].



*Figur 1.3: Agrobacterium tumefaciens er en kjent plante patogen bakterie. T-DNA regionen av Ti plasmid overføres ved direkte kontakt mellom bakterien og plantecellen (konjugasjon). Hvis plasmidet overføres, vil fremmed DNA kunne integreres på plantecellens kromosom [13].*

Transgene planter kan benyttes til å distribuere vaksiner, gjøre plantene resistente mot herbicider og insekticider i tillegg til å bedre deres stresstoleranse. Ødeleggelse av avlinger pga ustabil klima kan være en følge av de globale klimaendringene. Stimulering til økt produksjon av veksthormoner i planten kan øke planteproduksjonen og hindre intensivt landbruk og utarming av landbruksområder. Mikroorganismer kan også benyttes i prosesser til matproduksjon uten å være en del av det ferdige produktet. Et eksempel er en melketest som benyttes for å undersøke om det er antibiotikarester i melkeprodukter [2, 5, 7, 14].

Et annet stort fagfelt for moderne bioteknologi er bioremediering som innebærer bruk av mikroorganismer eller planter til rensing av miljøgifter. Dette kan bli en løsning på forurensing forårsaket av utslipp av olje, tungmetaller og andre kjemikalier fra industri, inkludert radioaktive partikler i grunnvann og jord. Studier foregår i ulike deler av verden og teknologien har stort potensiale. Mikrobielle «superbugs» som *Deinococcus radiodurans* (fig 1.4) har evnen til å overleve 1000 ganger større radioaktiv stråledose enn et menneske. Mikroben ble oppdaget i mat som hadde blitt behandlet med gammastråling. Genene som gir resistens mot ioniserende og

radioaktiv stråling kan bli viktig i opprensning av radioaktivt nedfall, men også for å kunne motstå kosmisk stråling i verdensrommet. Det er flere gener som øker DNA reparasjonen i cellen ved eksponering for ulike former for stress. Rensing kan gjøres ute i det forurensete miljø (in situ) eller i et innesluttet miljø. Eksempler på forurensing som effektivt kan bli rensset av ulike mikrober er kvikksølv (Hg), kopper (Cu), Krom (Cr), strontium (Sr), Uran (U), bly( Pb), og Argon (Ar) [15].



*Figur 1.4: Deinococcus radiodurans har spesielle egenskaper som gjør den interessant for GMO modeller, da særlig til bioremediasjon [16]*

Transgene dyr benyttes i fiskeoppdrett for å hindre sykdom og øke produktiviteten, men også for estetikkens skyld i form av fluorescerende akvariefisk. I 2012 ble det i Norge oppdaget transgene fisk i en dyrebutikk i Arendal. Slik fisk er forbudt i Norge til tross for at de holdes i et lukket miljø og fiskene ble inndratt og videre salg stoppet. Dette var første gangen GMO fisk ble påvist i Norge utenfor et forskningslaboratorium [17].

#### 1.1.4 Risiko ved bruk av GMO

Til tross for de mange gunstige sidene med genteknologiske metoder, har de forårsaket opphetede debatter. Bruk av sterke visuelle bilder som vist i figur 1.5 er ikke uvanlig å bruke for å få frem budskapet om risiko ved bruk av GMO.



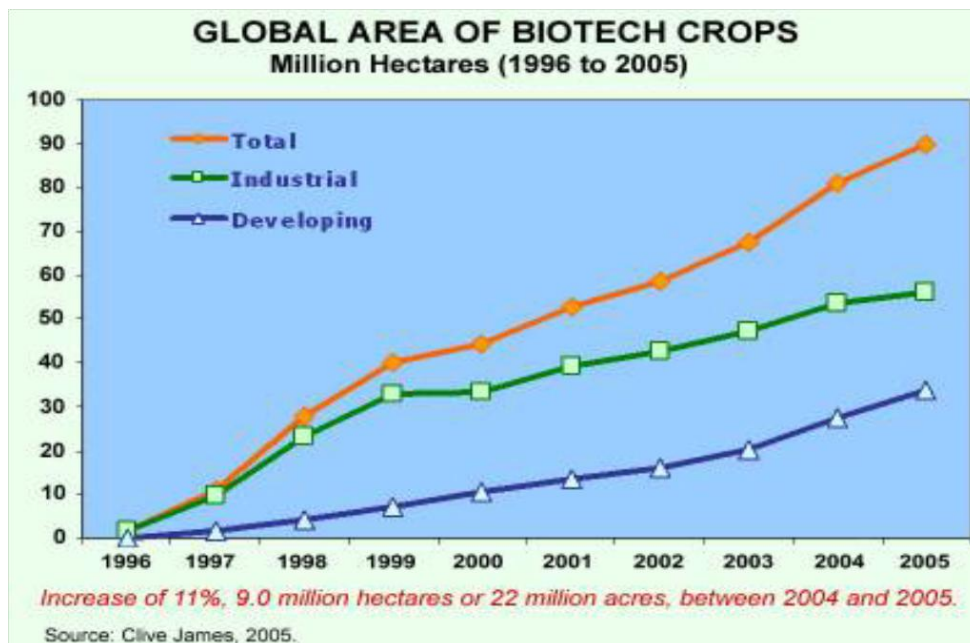
*Figur 1.5: Mange er kritiske til utbredelsen av GMO til mat produksjon. Kampanjer benytter ofte sterke visuelle midler.[18].*

Motstanden mot GMO er i Norge svært utbredt og det finnes bl.a. en egen facebook side mot GMO. Både miljøvernorganisasjoner og foreninger som representerer jordbruket er sterke motstandere. Hos dem står føre var prinsippet som en nødvendighet for å sikre trygg mat til forbrukeren og bevare mangfoldet i jordbruket. I motsetning til i USA, har denne politikken en stor oppslutning også fra stortingets side.

I USA er GMO planter benyttet til mat både for mennesker og dyr og utgjør en meget høy prosent av produserte landbruksvarer. Sammen med Argentina og Brasil står USA for ca 80 % av den globale produksjonen av GM planter [7]. I samme periode som debatten om sikkerhet og miljø ved



bruk av GMO har rast i EU, har den globale produksjonen økt årlig (fig 1.6).



Figur 1.6: Bruk av GMO har vist en økende trend både i industri land og utviklingsland. Figuren viser arealet som brukes til dyrkning av GM planter.[7]

På bakgrunn av vitenskapelige risikovurderinger, har det vært en bred enighet hos produsentene om at GMO ikke utgjør noen risiko for miljøet. Likevel er det publisert studier som viser en negativ effekt av konsum av GMO. Både i rotter og i *Daphnia magna* (vannloppe) ble det påvist økt dødelighet og mindre avkom [19]. I en fransk undersøkelse i 2008 ble det påvist økt dødelighet hos rotter som i et livsløp hadde blitt foret med Mais NK 603. EFSA og mat tilsynet har i ettertid underkjent denne studien [20]. Risikoen påvist i disse vurderingene er knyttet til proteiner som kan ha negative effekter bl.a. Cry1AB. Dette proteinet ble funnet i 19 GMO holdige fiskefôr som har blitt brukt i Norge og i prøver fra gravide kvinner i Canada, trolig på grunn av konsumering av GMO holdige matvarer [21].

Totalt finnes det 100 GMO produkter i produksjon i verden, men kun 31 er tatt inn i EU. I Norge, Belgia og Luxemburg har skepsisen vært særlig høy, noe som har fulgt til at Brussel i Belgia ble

erklært som GMO fri sone og at Norge til dags dato kun tatt inn 3 typer snitt nellik og en tobakksort. I EU har spørsmålet om GMO vært et vanskelig tema. Et felles regelverk for EU og EØS-land har vært vanskelig pga nasjonale hensyn og ønske om nasjonale autonomi angående GMO og det har vært vanskelig å komme til en enighet innad i unionen. Den økende produksjonen hos store matprodusenter som Canada, USA og søramerikanske land, stiller også GMO skeptiske land i en vanskelig posisjon, da det kan bli vanskelig å sikre seg GMO-frie varer. Merking av GMO-holdige varer vil bli et krav for å sikre forbrukeren. Søknader om å markedsføre GMO i EU blir vurdert med hensyn til helse, miljø og sikkerhet og økonomiske fordeler [22, 23, 24, 25]. I Norge blir det i tillegg vurdert om produktet har samfunnsnytte og bærekraftighet, men en annen begrunnelse kan bli nødvendig for å bevare Norges restriktive politikk i fremtiden. I 2012 benyttet utenriksministeren begrepet offentlig moral som innebærer å legge til grunn nasjonale verdier, kultur og religion. Dette begrepet er til nå kun benyttet ved spørsmål om ytringsfrihet. Dokumentasjon vedrørende miljøpåvirkning på nasjonalt nivå er i flere land mangelfull og flere har vegret seg i forhold til dette. I EU er ikke GMO tillatt som mat til mennesker, men kan benyttes til dyrefôr. Norge har blitt kritisert for den strenge linjen, men er også hedret for resultatene som føre var prinsippet har medført [25, 26]. Uten vitenskapelig dokumentasjon av skadelige effekter og risikofaktorer blir det vanskelig å forsvare den restriktive holdningen i GMO spørsmålet. Risikovurdering er i og for seg en vitenskapelig analyse hvor det skal foreligge faktisk dokumentasjon på risiko for skadelige virkninger, eller mangler på slik dokumentasjon. Risikohåndtering er en politisk vurdering basert på vitenskapelige vurderinger, men hvor det gjøres mange avveininger. I Norge blir dette en politisk vurdering hvor befolkningsoppunionen, langsiktige konsekvenser for helse og miljø og, ikke minst internasjonale økonomiske interesser spiller inn [7, 25, 26, 27, 28]. Problematikken ble tydeliggjort ved trussel om sanksjoner mot Norge fra EU. USA på sin side har varslet søksmål mot EU for importforbud av ulike GMO matvarer som etter europeisk standard ikke godkjennes. Noen risikomomenter er knyttet til kreftfremkallende

egenskaper hos GMO i matvarer (GMO fôr til dyr til kjøttproduksjon og GMO planter til mat), spredningen av GMO i miljøet og faren for ødeleggelse av native arter, med påfølgende redusert biodiversitet [5, 7, 23, 24, 25].

(USA har ikke undertegnet FN konvensjon for biodiversitet.)

Bruk av antibiotikaresistens gener som markører i seleksjonsprosessen ved produksjon av GMO har reist spørsmålet om potensiell risiko for spredning av disse til human og dyrepatoogene bakterier og til bakterier i naturlige miljø. Samtlige GMO søknader i Norge har blitt avslått på bakgrunn av tilstedeværelsen av antibiotikaresistensmarkører (*tabell 1.2*) [29] eller usikkerhet knyttet til uante reaksjoner, inkludert virulens i vaksiner som benytter virusvektorer. Et eksempel er en pseudorabies vaksine som er et GMO vaccinia virus med rabies gener som stimulerer immunologisk respons [10].

*Tabell 1.2: Oversikt over et utvalg av GMO søknader som har blitt avvist på bakgrunn av antibiotikaresistens markørgener. [29]*

Genmodifisert organisme (søknad)	Årsak til avvising av søknad
Genmodifisert raps <i>Brassica.napus</i> ( com(96) 158	Norge arbeider aktivt mot bruk av antibiotikaresistens markørgener. Kanamycin resistens markørgener. Kanamycin = reserve antibiotikum ved multiresistent tuberkulose.
Genmodifisert sikorissalat com(96) 424 <i>Chicorium.intybus</i>	Kanamycin resistens gener brukt som markør. Uheldig utvikling og risiko for resistensutvikling på lang sikt.
Genmodifisert mais com(96) 206	Ampicillin resistens gener. Norge har en mye gunstigere situasjon enn øvrige Europa. Ampicillin er et viktig og hyppig brukt antibiotikum. Norge 30 % resistens Europa 80 % resistens
Genmodifisert melketest T 102 K (97) 2068	Tilstedeværelse av resistensgener
Genmodifisert olje raps linje ms1 og rf2	Kanamycin resistens gener brukt som markør.

## 1.2 Aminoglykosid resistensgener som markører i GMP.

For å lette seleksjonen av transgene planter blir genetiske markører benyttet slik at GMP kan skilles fra planter som ikke har mottatt de ønskede egenskapene. Benyttelse av genmarkøren *aph(3)-II/npt II* som koder for aminoglykosid 3`-fosfotransferase/neomycin fosfotransferase og gir resistens mot aminoglykosidet kanamycin er det mest utbredte idet det er benyttet i ca 70-80% av alle GMO [29]. Resistensgener som koder for kanamycin, neomycin, bleomycin, gentamicin, streptomycin, tetrasyklin og ampicillin er brukt i fremstilling av GMO [29, 30, 31].

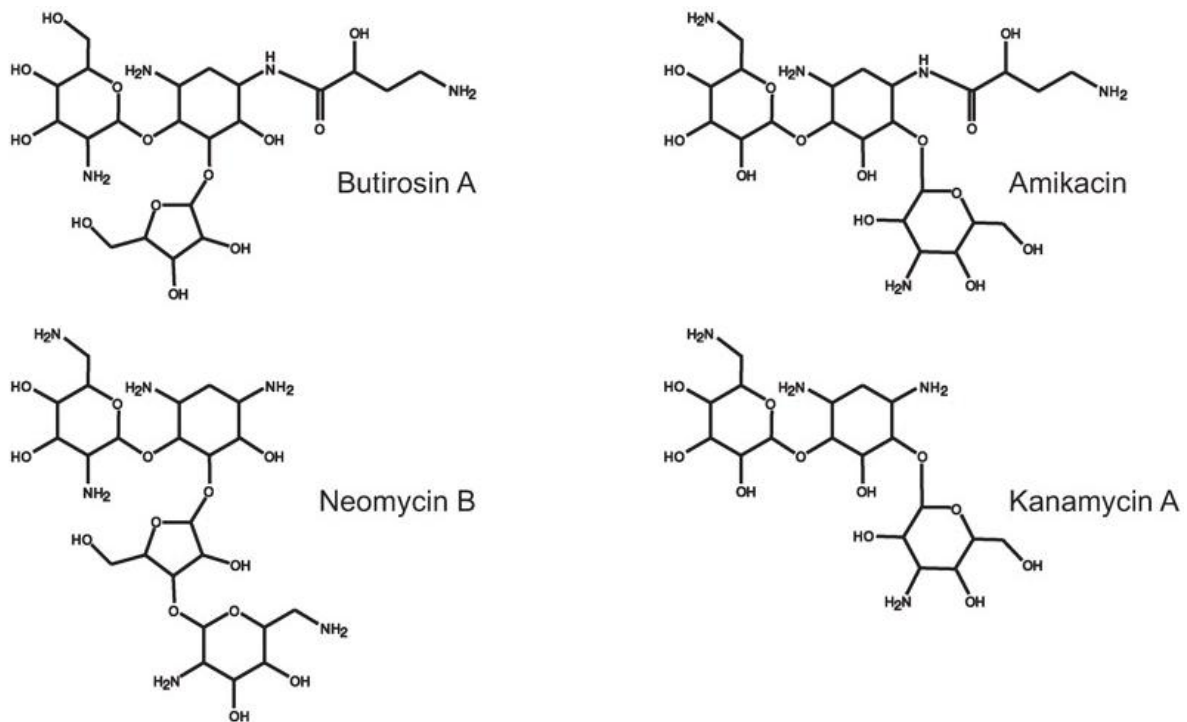
### 1.2.1 Aminoglykosider og deres virkemåte.

Kanamycin og neomycin tilhører gruppen aminoglykosider. Aminoglykosider er naturlig forekommende substanser som først ble isolert fra *Streptomyces spp* (kanamycin fra *Streptomyces kanamyceticus*) eller fra *Micromonospora*. Streptomycin ble først tatt i bruk i 1944 og senere fulgte flere medikamenter, både naturlige og semisyntetiske (tab1.3). Aminoglykosider består av to til flere aminosukker bundet til en heksosering via en glykosidbinding (figur 1.7) [32, 33].

*Tabell 1.3: Noen av de klinisk viktige aminoglykosidene.*

*Gentamicin, tobramycin, netilmicin, neomycin og framycetin, streptomycin og spektinomycin er de syv registrerte aminoglykosidene i Norge per 26.05.2013 [32, 33]*

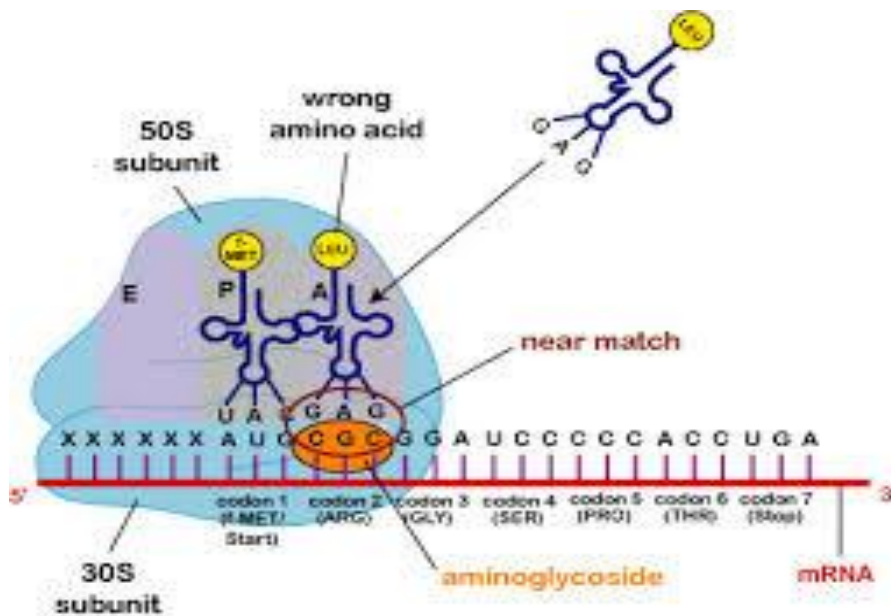
Aminoglykosider	Årstall tatt i bruk	Bruk i Norge (per 2013)
Gentamicin	1963	Ja
Tobramycin	1972	Ja
Streptomycin	1944	Ja (reserve ved resistente gonokokker)
Kanamycin	1957	Nei
Amikacin	1973	Nei
Neomysin	1949	Ja



Figur 1.7: Aminoglykosider har en struktur bestående av to til flere aminosukker bundet til en heksosering via en glykosidbinding. Alle over er substrater for APH(3) enzymene [34].

Aminoglykosider binder seg til utsiden av cellen og fraktes inn i cellen ved aktiv transport, før de binder de seg til cellens ribosomer.

Aminoglykosider virker ved å hemme proteinsyntesen ved at de binder seg til 30S og 50S subenheter på ribosomet og hemmer translasjonen av mRNA, noe som medfører feil og avbrudd av den voksende polypeptidkjeden (figur 1.8). Det viser seg også at aminoglykosidene løsner mRNA fra ribosomet [32].



Figur 1.8 : Aminoglykosider binder seg irreversibelt til 30S enheten av ribosomet og hindrer proteinsyntesen [35]

### 1.2.2 Aminoglykosidenes kliniske bruksområde.

Aminoglykosider er hovedsakelig aktive mot Gram-negative (G-) bakterier. De kan ikke brukes mot anaerobe bakterier siden de ikke er effektiv under anaerobe forhold. Aminoglykosidene er aktive selv mot bakterier som *Pseudomonas aeruginosa* og den Gram-positive (G+) bakterien *Staphylococcus aureus* som lett utvikler resistens mot andre antibiotika. Øvrige G+ bakterier er ofte resistente mot aminoglykosider. Aminoglykosidenes virkning ble først demonstrert mot *Mycobacterium tuberculosis* i 1949. Aminoglykosider er bakterieicide midler som har en fordel når det kreves en rask respons tid, noe som er avgjørende i sepsis pasienter med dårlig eget immunforsvar. Aminoglykosider kan benyttes alene med god effekt, men i mange tilfeller er det ønskelig å kombinere dem med andre antibiotika f.eks. beta-laktamer.

I Norge har gentamicin vært brukt til behandling av enterokokker (G+) og mot alvorlige systemiske infeksjoner (sepsis), da sammen med cefalosporiner eller penicilliner. Gentamicin og amikacin er enda klinisk viktig antimikrobielle midler. Kanamycin er brukt som andrevalg mot multiresistente

tuberkulosebakterier. Neomycin er brukt i veterinærmedisin og i salver til behandling av overfladiske sår. Amikacin er ikke benyttet i Norge og har lav resistensutvikling, dette fordi kryssresistens er ett mindre problem hos amikacin enn for andre aminoglykosider. I en oversikt over viktige antimikrobielle midler finner vi tobramycin, gentamicin og amikacin. Disse oppfyller de kriteriene som legges til grunn i WHO's evaluering av antimikrobielle midlers betydning i terapeutisk medisin. Kanamycin og neomycin fyller ikke kriterium nr 1 som viser til direkte betydning i terapeutisk medisin. Kriterium 2 innebærer antimikrobielle midler som brukes til å behandle sykdom forårsaket av organismer som kan tilegne seg resistensgener fra ikke humane kilder. Kanamycin fyller kriterium 2 på bakgrunn av at antibiotikaen kan være av betydning ved behandling av sykdom forårsaket av enterokokker, *E.coli* og *Salmonella sp* fra ikke humane kilder. I tillegg har betydningen av behandling med ulike aminoglykosider økt på grunn av multiresistente tuberkulose (TB) [36, 37].

### 1.2.3 Resistens mot aminoglykosider

Resistens kan deles inn i naturlig resistens, miljøavhengig resistens og ervervet resistens. Naturlig resistens er for eksempel manglende bindingseter for antimikrobielle midler eller manglende evne til opptak. Miljøavhengig resistens er påvirkning av ytre faktorer som hindrer funksjonen til det mikrobielle middelet. Aminoglykosider påvirkes av faktorer som oksygen tilgjengelighet, pH og tilstedeværelse av divalente kationer som kalsium og magnesium.

Aminoglykosider er polare kationiske molekyler og diffunderer ikke passivt inn i målcellen. De trenger hjelp via aktiv transport som er avhengig av oksidative prosesser. Under anaerobe forhold vil ikke aminoglykosidet fraktes inn i cellen. Transportprosessen er både tidkrevende og energikrevende. Hos G- bakterier fraktes aminoglykosidene gjennom porin kanaler i cellemembranen. Hvis det skjer endringer i disse porin kanalene vil dette resultere i minsket opptak.

Hos bakterier med negativ nettoladning på cellens overflate som hos *P.aeruginosa* vil divalente kationer i miljøet konkurrere om bindingsetene på bakteriecellens overflate og hindre opptak av aminoglykosidene i cellen. Mangel på optimale temperaturer kan svekke effekten av aminoglykosider som er mest virksomme ved temperaturer fra 35 °C og oppover. Dette har liten terapeutisk betydning da temperaturer over 35 °C er normalt hos mennesker og andre varmblodige dyr. I forhold til resistensbestemmelse er det derimot en viktig faktor da flere organismer kan ha optimale veksttemperaturer over eller under den optimale temperaturen for aminoglykosidenes aktivitet. Eksempelvis vokser *Yersinia enterocolitica* ved 28-29 °C og termotolerante *Campylobacter* har optimum veksttemperatur rundt 40 °C [38]. Grenseverdiene for resistent eller sensitiv varierer mellom ulike arter bakterier, noe som kompliserer vurderingen ytterligere. Enterokokker er resistente mot høye konsentrasjoner av aminoglykosider med en grenseverdi på R >1085µg/ml, mot R > 64µg/ml hos *E.coli* og *Salmonella spp* [39]. Undersøkelser av 100 bakterieisolater fra tre ulike miljøer (beitemark, dyrket mark og kloakkslam) i Bergen kommune, viste en utbredt resistens mot aminoglykosider, hvor 37-52 % av isolatene var resistente mot streptomycin og 30-46 % av isolatene var resistente mot kanamycin. Resistensbestemmelse ble utført ved agardiffusjonsmetoden. Isolatene tilhørte de fylogenetiske gruppene *Gamma-Proteobacterier*, slektene *Pseudomonas* og *Stenotrophomonas*, samt *Cytophaga*, *Flexibacter* og *Bacterioides* [40]. Liknende undersøkelser i Tyskland og Nederland viste at resistensen for aminoglykosider var utbredt, men viste en betydelig lavere prosentandel (0,01-0,56 %) [41].

Ervervet resistens hos mikroorganismer oppstår hovedsakelig som følge av horisontal overføring av resistensgener som sitter på mobile genelementer som plasmider, transposoner og integroner.

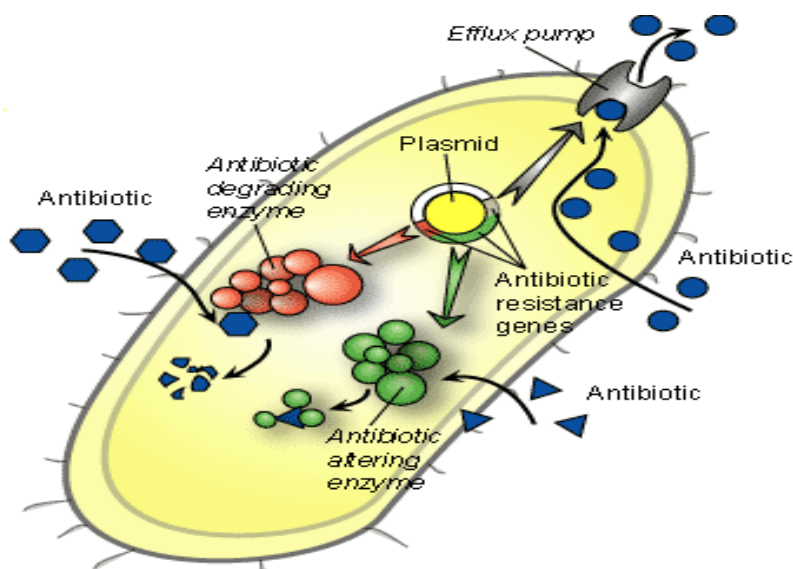
Transposoner og integroner overføres ved hjelp av plasmid eller bakteriofag vektorer, men det finnes selv overførbare konjugative transposoner. I tillegg kan resistensgener overføres til bakterier som har utviklet kompetanse til å ta opp nakent DNA fra sine omgivelser ved transformasjon. G+



bakterier er mindre restriktive og kan ta opp DNA fra flere ulike bakterier, mens de G- bakteriene helst tar opp DNA fra egne artsfeller. Bakteriofager har ofte et snevert antall av verter, men noen få er vist å ha et vidt vertspekter som omfatter mange ulike slekter og familier av bakterier [9, 42, 43].

Tabell 1.4: Eksempler på resistensmekanismer mot aminoglykosider hos ulike mikrober [32]

Resistensmekanismer	Virkning	Mikrobe eksempel
Endringer på ribosomet	Endringer på ribosomet grunnet kromosomale mutasjoner. Endringer i kromosomale gener er i større grad utbredt ved streptomycin resistens. Første mekanisme som ble observert hos <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Enzymatisk inaktivering	Tre grupper enzymer:  N -acetyltransferaser, O -fosfotransferaser og Nukleotidyltransferase.	<i>S.aureus, E.coli, E.faecalis</i>
Efflux pumper	Antibiotika pumpes ut via kanaler i cellemembranen	<i>P.aeruginosa</i>
Endret permeabilitet	Endring i overflaten / mutasjoner	
Manglende opptak	Redusert opptak i bakterien eller mangel på et transportsystem for aminoglykosider.	Gram-negative



Figur 1.9: Ulike resistensmekanismer hos mikrober, ofte sees en kombinasjon av flere mekanismer i samme mikrobe [44].

Tabell 1.4 og figur 1.9. viser eksempler på ervervete resistensmekanismer mot aminoglykosider hos mikroorganismer. Av de ulike resistensmekanismene er enzymatisk modifisering og inaktivering av størst klinisk betydning. Det er funnet mer enn 55 forskjellige inaktiverende enzymer [32].

Enzymatisk inaktivering av antibiotika er utbredt blant alle bakteriegrupper også antibiotika produserende bakterier. Utbredelsen og forekomsten av de ulike genene å variere sterkt blant ulike bakteriegrupper og de har forskjellig geografisk utbredelse. I Europa er aminoglykosid acetyl-3-transferase (*aac(3)* og *aac(6)*) svært utbredt og relativt hyppig funnet i kliniske isolater fra mennesker [45, 46, 47, 48, 49, 50].

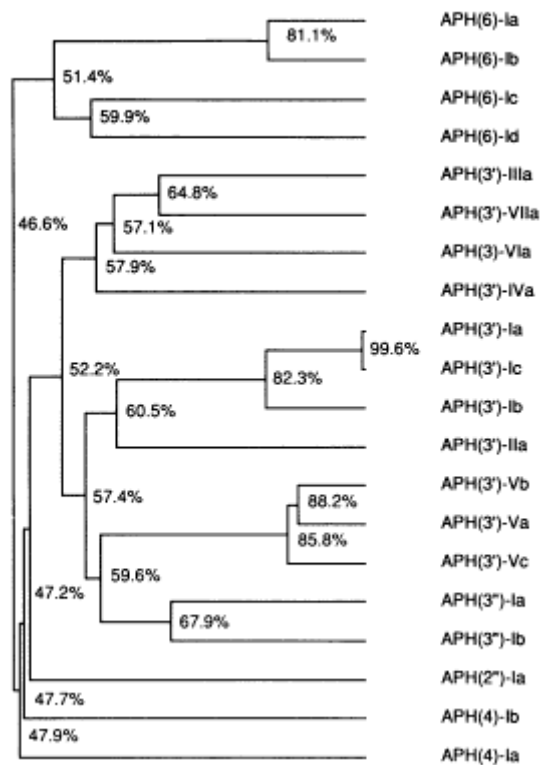
Nomenklaturen for enzymer knyttet til aminoglykosidresistens antyder hvilke del av aminoglykosidet de har som substrat. For eksempel vil APH(3)-II enzymet fosforylerer fosfatgruppen ved 3-hydroxyl setet av aminoglykosidet. Gener som koder for enzymer (f.eks. APH(3)-II), skrives med små bokstaver og i kursiv (*aph(3)-II*). Enzymer som modifiserer antibiotika er av særlig klinisk betydning siden genene for slike egenskaper (resistensgener) kan spres mellom bakterier ved hjelp av transposoner som sitter på konjugative plasmider. Dette er en

form for horisontal genoverføring (HGO) som i stor grad er årsaken til det voksne problemet med ESBL (extended spectrum beta-lactamase) hos G- bakterier [45, 46 ].

Hos aminoglykosider er følsomheten for de ulike enzymene varierende og det er ikke full kryssresistens mellom de ulike aminoglykosidene. Undersøkelser på aminoglykosidresistens har også blitt sett i sammenheng med økende bruk av cefalosporiner. Denne koresistensen kan forklare den økningen vi ser for aminoglykosider som ikke benyttes ofte i Norge. Eksempelvis vil det ved mistanke om sepsis benyttes empirisk behandling med gentamicin og beta-laktamer som penicilliner eller cefalosporiner før resultater fra blodkulturer foreligger. Økning av fluokinolon resistens f.eks. mot ciprofloksasin kan knyttes til bruk av gentamicin. Retningslinjer for bruk av antibiotika varierer, men det økende problemet med resistens har ført til oppfordring til moderasjon av bruk og riktig bruk av medikamentene [14, 45].

#### 1.2.4 Aminoglykosid modifierende enzymer: Aminoglykosid fosfotransferase (APH)

Aminoglykosid fosfotransferase er en av de viktigste gruppene av modifierende enzymer og gir resistens mot aminoglykosidene kanamycin, neomycin, bleomycin, parmomycin, ribostamycin, butirosmycin, isiparmicin og amikacin. APH enzymene er ATP avhengige enzymer som katalyserer fosforylering av hydroxyl grupper lokalisert på ulike steder i aminoglykosidene. De ulike enzymene i denne gruppen har høy prosent av homologi seg i mellom. Utbredelsen og den kliniske relevansen til disse enzymene er imidlertid varierende. APH enzymer er navngitt etter hvilket bindingsete de har til sitt substrat. APH undergruppene inkluderer APH(4)-1, APH(6)-1, APH(9)-1, APH(3'')-I til IV, APH(3'')-I, APH(7)-I og APH(2'')-I til IV [ 34, 47, 48].

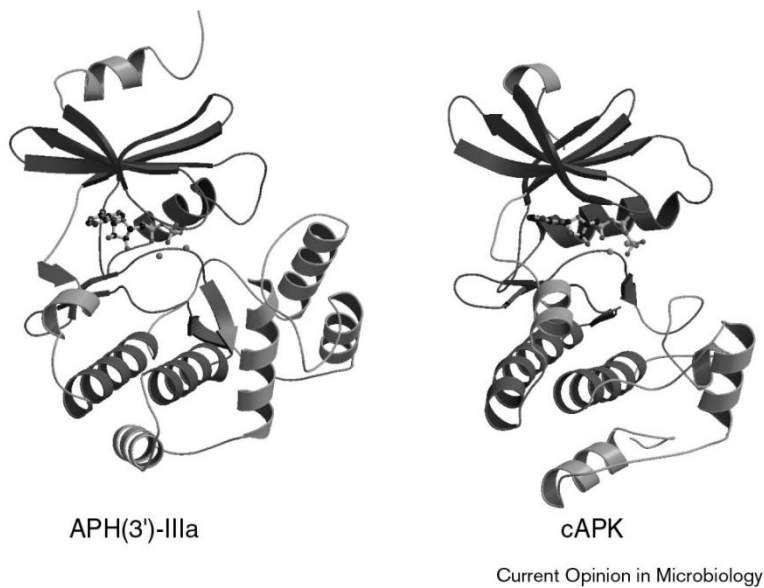


Figur 1.10: APH enzymene er den største gruppen av enzymer som gir resistens mot aminoglykosider. Diagrammet viser prosenten av aminosyresekvenshomologi mellom de ulike enzymene i APH gruppen [47].

### 1.2.5 Opphav og funksjon av APH(3) enzymene.

Enzymer er proteiner som kan ha store strukturelle likheter, men fremdeles ha svært forskjellig substrat. Gjennom studier av enzymer som metallenzymene har det blitt tydelig at når det i løpet av evolusjonen er utviklet en protein struktur som fungerer godt, vil denne beholdes og utvikle seg videre til å utføre ulike oppgaver. Denne evolusjonære teorien støttes ved økt kjennskap til 3D strukturen av ulike enzymer. Sammenlikninger har vist at det er slektskap mellom *aph(3)* gener for kanamycin resistens hos streptokokker og aminoglykosid inaktiverende enzymer hos antibiotika produserende organismer som *Streptomyces griseus* [34]. *E.coli* er ikke i stand til å transludere streptomycin mRNA transkriptet fra genet på Tn5 transposonet som *aph(3)-II* genet sitter på, noe

som kan tyde på at transposonet opprinnelig kan ha hatt en annen vert f.eks. en antibiotika produserende bakterie [34, 47]. Strukturen til APH(3) enzymene er blant de best studerte og viser at APH(3)-III strukturen har en slående likhet med proteinkinaser (fig 1.11), men at det er liten sekvenshomologi mellom disse enzym familiene. Studier viser at aminoglykosidkinaser også kan fungere som serine protein kinaser. APH (3)-III kan fosforylere ulike peptider og proteiner, men har lav aktivitet. Dette kan bety at den primære funksjonen av enzymet kan ha vært som en proteinkinase. Deretter kan genet som kodet for enzymet blitt flyttet ved hjelp av transposoner. Siden transposoner kan bevege seg mellom plasmider og kromosomet kan den store utbredelsen av APH enzymer i kliniske og miljøbakterier forklares av relativt høy mobilitet kombinert med seleksjonspress [34, 47].



*Figur 1.11: 3D strukturen til APH(3)-III enzymet viser stor strukturell likhet med proteinkinaser, her Cyclic AMP (Adenosine Monophosphate)-Dependent ProteinKinase (cAPK) [34].*

### 1.2.6 APH (3) enzymene og deres geners betydning og utbredelse.

APH(3) gruppen består av APH(3)-I, APH(3)-II og APH(3)-III. Hver av disse har isoenzymer som gir samme resistensprofil, men har ulik forekomst hos bakterier i naturen. Genene for enzymene i APH gruppen er knyttet til med en rekke ulike transposoner og plasmider. Genene for APH(3)-I .

APH(3)-I er vidt utbredt hos G- bakterier, (*Serratia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* og *Yersinia*) men forekommer også hos G+ bakterier som *Corynebacterium spp.*

*aph(3)-I* genene er knyttet til bredspektrede plasmider og transposonet Tn903. *aph(3)-III* gener er knyttet til G+ bakterier med utbredelse er blant humanpatogene bakterier som streptokokker, stafylokokker og enterokokker. Det kliniske mest relevante av APH(3) enzymene er APH(3)-I gruppen består av tre ulike isoenzymer med høy homologi. APH(3)-Ia og c har 99 % aminosyre sekvenslikhet (fig 1.10). Dette betyr at hybridiseringsprober for APH(3)-Ia genene, trolig vil hybridisere med APH(3)-Ic gener [34, 45]. I motsetning til *aph(3)-I* og *aph(3)-II* genene, koder *aph(3)-III* genet også for resistens mot det klinisk viktige antibiotikum amikacin som er et kanamycin derivat [32]. Genet *aph(3)-III* er også kjent som *nptIII* er brukt som genetisk markør i noen få studier. Av hensyn til amikacin resistensen er *aph(3)-III* plassert i risiko gruppe 3 av European Food Safety Authority (EFSA), og ikke tillatt som genmarkør hos GM planter til konsum hos mennesker [30]. Selv om utbredelsen av *aph(3)-III* hos klinisk viktige patogene med aminoglykosidresistens er høy i noen miljøer, er prosentandelen av resistente bakterier lav. Overføring av *aph(3)-II* genet fra G+ til G- bakterier er mistenkt å forekomme, selv om G+ bakterier hovedsakelig bærer genet. Tenover et al viste i sitt studium av 279 kliniske isolater av *Campylobacter jejuni* og *Campylobacter coli*, at *aph(3)-III* gener kunne påvises hos 9 av 11 kanamycin resistente isolater. Den totale frekvensen av kanamycin resistens blant isolatene var 6,45 %, noe som viser at den prosentvise andelen av total populasjon er relativt lav. Andelen av de

analyserte kanamycin resistente isolatene med *aph(3)-III* genet var hele 81 % [51]. APH(3) enzymer viser seg ofte i høy forekomst når den bestemte resistens fenotypen (kanamycin) uttrykkes i bakterien. Fenotypisk resistens brukes til å tolke kliniske isolater. Dette gjøres på bakgrunn av observasjoner over tid for typen bakterier. En fenotype med resistens for kun neomycin og kanamycin hos G-, vil fenotypisk knyttes til *aph(3)-II* genet. Der hvor det ikke uttrykkes denne fenotypen, vil det kunne tolkes som fravær av slike gener. Mye av antakelsene om *aph(3)* genets utbredelse i kliniske isolater er på bakgrunn av fenotypisk tolkning [52].

### 1.2.7 *aph(3)-II* og *aph(3)-I* genenes utbredelse

Shaw viste i sitt studium at utbredelsen av *aph(3)-I* geneene var høy i alle miljøer, men varierte mellom ulike bakteriearter. Blant de G- bakteriene hadde 46 % dette genet (6,6 % *Pseudomonas sp.*, 27,7% *Serratia sp* og 49% *Acinetobacter sp*). Totalt viste det seg at hele 90 % av isolater som hadde kanamycin og neomycin som resistensprofil var positive for *aph(3)-I* genet. Denne påstanden har vist seg å stemme i mange følgende studier av aminoglykosidresistens [47]. Nemeč og Dolzani viste i sitt studium av multiresistente *Acinetobacter baumannii* fra ulike miljøer i Europa at *aph(3)-I* kunne påvises i 76 av 101 isolater (75,2 %) [53]. Mendoza og Alvarez viste i sitt studium av G- isolater fra hospitaliserte pasienter at *aph(3)-I* kunne påvises i 251 av 334 isolater (75,1 %) ved DNA-DNA hybridisering med spesifikk genprobe [54]. Flamm og Phillips viste i sitt studium av 151 kliniske *Enterobacteriaceae* isolater at *aph(3)-I* og *ant (2'')* var de mest vanlige genotypene [55]. Navas et al viste i sitt studium av *Corynebacterium striatum* at *aph(3)-I* også er utbredt blant G+ bakterier. Hele 33 av 45 av *Corynebacterium striatum* isolatene som uttrykte kanamycin resistens, var positive for *aph(3)-I* genet (73,3 %) [56].

Genet som koder for APH(3)-I enzymet (*aph(3)-I*) er ofte benyttet som genetisk markør i transgene planter. APH(3)-II enzymet er av særskilt interesse i debatten om markøregener i GMO. Genet som

koder for APH(3) – II, *aph(3)-II* er svært utbredt i transgene planter. Studier viser at andelen av GMO planter med denne markøren kan være så stor som 80 %.

*aph(3)-II* genet ble først isolert fra *E.coli*, men finnes også i *Pseudomonas* og *Vibrio* arter [44]. Det finnes tre isoenzymene som koder for APH(3)-IIa, APH(3)-IIb og APH(3)-IIc [47, 57, 58].

*aph(3)-IIa* er funnet i G-, tilknyttet transposonet Tn5. To andre isoenzymer er funnet, disse er kodet for av kromosomale gener. *aph(3)-IIb* genet ble funnet å gi naturlig kanamycin resistens hos *Pseudomonas* [57]. *aph(3)-IIc* genet ble oppdaget hos den opportunistisk humanpatogene bakterien *Stenophomonas maltophilia* og koder for et enzym (APH(3)-IIc) som delte 50 %

aminosyresekvenshomologi både med APH(3)-IIa og APH(3)-IIb [58]. Shaw et al viste i sitt studium at *aph(3)-II* bare kunne påvises i 2,5% av isolatene (3,1% av de G- var *Pseudomonas* arter) [47]. I undersøkelser av kliniske kanamycin resistente G- bakterie isolater fra pasienter i Spania,

ble *aph(3)-II* kun påvist i 19 av 334 isolater [54]. Undersøkelser av 355 bakterieisolater fra elv, (Rhinen) jord, grisegjødsel og kloakkslam fra Nederland, viste en lav forekomst av *aph(3)-II* gener.

Det ble ikke påvist *aph(3)-II* gener i noen av prøvene fra jord eller vann, men i kloakk og

grisegjødsel ble det funnet en lav prosent av *aph(3)-II* positive isolater. De kanamycin resistente bakteriene tilhørte slektene *Pseudomonas*, (9,1 %) og *Xanthomonas* (10 %), og familiene

*Enterobacteriaceae* (30 %) og *Vibrionaceae* (33,3 %). Kun tre isolater fra kloakk hybridiserte med spesifikk probe for Tn5. Dette kan tyde på at *aph(3)-II* genet i de fleste tilfeller kan ligge på

bakterienes kromosom, eller at Tn5 har forsvunnet fra bakterien [41]. Leff et al påviste *aph(3)-II* gener i 3 av 184 kanamycin resistente isolater i ellevann fra The Runs Creek (U.S.A) ved

hybridisering med DNA prober. Studiet omfattet både dyrkbare og ikke dyrkbare bakterier ved at total DNA ekstrahert fra vannprøvene ble analysert [59]. En nyere undersøkelse av 10541 kliniske

isolater av *E.coli*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *S.aureus* og *P.aeruginosa* fra Østerrike i perioden 2008-2011, viste at den totale resistensandelen blant disse bakteriene kun utgjorde 0,0096 % [60]. De

Vries og Wachernagel viste i sitt studium av DNA i 4 prøver fra gårdsjord at *aph(3)-II* kunne



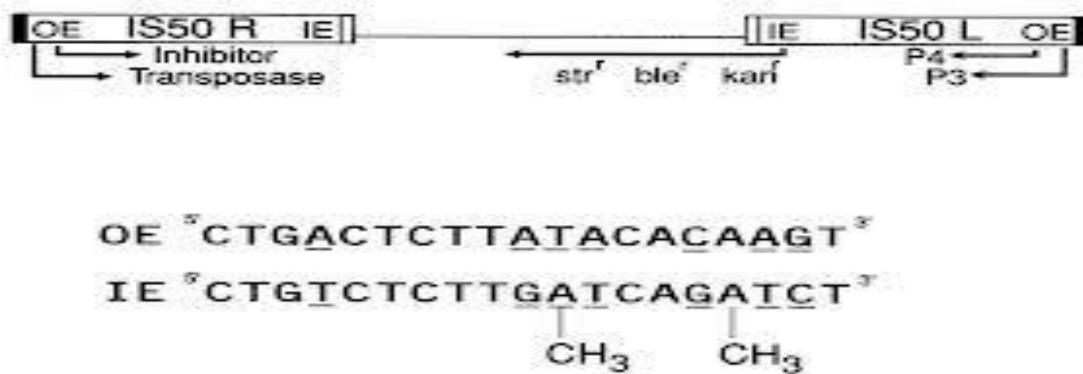
påvises i alle prøver og at konsentrasjonen av *aph(3)-II* genet varierte mellom  $2 \cdot 10^5$  og  $3 \cdot 10^8$  molekyler/gram jord [61]. I Norge er det siden 1997 blitt analysert *E.coli* isolater fra dyrehold med fokus på *aph(3)-II* gener. Resultatene av disse analysene har vist en lav forekomst av genet.

Forholdene i norsk husdyrhold er antatt å være nokså lik forholdene i øvrige land i Europa [24, 25]. Utbredelsen av *aph(3)-II* er ikke tilstrekkelig undersøkt til å vurdere forekomst i naturlige miljøer. Ved risikovurdering av GMO og mulig spredning av genetiske markører i miljøet er den ulike oppfatning av risiko og langsiktige konsekvenser ved bruk av *aph(3)-II* genet.

Interessen med hensyn til forekomsten av genet er knyttet til bruken av genet som en seleksjons markør i transgene planter og den potensielle påvirkningen spredning fra disse plantene kan ha på miljøet [5, 24, 25, 62].

I et evolusjonært så vel som klinisk perspektiv er flyttbare genelementer av sentral betydning i forhold til den eksplosive resistensutviklingen hos bakterier. Transposoner og plasmider har ofte ett til flere gener som koder for antibiotikaresistens. Transposoner er genetiske elementer som kan være viktige vektorer for resistensgener. De er påvist både i prokaryote og eukaryote organismer og har utvilsomt bidratt til evolusjonen i begge grupper. Til og med det menneskelige genomet inneholder disse flyttbare DNA elementene. Transposoner kalles ofte "jumping genes" eller "selfish genes". Som navnet indikerer kan de transposere (hoppe) mellom lokalisasjoner på genomet internt i en vertcelle, men de kan også transposere mellom kromosomet, plasmider og bakteriofager.

### Prokaryotic Transposon Tn5



Figur 1.12: Strukturen til Tn5 transposonet. Det består av to IS elementer som utgjør flankene.

DNA segment i kjernen har resistensgener mot streptomycin, bleomycin og kanamycin [63].

Tn5 er et grundig studert transposon som først ble påvist hos *E.coli* (1974), da som en del av et R-plasmid. Tn5 er et sammensatt transposon (figur 1.12) som består av et sentralt DNA segment med gener som koder for ulike proteiner, og som på hver flanke har et innsetningssekvens (IS)element. IS elementene er ikke nødvendigvis like, men transposonet utgjør hele området fra det ene IS elementet til det andre og beveger seg som en enhet. Tn5 bærer gener for kanamycin, bleomycin og streptomycin.

Tn5 finnes hos G- bakterier da særlig innenfor familiene *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* og *Vibrionaceae*. Hos disse vertene vil det uttrykkes aminoglykosidresistens, da særlig mot kanamycin [47].

Opphavet til transposonene usikkert, men en teori er at Tn5 oppstod ved en rearrangering av bakteriekromosomet slik at to mobile elementer ble flankene til tidligere immobile gener. Dette forutsetter at genene for kanamycin og streptomycin resistens var kromosomale gener, muligens på en antibiotikaproduerende organisme. En annen teori er at innsetning av et mobilt gen gjorde at resistensgenene skilt fra sin originale promotor, noe som medførte en lavgradig resistens. Selv en lavgradig resistens vil kunne gi en fordel over sensitive bakterier i et antibiotikum kontaminert miljø. Etter en periode kan den mindre aktive promotoren ha blitt erstattet med en mer funksjonell

promotor på grunn av seleksjonspress slik at organismen har oppnådd høygradig resistens.

God tilpasningsevne til endringer i det naturlige miljøet har vist seg å gi bakterier med Tn5 en selektiv fordel. Et eksempel er *E.coli* sin evne til å tilpasse seg miljøer med skiftende temperaturer.

Det finnes på en annen side et stort antall transposoner med gener som gir konkurransedyktige fordeler. Etablering av transposoner i det mikrobielle miljøet vil derfor også avhenge av mange miljøfaktorer. Tn903 og Tn5 bærer begge resistensgener for kanamycin og undersøkelser viser at disse resistensgenene har stor likhet [47]. Likevel er disse transposonenes IS elementer av ulikt opphav, noe som kan støtte teoriene om rearrangering og eller ut kutting av eksisterende kromosomale gener.

*E.coli* er istand til å transkribere genet for streptomycin resistens ( $str^R$ ) som sitter på Tn5, men kan ikke translaterer mRNA og uttrykker derfor ikke denne egenskapen.  $str^R$  genet hos Tn5 er vist å ha stor sekvenshomologi med  $kan^R$  gener hos *Streptomyces spp* og *Streptococcus spp*. Dette kan indikere at Tn5 ikke har sitt opphav fra en G- bakterie, men fra G+ arter, kanskje fra organismer som selv produserer aminoglykosider. Studier viser at der det tidligere var vanlig å finne Tn5 og dets tilhørende resistensgener, er den blitt mer sjelden. Forekomst av *aph* gener som normalt er knyttet til Tn5, er i tillegg funnet i organismer uten Tn5 å tilstede og heller funnet på vertens kromosom. En av teoriene er at andre transposoner som Tn7 eller Tn903 har utkonkurrert Tn5 i disse bakteriene.

Av de tre genene i Tn5 som gir aminoglykosidresistens, tilhører to grupper aminoglykosid fosfotransferase (*aph(3)-II* og *aph(6)-Ic*) [47, 64, 65].

### 1.3 Horisontal genoverføring (HGO)

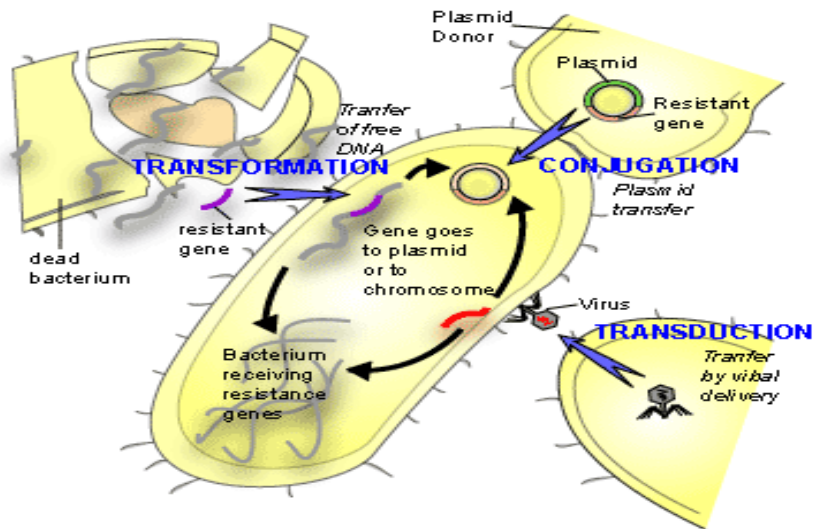
Horisontal genoverføring er avgjørende for mikrobiell evolusjon. Bakterienes evne til å ta opp genetisk materiale fra andre bakterier har gjort dem i stand til å overleve drastiske endringer i sitt naturlige miljø f.eks. næringsgrunnlag, pH, temperatur, kontaminering av tungmetaller, desinfeksjonsmidler, antibiotika og radioaktivitet. Mekanismene er også årsaken for den hurtige spredningen av resistensgener og samling av disse i genkassetter (integroner) som på kort tid har blitt ett globalt problem.

#### 1.3.1 Mekanismer for genoverføring og overføring av gener fra GMO til bakterier i ulike miljø.

Horisontal genoverføring omfatter ulike mekanisme for hvordan det genetiske materialet blir overført fra donoren til resipienten. Hos mikroorganismer kan det foregå ved transduksjon, transformasjon og konjugasjon (fig 1.14). Mekanismene forekommer i alle miljøer, men mekanismene som dominerer avhenger av miljøfaktorer og det mikrobielle samfunnets sammensetning (fig 1.15) [7, 66].

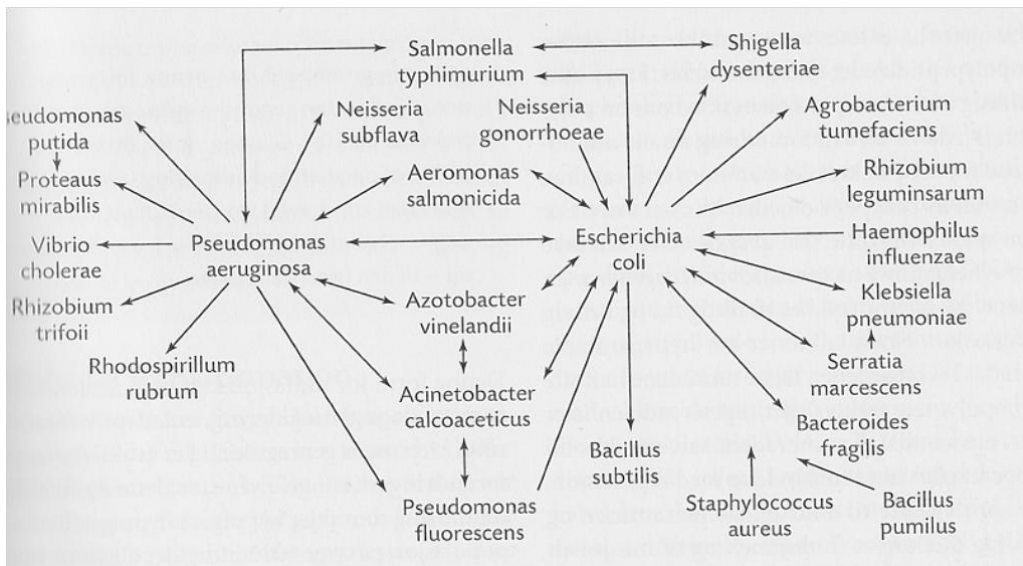
Transformasjon er den mest sannsynlige mekanismen for overføring av gener mellom planter og bakterier i jord og tarm. Fritt DNA fra GMP kan persistere i miljøet i måneder og år. Hvis transformasjon skjer mellom kompetente resipient bakterier i jord, kan slike gener mobiliseres i R-plasmider. Overføring av resistens mellom bakterier er som oftest ved konjugasjon. Dette innebærer fysisk kontakt mellom bakterier, hvor bakterie tettheten er høy. Jord og tarmsystemet er slike miljøer, hvor konjugasjon forekommer. Hvis genelementer fra GMP etableres i resipient bakterien, kan disse genene overføres til et bredt spekter av bakterier i det naturlige miljø.

Siden flere opportunistiske humanpatogene finnes i jord kan plasmider overføres til mer kjente humanpatogene bakterier og føre til terapivikt ved antibiotikabehandling. Overføring mellom jord bakterier og ulike humanpatogene presenteres i figur 1.15.



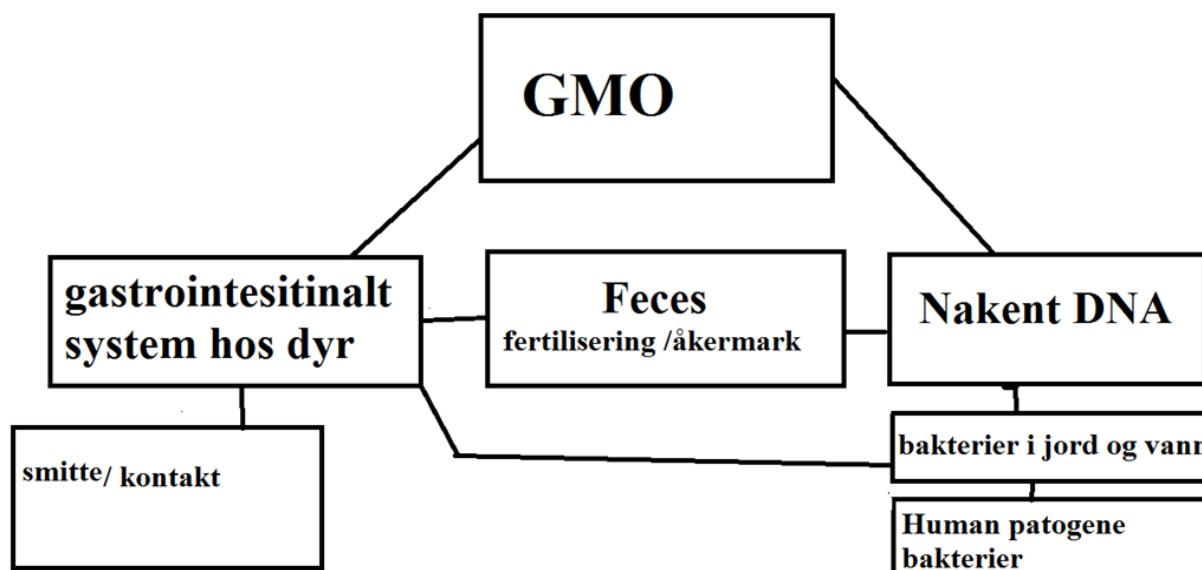
Figur 1.14: HGO mellom bakterier kan foregå ved transformasjon, transduksjon og konjugasjon

[67]



Figur 1.15: Bakterier fra ulike miljøer kan overføre plasmider til et bredt spekter av resipienter.

Dette kan foregå på tvers av art, slekt og familie. Figuren viser hvordan miljø og humanpatogene bakterier kan utveksle genetisk informasjon etter at DNA er overført ved transformasjon fra planter til bakterier [9]



Figur :1.16 Spredningsmuligheter av gener fra GMO til patogene bakterier og formering i ulike miljøer.

### 1.3.2 Transformasjon

I denne oppgaven er det valgt å fokusere på transformasjon, da dette regnes å være den mest sannsynlige mekanismen for HGO fra GM planter til bakterier (fig 1.16).

Transformasjon er opptak av nakent DNA og forutsetter stabilt opptak, integrering og funksjonelt uttrykk av de integrerte genene, under normale vekstbetingelser for den gitte organismen (fig 1.18).

Forutsetningene for suksessfull transformasjon å variere mellom ulike bakterier. I motsetning til transduksjon ved vertspesifikke virus vektorer og konjugasjon, som krever direkte celle til celle kontakt, gir transformasjon en mulighet for opptak av fritt DNA fra miljøet. Bakterier som er naturlige kompetente finnes i jord, vann, ekstreme miljøer og blant de mest kjente humanepatogene.

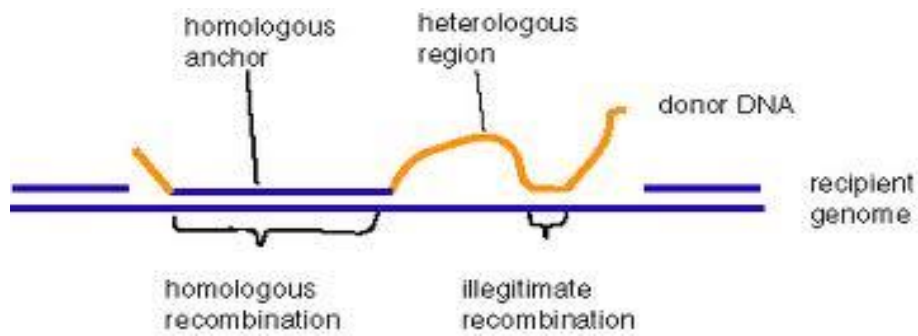
Blant undersøkte bakterier har kun 1 % evnen til naturlig transformasjon. G+ organismer er mindre restriktive i forhold til opphavet av DNA mens G- bakterier ofte er restriktive og krever spesielle sekvenser, såkalte USS (opptak signal sekvens) *Neisseria spp* og *Haemophilus spp* er eksempler på humanepatogene som krever slike sekvenser. For at DNA kan overføres mellom bakterier må

resipienten utvikle kompetanse. Bakgrunnen for oppregulering av kompetanse gener er en svært komplisert og aktivering av kompetanse gener avhenger av miljøfaktorer og kjemiske signaler fra det ytre miljøet. Utvikling av kompetanse hos en bakterie involverer uttrykk av 20-50 proteiner [68, 69]. Generell næringstilgjengelighet, pH og hvilke stadie av vekstfasen bakteriene befinner seg i vil påvirke transkripsjonen av kompetanse gener. Det finnes kompetente bakterier i alle miljøer (tabell 1.4) [67, 68].

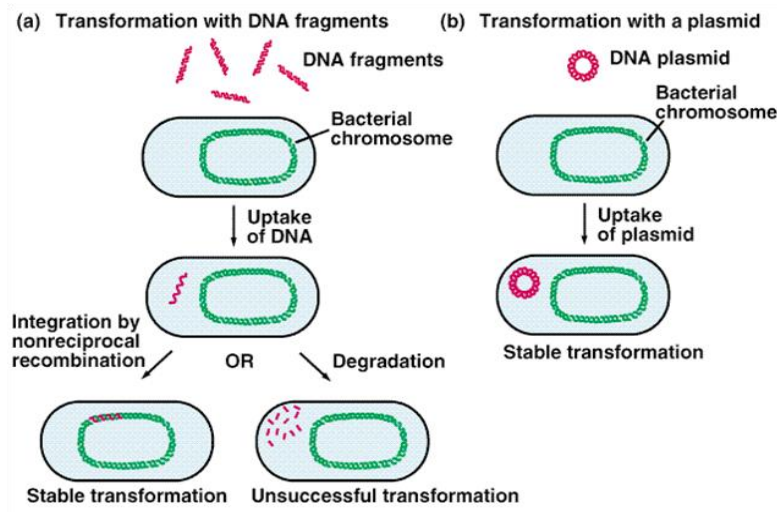
*Streptococcus pneumonia* utvikler kompetanse ved høy celledetthet, *Haemophilus influenzae* er avhengig av endringer i miljøet fra næringsrike til et næringsfattig og aerobe til anaerobe forhold. Andelen i prosent som utvikler kompetanse blant de ulike mikrobene varierer (*Bacillus subtilis* 20 % og *S.pneumonia* 100 %). Tidsperspektivet på kompetansen varierer fra en kort periode hos *S.pneumonia* til flere timer hos *B.subtilis*. Hotspots for slik overføring kan være tarmsystemet, plantejord eller nasofarynx (*S.pneumonia*) [70, 71, 72].

Integrering av DNA i resipienten foregår ved homolog rekombinasjon eller ved additiv integrering også kalt Homology facilitated illegitimate recombination (HFIR).

Homolog rekombinasjon forutsetter at donor DNA og resipient DNA har et område på 25-200 bp region av homologi. Homology facilitated illegitimate recombination (HFIR) forutsetter et område av høy homologi, hvor rekombinasjonen initieres. Deretter vil rekombinasjonen forlenges inn i et område med liten eller ingen homologi. På denne måten kan heterogent DNA adderes til resipientens DNA (fig 1.17). For at slike DNA rekombinasjoner skal kunne skje må allikevel DNA integrering restriksjoner overkommes. I tillegg vil transformasjons frekvens variere avhengig av flere miljøfaktorer, noe som kompliserer vurderinger av slike hendelser i naturen [68].



Figur 1.17: HFIR hvor heterogent DNA adderes til resipientens kromosom. Homologt område fungerer som ett anker mens heterogent DNA adderes [73].



Figur 1.18 : Transformasjon med plasmider eller fritt DNA [74].



Tabell 1.4: Oversikt over naturlig kompetente bakterier fra ulike grupper bakterier og deres habitat.

[68]

Naturlige kompetente bakterier	Habitat
<i>Cyanobacterium</i>	Autotrofe bakterier, tilstede i vann
<i>Thermus spp</i>	Ekstremofile
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Jord, sedimenter
<i>Campylobacter spp</i>	Humanpatogen, vann, tarm hos skaldyr og fjærkre.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Humanpatogen, finnes normalflora, øvre luftveier.
<i>Helicobacter</i>	
<i>Neisseria spp</i> - <i>N.gonorrhoea</i> - <i>N.meningitidis</i>	Obligate humanpatogene (veneriske sykdommer, meningitt, sepsis.)
<i>Bacillus spp</i> - <i>B.subtilis</i> - <i>B.cereus</i>	Opportunistisk humanpatogen, naturlig habitat jord.
<i>Staphylococcus spp</i>	Humanpatogen, del av human normalflora.
<i>Streptococcus spp</i>	Humanpatogen, en del av den humane normalflora.
<i>Pseudomonas spp</i>	Opportunistisk humanpatogen, naturlig habitat jord og vann.
<i>Clostridium botulinum</i>	Humanpatogen, obligat anaerob (potent neurotoksin), naturlig habitat jord.

### 1.3.3 Barrierer for suksessfull HGO.

Barrierer for suksessfull HGO er knyttet til både miljøfaktorer og bakterienes egenskaper. Barrierer for opptak av nakent DNA fra miljøet ved transformasjon er knyttet til tilstedeværelse av nukleaser som bryter ned DNA, og mineraler som binder DNA og dermed hindrer opptak i resipient bakteriene. Overføring av konjugative plasmider kan hemmes av fysiske barrierer som hindrer donor og resipient i å komme i kontakt, eller av overflate eksklusjon hos resipientcellene. Andre barrierer for HGO er manglende etablering av overført DNA i resipientcellen på grunn av restriksjon og degradering, eller på grunn av problem knyttet til rekombinasjon og replikasjon [68]. Overlevelse og vedlikehold av nye gener i populasjonen, avhenger av nytteverdien de nye genene gir verten, da opptak av genetisk materiale er kostbart energimessing for verten. Seleksjon for nye

egenskaper er derfor avgjørende for utfallet av HGO. Nielsen et al (2001) hevdet at den største barrieren for transformasjon var etablering av de overførte genene i resipienten, men at utfallet av genoverføringen i stor grad ble bestemt av seleksjonspresset i miljøet der overføringen skjedde [75].

#### 1.3.4 Horisontal genoverføring fra GM planter til bakterier i jord.

Overføring av gener mellom planter og native jordbakterier er en omstridt sak. Den generelle oppfatningen er at frekvensen av horisontal genoverføring er liten mellom disse. Transformasjon er utpekt som den mest sannsynlige ruten for overføring. Dette forutsetter tilstedeværelse av fritt intakt DNA. DNA fra planter slipper ut ved degradering av plantevev. Nedbrytning på grunn av nukleaser vil begrense tilgjengeligheten og kvaliteten på denne DNA. DNA bundet til partikler i jord, f.eks. med høyt leire innhold, kan imidlertid beskytte DNA fra degradering. Undersøkelser viser at DNA kan være intakt alt fra dager, uker og år i ulike miljøer. Rekombinant DNA har blitt funnet i jord etter 2 år. Miljørisikoen knyttet til kontaminering med rekombinant DNA, avhenger av frekvens av overføring, seleksjonspress og etablering [7, 68, 72].

Tabell 1.5: Oversikt over tilstedeværelse av plante DNA med markørgenet *aph(3)-II* fra mikrokosmos og feltstudier.

DNA kilde/ påvisning metode	Tilstedeværelse av <i>aph(3)-II</i> i jord	Referanse
Transgene planter (sukkerert)DNA med <i>aph(3)-II</i> markørgener ved DNA ekstraksjon og PCR	3-6 mnd	[76]
Åker med transgene sukkerert planter, <i>aph(3)-II</i> gen. Utplating på selektivt agar medium etterfulgt av hybridisering med DNA prober for <i>aph(3)-II</i>	2 år	[76]
Poppeltre blader med <i>aph(3)-II</i> markørgen. (DNA ekstraksjon + PCR )	4 måneder	[76]

Etter transformasjon må integreres må DNA integreres på resipientens genom ved rekombinasjon for å etableres i resipienten. Ved homolog rekombinasjon forutsetter dette ett område på minimum 25 bp homologi mellom donor DNA og resipient DNA [66, 68]. DNA rekombinasjon er også mulig ved additiv integrering eller homology-facilitated illegitimate recombination (HFIR) figur 1.17. Her iverksetter homologe regioner en homolog rekombinasjon som videre fungerer som ett anker for integrering av heterogent DNA til resipientens kromosom. Hos *S.pneumonia* has slike additiv integrering blitt observert, hvor 200 bp homologi ved initiering, gav innsetning av >1000 bp heterogent DNA. Slik rekombinasjon mellom lineært DNA og kromosomalt DNA er sjeldnere enn ved homolog rekombinasjon. Det er imidlertid observert at forekomsten av HFIR er vesentlig høyere (1 % av transformanter) når DNA fragmentet har flanker med høy homologi med kromosomalt DNA. Denne mekanismen er blitt observert under transformasjon mellom bakterier og planter i jord og plantemiljøer og gjør det mulig for bakterier å ta opp DNA fra transgene planter. Homolog rekombinasjon vil kunne gjenopprette dysfunksjonelle gener, men bidrar ikke til addering av heterogent DNA. HFIR vil derimot kunne tilføre heterogent DNA og medføre endringer i resipienten. Siden markørgener har prokaryotisk opphav vil dette øke sjansen for homologi mellom markørgenene og gener på prokaryote genomer. Sannsynligheten for integrering er liten kun beregnet til  $10^{-17}$  og  $10^{-18}$ . Selv om dette er beregnet som en liten miljørisiko, påpeker Heinemann og Traavik (2004) at den beregnede risikoen for *S.pneumonia* resistensutvikling ved transformasjon heller ikke ble vurdert som en trussel på bakgrunn av tilsvarende beregninger, men er i dag ett økende problem [68, 73]. Ut i fra beregningene av transformasjon frekvens mellom GM planter og bakterier i jord vil dette utgjøre ca 4000 transformanter per kvadratmeter overflate jord og er et høyere antall transformanter enn det som er antatt å kunne utgjøre en trussel for miljøet. Hotspots for transformasjon av plante DNA til bakterier kan være i degradert løv i områder med økt temperatur og fuktighet. HGO fra en transgenetisk tobakkplante med *aadA* gen (aminoglykosid resistens) til *Acinetobacter baylyi* ble påvist, ved å visualisere uttrykt *aadA:gfp* i transformanter in

situ [77]. Flere transformasjons forsøk har blitt utført i et slikt miljø (hotspot), men med få positive resultater. Flere undersøkelser har blitt utført i laboratoriet ved å benytte jordbakterier med en delesjon i et antibiotikaresistensgen som resipienter (tabell 1.6) [76, 78]. DNA fra transgene planter med et funksjonelt resistensgen har vært brukt å vurdere om DNA kan overføres fra planter til jordbakterier bl.a. ved å bruke *Acinetobacter sp* og DNA fra transgene sukkerert planter (tabell 1.6). Det er antatt at overføring av DNA uten homologe sekvenser med resipientens genom vil være betydelig lavere enn når homologi er tilstede. Det er derfor mulig at deteksjons grense for genoverføring er så lav at slike hendelser ikke kan påvises i de studiene som er gjort. Mikrokosmos studier av denne typen er få og viser få hendelser men funn av hotspots øker sannsynligheten. Så langt har ikke naturlig transformasjon mellom transgene planter og jordbakterier blitt påvist i feltstudier hvor GMP dyrkes (tabell 1.6), men tilstedeværelse av DNA, resipienter og naturlig kompetente, åpner muligheten for genoverføring i disse miljøer. Biodiversiteten i jord er høy og mengden DNA i disse miljøene vil ytterligere øke HGO i slike hotspots.

Nylig viste studier stor likhet mellom resistensgener hos humanpatogene og jordbakterier. Dette viste at jord trolig kan være et reservoar for resistensgener og at nylige overføringer har funnet sted [79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87].

Tabell 1.6: Studier av overføring mellom transgene planter og resipient bakterier som normalt finnes i jord. Alle positive resultater er knyttet til gjenoppretting av resistens ved homolog rekombinasjon. Feltstudier med transgene planter i jord viser har hittil ikke vist positive resultater.

Plante materiale	Resipient bakterie	Overførings frekvens	Metode	Referanse
Potet og sukkererter/	<i>Acinetobacter sp</i> med delesjon i <i>aph(3)-II</i>	Ja / ( $5.4 \times 10^{-9}$ )	Plating på selektivt medium, gjenoppretting av resistens ved homolog rekombinasjon	[81]
Potet, tobakkplante og sukkererter.	<i>Acinetobacter sp</i>	Ja / ( $3.5 \times 10^{-8}$ )	Plating på selektivt medium, gjenoppretting av resistens ved homolog rekombinasjon	[61]
Sukkererter (steril jord mikrokosmos)	<i>Acinetobacter sp</i>	Ja / ( $1.4 \times 10^{-8}$ )	Plating på selektivt medium, gjenoppretting av resistens ved homolog rekombinasjon	[78]
DNA fra transgene mais planter	<i>Eschericia coli</i> (kunstig kompetente)	Nei	-	[82]
Transgen tobakk planter	-	Nei	Feltstudie (Frankrike) <i>aacI</i> gentamicin resistens. PCR og utplating på selektiv agar medium.	[84]
Transgene sukkererter	-	Nei	<i>aph(3)-II</i> overføring fra transgene planter til jord i feltstudie. PCR og utplating på selektivt agar medium.	[79]

## 1.4 Bruk av antibiotika og risiko for miljø og helse.

### 1.4.1 Antibiotika og seleksjonspress

Opptak av gener er en energibyrd for mikroben og genets overlevelse i populasjonen er ofte avhengig av seleksjonspress som finnes i det aktuelle miljøet. Med seleksjonspress menes fysiske, kjemiske eller biologiske forhold i miljøet som bidrar til at det nye genet gir en fordel til verten. Når det gjelder kjemiske seleksjonsfaktorer har utslipp av antibiotika, tungmetaller og andre desinfeksjonsmidler bidratt til en dramatisk økning av resistente bakterier [68, 88, 89]. Seleksjonspress fremmer betydningen av egenskaper som gjør at mikrober kan tilpasse seg og overleve under de rådende forhold i miljøet. For *aph(3)-II* vil forekomst av kanamycin/neomycin/streptomycin i miljøet selektive for mikrober med slike gener. Koseleksjon er

et fenomen hvor seleksjonspresset ikke direkte selekterer for et gitt gen (f.eks. *aph(3)-II*), men som følge av at det sitter på en genkassetter med flere gener, og hvor alle følger med hvis ett gen med en fordelaktig egenskap selekteres for.

Benyttelse av desinfeksjonsmidler i tekstiler, kosmetikk, vaksiner og husholdningsartikler har reist spørsmålet om disse kan føre til økt resistens hos patogene mikrober. Plasmider kan ha gener som gir resistens mot slike midler, f.eks. klorhexidin og triklosan som er et produkt som brukes bl.a. i tannkrem. En studie viser at triklosan kan skape et seleksjonspress for økt antibiotikaresistens [89]. J.D. van Elsas et al viste imidlertid i sitt studium av Tn5 seleksjon hos *Pseudomonas fluorescense* at tilsetningen av høye dose kanamycin (180 µg) og lav dose streptomycin hadde ingen effekt på antall Tn5 bærende isolater i ulike jordtyper. Høye doser streptomycin gav derimot økning av kanamycin resistente bakterier. Effekten ble forsterket av modifisert pH, tilsetning av CaCo<sub>3</sub> og næringsstoffer. Studier av Tn7 og streptothricin resistens vist at høye prosentandeler resistente bakterier kan opprettholdes til tross for manglende seleksjonspress [41]. Risikovurdering må derfor inkludere flere variabler enn tidligere antatt [90].

#### 1.4.2 Bruk og utslipp av antimikrobielle midler i det naturlige miljø.

Bruken av antibiotika har steget jevnt siden de ble tatt i bruk på 1940 tallet. Bruk av antibiotika har forårsaket problemer med resistente mikrober som flytter seg på tvers av landegrenser både som følge av immigrering, reise og import av varer. Internasjonale forbindelser gjør det umulig å isolere seg fra andre lands resistensproblemer og på verdensbasis er det registrert høy forekomst av resistens mot bredspektret antibiotika som ampicillin, ciprofloksasin og tetrasyklin. Tallet er høyeste i fattige land med dårlig hygieniske og sosialøkonomiske forhold [91, 92, 93].

I 1996 ble det brukt 10200 tonn antibiotiske midler i EU hvor hele 50 % ble brukt i veterinær medisin. Dette tallet steg til 13288 tonn i 1999 ifølge European federation of animal health

(FEDSA), hvor av 35 % ble brukt til veterinærmedisin og 65% til humanmedisin. Endringen i fordelingen skyldes trolig forbudet mot diverse vekstfremmende midler i dyrehold.

I USA er enda ca 70 % av konsumert antibiotika brukt i dyrehold og i 2011 ble det konsumert 214 895 kg aminoglykosider i USA til dyrehold. Tetrasykliner ble hyppigst brukt, totalt 5 642 573 kg [88, 94].

Benyttelse av antibiotika til husdyr og profylaktisk som tilskudd i dyremat og for å fremme vekst vil skape et seleksjonspress i mikrofloraene hos dyrene. Dette fører til økende antibiotikaresistens i tarmfloraen. I jordbruket benyttes dyrefeces som gjødsling av dyrkbare områder og dette kan bidra til at resistente bakterier spres i miljøet. Selv om det i mange tilfeller ikke opprettholdes en resistent mikroflora i miljøet, avhenger resistensgenenes skjebne av miljøets seleksjonspress, det mikrobielle samfunnets evne til HGO og om fenotypen kan beholdes stabil uten seleksjonspress [96].

Eksempler på resistensutvikling som følge av profylaktisk bruk av antibiotika er glykopeptid resistens hos enterokokker som følge av bruk av avoparcein i dyrefôr. Avoparcein er et glykopeptid antibiotika som ble tatt i bruk som vekstfremmende middel i dyrefôr i 1975.

I 1997 ble det brukt hele 80 000 kg avopacein i jordbruket i EU [88].

I Norge ble det for første gang tatt i bruk i 1986 i produksjon av kyllinger og kalkuner. Avoparcein tilhører samme antibiotika gruppen (glykopeptider) som vankomycin. I dag representerer dette middelet et ess i ermet mot stafylokokker og enterokokker som er blitt resistente mot ampicillin og aminoglykosider. Resistensen skyldes gener som f.eks. *vanA*, *vanB*, *van C*, *van D* og *van E*, hvor kun *van A* var lokalisert på et plasmid [32]. I Norge som i resten av Europa, ble det observert en dramatisk økning i VRE mellom 1980-2000 tallet. Studier fra samtlige land fant en sammenheng mellom avopacein bruk og resistensøkningen. Som følge av dette ble avopacein forbudt i Sverige (1986), Norge og Danmark (1995) og i EU (1997). Studier fra Danmark viste en nedgang i VRE hos fjærkre fra 80 % til 5 %, men hos griser forble VRE nivået på 20 % (1998). Tyske studier viste lignende resultater både hos fjærkre (100 % til 25 %) og hos friske mennesker (12 % til 3 %) [96]. I

Italia ble forekomsten av VRE i kjøtt fra fjærkre testet og forekomsten av VRE hadde sunket fra 18% til 8%. En studie fra Sverige i år 2000 viste en høy forekomst av VRE i 33 av 118 kloakk og vannprøver. Råkloakk hadde høyest antall positive prøver etterfulgt av effluent fra sykehus og behandlet kloakk. Resistensgenet som stod for 85 % av resistensen hos resistente enterokokker var *van A* som overføres via plasmider [96]. I Norge (1998) ble 147 gårder testet for VRE. Av disse var 73 eksponerte og 74 gårder var ikke eksponert for avoparcein [98]. Det finnes også indikasjoner på at *Van A* genet forekommer i miljøet selv uten seleksjonspress.

Hva som skjer med antimikrobielle midler i miljøet er et viktig spørsmål for å forstå utviklingen og spredning av resistens. Studier viser at flere essensielle grupper av antibiotiske midler har blitt funnet i medisinsk relevante konsentrasjoner i miljøet. Effekten på bakteriene avhenger av miljøbetingede forutsetninger som pH, mengde jord alkalier, temperatur og oksygenkonsentrasjon [68, 88].

I det naturlige miljø vil det på grunn av antibiotika produserende organismer alltid finnes små mengder antibiotika [78]. Den kraftige utviklingen av resistensgener, transposoner, plasmider og integroner er likevel vist å være sterkt knyttet til antibiotikabruk, hvor kontaminering fra sykehus, farmasøytiske fabrikker, kloakk og dyrefeces brukt som til gjødsel i jordbruket pekes på som primære kilder for antibiotika og resistente mikrober. Dette fordi de fleste multiresistente isolater er funnet i miljøer hvor denne typen kontaminasjon forekommer.

Hele 90 % av antibiotika skrives ut i primærhelsetjenesten, men den andelen som benyttes på sykehus er bredspektrede som vil gi en bred resistens mot viktige antibiotika.

I tillegg til å persistere i miljøet er mange antimikrobielle midler ikke fullt metabolisert etter utskillelse fra pasienten (tabell 1.7) [32].



Tabell: 1.7 Viser utskillelse av kjente mikrobielle midler i urin [32]

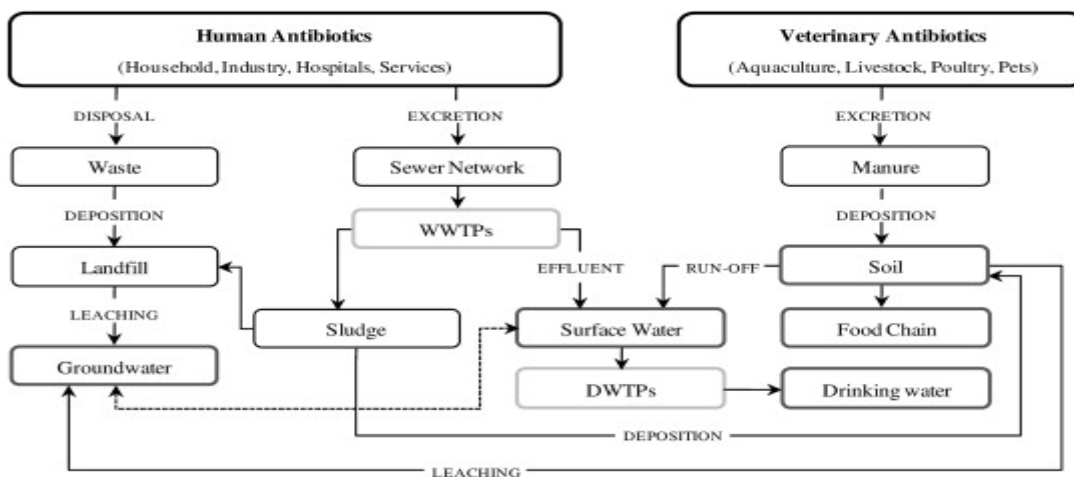
Antibiotikum	Utskillelse i urin % aktivt stoff av inntatt dose
Penicillin G	50-70
Ampicillin	70-90
Ceftazidim	90
Tetrasyklin	10-25
Erytromycin	2,5
Ciprofloksacin	35-40
Sulfametizol	90

Overvåkningsorganer i USA viste i 2011 stor variasjon hos ulike husdyr med hensyn til aminoglykosidresistens. Hos kylling og kalkun uttrykte 20-40 % av bakteriene kanamycin, gentamicin og streptomycin resistens, mens hos storfe og svin var kun 1,5% av bakteriene resistente. Dette kan tyde på at graden av kontaminering ved bruk av dyregjødsel vil avhenge av husdyrene i jordbruket [39].

Utslipp av antibiotika direkte til miljøet i form av avfall fra sykehus, produsenter av legemidler og kloakksystemer og har ikke blitt studert med tanke på hvilken skjebne disse restproduktene har på miljøet fauna, horisontal genoverføring og opprettholdelse av resistens i det aktuelle miljøet før de siste 20 årene. Utslipp av antibiotika fra farmasøytiske bedrifter i utlandet står for de mest alvorlige tilfellene av kontaminering. Manglende regulering og lover for denne industrien i land som India og Kina, hvor store deler av denne produksjonen foregår, skaper bekymring. I undersøkelse av elvevann tatt nedstrøms for renseanlegg som renser effluenter fra 90 farmasøytiske fabrikker i India, ble det påvist høye antibiotikakonsentrasjoner [99]. Høye nivåer av ciprofloksasin (31mg/L) som er et klinisk viktig antibiotikum ble funnet. Denne verdien overskrider den terapeutiske grensen hos mennesker. I samme studium ble det funnet aminoglykosid resistensgener *strA strB*, *aph(3)-Ib* og *aph(6)Id* opp mot 54 ganger høyere enn normalt. DNA ble isolert fra miljøprøvene og resistomet (summen av resistensgener og genetiske elementer med resistensgener) ble analysert ved hjelp av pyrosekvensering. Det ble i tillegg også funnet stort antall resistensgener, plasmider, transposoner

og introner samt transposaser som gjør transposering mulig. Det ble funnet resistensgener mot antibiotika som ikke kunne påvises i ellevannet. Dette kan tyde på koseleksjon f.eks. i sammenheng med genkassetter. Dette er den første dyrknings uavhengige studie av antibiotika kontaminerte områder, hvor både resistens og seleksjonspress ble vurdert. Studien viser at antibiotika øker seleksjon av resistente bakterier og øker frekvensen av horisontal genoverføring [99, 100].

En studie fra Tyskland viste at avfall fra ulike kilder kom ut i miljøet selv etter å ha gått gjennom et rensesanlegg. Dette gjaldt antibiotika så vel som andre kjemiske komponenter og kun få substanser ble brutt ned i det vannmiljøet. Studien viste at forekomst av Quinoloner i naturen var høy grunnet absorpsjon til partikler i kloakkslam, jord og sedimenter [88].



Figur 1.18: Utslipp av antibiotika i naturen kan komme fra flere kilder og gir et komplekst bilde av hvordan mulige kilder til seleksjonspress [88].

### 1.4.3 Antibiotikaforbruk og resistens i Norge

Sammen med Nederland, Sverige og Danmark har Norge hatt den laveste bruken av antibiotika i Europa og resistensforholdene i samtlige land er tilsvarende bruken. I Norge var den første bekymringen knyttet til en kort epidemi av meticillin resistente *S.aureus* på 1970 tallet og i 1975 ble MSIS (meldesystemet for infeksjonssykdommer) etablert. MSIS å kategorisere infeksjonssykdommer i grupper (A, B og C) etter trusselen de utgjør for allmennheten. Registreringen av forbruk av antibiotika basert på reseptarkiver har gjort det mulig å overvåke utviklingen av antibiotikabruk.. Resistensutviklingen og bevisstgjøring av allmennheten f.eks. gjennom debatter i oppdrettsnæringen og genmodifiserte organismer, har gitt opphav til overvåkingssystemer som NORM (1999) og faggrupper for resistensspørsmål (AFA). Den gunstige situasjonen i Norge er trolig knyttet til begrensingen av preparater på markedet, ved bruk av behovparagrafen, hvor Norge kunne avslå nye preparater hvis ikke gunstige fordeler og behov kunne dokumenteres. Behandling av søknader ble vurdert av en faggruppe av bakteriologer, leger og farmasøyter etablert i 1960 årene. Behovparagrafen falt bort som et ledd i EØS-avtalen i 1994 [91]

På bakgrunn av registre av resepter fra 1974-2007 ble det utarbeidet en oversikt over antibiotika trendene i Norge og i denne perioden ble en stigende trend funnet i de fleste aldersgrupper. Typen antibiotika som brukes har endret seg, men situasjonen er enda god fordi en høy andel smalspektret antibiotika brukes. Fenoxmetylpenicillin står fremdeles for den største andelen av foreskrevet antibiotika. Hele 90 % av antibiotika foreskrives i allmennpraksis, mens resistensproblemer og bruk av bredspektre preparater er knyttet til sykehus og institusjoner. Resistente tarmbakterier som *Shigella*, *Salmonella* og *Campylobacter* stammer som oftest fra utlandet, men kan spres i Norge etter import. *Klebsiella*, *Salmonella* og *Campylobacter* som hvert år rapporteres i MSIS som følge av smitte i utlandet. Flere sjeldne genotyper av disse bakteriene har blitt funnet etter slik smitte.

Dette gjelder også multiresistent tuberkulose (TB) fra Øst-Europa som er et stigende problem. Folkehelseinstituttet har nylig satt fokus på import av kjæledyr fra Syd-Europa som en kilde for resistente bakterier. Den generelle tanken er at ressurser er bedre brukt på forebygging enn brannslukking [ 91, 92, 93].

*Tabell 1.8: Resistens utbredelse i ulike regioner blant kliniske viktige humanpatogen bakterier.*

*Norge har en lav resistens sammenlignet med USA og øvrige land i Europa [32].*

Mikrobe	Antibiotikum	Prosent resistens		
		Norge	Europa	USA
E coli	Ampicillin/amoksicillin	20–25	40–45	40–45
	Tredjegerasjons kefalosporiner	3–5	3–5	2
	Aminoglykosider	0	3–5	3–5
Enterobacter	Tredjegerasjons kefalosporiner		25–30	25–30
Pseudomonas	Tredjegerasjons kefalosporiner		20	15–20
Enterokokker	Vankomycin	< 1	1	15–20
	Ampicillin	0–6	3–5	25–30
Koagulasenegative stafylokokker	Penicillin	85–90	85–90	85–90
	Meticillin	45–50	55–60	55–60
Gule stafylokokker	Penicillin	70–75	85–90	90
	Meticillin	0–3	20–25	25–30
Pneumokokker	Penicillin	1	30–50	40–45
Haemophilus influenzae	Ampicillin	0–5	30–35	10–15
Mycobacterium tuberculosis <sup>1</sup>	Rifampicin	3	0–16	10–13
	Multiresistens <sup>2</sup>	1–2	3–35	1–2
	Isoniazid	13	1–28	1,7

Resistensutviklingen i Skandinavia sees på som lav i forhold til resten av verden. Tabell 1.8 viser den tydelige forskjellen mellom Norge, USA og resten av Europa.

## 1.5 Risikovurdering ved bruk av *aph(3)-II* gener som markør i GMP.

Risikoen for resistensutvikling ved spredning av *aph(3)-II* genet er vurdert av EFSA, EU og av flere andre som liten. Evalueringen begrunnes av den lave observerte frekvensen av horisontal genoverføring, utbredelsen av kanamycin i miljøet og den lave betydningen av kanamycin i humanmedisin.

Likevel er det ingen som benekter muligheten for at gener fra GMP kan overføre gener til det naturlige mikrobielle miljøet. EFSA har på bakgrunn av denne problemstillingen rundt markører, sikkerhet og miljø, plassert ulike markører i grupper som henviser til deres risiko nivå.

- Gruppe 1: *npt II /aph(3)-II*= kanamycin/neomycin
- Gruppe 2: kloramfenikol, ampicillin, streptomycin og spectinomycin.
- Gruppe 3: Amikacin og tetrasyklin. [30]

Ampicillin har høy terapeutisk betydning i Norge med en resistens på 20-25 % blant *E.coli* isolater, mens det i Europa er observert 40-45 % resistens (tabell 1.8) [32]. I Norsk perspektiv ville plassering av ampicillin i gruppe 3 vært mer i takt med den nasjonale situasjonen. Da dette er et klinisk viktigere antibiotikum. Amikacin er ikke i bruk i Norge og en høy prosent av kliniske isolater av *K.pneumonia* og *E.coli* som uttrykte aminoglykosidresistens var følsomme for amikacin. Det viser seg også at amikacin i svært liten grad er påvirket av aminoglykosid hemmende enzymer. Fenotypisk resistens for kanamycin finnes i de fleste miljøer, men i prosentandel finnes det regionale og nasjonale forskjeller. En dansk undersøkelse ble utbredelsen av kanamycin resistens kartlagt for den opportunistisk patogene bakterien *Enterococcus faecalis* hos mennesker, broilere og griser. I denne studien viste det seg at 10-20 % av isolatene hadde betydelig kanamycin resistens.

Undersøkelser av danske *E.coli* isolater viste at 1-6 % var kanamycin resistente mens kun 0,5-1 % av de norske *E.coli* isolatene var resistente.

Undersøkelser av bakterier fra blodkulturer viste en meget lav frekvens av aminoglykosidresistens hos ellers meget resistente bakterier som *Streptococcus epidermidis*. Direkte undersøkelser av forekomst og utbredelse av *aph(3)-II* genen er ikke utført i Norge, men den lave observerte fenotypiske resistensen indikerer at forekomsten er lav [86].

I følge flere kilder er *aph(3)-II* utbredt i miljøet og resistensen mot kanamycin generelt høyt 20-40% [31]. Undersøkelser fra Nederland, Tyskland og Skandinavia viser imidlertid lavere fenotypisk kanamycin resistens. I ett studium av 274 *Campylobacter jejuni* isolater fra ville fugler i Sverige uttrykte ingen neomycin resistens. Studier av jord prøver viste at det var  $10^5$  kanamycin resistente bakterier per gram jord (tørrvekt), men dette utgjør dette en liten prosent av den totale dyrkbare bakterie populasjonen i jord [86, 87]. Dette setter spørsmålsteget ved argumentet for utbredelsen av kanamycin resistens. Risikovurdering av *aph(3)-II* gener som markør i GMP, bygger også på at den naturlige forekomsten av dette genet er høy, dette til tross for at få studier er utført. Studier fra Tyskland og Nederland viste en lav forekomst av *aph(3)-II* gener i kloakk og grisegjødsel. En studie av 4 jordprøver tatt fra ulike områder fra gårder i Tyskland viste tilstedeværelse av *aph(3)-II* genen i alle prøvene. Undersøkelsen ble utført med PCR på ekstrahert DNA og konsentrasjonen av *aph(3)-II* varierte mellom  $2 \cdot 10^5$  og  $3 \cdot 10^8$  molekyler /gram jord (tørrvekt) [86, 101]. Upubliserte undersøkelser utført av Norsk veterinærinstitutt i 2003-2004, av 60 importerte fôr prøver, viste at 5 % var positive for *aph(3)-II* genfragmenter. Disse prøvene var også positive for flere andre resistens gener [86].

På bakgrunn av frykten for inntak av APH(3)-II enzymet og mulige ugunstige effekter in vivo, ble enzymet utsatt for et miljø in vitro som simulerer forholdene i magesekken og tarm. Resultatet viste en rask degradering av APH(3)-II/NPT-II enzymet [102]. Overføring av intakte *aph(3)-II* gener fra GMO via mat er også en bakgrunn for skepsis. En studie viste at inntak av en GMO tomat med

kanamycin resistens, kunne inhibere effekten av kanamycin behandling in vivo [6]. Hvis intakte markørgener fra bakterier inntatt via matvarer eller fritt DNA fra GMO ikke blir nedbrutt i tarm vil i teorien kunne føre til transformasjon til mikrober i normalfloraen [68, 92].

Selv om HGO har blitt vurdert som mindre sannsynlig, har bruk av markører som koder for resistens for klinisk viktige antimikrobielle midler som tetrasyklin og ampicillin blitt forbudt i flere land. Det vitenskapelige grunnlaget for å vurdere denne risikoen er begrenset og ny forskning viser til at HGO kanskje er høyere enn in vivo en i de matematiske beregningene indikerer.

Det argumenteres også ved at verken neomycin eller kanamycin er et viktig antibiotikum i følge WHO [36, 102]. Bruk av aminoglykosider blir i større grad byttet ut pga fare for skader på nyrer og indre øre [31].

Studier viser at kanamycin resistens er utbredt i alle miljøer både i Norge og på verdensbasis, men prosentandelen av resistente bakterier i disse miljøene er varierende og Norge, Norden og Nederland har lavest prosentandel resistente bakterier [86, 102].

Kanamycin er ikke en del av det godkjente Norske antibiotika arsenalet, men brukes ved behandling av multiresistent tuberkulose [32, 93].

Denne sykdommen var utbredt frem til 1970 tallet og tar på verdensbasis flest liv av de bakterielle sykdommene. Selv om sykdommen er mest utbredt i fattige samfunn med begrensede behandling tilbud og hygiene, er sykdommen er på fremmarsj også i Europa. Innvandring fra Øst Europa og Afrika fører med seg en større utfordring på disse områdene også i Norge. Forekomst av multiresistent tuberkulose er forhøyet og krever i mange tilfeller et bredt utvalg av alternativ antibiotika inkludert kanamycin. Dette tyder på at betydning av aminoglykosidet kan være økende, noe som vektlegges i den norske risikovurderingen av GMO [92, 93].

## 1.6 Målsetninger for masteroppgaven

Hensikten med studiet er å undersøke utbredelsen av *aph(3)-II* genet i naturlige miljøer i Norge. Vurderinger av miljøkonsekvenser ved bruk av GMO med *aph(3)-II* gener, er gjort på grunnlag av høy forekomst av fenotypisk kanamycin resistens i miljøet og liten bruk av kanamycin i terapeutisk sammenheng. Vurdering av dette i Norge bør gjøres med Norges resistenssituasjon lagt til grunn. Det er tidligere funnet lav forekomst av *aph(3)-II* genet i Europa og hypotesen er at tilsvarende forekomsten i Norge trolig er lav på grunn av generell lav resistens mot samtlige antibiotika grupper. Kartlegging av *aph(3)-II* utbredelse i ulike miljøer vil kunne gi et bedre grunnlag for nasjonale vurderinger av GMO markører. Delmål for oppgaven er som følgende.

1. Undersøke kimtallet til kanamycin resistente bakterier i jord og dyrefeces.
2. Undersøke forekomst av *aph(3)-II* i prøver fra naturlige miljøer som skogsområder og åkerjord.
3. Vurdere utbredelsen av *aph(3)-II* genene i isolater fra dyr og fra kliniske isolater fra mennesker.
4. Undersøke kanamycin resistente isolater for andre klinisk viktige resistensgener som *aac(3)-IIa/c*, *acc(6)-Ib-cr*, *aph(3)-I*.
5. Isolere plasmider fra kanamycin resistente bakterieisolater og bruke disse til transformasjonsforsøk.



## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 Innhenting av prøvemateriale

I denne undersøkelsen ble det innhentet prøvemateriale fra dyr og jord i tillegg til humant prøvemateriale. Prøvemateriale ble innhentet fra 2 lokaliteter på Sørlandet og 3 i Bergens regionen. Jord fra dyrket mark og beitemark ble innhentet fra Farsund kommune i Vest- Agder mens jord fra skogsområder ble hentet i Arna bydel Bergen. Jordprøvene fra dyrket mark ble tatt fra øvre lag av nylig pløyd jord en måned etter fertilisering med dyregjødsel. Beitemark ble periodevis brukt som beite for sauer. Det ble tatt jordprøver på ca 50 gram fra det øverste 10 cm av jorden fra alle lokaliteter. Totalt ble det ble tatt 10 prøver fra åker, 9 prøver fra beitemark, 5 prøver fra granskogområde og 4 prøver fra løvskogområde. Hver prøve ble oppbevart kjølig i 50 ml sentrifugerør under transport til laboratoriet. Prøver til DNA ekstraksjon ble oppbevart i – 80 °C frys. Prøver til dyrkning ble oppbevart i kjøleskapet over natt ved 4 °C.

Fekalt prøvemateriale fra kalv, ku og sauer ble innhentet fra Stend jordbruksskole i Bergen.

Fecesprøver fra Stend ble tatt fra fjøset på nukleasefrie/sterile rør. Samleprøver ble tatt fra felles område med unntak av en prøve som ble tatt fra dyr som i løpet det siste året hadde gjennomgått en antibiotikakur. Totalt ble det tatt 24 samleprøver fordelt på ku (9) kalv (5) og sau (10). Det var ikke muligheter å få ta tatt prøver av samlebeholder som benyttes til fertilisering av åkrene. Prøvene ble fraktet kjølig til laboratoriet og satt i kjøleskap (dyrkning) og frys (DNA ekstraksjon). Prøvene fra fekal prøvemateriale ble behandlet innen 24 timer.

DNA fra bakterieisolater fra blodkulturer, puss og urinveisinfeksjoner hos mennesker ble supplert av Cristoffer Lindemann ved Haukeland universitetssykehus. Bakterieisolatene var tidligere brukt i en undersøkelse av aminoglykosidresistens gener for gentamicin (*aac(3)-IIa/c*, *aac(6)-Ib*) hvor isolatene ble identifisert ved biokjemiske API tester fra mikrobiologisk laboratorie ved Haukeland universitetssykehus. Disse bakterier var blitt dyrket i renkultur og lyst ved koking, løst i vann og

oppbevart ved – 80 °C [44].

## 2.2 Bakterie dyrkning og kimtallsbestemmelse

Dyrkning av bakterier ble kun gjort under aerobe forhold.

Fekalt prøvemateriale ble sådd ut på R2A og TSA (trypton soya agar) medium med 25µg/ml kanamycin for å påvise kanamycin resistente bakterier. Det ble i tillegg sådd ut paralleller uten kanamycin for å kunne vurdere prosentandelen av resistens og kimtall. Tidligere studier har brukt konsentrasjoner fra 10µg/ml - 100µg/ml kanamycin. Dyrkning av jordbakterier ble utført på tilsvarende måte, men kun på R2A agar medium. Ved primær dyrkning ble det i mine undersøkelser benyttet en lav konsentrasjon, da enkelte bakterier med *aph(3)-II* har en lavgradig kromosomal resistens, eller lavt uttrykk av resistensgener.

Jordprøvene ble fortynnet ved at 0,5 gram jord ble blandet med 1 ml fysiologisk saltvann (0,9% NaCl) i 2 ml eppendorfrør og homogenisert ved bruk av vortex mikser. Det ble laget fortynningsrekke fra 1:10 til 1:10 0000 i 0,9 % NaCl. 100µl av homogenisert materiale ble overført til eppendorfrør med 900µl av 0,9 % NaCl og videre fortynnet i 10X fortynning. For hver fortynning ble det benyttet 2 R2A agarskåler med kanamycin og 2 R2A agarskåler uten kanamycin ved å så ut 100µl med steril bakterieøse. Inkubasjon av agarskåler ble utført to inkubasjons temperaturer henholdsvis 26 °C og 37 °C. For kimtallsbestemmelse ble antall kolonier talt etter 5 dager på skåler uten kanamycin. På skåler med kanamycin ble antall kolonier talt etter 3-7 dagers inkubasjon. Kolonier som vokste på kanamycin skåler ved 26 °C ble platet om og dyrket ved 37 °C. Dette for å se om bakteriene var reelle resistente eller om veksten kom som følge av redusert antimikrobiell effekt av kanamycin ved 26 °C, for bakterier som ikke vokste ved 37 °C kunne ikke dette bestemmes.

Kanamycin resistente kolonier ble plukket med steril bakterieøse og sådd ut på R2A agar og dyrket ved 37 °C for å få renkultur av isolatene.

Fecesprøver ble fortynnet ved å tilsette 0,5 gram feces til 1 ml 0,9 % NaCl og homogenisere ved

bruk av vortex mikser. Fortynninger ble laget som nevnt for jordprøvene og 100µl ble sådd ut på R2A og TSA medium med og uten kanamycin og dyrket ved 37 °C. Kanamycin resistente kolonier ble plukket med steril bakterieøse og rendyrket på TSA agar med 25µg/ml kanamycin. Enkelt kolonier fra renkulturer fra fecesprøver ble i tillegg dyrket på ulike konsentrasjoner av kanamycin, 25µg/ml, 50µg/ml og 100µg/ml i tillegg til skål med 25µg/ml kanamycin + 32µg/ml med vankomycin og inkubert ved 37 °C. Vankomycin er virksom mot G+ bakterier mens de fleste G- er resistente. Vankomycin ble derfor brukt for å få en indikasjon av fordelingen mellom G+ og G- bakterier. Kimtallet ble beregnet ved å telle antallet kolonier på agarskåler og gange tallet med fortynningsfaktoren. Deretter ble antall bakterier per gram jord og feces beregnet ut i fra hvor mye materiale som ble brukt da den laveste fortynningen ble laget.

### **2.3 DNA ekstraksjon**

DNA ble ekstrahert direkte fra de rendyrkede bakterieisolatene og direkte fra jordprøvene. DNA ble utvunnet fra renkulturer av bakterier dyrket på R2A (jord) og TSA(feces). Kolonier ble plukket med en steril bakterieøse og slemmet opp i 400µl TE buffer i 1,5 ml eppendorfrør. Lyse av bakterier ble utført ved koking i 10 minutter fulgt av plassering på is. Cellerester ble sentrifugert ned ved 5000 X g i 15 min og supernatanten ble benyttet til PCR analyser.

DNA fra bakterieisolatene fra humant prøvemateriale var ekstrahert på forhånd, ved å slemme opp celler fra 13 kolonier, dyrket over natten på agar medium, i 400µl nukleasefritt vann etterfulgt av koking i 10 min, og fjerning av cellerester ved sentrifugering som beskrevet over [45].

DNA ble ekstrahert fra alle jordprøver ved hjelp av et kommersielt kit, FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biochemicals). Produsentens protokoll ble i hovedsak fulgt, men de ulike jordprøvene hadde ulik konsistens og vanninnhold derfor ble volumet av innveid materiale justert for å hindre overfylling av røret. Prøver fra beitemark var særlig kompakt og det kunne ikke benyttes mer enn 300 mg jord, da dette resulterte med en overmetning av kolonnen. Det måtte også benyttes 5 min

sentrifugering istedenfor 1 minutt i vasketrinn og eluering. Skog og åker prøver hadde en lettere konsistens og det ble benyttet 500 mg til ekstraksjon som anbefalt av produsent. Ingen tetning eller eluerings problemer ble observert i prøvene fra skog og åker.

Etter homogeniseringen av prøvene og lysis av bakteriene ble DNA rensset for PCR inhibitorer i en silicamatriks kolonne som binder DNA mens forurensningene ble vasket ut. DNA ble deretter eluert fra kolonnen med DNase-fritt vann.

Total DNA fra fecesprøver ble ekstrahert ved bruk av samme kit som for jord. Det ble benyttet 500 mg feces, ellers ble prøvene behandlet på samme måte som jordprøvene. Ekstrahert DNA ble kvantifisert på Nanoview (GE healthcare).

Det ekstraherte DNA ble oppbevart ved -20 °C i påvente av analysering.

#### **2.4 Påvisning av aminoglykosid resistensgener.**

I det naturlige miljø f.eks. jord er biodiversiteten høy, samtidig som kun en minimal andel av mikroorganismene lar seg kultivere (0,1-2 %) [32]. DNA direkte ekstrahert fra jord ble derfor undersøkt for kanamycin resistensgener ved hjelp av polymerase chain reaction (PCR). Slike analyser fanger opp mulige resistensgener også hos bakteriearter som ikke lar seg dyrke under laboratorieforhold.

Tabell 2.1: Primer sekvenser benyttet ved PCR amplifisering i denne oppgaven.

Mål gen	Annealing temperatur °C	Amplikon størrelse i basepar	Primersekvenser	Referanse
<i>aph(3)-II</i>	55	550 bp	F GTGCCCTGAATGAACTG R TAGCCAACGCTATGTCCT	[41]
<i>aac(3)-I a/c</i>	58	370 Bp	F TGAAACGCTGACGGAGCCT R GTCGAACAGGTAGCACTGAG	[45]
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	58	63 bp	F CCGACACTTGCTGACGTACAG R TGACGGACTCTTGCGCTAAA	[45]
<i>16S rRNA</i>	55	1400 bp	R TACGGYTACCTTGTTACGCCTT F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	-
<i>aph(3)-I</i>	57	470 Bp	F GGCAAGATCCTGGTATCGGTCT R AGACTAAACTGGCTGACGGCAT	[88]

#### 2.4.1 Undersøkelse av *aph(3)-II* gener i DNA ekstrahert fra jord.

Ved kun å undersøke dyrkede bakteriestammer i laboratoriet, kan vi ikke konkludere med at det genetiske materialet ikke finnes i miljøet. Ekstrahert DNA fra ekstraksjon ble derfor undersøkt med PCR-analyse med spesifikke primere for *aph(3)-II* genet (tabell 2.1). Primersekvensene i denne undersøkelsen ble benyttet av Smalla et al i en lignende undersøkelse av forekomst av *aph(3)-II* genet i miljøprøver fra Tyskland og Nederland i 1993. PCR betingelser ble valgt på bakgrunn av denne studien [41]. Øvrige PCR reagenser ble brukt etter anvisning fra leverandør. I PCR reaksjonen ble det per reaksjon benyttet 1µl templat, 12,5µl GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega), 1µl F primer (10µM), 1µl R primer (10µM), 9,5µl PCR vann til et reaksjonsvolum på totalt 25µl (tabell). GoTaq Hot Start Green Master Mix er en ferdig blandet master mix som inneholder MgCl, nukleotider (dNTP), DNA-polymerase enzym og loadingbuffer til elektroforese. PCR reaksjonen ble utført på GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) med et program som er vist i tabell 2.2. Positiv kontroll og negativ kontroll ble benyttet i hver PCR reaksjonsoppsett. PCR-vann ble benyttet som negativ kontroll og positiv kontroll var et *aph(3)-II* holdig plasmid pcDNA 3.1 HisB

(Invitrogen). Test av primere ble utført innledningsvis ved bruk av plasmidet pcDNA 3.1 HisB

(Invitrogen). Kontrollen gav fine bånd på 1 % agarosegel i forventet størrelse på ca 550 base par (bp).

Tabell 2.2: PCR program for analysering av *aph(3)-II* og brukte primersekvenser.

PCR forhold	Temperatur /tid	Antall sykluser
Denaturering (aktivering av polymerase)	95 °C 2:00 min	1 hold
Denaturering	95 °C 0:30 min	} 34 sykluser
Annealing	55 °C 0:30 min	
Elongation	72 °C 1:00 min	
Hold	4 °C	∞

#### 2.4.2 Undersøkelse av *aph(3)-II* gener i bakterieisolater.

Bakterieisolater fra dyrefeces og jordprøver ble tilfeldig plukket fra TSA medie med 25µl /ml kanamycin. For jordprøvene ble 50 isolater analysert med PCR på samme måte som fra DNA ekstrahert direkte fra jord (tabell 2.2 ).

Fecesprøvene ble inndelt i tre grupper ku, kalv og sau. Det ble plukket ca 50 isolater fra hver gruppe og PCR amplifikasjonen ble utført ved likt program som for ekstrahert DNA (tabell 2.2).

Reaksjons blanding bestod av 12,5µl, GoTaq Hot Start Green Master Mix, 5,5µl PCR vann, 1µl F primer (10µM), og 1µl R primer (10µM), og 5µl DNA templat. I hver analyse ble det benyttet plasmid med *aph(3)-II* gen som positiv kontroll og PCR vann som negativ kontroll.

Undersøkelse av *aph(3)-II* forekomst ble også utført på DNA fra 154 isolater av *Klebsiella sp* og *E.coli*, fra blodkulturer, urin og pussprøver fra mennesker. Undersøkelsen for forekomst av *aph(3)-II* ble utført på samme måte som beskrevet for miljøprøver (tabell 2.2)

### 2.4.3 Undersøkelse av andre aminoglykosidresistens gener, *aph(3)-I*, *aac(3)-IIa/c* og *aac(6)-Ib-Cr* i bakterieisolater fra dyrefeces og jord.

Analyse av *aph(3)-I*, *aac(3)-IIa/c* og *aac(6)-Ib-cr*, ble utført på tilfeldig plukkede isolater fra hver prøvegruppe, med unntak av humane prøver, hvor *aac(3)* og *aac(6)* allerede var undersøkt [45]. I alt ble det undersøkt for *aph(3)-I*, *aac(3)-IIa/c* og *aac(6)-Ib-cr*, hos 25 isolater fra ku, hvor *aph(3)-II* positive ble inkludert. Fra sau og kalv ble 20 isolater undersøkt for *aac(3)-IIa/c* og *aac(6)-Ib-cr* genene, men da *aph(3)-I* skulle analyseres var noen av prøvene forsvunnet. Dette medførte at kun 15 isolater fra kalv og 17 fra sau ble undersøkt for *aph(3)-I*. Disse genene er av klinisk relevans er av høy klinisk relevans i forhold til aminoglykosider og ble derfor inkludert. I undersøkelsen. *aac(6)-Ib-cr* ble inkludert som et tillegg studie for å se på utbredelsen blant ikke humane kilder. *aac(6)-Ib-Cr* er en mutant av *aac(6)-Ib* som i tillegg gir resistens for ciprofloksasin. PCR reaksjonen ble utført på GeneAmp 9700 (Applied Biosystems), reaksjonsblandingen bestod av 12,5µl GoTaq Hot Start Master Mix, 1µl F primer (10µM), 1µl R primer (10µM), 5µl prøve, 5,5µl PCR vann, totalvolum 25µl. Annealing temperatur og PCR innstillinger vises i tabell 2.1, øvrige innstillinger var som for *aph(3)-II* (tab 2.2). Annealing temperatur for primer og primersekvenser for amplifisering av *aac(3)-IIa/c* og *aac(6)-Ib-cr* ble hentet fra Lindemann et al [45] og er vist i tabell 2.1.

### 2.5 Isolering av plasmider fra kanamycin resistente bakterieisolater.

Bakterierkolonier ble plukket fra ferske renkulturer dyrket på TSA + 25µg/ml kanamycin plater. Overnattkulturer ble dyrket i 2 ml LB medium tilsatt 25µg/ml (50µg) kanamycin i 50 ml Falconrør. Bakteriene ble tilsatt med en steril bakterieøse til 50 ml røret med LB medie og inkubert ved rysting (200 rpm) ved 37°C i 14 timer. Isolering av plasmider ble utført på 20 tilfeldig plukket bakterieisolater dyrket fra fra fecesprøver. Qiagen Fast Miniprep ble benyttet etter prosedyren fra

produsenten. Det ble benyttet en 1-15 kb stige under gelelektroforesen (lineær DNA stige BioRad) for å gi en indikasjon på størrelsen på plasmidene.

## 2.6 Agarose gelelektroforese.

Agarose gelelektroforese ble benyttet til å verifisere at DNA ekstraksjonen fra jordprøver og bakterieisolatene var vellykket, for å visualisere PCR resultater og for å se hvorvidt de amplifiserte PCR produktene hadde riktig størrelse. Agarose gelelektroforese ble også benyttet for å vise om utvalgte aminoglykosidresistente bakterieisolater hadde plasmider og for å gi en indikasjon på deres størrelse.

Ekstrahert DNA ble visualisert ved elektroforese i 1% agarose (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) i 0,5 X Tris-Borat-EDTA buffer(TBE) tilsatt 1µl GelRed (Invitrogen). Elektroforesen ble utført i Wide mini-subcell GT (BIORAD) ved 80V i 60 min. PCR produkter fra *aac(3)-II* (370 bp), *aph(3)-I* (470 bp) og *aph(3)-II* (550 bp) ble visualisert på 1,5 % agarose gel i 0,5 X TBE buffer.

Elektroforesen ble utført i Sub-cell GT agarose gelelektroforese system (BIORAD) ved 80V i 90 min.

GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega) inneholdt gel loading buffer og 5µl av PCR produktet ble direkte satt i gel brønnene uten noe mer behandling. Det ble benyttet en 100 bp DNA stige (Invitrogen) for å beregne størrelsen på PCR produktene.

PCR produkt fra *aac(6)-Ib-Cr* (61) ble visualisert ved elektroforese i 3% agarose gel ved 80 V i 120 min. Grunnet den lille størrelsen på PCR produktet, (kun 61 bp) ble det benyttet en DNA stige på 50 bp (Invitrogen). Ellers var preparering av prøvene den samme som for de øvrige.

PCR produkt fra 16S rRNA amplifiseringen ble visualisert på 1,5 % agarose gelelektroforese (Sub-cell GT medium, BioRad) ved 70V i 120 min.

Visualisering av plasmider ble utført ved horisontal gel elektroforese (sub-cell GT BioRad) med 0,5 % agarose gel i TBE buffer tilsatt Gel Red (Invitrogen). Elektroforesen ble kjørt ved 80 V i 120



minutter ved romtemperatur.

Visualisering av PCR produkter på gel ble utført under Ultrafiolett lys (UVI Pro Chemi) og printet ut (Mitsubishi p91 fotoskriver)

## **2.7 Transformasjon av kompetente celler.**

Transformasjonsforsøk ble utført ved å benytte isolerte plasmid DNA sammen med kommersielle kompetente celler (One Shot TOP 10 fra Invitrogen). Transformasjon ble utført etter prosedyre protokoll fra produsent. Det ble bruk 7 plasmider i transformasjons forsøk. Plasmidene ble tilsatt rør med kjemiske kompetente celler, satt på is i 30 min og deretter gitt et hetsjokk ved 42 °C for å få de kompetente cellene til å ta opp DNA. Revitalisering og uttrykk av overførte gener ble gjort ved å tilsette S.O. C medium til cellene fulgt av inkubering ved 37 °C i 1 time ved rysting (200 rpm).

Etter anbefaling fra produsent ble cellene sådd ut på selektivt medium (25µg/ml kanamycin) med to ulike volum (10µl og 50µl). Agar platene ble inkubert overnatt ved 37 °C i aerob atmosfære.

## **2.8 16S rRNA PCR reaksjon, rensing av av PCR produkt og identifisering av bakterieisolater ved sekvensering av 16S rRNA gener.**

Kanamycin resistente bakterier med forskjellige kolonimorfologi ble plukket fra agar medium med kanamycin. Fekale bakterieisolater ble tatt fra TSA agar medium mens jordbakterier ble tatt fra R2A agar medium.

Bakterieisolater ble plukket fra fecesprøver fra kalv, ku og sau i tillegg til jordbakterier fra beitemark, åker, granskog og løvskog prøver. Det ble plukket 20 bakterieisolater fra hver gruppe, 20 fra sau, 20 fra ku, 20 fra kalv, og 20 fra jord. I tillegg ble de *aph(3)-II* positive isolatene identifisert. Dette gav et totalt antall på 86 bakterieisolater til 16S rRNA PCR reaksjon. Isolatene fra ku, kalv og sau ble valgt blant de bakterieisolatene som var blitt testet for *aph(3)-II*, *aph(3)-I*, *aac(3)-IIa/c* og

*aac(6)-Ib-Cr*.

DNA benyttet som templat for 16S rRNA PCR reaksjon var DNA hentet ut fra isolater ved koking. PCR reaksjon ble utført på GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) ved å bruke 12,5µl GoTaq Green Master Mix, 5,5µl nukleasefritt vann, 1µl F primer (10µM), 1µl R primer (10µM), og 5µl DNA templat.

Totalt 53 16S rRNA PCR produkter ble valgt ut hvorav 10 bakterieisolatene var fra hver dyregruppe, 19 bakterieisolatene fra jord og 4 isolater som var positive for *aph(3)-II*. Utvalget ble gjort fordi det i denne undersøkelsen ikke var ressurser til å sekvensere alle bakterieisolatene.

PCR produktene ble rensset før sekvenseringsreaksjon ved å benytte Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) som inneholder paramagnetiske kuler. PCR produkt ble rensset i 1,5 ml eppendorfrør ved å tilsette 20µl DNA fra PCR reaksjonen til røret og deretter tilsette 36µl Agencourt AMPure XP reagens som inneholder optimaliserings buffer og magnetiske kuler.

Forholdene i reaksjonen ble utført etter anbefalinger fra produsent. Primere og andre urenheter ble vasket ut ved hjelp av 70 % etanol (fersk preparert i nukleasefritt vann). Separeringen ble utført ved å sette eppendorfrøret med reagensene mot en magnet, slik at magnetiske kuler med bundet DNA ble konsentrert opp mot siden av røret. Reagensene i røret ble da enkelt fjernet uten å miste kulene. Etter rensing med etanol ble DNA eluert i nukleasefritt vann (Sigma-Aldrich).

Renset PCR produkt ble brukt som templat i sekvenseringsreaksjon.

Sekvenseringsreaksjon ble utført på GeneAmp 9700, ramspeed 9600, 1 min ved 96 °C, fulgt av 25 sykluser med 10 sek ved 96 °C, 5 sek ved 55 °C og 4 min ved 60 °C. Reaksjonsblanding bestående av 8µl terminator ready mix (BigDye 1.1 Cycle Sequencing kit Applied Biosystems), 2µl DNA templat, 1µl primer (10µM), og 7µl PCR vann til total reaksjonsvolum på 20µl.

PCR produkter fra sekvenseringsreaksjonen ble sendt til avdeling for medisinsk genetikkk ved Haukeland universitetssykehus hvor sekvenseringen ble utført ved bruk av ABI 3730 (Applied Biosystems). Kromatogrammet for hvert enkelt produkt ble vurdert for å avdekke doble sekvenser,

manglende identifisering av deler av sekvensen og øvrig kvalitets problemer. Etter kontroll av kromatogrammet ble sekvensene brukt i søk i BLAST ([blast.ncbi.nlm.gov/BLAST.cgi](http://blast.ncbi.nlm.gov/BLAST.cgi)) for å bestemme identiteten til bakterieisolatene. Det ble søkt etter MAX identitet likhet i databasen for 16S rRNA (Genebank).

### 3. RESULTATER

#### 3.1 Dyrkning av bakterier

##### 3.1.1 Dyrkning og kimtallsbestemmelse på media med og uten kanamycin

Bakteriene ble dyrket på R2A agar og deretter rendyrket på TSA (fecesprøver) og R2A (jordprøver).

Resultatene fra kimtallsbestemmelsen og kanamycin resistens fra jordprøver er presentert i tabell

3.1. Tabellen viser at de generelle kimtallene på medium uten kanamycin varierte mest i skogsjord ( $4 \cdot 10^4$  -  $3,5 \cdot 10^6$  cfu/g). I de fleste tilfellene gav inkubasjon ved 26 °C høyere antall kanamycin resistente enn ved 37°. For løvskog prøve 3 var det hele 75 ganger forskjell, men kimtallet ved 37 °C for prøven lå ca. 10 ganger lavere enn for de andre løvskogprøvene. Jord fra beitemark hadde høyest kimtall ( $7,6 \cdot 10^5$  -  $3,0 \cdot 10^7$  cfu/g), og i motsetning til skogjord var kimtallene 2-40 ganger høyere ved 37°C enn ved 26 °C. Kimtallene for åkerjord varierte ( $1,1 \cdot 10^5$  –  $1,6 \cdot 10^6$  cfu/g) og det var ingen tydelig forskjell mellom inkubasjon ved 26°C og 37°C

Kimtallene på medium med kanamycin lå mellom  $2 \cdot 10^2$  og  $3,3 \cdot 10^4$  cfu/g, med unntak av løvskog prøve 1 inkubert ved 26 °C, som hadde et kimtall på  $1,5 \cdot 10^5$  cfu/g. Bortsett fra åker prøve 1 og prøve 3, hvor kimtallene var 10 - 100 ganger høyere ved 26°C enn ved 37°C. For prøven fra løvskog 1 var kimtallet 241 ganger høyere ved 26°C enn ved 37°C. Tabell 3.1 viser at prosentandelen kanamycin resistente bakterier i jord var liten, men det kunne være store variasjoner mellom prøver fra samme miljø. I de fleste tilfeller lå prosentandelen resistente bakterier mellom 0,01% (beitemark) og 1,85% (løvskog), med to ekstreme unntak på 6,82% i løvskog og 7,14% i åkerjord. I overensstemmelse med kimtallene var prosentandelen av kanamycin resistente bakterier høyere hos bakterier dyrket ved 26°C enn ved 37°C. Spesielt høy forskjell kunne observeres i løvskog prøve 1, hvor prosentandelen av kanamycin resistente bakterier var hele 45 ganger høyere enn ved 26°C enn ved 37°C. Den gjennomsnittlige prosentandelen resistente bakterier i jordprøver var 0,19% ved 37°C og 2,21% ved 26°C. Jord fra løvskog viste seg til å ha en større andel kanamycin resistente

bakterier enn de øvrige områdene, gjennomsnittlig 3,1 % ved 26°C og 0,4 % ved 37°C, mens granskog og åkerjord hadde henholdsvis 0,3 % og 2,6% ved 26°C og 0,09% og 0,13% ved 37°C. For beite ble det bare oppnådd data fra 37°C inkubasjon og der var den kun 0,04 %.

Tabell 3.1: Kimtall av bakteriene fra jordprøver bestemt ved dyrkning på R2A. Inkubasjon ved 26 °C og 37 °C for hver prøve. Kanamycin resistens beregnet som prosent av kolonier kimtall (cfu/g fuktig jord) på R2A medium med kanamycin (kan+) av totalt kimtall på R2A medium uten kanamycin (kan-)

Lokalisasjon	prøve.id	inkubasjons-temperatur	Kimtall på kanamycin -	Kimtall på kanamycin +	Resistens i %
Granskog	1	26 °C	1,4*10 <sup>6</sup>	2*10 <sup>3</sup>	0,14 %
Granskog	1	37 °C	4*10 <sup>5</sup>	2*10 <sup>2</sup>	0,05 %
Granskog	3	26 °C	2*10 <sup>6</sup>	+	
Granskog	3	37 °C	3,8*10 <sup>6</sup>	1,4*10 <sup>3</sup>	0,03 %
Granskog	5	26 °C	1,48*10 <sup>6</sup>	8*10 <sup>3</sup>	0,54 %
Granskog	5	37 °C	2*10 <sup>5</sup>	3,8*10 <sup>2</sup>	0,19 %
Løvskog	1	26 °C	2,2*10 <sup>6</sup>	1,5*10 <sup>5</sup>	6,80 %
Løvskog	1	37 °C	4*10 <sup>5</sup>	6,2*10 <sup>2</sup>	0,15 %
Løvskog	3	26 °C	3*10 <sup>6</sup>	2*10 <sup>4</sup>	0,66 %
Løvskog	3	37 °C	4*10 <sup>4</sup>	4,2*10 <sup>2</sup>	1,01%
Løvskog	5	26 °C	5,4*10 <sup>5</sup>	1*10 <sup>4</sup>	1,85 %
Løvskog	5	37 °C	7*10 <sup>5</sup>	8*10 <sup>2</sup>	0,11 %
Beitemark	1	26 °C	+	3,3*10 <sup>4</sup>	
Beitemark	1	37 °C	++	6,7*10 <sup>2</sup>	
Beitemark	3	26 °C	7*10 <sup>5</sup>	++	
Beitemark	3	37 °C	3*10 <sup>7</sup>	3,3*10 <sup>3</sup>	0,01 %
Beitemark	5	26 °C	7,59*10 <sup>5</sup>	++	
Beitemark	5	37 °C	1,4*10 <sup>6</sup>	1,0*10 <sup>3</sup>	0,07 %
Åker	1	26 °C	1,34*10 <sup>6</sup>	5*10 <sup>2</sup>	0,03 %
Åker	1	37 °C	++	1,2*10 <sup>3</sup>	
Åker	3	26 °C	1,4*10 <sup>6</sup>	8*10 <sup>3</sup>	0,57 %
Åker	3	37 °C	1,6*10 <sup>6</sup>	1,4*10 <sup>3</sup>	0,08 %
Åker	5	26 °C	2,8*10 <sup>5</sup>	2*10 <sup>4</sup>	7,10 %
Åker	5	37 °C	1,1*10 <sup>5</sup>	2*10 <sup>2</sup>	0,18 %
+kun sopp					
++ sopp overvekst, vanskelig å telle bakterier.					

Kimtallsbestemmelse av fecesprøver ved dyrkning på R2A og inkubasjon ved 37°C er vist i tabell 3.2. På medium uten kanamycin var de fleste kimtallene i størrelsesordenen  $10^6 - 10^7$  cfu/g, med unntak av ku 1 ( $8,0 \cdot 10^5$  cfu/g), sau 4 ( $2,4 \cdot 10^9$  cfu/g) og kalv 4 ( $2,0 \cdot 10^8$  cfu/g). Tabellen viste at kanamycin resistente bakterier fantes i alle prøver, og at kimtallene på medium med kanamycin varierte innenfor 2 tier-potenser og lå på  $10^2 - 10^3$  cfu/g. Unntak var to prøver fra sau som hadde 100-1000 ganger høyere kimtall enn de andre prøvene. Det var sau 1 ( $8,0 \cdot 10^5$  cfu/g) og sau 6 ( $8,0 \cdot 10^4$  cfu/g). Disse ekstreme kimtall verdiene resulterte i at andelen resistente bakterier i disse prøvene lå på henholdsvis 20 % og 1,33 %. Med unntak av disse to prøvene hadde alle prøvene under 0,5 % kanamycin resistente bakterier. Begge prøvene med høy prosentandel resistens bakterier var samleprøver som bestod av fekalt prøvemateriale fra flere dyr hadde ligget i fjøset lengre tid enn de ferske prøvene. Prøvene fra ku og kalv hadde gjennomsnittlig den laveste prosentandelen kanamycin resistente bakterier (0,13 % og 0,04 %) mens sau hadde en andel på 0,27 %, når vi ser bort fra sau 1. Hvis man regner denne prøven er prosentandelen hele 3,56 % kanamycin resistente bakterier hos sau. Resultatene viser at den gjennomsnittlige prosentandelen kanamycin resistente bakterier i fecesprøver lav var 0,15 % når en ser bort fra den mest ekstreme prøven. Til sammenligning var den gjennomsnittlige resistensen i jordprøvene 0,19 % ved 37 °C. Det var derfor ingen stor forskjell på andelen kanamycin resistente bakterier i disse to miljøtypene.

Tabell 3.2: Kimtall av bakterier (cfu/gram feces) bestemt ved dyrking på TSA medium ved 37 °C .

Prosentandel av resistente bakterier ble beregnet på grunnlag av kimtall på medium med kanamycin i forhold til kimtall på medium uten kanamycin.

Prøve type	Prøve nr	Inkubasjons temperatur	Kimtall på medium med kanamycin	Kimtall på medium uten kanamycin	Prosentandel Resistente bakterier	Merknader
Ku	1	37 °C	$2,6 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^5$	0,03	
	2	37 °C	$2,7 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^6$	0,22	
	3	37 °C	$2,8 \cdot 10^3$	+		Behandlet med penicillin
	4	37 °C	$5,2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^6$	0,05	
	5	37 °C	$6 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^6$	0,06	
	6	37 °C	$3,8 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^6$	0,38	Samleprøve
	7	37 °C	$4,3 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^7$	0,01	
	8	37 °C	$7 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^6$	0,16	Samleprøve
	9	37 °C	+	$1,3 \cdot 10^7$		Samleprøve
Sau	1	37 °C	$8 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$	20	Samleprøve
	2	37 °C	+	$1,6 \cdot 10^7$		
	3	37 °C	$2,4 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^7$	0,001	
	4	37 °C	$8,2 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^9$	0,0003	Fersk
	5	37 °C	$7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^6$	0,017	
	6	37 °C	$8 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^6$	1,33	Samleprøve
	7	37 °C	$4 \cdot 10^2$	$5,4 \cdot 10^6$	0,007	Samleprøve
	8	37 °C	++	$2 \cdot 10^6$		Samleprøve
Kalv	1	37 °C	$3,4 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^7$	0,01	Fersk
	2	37 °C	$9,7 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^7$	0,07	Fersk
	3	37 °C	$6,3 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^6$	0,08	Samleprøve
	4	37 °C	$5,6 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^8$	0,0028	Samleprøve
	5	37 °C	+	++		
+ kun sopp ++ overvekst sopp, vanskelig å bestemme antall bakterier.						

### 3.1.2 Dyrkning av isolater på ulike konsentrasjoner av kanamycin og vankomycin

Tilfeldig plukkede isolater fra renkultur fra fecesprøver ble dyrket på ulike konsentrasjoner av kanamycin og vankomycin. Vankomycin sensitivitet benyttes her som et estimat for andelen Gram-positive bakterier, da vankomycin ikke normalt trenger gjennom den G- celle veggen. Resultatene er angitt i tabell 3.3. Det ble observert variasjon spesielt mellom bakterieisolater fra kalv og ku. Hos bakterier fra kalv var 79 % av bakterieneisolatene både kanamycin og vankomycin resistente, mens hos ku var det kun 40 %. Av bakterieisolatene fra sau var 61 % vankomycin resistente. Det kan tyde på at det var flere G+ bakterie hos ku og sau enn hos kalv. Ved økende kanamycin konsentrasjon sees en synkende prosentandel resistente bakterier, men ved 100µg/ml var fremdeles over 70 % av bakteriene resistente. Dette tyder på at de kanamycin resistente bakteriene i dyrenes tarmflora tåler høye konsentrasjoner av kanamycin.

*Tabell 3.3: Resultater fra dyrkning ved ulike konsentrasjoner av antibiotika kanamycin og vankomycin.*

Prøve	Antall isolater	25µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	25µg/ml kan + 30µg/ml van
Sau	36	33 (91 %)	26 (72 %)	26 (72 %)	22 (61 %)
Kalv	43	42 (97 %)	37 (86 %)	34 (79 %)	34 (79 %)
Ku	59	58 (98 %)	46 (77 %)	43 (72 %)	24 (40 %)

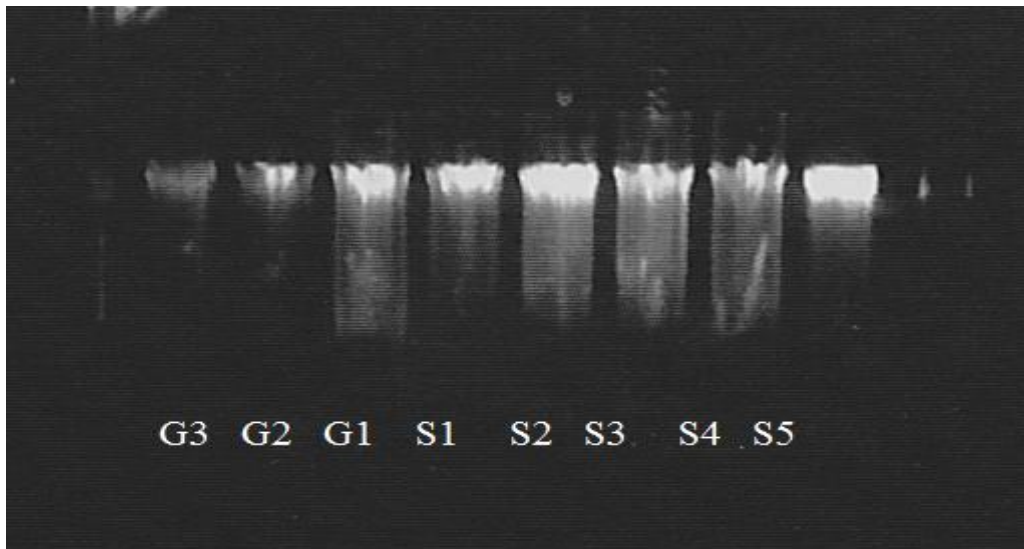


### **3.2 Ekstraksjon og kvantifisering av DNA fra jord, dyrefeces og bakterieisolater.**

Visualisering av ekstrahert DNA fra miljøprøver på 1 % agarose gel (tilsatt GelRed farge) bekreftet ekstraksjonen med synlig relativt intakt DNA, selv om noe fragmentering av DNA kan sees. Dette trolig som følge av behandlingen (homogenisering) under ekstraksjonen (se figur. 3.1). Ekstraksjon fra jord gav bedre resultater enn fra fecesprøver. DNA kvantifisering ved bruk av Nanoview viste at ekstraksjonen gav gode resultater. Tabell 3.4 viser at høyest mengde ekstrahert DNA ble funnet i jord fra granskogområder og beitemark, dette til tross for at det ble benyttet mindre jord til DNA ekstraksjon (300mg). Åkerområder hadde lavest mengde DNA i forhold til de andre jordprøvene hvor hele 500 mg jord ble benyttet til ekstraksjonen. Fecesprøver fra dyr hadde lavere mengde DNA enn fra jordprøver. Fra sauefeces var mengde DNA høyere enn for kalv og ku, med unntak av kalv 5 (794 $\mu$ g/ml).

Tabell 3.4 Oversikt over ekstrahert DNA fra miljøprøver (jord og dyrefeces) ved bruk av Nanoview (GE healthcare)

Prøve	Ekstrahert DNA	Prøve	Ekstrahert DNA
Kalv 1	119 µg/ml	Beitemark 1	268µg/ml
Kalv 2	213µg/ml	Beitemark 3	653µg/ml
Kalv 3	250µg/ml	Beitemark 4	398µg/ml
Kalv 4	317µg/ml	Beitemark 5	304µg/ml
Kalv 5	794µg/ml	Beitemark 7	428µg/ml
Ku 1	117µg/ml	Beitemark 8	819µg/ml
Ku 2	72µg/ml	Granskog 1	1846µg/ml
Ku 3	261µg/ml	Granskog 2	333µg/ml
Ku 4	135µg/ml	Granskog 3	538µg/ml
Ku 5	186µg/ml	Granskog 4	214µg/ml
Ku 6	161µg/ml	Granskog 5	872µg/ml
Ku 7	182µg/ml	Løvskog 1	123µg/ml
Ku 8	258µg/ml	Løvskog 2	519µg/ml
Ku 9	225µg/ml	Løvskog 3	337µg/ml
Sau 1	305µg/ml	Løvskog 4	430µg/ml
Sau 2	516µg/ml	Løvskog 5	491µg/ml
Sau 3	434µg/ml	Åker 1	179µg/ml
Sau 4	442µg/ml	Åker 2	509µg/ml
Sau 5	480µg/ml	Åker 3	282µg/ml
Sau 6	405µg/ml	Åker 4	262µg/ml
Sau 7	406µg/ml	Åker 5	237µg/ml
Sau 8	354µg/ml	Åker 6	341µg/ml
		Åker 7	240µg/ml
		Åker 9	258µg/ml



Figur 3.1: visualisering av ekstrahert DNA, på 1 % agarose gel i TBE og tilsatt GelRed , 80V 60 min ved romtemperatur. S= løvskog, G= granskog)

### 3.3 Påvisning av *aph(3)-II* gener i bakterieisolater og fra ekstrahert DNA.

Undersøkelsen omfatter forekomst av *aph(3)-II* gener i DNA fra jordprøver, fecesprøver fra dyr og bakterieisolater fra urinveisinfeksjoner og blodkulturer hos mennesker.

#### 3.3.1 Påvisning av *aph(3)-II* gener i jordprøver.

PCR ble benyttet for å undersøke forekomsten av *aph(3)-II* gen i jordprøver. Det ble benyttet 1 µl DNA fra ekstraksjon utført direkte fra jord ble benyttet som PCR templat, mens 5 µl av supernatanten fra lysis av bakterieisolater ble brukt som templat for undersøkelser av bakterieisolater. Kontroll plasmid med *aph(3)-II* gav tydelige bånd i forventet størrelse 550 bp. Det kunne ikke påvises *aph(3)-II* positive bakterieisolater i noen av jordprøvene.

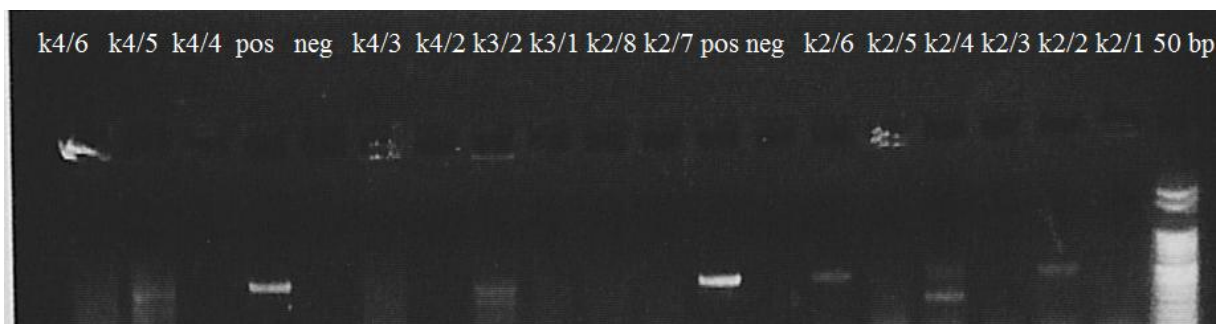
Total DNA fra direkte ekstraksjon av jordprøver viste heller ikke positive resultater. Hvis *aph(3)-II* er å tilstede er det under deteksjonsgrensen for den anvendte metoden.

### 3.3.2 Undersøkelser av forekomst av *aph(3)-II* gener i isolater fra fekaleprøver fra ku, kalv og sau.

Ved å bruke direkte ekstrahert DNA som templat, ble det observert bånd på prøver fra ku 1, 2 og 3. Grunnet lavt kopi nummer, kan ku 1 og 4 ha isolater som uttrykker *aph(3)-II* uten at dette fanges opp.

Det ble totalt analysert 58 isolater fra ku, 43 fra kalv og 36 fra sau. 5 isolater uttrykte svake bånd i forventet størrelse (550 bp) på 1 % agarose gel (fig 3.2). PCR reaksjonen ble utført i tre paralleller og gav like resultater, med unntak av ku (3) 2 og ku (4) 5, som ikke var positiv på alle paralleller. Kun isolater fra ku (2) viste positive resultater ved alle paralleller. Ku(3) 2 og Ku(4) 5 ble likevel sekvensert og regnet som positive, da 2 av 3 paralleller var positive.

Grunnet lavt kopi tall kunne DNA fra prøve ku 1 og ku 4 ha isolater som uttrykker *aph(3)-II* uten at dette ble fanget opp. Alle isolater og ekstrahert DNA fra kalv og sau var negative eller under deteksjonsgrensen.



*Figur 3.2: aph (3)-II positive isolater. 1,5 % agarose gel i TBE tilsatt GelRed, 80V i 60 min ved romtemperatur. Tre paralleller ble analysert for å bekrefte resultatet.*

### 3.3.3 Forekomst av *aph(3)-II* gener i bakterieisolater fra blodkulturer og urinveisinfeksjoner hos mennesker.

Identifiserte bakterieisolater fra humane infeksjoner i blod og urinveier, ble analysert for *aph(3)-II*. Disse har tidligere vist resistens mot ulike aminoglykosider *aac(3)-II a/c* og *aac(6)-Ib-cr* hvor sist nevnte er en mutasjon av *aac(6)-Ib* og gir resistens mot ciprofloksasin. Det ble ikke påvist noen *aph(3)-II* positive bakterieisolater blant disse. Det ble i første kjøring funnet noen isolater med et positivt bånd ved agarose gelelektroforese. Dette viste seg ved kontroll å være falske positive grunnet kontaminasjon fra den positive kontrollen. Ufullstendig forsegling av prøvene i 96-PCR platen var årsaken. Av de 126 prøver fra bakterieisolater blodkulturer og urinveisinfeksjoner, var ingen positive for *aph(3)-II* gener.

En total oversikt av resultater fra *aph(3)-II* forekomsten hos alle prøver, både direkte ekstrahert DNA og fra bakterieisolater vises i tabell 3.4.

Tabell 3.5 Oversikt over antall prøver (isolater og ekstrahert DNA) som ble analysert for forekomst av *aph(3)-II*.

Isolater	Antall isolater	Ekstrahert total DNA	<i>aph(3)-II</i>
Fecesprøver ku	20	9	5
Fecesprøver kalv	20	6	0
Fecesprøver sau	20	8	0
Isolater /urinveier	91	-	0
blodkultur fra mennesker	34	-	0
Miljøprøver			
- Åker	23	9	0
- Beitemark	29	9	0
- Løvskog		5	0
- Granskog		5	0
	Totalt: 237	51	5

### 3.4 Forekomst av genene *aph(3)-I*, *aac(3)-IIa/c*, *aac(6)-Ib-cr* i bakterieisolater fra dyrefeces og jord.

Det finnes et bredt spekter av resistensgener for aminoglykosider fordelt over ulike arter og miljøer. *aph(3)-II* negative isolater ble plukket ut tilfeldig i hver gruppe og analysert for noen av de mest observerte resistensgenene. Kun isolater fra feces og miljøprøver ble analysert, da isolater fra humane infeksjoner var allerede analysert.

Både *aac(3)-II* og *aph(3)-I* gener finnes i G- bakterier, men *aph(3)-I* er også funnet i noen G+ bakterie. Resultatene presentert i tabell 3.5 viser at *aac(3)-II a/c* ble funnet i fecesprøver fra alle dyregrupper. *aph(3)-I* var svært utbredt blant de fekale isolatene (47 %) og 7 av 57 (12,2 %) av isolatene hadde både *aac(3)-II* og *aph(3)-I*. *aph(3)-I* gener var svært utbredt i bakterieisolater fra sau (82 %), mens *aac(3)-IIa/c* var utbredt i bakterieisolater fra kalv (45%). Det er meget sannsynlig at disse isolatene er multiresistente stammer. *aac(6)-Ib-cr* kunne ikke påvises i noen av de fekale bakterieisolatene.

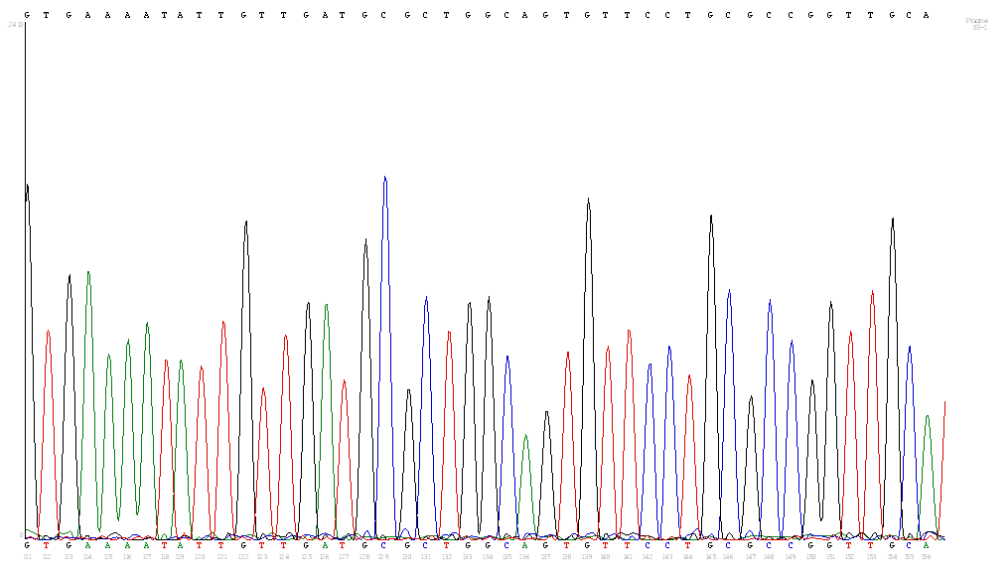
Blant jordprøvene ble det kun påvist *aph(3)-I* gener i 1 av 20 bakterieisolater (5 %) fra løvskog.

Tabell 3.6: Oversikt over antall resistente isolater med aminoglykosid resistensgener.

Gruppe	Antall isolater	<i>aac(3)-IIa/c</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	Antall isolater	<i>aph(3)-I</i>
Feces/ku	25	2 (8%)	0	25	7 (28 %)
Feces/kalv	20	9 (45%)	0	15	6 (40%)
Feces/sau	20	5 (25%)	0	17	14 (82%)
Skogsområder/Åker, beitemark	20	0 (0%)	0	20	1 (5%)



Figur 3.3: Viser gelelektroforese av PCR produkter av *aph(3)-I* på 1,5 % agarose gel i 0,5 X TBE buffer ved 80V i 90 min. Isolat 2 er fra skogsområder, isolatene 4-10 er fra fecesprøver. Grunnet mindre størrelse enn forventet på PCR produktet av *aph(3)-I* fra isolat 4-10. PCR produktene ble sekvensert for å bekrefte deres identitet.



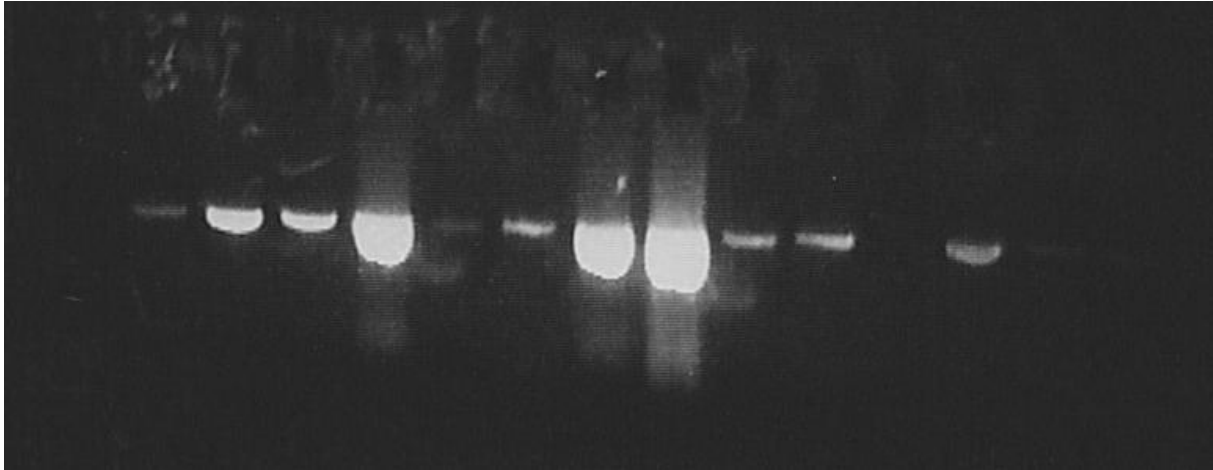
Figur 3.4: Kromatogram som viser resultat av sekvensering av *aph(3)-I* PCR produkt fra et av bakterieisolatene fra fecesprøver.

Sekvensering ble utført siden observerte bånd på agarose gel ikke gav produkter med forventet lengde i basepar (470 bp). PCR produkter av *aph(3)-I* gener som ble utført på DNA fra fekale bakterieisolater var på ca 250 bp. Sekvenseringen av dette fragmentet viste en 98 % (Max identitet) med *aph(3)-Ia* hos *E.coli*.

### **3.5 16S rRNA PCR og sekvensering.**

PCR reaksjonen av 16S rRNA gener ble utført på 20 bakterieisolater fra hver dyregruppe og 19 isolater fra jord, fordelt fra skog, åker og beitemark. Ved visualisering av 16S rRNA PCR produkt på agarose gel 1,5 %, hadde ikke alle positive bånd. Av disse ble det valgt ut 10 prøver fra ku, 9 fra kalv 10 fra sau, 17 fra jord og 6 isolater ekstra fra ku, hvor 5 var positive for *aph(3)-II* ved første undersøkelse, til sekvenseringsreaksjonen (figur 3.5) viser PCR produktene av 16S rRNA gener etter rensing med *Agencourt* magnetiske kuler. PCR produktene var rene og hadde en størrelse på 1200 bp. Mengden amplifiserte produkter var imidlertid sterkt varierende. Dette var særlig ett problem hos bakterieisolater fra sau og jord. En annen mulighet er at koking ikke var nok til å ødelegge celleveggen til enkelte bakterier slik at de ikke gikk i lysis. For å teste dette ble prøve av lysat testet på 1,5 % agarose gel. DNA kunne sees tydelig, men de kunne sees noe fragmentering. De første produktene ble eluert fra kolonnen med TE buffer. DNA viste seg å forsvinne i denne prosessen i varierende grad. Elueringsbufferen ble byttet til PCR vann og gav gode resultater (figur 3.5).





Figur 3.5: Gel elektroforese av PCR produkt fra 16S rRNA fra bakterieisolater fra jord etter rensing med Agencourt magnetiske kuler. Her visualisert på 1,5 % agarose gel i TBE buffer, 80V i 90 min.

Tabell 3.6: BLAST søk av sekvenserte 16S rRNA av fecesprøver på bakgrunn av max identitet.

Isolater	Identitet (16SRNA) Max identitet (Blast søk)	Max identitet %
Kalv 3 (1)	<i>E.coli</i>	99
Kalv 2 (4)	<i>Sphingobacterium daejeonense</i>	100
Kalv 3 (14)	<i>E.coli</i>	98
Kalv 1 (5)	<i>E.coli</i>	98
Kalv 3(6)	<i>E.coli</i>	99
Kalv 3(13)	<i>E.coli</i>	97
Kalv 3(10)	<i>E.coli</i>	97
Kalv 4(10)	<i>E.coli</i>	98
Kalv 1(4)	<i>Paenibacillus tarimensis</i>	100
Sau 4(12)	<i>E.coli</i>	99
KU 2 (6)	<i>Empedobacter brevis</i>	94
KU 2 (2)	<i>Empedobacter brevis</i>	93
Ku 2(4)	<i>Empedobacter brevis</i>	94
Ku 3 (5)	<i>Empedobacter brevis</i>	94
Ku 3(8)	<i>Wautersiella falsenii</i>	91
Ku 2(2)	<i>Wautersiella falsenii</i>	90

Svært mange av isolatene fra feces kunne ikke identifiseres p.g.a. dårlige eller manglende PCR produkter.

Spesielt var resultatene fra ku og sau isolatene dårlige. I disse tilfellene var det mistanke om at DNA kunne vært degradert da de ble oppbevart i forkant av sekvenseringen ved 4 °C på Tris-EDTA

buffer som i etterkant ble mistenkt for å være kontaminert av nukleaser og denne ble byttet til nukleasefritt vann. DNA fra Isolater fra kalv ble isolert og oppbevart på nukleasefritt vann og gav gode sekvenser. Totalt ble 16 bakterieisolater fra fekaleprøver identifisert (tabell 3.6), hvor 8 av dem tilhørte Enterobacteriaceae, og hadde høyest sekvenslikhet (97-99 %) med *E.coli*. De få *aph(3)-II* positive isolatene fra dyrefeces ble isolert fra ku 2 og ku 3. Disse bakterieisolatene viste høyest sekvenslikhet (93-94 %) med *Empedobacter brevis* (tabell 3.6) som tilhører familien *Flavobacteriaceae*. Ku(3)2 ble ikke sekvensert, da prøven forsvant under flytting av prøver. De to siste av de identifiserte isolatene fra ku hadde høyest sekvenslikhet med *Wautersiella falsenii* (90-91%) som også tilhører familien *Flavobacteriaceae*. De to siste av de identifiserte bakterieisolatene som ble identifisert var bakterieisolat kalv 2(4) som hadde 100% sekvenslikhet med *Sphingobacterium daejeonense*, og kalv 1(4) som hadde 100% sekvenslikhet med *Paenibacillus tarimensis* som er en G+ bakterie tilhørende phylumet *Firmicutes*.

Tabell 3.8: BLAST søk av sekvenserte 16S rRNA fra miljøprøver på bakgrunn av max identitet. S prøver= skogs prøver, R prøver= åker

Isolater	Identitet 16S rRNA	Max identitet accession nr	Miljø
S 13	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales Oxalobacteraceae; Collimonas Collimonas. arenae</i>	97 % NR_042824.1	Jord
S 15	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus</i>	96 % NR_074622	Sjøvann
R1	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Chitinophagaceae; Chitinophaga.arvensicola</i>	NR_042512 98%	Jord med lav pH
R3	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae; Pedobacter</i>	NR_043665 97%	Jord
R6	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Azospira</i>	NR_044023 87%	Grunnvann
S 3	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>	NR_025227 98%	Gårds jord
S 6	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; Plantibacter</i>	NR_041045 96%	Jord med gress vegetasjon
S 9	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus anthracis</i>	NR_041248 99%	-
S 11	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Micrococcus luteus</i>	NR_075062 96%	Jord

Sekvenseringen av bakterieisolatene fra jordprøvene ble utført på isolater med visuelt ulike kolonier og BLAST søk viste at de tilhørte mange ulike taksonomiske grupper (tabell 3.7). De fleste viste en høy sekvenslikhet med tidligere identifiserte isolater. I likhet med tidligere studier av jord fra åker og beitemark på Stend [40], ble medlemmer av følgende taksonomiske grupper funnet:

*Actinobacteria*, *Firmicutes*, som er G+ bakterier, og *Gamma-proteobacteria*, *Beta-proteobacteria*

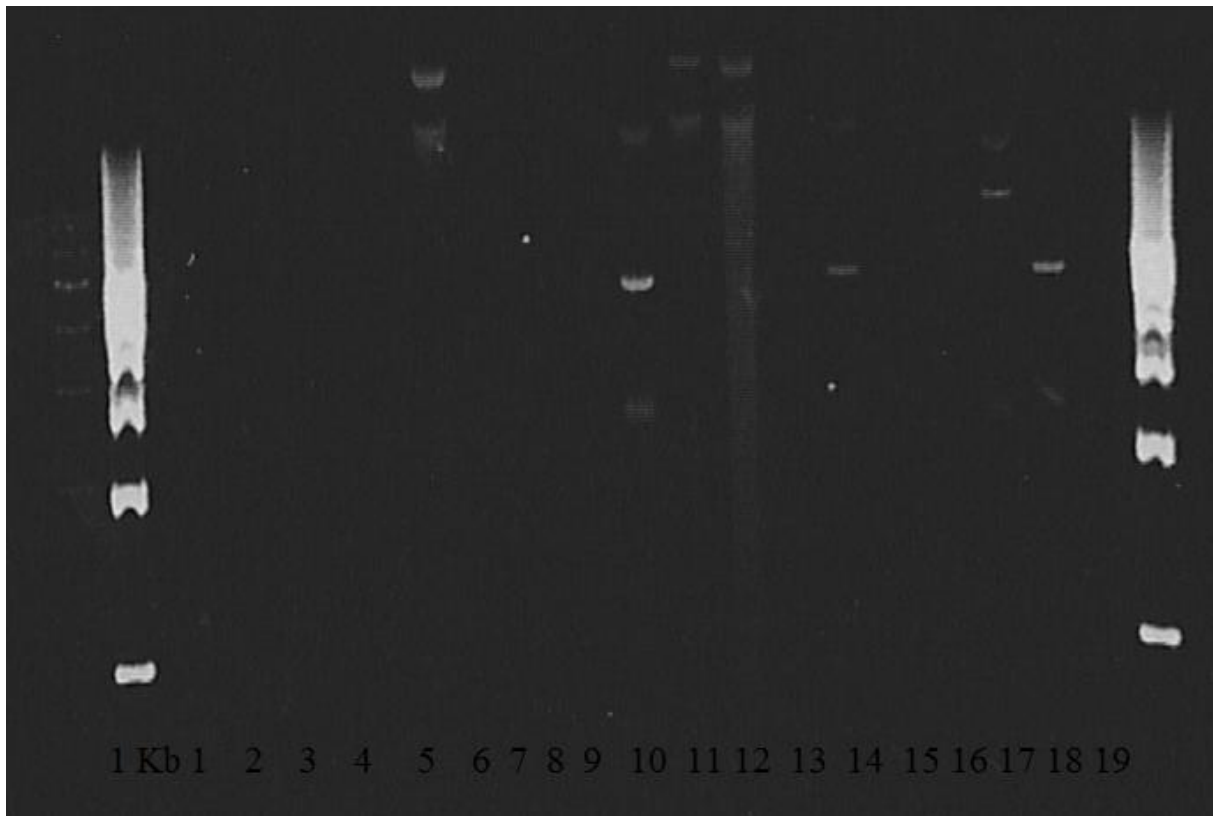
og *Bacterioides* som er G- bakterier.

### **3.6 Isolering av plasmider fra kanamycin resistente bakterieisolater.**

Forsøk på isoleringen av plasmider ble utført på 19 kanamycin resistente isolater dyrket fra dyrefeces. Det ble plukket 5 isolater fra sau, 7 fra kalv og 7 fra ku. Plasmider ble isolert fra alle tre gruppene, 2 fra ku, 3 fra kalv, og 2 fra sau. Plasmidene visualisert ved gelelektroforese på 0,5 % agarose gel med GelRed ved 80V i 120 minutter. Det ble benyttet en 1 Kb markør stige for å gi en størrelses indikasjon av plasmidene. Plasmidene 5, 11 og 12 viste stor likhet i størrelse, det samme gjorde plasmidene fra bakterieisolat 14, 17 og 18. Ett av de 2 *aph(3)-II* positive isolatene som ble undersøkt for påvisbare plasmider (ku 2 (2), kan sees som er plasmid nummer 10 (figur 3.6 ). Ku 2(2) ble identifisert ved sekvensering og hadde størst sekvenslikhet med *Empedobacter brevis*. Av de øvrige isolatene som det ble undersøkt, ble kun 2 isolater (ku (2) 6 og Ku (3)5) identifisert ved sekvensering. Disse to hadde ikke påvisbare plasmider. Begge ble viste høyest sekvenslikhet med *Empedobacter brevis*. Oversikt over alle isolater og eventuelt tilhørende plasmider kan sees i tabell (3.8 ). Kun 7 av 19 (36,8 %) isolater hadde påvisbare plasmider, men falske negative resultater kan ha forekommet da resistensgener ofte sitter på store R-plasmider som ikke vil kunne fanges opp ved å benytte miniprep metoden.

Tabell 3.8: Oversikt over isolater som ble undersøkt for plasmider.

Bakterie isolat	Plasmid nr	Pos/Neg
Sau 8(1)	19	-
Kalv 4(9)	18	+
Ku 6(6)	17	+
Ku 4(4)	16	-
Sau 4(4)	15	-
Kalv 2(1)	14	+
Ku 3(3)	13	-
Kalv 5(2)	12	+
Sau 3(4)	11	+
Ku 2(2)	10	+
Kalv 3(4)	9	-
Ku 4(1)	8	-
Ku 3(5)	7	-
Kalv 1(9)	6	-
Sau 5(1)	5	+
Kalv 2(1)	4	-
Ku 2(6)	3	-
Sau 7(3)	2	-
Kalv 4(3)	1	-



*Figur 3.6: Visualisering av plasmider isolert ved miniprep ved gelelektroforese på 0,7 % agarose gel i TBE buffer ved 70V i 120 minutter. 7 av 19 isolater hadde plasmider.*

Transformasjonsforsøk ble utført på de 7 plasmidene fra isolater fra kanamycin resistente bakterieisolater. Det ble benyttet kjemisk kompetente *E.coli* bakterieceller. Ingen kanamycin resistente bakterier kunne observeres på LB agar medium med 25µg/ml kanamycin etter transformasjon med plasmider. Det tyder på at ingen plasmider ble overført til de kompetente cellene. Plasmider med resistensgener er ofte store plasmider som ikke lar seg transformere inn i denne type kompetente celler.

## 4. DISKUSJON OG KONKLUSJONER

### 4.1 Diskusjon av metoder

Metodene i denne studien har sine begrensninger som det er viktig å være klar over. Antallet bakterier i jord som lar seg kultivere er ofte under 1 %, men flere bakterier enn tidligere har latt seg kultivere ved og ytterligere tilpasse inkubasjonstid, mediet og atmosfære. I denne studien ble det benyttet TSA og R2A agar. TSA er tilstrekkelig til fecesprøver, men er ikke godt egnet til jordprøver. R2A mediet er et generelt medium til dyrkning og isolering av aerobe bakterier i jord og vann. Mediet er næringsfattig og hindrer hurtig oppvekst og dominans av hurtigvoksende bakterier. R2A gjør det mulig å isolere bakterier som vokser med en relativ lav veksthastighet. Bruk av mediet sammen med lav temperatur og økt inkuberingstid gjør det til et passende medie for isolering av bakterier fra ulike naturlige miljøer. Problemer med økt inkuberingstid er faren for uttørkning av mediet. Det er derfor usikkert om noen av bakteriene ble mistet under inkubasjonen. Mediet ble ikke tilsatt cycloheximide som hindrer soppvekst. Dette medfører store problemer med oppvekst av sopp og dyrkningen av renkultur måtte utføres to ganger for å hindre soppkontaminering. R2A mediet har bl.a. vært brukt til isolering av *E.coli* fra jord kontaminert med organisk avfall [103], og til å studere mikrobielt mangfold blant bakteriepopulasjonen i jord (Yellowstone U.S.A) [104] R2A ble tillaget og levert av substrat laboratoriet, Haukeland universitetssykehus.

I denne oppgaven ble Kimtall av antall bakterier i prøvene bestemt og resultatene ble oppgitt som cfu/gram prøve (våtvekt). Totalantall bakterier ble ikke beregnet i denne undersøkelsen, men kan gjøres med fluoressens mikroskop ved å benytte metoder som fluoeressens in situ hybridation (FISH) eller ved å farge bakteriene med et fargestoff som binder seg til DNA (f.eks. DAPI).

Tidsbegrensning gjorde at dette ble nedprioritert.

Ett av problemene for å oppnå nøyaktig vurdering er inkubasjonstiden ved dyrkning av jord og vann bakterier. Avlesning ved agardiffusjonsmetoden gjøres etter 18-48 timer, mens inkubasjonstid for

miljøbakterier kan være i overkant av en uke og lengre. Avlesning etter lengre inkubasjon gir større hemmingssoner og isolater kan da feiltolkes som resistente. En annen faktor er inkubasjonstemperaturer. Optimal temperatur for jordbakterier er ofte under 30 °C, selv om flere er mesofile vil en betydelig andel av dyrkbare bakterier ikke være mulig å kultivere ved en temperatur på 37 °C. Aminoglykosider er mer virksomme ved økende temperaturer og inkubasjon ved lavere temperaturer kan gi usikre vurderinger av resistens. Undersøkelsen for kjente resistensgener er en bedre løsning, selv om dets tilstedeværelse ikke nødvendigvis gir en fenotypisk resistens. Vurdering av resistens ved tradisjonelle metoder gjøres på bakgrunn av verdier som er fastsatt for den bestemte mikroben. Kanamycin resistens grensene å variere sterkt f.eks. har enterokokker brytningsgrenser på  $R > 1085 \mu\text{g/ml}$ , mens *E.coli* og *Salmonella spp* har betydelig lavere grenser  $R > 64\mu\text{g/ml}$  [94]. Dette gjør at det ikke blir en fullstendig resistens vurdering når identiteten på mikroben er ukjent og verdiene blir derfor veiledende. Alle agardiffusjonsmetoder er standardisert med tid og temperatur. Avvik fra disse vil også påvirke hemningssonene og dermed resultatet.

DNA ekstraksjon ble utført samme dag som innhenting av materiale med kommersielt ekstraksjons kit. Kitet har en betydelig fordel over DNA ekstraksjon med kloroform både med hensyn til tid, brukervennlighet og helsesikkerhet. Ulempen er muligheten for å miste DNA ved bruk av silica kledde kolonner. Det ble observert store variasjoner i jordprøvene og i de fecesprøvene i henhold til mengde ekstrahert DNA. Da prøvemengden var stor ble ikke alle prøvene fra de ulike områdene DNA kvantifiser før PCR reaksjon. GoTaq Hot Start Green Master Mix protokoll viser til mengde DNA til 250 ng per reaksjon. Prøvene ble justert i konsentrasjon i forhold til dette. Da de resterende prøvene ble kvantifisert, kunne det sees at noen av prøvene hadde mye høyere mengde DNA enn de øvrige fra samme område. PCR reaksjonen i disse prøvene kan ha blitt falsk negative på grunn av for mye DNA temlat i reaksjonen. Dette gjaldt prøve fra sau (Sau2) kalv (kalv 5) og fra skogsjord (G 3) og G 2) og beitemark (BM 8). Siden DNA binder magnesium ioner som inhiberer PCR reaksjonen, kan for mye DNA templat hindre amplifikasjon av målgen. Grensen for mengden DNA



templat per PCR reaksjon som var satt til GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega) var høy (250ng/reaksjon) og det er spørsmål om en ytterligere fortykning av DNA i forkant av PCR reaksjonen kunne gi andre resultater.

For å ekstrahere DNA fra kultiverte bakterier ble cellene lyst ved koking. De første 20 bakterieneisolatene som ble forsøkt identifisert ved 16S rRNA sekvensering gav dårlige resultater, da sekvensene var for korte for å kunne identifisere dem. Noen bakterier kan ha en så rigid cellevegg at de ikke går i lysis ved koking f.eks. *Acinetobacter sp* eller sporedannelse hos G+ bakterier kan være årsaken til manglende resultater ved PCR, eller koloniene som ble plukket kan være eukaryote. En annen mulighet er at TE bufferen som ble benyttet i begynnelsen av studiet ikke var nukleasefri slik at DNA kan ha blitt degradert før det ble benyttet som templat for PCR før sekvensering. Når denne ble byttet ut opphørte dette problemet.

Undersøkelse av *aph(3)-II* ble utført ved å bruke primere fra tidligere studie [41]. Primerne er rettet mot *aph(3)-II* genet, men disse ble brukt før det var kjennskap til *aph(3)-IIb* (*Pseudomonas spp*) og *aph(3)-IIc* (*Stenotrophomonas maltophilia*). Aminosyresekvenshomologien mellom de ulike *aph(3)-II* variantene var mellom 50-80 %, og primerne kan være uegnet for å fange opp isolater positive for disse variantene [47]. Siden *Pseudomonas* og *Stenotrophomonas* er utbredt i jord og er opportunistiske humanpatogene bakterier vil kartleggingen av disse variantene være av betydning. Sekvensering regnes som gullstandard ved identifisering av bakterier. En annen aktuell metode vil på sikt være MALDI-TOF-MS. Studier utført på kjente humanpatogene bakterier ved hjelp av MALDI-TOF-MS viste høy sensitivitet og spesifisitet. Analysetiden ble beregnet til kun 4 minutter per prøve. På jordprøvene vil begrensningene av metoden ligge i manglende data på disse isolatene i databasen. MALDI-TOF vil kunne benyttes direkte på prøvematerialet og ikke være avhengig av dyrking. Da sekvensering er dyrt og kvaliteten lett kan bli forringet, vil MALDI-TOF kunne bidra i bakteriologien på en positiv måte [105].

Plasmid isolering med miniprep har sine begrensninger. Miniprep vil ikke fange opp store plasmider. R-plasmider er ofte store plasmider og kan ha gått tapt under isoleringen av plasmid DNA. Kjemiske kompetente celler er ikke gunstig å bruke ved transformasjons undersøkelse av naturlige plasmider, da slike plasmider er svært vanskelig om ikke umulig å overføre. Tidligere undersøkelser for å påvise transformasjon har brukt *Agrobacterium tumefaciens* som resipient [75]. Konjugasjon er den mest vanlige mekanismen for HGO av plasmider. Alternativt kunne lineært DNA fra vært brukt under transformasjonsforsøket. Konjugasjons forsøk kunne også vært aktuelt, men ble ikke utført grunnet tidsbegrensning. I vurdering av forekomst av plasmider i de kanamycin resistente bakteriene, kommer derfor metoden til kort.

Undersøkelsen av *aac(3)-IIa/c* viste i første PCR reaksjon dobbelt band på agarose gelelektroforesen. Annealing temperaturen i PCR oppsettet ble derfor justert opp 2 °C. Dette gav gode resultater med bånd på gelen kun i riktig størrelse. Uspesifikke bånd er ofte mindre enn målgenet og amplifiseres raskere under PCR. Dette vil kunne forårsake at de uspesifikke båndene overskygger båndet til målgenet.

## 4.2 Diskusjon av resultater

Bakterier fra jordprøvene vokste raskere og i større antall ved inkubasjon ved 26 °C enn ved 37 °C. Det ble observert et stort visuelt mangfold i bakterienes kolonimorfologi, da særlig i jordprøvene fra beitemark og skogsområder. Jordprøvene fra åker hadde lavere visuelt mangfold. Kolonier av svermende bakterier (f.eks. *Proteus* arter eller sporedannede bakteriearter) ble kun observert i jordprøvene fra beitemark og spredte seg raskt til hele agarskålen. Telling av antall bakterier i jord fra beitemark og dels åker var utfordrende på grunn av oppvekst av sopp. Ved inkubasjon ved 37 °C var sopp et mindre problem, men ved 26 °C ble oppveksten så kraftig at det var vanskelig å få et nøyaktig antall av bakteriene. Plukking av kolonier til renkultur ble også vanskelig på grunn av soppkontaminasjon. Mangfoldet av sopp viste seg til å være høyere i beitemark enn åker. Det var

mindre problemer med sopp i jordprøver fra skog. På grunn av ovennevnte problemer ble det i noen få tilfeller ikke mulig å telle bakteriene på agarplaten.

Vurdering av resistens ved agardiffusjonsmetoden kunne ikke utføres, da kanamycin og neomycin diskene og E-tester ikke var tilgjengelig. En enkel vurdering ble derfor gjort ved å dyrke bakterier på flere medier tilsatt ulike mengder kanamycin, i tillegg til en skål tilsatt vankomycin som dreper G<sup>+</sup> bakterier. Flere faktorer påvirker resistensvurdering. Avlesning av resultater skjer vanligvis etter 18 timer etter utsæd av bakterier på agar medium. Dette var vanskelig å følge når jordprøvene ble dyrket på R2A medium, da dette er et medium som er beregnet for inkubasjon i 5-7 dager. Siden jordbakteriene generelt krevde lengre dyrkningstid ble en sikker vurdering vanskelig. Den fenotypiske undersøkelsen av antibiotikaresistens fungerte kun veiledende. Siden kanamycin har lavere aktivitet ved lave temperaturer, gav inkubasjon ved 26 °C en høyere prosentandel kanamycin resistente bakterier. For å undersøke om dette var på grunn av lav aktivitet av kanamycin ved disse forholdene, ble samme bakteriekolonier sådd ut på nytt og inkubert ved 37 °C. Dette avdekket at noen bakterier ikke av i stand til å vokse under disse forholdene og noen vokste kun på agar medium uten kanamycin ved 37 °C. Disse isolatene ble på bakgrunn av dette ikke vurdert som kanamycin resistente. På en annen side er det muligheter for at *aph(3)-II* gener er å tilstede, uten at en fenotypisk kanamycin resistens kan observeres. Lavt uttrykk av genet, kan føre til at den ikke vokser på agar med kanamycin. Vurderingen av *aph(3)-II* forekomst blir derfor begrenset til andel positive av en fenotypisk kanamycin resistent gruppe.

I litteraturen har kanamycin resistens blitt regnet som utbredt i alle miljøer. Kanamycin resistente bakterier er utbredt, men antall resistente bakterier i de enkelte miljøene varierer stort.

Konsentrasjoner på 40-60 % har blitt observert i kloakkslam og grise gjødsel og i 20 % av bakteriene i tarm hos mennesker [30, 40]. I en rapport fra NARMS 2011 ble det fremlagt tall som viste at prosenten av kanamycin resistente bakterier hos kalkuner og kylling var (13-24 %), mens

det hos storfe og gris hadde lavere forekomst (1,3-7 %) [39]. I Norge og Danmark ble det på 90-tallet undersøkt aminoglykosidresistens hos *E.coli* hos broiler kyllinger og griser. Studien viste 0,5-3 % i Norge og 1-6 % i Danmark [5, 86]. Smalla et al viste i en studie at forekomst av kanamycin resistente bakterier i miljøet var utbredt, men prosentandelen var relativt lav (1-7%) [78]. Gerbert et al viste i sitt studium enda lavere forekomst i miljøprøver med 0,1- 1,5% i miljøprøver og 20% i grisekjøtsel og kloakk [41]. Et annet studium viste at antallet kanamycin resistente bakterier i jord miljøer var ca  $10^5$  per gram jord [86, 87].

Resultatene fra denne undersøkelsen viser stor likhet med tidligere publiserte resultater og Kanamycin resistente bakterier ble funnet i alle miljøer.

Selv om undersøkelsen av kanamycin resistens hos bakterier fra jordprøver, viste stor utbredelse av fenotypen var prosentandelen kanamycin resistente bakterier relativt lav 0,03-7,10 %. I prøver fra dyrefeces ble det påvist enda lavere prosent andel (0,001-1,3 %). Resultatene er beregnet per/gram våtvekt feces. Ett unntak var i en prøve fra sau hvor det ble observert hele 20 % resistens. Denne prøven var en samleprøve som bestod av feces liggende under gitter i fjøset. Økning i resistente bakterier p.g.a. utveksling av plasmider med resistensgener har vært observert i feces fra kjøtsel som var oppbevart over tid. En annen mulighet er at agar mediet ikke hadde virksom kanamycin, eller at denne har blitt svekket.

Utbredelsen av *aph(3)-II* genen er lite beskrevet i litteraturen, men Gebhart et al og Leff et al viste en lav forekomst, forholdsvis 1,63% i miljø prøver [41, 59]. Blant kliniske isolater viste Woegebauer et al at prosentandelen av *aph(3)-II* genen var liten, henholdsvis 0,0096 % [60]. Undersøkelsen av isolater både fra jord, dyr og fra infeksjoner hos mennesker viste en lav forekomst av *aph(3)-II* (8 % av isolater fra feces), hvor alle positive isolater ble isolert fra kufeces. Kanamycin resistente stammer med påvist *aph(3)-II* gener ble sekvensert og alle *aph(3)-II* positive

bakterieisolater viste mellom 91 - 94 % likhet med *Empedobacter brevis*.

*E. brevis* er en G- bakterie som tilhører familien *Flavobacteriaceae* i bakterie fylumet *bacterioidetes* og slekten *Empedobacter*. Denne bakterien og dens nære slektninger har sitt naturlige habitat i jord og vann, men finnes også i matvarer og overflater i sykehus miljøer. Evnen til å leve i klorbehandlet vann gjør at den i likhet med *Pseudomonas spp* kan opptre som en opportunistisk patogen hos hospitaliserte pasienter. Isolatene som ble identifisert som *E. brevis* ble først mistenkt å være G+, da disse isolatene ikke vokste på agarskåler med vankomycin som brukes mot G+ bakterier. Det viser seg at *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium* og *Empedobacter* har et uvanlig resistensmønster. Disse bakteriene er hyppig resistente for penicilliner, aminoglykosider og cefalosporiner, men er ofte sensitive for clindamycin, rifampin og vankomycin. Det ble ikke utført gramfarging i denne undersøkelsen [106].

Smalla et al. viste at Dominansen av andre resistensgener som *acc(3)* og *acc(6)* kan være en mulig årsak til den lave frekvensen av *aph(3)-II* i miljøet. Det er observert at *aph(3)* gruppen i kliniske isolater har minsket de siste ti årene og seleksjon for andre resistensgener kan være en årsak til denne trenden [47, 52]. Kanamycin og neomycin er ikke benyttet til behandling av mennesker, men neomycin er brukt i veterinærmedisin og i salver til behandling av overfladiske sår. Bruk av gentamicin er utbredt i Norge og resten av verden og genene *aac(3)* og *aac(6)* gir bl.a. gentamicin resistens, men også resistens for andre aminoglykosider. Den kliniske relevansen av *aph(3)-I* og *aph(3)-III* er også stor, da disse genene har et utvidet vertsspekter og gir resistens for klinisk viktig antibiotika som amikasin og gentamicin. I denne studien ble det påvist *aph(3)-I* i fekaleprøver fra kalv, ku og sau og i et isolat fra skogsjord. Resultater fra dyrefeces prøver og isolater fra humane infeksjoner for *aac(3)* gener viste en høyere forekomst av dette genet blant aminoglykosidresistente bakterier. Det var kun 2 isolater fra ku som var positiv for *aac(3)* gener. Dette kan skyldes at det kan ha vært en større andel G+ blant isolatene og *aac(3)-II* finnes hovedsakelig hos G- bakterier. Noen av isolatene hadde både *aac(3)-IIa* og *aph(3)-I* aminoglykosid resistensgener. Undersøkelser for

*aac(6) Ib-cr* viste ingen positive hos samtlige isolater fra naturlige miljøer eller dyrefeces. Dette kan tyde på at denne mutasjonen av *aac(6)Ib* ikke er utbredt i naturen og at økningen av denne varianten i humane infeksjoner skyldes bruk av antibiotika (gentamicin og beta-laktam antibiotika). Mye kan tyde på at *aph(3)-II* kan være utkonkurrert av andre resistensgener mot aminoglykosider og at koseleksjon for *aac(3)* og *aac(6)* og større utbredelse av transposoner som Tn903 og Tn7 i naturen ytterligere bidrar til denne trenden [41, 57]

PCR analyser av *aph(3)-I* genet i isolater fra dyrefeces viste et bånd på 250 bp, noe som er mye mindre enn forventet (470 bp). Antallet isolater som gav positive resultater virket sannsynlig, men PCR produkt ble rensert og sekvensert for å undersøke om det virkelig var et *aph(3)-I* ampikon. Sekvenseringen viste 99 % likhet med *aph(3)-I* gener fra *E.coli*. Primerene benyttet til *aph(3)-I* er ikke spesifisert til type a, b eller c. Det er derfor en usikkerhet om hvilke som vil detekteres under PCR. *aph(3)-I* undergruppene har stor homologi og det er ikke umulig at alle varianter ville blitt fanget opp.

Plasmider ble isolert fra kanamycin resistente isolater fra ulike miljøprøver. Plasmid undersøkelser av et tilfeldig utvalgte kanamycin resistente isolater viste at flere hadde påvisbare plasmider, men hos de fleste ble det ikke påvist noen plasmider, hvor 7 av 19 isolater som ble undersøkt. Ingen av de isolerte plasmidene lot seg transformere inn i kjemisk kompetente celler. Resistensen kan sitte på kromosomet eller plasmidene kan ha vært inkompatible med cellene eller vært for store for at de kjemiske kompetente *E.coli* bakteriene kunne ta dem opp gjennom celleveggen. Det er kjent at flere bakterier bl.a. *S.maltophilia* og *P.aeruginosa* har *aph(3)* gener som er lokalisert på kromosomet. *aph(3)* trolig stammer fra antibiotika produserende stammer som har resistensgener på kromosomet og kromosomal resistens for aminoglykosider er ikke unaturlig. Resistensgener kan også bli tatt opp av kompetente bakterier uten å uttrykke fenotypisk resistens.

Vurdering av sikkerhet ved bruk av *aph(3)-II* som markør i GMP kan ikke besvares av dette studiet, men det støtter opp om litteraturen på området ved å si at *aph(3)-II* ikke er utbredt i stor grad i

naturen. Kanamycin resistens er beskrevet som svært utbredt blant både humanpatogene bakterier og miljøbakterier. Andelen av kanamycin resistente bakterier varierer fra lavt registrert resistens, dvs. mindre enn 1 % i jord og vann til 50 % i kloakkslam [40, 41, 59]. Det knyttes noe usikkerhet til vurderingen av kanamycin resistens på bakgrunn av dyrkning og tradisjonell resistensbestemmelse ved agardiffusjonsmetoden ved undersøkelser av miljøbakterier.

Markører for *aph(3)-I* / *aph(3)-II* er mye brukt ved produksjon av GMP benyttet til dyrefôr og matvarer til mennesker. Utbredelsen av kanamycin og den manglende kliniske relevansen i terapeutisk sammenheng, har i flere vitenskapelige miljøer ufarliggjort *aph(3)-II* som markørgen. Risikoen for overføring av resistensgener og seleksjon av overførte egenskaper blir av de fleste vitenskapelige miljøer vurdert til å være liten. Risikovurderingen bygger på påvisningen av at funksjonelt APH(3)-II protein ble ødelagt i omgivelser som imiterer forholdene i mage og tarm og dermed ikke å bidra med seleksjonspress i mage og tarm. Det er også vurdert at DNA integriteten vil være svekket etter enzymatisk degradering og dermed ikke kunne bidra til transformasjon in vivo. Overføring av gener er bevist gang på gang til å skje på tvers av art, familie og til og med mellom prokaryoter og eukaryote. Forskere med en skeptisk holdning til GMO har påpekt at den samme sannsynligheten har vært lagt frem ved risiko vurdering av penicillin resistens hos *S.pneumonia*. Visualisering av HGO ved in situ forsøk med transgene planter som donorer og bakterier som resipienter viste at ett defekt resistensgen i bakterien kunne gjenopprettes ved transformasjon med plante DNA [75, 77, 78]. I de fleste tilfeller er disse overføringene knyttet til homologe gen regioner og fremmede gener kan i verste fall erstatte et dysfunksjonelt resistensgen hos resipienten. Skeptikere har påpekt at overføring av gener med additiv integrering kan bidra til horisontal genoverføring utover de homologe regionene og ta opp genelementer som ellers ikke ville være tilstede hos mottaker. Samling av resistensgener i genkassetter og prokaryotisk opprinnelse hos genmarkører bidrar i positiv retning for en slik overføring.

Smalla et al 2008, viste at gjødsel fra griser som brukes til gjødsling i jordbruket er et reservoar for plasmider med bredt vertsspekter og med høy forekomst av resistensgener. Studiet ble utført på 15 grisegårder i Tyskland. Tilskudd av grise-gjødsel viste seg å mobilisere plasmider i jord ved konjugasjon [80]. Dette er ett kontaktpunkt mellom GMP og humanpatogene bakterier, hvis transformasjon først skjer mellom jordbakterier og fritt DNA fra GMP enten i åker eller i tarmen av dyr som inntar GMP (fig 1.16) [80]. Nylige studier fra USA viste stor homologi mellom resistensgener i jord og i humanpatogene bakterier, hvor hele 110 av 252 gener viste likheter, og 18 av genene fra jordbakteriene var identiske med gener isolert fra humanepatogene bakterier. Dette kan tyde på en nylig overføring av gener mellom disse miljøene. Det ble i samme studium foreslått at jord trolig er et reservoar for resistensgener [81]

En viktig problemstilling ved vurdering av horisontal genoverføring i ulike miljø er begrensinger når det gjelder metoder for å evaluere miljøbakterienes betingelser for genoverføring. Da kun 0,1-1 % av dem er dyrkbare, vil dyrkingsmetoder være utilstrekkelige for å vurdere forekomsten av naturlig HGO som konjugasjon, kompetanseutvikling og transformasjon [66, 79]. Problemet er belyst i et studium av Netherwood et al [70] som sammenlignet HGO i tarmsystem hos kyllinger ved *in vitro* og *in vivo* teknikker, hvor de brukte en genmodifisert og rifampin resistent (Rif<sup>r</sup>) stamme av *Enterococcus faecium* som bar et bredspektret konjugativt plasmid (pAM $\beta$ <sub>1</sub>) med erytromycin resistens (Ery<sup>r</sup>). Resipienter var umodifiserte (Rif<sup>s</sup>) stammer av samme bakterie (probiotika). I kyllingenes tarmsystem, ble det påvist at frekvensen av genoverføringen *in vivo* var 0,03 transkonjuganter per mottaker celle, noe som er meget høyt. *In vitro* var konjugasjons frekvens lavere enn *in vivo*, og genoverføring kunne bare påvises ved konjugasjon på filteroverflater og ikke i flytende kulturer. Dette viser at hyppigheten av genoverføring i miljøet kan være høyere enn det man kan påvise *in vitro*, og at tarmer kan være såkalte hotspots for horisontal genoverføring [70]. Andre studier viser også til hotspots for horisontal genoverføring. Nylig ble et slikt hotspot identifisert hos *S.pneumonia*. Nasofarynx kolonisert med to til flere serotyper av *S.pneumonia* viste



en transformasjonrate *in vivo*, som var hele 10 millioner ganger høyere enn beregnet ut fra sepsis infeksjonsmodellen, som tidligere ble lagt til grunn. Denne dramatiske forskjellen viser at miljøbetingelser som næringsfattig medium, lav temperatur og biofilmdannelse i nasofarynx skaper et hotspot for horisontal genoverføring [70, 71 ].

Til tross for dette har flere studier mikrokosmos vist liten eller ingen transformasjon både ved tilføring av DNA og plasmider med genmarkører. Manglende seleksjonspress pekes på som en begrensning i disse miljøene. En studie viste at tilsetning av kanamycin og streptomycin til jord i mikrokosmos, ikke førte til økning av kanamycin resistente bakterier ved tilsetning av høye verdier av kanamycin. Et forhøyet antall streptomycin resistente bakterier ble derimot påvist ved tilsetning av moderate mengder streptomycin. Miljøet og dets mikroflora vil trolig ha store innvirkninger på frekvensen av genoverføring. Hvis eksemplet for *S.pneumonia* kan overføres til jord, er det vanskelig å sette lit til de risikovurderingene som legges til grunn for vurderingen av risikoen *aph(3)-II* utgjør i denne sammenheng, særlig med tanke på at jord er et komplekst og sammensatt miljø både kjemisk, strukturelt og mikrobielt. Horisontal genoverføring fra jord til humanpatogene som har blitt påvist ved sekvensering av resistensgener. Den store likheten mellom resistensgenene peker mot en nylig overføring, men i hvilken retning overføringen har skjedd er imidlertid ukjent. Utslipp av humanpatogene ut i miljøet via kloakk eller fertilisering er en mulig forklaring. Uansett hvilken retning overføringen har skjedd eller i hvilken frekvens HGO skjer mellom GMO og humanpatogene er seleksjon av disse genene trolig avhengig av seleksjonspress for at genene skal etableres i resipienten. Antibiotikabruk og dets påvirkningen på seleksjonspress er et stort problem på et globalt nivå og manglende kontroll og overvåkning, spesielt i antibiotikaproduserende land er skremmende. Dette fordi landegrensene ikke lengre begrenser omfanget av problemet.

### 4.3 KONKLUSJONER

På bakgrunn av studien av 237 kanamycin resistente isolater fra dyrefeces, infeksjoner hos mennesker og fra jord, støtter studien opp om liknende studier fra Tyskland, Nederland og Østerrike som viste en lav forekomst av *aph(3)-II* gener, i bakterieisolater fra både miljøet og kliniske infeksjoner [41, 60]. Kanamycin resistens var å tilstede i alle miljøene som ble testet, men prosentandelen var lav. *aac(3)-IIa/c* og *aph(3)-I* gener var utbredt i bakterieisolater fra infeksjoner hos mennesket og i dyrefeces, men ikke i jord. Dette støtter opp om at resistensgener som *aac(3)-IIa* og *aph(3)-I* kan ha utkonkurrert *aph(3)-II* genet i kliniske isolater og at kanamycin resistens i jordbakterier er dominert av andre resistensgener enn *aph(3)-II*. Risikovurderinger knyttet til bruk av av GMP med *aph(3)-II* markørgener er gjort på bakgrunn av at kanamycin resistens og *aph(3)-II* genet skal være utbredt i naturen. Denne studien viser at selv om kanamycin resistens er utbredt, er prosentandelen lav og *aph(3)-II* ikke utbredt. Vurdering av resistens bør gjøres på nasjonalt plan, da det trolig er stor variasjon mellom ulike deler av verden, med ulikt klima og mønster i antibiotikabruk.

### 4.4 Videre arbeid

Undersøkelser av dyrefeces som blir brukt til naturgjødsel i jordbruket før og etter oppsamling i gjødsel kjeller, kan benyttes for å kartlegge resistensprofiler hos ulike husdyr samt utskillelse av umetaboliserte antimikrobielle midler ved behandling. Ved å benytte nye metoder som Pyrosekvensering ved analyser av åker og beitemark for å få en oversikt over resistomet i norsk natur, kan gi en bedre forståelse av de dypere genetiske forskjellene i disse miljøene. Seleksjonspress er av samtlige utpekt som en avgjørende faktor i spredning av resistensgener, også i jord og vann. Kartlegging av utbredelse av antibiotika i vann og jord fra ulike steder bl.a. kommunale vannforsyninger, kloakkrenseanlegg og sykehusutslipp ved GC-MS eller LC-MS, sammen med pyrosekvensering kan gi innblikk i hvilket seleksjonspress miljøene utsettes for og

hvordan dette påvirker sammensetningen i det mikrobielle miljøet. Simuleringer av denne problemstillingen i mikrokosmos studier, kan også gi innsikt i hvilke genetiske endringer som forekommer i mikrofloraen, etter eksponering for ulike konsentrasjoner av antibiotikagrupper.

# Litteraturliste

1. <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducing-microbes/bacteria>
2. <http://www.utviklingsfondet.no/milj-og-utvikling/biologisk-mangfold/genmodifiserte-organismer-gmo/>
3. <http://www.monsanto.com/newsviews/Pages/food-safety.aspx>
4. <http://tidsskriftet.no/article/92223/>
5. Health department of Norway “GMO food” October 2000, NOU 2000:29, chapter 8,6- 8,6,5.
6. <http://naturvernforbundet.no/naturogmiljo/import/genforskningens-foelger-article12367-1009.html>, sited 12/4-2012
7. Rogne.S, Linnestad.C “ GMO i oppdrettsnæringen” Bioteknologinemda [www.bion.no](http://www.bion.no)
8. <http://www.decodedscience.com/gmo-food-pro-and-con/23179>
9. Degree Miklos” Medisinsk mikrobiologi “ 3 edition, chapter 4 Bacterial genetics page(47-60)
10. Kjekken R, “DNA – fremtidens vaksine?”, Tidsskr Nor Lægeforen nr. 22, 2006; 126 2964–8
11. ^ Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW., Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis, Cell. 1977 Jun; 11(2):263-71.
12. <http://www.scq.ubc.ca/transgenic-crops-how-genetics-is-providing-new-ways-to-envision-agriculture/>
13. [http://www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig\\_tab/433583a\\_F2.html](http://www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig_tab/433583a_F2.html) fig 2 “ Hoe Agrobacterium genetically transform plants”
14. Government surveillance of plants, fish, animals and foodstuff, rapport” Surveillance over gen modified foodstuff “2009. Food subservience department.
15. Konhauser.K “Introduction to geomicrobiology” Blackwell publishing, 2007, kapittel 1 s (23, 28)
16. <http://biologypop.com/the-thoughest-bacterium-of-the-world-deinococcus-radiodurands-video/>
17. <http://www.nrk.no/nyheter/distrikt/sorlandet/1.8874187>
18. <http://www.treehugger.com/green-food/gmo-bans-laws-and-labels-from-around-the-world.html>
19. Bøhn.T, Traavik.T “Reduced fitness of Daphnia magna fed Bt-transgenic maize variety” Environmental. Contam.toxicol, 2007.
20. <http://www.epsoweb.org/file/1095>
21. Aris A, Leblanc S (May 2011). "Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada". *Reprod. Toxicol.* **31** (4): 528–33. doi:10.1016/j.reprotox.2011.02.004. PMID 21338670.
22. [http://www.regjeringen.no/nb/dokumentarkiv/Regjeringen-Stoltenberg-I/md/nyheter-og-pressemeldinger/2000/norge\\_sier\\_nei\\_til\\_tre\\_eu-godkjente.html?id=243366](http://www.regjeringen.no/nb/dokumentarkiv/Regjeringen-Stoltenberg-I/md/nyheter-og-pressemeldinger/2000/norge_sier_nei_til_tre_eu-godkjente.html?id=243366)

23. <http://www.regjeringen.no/nb/dep/lmd/aktuelt/nyheter/2010/sept-10/brussel-erklart-som-gmo-fri-sone.html?id=6154>
24. <http://www.lovddata.no/all/hl-19930402-038.h>
25. <http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/dok/nouer/2000/nou-2000-29.html?id=143253>
26. Jerneshaugen.A “ Problematisk for et lite land å ha eget regelverk” 2012 genialt no 2 2012.
27. Tjerneshaugen.A “Kampanje mot genmodifisert mat” genialt no 2 2012.
28. Tjerneshaugen.A “ Vi står ovenfor et dilemma” genialt no2, 2012.
29. <http://www.regjeringen.no/nb/dep/md/tema/naturmangfold/genteknologi-/begrunnelse-for-de-norske-forbudene-mot-.html?id=411955> sited 12/4-2012
30. Richard Braun “ Antibiotic resistance marker in genetically modified (GM) crops” 2001, European federation of biotechnology” briefing paper nr 10,[http://www.biosafety.be/ARGMO/Documents/EFB\\_AntibioticRM\\_English.pdf](http://www.biosafety.be/ARGMO/Documents/EFB_AntibioticRM_English.pdf) ( sited 12/4-2012)
31. European food safety authorities: EFSA, approaches to risk assessment in the area of antimicrobial resistance with the emphasis on commercial micro-organisms” EFSA journal 2011 9(10):196. [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu) sited 12/4-2012
32. Degree Miklos” Medisinsk mikrobiologi “ 3 utgave, kapittel 47, Antibakterielle og antimykotiske midler side (571-576)
33. <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/29538> kapittel L.1 2.9 aminoglykosider 26.05.2013
34. Wright.G “ Aminoglycoside-modifying enzymes” current opinion in microbiology, 1999, 2: s 499-503
35. [https://www.google.no/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&docid=Yf3u77ExDH4zXM&tbnid=OWurqwVa-f1vZM:&ved=0CAQQjB0&url=http%3A%2F%2Ffaculty.ccbcmd.edu%2Fcourses%2Fbio141%2Flecguide%2Funit6%2Fgenetics%2Fprotsyn%2Ftranslation%2Faglycomiscode\\_illus.html&ei=Ii1gUsqiNobU4wTeYG4Ag&bvm=bv.54934254,d.bGE&psig=AFQjCNF72QB3Az48qQafRbk41mxSuCcF7A&ust=1382121120489766](https://www.google.no/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&docid=Yf3u77ExDH4zXM&tbnid=OWurqwVa-f1vZM:&ved=0CAQQjB0&url=http%3A%2F%2Ffaculty.ccbcmd.edu%2Fcourses%2Fbio141%2Flecguide%2Funit6%2Fgenetics%2Fprotsyn%2Ftranslation%2Faglycomiscode_illus.html&ei=Ii1gUsqiNobU4wTeYG4Ag&bvm=bv.54934254,d.bGE&psig=AFQjCNF72QB3Az48qQafRbk41mxSuCcF7A&ust=1382121120489766)
36. Department of food safety and zoonosis “Critically important antimicrobials for human medicine” 2<sup>nd</sup> revision 2009.
37. [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=List\\_6212&Main\\_6157=6263:0:25,6568&MainContent\\_6263=6464:0:25,6580&List\\_6212=6218:0:25,6581:1:0:0::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=List_6212&Main_6157=6263:0:25,6568&MainContent_6263=6464:0:25,6580&List_6212=6218:0:25,6581:1:0:0::0:0)
38. Forbes.B, Sahm.D “Diagnostic microbiology” 12th edition, Mosby Elsevier, 2007, kapittel 7, s (102-103)
39. NARMS “retail meat report 2011”
40. Patel.S, Torsvik.V “ Utbredelse av antibiotikaresistens I bakterier fra det ytre miljø” 1999, rapport statens forurensingstilsyn.
41. Smalla, K., L. S. van Overbeek, R. Pukall, and J. D. van Elsas. 1993. Prevalence of *nptII* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. FEMS Microbiol. Ecol. 13:47-58. No abstract available.
42. Gaustad P” Mechanisms for development of antibioticresistant bacterial” Tidskriften den noeske legeförening 2001, nr 26, 121; 3090-4

43. Lorentz.M.G and Wackernagel.W “ Bacterial gene transfer by natural transmission of genes in the environment” American society for microbiology, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Sept. 1994, p. 563-602 Vol. 58, No. 3
44. [http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html)
45. Lindemann. P.C, Risberg.K, Wiker. H, Mylvaganam.H « Aminoglycoside resistance in clinical Escherichia coli and Klebsiella pneumonia isolates from western Norway» APMIS 2011, 120 s 495-502.
46. Ruiz.E, Ocampo.Sosa.A et al “ Changes in ciprofloxacin resistanc levels in enterobacter aerogenes isolates accosiated with with variable expression of the aac(6)-Ib-Cr gene” antimicrobial agents and chemotherapy p 1097-1100.
47. Shaw.K.J et al “Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes” Microbiological reviews.1993 Mars, s 138-163.
48. Ramirez.M, Tolmasky.M “ Aminoglycoside modifying enzymes” drug resist update, 2010 december 13 (6): 151-171.
49. The Aminoglycoside Resistance Study Groups. 1995. [The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms--combined results of surveys in eight regions of the world.](#) J. Chemother. 7 Suppl 2:17-30.
50. Schmitz, F. J., J. Verhoef, and A. C. Fluit. 1999. [Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme.](#) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18(6):414-421.
51. Tenover.F, Elvrum.P « Detection of two different kanamysin resistance genes in naturally occuring isolates of Campylobacter coli» Antimicrobial agents and chemotherapy, Aug 1988, p 1170-1173.
52. Livermore.D, Winstanly.T “ interpetive reading:reconisingthe unusualand inferringresistance mechanismsfrom resistancephenotypes., Journal of antimicrobial chemotherapy2001,48, s 87-102
53. Nemeč.A, Dolžani.L et al « Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-european Acineetobacter baumannii» journal of medical microbiology, 2004, 53 p 1233-1240
54. Alvarez.M, Mendoza.MC « Epidemiological survey of genes encoding aminoglycoside phosphotransferases APH (3) I and APH (3)-II using DNA probes» journal of chemotherapy, 1992 august 4 (4): 203-210.
55. Flamm RK, Phillips KL, Tenover FC, Plorde JJ “ A survey of clinical isolates of Enterobacteriaceae using a series of DNA probes for aminoglycoside resistance genes” Mol cell probes 1993 apr 7 (2) p 139-144.
56. Navas.J, Duran,S. Martinez.S, Salas, L “ Resistance to aminoglycosides in Corynebacterium striatum” Epidemiology of antimicrobial resistance, 2012.
  57. Ha Chler H, Sabtanam P, Kayser.H. F “Sequence and Characterization of Novel Chromosomal Aminoglycoside Phosphotransferase Gene, aph(3)-IIb, in Pseudomonas aeruginosa” Antimicrobial agents and chemotherapy. May 1996 p. 1254-1256 vol 40, No. 5
58. Okazaki.A, Avison.M « aph (3)-IIc an Aminoglycoside resistance determinant from Stenotrophomonas maltophilia» Antimicrobial agents and chemotherapy, jan. 2007, s 359-360.
59. Leff.L, Dana.J et al “ detection of Tn5-like sequences in kanamycin- resistant stream bacteria and environmental DNA” 1993, Applied and environmental microbiology,

60. Woegerbauer.M, Zeinzinger.J, Springer.B “Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa* in Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica subsp. enterica, and Staphylococcus aureus isolates in Austria” 2013, J Med Microbiol, November 2013.
61. De Vries J., Wackernagel W. (1998). Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. Mol. Gen. Genet., 257: 606-613.
62. [http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/dok/rapporter\\_planer/planer/1998/plan-for-a-motvirke-antibiotikaresistens.html?id=101959](http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/dok/rapporter_planer/planer/1998/plan-for-a-motvirke-antibiotikaresistens.html?id=101959)
63. <http://www.pnas.org/content/97/16/8944.figures-only>
64. Berg.D.E, Berg C.M et al, 1984 « Bacterial transposon Tn5: evolutionary inferences» Mol.Biol Evol. 1984, 1(5):411-422
65. Trun.N, Trempey.J « fundamental bacterial genetics» 2004, blackwell publishing, kapittel 5, side( 74-76)
66. Thomas.C.M, Nielsen.K.M, 2005 « Mechanisms of, and barriers to horizontal gene transfer between bacteria» Nature reviews. Microbiology, September 2005 volume 3, p 711-720.
67. <http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/content/uploads/2007/11/horizontaltransfer.gif>
68. Traavik.T, Heinemann,J « problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plant» Nature biotechnology, volum 22, nummer 9, september 2004.
69. Trun.N, Trempey.J « fundamental bacterial genetics» 2004, blackwell publishing, kapittel Transformasjon.
70. Netherwood.T, Bowden,R 1999 « Gene transfer in the gastrointestinal tract» applied environmental microbiology, November 1999, side (5139-5141)
71. Marks. L, Reddinger.R et al “High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in streptococcus pneumonia” 2012, mbio.asm.org October 2012 volum 3 issue 5, 200-212.
72. Nielsen.K.M, Johnsen.P.J, Benasson.D "Release and persistence of extracellular DNA in the environment", 2007, environ, biosafety Res 6 s (37-53) [www.ebr-journal.org](http://www.ebr-journal.org)
73. <http://www.genetik.uni-oldenburg.de/10227.html>
74. [http://www.pc.maricopa.edu/Biology/rcotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%209%20LB/Ch9b\\_print.html](http://www.pc.maricopa.edu/Biology/rcotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%209%20LB/Ch9b_print.html) Bacterial transformation (p. 274-275)
75. Nielsen.K.M, Van Elsas. J.D, Smalla.K “Dynamics, horizontal transfer and selection of novel DNA in bacterial populations in the phytosphere of transgenic plants” Annals of microbiology, vol 51, 2001, p 79-94.
76. Gebhard.F, Smalla.K “Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer” Antimicrobial agents and chemotherapy 17 june 1998,
77. Pontiroli.A, Rizzi.A, Simonet.P, « Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco» applied environmental microbiology, mai 2009, side ( 3314-3322 )
78. Nielsen.K, Van Elsas, Smalla.K “Transformation of Acinetobacter sp strain BD413(pFG4DnptII) with transgenic plant DNA in soil Microcosm and effects of kanamycin on selection of transformants” 2000, Applied and environmental microbiology, mars 2000, vol 66, no 3

79. Torsvik.V, Goksøyr.J, Daae.F.L, 1990 «High diversity in DNA of soil bacteria» applied environmental microbiology, mars 1990, side ( 782-787)
80. Bihn,T.C, Heuer.H, Smalla.K, “Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids” 28 Juni 2008
81. Forsberg.K, reyes.A, Wang.B “the shared resistome of soilbacteria and human pathogens” 2013. Nature review.
82. Small.K, Borin.S, Heuer.H, Gebhard.F, Van Elsas, Nielsen.K “Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria, Are there new data to fuel the debate?” 2000, 6th international symposium on the biosafety of GMOs page 146 -149
83. FDA “ Guidance for industry: use of antibiotic resistance marker genes in transgenic plants, draft guidance” sep, 1998
84. Paget.E, Lebrum.M “the fate of recombinant plant DNA in soil” Eur.J.Soil.Biol,. 34: p 81-88
85. Van overbeek. L, Ray.J van Elias.J.D “ Assessment of transformability of bacteria associated with tomato and potato plants” abstract pub.Med
86. Norwegian scientific committee for food safety “An assessment on potential long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway” 14 november 2005.
87. Jelenic.S “Controversy associated with the common component of most transgenic plants- Kanamycin resistance marker gene” Food technol. Biotechnology, vol 41, 2003, p 183-190.
88. Kummerer.K « Significance of antibiotics in the environment» journal of antimicrobial chemotherapy 2003, 52 p( 5-7)  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479711001782>
89. Heir.E, Steinbakk.M, Sidhu.M.S “Can disinfectants contribute to bacterial antibiotic resistance?” Tidskriften norsk legeförening 2001, nr 27, p 3201-6.
90. Oliveria.R, Wolters.A.C, van Elsas.J.D « Effects of antibiotics in soil on the population dynamics of transposon Tn5 carrying Pseudomonas. Fluorecens» Plant and soil august 1995, volum 175, nummer 2, side ( 323-333)
91. Lindbæk.M, Gradmann.C, Lie.A. K 2010 « Erindringer om antibiotikaresistensens historie i Norge» Tidsskriften Norsk legeförening, nr 24, 2010:130:2494-8.
92. Blix.H.S, Rønningen.M, 2008 «Antibiotikaforbruk i Norge» Tidsskriften Norsk legeförening, nr 20, 2008, 128: 2324-9
93. Heldal.E, Rønning K, Mannsåker.T “ Tuberkulose i Norge 2008-2009, med behandlingsresultater 2005-2008.
94. Food and drug administration FDA (department of health and human services) “ 2011 summary report on antimicrobials sold or distributes for use in food-producing animals” FDA journal 2011.
95. Sunnfjord. A “Antibiotiks til dyr og resistens hos bakterier fra dyr- betydning for menneskets helse” Tidskriften Norsk legeförening nr 21 2008, side 2457-2461.
96. Bogaard.A.E, Bruinsmed.N, Stoberingh,E.E “ The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands” journal of antimicrobial chemotherapy, 2000 vol 46 p 145-153.
97. Iversen.A, Kuhn.I et al “ High prevalende of vancomycin resistant enterococci in Swedish



sewage” applied and environmental microbiology, 2002, vol 68 No 6, p 2838-2842,

98. Borgen.K, Simonsen.G.S, Sundfjord.A, Olsvik.E, Kruse.H “ Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned” Journal of Applied Microbiology 2000, 89, 478-485
99. Kristiansson.E, Fick.J, Janzon.A « Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements» åpent publisert februar 2011.
100. Guardabassi.L, Petersen.A et al “Antibiotic resistance in Acinetobacter spp. Isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant” Applied and environmental microbiology 1998, vol 64, No 9, p 3499-3502.
101. “Health and environment evaluation regarding antimicrobial resistance marker genes in gene modified plants” 27/10.2005, Dok.nr 05/312-5)
102. Fuchs. R, et al « Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPT II) protein» biotechnology desember 1993, vol 11 s 1543-1546.
103. Unc,A, Gardner.J, Springthorpe.S, 2006 « Recovery of Echerichia.coli from soil after addition of sterile organic wastes» mars 2006 side ( 2287-2289)
104. Norris.T, Wraith.Castenholz,W 2002 « Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event» applied environmental microbiology december 2002 side (6300-6309)
105. Sen-yung, Tseng.C, Lee. S.Y “ Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF-MS” 2008 American soci<http://www.mcponline.org>
106. Forbes.B, Sahm.D “Diagnostic microbiology” 12th edition, Mosby Elsevier, 2007, kapittel 26, s 358-360.

## Appendix I

### Utstyrliste

Apparatur/bruk	Navn/forhandler	Merknader
PCR apparatur	Geneamp 9700 (Applied Biosystems)	
Sekvensering	ABI 3730 (Applied Biosystems)	Avd. Medisinsk genetik (HUS)
Riste maskin	Vortex grant Bio	
UV- lys til elektroforese	UVI pro chemi (BIO-RAD)	
Printer	Mitsubishi p91 fotoskriver.	
Elektroforese kar	Sub-Cell GT medium (BioRad)	
Pipette og spisser	Aerosol resistant (Molecular bioproducts)	cat.no 2279
DNA kvantitering	Nanoview (GEhealthcare)	Brukt ved Høgskolen I Berge

Reagenser	forhandler	Art.no	Kommentar
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied biosystems	4337450	Brukt uten buffer
Primere 10 mM	Invitrogen		Løst I PCR vann etter instruks fra produsent
GoTaq Hot Start Green MasterMix	Applied Biosystems	M5122	Brukt etter anvisning
R2A medium			Ferdig produsert pulver løst i sterilt vann.
Molecular biology grade water Dnase og Rnase free 0,1 filterert	Sigma-aldrich cheme	lot 42k2369	
One shot TOP 10 competent cells	invitrogen		Leveret I kit, med celler og egnet bakterie medium.(SOC-Medium)
Agencourt AMPure XP	(Beckman coulter)		
LB medium TSA medium/ kanamysin			Produsert av substrat laboratoriet Ved Haukeland universitetssykehus

TBE elektroforese buffer

5 X stamløsning

54 gram Tris Base (fw= 121,4g)

27 gram borsyre (FW=61,83g)

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

Justert vann mengde til 1 liter.

Arbeidsløsning laget ved å fortynne 5 X stamløsning 1:10 med destillert vann.

## Appendix 2: Supplerende data.

Rådata. ( undersøkelser av isolater)

Isolat	<i>aph(3)-I</i>	<i>aph(3)-II</i>	<i>aac(3)-II a/c</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>
K 1(3)	Pos	Neg	Neg	Neg
K 3(13)	Pos	Neg	Neg	Neg
K 1(4)	Neg	Neg	Neg	Neg
K 3(14)	Pos	Neg	Pos	Neg
K 4(5)	Neg	Neg	-	Neg
K 2(4)	Neg	Neg	Neg	Neg
K 1(7)	Neg	Neg	Pos	Neg
K 1(1)	Neg	Neg	Neg	Neg
K 1(2)	Neg	Neg	Neg	Neg
K 3(1)	Neg	Neg	Pos	Neg
K 4(10)	Pos	Neg	Pos	Neg
K 3(10)	Pos	Neg	Pos	Neg
K 4(14)	Pos	Neg	Pos	Neg
K 2(1) 10 <sup>2</sup>	Neg	Neg	Neg	Neg
K 3(6)	Neg	Neg	Pos	Neg
K 3(9)	-	-	Pos	-
K 3(16)	-	-	Pos	-
K 1(5)		Neg	Neg	Neg
K 2(1)	Neg	Neg	Neg	Neg
K 4(13)	Pos	Neg	-	-
K 4(16)	Pos	Neg	-	-
K 4(5)	Neg	Neg	Neg	Neg
K 1(1)2	Neg	Neg	-	-
S 7(4)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 3(4)	Neg	Neg	Neg	Neg
S 6(3)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 1(1) 10 <sup>4</sup>	Pos	Neg	Pos	Neg
S 1(11)	Pos	Neg	Neg	Neg

S 1(8)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 8(2)	Neg	Neg	Pos	Neg
S 7(2)	Neg	Neg	Pos	Neg
S 1(4)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 1(12)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 1(1)	Pos	Neg	Pos	Neg
S 5(1)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 4(4)	Pos	Neg	Neg	Neg
S 1(6) 10 <sup>3</sup>	Pos	Neg	Neg	Neg
S 6(1) 10 <sup>3</sup>	Pos	Neg	Neg	Neg
S 1(6)	Pos	Neg	Pos	Neg
S 1(4) 10 <sup>3</sup>	Pos	Neg	Neg	Neg
S 6(2)	-	Neg	Neg	Neg
S 8(3)	-	Neg	Neg	Neg
S 7(5)	-	Neg	Neg	Neg
KU 1(1)	Pos	Neg	Neg	Neg
KU 1(2)	Pos	Neg	Neg	Neg
KU 2(7)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 4(1)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 4(5)	Pos	Neg	Neg	Neg
KU 2(8)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 3(3)	Pos	Neg	Neg	Neg
KU 3(2)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 6(6)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 6(8)	Neg	Neg	Pos	Neg
KU 7(1)	Pos	Neg	Neg	Neg
KU 7(2)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 7(3)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 7(4)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 8(2)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 9(5)	Pos	Neg	Neg	Neg

KU 9(6)	Pos	Neg	Neg	Neg
KU 2(2)	Neg	Pos	Neg	Neg
KU 2(4)	Neg	Pos	Neg	Neg
KU 2(6)	Neg	Pos	Neg	Neg
KU 2 (2) 10 <sup>2</sup>	Neg	Pos	Neg	Neg
KU 3(4)	-	Pos	Neg	Neg
KU 9(2)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 6(2)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 3(5)	Neg	Neg	Neg	Neg
KU 3(8)	Neg	Neg	Neg	Neg