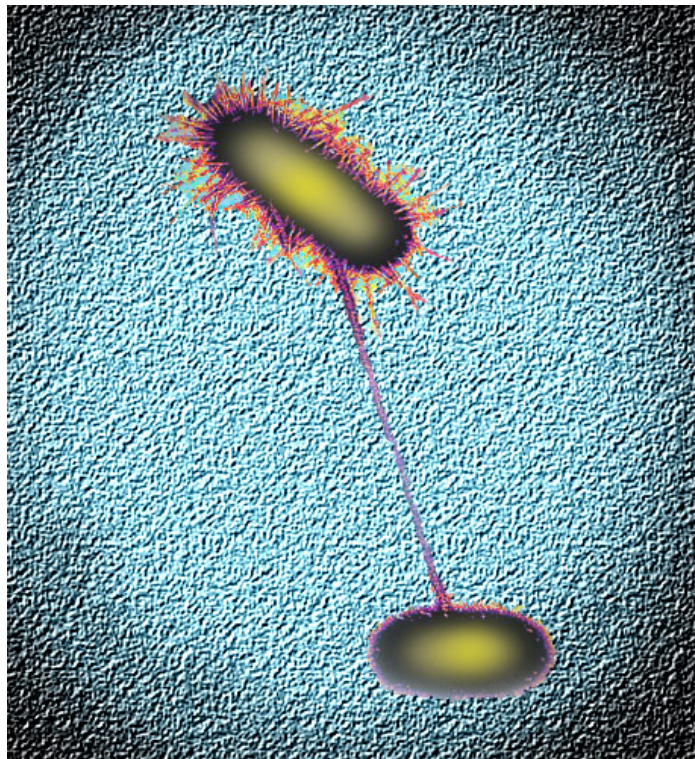




Overførbar antibiotikaresistens hos *Escherichia coli*.

Beathe Kiland Langerud



Masteroppgave, 60 studiepoeng
Oppdragsgiver: as Telelab, Skien





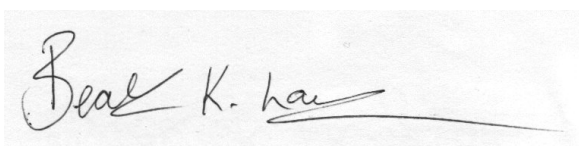
Tittel:	Overførbar antibiotikaresistens hos <i>Escherichia coli</i> .
Nøkkelord:	Antibiotikaresistens, plasmider, S1-PFGE
Forfatter:	Beathe Kiland Langerud
Studentnr.:	050402
Fagkode:	220911
Oppgavetype:	Masteroppgave
Studiepoeng:	60
Studium:	Masterstudium i natur-, helse- og miljøvern tilrettelagt for bioingeniører
Konfidensiell	Nei
:	



Forord

Denne masteroppgaven er en del av ”Mastergrad i natur-, miljø- og helsevern tilrettelagt for bioingeniører” ved Høgskolen i Telemark, avdeling for allmennfag, Bø. Det praktiske arbeidet er utført ved FoU-avdelingen ved as Telelab i Skien fra juni 2006 til desember 2007. Veiledere har vært Andrew Jenkins, PhD, forskningssjef as Telelab og Linda Strand, Cand. scient, forskningsingeniør as Telelab. Oppgaven inngår som en del av doktorgradsarbeidet til sistnevnte ved Universitetet i Tromsø.

Jeg vil rette en stor takk til mine to svært flinke veiledere som har vært tålmodige og alltid hatt noen minutter til overs for spørsmål. Stor takk rettes også til dr George A. Jacoby ved Lahey clinic i Massachusetts, USA for å ha gitt oss mottakerstammen *Escherichia coli* J53 Az^R, til stipendiat Umaer Naseer ved Universitetet i Tromsø for å ha hjulpet meg med pulsfeltprogrammet til S1-PFGE, samt til Anne Gry Allum for opplæring i PFGE. Til mine medstudenter Nina og Stig: Vil savne kompaniskapet på Bionors gamle kontor, men det er godt vi blir ferdige også. Til alle ansatte ved as Telelab: Takk for god mat og kaker, hyggelige samtaler og villig hjelp til en forvirret student. En takk må også rettes til biblioteket ved Høgskolen i Telemark avdeling Bø for god service, og selvfølgelig til mine venner og foreldre som har bidratt med psykisk og finansiell oppbakking.



Beate Kiland Langerud

Oslo 11.5.2008

Forsidebilde: Bakteriell konjugasjon. Kilde: <http://flickr.com/photos/ajc1/1103490291/>
(10.5.2008)

Abstract

Introduction: *Escherichia coli* is part of the normal faecal flora in humans and warm-blooded animals. The bacteria may also be the cause of extra-intestinal infections, i.e. nearly 80 % of uncomplicated urinary tract infections (UTIs). Development of resistance against antibiotics used in treatment of UTI is a well known and escalating problem worldwide. Amongst others, the resistance genes can spread between bacteria on plasmids. One has studied plasmid-mediated antibiotic resistance in two materials; 1) Faecal *E. coli* from healthy women, and 2) ciprofloxacin resistant urinary *E. coli* from out-patients diagnosed with uncomplicated UTIs.

Methods: Conjugation experiments (colony cross streak) were performed using 138 faecal *E. coli* (belonging to 20 clones) from healthy women and 35 urinary ciprofloxacin resistant *E. coli* (belonging to 25 clones) as donors. *E. coli* DH5 α pUC19 Nal^R or *E. coli* J53 Az^R were used as receivers in the primary conjugation experiments, while *E. coli* HB101 Str^R were used as a secondary receiver. Using disk diffusion tests and E-tests, the transipients from experiments with faecal *E. coli* were tested for antibiotic resistance against sulphonamide, trimethoprim and tetracycline while the transipients from experiments with ciprofloxacin resistant *E. coli* were tested for resistance against ampicillin, sulphonamide, trimethoprim, tetracycline, ciprofloxacin, nalidixic acid, chloramphenicol or kanamycin. Plasmid investigations were carried out using S1-PFGE, S1-nuclease cutting and restriction analysis.

Results: Eight out of 138 faecal *E. coli* possessed transferable antibiotic resistance against both sulphonamide and trimethoprim. None were able to transfer resistance against tetracycline. The eight isolates were all members of the same clone and shared equal resistance pattern. Generally, more plasmids were transferred to the primary transipients when using sulphonamide as a selection agent than when using trimethoprim. In the secondary conjugation experiments, the primary sulphonamide transipients were able to further transfer resistance while the primary trimethoprim transipients were not. Still the secondary transipients were resistant against both sulphonamide and trimethoprim. The resistance determinants can most likely be found at a non-conjugative plasmid sized ap. 7,8 kb (given the name pCTL5). The conjugative plasmid has not been defined, but is assumed to be a plasmid given the name pCTL3 (ap. 35 kb). Out of 35 urinary ciprofloxacin resistant *E. coli*

isolates, thirteen isolates belonging to 11 clones possessed transferable antibiotic resistance against one or more antibiotics. Totally 21 certain, and three uncertain, transipients were obtained. All resistance determinants were able to transfer using both direct and indirect selection, except against quinolones where only indirect selection gave growth of transipients. Using kanamycin as selection agent gave the most frequent growth of transipients, while it was resistance against ampicillin and/or sulphonamide that were the most frequent resistance determinants to be transferred. Plasmids found in the transipients varied in size from ap. 40 to ap. 240 kb.

Sammendrag

Innledning: *Escherichia coli* er en del av den fekale normalfloraen hos mennesker og varmblodige pattedyr, men kan også forårsake ekstraintestinale infeksjoner. Særlig kjent er den som etiologisk agens ved ukompliserte urinveisinfeksjoner. Resistensutvikling mot antibakterielle midler som brukes i behandlingen av UVI er et kjent problem, både på verdensbasis og i Norge. En av måtene resistens kan spres på er via plasmider. Man har undersøkt plasmidmediert overførbart resistens i to ulike materialer. Målet med oppgaven er å se hva overførbare plasmider har å si for resistensprofilen hos isolatene i de to ulike materialinnsamlingene.

Metoder: Det ble utført konjugasjonsforsøk (kolonikryssning på fast agar) med 138 fekale *E. coli* (tilhørende 20 kloner) fra friske kvinner og 35 ciprofloxacinresistente uropatogene *E. coli* (tilhørende 25 kloner) som donorer. *E. coli* DH5 α pUC19 Nal^R eller *E. coli* J53 Az^R ble benyttet som primære mottakere i konjugasjonsforsøkene og *E. coli* HB101 Str^R som sekundær mottaker. Ved hjelp av agardiffusjonstest og E-test ble transipientene fra det fekale normalmaterialet undersøkt for resistens mot sulfonamid, trimetoprim eller tetracyclin, mens transipientene fra det ciprofloxacinresistente UVI-materialet ble undersøkt for resistens mot ampicillin, sulfonamid, trimetoprim, tetracyclin, ciprofloxacin, nalidixinsyre, kloramfenikol eller kanamycin. Transipientenes og donorenes innhold av plasmider ble undersøkt med restriksjonskutting, kutting med S1-nuklease og S1-PFGE.

Resultater: Åtte av 138 isolater i det fekale normalmaterialet hadde overførbart resistens mot både sulfonamid og trimetoprim. Ingen overførte resistens mot tetracyclin. Alle isolatene med overførbart resistens tilhørte samme klon med likt resistensmønster. Generelt var flere plasmider overført fra donor til de primære transipientene selektert med sulfonamid, enn til de primære transipientene selektert med trimetoprim. I sekundære konjugasjonsforsøk fikk en kun overført resistens videre fra de primære sulfonamidtransipientene, ikke de primære trimetoprimtransipientene. De sekundære sulfonamidtransipientene var likevel resistente mot både sulfonamid og trimetoprim. Resistensdeterminant(e) satt mest sannsynlig på et ikke-konjugerbart plasmid med størrelse på ca 7,8 kb (gitt navnet pCTL5). De(t) konjugerbare plasmid(et)/ene er ikke bestemt, men er mest sannsynlig et plasmid på ca 35 kb (gitt navnet pCTL3).

Av 35 isolater i det ciprofloxacinresistente materialet hadde 13 stk, tilhørende 11 kloner, overførbar resistens mot ett eller flere antibiotika. Totalt fikk en vekst av 21 sikre transipienter, samt tre usikre. Resistens mot nalidixinsyre og/eller ciprofloxacin lot seg kun overføre ved indirekte seleksjon, mens resistens mot ampicillin, sulfonamid, trimetoprim, tetracyclin, kloramfenikol eller kanamycin lot seg overføre både ved direkte og indirekte seleksjon. Bruk av kanamycin som seleksjonsmiddel ga hyppigst vekst av transipienter, mens det var resistens mot ampicillin og/eller sulfonamid som var hyppigst(e) overført(e) resistendeterminant(er). Plasmidene som ble funnet i transipientene varierte i størrelse fra ca 40 kb til ca 240 kb.

Innholdsfortegnelse

FORORD

ABSTRACT

SAMMENDRAG

1. INNLEDNING.....	1
2. TEORI.....	5
2.1 ESCHERICHIA COLI	5
2.2 OVERFØRBARE GENELEMENTER	5
2.2.1 Plasmider.....	5
2.2.2 Resistensplasmider	6
2.2.3 Plasmidinkompatibilitet.....	7
2.2.4 Genkassetter, integroner, transposoner og ISCR-elementer	8
2.3 ANTIBIOTIKA OG ANTIBIOTIKARESISTENS	10
2.3.1 Antibiotika og virkningsmekanismer	10
2.3.2 Resistens og resistensmekanismer	10
2.3.3 Multiresistens forårsaket av endret permeabilitet eller effluks	11
2.3.4 Kloramfenikol.....	11
2.3.5 Sulfonamid.....	12
2.3.6 Trimetoprim.....	13
2.3.7 Tetracycliner.....	13
2.3.8 Aminoglykosider	14
2.3.9 Ampicillin	16
2.3.10 Kinoloner	17
2.4 GENETISK OVERFØRING.....	19
2.4.1 Transformasjon.....	19
2.4.2 Transduksjon	19
2.4.3 Konjugasjon.....	20
3. MATERIALE OG METODE	21
3.1 TEORETISK BAKGRUNN	21
3.1.1 Seleksjon og kontraseleksjon	21
3.1.2 Konjugasjonsforsøk	21
3.1.3 Plasmidisolering.....	23
3.1.4 Gelelektroforese	24
3.1.5 Kutting med S1-nuklease	25
3.1.6 S1-PFGE.....	26
3.2 BAKTERIESTAMMER	26
3.2.1 Mottakerstammer.....	26
3.2.2 Donorstammer	28
3.3 KONJUGASJONSFORSLØK	32
3.4 BESTEMMELSE AV ANTIBIOTIKAKONSENTRASJONER	33
3.5 RESISTENSUNDERSØKELSER	36
3.6 PLASMIDANALYSER.....	37
3.6.1 Små plasmider (< 11 kbp)	37
3.6.2 Store plasmider (> 11 kbp).....	38
3.6.3 Elektroforese: Størrelsesstandarder, farging og dokumentasjon	40
4. RESULTATER.....	41
4.1 BESTEMMELSE AV ANTIBIOTIKAKONSENTRASJON TIL BRUK I DYRKNINGSMEDIENE.....	41
4.2 FEKALT NORMALMATERIALE	43

4.2.1 Fekalt normalmateriale: Konjugasjonsforsøk	43
4.2.2 Fekalt normalmateriale: Resistensundersøkelse av transipienter	45
4.2.3 Fekalt normalmateriale: Plasmidanalyser	47
4.3 CIPROFLOXACINRESISTENT UVI-MATERIALE	57
4.3.1 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale: Konjugasjonsforsøk	57
4.3.2 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale: Resistensundersøkelse av transipienter	59
4.3.3 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale: Plasmidundersøkelser	64
5. DISKUSJON OG KONKLUSJON.....	69
5.1 METODEDISKUSJON.....	69
5.1.1 Konjugasjonsforsøk	69
5.1.2 Kutting med S1-nuklease	70
5.2 FEKALT NORMALMATERIALE	70
5.3 CIPROFLOXACINRESISTENT MATERIALE	74
5.4 KONKLUSJON	81
LITTERATUR	83
VEDLEGG.....	102

1. Innledning

Escherichia coli ble ”oppdaget” av den tyske barnelegen og mikrobiologen Theodor Escherich i 1885 (Schulman, Friedman et al. 2007). Bakterien har sitt naturlige reservoar som en del av normalfloraen i tykktarm hos mennesker og varmblodige pattedyr, men den kan også være årsaken til tarminfeksjoner, urinveisinfeksjoner (UVI), neonatal meningitt, peritonitt, mastitt, sepsis og pneumoni (Degré, Hovig et al. 2000).

I 1928 oppdaget Alexander Fleming det første antibiotikumet, penicillin, ved en tilfeldighet og i begynnelsen av 40-årene begynte man å ta det i bruk til behandlingen av infeksjonssykdommer (Chain, Florey et al. 1993). I 1943 isolerte man det andre antibiotikumet, streptomycin (Schatz, Bugie et al. 2005), som er det første i rekken av aminoglykosider. I tillegg hadde man i slutten av 1930-årene startet bruken av sulfonamider, som var det første antibakterielle middelet som ble produsert i storskala (Sköld 2000), og man trodde at infeksjonssykdommene kunne utryddes fra verdens problemer. Denne illusjonen varte ikke lenge: Selv før penicillin ble sluppet ut på markedet var penicillin-nedbrytende enzymer oppdaget (Abraham og Chain 1940).

Det var i *E. coli* man for første gang oppdaget at bakterier kunne utveksle gener seg imellom via direkte celle- til cellekontakt (konjugasjon) (Tatum og Lederberg 1947), noe som har vært viktig for forståelsen av hvordan antibiotikaresistens spres. Andre mekanismer for overføring av genmateriale fra en celle til en annen er transformasjon (Avery, MacLeod et al. 1995) og transduksjon (Zinder og Lederberg 1952). Overføring av genmateriale ved transformasjon vil ikke kunne skje hos *E. coli* under fysiologiske forhold, men det er vist å ha funnet sted i vann (Woegerbauer, Jenni et al. 2002). Genomiske mutasjoner står også bak en stor del av resistensutviklingen og *E. coli* har vist seg å ha en svært høy mutasjonsrate, hvilket kan være av betydning for raskt utvikling av resistens (Perfeito, Fernandes et al. 2007).

Spredning av resistens er avhengig av flere faktorer, der en av dem er seleksjonspress som følge av bruk av antibiotika. En annen faktor er hvor effektiv de eventuelle overføringsprosessene er (Datta 1984). Spredningen kan skje på to nivåer: Klonal spredning av resistente bakterier som spres mellom pasienter eller horisontal spredning der transposoner

eller plasmider overføres fra bakterie til bakterie via konjugasjon, transduksjon eller transformasjon (Gaustad 2001). For resistensutbredelsen blant uropatogene *E. coli* i Europa er det vist at horisontal spredning spiller en større rolle enn klonal spredning (Landgren, Odén et al. 2005; Blahna, Zalewsk et al. 2006).

Bakterieinnholdet i kolon utgjør cirka 60 % av den fekale massen (O'Hara og Shanahan 2006), der fakultative bakterier som bl.a. *E. coli* utgjør 0,1-1 % (Finegold, Sutter et al. 1983). I tarmmiljøet vil det kunne skje overføring av resistensdeterminanter fra *E. coli* til *E. coli* eller fra beslektede bakterier som f. eks *Salmonella spp* eller *Shigella spp* til *E. coli* og vice versa (Corliss, Cohen et al. 1981). Tilstedeværelsen av antibiotikaresistente *E. coli* med mulighet for overføring av resistens til andre bakterier i tarmen vil kunne ha stor klinisk betydning. Dette fordi bakteriene i tykktarmen kan gi infeksjoner i andre deler av kroppen, som f. eks urinveisinfeksjoner (UVI) (Brumfitt, Faiers et al. 1971), samt at tarmen er et viktig reservoar for resistensgener (Søgaard 1975).

Urinveisinfeksjoner forekommer hyppig hos kvinner på grunn av deres korte uretra. I en studie fra USA estimeres det at ca 60 % av alle kvinner har UVI en gang i løpet av livet (Foxman, Barlow et al. 2000). *E. coli* er årsak til ca 80 % av tilfellene med ukomplisert UVI, mens den ved nosokomial eller komplisert UVI er en mer sjelden årsak (20-30 %) (Jureen, Digranes et al. 2003; Kahlmeter 2003).

Resistensforhold for uropatogene *E. coli* i Europa og Telemark og for *E. coli* fra fekal normalflora rundt år 2000 er sammenfattet i tabell 1. Tetracyclin, kloramfenikol og kanamycin brukes ikke/brukes sjelden til behandling av UVI, og resistensforhold mot disse antibiotika hos *E. coli* isolert fra humane urinveisinfeksjoner eller fra normal human fekal flora har man derfor begrensede data på.

Tabell 1: Resistensforhold hos *E. coli* isolert fra urinveisinfeksjoner eller fra tarm hos friske kvinner rundt årtusensskiftet.

Antibiotika	Antall % resistente <i>E. coli</i> fra UVI hos polikliniske pasienter.				Antall % resistente* <i>E. coli</i> fra tarm hos friske kvinner
	Europa og Canada ¹ (n = 2468)	Norge ¹ (n = 168)	Telemark ² (n = 15 506)	Telemark og Oslo ³ (n = 31)	Telemark og Oslo ^{3,4} (n = 138)
Ampicillin	29,8	23,8	21,6	100	100
Sulfonamid	29,1	25,0	24,8	68	39,9
Trimetoprim	14,8	13,1	17,3	16	19,6
Trim-sulfa	14,1	11,3	13,7	-	-
Nalidixinsyre	5,4	1,2	-	3	0,7
Ciprofloxacin	2,3	0	-	0	0
Mecillinam	1,2	0	3	10	0
Nitrofurantoin	1,2	0	2,5	3	0
Gentamicin	1,0	0	-	3	0
Kloramfenikol	-	-	-	6	2,2
Tetracyclin	-	-	-	97	76,8

*: Intermediære er regnet som resistente.

1: Kahlmeter 2003, 2: Grude, Tveten et al. 2001, 3: Grude, Potaturkina-Nesterova et al. 2007, 4: Upublisert, Telelab

Studiens formål

Målet med denne studien var å se på overførbar resistens hos *E. coli*. Man screenet to materialsamlinger: Et som består av *E. coli* fra tarmflora hos friske kvinner og et som består av ciprofloxacinresistente *E. coli* isolert fra urin hos pasienter med urinveisinfeksjon.

Fekalt normalmateriale stammer fra NORCCAP-studien (Bretthauer, Gondal et al. 2002) og består av 138 isolater av *E. coli* isolert fra kolon hos 10 friske kvinner under og 1 måned etter koloskopi. I en tidligere studie er det blitt utført resistensbestemmelse og måling av MIC-verdier, samt at isolatene er inndelt i 20 kloner etter PFGE-mønster (se vedlegg 1) (Grude, Potaturkina-Nesterova et al. 2007). Det er tidligere også funnet at det fekale normalmaterialet

viste variasjon i resistensmønster innad i klonene (upublisert, as Telelab), og man ønsket derfor å se om overførbare resistensplasmider var årsaken til dette.

De ciprofloxacinresistente UVI-stammene ble isolert fra polikliniske urinprøver mottatt hos as Telelab fra pasienter med symptomer på urinveisinfeksjon i 2003. Stammene viste seg i stor grad å være multiresistente (97 %) (se tabell 5a og b for resistensmønster) og tilhøre 25 ulike PFGE-klasser, der 19 av klassene kun inneholdt én stamme. To hadde ESBL-produksjon (Skudal, Grude et al. 2006). Man ønsket å se om overførbare plasmider kunne være medvirkende årsak til den store graden av multiresistens.

Til å undersøke om isolatene i de to ulike innsamlingene kunne overføre antibiotikaresistens ble det benyttet konjugasjonsforsøk, resistensanalyser og plasmidanalyser. Man ønsket at dette ville gi svar på hvor stor andel av stammene som bar overførbare resistensdeterminanter, hvilken resistensprofil mottakeren i konjugasjonsforsøket fikk overført og omtrentlig(e) størrelse(r) på de(t) overførte plasmidet/ene.

2. Teori

2.1 *Escherichia coli*

Slekten *Escherichia* tilhører familien *Enterobacteriaceae* sammen med blant annet *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* og *Yersinia*. Bakterien er en gram-negativ, bevegelig, ikke-sporulerende og fakultativt anaerob stav. *Escherichia coli* kan deles inn i undergrupper, blant annet ved typing av somatiske O-antigener, H-antigener (flageller) og bestemmelse av toksinproduksjon. *E. coli* som gir urinveisinfeksjoner kalles uropatogene *E. coli* (UPEC) og stammer som oftest fra pasientens egen tarmflora (Degré, Hovig et al. 2000; Mims, Dockrell et al. 2004).

I tillegg til å være en del av den naturlige tarmfloraen og hovedårsak til UVI brukes *E. coli* som indikatorbakterie for å avsløre fekal forurensing i vann (Edberg, Rice et al. 2000) og som ”arbeidshest” innenfor molekylærbiologisk forskning.

2.2 Overførbare genelementer

2.2.1 Plasmider

Plasmider er ekstrakromosomalt, dobbelttrådig og vanligvis sirkulært DNA som replikeres uavhengig av kromosomet i en bakteriecelle. Størrelsen kan variere fra små plasmider på mindre enn 1,5 kb til megaplasmider på over 600 kb. De klassifiseres som konjugerbare dersom de kan sette i gang sin egen overføring til en ny celle ved dannelsen av konjugasjonspili eller som mobiliserbare dersom de er avhengig av tilstedeværelsen av et konjugerbart plasmid å kunne overføres sammen med. Mobiliserbare plasmider er ofte små, 6 – 18 kb, og lar seg overføre med høy frekvens, mens konjugative plasmider vanligvis er større enn 30 kb. Det første konjugerbare plasmidet som ble identifisert i enterobakterier er F-faktoren, og senere fant man de colicigene (Col) plasmidene og R-plasmidene. Plasmidene kan tapes spontant fra bakterien eller ved hjelp av enkelte behandlinger (f. eks plasmid curing med acridin orange) og de kan ankomme bakterien via horisontal overføring (Clowes 1972; Novick 1987). Det er vist at plasmider er en biosyntetisk byrde for cellen, hvilket fører til at

celler som inneholder plasmider ofte har en høyere generasjonstid enn celler uten plasmider (Zünd og Lebek 1980).

Med begge trådene kovalent bundet kalles det sirkulære DNA-elementet ”covalent closed circular (ccc)”, som vil kunne få en supervridd form. Ved et kutt i en av trådene vil en få en ”open circular” form og ved et kutt i begge trådene vil det sirkulære DNA-elementet linealiseres dersom kuttene ligger vis a vis for hverandre. Intracellulært antas det at fra 27 % til 44 % av plasmidene er i ccc-form (Bujard 1968; Clewell og Helinski 1970; Freifelder, Folkmanis et al. 1971).

Plasmider finnes hos både gram-negative og gram-positive bakterier, der de hos gram-positive bakterier vanligvis er non-konjugative og hos gram-negative bakterier vanligvis er konjugative. Når derimot non-konjugative plasmider fra en gram-positiv bakterie settes inn i en gram-negativ bakterie kan de skifte karakter til å bli konjugative, og det antas derfor at denne egenskapen er mer knyttet til celleveggen hos bakterien enn til selve plasmidet (Davies og Smith, 1978).

Plasmider kan være til stede hos både antibiotikasensitive og antibiotikaresistente *E. coli*, men da i større omfang og antall blant de resistente isolatene (Platt, Sommerville et al. 1984).

Plasmider er heller ikke et resultat av antibiotikabruk, da de er vist å ha vært til stede i bakterier før antibiotikaens inntog i verden (Hughes og Datta 1983).

2.2.2 Resistensplasmider

Historien bak oppdagelsen av R-plasmidene starter i Japan på slutten av 1950-tallet, der de etter en epidemi med bacillær dysenteri forårsaket av *Shigella flexneri* fant at resistens mot de ulike antibiotika som ble brukt i behandlingen (sulfonamid, kloramfenikol, tetracyclin og streptomycin) i flere tilfeller lot seg overføre til *E. coli* og vice versa. Dette ble i følge en reviewartikkel av Watanabe (Watanabe 1963) først oppdaget av Ochiai et al i 1959 og året etter av Akiba et al, men disse studiene gikk Vesten forbi da de var skrevet på japansk. Senere i 1960 ble det vist at resistensdeterminanten satt på et agens som var forskjellig fra F-faktoren, uavhengig av kromosomet og lot seg overføre ved direkte celle-til-celle kontakt (konjugasjon) (Mitsubishi, Harada et al. 1960). Agenset ble av dem gitt navnet ”R-faktor”. Senere er dette endret til R-plasmid (Novick, Clowes et al. 1976). I 1961 ble det første direkte beviset for at

R-faktorene består av DNA presentert (Marmur, Rownd et al. 1961) og i 1962 kom man frem til at DNA kan ha en sirkulær, dobbeltrådig form (Fiers og Sinsheimer 1962).

Det første funnet av et resistensplasmid i Europa ble presentert i England etter et sykehusutbrudd av *Salmonellae spp* (Datta 1962). Året etter, i Tyskland, kom det første publiserte funnet av resistensplasmider i *E. coli* (Lebek 1963a; Lebek 1963b). Det er også interessant at det ble funnet overførbar resistens mot streptomycin hos *E. coli* i Norge i 1962, mediert av noe som man i ettertid forstår kan ha vært et resistensplasmid (Gundersen, Jyssum et al. 1962).

Resistensplasmider kan være ustabile slik at de mistes ved manglende selektivt press, men det skjer også at bakterier bevarer og overfører plasmidinnholdet til nye generasjoner selv i omgivelser frie for antibiotika. Dette kan tyde på at plasmidene også bærer andre gener som er nyttige for verten (Smith og Halls 1966; Davies og Smith 1978). Det finnes flere mekanismer for vedlikehold av plasmidinnhold i celler. Eksempler inkluderer oppløsning av plasmidmultimerer til monomerer så de får et høyere kopiantall og dermed blir vanskeligere å miste under deling, toxin-antitoxinsystemer som selektivt dreper plasmid-frie celler, og delingsmekanismer som aktivt fordeler plasmider til dattercellene under celledelingen slik at færre blir plasmidløse tross lavt kopiantall (Zielenkiewicz og Ceglowski 2001).

Overføring av resistens via R-plasmider er vist både *in vitro* i buljong/agarskåler, i mikromiljøer (Freter, Freter et al. 1983; Kruse og Sørnum 1994) og *in vivo* i mennesker (Platt, Chesham et al. 1986) – også i tilfeller uten seleksjonspress (Petrocheilou, Grinsted et al. 1976).

2.2.3 Plasmidinkompatibilitet

Plasmidinkompatibilitet defineres vanligvis som den manglende evnen to plasmider har til å arves sammen uten varig, ytre seleksjonspress (Novick, Clowes et al. 1976). Plasmider som er inkompatible sies å være beslektede og mest sannsynlig ha en evolusjonsmessig felles stamfar. Dette viser seg ved at inkompatible plasmider har elementer involvert i replikasjonskontroll og delingsmekanisme til felles (Couturier, Bex et al. 1988).

Til nå er det funnet 26 ulike inkompatibilitetsgrupper blant plasmider i *Enterobacteriaceae* (Johnson, Wannemuehler et al. 2007). Noen plasmider lar seg gruppere i flere inkompatibilitetsgrupper og et gen som koder for antibiotikaresistens kan finnes på plasmider av ulike inkompatibilitetsgrupper (Datta 1977).

Den første måten R-plasmider ble delt inn i undergrupper på var å se om plasmidet undertrykket F-faktor i cellen (= f_i^+) eller ei (= f_i^-) (Nakaya, Nakamura et al. 1960). Det er blitt rapportert at to f_i^+ -plasmider alltid er inkompatible, mens enkelte grupper f_i^- -plasmider kan eksistere i samme celle. Et f_i^+ -plasmid og et f_i^- -plasmid vil alltid kunne eksistere sammen (Watanabe, Nishida et al. 1964; Datta og Hedges 1971). F_i^+ er nå synonymt med inkompatibilitetsgruppe F (Couturier, Bex et al. 1988). Den nyeste måten å bestemme inkompatibilitet på er ved bruk av PCR til å utføre replikontyping (Carattoli, Bertini et al. 2005; Johnson, Wannemuehler et al. 2007).

2.2.4 Genkassetter, integroner, transposoner og ISCR-elementer

Genkassetter, integroner og transposoner er viktige årsaker til utvikling og utbredelse av resistens og multiresistens (Hall og Collis 1995; Leverstein-vanHall, Blok et al. 2003).

Transposoner er genetiske elementer som er i stand til å forflytte seg selv. De ble oppdaget for første gang i mais (McClintock 1950) og overføring av antibiotikaresistens som følge av transposoner ble presentert for første gang i 1974 (Hedges og Jacob 1974). Den enkleste formen for transposon er IS (Insertional Sequence)-elementer. Størrelsen på disse kan variere fra ca 0,5 kb til ca 2,5 kb, hvilket gjør at de sjelden kan inneholde mer enn ett til to gener. De fleste inneholder åpne leserammer som koder for transposase, og avgrenses av korte, inverterte og repeterende ender. Sammensatte transposoner består av to, ofte inverst repetererte, kopier av et IS-element som flankerer en sentral genregion der den sentrale genregionen bl.a. kan inneholde resistensgener (Bennett 2004). Enkelte transposoner kan la seg overføre direkte til nye celler via konjugasjon, ofte fra kromosomet og via et sirkulært, dobbelttrådig intermediat. Etter konjugasjonen vil de gå inn på et plasmid eller på kromosomet. Disse kalles da konjugative transposoner (Salyers, Shoemaker et al. 1995).

Genkassetter er små, flyttbare elementer som vanligvis kun inkluderer ett enkelt gen og et spesifikt rekombinasjonssete (*attC*-sete) kalt "59 base element" nedstrøms for genet. Til nå er

det funnet over 40 ulike kassetter som varierer i størrelse fra 262 bp til 1549 bp.

Genkassetene sitter vanligvis integrert i et integron eller på et annet uspesifikt sted, men de kan også eksistere midlertidig som frie, sirkulære og ikke-replikerende elementer (Recchia og Hall 1995).

Integroner er genetiske elementer som kan fange opp og uttrykke genkassetter. Integronene inneholder et *intl*-gen som koder for integrase på 3' ende, et integrasjonssete for en eller flere genkassetter (*att*) og en promoter på 5'ende. Integronene kan deles inn i to hovedgrupper: Resistensintegroner som kan sitte både på plasmider og på kromosomet, og superintegroner som er større og sitter på kromosomet. Videre kan resistensintegronene klassifiseres etter hvilket *intl*-gen de bærer, der 3 ulike klasser er kjent til nå (Fluit og Schmitz 2004). Klasse 1 integroner er den største klassen og inneholder i de fleste tilfeller genet *sulI*, hvilket koder for sulfonamidresistens (Ploy, Lambert et al. 2000). Disse bæres av Tn21-liknende transposoner (Bennett 2004). Klasse 2 integroner inneholder vanligvis gener som koder for resistens mot trimetoprim og streptomycin og har et ikke-funksjonelt *intl*-gen. Det ikke-fungerende *intl*-genet gjør at klasse 2 integroner ikke kan fange opp nye genkassetter og rekkefølgen av resistensgener er av den grunn stasjonær. Arketyper av klasse 2 integroner sitter i Tn7-familien av transposoner. Kun ett tilfelle av klasse 3 integroner er kjent, og resistensgener i *Enterobacteriaceae* er kun kjent i integroner tilhørende klasse 1 og 2 (Ploy, Lambert et al. 2000; Bennett 2004; Fluit og Schmitz 2004; Peirano, Agersø et al. 2005). Uttrykket til genkassetene som sitter i et integron er posisjonsavhengig, der de genkassetter som ligger nærmest promotoren har et sterkere gnuttrykk enn de kassetter som sitter lengre fra promotoren (Colliss og Hall 1995).

I tillegg til de ovennevnte viktige bidragene til spredning og utvikling av antibiotikaresistens finnes de såkalte "common regions" (CR) som først ble oppdaget i 1990 (Stokes, Tomaras et al. 1993). CR er antatt å replikere via en "rolling circle" modell og kan da ta med seg nærliggende gener (Tavakoli, Comanducci et al. 2000).

2.3 Antibiotika og antibiotikaresistens

2.3.1 Antibiotika og virkningsmekanismer

Antibakterielle midler kan klassifiseres på tre måter:

- etter virkningsmekanisme (se tabell 2)
- ved om de er bakteriocide eller bakteriostatiske
- ved kjemisk struktur

Tabell 2: Oppsummering av de ulike seleksjonsmidler som er benyttet i oppgaven og hvilke familier og virkningsmekanismer disse har (Tenover 2006).

Familie	Virkningsmekanisme	Benyttet i oppgaven
Beta-laktamer Glykopeptider Bacitracin	Hemming av celleveggsyntese	Ampicillin - -
Polymyxiner	Virkning på cellemembranen	-
Aminoglykosider Tetracyclin Amfenikoler Makrolider Lincosamider Steroider Spectinomycin Muporocin	Hemming av proteinsyntese	Kanamycin Doxycyclin Kloramfenikol - - - -
Nitrofurantoin Nitroimidazoler Kinoloner Rifampicin	Hemming av nukleinsyresyntese	- - Nalidixinsyre, ciprofloxacin -
Sulfonamider Trimetoprim	Hemming av essensielle metabolske trinn i cellen	Sulfamethoxazol Trimetoprim

2.3.2 Resistens og resistensmekanismer

Resistens mot antibakterielle midler kan skyldes naturlig forekommende kromosomale gener (eks: *ampC*) og multiresistens-efflukssystemer, eller ervervet resistens som følge av genmutasjoner eller overføring av resistensdeterminanter båret på plasmider, i bakteriofager eller på transposoner (Alekhun og Levy 2007).

2.3.3 Multiresistens forårsaket av endret permeabilitet eller effluks

Overaktive efflukspumper eller endret permeabilitet kan forårsake multiresistens hos *E. coli*, og bakterien har minst ni ulike proton-avhengige efflukspumper som kan gi resistens mot flere ubeslektede antibiotika. Genene som koder for disse efflukspumpesystemene kan deles inn i tre familier:

- 1) ”Major facilitator superfamily” (MFS): *emrD*, *mdfA*, *emrB*
- 2) “Resistance nodulation-cell division family” (RND): *acrB*, *acrF*, *acrD*, *yhiV*
- 3) “Small multidrug resistance family” (SMR): *emrE*, *tehA*

Av disse er det RND-familien som står bak de viktigste effluks-systemene i *E. coli*.

(Pidcock 2006; Viveiros, Dupont et al. 2007)

Genuttrykket til genene i RND-familien styres bl.a. av transkripsjonsaktivatoren MarA (multiple antibiotic resistance) (Jellen-Ritter og Kern 2001). Denne kodes for av en transkripsjonell enhet kalt *mar*, som ble oppdaget i *E. coli* i 1983 etter seleksjon med lave nivåer tetracyclin og kloramfenikol (George og Levy 1983; Cohen, Hächler et al. 1993). Mutasjoner i *mar* er vist å gi resistens mot flere ulike antibiotika, inkludert tetracyclin, kloramfenikol, betalaktamer og kinoloner. Dette skyldes økt aktivering av AcrAB eller AcrEF efflukspumpen, samt minsket uttrykk av outer membrane protein (omp) F-porinet (Franklin 1967; Cohen, McMurry et al. 1989; Cohen, Hächler et al. 1993; Goldman, White et al. 1996).

2.3.4 Kloramfenikol

Kloramfenikol er et bredspektret, bakteriostatisk, antibakterielt middel som ble isolert for første gang i 1947 (Ehrlich, Bartz et al. 1947). Medikamentet binder seg reversibelt til 50 S ribosomal subenhet og på den måten inhiberes peptidyltransferase-trinnet under translasjonen slik at dannelsen av peptidbindinger hindres (Gale og Folkes 1953; Hurwitz og Braun 1967).

Resistens mot kloramfenikol kan forårsakes av både endret transport av medikament over cellemembranen (Gaffney, Cundliffe et al. 1981) og mutasjoner i det ribosomale bindingssetet for kloramfenikol (Baugman og Fahnestock 1979), men den viktigste årsaken er episomal og skyldes en induserbar acetyltransferase (chloramphenicol acetyl transferase, CAT, *cat*). Som navnet tilsier acetylerer CAT hydroksylgrupper på medikamentet slik at dette detoxifiseres (Shaw 1983). Ved lavgradig resistens er årsaken vanligvis endret permeabilitet, mens

høygradig resistens i de fleste tilfelles skyldes CAT. CAT-gener er ofte funnet på store multiresistensintegroner (Schwarz, Kehrenberg et al. 2004)

2.3.5 Sulfonamid

Sulfonamid, et bakteriostatisk antibakterielt middel, ble tatt i bruk klinisk i 1935 og resistens mot dette antibiotikumet var en av de første R-plasmid-egenskapene som ble oppdaget (Sköld 1976).

Til produksjon av blant annet puriner og pyrimidiner trengs dihydrofolatsyre. Nest siste trinn i dannelsen av dihydrofolatsyre er en kondensasjonsreaksjon mellom p-aminobenzosyre (PABA) og 7,8-dihydro-6-hydroxymetylpterin-pyrofosfat (DHPPP), der enzymet dihydropteroat syntase (DHPS) virker som katalysator. Sulfonamid konkurrerer med PABA for binding til DHPS og hindrer dermed kondensasjonsreaksjonen (Sköld 2000).

Plasmidmediert resistens mot sulfonamid er det klinisk viktige i enterobakterier og skyldes et alternativt *folP* gen (*su1*) som koder for produksjonen av en DHPS med lavere affinitet for sulfonamid enn villtypegenet gjør (Wise og Abou-Donia 1975). I gram-negative bakterier er det til nå funnet tre varianter av det plasmidmedierte genet: *su1*, *su2* og *su3*. Den første av disse, *su1*, assosieres vanligvis med klasse I integroner sammen med andre resistensdeterminanter. Genet *su2* er hovedsakelig funnet på små, ikke-konjugative plasmider, men kan også være til stede på større, konjugative plasmider (Rådström, Swedberg et al. 1991; Ploy, Lambert et al. 2000; Sköld 2000; Enne, Livermore et al. 2001). Det sist oppdagede genet, *su3*, ble oppdaget hos svin i Sveits (Perreten og Boerlin 2003). Hos humane isolater av *E. coli* i Skandinavia er det funnet i Sverige og Danmark, men foreløpig ikke i Norge (Grape, Sundström et al. 2003; Kern, Klemmensen et al. 2006). *Su3* er i likhet med *su1* assosiert med klasse I-integroner (Antunes, Machado et al. 2007; Sunde, Solheim et al 2008).

Ifølge en artikkel av Akiba og Yokota publisert i 1961 (Watanabe 1963) kan resistens mot sulfonamid også forårsakes av minsket permeabilitet, men dette er ikke kjent å skyldes en overførbar resistensdeterminant. Det kan også ligge spontane kromosomale mutasjoner i *folP* bak resistensutviklingen (Sköld 2000).

2.3.6 Trimetoprim

Trimetoprim ble tatt i bruk først i England i 1962, og etter 1968 ofte i kombinasjon med sulfonamid for å bremse utvikling av resistens og fordi de ble antatt å være synergistiske. Senere er synergismen mistenkt å kun være et *in vitro*-fenomen (Huovinen, Sundström et al. 1995). Trimetoprim, i likhet med sulfonamid, hindrer dannelsen av tetrahydrofolatsyre. Mekanismen er inhibering av enzymet dihydrofolat reduktase (Hitchings 1969).

Plasmidbåren resistens mot trimetoprim ble beskrevet i 1972 (Fleming, Datta et al. 1972) og skyldes produksjon av en alternativ dihydrofolat reduktase (DHFR, *dfr*) som er resistent mot trimetoprim (Amyes og Smith 1974). Det alle fleste *dfr* sitter i en genkassett, selv om det også er funnet varianter som sitter på små plasmider sammen med gener for resistens mot sulfonamid eller aminoglykosider. Gener som koder for den vanligste enzymtypen (DHFR type I) sitter ofte i klasse 2 integroner på transposon Tn7, selv om sammenhengen ikke alltid er til stede (Steen og Sköld 1985; Heikkilä, Sundström et al. 1991). Et gen som koder for den samme enzymtypen er også funnet i klasse 1 integroner på det beslektede transposonet Tn21 (Tsakris, Johnson et al. 1993). Som kjent er integroner av klasse I ofte bærere av *sul1*, og bruken av trimetoprim-sulfonamid i kombinasjon antas derfor å ha bidratt til spredningen av disse integronene (Huovinen, Sundström et al. 1995).

I en studie av horisontal overføring av trimetoprim og/eller sulfonamidresistens i Europa og Canada ble resultatet at de enkelte resistensdeterminantene var likt distribuert i de ulike geografiske områdene, mens fordelingen av integroner så ut til å ha en regional variasjon som kan forklares med ulikt selektivt press. Blant isolatene fra Norge ble det funnet følgende genkombinasjoner:

- i) *sul1*, klasse I integron, *dfrA1*
 - ii) *sul 1* og *sul 2*, ingen integroner
 - iii) *sul 1* og *sul 2*, klasse I integron, *dfrA12*
- (Blahna, Zalewsk et al. 2006)

2.3.7 Tetracycliner

Det første medlemmet i gruppen tetracycliner, klortetracyclin, ble oppdaget i 1947 etterfulgt av oxytetracyclin. I 1952 kom det første syntetiske derivatet, tetracyclin, og senere kom doxycyclin og minocyclin. Sist ute er tigecyclin som kom i 2005 og som ikke lar seg påvirke

av resistensmekanismene som gir resistens mot de tidligere tetracyclinene (Roberts 1996; Olson, Ruzin et al. 2006). Tetracyclinene virker ved å binde seg reversibelt til 16S-delen av 30S ribosomal enhet. Dermed hindres binding av aminoacyl-tRNA til akseptorsetet (A) på ribosomene og proteinsyntesen stoppes (Connamacher og Mandel 1965).

Resistens mot tetracyclin kan skyldes en eller flere av følgende mekanismer (Chopra og Roberts 2001):

- Redusert opptak som følge av endring av poriner som f. eks OmpF. Resistensmekanismen gir ofte resistens mot andre ubeslektede antibiotika samtidig.
- Membranassosierte, inducible Tet-proteiner som øker effluksen. Dette er den mest studerte resistensmekanismen.
- Enzymatisk modifisering av tetracyclin slik at medikamentet blir inaktivt og diffunderer ut av cellen. Hos *E. coli* gir dette resistens kun under aerobe forhold.
- Beskyttelse av ribosomet vha et EF-G liknende protein. Mekanismen er mindre kjent enn effluks, men antas å være mer utbredt.

Til nå er det kjent 29 ulike tetracyclin-resistensgener (*tet*) og tre oxytetracyclin-resistensgener (*otr*). Betegnelsen *otr* gjenspeiler kun at genet ble oppdaget i en organisme som produserte oxytetracyclin og ikke at det har ulik funksjon i forhold til *tet*-genet (Chopra og Roberts 2001). Genene kan kode både for efflukspumper, for proteiner som beskytter ribosomet og for enzymatisk modifisering. Flertallet av *tet*-genene er assosiert med store plasmider, transposoner, konjugerbare transposoner og integroner som i mange av tilfellene også bærer resistens mot tungmetaller, toksiner eller andre antibiotika. Særlig kjent er koblingen til *erm(B)*, som gir resistens mot makrolider, lincosamider og B streptograminer eller koblingene til gener som koder for kanamycinresistens eller kloramfenikolresistens (Speer, Shoemaker et al. 1992; Chopra og Roberts 2001).

2.3.8 Aminoglykosider

Det første antibiotikumet i aminoglykosidgruppen var streptomycin, et av de første antibakterielle midler på markedet. Aminoglykosidene hemmer proteinsyntesen ved å binde seg til ulike seter på 30S ribosomal subenhet, og skiller seg fra andre proteinsyntesehemmende antibakterielle midler ved at majoriteten er bakteriocide.

Aminoglykosidene deles inn i to grupper etter som om de inneholder streptidin (streptomycin

og derivater) eller deoxystreptamin (neomycin, ribostamycin, kanamycin, gentamycin og tobramycin) (Davies 1987; Gonzalez og Spencer 1998).

Resistens mot aminoglykosider kan skyldes både minsket intracellulær konsentrasjon og endret mål molekyl, men den overførbare resistensen skyldes inaktiverende enzymer. Det finnes tre klasser av disse enzymene, i tillegg til et bifunksjonelt enzym med både fosfotransferase og acetyltransferasevirkning (AAC[6']-APH[2']) (Kotra, Haddad et al. 2000):

- aminoglykosid fosfotransferaser (APH)
- aminoglykosid nukleotidtransferaser (ANT)
- aminoglykosid acetyltransferaser (AAC)

Selv om alle enzymtypene er aktive nok til å gi effektiv resistens er det kun aminoglykosid fosfotransferasene som gir høygradig resistens (Vakulenko og Mobashery 2003). For ikke mange år siden ble det også oppdaget et plasmidbåret gen, *armA* (aminoglykosid resistens metylase), som koder for metylering av 16S rRNA og resulterer i høygradig resistens mot bl.a. kanamycin, gentamicin, tobramycin og fortimicin (Galimand, Courvalin et al. 2003).

Substrat for de inaktiverende enzymene kan være acetyl-CoA eller ATP og aminoglykosider. Mest sannsynlig er enzymene forbundet med den indre cellemembranen der de er tilgjengelige for acetyl-koenzym A og ATP (Davies og Smith 1978). Acetyltransferasene katalyserer overføringen av acetat fra acetyl-CoA til en aminogruppe på antibiotikumet. Dette skjer kun for deoxystreptamin-antibiotika. Enzymene kan deles inn i fire hovedgrupper og videre inn i flere undergrupper, der en av undertypene (AAC[6']-Ib) gir resistens mot kanamycin, tobramycin og amikacin, men ikke gentamycin (Davies og Smith 1978). Denne enzymvarianten er særlig interessant fordi den i mutert tilstand (AAC[6']-Ib-cr) også gir resistens mot fluorokinoloner (Robicsek, Strahilevitz et al. 2006).

Nukleotidyltransferasene bruker ATP eller andre nukleotider som substrat i enzymatisk modifikasjon av aminoglykosidene og kan deles inn i 5 hovedgrupper. En av undergruppene (AAD[3'']) ligger på et transposon (Tn4) som også bærer resistens mot betalaktamer og sulfanilamider (Davies og Smith 1978).

Aminoglykosid fosfotransferasene er sannsynligvis de mest utbredte aminoglykosid-enzymene og kan deles inn i 7 hovedgrupper. Flere av typene er lokalisert på transposoner som også bærer andre resistensdeterminanter, f. eks beta-laktamase (Davies og Smith 1978).

2.3.9 Ampicillin

Ampicillin ble tatt i bruk for første gang i 1961 og er et beta-laktamantibiotikum med utvidet spekter (Neu 1975). Virkningsmekanismen er den samme som for penicillin, hvilket vil si at medikamentet hemmer peptidyltransferase som bidrar til å danne kryssbindingene i siste steg av cellemembrandannelsen (Izaki, Matsushashi et al. 1968).

Hos *E. coli* kan resistens mot ampicillin skyldes hindret permeabilitet som følge av kromosomale mutasjoner eller produksjon av kromosomale eller plasmidmedierte beta-laktamaser. Beta-laktamasene detoksisifiserer medikamentet ved enzymatisk hydrolyse av beta-laktamringen (Davies og Smith 1978). Den første overførbare beta-laktamasen ble funnet i 1963 og ble gitt navnet TEM etter navnet på pasienten (Temoniera) hvor bakterien var blitt isolert fra (Datta og Kontomichalou 1965). En annen variant av beta-laktamasene er SVH-1 (sulfhydryl variabel). Denne er vanligvis kromosomalt betinget i *Klebsiella*, men plasmidmediert i *E. coli* (Matthew, Hedges et al. 1979; Tzouvelekis og Bonomo 1999). TEM-1 og TEM-2 er funnet igjen i et stort antall bakterieslekter, på plasmider tilhørende flere ulike inkompatibilitetsgrupper og er ofte båret av transposoner. SVH-1 er også båret av plasmider, men det er usikkert om det er båret av transposoner eller ei (Jacoby og Sutton 1991). Siden midten av 80-tallet er man blitt oppmerksom på muterte varianter av beta-laktamasene som ikke bare gir resistens mot penicillingruppen, men også mot bredspektrede cefalosporiner og monobaktamer. Disse utgjør nå majoriteten av ekstendert-spektrum-beta-laktamasene (ESBL) og sitter ofte på store plasmider som også kan kode for resistens mot flere andre typer antibiotika (Kliebe, Nies et al. 1985; Bradford 2001). I tillegg har man metallo-beta-laktamasene (MBL) som hydrolyserer alle klasser av beta-laktamantibiotika, inkludert karbapenem. MBL-genene er ofte assosiert med aminoglykosidresistens og nylig også med kinolonresistensgenet *qnrS* (Walsh 2005; Aschbacher, Doumith et al. 2008)

En siste variant av plasmidbåren beta-laktamase er AmpC-beta-laktamase, som i tillegg til resistens mot penicilliner også gir resistens mot 3. generasjons cefalosporiner. Stammer av *E.*

coli har et kromsomt *ampC*-gen, men det er også funnet plasmidbåren AmpC i flere bakteriearter tilhørende *Enterobacteriaceae* (Bauernfeind, Chong et al. 1998).

2.3.10 Kinoloner

Kinolonenes antibakterielle virkning består i å binde seg til kompleksene som oppstår mellom DNA og DNA-gyrase eller topoisomerase IV og hindrer på den måten replikasjon av DNA (Hawkey 2003). Nalidixinsyre, som regnes som stamfaren til kinolonene, kom på markedet i 1962 og på 80-tallet ble kinolonene forbedret ved å få satt på fluorid og en piperazinyllgruppe (= fluorokinoloner) (Wolfson og Hooper 1989).

Kjente resistensmekanismer mot kinoloner før 1998 inkluderte kromosomale mutasjoner i gener som kodet for gyrase (*gyrA* og *gyrB*) eller topoisomerase IV (*parC* og *parE*) (Drlica og Zhao 1997) samt endret permeabilitet (*ompF*) og effluks (Poole 2000).

I 1987 ble det publisert en artikkel om funn av plasmidmediert kinolonresistens hos *Shigella dysenteriae* (Munshi, Sack et al. 1987), men senere ble dette funnet antatt å være en mutert transkonjugant (Courvalin 1990). Første verifiserte funn ble ikke publisert før 11 år senere da man fant et multiresistensplasmid som bar *qnrA* i isolater av *Klebsiella pneumoniae* isolert i Birmingham, Alabama i 1994. *QnrA* ga lavgradig resistens hos *E.coli* J53 ved innførsel av resistensplasmidet (Martinez-Martinez, Pascual et al. 1998). Senere er det funnet to andre *qnr*-gener: *qnr B* (Jacoby, Walsh et al. 2006) og *qnr S* (Hata, Suzuki et al. 2005). Genene koder for Qnr-proteiner som tilhører pentapeptidrepeterende-familien og man antar at disse kan binde seg til gyrase holoenzymet og dets subenheter GyrA og GyrB. På den måten vil Qnr-proteinene kunne hindre gyrasen å binde seg til DNA, og kinolonene vil ikke ha et DNA-gyrase-kompleks å binde seg til (Tran og Jacoby 2002; Tran, Jacoby et al. 2005a). Det er også funnet at Qnr-proteinene binder seg til topoisomerase IV holoenzymet og dets subenheter ParC og ParE (Tran, Jacoby et al. 2005b). *QnrA* er blitt funnet både i isolater som karakteriseres som sensitive og i isolater som karakteriseres som resistente (Robicsek, Sahn et al. 2005). I seg selv gir *qnrA*, *qnrB* og *qnrS* kun lavgradig resistens, men *in vitro* gjør tilstedeværelsen av *qnr* det lettere å selektere for høygradig resistens (Martinez-Martinez, Pascual et al. 2003).

Plasmider som bærer *qnr* kan variere veldig i størrelse, og i de fleste tilfeller bæres flere andre resistensdeterminanter i tillegg til *qnr*. Særlig kjent er sammenhengen med gener for beta-

laktamase. Det er også funnet at *qnrA* og noen ganger *qnrB* kan sitte i *sull*-integroner, mens dette til nå ikke er funnet for *qnrS* (Robicsek, Jacoby et al. 2006). Generelt er kinolonresistente stammer overveiende ofte multiresistente, men årsaken til dette er fortsatt gjenstand for diskusjon (Chenia, Pillay et al. 2006; Karlowisky, Hoban et al. 2006; Grude, Strand et al. 2008).

Nylig er det oppdaget to nye plasmidmedierte mekanismer for kinolonresistens. Den ene er en mutert variant av aminoglykosid transferase, AAC(6')-1b-cr, med evnen til å redusere aktiviteten til norfloxacin og ciprofloxacin. Det muterte enzymet gir i seg selv svært liten økning i MIC for ciprofloxacin, men bidrar til additiv effekt hvis det er til stede sammen med *qnr* og/eller kromosomale mutasjoner (Robicsek, Strahilevitz et al. 2006). Den andre er en efflukspumpe gitt navnet QepA som gir lavgradig resistens mot fluorokinoloner (Yamane, Wachino et al. 2007).

2.4 Genetisk overføring

Det finnes tre måter genetisk materiale kan overføres fra en celle til en annen på:

- Transformasjon: Nakent DNA tas opp av kompetente celler (Avery, MacLeod et al. 1995).
- Transduksjon: DNA overføres ved hjelp av bakteriofager (Zinder og Lederberg 1952).
- Konjugasjon: DNA overføres gjennom konjugasjonspili ved direkte celle- til cellekontakt (Tatum og Lederberg 1947).

Av disse antas det at konjugasjon er vanligst (Richmond 1969; Mazel og Davies 1999).

2.4.1 Transformasjon

Naturlig genetisk transformasjon er opptak av fritt kromosomalt DNA eller plasmid-DNA fra omgivelsene. Transformasjon kan forekomme både mellom bakterier av samme art og av ulike arter. Celler som har mulighet til å ta opp nakent DNA kalles kompetente celler. Kompetente kan de være naturlig eller bli gjennom kjemisk behandling, elektrosjokk eller ved gjentatt frysing og tining (Lorenz og Wackernagel 1994). *E. coli* er ikke kjent for å være naturlig kompetent i kalsiumfattige miljøer som f.eks urin (Woegerbauer, Jenni et al. 2002).

2.4.2 Transduksjon

Bakteriofager er virus som infiserer bakterier, hvor de tar i bruk bakteriecellens transkripsjonsmaskineri til å replikere eget virus-DNA. Ved dannelse av nye bakteriofagpartikler (kapsider) i cytoplasma kan det hende at noe av vertens DNA, som f.eks plasmider, inkorporeres i kapsidet. Hvilke av vertens gener som inkorporeres kan skje tilfeldig og dette vil kunne gi opphav til generell transduksjon. Den andre formen for transduksjon kalles spesialisert/begrenset transduksjon, der en temperat fag som har blitt inkorporert i vertens kromosom vil kunne få med seg nærliggende gener på kromosomet når den bryter ut fra dette. *In vitro* har man funnet at spesialisert transduksjon har en høyere frekvens enn generell transduksjon (Richmond 1969; Jones og Sneath 1970).

2.4.3 Konjugasjon

Konjugasjon er særlig kjent mellom bakterier tilhørende samme slekt, men overføring mellom langt mer ubeslektede organismer som f.eks gram-negative og gram-positive bakterier kan også finne sted (Courvalin 1994).

Konjugasjonsprosessen kan deles inn i fire stadier:

- Kontakt og dannelse av konjugasjonsbro: Dannelsen av kjønnpili skjer hovedsakelig i cellekulturer som er i stasjonær fase (Anderson 1968). Initiering av pilusdannelse og påfølgende konjugasjon er avhengig av proteiner som kodes for av et plasmidmediert genkompleks kalt *tra* (Frost, Ippen-Ihler et al. 1994). Kjønnpiliene finnes i tre ulike morfologiske former, der pilier som sitter på bakterier som inneholder plasmider av samme inkompatibilitetsgruppe har samme morfologiske form: a) tynn fleksibel, b) tykk fleksibel og c) rigide filamenter/staver (Bradley 1980). Man har funnet at rigide filamenter overfører bedre på faste dyrkningsmedier enn i buljong mens de fleste fleksible pilier er like effektive både på fast agar og i buljong (Bradley, Taylor et al. 1980).
- DNA-mobilisering: Et proteinkompleks kjent som et relaxosom inneholder enzymer (bl.a relaxase) som kutter ved *oriT* (origin of transfer) og tvinner opp en av trådene i plasmidet (Lanka og Wilkins 1995).
- Overføring: Et type IV-sekresjonssystem fører relaxasen over konjugasjonsbroen og en enkelttrådet mor-tråd overføres passivt med ved å være bundet til relaxasen (Llosa, Gomis-Rüth et al. 2002).
- Ferdiggjøring: Overføringen avsluttes når tråden religeres ved *oriT*. I mottakercellen vil den overførte DNA-tråden fungere som templat for syntese av ny tråd (Lanka og Wilkins 1995).

Det er antatt av flere at konjugasjon *in vivo* skjer med en lavere frekvens enn *in vitro* grunnet hemmende stoffer fra tarmens mikroflora, men denne observasjonen kan også skyldes generell lavere vekstrate *in vivo* enn *in vitro* og dermed dannelsen av færre transipienter (Freter, Freter et al. 1983; Licht, Christensen et al. 1999).

3. Materiale og metode

Sammensettingen av de ulike dyrkningsmedier og løsninger, samt opplysninger om leverandører og produsenter av kommersielle kit, enzymer og utstyr er lagt i vedlegg 8a-k.

3.1 Teoretisk bakgrunn

3.1.1 Seleksjon og kontraseleksjon

I konjugasjonsterminologien ”selekteres” det for donormarkører som overføres til mottaker. Hensikten er å hindre vekst av ”rene” mottakerceller. Begrepet ”kontraseleksjon” brukes for seleksjon for en mottakermarkør som ikke finnes hos donoren. Hensikten med kontraseleksjon er å hindre vekst av donorceller. Dersom seleksjonsmiddel og kontraseleksjonsmiddel brukes i samme dyrkningsmedie er målet derfor å kun få vekst av transipienter, ikke donor eller mottakerstamme.

3.1.2 Konjugasjonsforsøk

Fire ofte brukte metoder for overføring av konjugerbare plasmider er (Walter, Porteous et al. 1987):

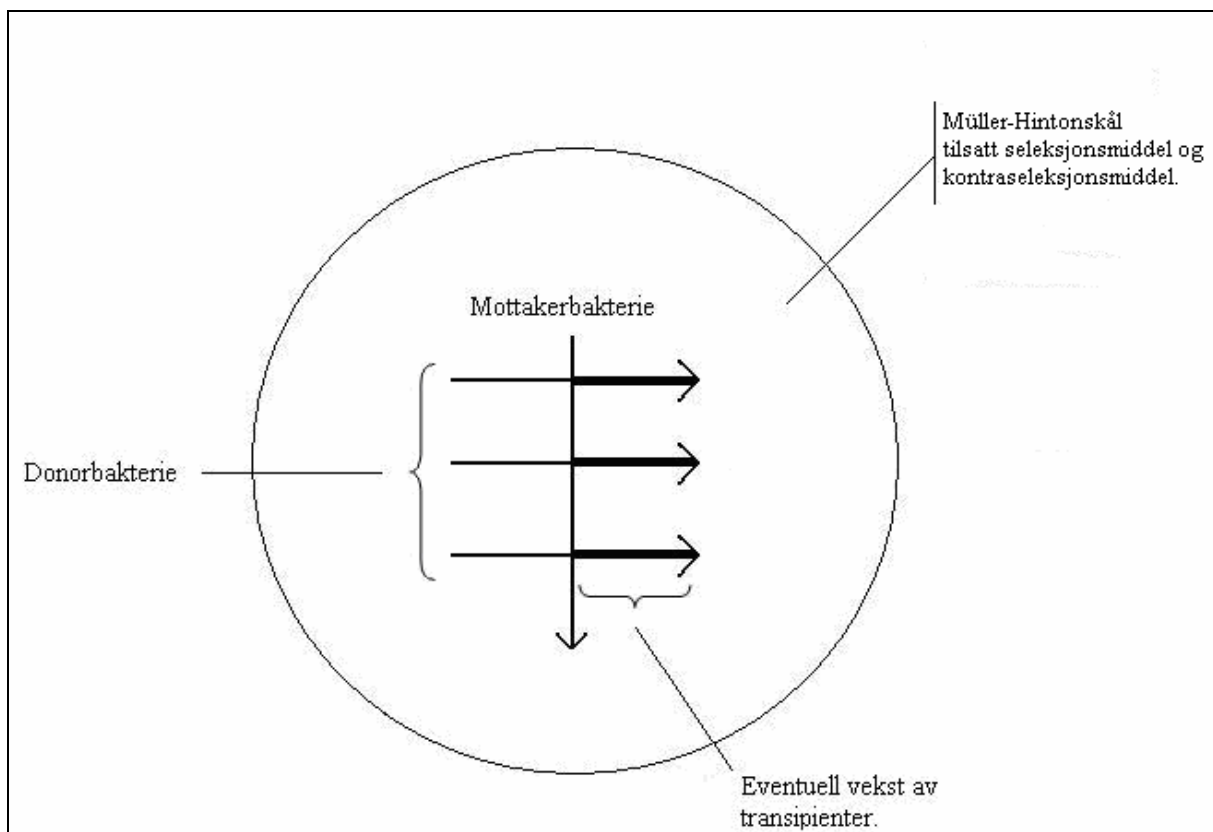
- Paring av enkeltceller i buljong, “broth mating” (BM)
- Paring av enkeltceller på filter, “filter mating” (FM)
- Paring av kolonier på agar, “colony cross streak” (CCS)
- Paring av enkeltceller på agar, “combined spread plate” (CSP)

Disse skiller seg fra hverandre ved om donor og mottaker dyrkes opp kun på skål (CCS) eller første på skål og så i buljong (BM, FM, CSP), deretter om de pares på skål (CCS, CSP, FM) eller i buljong (BM) og til slutt om transipienter selekteres ved direkte vekst på skål (CCS), ved direkte utsæd på skål av buljong med donor og mottaker blandet (BM, CSP) eller ved filtrering og vasking av buljong med celler før utsæd på skål (FM). Felles for dem alle er at donor og mottaker må komme i fysisk kontakt med hverandre for at det skal kunne dannes konjugasjonspili og at transipientene til slutt må selekteres på en måte som hindrer ren donor eller mottaker å vokse opp.

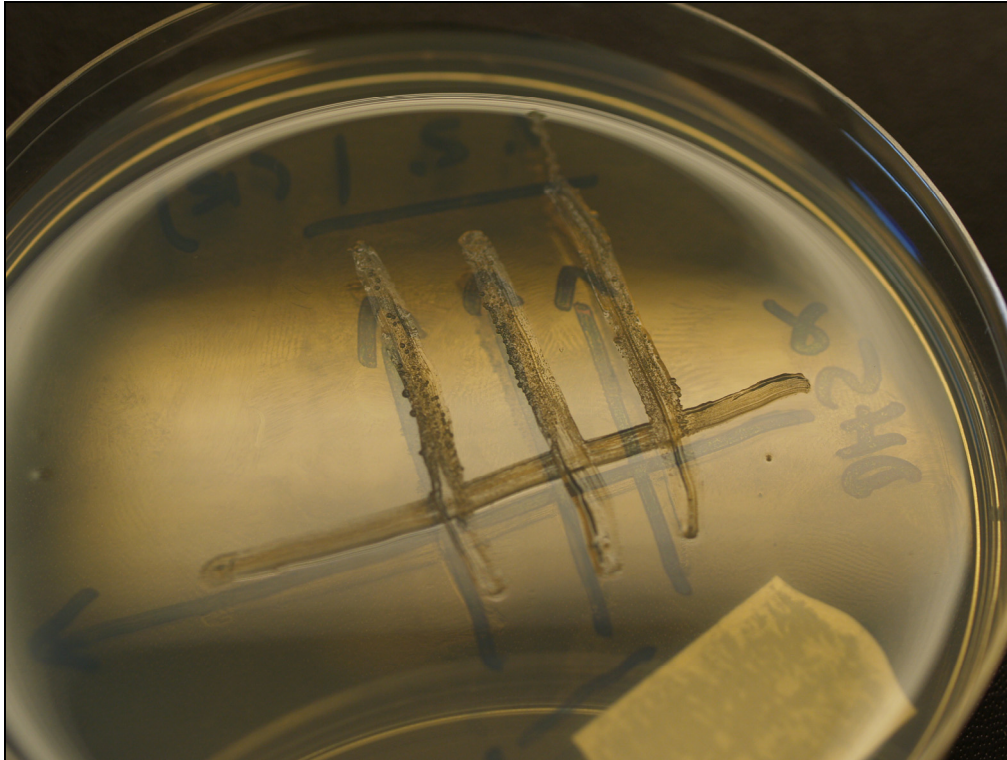
Metoden som er brukt i denne oppgaven er ”colony cross streak”, heretter kalt kolonikryssning. Denne utføres ved å stryke en koloni av mottakerbakterien fra en ende til ende på en Müller-Hinton (MH) skål tilsatt seleksjonsmiddel og kontraseleksjonsmiddel. Deretter blir donorstammen strøket ut så den krysser 90 ° på mottakerstreken, og det strykes ut tre kolonier av hver kolonistørrelse av donoren (se figur 1). Dersom overføring av plasmid som bærer seleksjonsmarkøren er vellykket fra donor til mottaker vil det vokse kolonier fra krysningspunktet mellom donor og mottaker og videre ut streken der donor og mottaker er blitt blandet (se figur 2).

Måten konjugasjonsforsøket utføres på utelukker ikke at mottakeren mottar plasmidet via transduksjon og ikke via konjugasjon, selv om det siste som nevnt er vanligst.

Mottakercellene som i denne oppgaven da får overført plasmid(er) fra donorcellen kalles av den grunn ”transipienter” (Novick, Clowes et al. 1976) og ikke transkonjuganter.



Figur 1: Illustrasjon av utførelse av konjugasjonsforsøk med kolonikryssnings-metoden.



Figur 2: Fotografi av konjugasjonsforsøk med vellykket vekst av transipienter.

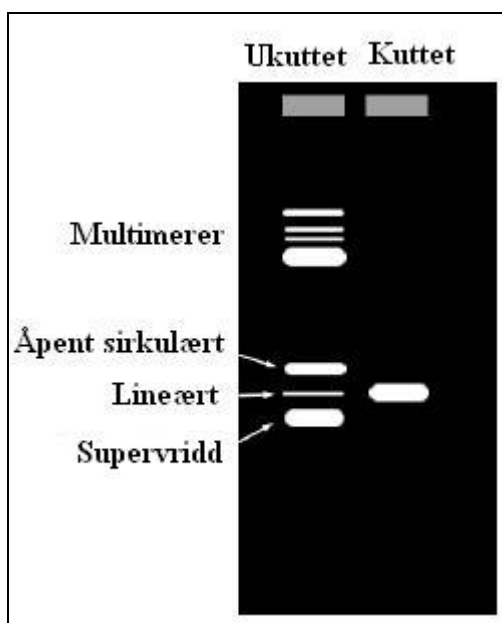
3.1.3 Plasmidisolering

Ved isolering av plasmid-DNA er det i denne oppgaven tatt i bruk et kommersielt isoleringskit fra Qiagen (miniprep). Kitet benytter seg av alkalisk lysering av celleveggen ved bruk av NaOH og natrium-dodecylsulfat (SDS). Samtidig fjernes RNA ved bruk av RNase. De alkaliske forholdene vil sammen med SDS denaturere lineært, kromosomalt DNA og proteiner. Dobbeltrådene i plasmider med ccc-form vil derimot være sammenflettet og selv ikke ved denaturering la seg separere. Ved tilsetning av sterk saltløsning felles denaturerte proteiner, DNA og celledetritus ut, samtidig som pH normaliseres slik at plasmidene kan renatureres (Birnboim og Doly 1979; Sambrook, Fritsch et al. 1980). Etter sentrifugering hos eluatet over i en resinkolonne som binder DNA i nærvær av høy saltkonsentrasjon (Vogelstein og Gillespie 1979). Til slutt vaskes kolonnen med buffer så rester av salter og proteiner vaskes ut, før plasmidene elueres ut ved bruk av buffer med lav ionestyrke, eventuelt destillert vann.

3.1.4 Gelelektroforese

Konvensjonell agarose-gelelektroforese

Konvensjonell agarose-gelelektroforese er en metode for separering DNA-fragmenter med størrelse fra ca 200 baser til ca 50 kb. Ved agarose-gelelektroforese av plasmider kan en ofte se tre bånd som svarer til et plasmid, der supertvunnede plasmider ved de vanligst benyttede betingelser vil vandre raskest, etterfulgt av linealiserte plasmider og til slutt åpne, sirkulære plasmider. I tillegg observeres noen ganger tilsvarende former av plasmidmultimerer (Martin 1996). En gel med ukuttede plasmider vil derfor kunne se ut som illustrert i figur 3.



Figur 3: Eksempel på plasmidbånd ved agarosegelelektroforese av kuttete plasmider og plasmider linealisert med restriksjonsenzym med ett kuttsete i plasmidet.

Pulsfelt-gelelektroforese (PFGE)

Pulsfelt-gelelektroforese er en metode som kan brukes til separering av DNA-fragmenter med størrelse fra ca 20 kb til > 10 mb. I motsetning til vanlig elektroforese hvor spenningsfeltet er konstant i gelens lengderetning, blir det elektriske feltet i PFGE variert fram og tilbake på skrå av gelens lengderetning slik at DNA molekylene må følge en sikk-sakk bane gjennom gelen. Prinsippet bak PFGE er tanken om at jo større DNA-fragmentene er, jo lenger tid bruker de på å reorientere seg ved retningskifte i det elektriske feltet (Olson 1989). Når det gjelder plasmider er også den tredimensjonale formen av betydning (Levene og Zimm 1987; Wang og Lai 1995). Metoden ble presentert for første gang i 1984 (Schwartz og Cantor 1984)

og har senere blitt endret, hovedsakelig med tanke på vinklene spenningene sendes i. Metoden som er den mest benyttede og som også benyttes i denne oppgaven kalles "contour-clamped homogenous electric fields" (CHEF). Denne ble beskrevet for første gang i 1986 og benytter 24 elektroder til å skape et 120° reorienteringsfelt (Chu, Vollrath et al. 1986).

3.1.5 Kutting med S1-nuklease

S1-nuklease fra *Aspergillus oryzae* er en endonuklease som selektivt bryter ned ssDNA eller enkelttrådede områder i dsDNA (Ando 1966; Godson 1973). Enzymet kutter veldig raskt enkelttrådet DNA og noe saktere det enkelttrådede området på motsatt side av et nick i dsDNA (Wiegand, Godson et al. 1975). Det har også muligheten til å kutte dsDNA på plasser med et "mismatched" basepar (Shenk, Rhodes et al. 1975). Supertvunnet plasmid-DNA (form I) er vist å kunne konverteres til "opened relaxed"-DNA (form II) og videre til linealisert DNA (form III) (Wiegand, Godson et al. 1975). Den elektroforetiske mobiliteten til plasmider linealisert med S1-nuklease er vist å være lik som hvis plasmidet var blitt linealisert med restriksjonsenzym (Bai, Yang et al. 2003).

Ved bruk av gelelektroforese til størrelsesbestemmelse av plasmider må plasmidbåndene sammenliknes med en referansestige av kjente båndstørrelser. Størrelsesstandardene i referansestigen består som oftest av linealisert DNA. Etersom plasmider, som tidligere nevnt, kan ha tre ulike konformasjoner vil det forenkles arbeidet om plasmidene er linealiserte og dermed kan sammenliknes med referansestigen av linealisert DNA (Martin 1996). Til linealisering av plasmidene kan det for eksempel benyttes restriksjonszymer (Skorupska, Buraczynska et al. 1979). Dog finnes enkelte problemer med bruken av restriksjonszymer til kutting av ukjente plasmider: Man kjenner ikke hvilke enzymer som kutter plasmidet/ene og hvor ofte de kutter, og ved store plasmider kan man få mange fragmenter av svært ulik størrelse slik at separasjonen av disse byr på et problem. Hvis det er mer enn et plasmid til stede vil det også være en utfordring å dedusere hvilke restriksjonsfragmenter som "hører til" hvilket plasmid (Causey 1978). Et alternativ til bruken av restriksjonszymer ved størrelsesestimering av ukjente plasmider er kutting med S1-nuklease (Drygin og Zverev 1982; Barton, Harding et al. 1995).

3.1.6 S1-PFGE

Kutting av plasmider med S1-nuklease kan kombineres med PFGE for separasjon av store plasmider (Barton, Harding et al. 1995). Fordelen med dette er at det er lettere å kunne bestemme plasmidstørrelsen når plasmidet er linealisert (Bliek, Lincke et al. 1988), samt at man kan finne megaplasmider som ved vanlige plasmidisoleringsprosedyrer er vanskelig å separere fra kromosomalt DNA (Barton, Harding et al. 1995). Ved S1-PFGE vil både kromosomet og plasmider bli kuttet med S1-nuklease, og kromosomfragmentene vil ses som et diffust bånd helt øverst i gelen mens plasmidene vil være linealiserte og vandre lenger (Barton, Harding et al. 1995). Dersom det finnes plasmider som ikke er linealiserte vil de som er supervridde vandre gjennom gelen inverst proporsjonalt med størrelsen og uavhengig av pulstiden (Wang og Lai 1995), og selv store, supervridde plasmider vil vandre ut av gelen under de PFGE-betingelser som er benyttet i oppgaven. Åpne sirkulære plasmider vil forbli fanget i agarosepluggen eller gi et diffust bånd øverst i gelen ved de korte pulstider som er benyttet i PFGE-programmet i oppgaven (Levene og Zimm 1987).

3.2 Bakteriestammer

Mottaker, donor og eventuelle transipienter ble oppbevart i brain-heart-infusion frysebuljong ved -70°C.

3.2.1 Mottakerstammer

En oversikt over mottakerstammene som ble benyttet i konjugasjonsforsøk vises i tabell 4. En av mottakerstammene, *E. coli* K12 DH5 α Nal^R, viste seg å inneholde plasmidet pUC19. Dette var utilsiktet, men ved plasmidanalysene tjente plasmidet som en internkontroll.

Tabell 4: Oversikt over de ulike bakteriestammene benyttet som mottakere i konjugasjonsforsøkene.

Stamme [†]	Genotype	Plasmid-innhold	Benyttet seleksjonsmarkør	Kilde
<i>E. coli</i> K12 DH5α pUC19 Nal ^R	F ⁻ , ø80dlacZΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	pUC19	Resistens mot nalidixinsyre	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Transformert med pUC19 av Andrew Jenkins.
<i>E. coli</i> K12 J53 Az ^R	F ⁻ , <i>met. pro. rifR</i> , <i>recA</i> , AzR	Ingen	Resistens mot natriumazid	George Jacoby [*]
<i>E. coli</i> K12 HB101 Str ^R	<i>supE44</i> , Δ(<i>mcnC-mrr</i>), <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>	Ingen	Resistens mot streptomycin	Promega Corporation, Madison, WI, USA.

* = Jacoby and Han 1996

† = Heretter kalt *E. coli* DH5α, *E. coli* J53 eller *E. coli* HB101.

3.2.2 Donorstammer

Fekalt normalmateriale

Det fekale normalmateriale er en del av et materiale samlet inn under NORCCAP-studien (Bretthauer, Gondal et al. 2002) og er gitt navnet coliclone ved as Telelab. Det består av 138 *E. coli*-isolater fra 10 friske kvinner og er delt inn i 20 kloner ved PFGE (Grude, Potaturkina-Nesterova et al. 2007).

*Utvalg til konjugasjonsforsøk med *E. coli* DH5 α pUC19 Nal^R som mottaker*

Av isolatene som var resistente mot sulfonamid eller tetracyclin ble det tilfeldig valgt ut et isolat av hver ulik MIC innenfor hver klon. I de tilfeller man fikk vekst av transipient ble det også utført konjugasjonsforsøk med resten av isolatene tilhørende samme klon. Med sulfonamid som seleksjonsmiddel ble det utført konjugasjonsforsøk med 25 stammer tilhørende 14 kloner og med tetracyclin som seleksjonsmiddel ble det utført konjugasjonsforsøk med åtte stammer tilhørende seks kloner. Det ble ikke utført konjugasjonsforsøk med trimetoprim som seleksjonsmiddel.

*Utvalg til konjugasjonsforsøk med *E. coli* J53 Az^R som mottaker*

Man ønsket å utføre konjugasjonsforsøk med alle resistente isolater som donorer, men ved bruk av sulfonamid som seleksjonsmiddel kunne en bare benytte donorer med $\text{MIC}^{\text{Sul}} \geq 512$. Årsaken var at lavere konsentrasjoner av sulfonamid i konjugasjonsskålene tillot pseudovekst av mottakerstammen *E. coli* J53 Az^R (se kapittel 4.1). Man endte dermed opp med 39 sulf^R-isolater tilhørende 14 kloner som mulige donorer. Med tetracyclin som seleksjonsmiddel ble alle isolater med $\text{MIC}^{\text{Tet}} \geq 256$ brukt som donorer, totalt 28 stykk tilhørende tre kloner. Med trimetoprim som seleksjonsmiddel ble alle resistente isolater (disse hadde $\text{MIC}^{\text{Trim}} \geq 64$) benyttet som donorer, totalt 27 stammer tilhørende to kloner.

Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmateriale som er blitt benyttet som donorstammer i konjugasjonsforsøk er lagt i vedlegg 2.

Ciprofloxacinresistente UVI-isolater

Det ciprofloxacinresistente UVI-materialet er gitt navnet FQI hos as Telelab, og består av 35 *E. coli*-isolater som er gruppert i 25 kloner ved PFGE (Grude, Strand et al. 2008). Isolat

nummer 11, 27 og 50 er positive for aminoglykosidasen AAC(6')-Ib, mens isolat nummer 19 og 32 er positive for den muterte versjonen AAC(6')-Ib-cr som gir ciprofloxacinresistens. Det er også vist at isolat 32 og 53 har ESBL (Grude, Strand et al. 2008).

Alle isolater som i følge Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål sine retningslinjer (AFA, 2006) var definert som resistente mot ampicillin (33 stk), trimetoprim (32 stk), sulfonamid (34 stk), ciprofloxacin (35 stk), nalidixinsyre (35 stk), tetracyclin (33 stk), kloramfenikol (19 stk) eller kanamycin (22 stk) ble det bestemt å benytte som donorer i konjugasjonsforsøk. For oversikt over resistensprofilene til de ulike isolatene, se tabell 5a og b.

Det ble ikke utført overføringsforsøk med mecillinam eller nitrofurantoin som seleksjonsmidler da overførbar resistens mot mecillinam er nært korrelert med resistens mot ampicillin (Chau, Ng et al. 1981) og overførbar resistens mot nitrofurantoin kun er publisert i en artikkel (Breeze og Obaseiki-Ebor 1983).

Tabell 5 a : MIC-verdier bestemt ved E-test (nøyaktig av/lest) og tolkning av disse som sensitiv (S), intermedier (I) eller resistent (R) hos isolater i det ciprofloxacinsensitive UVI-materialet.

Nr	Amp*	Nit*	Mec*	Tri*	Sul*	Cip*	Nal*	Tet*	Klor*	Gen*	Kan†
1	512 R	8 S	1,5 S	64 R	512 R	32 R	512 R	512 R	32 R	0,125 S	1,5 S
3	512 R	48 R	256 R	32 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	0,5 S	256 R
4	96 R	2 S	1 S	64 R	512 R	32 R	512 R	1,5 S	6 S	0,094 S	0,5 S
5	512 R	128 R	4 I	64 R	612 R	64 R	512 R	512 R	512 R	64 R	256 R
7	512 R	12 S	1,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	32 R	24 R	256 R
8	512 R	12 S	0,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	256 R	4 S	0,25 S	2 S
9	8 I	64 R	0,25 S	64 R	512 R	64 R	512 R	256 R	192 R	0,38 S	4 I
10	512 R	12 S	2 S	0,19 S	256 R	64 R	512 R	512 R	8 S	2,4 I	6 R
11	512 R	32 S	1,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	1,5 S	48 R
14	512 R	24 S	1 S	54 R	512 R	16 R	512 R	8 I	6 S	24 R	8 R
17	256 R	4 S	1 S	64 R	512 R	64 R	512 R	256 R	4 S	0,38 S	4 I
18	512 R	8 S	1,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	256 R	8 S	64 R	6 R
19	512 R	192 R	0,75 S	64 R	512 R	64 R	512 R	12 R	16 R	0,38 S	48 R
25	512 R	12 S	1,5 S	64 R	512 R	32 R	512 R	512 R	4 S	0,19 S	2 S
26	512 R	32 S	256 R	64 R	512 R	24 R	512 R	512 R	16 R	0,19 S	2 S
27	512 R	348 R	2 S	64 R	256 R	64 R	512 R	512 R	512 R	4 I	256 R
28	512 R	48 R	1,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	0,19 S	256 R
30	512 R	8 S	1,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	4 S	256 R	256 R

* = Grude, Strand et al. 2008, † = utført i denne studien

Tabell 5 b: MIC-verdier bestemt ved E-test (nøyaktig avlest) og tolkning av disse som sensitiv (S), intermedier (I) eller resistent (R) hos isolater i det ciprofloxacinsensitive UVI-materialet.

Nr	Amp*	Nit*	Mec*	Tri*	Sul*	Cip*	Nal*	Tet*	Klor*	Gen*	Kan†
32	512 R	12 S	4 I	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	38 R	48 R
33	512 R	16 S	0,75 S	64 R	512 R	16 R	512 R	512 R	512 R	16 R	12 R
35	8 I	16 S	0,25 S	0,25 S	48 S	64 R	512 R	512 R	3 S	0,25 S	3 I
36	12 I	16 S	0,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	12 R	0,19 S	256 R
38	512 R	8 S	1 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	8 S	0,25 S	2 S
39	512 R	6 S	2 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	32 R	0,25 S	2 S
43	12 I	96 R	0,5 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	0,125 S	1,5 S
44	256 R	16 S	512 R	64 R	512 R	24 R	512 R	256 R	512 R	0,38 S	2 S
45	512 R	12 S	1 S	64 R	512 R	8 R	512 R	256 R	6 S	0,25 S	6 R
47	512 R	32 S	256 R	0,5 S	512 R	64 R	512 R	512 R	4 S	32 R	6 R
48	512 R	8 S	1 S	64 R	512 R	6 R	512 R	256 R	6 S	0,25 S	3 I
49	512 R	24 S	0,75 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	4 S	0,25 S	2 S
50	512 R	24 S	1 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	1 S	32 R
51	512 R	32 S	1,5 S	64 R	512 R	12 R	512 R	512 R	96 R	0,25 S	256 R
53	512 R	96 R	2 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	512 R	24 R	256 R
54	512 R	16 S	0,75 S	64 R	512 R	64 R	512 R	512 R	6 S	0,19 S	2 S
56	96 R	16 S	0,5 S	64 R	512 R	8 R	512 R	512 R	8 S	0,25 S	6 R

* = Grude, Strand et al. 2008, † = utført i denne studien

3.3 Konjugasjonsforsøk

Ved oppdyrking av mottaker fra frysebuljong ble det benyttet CLED-agar, og ved oppdyrking av donor fra frysebuljong ble det benyttet isosensitivitetsagar (ISA) tilsatt det antibiotikumet en ønsket å se om donoren overførte resistens mot. Antibiotikakonsentrasjoner man benyttet til dette var: Ampicillin 20 µg/ml, sulfonamid 15/500 µg/ml, trimetoprim 20 µg/ml, tetracyclin 5 µg/ml, kloramfenikol 8 µg/ml, ciprofloxacin 2 µg/ml, nalidixinsyre 100 µg/ml og kanamycin 10/20 µg/ml. (Se kapittel 4.1 og tabell 9 for nærmere forklaring.)

Til konjugasjonsforsøk og videre dyrkning av transipientene ble det benyttet Müller-Hinton (MH)-agar tilsatt kontraseleksjonsmiddel (250 µg/ml natriumazid, 100 µg/ml streptomycin eller 12,5 µg/ml nalidixinsyre) og det antibiotikumet en ønsket å se om donoren overførte resistens mot i følgende konsentrasjoner: Ampicillin 20 µg/ml, sulfonamid 25/200/500 µg/ml, trimetoprim 20 µg/ml, tetracyclin 5 µg/ml, kloramfenikol 8 µg/ml, ciprofloxacin 2 µg/ml, nalidixinsyre 12,5/100 µg/ml og kanamycin 10/20µg/ml. (Se kapittel 4.1 og tabell 9 for nærmere forklaring.)

For donorer tilhørende det fekale normalmaterialet ble det først utført primære konjugasjonsforsøk med *E. coli* DH5α eller *E. coli* J53 som mottaker. Deretter ble det utført sekundære konjugasjonsforsøk med transipient som donor og *E.coli* HB101 som mottaker. For donorer tilhørende det ciprofloxacinresistente UVI-materialet ble det kun benyttet *E. coli* J53 som mottaker i konjugasjonsforsøket og sekundære konjugasjonsforsøk ble ikke utført grunnet mangel på egnet mottakerstamme.

Ved dyrkning av donor eller transipient på skål med antibiotika kunne det hende man fikk vekst av mer enn en kolonistørrelse. Dette ble notert, og det ble utført konjugasjonsforsøk med alle de ulike kolonistørrelsene.

Konjugasjonsforsøket ble utført som tidligere beskrevet i kap 3.1.2. Konjugasjonsskålen ble inkubert ved $36 \pm 1,5$ °C, og resultatet avlest etter både ett og to døgn. Mulige transipient-kolonier ble sådd ut til enkeltkolonier på ny, selektiv skål to ganger før nedfrysning og videre undersøkelser.

Eventuelle transipienter ble gitt navnet ”Mottaker-donor^{seleksjonsmiddel}”, for eksempel J53-c1.2.1^{sulf} der ”c” = coliclon = donor fra det fekale normalmateriale og ”FQ” = donor fra det ciprofloxacinresistente UVI-materialet. Donor- eller transipientkolonier kan også ha fått betegnelsen ”liten” eller ”medium”, hvilket svarer til hva slags størrelse kolonien hadde dersom stammen vokste med mer enn en kolonistørrelse på agarskålen. For eksempel kan coliclon 1.2.1medium gi opphav til både J53-c1.2.1liten^{sulf} og J53-c1.2.1medium^{sulf}.

Ved tvil om veksten i de sekundære konjugasjonsforsøkene var en ekte transipient kunne en for J53-transipientene undersøke dette nærmere ved å så de ut på CLED-skål og vurdere morfologien. *E. coli* J53 forgjærer laktose og vokser med store, gule, flate kolonier med frynsete kant på CLED, mens *E. coli* HB101 ikke forgjærer laktose og vokser med små, gjennomsluktige kolonier med klart avgrenset kant.

3.4 Bestemmelse av antibiotikakonsentrasjoner

Egnede konsentrasjoner av seleksjons- og kontraseleksjonsmidler ble bestemt ved agarfortynningsmetoden eller ved justeringer rundt konsentrasjoner anbefalt i publisert arbeid (Datta 1969; Vorland, Carlsson et al. 1985; Tran og Jacoby 2002). Hvilke isolater og konsentrasjoner av seleksjons- og kontraseleksjonsmidler som ble benyttet i bestemmelsen er oppsummert i tabell 6a og b. Alle skålene ble dyrket ved $36 \pm 1,5$ °C i 16-22 timer før veksten ble avlest.

Streptomycin

Streptomycin ble benyttet som kontraseleksjonsmiddel der *E. coli* HB101 er benyttet som mottaker i sekundære konjugasjonsforsøk.

Nalidixinsyre

Nalidixinsyre ble brukt både som kontraseleksjonsmiddel der *E. coli* DH5a er mottaker i konjugasjonsforsøk med fekalt normalmateriale som donor, og som seleksjonsmiddel i konjugasjonsforsøk med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor.

Natriumazid

Natriumazid ble brukt som kontraseleksjonsmiddel der *E. coli* J53 er mottaker i konjugasjonsforsøk.

Sulfonamid

Sulfonamid ble brukt som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk med både det fekale normalmateriale og med det ciprofloxacinresistente UVI-materialet som donor og med enten *E. coli* DH5 α , *E. coli* HB101 og *E. coli* J53 som mottaker.

Tetracyclin

Tetracyclin ble brukt som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk både med ciprofloxacinresistent UVI-materiale og fekalt normalmateriale som donor, og med *E. coli* J53 som donor.

Ciprofloxacin

Ciprofloxacin ble benyttet som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor og *E. coli* J53 som mottaker.

Ampicillin

Ampicillin ble brukt som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor.

Kanamycin

Kanamycin ble brukt som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk med isolater fra det ciprofloxacinresistente UVI-materiale som donor.

Trimetoprim

Trimetoprim ble brukt som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk både med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor og med fekalt normalmateriale som donor.

Kloramfenikol

Kloramfenikol ble brukt som seleksjonsmiddel ved konjugasjonsforsøk både med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor.

Tabell 6 a: Oversikt over hvilke isolater, medier og konsentrasjoner av seleksjons- og kontraseleksjonsmidler brukt i bestemmelsen av konsentrasjonen(e) av seleksjon- og kontraseleksjonsmidler i dyrkningsmediene.

Middel	Medium	Undersøkte konsentrasjoner (µg/ml)	Stammer testet
Streptomycin	LB-agar og MH-agar	50 og 100	Mottaker: <i>E. coli</i> HB101
			Donorer: c1.2.1, c1.2.10, c2.2.8, c2.1.8, c2.2.3, c4.2.11, c10.1.5 og c12.1.2
			Transipient: DH5α-c1.2.1 ^{Sul}
Nalidixinsyre	MH-agar	3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 og 100	Mottaker: <i>E. coli</i> DH5α
			Donorer: c1.2.1, c2.2.10, c3.2.17, c4.2.11, c6.1.4, c6.1.7, c9.1.3 og c12.1.1. FQ4, FQ10, FQ35 og FQ56
Natriumazid	IS-agar	50, 100 og 200.	Mottaker: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: FQ5, FQ15, FQ25, FQ42 og FQ50.
Sulfonamid	MH-agar og IS-agar	6,25, 12, 25, 50, 100, 137,5, 275 og 550.	Mottakere: <i>E. coli</i> DH5α, <i>E. coli</i> J53, <i>E. coli</i> HB101
			Donorer: c1.2.1, c2.2.8, c2.2.10, c3.2.17, c6.1.4, c6.1.7, c9.1.1, c9.1.3 og c12.1.1. FQ4, FQ10, FQ35 og FQ56.
			Transipienter: DH5α-c1.2.1 ^{Sul} , DH5α-c1.2.3 ^{Sul} , DH5α-c1.2.7 ^{Sul} , DH5α-c1.2.8 ^{Sul} , DH5α-c1.2.9 ^{Sul} , DH5α-c1.2.10 ^{Sul} , DH5α-c1.2.11 ^{Sul} og DH5α-c1.2.12 ^{Sul} .
Tetracyclin	IS-agar	3,125, 5, 6,25, 10, 12,5, 25 og 50.	Mottakere: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: c1.2.1, c1.2.10, c2.2.8, c2.1.8, c2.2.3, c4.2.11, c10.1.5 og c12.1.2 FQ1, FQ4, FQ8, FQ14 og FQ15.

Tabell 6 b: Oversikt over hvilke isolater, medier og konsentrasjoner av seleksjons- og kontraseleksjonsmidler brukt i bestemmelsen av konsentrasjonen(e) av seleksjon- og kontraseleksjonsmidler i dyrkningsmediene.

Middel	Medium	Undersøkte konsentrasjoner (µg/ml)	Stammer testet
Ciprofloxacin	IS-agar	2, 4, 8 og 16.	Mottakere: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: FQ1, FQ14, FQ15, FQ26, FQ45, FQ48 og FQ51.
Ampicillin	LB-agar	20	Mottakere: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: FQ9, FQ17, FQ19, FQ30, FQ43 og FQ56.
Kanamycin	LB-agar og IS-agar	10 og 20	Mottakere: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: FQ5, FQ7, FQ10, FQ14, FQ18, FQ27, FQ30, FQ32, FQ33, FQ44, FQ47 og FQ53.
Trimetoprim	LB-agar	10	Mottakere: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: FQ3, FQ9, FQ10, FQ15, FQ27, FQ42, FQ48 og FQ53.
Kloramfenikol	LB-agar	10	Mottakere: <i>E. coli</i> J53
			Donorer: FQ1, FQ10, FQ19, FQ33, FQ36 og FQ51.

3.5 Resistensundersøkelser

Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetoden ble utført ved først å lage en 0,5 McFarland bakterisuspensjon i romtemperert, fosfatbufret saltvann (PBS). Fra denne brukte man en pasteurpipette til å overføre en dråpe over i 5 ml ny, romtemperert PBS, blandet og svabret fortynningen ut på ISA-skål ved bruk av en bomullspinne. Ved denne metoden ble transipientene undersøkt for resistens mot sulfonamid, trimetoprim, tetracyclin, ampicillin, kloramfenikol, nitrofurantoin, mecillinam, gentamicin, nalidixinsyre og ciprofloxacin. Resultatet ble avlest med skyvelær som mm-soner hemmet vekst etter inkubasjon i 16-22 timer ved $36 \pm 1,5$ °C, og stammen angitt som resistent, intermediær eller sensitiv etter

Arbeidsgruppen For Antibiotikaspørsmål (AFA) sine retningslinjer (AFA, 2006). I de tilfeller der isolatet ble definert som resistent mot et antibiotikum eller flere ved bruk av agardiffusjonstesten ble det gått videre med å finne MIC-verdien. Til dette benyttet man E-test etter metoden beskrevet i pakningsvedlegget til AB Biodisk. Unntak er for ciprofloxacine og nalidixinsyre der det ble utført E-test på alle transpienter uavhengig av resultat fra agardiffusjonstesten. For kanamycin ble det ikke utført resistensundersøkelse med agardiffusjonsmetoden, kun med E-test.

Som kontroll ved resistensbestemmelse (E-test og agardiffusjon) benyttet man *E. coli* CCUG 17620.

3.6 Plasmidanalyser

Før plasmidisolering ved bruk av Qiagen miniprep eller tillaging av agarosepluggen til PFGE ble donorstammene dyrket opp på samme medium som ble benyttet til oppdyrking før konjugasjonsforsøket, mens transpienter er dyrket opp på samme medium som ble brukt i konjugasjonsforsøket. Deretter ble en enkeltkoloni hatt over i 5 ml Luria-Bertoni (LB)-buljong, tilsatt enten 20 µg/ml ampicillin, 200 µg/ml sulfonamid, 5 µg/ml kanamycin eller 20 µg/ml trimetoprim avhengig av bakteriestammens resistensprofil.

3.6.1 Små plasmider (< 11 kbp)

Til isolering av mindre plasmider ble det benyttet miniprep plasmidisoleringskit fra Qiagen og anbefalinger i pakningsvedlegg for isolering av plasmider opp til 50 kbp ble fulgt.

Kutting med S1-nuklease og agarose-gelelektroforese

Kutting med S1-nuklease ble utført for å bestemme størrelsen på plasmidene. Man inkuberte 7 µl plasmid-DNA med 1 U S1-nuklease i 93 µl S1-nukleasebuffer ved $36 \pm 1,5$ °C i 45 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 1 µl 0,5 M EDTA og overføre til is. På en 0,7 % agarosegel appliserte man 25 µl kuttereksjon (tilsvarer 1,75 µl ukuttet plasmid) og 5 µl ukuttet plasmid i brønn ved siden av for sammenlikning.

Restriksjonsanalyse og agarose-gelelektroforese

Kutting med restriksjonszymer ble kun utført for små plasmider isolert fra donorer fra det fekale normalmateriale og deres eventuelle transipienter. Kuttereaksjon ble utført i eppendorfrør etter oppsettet i tabell 7. Rørene ble inkubert ved $36 \pm 1,5$ °C i en time og hele volumet ukuttet eller kuttet plasmid satt på 0,7 % agarosegel for separering ved 30 V i 12 timer.

Tabell 7: Oppsett for kutting av plasmider med HindIII.

	Kuttet	Ukuttet
dH ₂ O	-	1 µl
Buffer E x 10	1 µl	1 µl
Restriksjonsenzym HindIII 10 U/µl	1 µl	-
Plasmid fra miniprep	8 µl	8 µl
Totalt	10 µl	10 µl

3.6.2 Store plasmider (> 11 kbp)

Til linealisering og størrelsesbestemmelse av plasmider > 11 kbp benyttet man S1-nuklease pulsfeltgelelektroforese (S1-PFGE) (Barton et al, 1995), med tillaging av agaroseplugger som beskrevet nedenfor og pulsfeltprogram som vist i tabell 8.

Tillaging av agaroseplugger

Pluggtillagingsmetoden baserte seg på en kombinasjon av Telelabs prosedyrer for tillaging av agaroseplugger av stafylokokker og *E. coli*, men der man har kuttet ut bruken av PMSF og lysostaphin (upublisert, as Telelab).

Tillaging av plugger ble utført ved å dyrke en koloni av den ønskede stammen i 5 ml LB-buljong, event. tilsatt selektiv antibiotika, ved $36 \pm 1,5$ °C i 14-16 timer på rotasjonshjul. Deretter hadde man 100 µl over i 5 ml med ny selektiv LB-buljong og dyrket buljongen i ytterligere 2 timer ved $36 \pm 1,5$ °C på rotasjonshjul før måling av O.D. ved 600 nm. Til pluggene ble det brukt 1 ml buljong med O.D. = 0,5, som tilsvarer 1×10^9 celler/ml. Buljongen ble overført til 10 ml rør med skrukork og sentrifugert ved 5000 rpm i 10 minutter. Deretter ble supernatanten helt forsiktig av, bakteriecellene resuspendert i 500 µl PIV-sukrosebuffer per prøve tilsatt 100 µl (100 mg/ml) nylaget lysozym per prøve (til sammen 600 µl) og satt på is i 15 minutter. Det ble laget en 2 % pluggagarose i PIV-buffer og

bakteriesuspensjonen ble blandet med likt volum agarose før støping i former. Disse ble satt ved 4 °C i minst 20 minutter før pluggene ble overført til 10 ml rør, tilsatt 3 ml lyseringsbuffer og satt til inkubering 2 timer på rotasjonshjul ved $36 \pm 1,5$ °C. Deretter ble lyseringsbufferen pipettert av og erstattet med 3 ml ESP-buffer til inkubering over natt ved 50 °C. Dagen etter ble pluggene vasket 30 min x 3 i dH₂O og 30 min x 2 i TE-buffer, alt ved 50 °C med vipping. Etter siste vask ble pluggene fanget opp med filterduk, overført til 1,5 ml rør med skrukork, dekket med TE-buffer og oppbevart ved 4 °C.

Til S1-kutting av donorene fra det fekale normalmaterialet ble det benyttet tidligere lagde plugg lagd med metoden for *E. coli* som benyttes på as Telelab.

Kutting med S1-nuklease i plugg

Kutting av plugg med S1-nuklease ble utført som følger: En kuttet 3-4 mm av pluggen med skalpell og overførte den til et eppendorfrør for vasking to ganger å 15 minutter i 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Etter vask overførte man pluggen til et nytt eppendorfrør og tilsatte 200 µl S1-nukleasebuffer med 1 U S1-nuklease på is før det hele ble satt til inkubering ved $36 \pm 1,5$ °C i 45 minutter. Kuttereaksjonen ble stoppet ved å overføre pluggene til eppendorfrør med 100 µl 20 mM EDTA på is.

Pulsfelt og tolkning

Pulsfeltprogrammet som ble benyttet er spesifisert i tabell 8.

Tabell 8: Spesifikasjoner for pulsfeltprogram benyttet til gelseparasjon av plasmider i agaroseplugg kuttet med S1-nuklease.

Gitt programnummer	18
Buffer	0,5 x TBE med 50 mM thiourea
Temperatur	14 °C
Pulstider	1-20 sekunder
Ramping factor	Lineær
Tid	15 timer
Spenning	6 V/cm (200 V)
Vinkel	120 °

3.6.3 Elektroforese: Størrelsesstandarder, farging og dokumentasjon

Til størrelsesmarkør ved konvensjonell agarose-gelelektroforese benyttet en bakteriofag lambda kuttet med PstI, hvilket gir følgende båndstørrelser (bp): 11 497, 5077, 4749, 4507, 2838, 2560, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805 og 512.

Til størrelsesmarkør ved S1-PFGE benyttet en *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 kuttet med SmaI, hvilket gir følgende båndstørrelser (kbp) på gelen: 674, 361, 324, 262, 257, 208, 175, 135, 117, 80, 60, 44, 36, 10 og 9.

Til separering av plasmider kuttet med restriksjonsenzymmer eller S1-nuklease ble det vanligvis benyttet en agarosekonsentrasjon på 0,7 % (enkelte ganger 0,8 % eller 0,9 %) og til S1-PFGE ble det benyttet 1 % agarose.

Siden flere av donorene i det ciprofloxacinresistente materialet tidligere var blitt degradert ved PFGE (upublisert, as Telelab) ble det benyttet 50 μ M thiourea i elektroforesebufferen (Silbert, Boyken et al. 2003) for å hindre dette under S1-PFGE.

Agarosegelene ble farget med 0,1 % (v/v) SYBR-gold i 30-40 minutter under konstant bevegelse før fotografering med 302 nm UV-lys, gult filter (eksponeringstid 40 s med polaridkamera, automatisk eksponeringstid med digitalt kamera).

Gelbildene fra kutting av små plasmider med restriksjonsenzym ble lagt inn i GelCompareII hvorpå man lagde en grafisk sammenstilling av noen av plasmidprofilene.

4. Resultater

4.1 Bestemmelse av antibiotikakonsentrasjon til bruk i dyrkningsmediene.

For å kunne utføre konjugasjonsforsøk var det nødvendig å finne egnet konsentrasjonen av seleksjonsmidler og kontraseleksjonsmidler til bruk i dyrkningsmediene. Til dette ble det brukt agartitrering og avlesning av vekst av mottakerisolater og donorer med ulik MIC på de ulike konsentrasjonene.

Konsentrasjonene av seleksjons- og kontraseleksjonsmidler som man kom frem til å benytte i produksjonen av dyrkningsmediene er sammenfattet i tabell 9.

Med sulfonamid var det vanskelig å få til en klar seleksjon da bakterier kunne leve på sine døde artsfrender og vokse med "pseudovekst". Det var ingen klar sammenheng mellom MIC bestemt med E-test og vekst på skåler tilsatt sulfonamid. For eksempel sluttet enkelte donorisolater med MIC = 256 µg/ml å vokse på samme sulfonamidkonsentrasjon (25 µg/ml) som sensitive stammer gjorde. Et problem var dessuten at både *E. coli* HB101 og *E. coli* J53 vokste med pseudovekst opp til 2-300 µg/ml sulfonamid. Dette gjorde at enkelte isolater ikke kunne brukes som donorer da det ble vanskelig å skille vekst av donor og mottaker.

På 10 µg/ml kanamycin vokste ikke *E. coli* J53, mens både sensitive, intermediære og resistente donorstammer fra det multiresistente UVI-materialet vokste. En forsøkte derfor med 20 µg/ml istedenfor for å hindre vekst av de sensitive stammene. Fortsatt vokste ikke *E. coli* J53 og sensitive stammer sluttet å vokse, men en fikk problemer med svak eller ingen vekst av stammer med MIC^{Kan} 8-256 µg/ml. En valgte derfor å dyrke opp og utføre konjugasjonsforsøkene først på agarskåler med 20 µg/ml kanamycin, og i de tilfeller en ikke fikk vekst av stammer definert som resistente ble konjugasjonsforsøk med disse også utført på skåler med 10 µg/ml kanamycin. Transipienter som eventuelt vokste på 10 µg/ml kanamycin og ikke på 20 µg/ml kanamycin måtte en undersøke nøye videre da det kunne være tilfelle at de var muterte *E. coli* J53.

Tabell 9: Resultater fra bestemmelse av konsentrasjoner av seleksjons- og kontraseleksjonsmidler i dyrkningsmedier.

		Seleksjonsmidler (µg/ml)							Kontraseleksjonsmidler (µg/ml)			
		Sul*	Tet	Amp	Kan*	Trim	Klor	Nal	Cip	Str	NaAz	Nal
ISA- skåler	Fekalt normalmateriale	15 eller 500†	5	-	-	20	-	-	-	-	-	-
	Ciprofloxacinresistent UVI-materiale	100	5	20	10 eller 20	20	8	100	2	-	-	-
MH- skåler	Fekalt normalmateriale	25, 200 eller 500‡	5	-	-	20	-	-	-	100	250	12,5
	Ciprofloxacinresistent UVI-materiale	500	5	20	10 eller 20	20	8	100	2	-	250	-
LB- buljong		200	5	20	10	-	-	-	-	-	-	-

* = se kommentar i tekst før tabellen. † = 15 µg/ml ved *E. coli* DH5α eller *E. coli* HB101 som mottakere og 500 µg/ml ved *E. coli* J53 som mottaker. ‡ = 25 µg/ml ved *E. coli* DH5α som mottaker, 200 µg/ml ved *E. coli* HB101 som mottaker og 500 µg/ml ved *E. coli* J53 som mottaker.

4.2 Fekalt normalmateriale

4.2.1 Fekalt normalmateriale: Konjugasjonsforsøk

Konjugasjonsforsøk ble utført med *E. coli* DH5 α som mottaker og sulfonamid og tetracyclin som seleksjonsmiddel, samt med *E. coli* J53 som mottaker og sulfonamid, trimetoprim og tetracyclin som seleksjonsmidler. Videre ble det utført sekundære konjugasjonsforsøk med transipientene fra det primære forsøket som donorer og *E. coli* HB101 som mottaker.

Tabell 10 og 11 oppsummerer antall stammer som ga overføring av resistens ved direkte seleksjon i primære konjugasjonsforsøk, og hvilke primære transipienter som førte resistensen videre ved sekundære konjugasjonsforsøk.

Tabell 10: Oppsummering av vellykkede, primære konjugasjonsforsøk med fekalt normalmateriale som donor.

Mottaker Seleksjonsmiddel	<i>E. coli</i> DH5 α		<i>E. coli</i> J53	
	Antall utførte	Antall vellykkede	Antall utførte	Antall vellykkede
Tetracyclin	8	0	28	0
Trimetoprim	0	-	27	7
Sulfonamid	25	8	27*	8

* = enkelte av donorstammene med MIC^{Sulf} \geq 512 μ g/ml bestemt med E-test vokste av uviss grunn ikke på 500 μ g/ml sulfonamid, og av 39 isolater med MIC^{Sulf} \geq 512 μ g/ml klarte man kun å dyrke opp 27 isolater tilhørende to kloner. Se vedlegg 2 for hvilke isolater dette gjaldt.

Overføring av tetracyclinresistens

Av 8 stammer benyttet til konjugasjonsforsøk med *E. coli* DH5 α som mottaker og 28 stammer benyttet til konjugasjonsforsøk med *E. coli* J53 som mottaker ga ingen overføring av tetracyclinresistens ved direkte seleksjon.

Overføring av trimetoprimresistens

Konjugasjonsforsøk med trimetoprim som seleksjonsmiddel ble kun utført med bruk av *E. coli* J53 som mottaker. Av de 27 undersøkte isolatene overførte sju resistens mot trimetoprim

til *E. coli* J53. Man fikk vekst av åtte transipienter da donor nummer 1.2.8 ga vekst av transipienter både for liten og middels koloni. Isolatene som overførte resistens mot trimetoprim var de samme som overførte resistens mot sulfonamid, med unntak av nr 1.2.3 (se nedenfor). Av trimetoprim-transipientene overførte ingen resistens videre til *E. coli* HB101 (se tabell 11).

Overføring av sulfonamidresistens

Sulfonamid ble brukt som seleksjonsmiddel både ved primære konjugasjonsforsøk med *E. coli* DH5 α eller *E. coli* J53 som mottaker, samt ved sekundære konjugasjonsforsøk med *E. coli* HB101 som mottaker.

Resultater fra bruk av E. coli DH5 α som mottaker

Ved konjugasjonsforsøk med *E. coli* DH5 α som mottaker ga 25 donorer vekst av åtte transipienter fra åtte donorer. De overføringsdyktige isolatene utgjorde alle isolatene i en klon (klon 01), var isolert fra samme pasient og hadde likt resistensmønster. To av transipientene, DH5 α -c1.2.10^{Sulf} og DH5 α -c1.2.12^{Sulf}, overførte sulfonamidresistens videre til *E. coli* HB101 i et sekundært konjugasjonsforsøk (se tabell 11).

Resultater fra bruk av E. coli J53 som mottaker

Av de 27 donorene som ble benyttet i primære konjugasjonsforsøk overførte åtte sulfonamidresistens til *E. coli* J53, og disse var de samme isolatene som overførte sulfonamidresistens til *E. coli* DH5 α (se tabell 11.) En fikk vekst av elleve transipienter da tre av donorene (nummer 1.2.1, 1.2.3 og 1.2.8) ga vekst av transipienter for to undersøkte kolonistørrelser (liten og medium). Videre overføring av resistens fra J53-coliclon^{sulf} til *E. coli* HB101 i det sekundære konjugasjonsforsøket skjedde for fem av elleve transipienter (fem av åtte av de opprinnelige donorstammene) (se tabell 11).

Totalt fikk man overføring av sulfonamidresistens fra åtte donorer av totalt 138 isolater og 47 sulfonamidresistente isolater. Alle donorene tilhørte samme klon og hadde likt resistensmønster. Ingen av de andre 19 klonene overførte resistens, selv om en annen klon hadde samme resistensmønster som klonen som overførte resistens.

Tabell 11: Oversikt over isolater tilhørende det fekale normalmateriale som ga vekst av transipienter ved primære konjugasjonsforsøk med *E. coli* DH5 α eller *E. coli* J53 som mottaker og sulfonamid eller trimetoprim som seleksjonsmiddel. Primære transipienter som overførte resistens videre til *E. coli* HB101 i et sekundært konjugasjonsforsøk er merket med grått. I.u.= ikke utført pga kun en kolonistørrelse ved oppdyrking.

Donor*	Seleksjonsmiddel		
	Sulfonamid		Trimetoprim
	Mottaker		
	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> J53	<i>E. coli</i> J53
	Vekst av transipient?	Vekst av transipient?	Vekst av transipient?
Coliclon 1.2.1 (liten)	i.u.	Ja	Nei
Coliclon 1.2.1 (medium)	Ja	Ja	Ja
Coliclon 1.2.3 (liten)	i.u.	Ja	i.u.
Coliclon 1.2.3 (medium)	Ja	Ja	Nei
Coliclon 1.2.7	Ja	Ja	Ja
Coliclon 1.2.8 (liten)	i.u.	Ja	Ja
Coliclon 1.2.8 (medium)	Ja	Ja	Ja
Coliclon 1.2.9 (liten)	i.u.	i.u.	Nei
Coliclon 1.2.9 (medium)	Ja	Ja	Ja
Coliclon 1.2.10	Ja	Ja	Ja
Coliclon 1.2.11	Ja	Ja	Ja
Coliclon 1.2.12	Ja	Ja	Ja

* = Der det er funnet flere kolonistørrelser ved en oppdyrking og kun en kolonistørrelse ved en annen oppdyrking er denne ene størrelsen notert som medium.

4.2.2 Fekalt normalmateriale: Resistensundersøkelse av transipienter.

Alle J53-transipientene og DH5 α -transipientene som ble selektert med sulfonamid var resistente mot trimetoprim i tillegg til sulfonamid. Alle J53-transipientene som var selektert med trimetoprim var resistente mot sulfonamid i tillegg til trimetoprim. I de tilfellene der en fikk resistensoverføring fra J53-coliclon^{Sulf} eller DH5 α -coliclon^{Sulf} til *E. coli* HB101 var de sekundære transipientene også resistente mot begge disse antibiotika. MIC for sulfonamid eller trimetoprim forandret seg ikke fra donor til transipient så langt E-testen viste, og alle transipientene var høygradig resistente mot begge antibiotika. Av de antibiotika som ble benyttet til resistensundersøkelsene uttrykte ingen av transipientene annen overført resistens enn mot sulfonamid og trimetoprim. Se tabell 12.

Tabell 12: Resultater fra resistensundersøkelse med agardiffusjon og E-test.

	Tolkning av mm-soner [†]										MIC-verdier (µg/ml)	
	Sul	Trim	Tet	Amp*	Klor	Nit	Mec	Gen	Nal	Cip	Sul	Trim
Mottaker												
<i>E. coli</i> DH5α pUC19	S	S	-	R	-	S	I	-	-	S	0,75	0,023
DH5α-transipienter												
DH5α-c1.2.1 liten sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.1 medium sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.3 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.7 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.8 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.9 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.10 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.11 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.12 sulf	R	R	-	R	-	S	I	-	-	S	> 1024	> 32
Mottaker												
<i>E. coli</i> J53	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	8,0	0,125
J53-transipienter												
J53-c1.2.1 liten sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.1 medium sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.3 liten sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.3 medium sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.7 sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.8 liten sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.8 medium sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.9 sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.10 sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.11 sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.12 sulf	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.1 Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.7 Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.8 liten Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.8 medium Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.9 Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.10 Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.11 Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.12 Trim	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
Sekundær mottaker												
<i>E. coli</i> HB101	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	2,0	0,125
Sekundære transipienter												
DH5α-c1.2.10 sulf-HB101	R	R	-	I	-	S	S	S	-	S	> 1024	> 32
DH5α-c1.2.12 sulf-HB101	R	R	-	I	-	S	S	S	-	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.1liten sulf-HB101	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1-2-8 liten sulf-HB101	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.10 sulf-HB101	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.11 sulf-HB101	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32
J53-c1.2.12 sulf-HB101	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	> 1024	> 32

* = pUC19 bærer resistens mot ampicillin.

† = Etter AFAs retningslinjer (AFA, 2006). Nøyaktig avleste mm-soner er lagt i vedlegg 3.

4.2.3 Fekalt normalmateriale: Plasmidanalyser

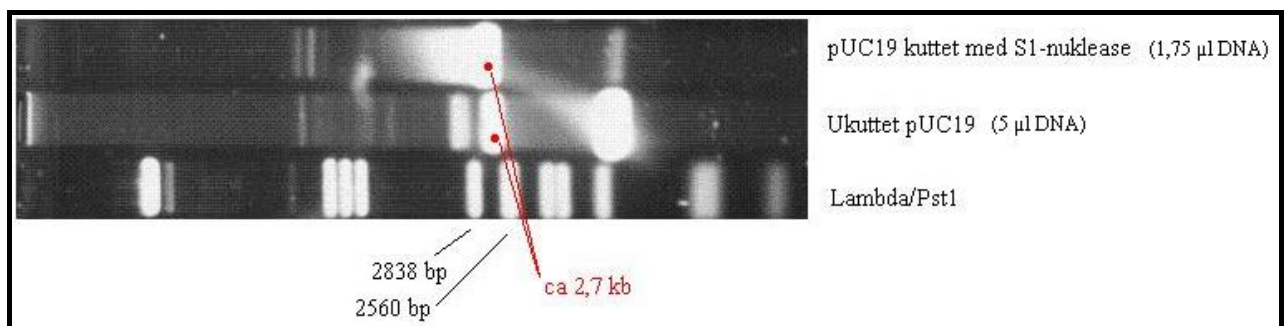
For å estimere antall og størrelse på plasmidene i donor og transipienter ble de linealisert ved kutting med S1-nuklease. Til hjelp i størrelsesbestemmelsen av de overførte plasmidene ble det også utført restriksjonskutting av plasmider i donor og DH5 α -coliclon.

Sammenfatning av plasmidstørrelsene, funnet både ved S1-kutting av plasmider isolert med miniprep og ved S1-kutting av plasmider i agaroseplugg, er presentert i tabell 13.

Små plasmider (≤ 11 kb)

Gelbilder fra S1-kutting av plasmider isolert med miniprep er lagt i vedlegg 4a-4d. Tolkning av plasmidstørrelsene fra gelbildene er sammenfattet i tabell 13.

For å unngå forstyrrelse fra ufullstendig kutting med S1-nuklease ble ukuttet og kuttet DNA sammenliknet. Bånd som mistet sin intensitet etter S1-kutting ble tolket som at de var sirkulære eller supertvunnede plasmidformer før kutting. Bånd som økte sin intensitet etter kutting ble regnet for å være linealiserte. Se figur 4, der båndet som har økt sin intensitet (til tross for mindre mengde påsatt kuttet DNA enn ukuttet DNA) stemmer overens med den kjente størrelsen til pUC19 (2,7 kb). Linealiserte plasmider kunne størrelsesbestemmes ved sammenlikning med den lineære størrelsesmarkøren. I flere tilfeller kunne man også se bånd som økte i intensitet etter S1-kutting og som man etter sammenlikning med restriksjonsprofilen og ukuttet DNA antok var åpne, sirkulære plasmider som stammet fra S1-kuttete supertvunnede plasmider.

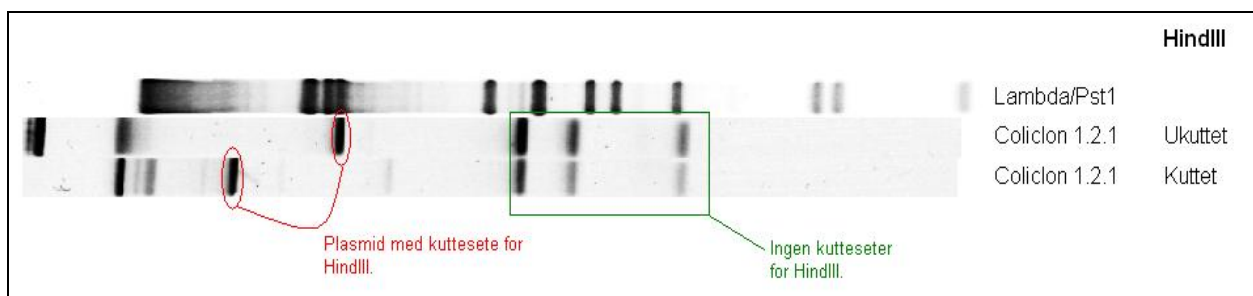


Figur 4: Eksempel på kutting med S1-nuklease: Plasmidinnhold i *E. coli* DH5 α (= pUC19) ukuttet og kuttet.

Figur 5a, 5b, 5c og 5d viser tankegangen rundt bestemmelsen av plasmidstørrelser- og antall, der resultatene er oppsummert i tabell 13. Som eksempel har en valgt transipientene en fikk

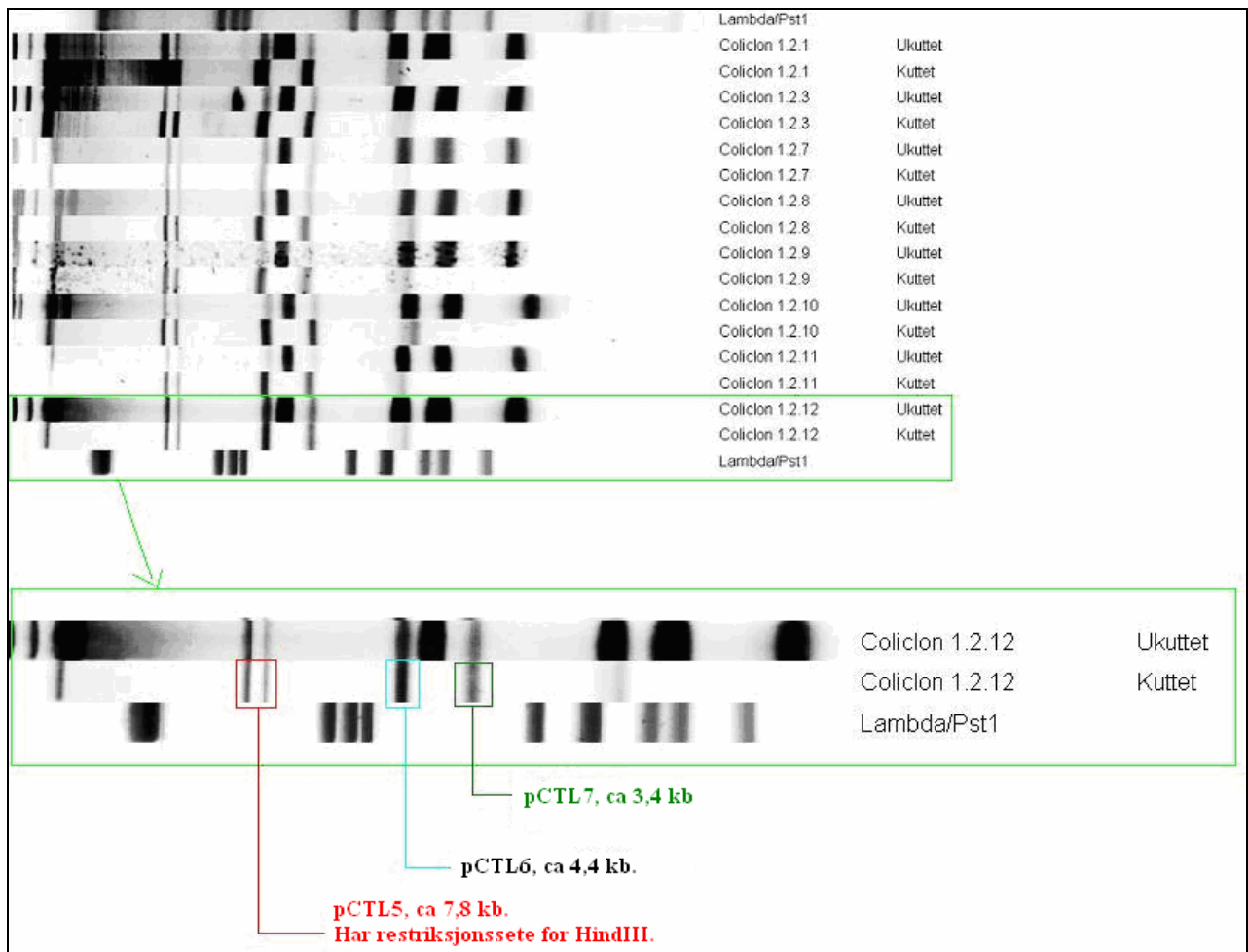
etter konjugasjonsforsøk med c1.2.7 og c.1.2.10 som donorer. Den førstnevnte representerer transipienter som ikke førte resistensdeterminanten videre i et sekundært konjugasjonsforsøk, men den andre gjorde det.

En startet med å undersøke om donorenes plasmider hadde restriksjonssteder for HindIII og om HindIII kunne brukes for linealisering av plasmidene. Man fant at forskjellen mellom ukuttet donor plasmid-DNA og kuttet donor plasmid-DNA kun var ett bånd som hadde endret posisjon (se figur 5a). Det ble derfor antatt av plasmidet som hadde endret posisjon hadde ett restriksjonssete for HindIII og sannsynligvis var blitt linealisert. Størrelsen ble funnet å være ca 7,8 kb. Dette ble senere bekreftet med S1-kutting. De øvrige plasmidene hadde ikke kuttsete for HindIII. HindIII kunne derfor ikke benyttes i størrelsesbestemmelse av alle plasmidene. Andre restriksjonszymer (RsaI og CfoI) ble også forsøkt benyttet, men ga ingen lett tolkbare resultater.



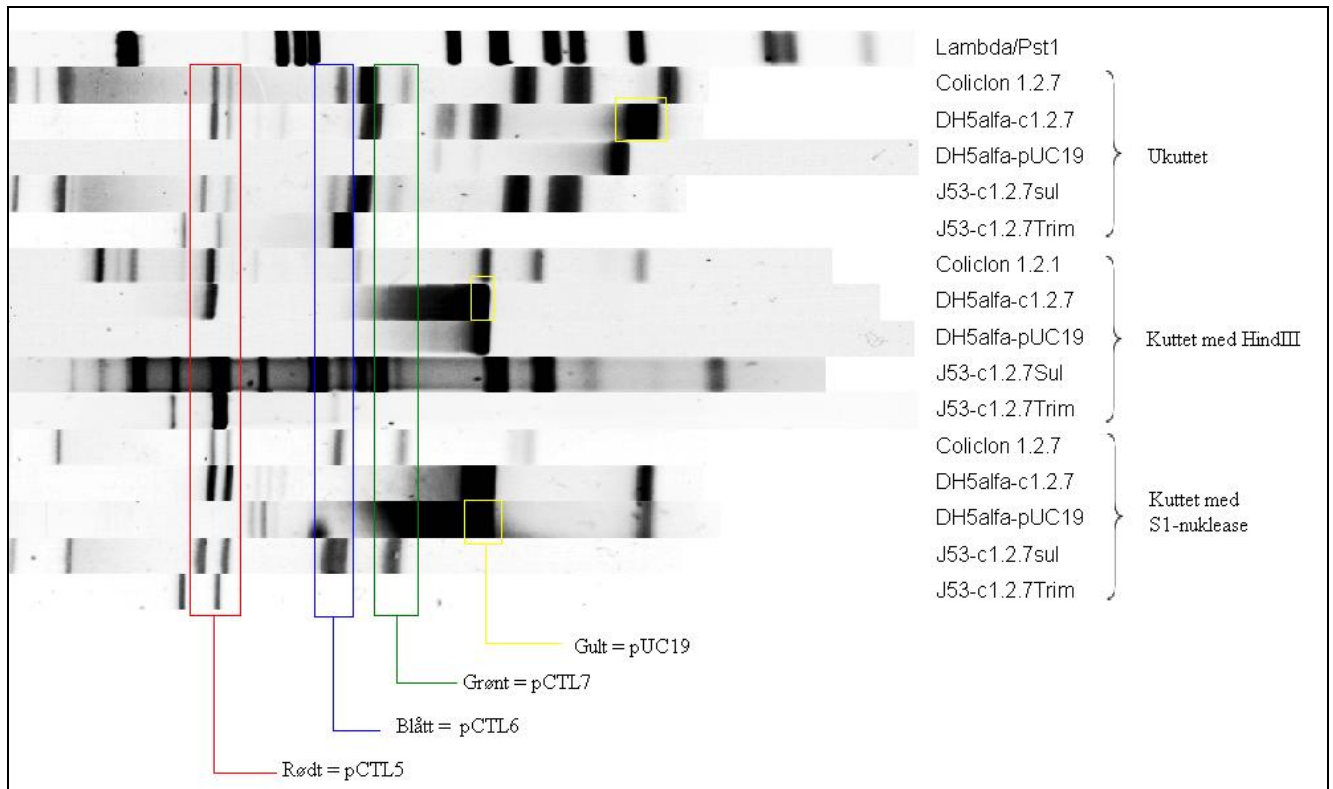
Figur 5 a: Plasmidinnholdet i donor, ukuttet og kuttet med HindIII med forklaring av hvilket plasmid som har kuttsete for HindIII. Coliclon 1.2.1 representerer alle donorene, da plasmidinnholdet innad i klonen med overførbar resistens var det samme.

Man ønsket også å størrelsesbestemme de andre plasmidene og bekrefte størrelsen på plasmidet som ble størrelsesbestemt med restriksjonskutting. Til dette benyttet man kutting med S1-nuklease. Ukuttet plasmidinnhold hos klon 01 i det fekale normalmaterialet var likt innad i klonen, med unntak av coliclon 1.2.8, 1.2.10 og muligens 1.2.12 som har et ekstra bånd (større enn størrelsesmarkørens største bånd på 11 kb). Ved kutting med S1-nuklease forsvant dette og det var derfor ikke lineært. Etter kutting med S1-nuklease så man at plasmidinnholdet av plasmider som lot seg separere på 0,7 % agarosegel var likt hos alle donorene (se figur 6b). Av plasmider som var mindre enn 11 kb inneholdt donorene tre plasmider på ca 7,8 kb, ca 4,4 kb og ca 3,4 kb. Disse er henholdsvis gitt navnene pCTL (Plasmid Coliclon TeleLab) 5, 6 og 7.



Figur 5 b: Plasmidinnholdet i donorstammene som overførte sulfonamid- eller trimetoprimresistens, både ukuttet og kuttet med S1-nuklease. pCTL5 er representert med hva som antas å være både lineær og åpen, sirkulær form av plasmidet.

Det ble observert at båndene ofte lå i par når de var ukuttet eller kuttet med S1-nuklease. Ved kutting med HindIII så man derimot ingen dobbeltbånd. Det ble derfor antatt at dobbeltbåndene bestod av linealisert og åpen sirkulær form av samme plasmid. Størrelsen til plasmidet som lot seg linealisere med HindIII ble sammenliknet med størrelsen til de to båndene som lå ved omtrent samme posisjon når de var kuttet med S1-nuklease. En fant da at det i det fleste tilfellene var det øverste båndet som var linealisert.

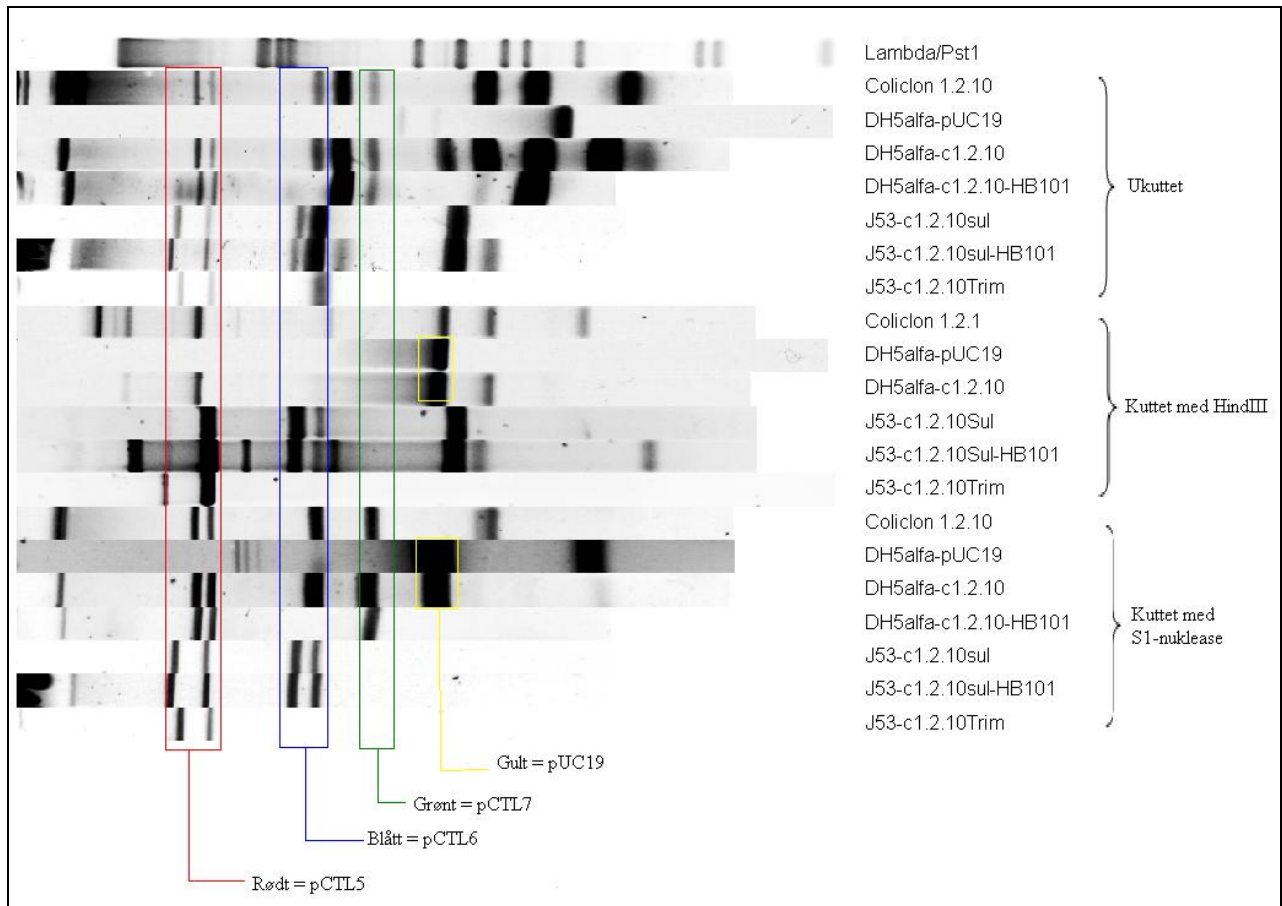


Figur 5 c: Illustrasjon av sammenhengen mellom plasmidinnhold i donor c1.2.7, DH5 α -c1.2.7^{Sul}, J53-c1.2.7^{Sul} og J53-c1.2.7^{Trim}. Da plasmidinnholdet i alle donorene er det samme er donor c1.2.1 i fremstillingen i stedet for donor c.1.2.7 da en ikke har kuttet denne med HindIII.

Hvilke plasmider som var overført ble bestemt fra resultatene av S1-kuttingen. Av plasmider mindre enn 11 kb i donor c1.2.7 ble alle tre overført til J53-c1.2.7^{Sul}. Kun pCTL5 ble overført til J53-c1.2.7^{Trim} og DH5 α -c1.2.7^{Sul}. Se figur 5c.

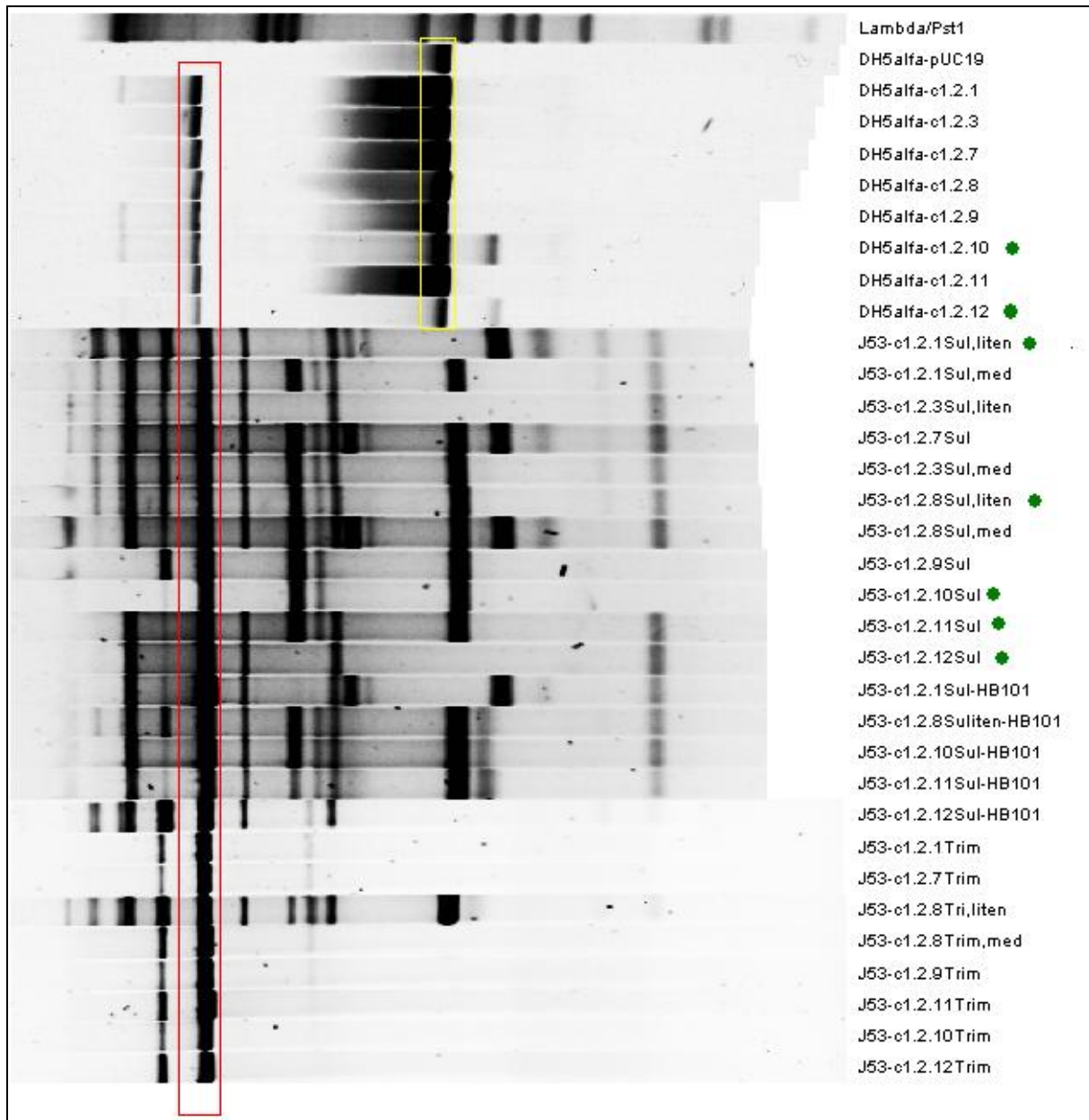
Alle plasmidene som var mindre enn 11 kb ble overført fra donor c1.2.10 til *E. coli* DH5 α ved seleksjon med sulfonamid. Sekundært konjugasjonsforsøk med *E. coli* HB101 som mottaker og sulfonamid som seleksjonsmiddel ga videre overføring av pCTL5 og pCTL7. Når *E. coli* J53 ble benyttet som mottaker fikk en overført pCTL5 og pCTL6 ved seleksjon med sulfonamid, mens kun CTL5 ble overført ved seleksjon med trimetoprim. Sekundært konjugasjonsforsøk ga som kjent kun vekst av transipienter der sulfonamid ble benyttet til seleksjon, og begge plasmidene i den primære transipienten ble overført. Se figur 6d.

For eventuelle plasmider større enn 11 kb, se resultater fra bruk av S1-PFGE.

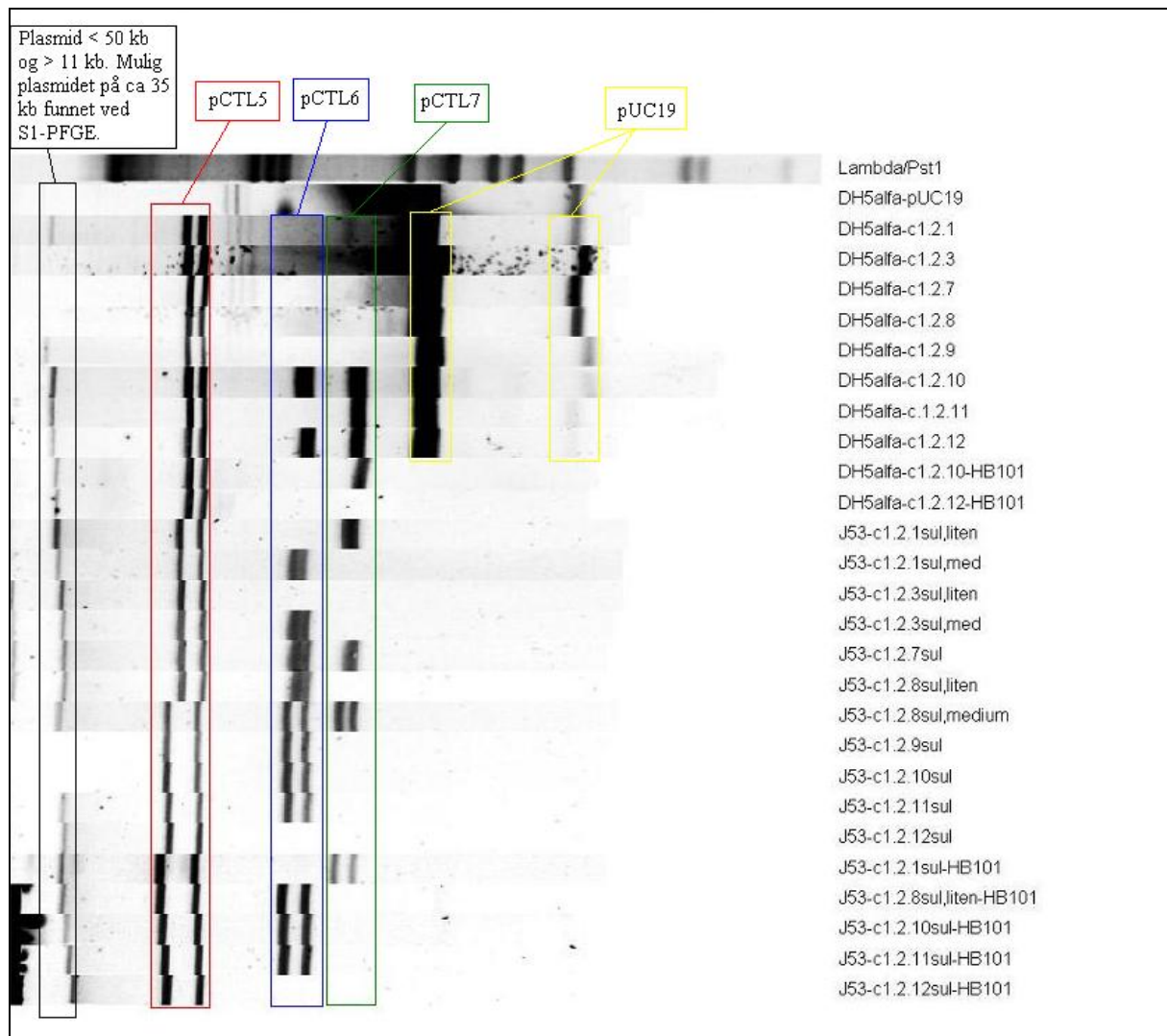


Figur 5 d: Illustrasjon av sammenhengen mellom plasmidinnhold i donor c1.2.10 og dens primære transipienter DH5 α -c1.2.10^{Sul}, J53-c1.2.10^{Sul} og J53-c1.2.10^{Trim} samt dens sekundære transipienter DH5 α -c1.2.10^{Sul}-HB101 og J53-c1.2.10^{Sul}-HB101. Da plasmidinnholdet i donorene er likt er det benyttet donor c1.2.1 i fremstillingen i stedet for donor c1.2.10 da den ikke har kuttet denne med HindIII.

Man ønsket så å se om det var et plasmid som ble funnet igjen i alle transipientene, da dette kunne bety at det bar på resistensdeterminantene. Man ønsket også å se om det var en sammenheng mellom plasmidinnhold og bakteriens overføringsevne. Ved kutting med HindIII (se figur 6) så man at pCTL5 var det eneste plasmidet som befant seg i alle transipientene, uavhengig av hvilken mottakerbakterie eller seleksjonsmiddel som ble benyttet i konjugasjonsforsøket. Av andre ting man la merke til var at alle DH5 α -transipientene, unntatt DH5 α -c1.2.10^{Sul} og DH5 α -c1.2.12^{Sul}, kun inneholdt pCTL5 av plasmidene som var mindre enn 11 kb. Det samme gjaldt alle J53-transipientene selektert med trimetoprim, unntatt J53-c1.2.8liten^{Trim}. (se tabell 13). Det samme fant man da plasmidene ble kuttet med S1-nuklease (se figur 7), med unntak at det kom frem at DH5 α -c1.2.11 også inneholdt pCTL7. Generelt hadde J53-transipientene selektert med sulfonamid en mer komplisert plasmidprofil enn de øvrige transipientene.



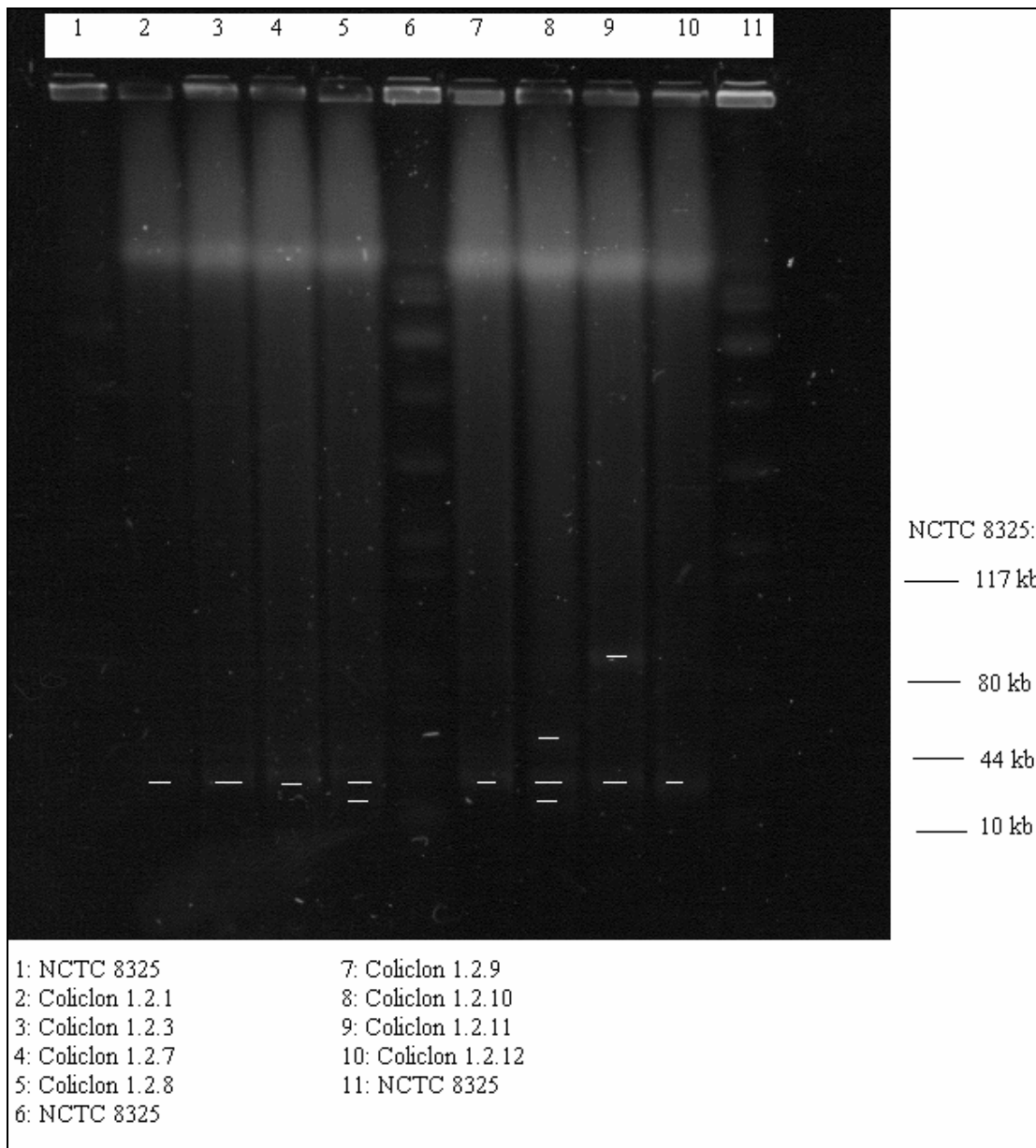
Figur 6: Grafisk sammenstilling av restriksjonsprofiler fra HindIII-kutting av plasmider i alle transipienter. Gult = pUC19 (2,7 kb), rødt = eneste bånd (7,8 kb) som går igjen i alle transipientene = pCTL5, grønn sirkel = transipienter som overførte resistens i sekundære konjugasjonsforsøk med *E. coli* HB101.



Figur 7: Sammenlikning av plasmider isolert fra sulfonamidtransipienter, kuttet med S1-nuklease. Rødt = pCTL5, blått = pCTL6, grønt = pCTL7 og gult = pUC19. Alle trimetoprim-transipientene, unntatt J53-c1.2.8liten^{Trim}, inneholdt kun pCLT5 og er derfor ikke tatt med i oversikten.

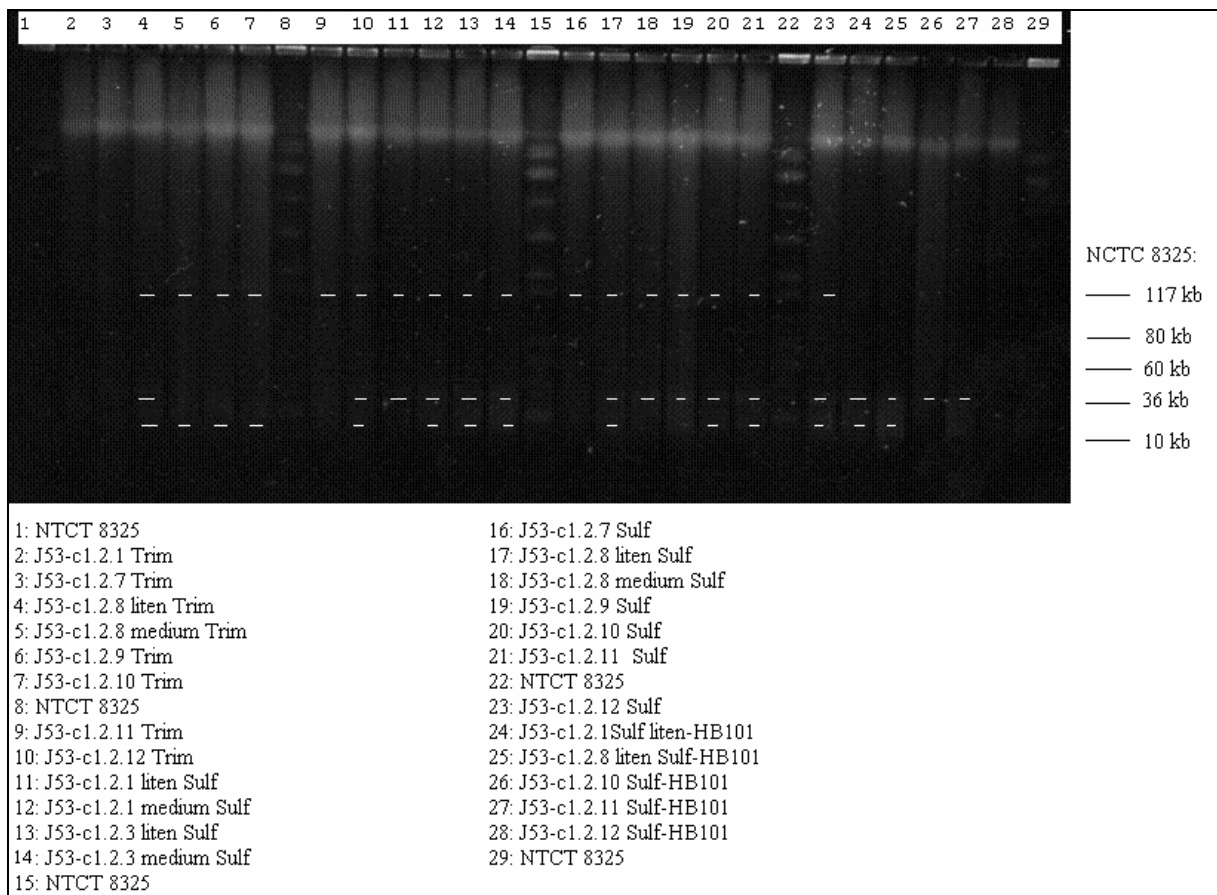
Mellomstore og store plasmider (> 11 kb)

Plasmider over 11 kb ble størrelsesbestemt ved bruk av S1-PFGE. Det ble ikke utført S1-PFGE på transipienter fra konjugasjonsforsøk med fekalt normalmateriale som donator og *E. coli* DH5 α som mottaker. Av den grunn hadde en ingen data på om disse transipientene hadde fått overført plasmider > 11 kb, annet enn at en kan se bånd helt øverst i gelen på gel med plasmider fra miniprep kuttet med S1-nuklease.



Figur 8: Gelbilde fra S1-PFGE av donorer i det fekale normalmaterialet som overførte resistens i konjugasjonsforsøk. Plasmidbånd (svake) er markert med hvit strek.

Gelbildene i figur 8 og 9 viste at alle donorene inneholdt et plasmid på ca 35 kb (= pCTL3). Donor nummer 1.2.8 og 1.2.10 så også ut til å inneholde et plasmid på ca 15 kb (= pCTL4), samt at nummer 1.2.10 inneholdt et plasmid på ca 50 kb (= pCTL2). Nummer 1.2.9 og 1.2.11 inneholdt et plasmid på ca 90 kb (= pCTL1) og dette kan muligens også være til stede i de resterende donorstammene (veldig svakt bånd). Alle J53-transipientene selektert med sulfonamid og fire av sju J53-transipienter selektert med trimetoprim inneholdt pCTL1. Plasmidet ble ikke overført videre til *E. coli* HB101. pCTL2 ser ikke ut til å ha blitt overført. pCTL3 ble overført til alle J53-transipientene selektert med sulfonamid, men ble kun funnet hos to av sju J53-transipienter selektert med trimetoprim. Se tabell 13.



Figur 9: Gelbilde fra S1-PFGE av transpienter fra konjugasjonsforsøk med det fekale normalmaterialet som donorer. Plasmidbånd (svake) er markert med hvit strek.

Tabell 13: Sammenfatning over plasmider funnet i donorer fra fekalt normalmateriale og deres transipienter.

X = plasmid tilstede.

Metode	Plasmid (pCTL nr) (størrelse)	1	2	3	4	5	6	7
		90 kb	50 kb	35 kb	15 kb	7,8 kb	4,4 kb	3,4 kb
Coliclon 1.2.1		-	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.1 liten ^{Sul}		X	-	X	-	X	-	X
J53-c1.2.1 liten ^{Sulf} -HB101		-	-	X	X	X	-	X
J53-c1.2.1 medium ^{Sul}		X	-	X	X	X	X	-
J53-c1.2.1 ^{Trim}		-	-	-	-	X	-	-
DH5α-c1.2.1 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	> 11	X	-	-
Coliclon 1.2.3		-	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.3 liten ^{Sul}		X	-	X	X	X	-	-
J53-c1.2.3 medium ^{Sul}		X	-	X	X	X	X	-
DH5α-c1.2.3 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	-	X	-	-
Coliclon 1.2.7		-	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.7 ^{Sul}		X	-	-	-	X	X	X
J53-c1.2.7 ^{Trim}		-	-	-	-	X	-	-
DH5α-c1.2.7 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	-	X	-	-
Coliclon 1.2.8		-	-	X	X	X	X	X
J53-c1.2.8 liten ^{Sul}		X	-	X	X	X	X	-
J53-c1.2.8 liten ^{Sulf} -HB101		-	-	X	X	X	X	-
J53-c1.2.8 medium ^{Sul}		X	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.8 liten ^{Trim}		X	-	X	X	X	X	-
J53-c1.2.8 medium ^{Trim}		X	-	-	X	X	-	-
DH5α-c1.2.8 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	-	X	-	-
Coliclon 1.2.9		X	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.9 ^{Sul}		X	-	X	-	X	X	-
J53-c1.2.9 ^{Trim}		X	-	-	X	X	-	-
DH5α-c1.2.9 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	> 11	X	-	-
Coliclon 1.2.10		-	X	X	X	X	X	X
J53-c1.2.10 ^{Sul}		X	-	X	X	X	X	-
J53-c1.2.10 ^{Sulf} -HB101		-	-	X	-	X	X	-
J53-c1.2.10 ^{Trim}		X	-	-	X	X	-	-
DH5α-c1.2.10 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	> 11	X	X	X
DH5α-c1.2.10 ^{Sulf} -HB101		i.u	i.u	i.u	-	X	-	X
Coliclon 1.2.11		X	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.11 ^{Sul}		X	-	X	X	X	X	-
J53-c1.2.11 ^{Sulf} -HB101		-	-	X	-	X	X	-
J53-c1.2.11 ^{Trim}		X	-	-	-	X	-	-
DH5α-c1.2.11 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	-	X	-	X
Coliclon 1.2.12		-	-	X	-	X	X	X
J53-c1.2.12 ^{Sul}		X	-	X	X	X	-	-
J53-c1.2.12 ^{Sulf} -HB101		-	-	-	-	X	-	-
J53-c1.2.12 ^{Trim}		X	-	X	X	X	-	-
DH5α-c1.2.12 ^{Sulf}		i.u	i.u	i.u	-	X	X	X
DH5α-c1.2.12 ^{Sulf} -HB101		i.u	i.u	i.u	-	X	-	-

4.3 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale

Resultater fra både konjugasjonsforsøk, resistensundersøkelser og plasmidundersøkelser er oppsummert i tabell 18a-18c.

4.3.1 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale: Konjugasjonsforsøk

Ved oppdyrking av donorer til konjugasjonsforsøk viste det seg at enkelte ikke lot seg dyrke på de konsentrasjoner av seleksjonsmiddel som var nødvendig for å skille vekst av mottaker og donor. Hvilke isolater dette gjaldt og antall isolater benyttet i konjugasjonsforsøkene er oppsummert i tabell 14.

Av 35 isolater ga 13 (37 %) sikker vekst av transipienter ved konjugasjonsforsøk med *E. coli* J53 Az^R som mottaker (se tabell 14). Disse stammene var FQ nr 5, 8, 18, 19, 25, 28, 30, 32, 36, 39, 47, 51 og 56 hvor nr 5 og 56 er klonalt like, samt nr 18 og 30 (Grude, Strand et al. 2008). I tillegg fikk man vekst av mulige transipient-kolonier på enkelte skåler, der man måtte ha hjelp av resultater fra resistensundersøkelser og plasmidundersøkelser til å fastslå om det var en ekte transipient, eller om det var donor eller mottaker som hadde klart å overleve på konjugasjonsskålen. Særlig gjaldt dette konjugasjonsforsøk der kanamycin ble benyttet som seleksjonsmiddel. Vurdering av kolonienes morfologi og lukt ble også benyttet som hjelpemiddel. Isolatene man var usikre på om overførte resistens var: FQ nr 7, 10, 14, 27, 33, 50 og 53. Videre resistens- og plasmidundersøkelser av disse viste at nr 7, 10, 14 og 33 var ren mottaker (*E. coli* J53) som hadde klart å overleve på selektivt medium. FQ nr 27, 50 og 53 rådet det fortsatt tvil om etter resistens- og plasmidundersøkelsene.

Tabell 14: Ciprofloxacinresistente isolater benyttet i konjugasjonsforsøk, samt forklaring på hvorfor de eventuelt ikke ble benyttet. Isolater med sikker overførbar resistens ved direkte seleksjon er merket med grått. S = sensitiv, I = intermediær.

FQ #	Benyttet seleksjonsmiddel						Nal/ Cipro
	Amp	Sul	Tet	Klor	Trim	Kan	
1	x	x	x	x	x	S	x
3	x	x	x	x	x	x	x
4	x	x	S	S	x	S	x
5	x	x	x	x	x	Se komm.*	x
7	x	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	S	x	S	x
9	I	x	x	x	x	I	x
10	x	Se komm.*	x	S	S	x	x
11	x	x	x	x	x	Se komm.*	x
14	x	x	I	S	x	x	x
17	x	x	x	S	x	I	x
18	x	x	x	S	x	x	x
19	x	x	x	x	x	x	x
25	x	x	x	S	x	S	x
26	x	x	x	x	x	S	x
27	x	x	x	x	x	x	x
28	x	x	x	x	x	x	x
30	x	x	x	S	x	x	x
32	x	x	x	x	x	x	x
33	x	x	x	x	x	x	x
35	I	S	x	S	S	I	x
36	x	x	x	x	x	x	x
38	x	x	x	S	x	x	x
39	x	x	x	x	x	S	x
43	x	x	x	x	x	S	x
44	x	x	x	x	x	S	x
45	x	x	x	S	x	Se komm.*	x
47	x	x	x	S	S	x	x
48	x	x	x	S	x	I	x
49	x	x	x	S	x	S	x
50	x	x	x	x	x	x	x
51	x	x	x	x	x	x	x
53	x	x	x	x	x	x	x
54	x	x	x	S	x	x	x
56	x	x	x	S	x	Se komm.*	x
Sum utførte	33	33	33	19	32	18	35
Sum vellykket	3	4	1	3	5	5	0
% vellykket av utførte	9,1	12,1	3,0	15,8	15,6	27,8	0

* = Ingen vekst på selektiv skål, til tross for MIC høyere enn konsentrasjonen av seleksjonsmiddel i dyrkningsmediet.

4.3.2 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale: Resistensundersøkelse av transipienter

Fra resistensundersøkelsene så man at flere av plasmidene bar resistensdeterminanter som ikke hadde latt seg selekttere direkte. Dette ble kontrollert og resultatet ble det samme. Det ble funnet 14 ulike resistensmønstre blant transipientene (se tabell 15), og hvis man kun inkluderte de sikre transipientene hadde 18 av 21 fått overført resistens mot minst en ekstra type antibiotika i tillegg til den som ble benyttet som seleksjonsmiddel i konjugasjonsforsøket. Hyppigste overførte resistensdeterminanter var mot sulfonamid (16 av 21 transipienter) og ampicillin (17 av 21 transipienter) (se tabell 16 a-c).

Tabell 15: Oppsummering av de ulike resistensmønstre og hyppigheten av disse blant transipientene fra konjugasjonsforsøk mellom ciprofloxacinresistente UVI-isolater som donor og *E. coli* J53 som mottaker.

Donorer (inkl usikre)	Antall transipienter (inkl usikre)	Resistensmønster
18 og 47 (50)	2 (3)	Kan
19, 32	2	Kan, cip
(27 og 53)	(2)	Kan, cip, nal
19	2	Kan, cip, amp, sul,
5	1	Kan, cip, amp, nal, sul, trim, tet, klor, gen
5	1	Kan, amp, sul, trim, tet
30	1	(Kan), amp, sul, trim, tet, gen
5	3	Cip, nal, amp, sul, tet, klor
28	1	Cip, nal, amp, sul, trim, tet, klor
28 og 36	2	Cip, amp, sul, trim, tet, klor
47	1	Amp
39	1	Amp, sul
51	1	Amp, sul, klor
8, 25 og 56	3	Amp, sul, trim, tet
Sum	21 (24)	

Tabell 16 a: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E-test (tofolds avlesning) for mottaker (*E. coli* J53), donorer og transpienter. Usikre transpienter er skrevet i lysegrått.

Stamme	Amp*	Tri*	Sul*	Cip*	Nal*	Tet*	Klo*	Gen*	Kan
<i>E. coli</i> J53 (mottaker)	4,0	0,25	8,0	0,008	4,0	1,0	8,0	0,128	2,0
FQ 5 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	256	64,0	256
J53-FQ 5 Amp (transpient)	256	S	512	0,032	16,0	256	16,0	S	S
J53-FQ 5 Sul (transpient)	256	S	512	0,032	8,0	256	32,0	S	S
J53-FQ 5 Trim (transpient)	256	32,0	512	0,008	4,0	256	S	S	256
J53-FQ 5 Tet (transpient)	256	S	512	0,032	8,0	256	16,0	S	S
J53-FQ 5 Klor (transpient)	256	32,0	512	0,032	16,0	256	32,0	8,0	256
FQ 8 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	4,0 (S)	0,25 (S)	2,0 (S)
J53-FQ8 Trim (transpient)	256	32,0	512	0,016	2,0	256	S	S	S
FQ 18 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	8,0 (S)	64,0	8,0
J53-FQ 18 Kan (transpient)	S	S	S	0,016	4,0	S	S	S	8,0
FQ 19 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	16,0	16,0	0,50	64,0
J53-FQ19 Amp (transpient)	256	S	512	0,032	4,0	S	S	S	16,0
J53-FQ19 Sul (transpient)	256	S	512	0,032	4,0	S	S	S	16,0
J53-FQ19 Kan (transpient)	S	S	S	0,032	4,0	S	S	S	64,0
FQ 25 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	4,0 (S)	0,125 (S)	2,0 (S)
J53-FQ25 Trim (transpient)	256	32,0	512	0,016	4,0	256	S	S	S
FQ 27 (donor)	256	32,0	256	32,0	256	256	256	4,0	256
J53-FQ 27 Kan [†] (transpient)	-	-	-	32,0	256	-	-	-	256

Tabell 16 b: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E-test (tofolds avlesning) for mottaker (*E. coli* J53), donorer og transipienter. Usikre transipienter er skrevet i lysegrått. Sensitive isolater er angitt som S, med unntak for ciprofloxacin og nalidixinsyre der MIC er notert selv om isolatet er sensitivt etter AFAs retningslinjer.

Stamme	Amp*	Tri*	Sul*	Cip*	Nal*	Tet*	Klo*	Gen*	Kan
J53 (mottaker)	4,0	0,25	8,0	0,008	4,0	1,0	8,0	0,128	2,0
FQ 28 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	256	0,25 (S)	256
J53-FQ28 Klor (transipient)	256	32,0	512	0,032	4,0	256	256	S	S
J53-FQ28 Trim (transipient)	256	32,0	512	0,032	16,0	256	256	S	S
FQ 30 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	4,0 (S)	256	16,0
J53-FQ30 Kan (transipient)	256	32,0	512	0,008	1,0	16,0	S	6,0	2,0 (S)
FQ 32 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	256	32,0	64,0
J53-FQ32 Kan (transipient)	S	S	S	0,064	4,0	S	S	S	32,0
FQ 36 (donor)	12	32,0	512	32,0	256	256	12,0	0,125 (S)	256
J53-FQ36 Klor (transipient)	256	32,0	512	0,032	4,0	256	256	S	S
FQ 39 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	32,0	0,25 (S)	2,0 (S)
J53-FQ 39 Sulf (transipient)	256	S	512	0,008	4,0	S	S	S	S
FQ 47 (donor)	256	0,500 (S)	512	32,0	256	256	4,0 (S)	32,0	8,0
J53-FQ47 Amp (transipient)	256	S	S	0,016	4,0	S	S	S	S
J53-FQ47 Kan (transipient)	S	S	S	0,016	4,0	S	S	S	64,0
FQ 50 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	256	1,00 (S)	32,0
J53-FQ50 Kan (transipient)	S	S	S	0,016	4,0	S	S	S	6,0

Tabell 16 c: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E-test (tofolds avlesning) for mottaker (*E. coli* J53), donorer og transpienter. Usikre transpienter er skrevet i lysegrått. Sensitive isolater er angitt som S, med unntak for ciprofloxacin og nalidixinsyre der MIC er notert selv om isolatet er sensitivt etter AFAs retningslinjer.

Stamme	Amp*	Tri*	Sul*	Cip*	Nal*	Tet*	Klo*	Gen*	Kan
J53 (mottaker)	4,0	0,25	8,0	0,008	4,0	1,0	8,0	0,128	2,0
FQ 51 (donor)	256	32,0	512	16,0	256	256	128	0,25 (S)	256
J53-FQ51 Sul (transpient)	256	S	512	0,008	4,0	S	64,0	S	S
FQ 53 (donor)	256	32,0	512	32,0	256	256	256	32,0	256
J53-FQ53 Kan [†] (transpient)	-	-	-	32,0	256	-	-	-	256
FQ 56 (donor)	128	32,0	512	8,0	256	256	8,0 (S)	0,25 (S)	8,0
J53-FQ56 Trim (donor)	256	32,0	512	0,008	4,0	256	S	S	S
Antall resistente sikre transpienter (inkl usikre)	17	9	16	11 (13)	3 (5)	12	8	2	8 (12)

* = Der hvor MIC-verdien på transpienten overstiger donorens MIC, eller omvendt, er det notert samme MIC-verdi da det er benyttet E-tester med ulik maksimumsgrense for måling av MIC på transpient og donor. Se vedlegg 6a - 6c for de nøyaktig avleste MIC-verdiene for transpient og donor.

† = "Transpienten" har vært resistent for alle de samme antibiotika som donorisolatet ved resistensundersøkelser med agar-diffusjon. E-test mot disse er derfor ikke utført da man antar "transpienten" er en mutert donor, som også MIC-verdiene mot kinoloner og kanamycin kan tyde på.

Kjent plasmidmediert resistens mot kinoloner gir kun en svak økning i MIC i seg selv (Martinez-Martinez, Pascual et al. 1998), og selv om transpientenes MIC-verdier mot kinoloner i dette forsøket ikke var høye nok til å defineres som resistente kan det være at MIC-verdien har økt hos transpienten i forhold til hos mottakeren. Fra åtte repeterte E-tester mot ciprofloxacin og nalidixinsyre fant man at MIC-verdiene for *E. coli* CCUG 17620 mot disse kun varierte med pluss-minus én fortykning. MIC-verdien til *E. coli* J53 antas derfor også å variere med en fortykning (se vedlegg 5). For å vurdere om MIC-verdien mot nalidixinsyre eller ciprofloxacin hadde økt i transpienten ble det valgt å si at denne endringen måtte bestå i en økning av MIC på mer enn tofolds i forhold til MIC-verdien hos *E. coli* J53. Med dette kravet fant man hos de 21 sikre transpientene en økning i MIC for nalidixinsyre hos fem transpienter, og økning i MIC for ciprofloxacin hos 11 transpienter (se tabell 17).

De sikre transipientene som hadde fått overført kinolonresistens stammet fra konjugasjonsforsøk med fem ulike donorer: nr 5, 19, 28, 32 og 36, hvor transipientene fra donor nr 19, 32 og 36 kun hadde økning i MIC for ciprofloxacin og ikke for nalidixinsyre (se tabell 17). Av donorstammene som har gitt vekst av transipienter med økt MIC for kinoloner er nr 19 og nr 32 PCR-positive for den muterte varianten av aminoglykosidase *aac(6')-Ib* (*aac[6']-Ib-cr*) (upublisert, as Telelab), som gir resistens mot ciprofloxacin i tillegg til kanamycin (ikke gentamicin) (Robicsek, Strahilevitz et al. 2006). Det er usikkert om det tredje isolatet (FQ 53) som var PCR-positiv for *aac(6')-Ib-cr* (upublisert, as Telelab) overførte kinolonresistens.

Tabell 17: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E-test (nøyaktig avlest) for transipienter som har fått overført resistens mot fluorkinoloner, og sammenlikning av denne med MIC-verdi til mottakerstammen. Kun de stammer som har fått overført kinolonresistens er inkludert i tabellen.

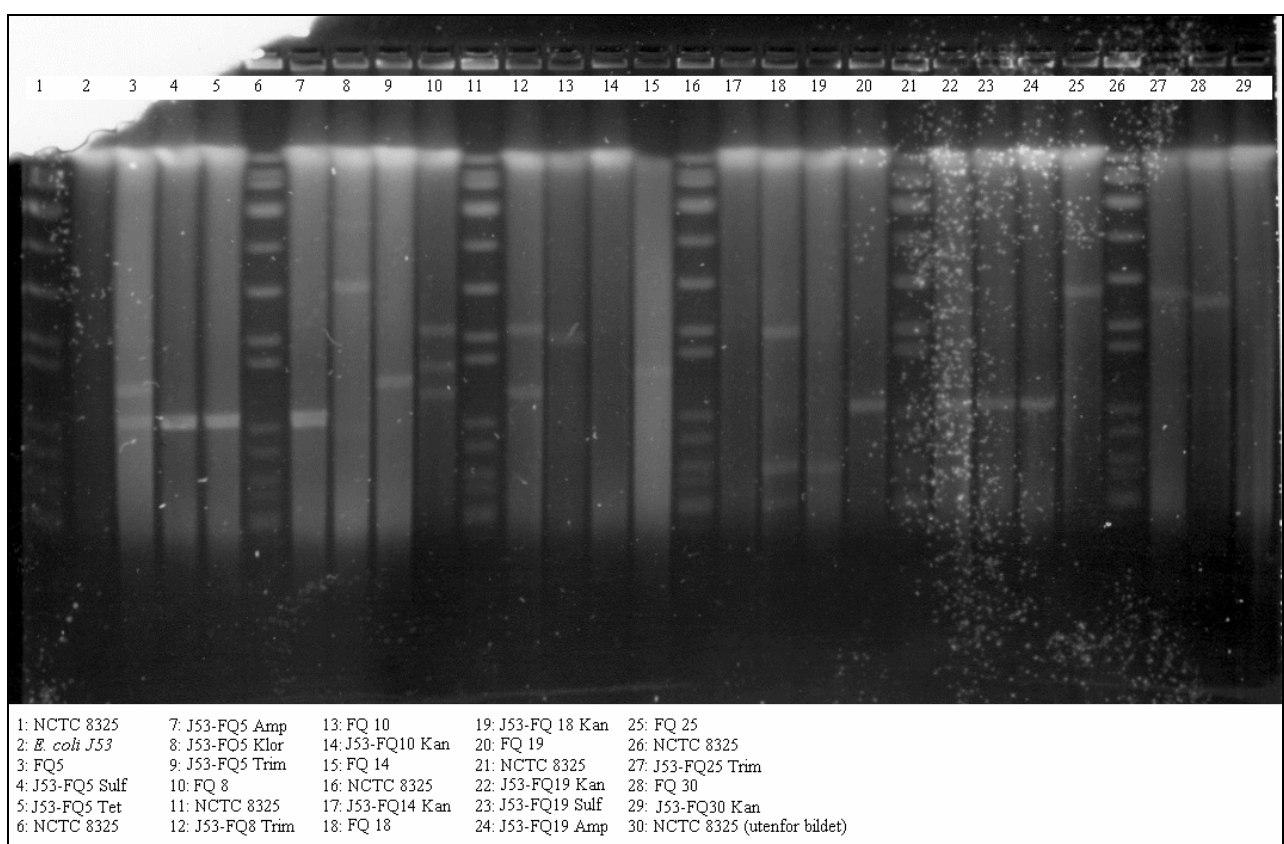
Stamme	Nalidixinsyre			Ciprofloxacin		
	MIC-verdi ($\mu\text{g/ml}$)	Antall fortynninger endring fra <i>E. coli</i> J53	Reell endring?	MIC-verdi ($\mu\text{g/ml}$)	Antall fortynninger endring fra <i>E. coli</i> J53	Reell endring?
J53-FQ 5 Amp	12	4	Ja	0,032	5	Ja
J53-FQ 5 Sul	8	3	Ja	0,032	5	Ja
J53-FQ 5 Tet	8	3	Ja	0,032	5	Ja
J53-FQ 5 Klor	12	4	Ja	0,032	5	Ja
J53-FQ19 Amp	3	0	Nei	0,032	5	Ja
J53-FQ19 Sul	3	0	Nei	0,032	5	Ja
J53-FQ19 Kan	3	0	Nei	0,032	5	Ja
J53-FQ27 Kan	256	-	Se komm [*]	32	-	Se komm [*]
J53-FQ28 Klor	3	0	Nei	0,023	4	Ja
J53-FQ28 Trim	12	4	Ja	0,023	4	Ja
J53-FQ32 Kan	3	0	Nei	0,047	6	Ja
J53-FQ36 Klor	3	0	Nei	0,023	4	Ja
J53-FQ53 Kan	256	-	Se komm [*]	32	-	Se komm [*]
	Totalt antall økte MIC		5	Totalt antall økte MIC		11

* = Mulig donor.

4.3.3 Ciprofloxacinresistent UVI-materiale: Plasmidundersøkelser

Til størrelsesbestemmelse av plasmidene i det ciprofloxacinresistente UVI-materiale ble det benyttet S1-kutting, både i plugg (store plasmider) og i miniprep (små plasmider). Resultatene ble vurdert på samme måte som for det fekale normalmaterialet.

Figur 10 viser hvordan en S1-PFGE gel ser ut. Resultater fra tolkning av denne og andre S1-PFGE geler er sammenfattet i tabell 18a-c, sammen med plasmidstørrelsene funnet ved S1-kutting av plasmider fra miniprep.



Figur 10: Gelbilde fra S1-PFGE, med enkelte av donorene og transipientene fra det ciprofloxacinresistente UVI-materialet. Størrelsesmarkør = *S. aureus* NCTC 8325.

Kun to av de undersøkte donorene (nr 36 og 39) inneholdt plasmider som var mindre enn 11 kb, mens alle inneholdt plasmider som var større enn 11 kb. Alle plasmidene som ble overført til transipientene var større enn 11 kb. Av transipientene man fortsatt var usikker på om var ekte fant man ingen plasmider verken i J53-FQ7^{Kan?}, J53-FQ14^{Kan?} eller J53-FQ33^{Kan?} og kombinert med resultatene fra resistensundersøkelsen antok man at disse derfor var *E. coli* J53 som klarte å vokse på selektiv skål. En var også usikker på J53-FQ27^{Kan?}, J53-FQ50^{Kan?}

og J53-FQ53^{Kan}. Av disse inneholdt J53-FQ50^{Kan?} og J53-FQ53^{Kan?} ingen plasmider, selv om resultatene var vanskelige å tolke grunnet degradering. Transipienten J53-FQ27^{Kan?} inneholdt de samme to plasmidene som donoren, men sammenlikner man dette med resultatene fra resistensundersøkelsene er det fortsatt uløst om man har fått vekst av transipient eller donor. Den siste stammen man var usikker på, J53-FQ30^{Kan?}, inneholdt et plasmid som var større enn 11 kb, men for lite til å kunne ses på S1-PFGE-gelen. En antar derfor at J53-FQ30^{Kan} er en ekte transipient. Hva som gjorde at den kun hadde MIC^{Kan} = 2,0 µg/ml når den ble selektert på 20 µg/ml kanamycin er derimot usikkert.

Generelt så man at det ble overført store plasmider > 40 kb, hvilket kan stemme med at transipientene i stor grad er multiresistente.

Tabell 18 a: Oppsummering av resultater fra konjugasjonsforsøk, resistensanalyser og plasmidundersøkelser.

Donor	Donor: Resistens	Donor: Plasmider	Overfører*	Transipient: Resistens	Transipient: Plasmider	Kommentar
5	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor, gen, kan	100 kb, 85 kb	Ampicillin	Amp, sul, cip, nal, tet, klor	85 kb	Donor tilhører samme klon som nr 56.
			Sulfonamid	Amp, sul, cip, nal, tet, klor	85 kb	
			Tetracyclin	Amp, sul, cip, nal, tet, klor	85 kb	
			Kloramfenikol	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor, gen, kan	180 kb, 240 kb	
			Trimetoprim	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, kan	100 kb	
8	Amp, trim, sul, cip, nal, tet	140 kb, 110 kb, 90 kb	Trimetoprim	Amp, trim, sul, tet	140 kb, 90 kb	-
18	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, gen, kan	135 kb, 40 kb, 10 kb	Kanamycin	Kan	40 kb	Donor tilhører samme klon som nr 30.
19	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor, kan	85 kb	Ampicillin	Amp, sul, cip, kan	85 kb	Donor er positiv for AAC(6')-Ib-cr.
			Sulfonamid	Amp, sul, cip, kan	85 kb	
			Kanamycin	Cip, kan	85 kb	

* = Ved direkte seleksjon

Tabell 18 b: Oppsummering av resultater fra konjugasjonsforsøk, resistensanalyser og plasmidundersøkelser.

Donor	Donor: Resistens	Donor: Plasmider	Overfører*	Transipient: Resistens	Transipient: Plasmider	Kommentar
25	Amp, trim, sul, cip, nal, tet	170 kb	Trimetoprim	Amp, trim, sul, tet	170 kb	-
28	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor	170 kb, 70 kb	Kloramfenikol	Amp, trim, sul, cip, tet, klor	170 kb	-
			Trimetoprim	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor	170 kb	-
30	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, gen, kan	165 kb	Kanamycin	Amp, trim, sul, tet, (gen)	> 11 kb	Transipient vokste på 10 µg/ml kanamycin til tross for MIC ^{kan} = 2,0 µg/ml (dvs sensitiv). Donor tilhører samme klon som nr 18.
32	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor, gen, kan	200 kb, 120 kb, 80 kb, 50 kb	Kanamycin	Cip, kan	80 kb	Donor er positiv for AAC(6')-Ib-cr og har ESBL.
36	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor, kan	185 kb, 100 kb, 80 kb + 11 stk fra 4,7 kb til 2,1 kb.	Kloramfenikol	Amp, trim, sul, cip, tet, klor	175 kb	-
39	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor	100 kb, 90 kb, 70 kb, 10 kb, 2,9 kb	Sulfonamid	Amp, sul	100 kb, 70 kb	-

* = Ved direkte seleksjon.

Tabell 18 c: Oppsummering av resultater fra konjugasjonsforsøk, resistensanalyser og plasmidundersøkelser.

Donor	Donor: Resistens	Donor: Plasmider	Overfører*	Transipient: Resistens	Transipient: Plasmider	Kommentar
47	Amp, sul, cip, nal, tet, gen, kan	117 kb	Ampicillin	Amp	117 kb	-
			Kanamycin	Kan	Ingen	Klar transipient. Mulig tap av plasmid.
51	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, klor, kan	145 kb, 117 kb	Sulfonamid	Amp, sul, klor	117 kb	-
56	Amp, trim, sul, cip, nal, tet, kan	145 kb	Trimetoprim	Amp, trim, sul, tet	145 kb	Donor tilhører samme klon som nr 5.

* = Ved direkte seleksjon

5. Diskusjon og konklusjon

5.1 Metodediskusjon

5.1.1 Konjugasjonsforsøk

Konjugasjonsmetoden ”kolonikryssning” er enkel å utføre og resultatet raskt å lese av som vekst av transipienter eller ei, med unntak av de tilfeller der enten donor eller mottakerstamme vokser på de konsentrasjoner av seleksjonsmiddel som blir benyttet for å kun gi vekst av transipienter. Metoden har flere fordeler: En av dem er at man har en samtidig kontroll på om donor og mottaker vokser på konjugasjonsskålen så man kan vurdere om transipientene kan være mutert donor eller mottaker. En annen er at konjugasjon på skåler antas å gi et høyere antall muligheter for dannelsen av konjugasjonspar siden alle typer pili er mer stabile på agar, i forhold til i buljong (Bradley, Taylor et al. 1980). Bruken av direkte kryssning med bakteriekolonier øker også sannsynligheten for at en donorcelle og en mottakercelle skal kunne treffe på hverandre, i motsetning til blanding av to buljongkulturer (Netherwood, Bowden et al. 1999). Man vil også anta at kontakttiden er stor med koloni-kryssningsmetoden da cellene kommer i kontakt med hverandre på et fast medium. Av ulemper med metoden kan det nevnes at man ikke har mulighet for å bestemme overføringsfrekvensen. Siden koloniene ofte vokser tett kan man også måtte bruke ekstra tid på å rendyrke koloniene, og hvert utsæd øker sannsynligheten for at mutasjoner skal finne sted. Metoden må også anses å være en screeningmetode.

For konjugasjonsforsøk generelt sett er det største problemet å finne seleksjon- og kontraseleksjonsmidler som kun tillater vekst av transipienter og som heller ikke hemmer overføringen. Både ved konjugasjonsforsøk med det fekale normalmaterialet og det ciprofloxacinresistente UVI-materialet som donorer var det flere isolater som ikke kunne benyttes. Dette fordi de ikke lot seg dyrke på de benyttede konsentrasjoner av seleksjonsmidler som var nødvendig for å hindre vekst av mottakerstamme. Andelen av overførbar resistens i materialene kan derfor være feilestimert da ikke alle isolatene er undersøkt. I enkelte tilfeller måtte man også benytte seg av høye konsentrasjoner av seleksjonsmiddel og dette kan ha hindret vekst av transipienter med lavgradig resistens.

5.1.2 Kutting med S1-nuklease

Ved bruk av konvensjonell agarose-gelelektroforese til å separere produktene etter kutting med S1-nuklease trengs det nøye vurdering av gelbildet. Dette fordi enzymet både kan konvertere supertvunnet plasmid til åpent, sirkulært og åpent, sirkulært til linealisert. Ved bruk av PFGE til separering av produktene er resultatet lettere å tolke når man har et pulsfeltprogram som sørger for at åpne, sirkulære plasmider og supertvunne plasmider ikke forstyrrer i området der de lineære plasmidene befinner seg. For at resultatene skal bli enklere å tolke ved bruk av konvensjonell gelelektroforese bør det brukes mer tid på å finne den optimale konsentrasjonen av S1-nuklease i forhold til mengde DNA, samt optimale inkuberingsforhold for å få alt plasmid konvertert til lineær form. Ved S1-PFGE er svake bånd det største problemet, og mengden bakterier i agarosepluggen bør vurderes økt i forhold til vanlig PFGE.

5.2 Fekalt normalmateriale

I det fekale normalmaterialet overførte 1 av 20 kloner resistens og det ser ut til at isolatene i klonen kan overføre sin resistens like lett til *E. coli* DH5 α som til *E. coli* J53. Ved sekundære konjugasjonsforsøk med *E. coli* HB101 som mottaker ser man derimot en forskjell da man lettere fikk overført resistens til *E. coli* HB101 fra J53-transipientene enn fra DH5 α -transipientene. Dette kan skyldes tilfeldigheter, men kan for eksempel også skyldes at innholdet av pUC19 i *E. coli* DH5 α har forstyrret konjugasjonsprosessen eller at de to primære konjugasjonsmottakerne er ulike i sitt plasmidreguleringsapparat.

Ett av isolatene som overførte resistens ved direkte seleksjon med sulfonamid gjorde det ikke ved bruk av trimetoprim (= nr 1.2.3). Dette ble kontrollert ved nye konjugasjonsforsøk, og resultatet ble det samme. Ved bruk av trimetoprim til seleksjon fikk man heller ikke overført resistens videre fra den primære transipienten til *E. coli* HB101. Det kan derfor se ut som om det er en sammenheng mellom seleksjonsmiddelet og konjugasjonsevnen i dette materialet. Resultatet kan ikke skyldes færre antall plasmider da nr 1.2.3 inneholder de samme plasmidene som flere av donorisolatene som overførte trimetoprimresistens ved direkte seleksjon. Uavhengig av hvilket av disse midlene som ble benyttet til seleksjon er både de primære og de sekundære transipientene resistente mot begge to antibiotika

Ettersom en måtte bruke høy konsentrasjon av sulfonamid til seleksjon av transipientene ved bruk av *E. coli* J53 som mottaker var det enkelte Sulf^R-stammer som en ikke fikk undersøkt for overførbar resistens da de ikke vokste opp på ISA med 500 µg/ml sulfonamid. Det kan derfor være mulig at antallet stammer som bærer overførbar resistens i det fekale normalmaterialet var høyere enn antatt i denne oppgaven og som ville blitt oppdaget ved bruk av andre konjugasjonsmetoder eller en mottakerbakterie som ikke hadde overlevd på like høye konsentrasjoner av sulfonamid.

I de tilfellene en har hatt både små, middels og store kolonier er det kun de små eller middels koloniene som har gitt vekst av transipienter. Innhold av R-plasmider er kjent for å være en byrde for bakteriecellen (Zünd og Lebek 1980) og kan muligens være årsaken til at noen bakterier vokser saktere enn andre og gir mindre kolonier.

På to måter skilte de primære sulfonamid-transipientene seg ut i forhold til de primære trimetoprim-transipientene:

- 1) Ingen av trimetoprim-transipientene overførte resistens videre til *E. coli* HB101 i det sekundære konjugasjonsforsøket:
- 2) Trimetoprim-transipientene inneholdt færre plasmider enn sulfonamidtransipientene.

Ved kutting med S1-nuklease fant man at alle de primære DH5α-transipientene fikk overført pCTL5 på ca 7,8 kb, mens DH5α-c1.2.11^{Sulf} i tillegg inneholder pCTL7 og DH5α-c1.2.10^{Sulf} samt DH5α-c1.2.12^{Sulf} inneholder både pCTL5, pCTL6 og pCTL7. Resultatene bekreftes av kutting med RsaI (resultater ikke lagt ved) eller HindIII, der disse tre transipientene skiller seg fra de øvrige i restriksjonsmønster. I det sekundære konjugasjonsforsøket med *E. coli* HB101 som mottaker var det kun DH5α-c1.2.10^{Sulf} og DH5α-c1.2. som ga vekst av sekundære transipienter. Fra dette kunne man anta at pCTL7 var det konjugerbare plasmidet, men dette avvises av resultatene fra J53-transipientene. Plasmid CTL6 kan heller ikke være det konjugerbare plasmidet, da man finner det samme plasmidet i flere primære J53-transipienter uten at disse gir vekst av sekundære transipienter. Teoretisk sett er det dessuten mer sannsynlig at det konjugative plasmidet er stort (Clowes 1972). Til slutt står en igjen med pCTL1 og pCTL3. Plasmid CTL1 som finnes i 11 av 11 J53-transipienter selektert med sulfonamid og i seks av åtte J53-transipienter selektert med trimetoprim. Dersom pCTL1 er konjugerbart ville man også ha forventet vekst av transipienter ved bruk av trimetoprim som seleksjonsmiddel, hvilket en ikke så. Plasmidet finnes heller ikke i noen av de sekundære

transipientene, så hvis plasmidet er konjugativt blir det ikke selv overført i det sekundære konjugasjonsforsøket. Det siste alternativet, pCTL3, er til stede i alle donorer, i 10 av 11 J53-transipienter selektert med sulfonamid og i kun to av åtte J53-transipienter selektert med trimetoprim. Det er også til stede i alle sekundære transipienter. Dette er derfor den sterkeste kandidaten til å være det konjugative plasmidet.

Blant J53-coliclon^{Trim} så man at J53-c1.2.8liten^{Trim} skilte seg ut da den ved S1-kutting og S1-PFGE inneholdt flere plasmider enn de andre trimetoprim-transipientene. Dette så man også på restriksjonsmønsteret, der stammen hadde langt flere bånd enn de andre.

Fra kutting av J53-transipientene med HindIII fikk man en helt annen restriksjonsprofil enn der *E. coli* DH5 α var benyttet som mottaker (se figur 7). Som en ser fra størrelsesundersøkelsene av plasmidene (tabell 13) inneholder J53-transipientene generelt sett flere plasmider enn DH5 α -transipientene, og restriksjonsmønsteret er av den grunn naturlig nok mer komplisert med flere plasmider til stede. Dersom man hadde hatt data på eventuelle store plasmider i DH5 α -transipientene kunne man sett på likheter og ulikheter i restriksjonsmønster mellom isolater som inneholdt samme plasmidstørrelse for å se om det var de samme plasmidene som ble overført ved bruk av de ulike mottakerbakteriene. Dette hadde man dog ikke.

Tolkning av plasmidanalysene kan tyde på at det er pCLT5 som bærer genet/genene som koder for sulfonamid- og trimetoprimresistens, da dette er det eneste plasmidet som lot seg overføre først fra donor til *E. coli* DH5 α /*E. coli* J53 og deretter videre til *E. coli* HB101. Dersom plasmidet er konjugerbart og bærer enten Sul^R eller Trim^R ville man forventet at alle de primære transipientene overførte resistensen videre til *E. coli* HB101. Dette var derimot ikke tilfellet og en kunne derfor si at pCTL5 mest sannsynlig ikke var konjugerbart.

S1-PFGE som ble utført på donorene ga vanskelig tolkbare resultater pga svake bånd. Dette kunne muligens være fordi pluggene av donorene som ble brukt var noen år gamle, i forhold til de nylagde pluggene av transipienter som ga klarere resultater. Det burde blitt laget nye pluggen og analysen utført på nytt. S1-PFGE var også vanskelig å tyde da så godt som alle plasmidene lå i nedre del av gelen (< 30 kbp) hvor båndene lett blir diffuse.

Det kan stilles spørsmål om hvorfor alle J53-coliclon inneholdt pCTL1 når man kun fant det i to av donorene. Mottakeren *E. coli* J53 ble undersøkt med S1-PFGE og inneholdt ingen plasmider, så plasmidet måtte komme fra donoren. Årsakene til at en ikke fant det igjen hos alle donorene kan for eksempel være at de er blitt ødelagt under oppbevaring.

Alle isolatene i det fekale normalmaterialet som overførte resistens tilhørte samme klon, med likt resistensmønster og var isolert fra en og samme pasient. En del av oppgaven gikk ut på å se om ulikt resistensmønster innad i en klon i det fekale normalmaterialet kunne forårsakes av overførbare plasmider, og resultatene fra konjugasjonsforsøkene tyder på at dette ikke er tilfellet blant de klonene som finnes i dette materialet. Likevel må resultatet ses på i lys av at det kun var en av 20 kloner som i det hele tatt hadde overførbar resistens, og at det også kan finnes overførbar resistens som det ikke har vært mulig å selektere for grunnet lav MIC.

Det ville også vært fordelaktig å undersøke flere kolonier av hver transipient enn hva som er gjort, da de forskjellige plasmidene hos donorcellen kan overføres ulikt til mottakercellene. Det hjelper dog at man har benyttet både *E. coli* DH5 α og *E. coli* J53 som mottakere i konjugasjonsforsøk, og fra plasmidanalysene som er gjort på transipientene fra begge forsøkene får man et visst inntrykk av hvordan plasmidinnholdet kan variere i transipientene selv om donoren er den samme. Da ingen av plasmidene med størrelse under 11 kb skiller seg ut ved å ikke være til stede i DH5 α -transipienter, men til stede i J53-transipienter kan man også si at det er sannsynlig at ingen av disse tilhører samme inkompatibilitetsgruppe som pUC19.

Det er samlet inn ulikt antall isolater fra kvinnene i undersøkelsen, og total prosentvis overførbar resistens i materialet blir derfor ikke mulig å regne ut ettersom det finnes ulikt antall isolater i hver klon og ulikt antall kloner fra hver kvinne. Sammenliknet med andre undersøkelser av overførbar antibiotikaresistens blant fekal *E. coli* hos friske personer utenfor sykehus eller ved innleggelse er andelen overførbar resistens (1 av 20 kloner) i denne undersøkelsen liten (Datta 1969; Linton, Lee et al. 1972; Søgaard 1975; Widh og Sköld 1977), selv om det må tas hensyn til ulikheter i valg av isolater til donorer, bruken av ulike konjugasjonsmetoder, at det er flere år mellom undersøkelsene og at de er utført i ulike deler av verden.

5.3 Ciprofloxacinresistent materiale

Overførbar resistens er funnet for 37 % av isolatene i det ciprofloxacinresistente UVI-materialet og denne er knyttet til middels store til store plasmider. Noen har kun fått overført resistens mot et av de antibiotika som er undersøkt, andre har fått overført resistens mot ni antibiotika, mens hovedtyngden ligger på mellom 4 og 6 resistensdeterminanter.

For noen av transipientene har man hatt en temmelig klar vekst av transipient på konjugasjonsskålen, men ved resistens- og plasmidundersøkelse finner man ingen plasmider i transipient samt at resistensmønsteret er svært likt resistensmønsteret til donoren. Stammer man fortsatt er usikker på om er transipienter innbefatter J53-FQ27^{Kan}, 53-FQ50^{Kan} og J53-FQ53^{Kan}. En mulighet å kontrollere dette på ved en senere anledning er å bruke PFGE og kutte med for eksempel XbaI for så å sammenlikne båndmønsteret på donor og transipient.

En fikk vekst av transipienter ved seleksjon med alle de antibiotika en hadde valgt å bruke til seleksjon, med unntak av ciprofloxacin og nalidixinsyre. Tidligere studier har vist at både nalidixinsyre og ciprofloxacin kan hemme konjugasjonsprosessen (Burman 1977; Scazzocchio, Selan et al. 1988) og dette kan være årsaken til at en ikke fikk til direkte seleksjon av transipienter ved bruk av kinoloner som seleksjonsmiddel. Kanamycin var seleksjonsmiddelet som ga størst prosentvis vekst av transipienter i forhold til antall utførte forsøk, etterfulgt av trimetoprim og kloramfenikol. Tetracyclin lå i andre enden av skalaen med vekst av transipienter for kun en donor. Ved bruk av seleksjon med tetracyclin ble det også observert at det var nødvendig med to dagers dyrkning, før en så vekst av transipienter. For de andre seleksjonsmidlene holdt det med en dag.

Resistensundersøkelsene viste at transipientene både kunne ha høyere, lavere og samme MIC-verdier som donoren. Særlig var dette tydelig for kloramfenikol. Det ble også funnet at transipienten J53-FQ30^{Kan} hadde en MIC-verdi mot kanamycin som skulle tilsa at den var sensitiv selv om isolatet tidligere hadde klart å overleve på kanamycinkonsentrasjoner på 5-10 ganger sin MIC-verdi.

Av donorisolatene som var PCR-positive for aminoglykosidasen aac(6')-Ib (nr 11, 27 og 50) ga nummer 11 ingen vekst av transipienter i det hele tatt, mens nummer 27 og 50 ga vekst av mulige transipienter. Videre undersøkelser viste at en sannsynligvis hadde fått vekst av

henholdsvis donor og mottaker. Av donorisolatene som var PCR-positive for den muterte varianten av aminoglykosidasen (nr 19, 32 og 53) ga nr 19 og 32 vekst av transipienter som kan ha fått overført resistensdeterminanten. Donor nr 53 derimot klarte å overleve på konjugasjonsskålen og man fikk ikke selektert frem eventuelle transipienter.

Donorer med overførbar kinolonresistens

FQ 5

Donoren overførte resistens mot både ampicillin, sulfonamid, trimetoprim, tetracyclin og kloramfenikol ved direkte seleksjon. Ved indirekte seleksjon overførte den også resistens mot gentamicin i ett av fem tilfeller, kanamycin i to av fem tilfeller og kinoloner i fire av fem tilfeller. Plasmidanalysene viser at donoren inneholder to plasmider på ca 100 kb og ca 85 kb. Transipientene J53-FQ5^{Sul}, J53-FQ5^{Tet} og J53-FQ5^{Amp}, som har likt resistensmønster (amp, sul, cip, nal, tet, klor), har alle fått overført det samme plasmidet på 85 kb fra donoren. Transipienten J53-FQ5^{Trim} har fått overført det andre plasmidet (ca 100 kbp) og har et annet resistensmønster (amp, trim, sul, tet, kan) enn de tre forannevnte. Den siste transipienten, J53-FQ5^{Klor} skiller seg ut fra de forannevnte ved at den ikke inneholder noen plasmider av samme størrelse som i donoren. Det antas derfor at plasmidene som finnes i denne transipienten er kointegrater av de to plasmidene på ca 85 kbp og ca 100 kbp. Denne teorien støttes også av at J53-FQ5^{Klor} er resistent mot alle antibiotika som de andre transipientene i sum er resistente mot. Mulig resistensmekanisme for kinolonresistens kan være efflux, da donoren verken er qnr-positiv eller aac-Ib-cr positiv (upublisert, as Telelab). Dette vil da også forklare den store graden av multiresistens. Donoren er klonalt lik nr 56, men denne viste kun overførbar resistens mot trimetoprim ved direkte seleksjon. Plasmidinnholdet og transipientens resistensmønster er også ulikt fra J53-FQ5^{Trim}.

FQ 19

Donoren FQ 19 overførte resistens mot ampicillin, kanamycin og sulfonamid ved direkte seleksjon. Transipientene J53-FQ19^{Amp} og J53-FQ19^{Sul} har likt resistensmønster og er resistente mot kinoloner og kanamycin i tillegg til ampicillin og sulfonamid. Ved seleksjon med kanamycin er transipienten (J53-FQ19^{Kan}) kun resistent mot kinoloner og kanamycin, der MIC mot kanamycin er høyere enn hos de to andre transipientene. At transipientene er resistente mot ciprofloxacin og kanamycin stemmer med at FQ19 er funnet å være PCR-positiv for mutert aminoglykosidase, aac(6['])-Ib-cr (upublisert, as Telelab). I teorien bør det

finnes minst to plasmider i FQ19, der det ene er overført til transipientene selektert med sulfonamid eller ampicillin og det andre er overført til kanamycin-transipienten. Plasmidanalysene viser kun ett plasmid på ca 85 kb både i donoren og i alle transipientene. Dersom det kun er en type plasmid av denne størrelsen til stede i donoren skulle alle transipientene teoretisk sett hatt samme resistensmønster, hvilket ikke er tilfelle. Det antas derfor at donor bærer til plasmider av ca samme størrelse, men det trengs videre undersøkelser med restriksjonsanalyser eller nye konjugasjonsforsøk for å skille plasmidene.

FQ 28

Donoren FQ 28 overførte både resistens mot kloramfenikol og trimetoprim ved direkte seleksjon. Begge transipientene har likt resistensmønster med unntak av at J53-FQ28^{Trim} er resistent mot nalidixinsyre mens J53-FQ28^{Klor} ikke er det. Donoren inneholder to plasmider, der det største på ca 170 kb kan finnes igjen i begge transipientene. Om det er to plasmider av lik størrelse, der den ene gir resistens mot nalidixinsyre og den andre ikke, eller om det er samme plasmid og ulikheten i nalidixinsyres resistens kun skyldes tilfeldigheter vites ikke. Videre undersøkelser, for eksempel med restriksjonskutting, trengs for å avgjøre dette. Donoren er ikke vist å være positiv for qnr-gener eller aac(6')-Ib-cr og det antas derfor at årsaken til resistens skyldes effluks, som også vil kunne forklare at transipienten er multiresistent.

FQ 32

Donoren FQ 32 ga vekst av transipienter ved direkte seleksjon med kanamycin. Transipientene er også resistente mot ciprofloxacin, og dette stemmer med at donoren er funnet positiv for aac(6')-Ib-cr. Plasmidundersøkelsene viser fire plasmider i donoren, der kun et av dem på ca 80 kb også er funnet igjen i transipienten. Dette må derfor være plasmidet som bærer aac(6')-Ib-cr. Donoren har også ESBL, men siden overføring av ampicillinresistens ikke ble observert antas det at plasmidet som bærer resistensdeterminanten for ESBL ikke er overførbar i dette tilfellet.

FQ 36

Donoren FQ 36 overførte resistens mot kloramfenikol ved direkte seleksjon, men transipienten var også resistent mot ampicillin, trimetoprim, sulfonamid, ciprofloxacin og tetracyclin i tillegg. Ifølge plasmidundersøkelsene inneholder donoren tre store plasmider på ca 185 kb, 100 kb og 85 kb samt flere under 11 kb. Transipienten inneholder ett plasmid på ca

175 kb, og dette stemmer ikke med størrelsen på noen av plasmidene i donoren. Teorien er at plasmidet er et kointegrat av to plasmider som for eksempel det på 100 kb og det på 80 kb. Transipienten er høygradig resistent mot kloramfenikol, hvilket tyder på at resistensen forsårsakes av kloramfenikol acetyltransferase (CAT). Disse finnes ofte på store multiresistensintegroner, og dette stemmer med resistensprofilen til transipienten. En annen mulighet kan være endret permeabilitet, men da vil man forvente lavere MIC mot kloramfenikol. Dette vil derimot forklare hvorfor isolatet har overførbart resistens mot ciprofloxacin, når det verken er funnet kjente *qnr*-gener eller *aac(6')*-Ib-cr.

Donorstammer vist å være positive for aminoglykosidase (upublisert, as Telelab)

FQ 11

Donoren overførte ikke resistens.

FQ 27

Donoren FQ 27 ga vekst av mulige transipienter ved seleksjon med kanamycin, men som tidligere skrevet er det usikkert om koloniene er ekte transipienter eller om det er donor som har klart å overleve på natriumazid. Plasmidundersøkelsene viser at den mulige transipienten inneholder de samme to plasmidene som donoren, og man står derfor igjen med to muligheter: 1) Man har fått vekst av ekte transipienter som har samme resistensprofil som donoren, med unntak av å være sensitiv istedenfor resistent mot sulfonamid og intermediær istedenfor resistent mot gentamicin. E-test for ciprofloxacin og nalidixinsyre viste høygradig resistens mot begge kinoloner. Om dette er korrekt er isolatet veldig interessant da det ikke er funnet å være positivt for *qnr*-gener eller *aac(6')*-Ib-cr. Det var vanskelig å dyrke opp transipientene på selektivt medium etter nedfrysning. Det burde vært utført ny resistensundersøkelse mot alle antibiotika ved agardiffusjon også etter nedfrysning.

2) Man har fått vekst av donor, som av ukjent grunn er gått fra å være sulf^R til å være sulf^S og fra genta^R til genta^I. Hvis dette er tilfelle ville man forventet tap av plasmid.

FQ 50

Donoren FQ 50 overførte resistens mot kanamycin ved direkte seleksjon. Man forventet overføring av kanamycinresistens da donoren var vist å være positiv for aminoglykosidase, men resistensanalysene viste kun en MIC-verdi mot kanamycin som så vidt var over grensen for å bli definert som resistent. Videre plasmidanalyser ga ingen tydeligere svar, da donoren

var degradert i S1-PFGE og ingen plasmider ble funnet i transipient. Man kan ha vekst av *E. coli* J53 som har mutert, eller det kan være at plasmidet er gått inn på kromosomet. Videre undersøkelser som for eksempel PFGE med kutting av kromosomalt DNA med XbaI kan brukes for å få visshet i dette.

Øvrige donorisolater med overførbar resistens

FQ 8

Donoren FQ 8 overførte resistens mot trimetoprim ved direkte seleksjon. Indirekte er det også overført resistens mot ampicillin, sulfonamid og tetracyclin. Donoren inneholder tre plasmider, der to av dem er overført til transipienten. En teori er derfor at det ene plasmidet bærer resistens mot trimetoprim og er konjugativt. Resistens mot trimetoprim er ofte assosiert med tilstedeværelsen av integroner, og hvis alle resistensdeterminantene sitter på samme plasmid er det naturlig å anta at plasmidet bærer klasse 1 integron med *sulI*. I så tilfelle ville det vært naturlig å forvente overføring av sulfonamidresistens ved direkte seleksjon, hvilket ikke har skjedd. Hvilket plasmid de øvrige resistensdeterminantene sitter på trengs det videre undersøkelser til for å bestemme. For eksempel kan det utføres sekundære konjugasjonsforsøk eller Southern Blot med prober mot kjente resistensgener. Hva som er årsaken til at det tredje plasmidet ikke lar seg overføre vites ikke, og en måtte undersøkt flere transipient-kolonier for å være sikker på om dette er tilfellet eller ei.

FQ 18

Donoren FQ 18 ga mulig vekst av transipienter ved seleksjon med kanamycin. Disse er kun resistente mot kanamycin, og MIC-verdien gjør at man er usikker på om det er en ekte transipient eller om det er *E. coli* J53 som har klart å vokse på selektiv skål. Plasmidanalysene viser at donoren inneholder 3 plasmider, der ett på ca 40 kb kan finnes igjen i transipienten. Det antas derfor at man har med en ekte transipient å gjøre, da *E. coli* J53 er plasmidløs. Donoren er ikke vist å være positiv for AAC(6³)-Ib, men det utelukker ikke at den kan være positiv for andre acetyltransferaser. Donoren tilhører samme klon som nr 32, men en fant ingen likheter mellom de respektive transipientene.

FQ25

Donoren FQ 25 overførte resistens mot trimetoprim ved direkte seleksjon, mens resistens mot ampicillin, sulfonamid og tetracyclin ble overført indirekte. Man fikk også vekst av mulig

transipient ved seleksjon med ampicillin, men dette viste seg ved resistensanalyser å antakeligvis være donoren som hadde overlevd på selektiv skål. Plasmidanalysene viser at donoren inneholder et stort plasmid på ca 170 kb, og at dette er overført til transipienten (FQ25^{Trim}). Plasmidet må da bære alle resistensdeterminantene og siden transipienten er resistent både mot trimetoprim og sulfonamid antas resistensdeterminantene å sitte på et integron.

FQ 30

Donoren FQ 30 ga vekst av transipienter ved seleksjon med kanamycin. Transipienten er resistent mot flere antibiotika enn bare kanamycin, men transipientens MIC-verdi for kanamycin er så lav at den defineres som sensitiv. Donoren inneholder to plasmider, et på ca 165 kb og et mindre som er for lite til å synes med S1-PFGE, men for stort til å kunne vandre i 0,7 % konvensjonell agarosegel. Av disse plasmidene finner man det minste igjen i transipienten, men det er ikke mulig å størrelsesbestemme det nærmere enn til å være > 11 kb og < 20 kb. Ettersom koloniene inneholder et plasmid kan det ikke være *E. coli* J53 som har vokst. Det finnes derfor to mulige forklaringer: 1) Donor har overlevd på natriumazid, har tapt plasmidet på 165 kb og med det også mistet resistensdeterminantene for ciprofloxacin, nalidixinsyre og kanamycin. 2) Vekst av transipient som har fått overført det minste plasmidet. For begge alternativene er det uklart hva som er årsaken til at bakteriecellene har klart å overleve på en kanamycin-konsentrasjon som er minst fem ganger så høy som MIC-verdien. Videre undersøkelser som f.eks vanlig PFGE er nødvendig for å bestemme hvilket alternativ som er riktig.

FQ 39

Donoren FQ 39 overførte sulfonamidresistens ved direkte seleksjon og transipienten var også resistent mot ampicillin. Donoren inneholder fem plasmider, der tre (ca 100 kb, ca 70 kb og ca 10 kb) kan finnes igjen transipienten. Hvordan plasmiddeterminantene for sulfonamid og ampicillin er fordelt på plasmidene trengs det ytterligere undersøkelser som f.eks Southern blot for å si noe om.

FQ 47

Donoren FQ 47 overførte resistens både mot ampicillin og kanamycin ved direkte seleksjon. Transipientene, J53-FQ47^{Amp} og J53-FQ47^{Kan}, er ikke resistente mot andre antibiotika enn de som ble benyttet til seleksjon. Plasmidanalysene viste at donoren inneholder et plasmid på ca

117 kb, og at dette er overført til ampicillin-transipienten. Selv om kanamycin-transipienten ble vurdert som ekte både fra vurdering av morfologi og resistensanalyser finner man ingen plasmider i denne. Den kan ikke være *E. coli* J53 da MIC mot kanamycin er høyere enn hos donor. Hva som er årsaken til at man ikke finner plasmider i transipienten vites ikke, men det er tidligere funnet at transipienter i enkelte tilfeller kan være plasmidfrie (Howe 1984). En annen mulighet kan være at resistensdeterminanten er blitt integrert på kromosomet. Av resistensmekanismer antas det at resistensen mot ampicillin skyldes plasmidmediert beta-laktamase og resistensen mot kanamycin skyldes en aminoglykosidase. Muligheten er også til stede for tilstedeværelse av ampC hos J53-FQ47^{Amp}, men det trengs videre resistensanalyser mot cefalosporiner for å bestemme dette.

FQ 51

Donoren FQ 51 overførte resistens mot sulfonamid ved direkte seleksjon. Transipientene er også resistente mot ampicillin og kloramfenikol. Plasmidundersøkelser viser at donor inneholder to plasmider, der det minste på ca 117 kb kan finnes igjen i transipienten. Dette plasmidet må derfor bære alle resistensdeterminantene som er overført. Etersom transipienten er høygradig resistent mot kloramfenikol er teorien at plasmidet bærer et integron der resistensdeterminantene for både sulfonamid, ampicillin og kloramfenikol sitter.

FQ 53

Donoren FQ 53 ga vekst av mulige transipienter ved bruk av kanamycin til seleksjon. Etersom donoren er positiv for aac(6')-Ib-cr og ESBL er muligheten til stede for både overføring av ESBL og resistens mot ciprofloxacin og kanamycin. Resistensanalysene viste at man kunne ha vekst av donor som overlevde på natriumazid. Transipienten er resistent mot alle antibiotika som donoren er resistent mot, der den eneste forskjellen er en nedgang i MIC for kanamycin fra > 256 µg/ml til 6,0 µg/ml ved første gangs analysering. Dette blir kontrollert og ved ny utførelse av E-testen er MIC for kanamycin hos transipient > 256 µg/ml. I mellomtiden ble transipientene fryst ned og dyrket opp igjen. Det var da problemer med å få dem til å vokse på selektiv skål. Om man har fått overført resistensdeterminanten for aac(6')-Ib-cr vet man derfor ikke. Plasmidanalyser viser ingen plasmider ved S1-PFGE, og ved S1-kutting av plasmider isolert med miniprep fikk man resultater som ikke lot seg tolke pga degradert DNA. Donor inneholder et plasmid på ca 100 kb, og dette er ikke overført. Man kan ha en ekte transipient, der plasmidet av ukjent årsak ikke er til stede. Det kan også være vekst av donor, men da ville man også forventet å finne et plasmid. Videre undersøkelser med

vanlig PFGE vil kunne hjelpe. På de nedfrosne transipientene bør det også utføres nye resistensundersøkelser mot samtlige antibiotika brukt i oppgaven.

FQ 56

Donoren FQ 56 overførte trimetoprimresistens ved direkte seleksjon. Transipientene er også resistente mot ampicillin, sulfonamid og tetracyclin. Plasmidanalyser viser at donoren inneholder et plasmid på ca 145 kb, og dette kan man finne igjen i transipienten. Plasmidet antas derfor å bære resistensgener mot alle de antibiotika som transipienten er resistent mot. Donoren tilhører samme klon som nr 5, men plasmidinnholdet er ulikt. Av resistensmekanismer antas det at plasmidet bærer et integron som inneholder gen for beta-laktamase, samt *sul* (resistens mot sulfonamid), *dfr* (resistens mot trimetoprim) og en *tet* (resistens mot tetracyclin) som koder for effluks. Dette fordi det antas at effluks er en uaktuell resistensmekanisme siden man verken har fått overført resistens mot kinoloner eller aminoglykosider.

Som beskrevet ovenfor og sammenfattet i tabell 18 a-c lar noen av resultatene seg ikke forklare med enkel plasmidoverføring. For eksempel ble det i transipientene J53-FQ5^{Klor} og J53-FQ36^{Klor} funnet plasmider av en størrelse som en ikke fant i donoren. En forklaring på dette kan være at to eller flere plasmider har dannet et kointegrat. En annen observasjon var overføring av resistens uten funn av plasmider i transipienten. Mulige forklaringer på dette kan være at plasmidet er blitt integrert i kromosomet, at plasmidet har vært ustabil og gått tapt eller at resistensdeterminanten er overført via andre mekanismer som ikke involverer et plasmid.

5.4 Konklusjon

Det fekale normalmaterialer er undersøkt for overførbar resistens mot sulfonamid, tetracyclin og trimetoprim. Av totalt 20 kloner har én klon overførbar resistens mot sulfonamid og trimetoprim. Alle isolatene i klonen med overførbar resistens inneholder de samme plasmidene. Disse varierer i størrelse fra ca 90 kb (gitt navnet pCTL1) til ca 3,4 kb (gitt navnet pCTL7). Plasmidet som antas å bære resistensdeterminantene er et ikke-konjugativt plasmid på ca 7,8 kb (gitt navnet pCTL5). Overføringsevnen til plasmidet kan være påvirket av om det er brukt trimetoprim eller sulfonamid til seleksjon under konjugasjonsforsøket.

Det ciprofloxacinresistente UVI-materialet er undersøkt for overførbar resistens mot ampicillin, sulfonamid, trimetoprim, tetracyclin, nalidixinsyre, ciprofloxacin, kloramfenikol og kanamycin. Blant 35 isolater tilhørende 25 kloner har man overførbar resistens hos 13 isolater tilhørende 11 kloner, i tillegg til tre isolater der det trengs videre undersøkelser for å fastslå om resistensoverføring har forekommet eller ei. For samtlige antibakterielle midler man har benyttet som seleksjonsmidler finner man overførbar resistens. Resistens mot ampicillin og/eller sulfonamid overføres hyppigst, mens bruk av kanamycin som seleksjonsmiddel gir størst prosentvis vellykket vekst av transipienter – etterfulgt av kloramfenikol og trimetoprim. Ciprofloxacin og nalidixinsyre er de eneste midlene der resistens ikke er overført ved direkte seleksjon. Plasmidene som overføres fra det ciprofloxacinresistente UVI-materialet til *E. coli* J53 varierer i størrelse fra ca 40 kb til ca 180 kb.

For det fekale normalmaterialet vil videre undersøkelser inkludere S1-PFGE på DH5 α -transipientene, samt undersøkelse av hvilket plasmid som bærer hvilke(t) resistensgen ved bruk av metoder som for eksempel Southern Blot eller ”plasmid curing”. Det bør også lages nye plugger av donorstammene og utføre S1-PFGE på disse.

For det ciprofloxacinresistente UVI-materialet vil videre undersøkelser kunne inkludere PCR for å finne kjente resistensgener, kanskje særlig med tanke på effluxgener hos transipientene som har fått overført kinolonresistens uten at donor er positiv for *qnr* eller mutert aminoglykosidase (AAC[6 \prime]-Ib-cr). Det kan også være interessant med bruk av PCR og sekvensering for å se på tilstedeværelsen av integroner og hvilke genkassetter disse inneholder. Det samme gjelder bruk av Southern Blot for å finne hvilke plasmider som bærer hvilke kjente resistensgener. Sekundære konjugasjonsforsøk kan mest sannsynlig ikke utføres, da det vil være en utfordring å finne en passende mottaker grunnet donorenes multiresistensprofil.

Litteratur

Abraham, E. P. og E. Chain (1940). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin." Nature **146**: 837.

Alekshun, M. N. og S. B. Levy (2007). "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." Cell **128**(6): 1037-50.

Amyes, S. G. og J. T. Smith (1974). "R-factor trimethoprim resistance mechanism: an insusceptible target site." Biochem Biophys Res Commun **58**(2): 412-8.

Anderson, E. S. (1968). "The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria." Annual review of microbiology **22**: 131-180.

Ando, T. (1966). "A nuclease specific for heat-denatured DNA in isolated from a product of *Aspergillus oryzae*." Biochimica et biophysica acta **114**(1): 158-68.

Antunes, P., J. Machado, et al. (2007). "Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(4): 1545-8.

AFA: Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmåls brytningspunkter for bakteriers antibiotikafølsomhet – versjon 1.9 (2006). ISBN 82-92345-02-07

Aschbacher, R., M. Doumith, et al. (2008). "Linkage of acquired quinolone resistance (*qnrS1*) and metallo- β -lactamase (*blaVIM-1*) genes in multiple species of Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy." Journal of antimicrobial chemotherapy **In Press**.

Avery, O. T., C. M. MacLeod, et al. (1995). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944." Molecular medicine (Cambridge, Mass.) **1**(4): 344-65.

- Bai, Y. L., Z. L. Yang, et al. (2003). "The action of S1 nuclease and a cloning strategy for microcircular DNAs." Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology **19**(2): 240-3.
- Barton, B. M., G. P. Harding, et al. (1995). "A general method for detecting and sizing large plasmids." Analytical biochemistry **226**: 235-240.
- Bauernfeind, A., Y. Chong, et al. (1998). "Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery?" Yonsei medical journal **39**(6): 520-5.
- Baugman, G. A. og S. R. Fahnstock (1979). "Chloramphenicol Resistance Mutation in *Escherichia coli* Which Maps in the Major Ribosomal Protein Gene Cluster." Journal of bacteriology **137**(3): 1315-1323.
- Bennett, P. M. (2004). "Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement." Methods Mol Biol. **266**: 71-113.
- Birnboim, H. C. og J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic acids research **7**(6): 1513-23.
- Blahna, M. T., C. A. Zalewski, et al. (2006). "The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada." Journal of antimicrobial chemotherapy **57**: 666-672.
- Blik, A. M. v. d., C. R. Lincke, et al. (1988). "Circular DNA of 3T6R50 double minute chromosomes." Nucleic acids research **16**(11): 4841-51.
- Bradford, P. A. (2001). "Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat." Clinical microbiology reviews **14**(4): 933-951.
- Bradley, D. E. (1967). "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins." Bacteriological reviews **31**(4): 230-314.

- Bradley, D. E. (1980). "Morphological and serological relationships of conjugative pili." Plasmid **4**(2): 155-69.
- Bradley, D. E., D. E. Taylor, et al. (1980). "Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12." Journal of bacteriology **143**(3): 1466-70.
- Breeze, A. S. og E. E. Obaseiki-Ebor (1983). "Transferable nitrofurantoin resistance conferred by R-plasmids in clinical isolates of *Escherichia coli*." Journal of antimicrobial chemotherapy **12**(5): 459-67.
- Bretthauer, Gondal, et al. (2002). "Design, organization and management of a controlled population screening study for detection of colorectal neoplasia." Scandinavian journal of gastroenterology **5**: 568-573.
- Brumfitt, W., M. C. Faiers, et al. (1971). "Antibiotic-resistant *Escherichia coli* causing urinary-tract infection in general practice: relation to faecal flora." Lancet **1**(7694): 315-7.
- Bujard, H. (1968). "Studies on circular DNA. II. Number of tertiary turns in papilloma DNA." Journal of molecular biology **33**(2): 503-5.
- Burman, L. G. (1977). "R-plasmid transfer and its response to nalidixic acid." Journal of bacteriology **131**(1): 76-81.
- Carattoli, A., A. Bertini, et al. (2005). "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing." J Microbiol Methods **63**(3): 219-28.
- Causey, S. C. (1978). "Transconjugant analysis: limitations on the use of sequence-specific endonucleases for plasmid identification." Journal of bacteriology **135**(3): 1070-9.
- Chain, E., H. W. Florey, et al. (1993). "Penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940." Clin. Orthop. Relat. Res. **295**: 3-7.
- Chenia, H. Y., B. Pillay, et al. (2006). "Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens." Journal of antimicrobial chemotherapy **58**(6): 1274-8.

- Chau, P. Y., W. S. Ng, et al. (1981). "Plasmid-mediated partial cross-resistance between ampicillin, mecillinam and cefamandole in *Salmonella johannesburg* and *Salmonella typhimurium*." Journal of antimicrobial chemotherapy **7**: 245-255.
- Chopra, I. og M. Roberts (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." Microbiology and molecular biology reviews **65**(2): 232-260.
- Chu, G., D. Vollrath, et al. (1986). "Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields." Science **234**(4783): 1582-1585.
- Clewell, D. B. og D. R. Helinski (1970). "Properties of a supercoiled deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event." Biochemistry **9**(22): 4428-4440.
- Clowes, R. C. (1972). "Molecular structure of bacterial plasmids." Bacteriological reviews **36**(3): 361-405.
- Cohen, S. P., H. Hächler, et al. (1993). "Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **175**(5): 1484-1492.
- Cohen, S. P., L. M. McMurry, et al. (1989). "Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction." Antimicrobial agents and chemotherapy **33**(8): 1318-1325.
- Colliss, C. M. og R. M. Hall (1995). "Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons." Antimicrobial agents and chemotherapy **39**(1): 155-62.
- Connamacher, R. H. og H. G. Mandel (1965). "Binding of tetracycline to the 30S ribosomes and to polyuridylic acid." Biochem Biophys Res Commun **20**: 98-103.

Corliss, T. L., P. S. Cohen, et al. (1981). "R-Plasmid Transfer to and from *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Fecal Samples." Applied and environmental microbiology **41**(4): 959-966.

Courvalin, P. (1990). "Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence?" Antimicrobial agents and chemotherapy **34**(5): 681-4.

Courvalin, P. (1994). "Transfer of Antibiotic Resistance Genes between Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **38**(7): 1447-51.

Couturier, M., F. Bex, et al. (1988). "Identification and classification of bacterial plasmids." Microbiological reviews **52**(3): 375-95.

Datta, N. (1962). "Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*." The Journal of Hygiene (London) **60**: 301-10.

Datta, N. (1969). "Drug resistance and R factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital." British medical journal **2**(5654): 407-11.

Datta, N. (1977). "Classification of plasmids as an aid to understanding their epidemiology and evolution." Journal of antimicrobial chemotherapy **3 (Suppl. C)**: 19-23.

Datta, N. (1984). "Bacterial resistance to antibiotics." Ciba Foundation symposium **102**: 204-218.

Datta, N. og R. W. Hedges (1971). "Compatibility groups among *fⁱ* R factors." Nature **234**: 222-223.

Datta, N. og P. Kontomichalou (1965). "Penicillin synthesis controlled by infectious R factors in enterobacteriaceae." Nature **208**(5007): 239-41.

Davies, J. og D. I. Smith (1978). "Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents " Annual review of microbiology **32**: 469-518.

Davies, B. D. (1987). "Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides."

Microbiological reviews **51**(3): 341-50.

Degré, M., B. Hovig, et al. (2000). "Medisinsk mikrobiologi." Gyldendal Norsk Forlag AS
ISBN 82-00-45056-2.

Drlica, K. og X. Zhao (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones."

Microbiology and molecular biology reviews **61**(3): 377-92.

Drygin, I. F. og V. V. Zverev (1982). "Nuclease S1 for DNA molecular weight determination in multiplasmid *Escherichia coli* strains." Mol. Biol. (Mosk.) **16**(3): 633-6.

Edberg, S. C., E. W. Rice, et al. (2000). "*Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection." Symp Ser Soc Appl Microbiol **29**: 106S-116S.

Ehrlich, J., Q. R. Bartz, et al. (1947). "Chloromycetin, a new antibiotic from a soil Actinomycete." Science **106**(2757): 417.

Enne, V. I., D. M. Livermore, et al. (2001). "Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction." Lancet **357**(9265): 1325-8.

Fiers, W. og R. L. Sinsheimer (1962). "The structure of the DNA of bacteriophage phi-X174. III. Ultracentrifugal evidence for a ring structure." Journal of molecular biology **5**: 424-434.

Finegold, S. M., V. L. Sutter, et al. (1983). "Normal indigenous intestinal flora." D. J. Hentges (ed.), Human intestinal microflora in health and disease. Acad. Press, London: 3-31.

Fleming, M. P., N. Datta, et al. (1972). "Trimethoprim resistance determined by R factors." British medical journal **1**(5802): 726-8.

Fluit, A. C. og F.-J. Schmitz (2004). "Resistance integrons and super-integrons." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **10**(4): 272-88.

- Foxman, B., R. Barlow, et al. (2000). "Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs." Annals of epidemiology **10**(8): 509-15.
- Franklin, T. J. (1967). "Resistance of *Escherichia coli* to tetracyclines. Changes in permeability to tetracyclines in *Escherichia coli* bearing transferable resistance factors." The Biochemical journal **105**(1): 371-8.
- Freifelder, D., A. Folkmanis, et al. (1971). "Studies on *Escherichia coli* sex factors: evidence that covalent circles exist within cells and the general problem of isolation of covalent circles." Journal of bacteriology **105**(3): 722-7.
- Freter, R., R. R. Freter, et al. (1983). "Experimental and mathematical models of *Escherichia coli* plasmid transfer *in vitro* and *in vivo*." Infection and immunity **39**(1): 60-84.
- Frost, L. S., K. Ippen-Ihler, et al. (1994). "Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor." Microbiological reviews **58**(2): 162-210.
- Gaffney, D. F., E. Cundliffe, et al. (1981). "Chloramphenicol resistance that does not involve chloramphenicol acetyltransferase encoded by plasmids from gram-negative bacteria." Journal of general microbiology **125**(1): 113-21.
- Gale, E. F. og J. P. Folkes (1953). "The assimilation of amino acids by bacteria. 19. The inhibition of phenylalanine incorporation in *Staphylococcus aureus* by chloramphenicol and p-chlorophenylalanine." The Biochemical Journal **55**(5): 730-5.
- Galimand, M., P. Courvalin, et al. (2003). "Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae Due to 16S rRNA Methylation." Antimicrobial agents and chemotherapy **47**(8): 2565-2571.
- Gaustad, P. (2001). "Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier." Tidsskr Nor Læreforen **121**(26): 3090-4.
- Godson, G. N. (1973). "Action of the single-stranded DNA specific nuclease S1 on double-stranded DNA." Biochimica et biophysica acta **308**(7): 59-67.

Goldman, J. D., D. G. White, et al. (1996). "Multiple antibiotic resistance (mar) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones." Antimicrobial agents and chemotherapy **40**(5): 1266-1269.

Gonzalez, L. S. og J. P. Spencer (1998). "Aminoglycosides: a practical review." American family physician **58**(8): 1811-20.

Grape, M., L. Sundström, et al. (2003). "Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources." Journal of antimicrobial chemotherapy **52**(6): 1022-4.

Grude, N., Y. Tveten, et al. (2001). "Urinary tract infections in Norway: bacterial etiology and susceptibility. A retrospective study of clinical isolates." Clin. Microbiol. Infect. **7**(10): 543-7.

Grude, N., N. I. Potaturkina-Nesterova, et al. (2007). "A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*." Clinical Microbiology and Infection **13**(2): 208-11.

Grude, N., L. Strand, et al. (2008). "Fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Norway: evidence of clonal spread." Clinical Microbiology and Infection.

Gundersen, W. B., K. Jyssum, et al. (1962). "Genetic instability with episome-mediated transfer in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **83**: 616-23.

Hall, R. M. og C. M. Collis (1995). "Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons." Drug Resist. Updat. **1**(2): 109-19.

Hata, M., M. Suzuki, et al. (2005). "Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(2): 801-3.

Hawkey, P. M. (2003). "Mechanisms of quinolone action and microbial response." Journal of antimicrobial chemotherapy **51**(Suppl S1): 29-35.

Hedges, R. W. og A. E. Jacob (1974). "Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons." Molecular & general genetics **132**(1): 31-40.

Heikkilä, E., L. Sundström, et al. (1991). "Analysis of genetic localization of the type I trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli* isolated in Finland." Antimicrobial agents and chemotherapy **35**(8): 1562-9.

Howe (1984). "Conjugally-acquired antibiotic resistance: are plasmids always present?" Journal of antimicrobial chemotherapy **14**(6): 570-573.

Hughes, V. M. og N. Datta (1983). "Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era." Nature **302**(5910): 725-6.

Huovinen, P., L. Sundström, et al. (1995). "Trimethoprim and sulfonamide resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **39**(2): 279-89.

Hurwitz, C. og C. B. Braun (1967). "Measurement of Binding of Chloramphenicol by Intact Cells." Journal of bacteriology **93**(5): 1671-6.

Izaki, K., M. Matsushashi, et al. (1968). "Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. 8. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*." Journal of biological chemistry **243**(11): 3180-92.

Jacoby, G. A. og L. Sutton (1991). "Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrobial agents and chemotherapy **35**(1): 164-9.

Jacoby, G. A. og P. Han (1996). "Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*." Journal of clinical microbiology **34**(4): 908-11.

Jacoby, G. A., K. E. Walsh, et al. (2006). "qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **50**(4): 1178-1182.

Jellen-Ritter, A. S. og W. V. Kern (2001). "Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants Selected with a fluoroquinolone." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**(5): 1467-1472.

Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, et al. (2007). "Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates." *Applied and environmental microbiology* **73**(6): 1976-83.

Jones, D. og P. H. A. Sneath (1970). "Genetic transfer and bacterial taxonomy." *Bacteriological reviews* **34**(1): 40-81.

Jureen, R., A. Digranes, et al. (2003). "Urinveispatogene bakterier ved ukomplisert nedre urinveisinfeksjon hos kvinner." *Tidsskr Nor Læreforen* **15**(123): 2021-2.

Kahlmeter, G. (2003). "An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project." *Journal of antimicrobial chemotherapy* **51**(1): 69-76.

Karlowsky, J. A., D. J. Hoban, et al. (2006). "Fluoroquinolone-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatients are frequently multidrug resistant: results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance-Quinolone Resistance study." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**(6): 2251-2254.

Kern, M. B., T. Klemmensen, et al. (2006). "Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance." *Journal of antimicrobial chemotherapy* **50**(4): 513-6.

Kliebe, C., B. A. Nies, et al. (1985). "Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **28**(2): 302-7.

Kotra, L. P., J. Haddad, et al. (2000). "Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**(12): 3249-3256.

Kruse, H. og H. Sørum (1994). "Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments." Applied and environmental microbiology **60**(11): 4015-21.

Landgren, M., H. Odén, et al. (2005). "Diversity among 2481 *Escherichia coli* from women with community-acquired lower urinary tract infections in 17 countries." Journal of antimicrobial chemotherapy **55**: 928-937.

Lanka, E. og B. M. Wilkins (1995). "DNA processing reactions in bacterial conjugation." Annual review of biochemistry **64**: 141-69.

Lassen, J. (1975). "Rapid identification of gram-negative rods using a three-tube method combined with a dichotomic key." Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Supplement **83**(6): 525-33.

Lebek, G. (1963) a. "The spontaneous loss of episomal transmissible multiple resistance to antibiotics in populations of gram-negative intestinal microorganisms in cultures with and without antibiotics." Z Hyg Infektionskr. **149**: 255-66.

Lebek, G. (1963) b. "The transmission of multiple resistance to antibiotics and chemotherapeutic agents in their significance for hospitalism with multiple resistant gram-negative intestinal bacteria." Zentralbl Bakteriol [Orig]. **191**: 387-95.

Levene, S. D. og B. H. Zimm (1987). "Separations of open-circular DNA using pulsed-field electrophoresis." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**(12): 4054-4057.

Leverstein-vanHall, M. A., H. E. M. Blok, et al. (2003). "Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin." The journal of infectious diseases **187**(2): 251-9.

Licht, T. R., B. B. Christensen, et al. (1999). "Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment." Microbiology **145**: 2615-22.

Linton, K. B., P. A. Lee, et al. (1972). "Antibiotic resistance and transmissible R-factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and a rural community."

Journal of hygiene **70**: 99-104.

Llosa, M., F. X. Gomis-Rüth, et al. (2002). "Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport." Molecular microbiology **45**(1): 1-8.

Lorenz, M. G. og W. Wackernagel (1994). "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment." Microbiological reviews **58**(3): 563-602.

Marmur, J., R. Rownd, et al. (1961). "The nature of intergeneric episomal infection." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **47**: 972-9.

Martin, R. (1996). "Gel electrophoresis: Nucleic acids." BIOS Scientific Publishers Limited Oxford, England.

Martinez-Martinez, L., A. Pascual, et al. (2003). "Interaction of plasmid and host quinolone resistance." Journal of antimicrobial chemotherapy **51**(4): 1037-1039.

Martinez-Martinez, L., A. Pascual, et al. (1998). "Quinolone resistance from a transferable plasmid." Lancet **351**: 797-799.

Matthew, M., R. W. Hedges, et al. (1979). "Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria." Journal of bacteriology **138**(3): 657-62.

Mazel, D. og J. Davies (1999). "Antibiotic resistance in microbes." Cellular and molecular life sciences **56**(9-10): 742-54.

McClintock, B. (1950). "The origin and behavior of mutable loci in maize." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **36**(6): 344-55.

Mims, C., H. M. Dockrell, et al. (2004). "Medical microbiology." Elsevier limited ISBN 0 7234 3260 0.

- Mitsuhashi, S., K. Harada, et al. (1960). "On the drug-resistance of enteric bacteria. 3. Transmission of the drug-resistance from *Shigella* to F⁻ of Hfr strains of *E. coli* K-12." The Japanese journal of experimental medicine **30**: 301-306.
- Munshi, M. H., D. A. Sack, et al. (1987). "Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1." Lancet **2**(8556): 419-21.
- Nakaya, R., A. Nakamura, et al. (1960). "Resistance transfer agents in *Shigella*." Biochem Biophys Res Commun **3**: 654-9.
- Netherwood, T., R. Bowden, et al. (1999). "Gene transfer in the gastrointestinal tract." Applied and environmental microbiology **65**(11): 5139-41.
- Neu, H. C. (1975). "Aminopenicillins - clinical pharmacology and use in disease states." International journal of clinical pharmacology and biopharmacy **11**(2): 132-44.
- Novick, R. P. (1987). "Plasmid Incompatibility." Microbiological reviews **51**(4): 381-395.
- Novick, R. P., R. C. Clowes, et al. (1976). "Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal." Bacteriological reviews **40**(1): 168-89.
- O'Hara, A. M. og F. Shanahan (2006). "The gut flora as a forgotten organ." EMBO reports **7**(7): 688-93.
- Olson, M. V. (1989). "Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology." Journal of chromatography. **470**(2): 377-83.
- Olson, M. W., A. Ruzin, et al. (2006). "Functional, Biophysical, and Structural Bases for Antibacterial Activity of Tigecycline." Antimicrobial agents and chemotherapy **50**(6): 2156-66.
- Peirano, G., Y. Agersø, et al. (2005). "Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil." Journal of antimicrobial chemotherapy **55**: 301-305.

- Perfeito, L., L. Fernandes, et al. (2007). "Adaptive mutations in bacteria: high rate and small effects." Science **317**(5839): 813-5.
- Perreten, V. og P. Boerlin (2003). "A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland." Antimicrobial agents and chemotherapy **47**(3) 1169-72.
- Petrocheilou, V., J. Grinsted, et al. (1976). "R-plasmid transfer *in vivo* in the absence of antibiotic selection pressure." Antimicrobial agents and chemotherapy **10**(4): 753-61.
- Platt, D. J., J. S. Sommerville, et al. (1984). "Antimicrobial resistance and the ecology of *Escherichia coli* plasmids." The Journal of Hygiene (London) **93**(2): 181-8.
- Platt, D. J., J. S. Chesham, et al. (1986). "R-plasmid transfer *in vivo*: a prospective study." Journal of medical microbiology **21**(4): 325-330.
- Ploy, M.-C., T. Lambert, et al. (2000). "Integrins: an antibiotic resistance gene capture and expression system." Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC **38**(6): 483-487.
- Poole, K. (2000). "Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **44**(9): 2233-41.
- Recchia, G. D. og R. M. Hall (1995). "Gene cassettes: a new class of mobile element." Microbiology **141**: 3015-27.
- Richmond, M. H. (1969). "Extrachromosomal elements and the spread of antibiotic resistance in bacteria." The Biochemical journal **113**(2): 225-34.
- Roberts, M. C. (1996). "Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution." FEMS microbiology reviews **19**: 1-24.
- Robicsek, A., G. A. Jacoby, et al. (2006). "The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance." The Lancet infectious diseases **6**(10): 629-40.

Robicsek, A., D. F. Sahm, et al. (2005). "Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(7): 3001-3.

Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." Nature medicine **12**(1): 83-8.

Rådström, P., G. Swedberg, et al. (1991). "Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution." Antimicrobial agents and chemotherapy **35**(9): 1840-1848.

Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, et al. (1995). "Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements." Microbiological reviews **59**(4): 579-90.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1980). "Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition." Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA ISBN 0-87969-309-6.

Scazzocchio, F., L. Selan, et al. (1988). "Inhibition of plasmid conjugation by some recently synthesized 4-quinolone compounds." Chemioterapia **7**(5): 295-7.

Schatz, A., E. Bugie, et al. (2005). "Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944." Clin. Orthop. Relat. Res. **437**: 3-6.

Schulman, S. T., H. C. Friedman, et al. (2007). "Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?" Clin. Infect. Dis. **45**(8): 1025-9.

Schwartz, D. C. og C. R. Cantor (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." Cell **37**(1): 67-75.

Schwarz, S., C. Kehrenberg, et al. (2004). "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol." FEMS microbiology reviews **28**(5): 519-42.

Shaw, W. V. (1983). "Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology." CRC critical reviews in biochemistry **14**(1): 1-46.

Shenk, T. E., C. Rhodes, et al. (1975). "Biochemical method for mapping mutational alterations in DNA with S1 nuclease: the location of deletions and temperature-sensitive mutations in simian virus 40." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **72**(3): 989-93.

Silbert, S., L. Boyken, et al. (2003). "Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea." Diagnostic microbiology and infectious disease **47**: 619-621.

Skorupska, A., M. Buraczynska, et al. (1979). "Restriction enzyme analysis of the plasmid Collb DNA." Molecular & general genetics **173**(2): 197-201.

Skudal, H. K., N. Grude, et al. (2006). "Økende forekomst av antibiotikaresistens ved urinveisinfeksjoner." Tidsskr Nor Læreforen **126**(8): 1058-60.

Sköld, O. (1976). "R-factor-mediated resistance to sulfonamides by a plasmid-borne, drug-resistant dihydropteroate synthase." Antimicrobial agents and chemotherapy **9**(1): 49-54.

Sköld, O. (2000). "Sulfonamide resistance: mechanisms and trends." Drug Resist. Updat. **3**(3): 155-160.

Smith, H. W. og S. Halls (1966). "Observations on infective drug resistance in Britain." British medical journal **1**(5482): 266-9.

Speer, B. S., N. B. Shoemaker, et al. (1992). "Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance." Clinical microbiology reviews **5**(4): 387-399.

Steen, R. og O. Sköld (1985). "Plasmid-borne or chromosomally mediated resistance by Tn7 is the most common response to ubiquitous use of trimethoprim." Antimicrobial agents and chemotherapy **27**(6): 933-7.

Stokes, H. W., C. Tomaras, et al. (1993). "The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin." Plasmid **30**(1): 39-50.

Sunde, M., H. Solheim, et al. (2008). "Genetic linkage between class 1 integrons with the *dfrA12-orfF-aadA2* cassette array and *sul3* in *Escherichia coli*." Veterinary microbiology **In Press**

Søgaard, H. (1975). "Incidence of antibiotic resistance and transmissible R factors in the gram-negative bowel flora of hospital patients on admission." Scandinavian journal of infectious diseases **7**: 253-258.

Tatum, E. L. og J. Lederberg (1947). "Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **53**(6): 673-84.

Tavakoli, N., A. Comanducci, et al. (2000). "IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition." Plasmid **44**(1): 66-84.

Tenover, F. C. (2006). "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria." American journal of infection control **34**(5 Suppl 1): s3-10.

Tran, J. H. og G. A. Jacoby (2002). "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(8): 5638-5642.

Tran, J. H., G. A. Jacoby, et al. (2005)a. "Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(1): 118-25.

Tran, J. H., G. A. Jacoby, et al. (2005)b. "Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(7): 3050-2.

Tsakris, A., A. P. Johnson, et al. (1993). "Prevalence of the type I and type II DHFR genes in trimethoprim-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from Greece." Journal of antimicrobial chemotherapy **31**(5): 665-71.

Tzouvelekis, L. S. og R. A. Bonomo (1999). "SHV-type beta-lactamases." Current pharmaceutical design **5**(11): 847-64.

Vakulenko, S. B. og S. Mobashery (2003). "Versatility of aminoglycosides and prospects for their future." Clinical microbiology reviews **16**(3): 430-50.

Vogelstein, B. og D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**(2): 615-9.

Vorland, L. H., K. Carlsson, et al. (1985). "Antibiotic resistance and small R plasmids among *Escherichia coli* isolates from outpatient urinary tract infections in northern Norway." Antimicrobial agents and chemotherapy **27**(1): 107-113.

Walsh, T. R. (2005). "The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria." Clin. Microbiol. Infect. **11**(Suppl 6): 2-9.

Walter, M. V., A. Porteous, et al. (1987). "Measuring genetic stability in bacteria of potential use in genetic engineering." Applied and environmental microbiology **53**(1): 105-9.

Wang, M. og E. Lai (1995). "Pulsed field separation of large supercoiled and open-circular DNAs and its application to bacterial artificial chromosome cloning." Electrophoresis **16**(1): 1-7.

Watanabe, T. (1963). "Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria." Bacteriological reviews **27**: 87-115.

Watanabe, T., H. Nishida, et al. (1964). "Episome-mediated transfer of drug resistance in enterobacteriaceae. VII. Two types of naturally occurring R factors." Journal of bacteriology **88**: 716-26.

Widh, A. og O. Sköld (1977). "Ubiquity of R factor-mediated antibiotic resistance in the healthy population." Scandinavian journal of infectious diseases **9**(1): 37-9.

Wiegand, R. C., G. N. Godson, et al. (1975). "Specificity of the S1-nuclease from *Aspergillus Oryzae*." The Journal of biological chemistry **250**(22): 8848-8855.

Wise, E. M. og M. M. Abou-Donia (1975). "Sulfonamide resistance mechanism in *Escherichia coli*: R plasmids can determine sulfonamide-resistant dihydropteroate synthases." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **72**(7): 2621-5.

Woegerbauer, M., B. Jenni, et al. (2002). "Natural Genetic Transformation of Clinical Isolates of *Escherichia coli* in Urine and Water." Applied and environmental microbiology **68**(1): 440-43.

Wolfson, J. S. og D. C. Hooper (1989). "Fluoroquinolone antimicrobial agents." Clinical microbiology reviews **2**(4): 378-424.

Yamane, K., J. Wachino, et al. (2007). "New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(9): 3354-60.

Zielenkiewicz, U. og P. Cegłowski (2001). "Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems." Acta biochimica Polonica **48**(4): 1003-23.

Zinder, N. D. og J. Lederberg (1952). "Genetic exchange in *Salmonella*." Journal of bacteriology **64**(5): 679-99.

Zünd, P. og G. Lebek (1980). "Generation time-prolonging R plasmids: correlation between increases in the generation time of *Escherichia coli* caused by R plasmids and their molecular size." Plasmid **3**(1): 65-9.

Vedlegg

Vedlegg 1a-c:

MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt med E-test og tolkning av disse som sensitiv (S), intermediaær (I) eller resistent (R) for isolatene i det fekale normalmaterialet.

Vedlegg 2a:

Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmaterialet som er benyttet i konjugasjonsforsøk med sulfonamid som seleksjonsmiddel.

Vedlegg 2b:

Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmaterialet som er benyttet i konjugasjonsforsøk med trimetoprim som seleksjonsmiddel.

Vedlegg 2c:

Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmaterialet som er benyttet i konjugasjonsforsøk med tetracyclin som seleksjonsmiddel.

Vedlegg 3:

Millimetersoner fra resistensundersøkelse med agardiffusjon for transpienter med fekalt normalmateriale som donor, deres donorer og mottakere.

Vedlegg 4a-d:

Gelbilder fra kutting med S1-nuklease av plasmider isolert med miniprep fra fekalt normalmateriale.

Vedlegg 5:

MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) for ciprofloxacin og nalidixinsyre hos *E. coli* J53 Az^R og *E. coli* CCUG17620.

Vedlegg 6:

Millimetersoner fra resistensundersøkelse med agardiffusjon for transpienter med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor.

Vedlegg 7:

Nøyaktige MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E- test for transpienter fra det ciprofloxacinresistente UVI-materialet.

Vedlegg 8a-k:

Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

Vedlegg 1a: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E-test og tolkning av disse som sensitiv (S), intermediær (I) eller resistent (R) for isolatene i det fekale normalmateriale. Utført i en tidligere studie ved as Telelab.

NR	Nyclone	AMP	A	NIT	N	MEC	M	TRI	T	SUL	S	CIP	C	NAL	NA	TET	TE	KLO	K	GEN	G
1.2.1	c01	4	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,05	S	4	S	512	R	6	S	0,25	S
1.2.2	c02	3	I	8	S	0,125	S	0,5	S	256	R	0,01	S	2	S	6	I	3	S	0,25	S
1.2.3	c01	6	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,03	S	2	S	512	R	6	S	0,38	S
1.2.7	c01	8	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,03	S	3	S	512	R	8	S	0,25	S
1.2.8	c01	4	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,03	S	2	S	8	I	6	S	0,25	S
1.2.9	c01	6	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,05	S	3	S	512	R	8	S	0,25	S
1.2.10	c01	6	I	6	S	0,25	S	64	R	512	R	0,03	S	3	S	16	R	6	S	0,25	S
1.2.11	c01	6	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,03	S	3	S	512	R	6	S	0,25	S
1.2.12	c01	6	I	8	S	0,125	S	64	R	512	R	0,03	S	2	S	512	R	6	S	0,25	S
2.1.1	c03	12	I	12	S	0,25	S	0,25	S	32	S	0,05	S	4	S	12	R	12	R	0,25	S
2.1.2	c04	12	I	12	S	0,25	S	0,25	S	64	S	0,05	S	4	S	12	R	12	R	0,38	S
2.1.3	c03	4	I	8	S	0,19	S	0,25	S	32	S	0,02	S	3	S	6	I	4	S	0,25	S
2.1.4	c05	4	I	12	S	0,19	S	0,5	S	256	R	0,03	S	4	S	12	R	8	S	0,25	S
2.1.6	c03	6	I	8	S	0,25	S	0,38	S	32	S	0,03	S	3	S	8	I	4	S	0,25	S
2.1.7	c04	12	I	16	S	0,25	S	0,25	S	64	S	0,05	S	6	S	16	R	12	R	0,25	S
2.1.8	c06	8	I	16	S	0,25	S	0,75	S	256	R	0,03	S	6	S	32	R	8	S	0,25	S
2.1.9	c03	6	I	16	S	0,25	S	0,38	S	96	I	0,03	S	3	S	12	R	4	S	0,25	S
2.1.12	c03	6	I	12	S	0,25	S	0,5	S	64	S	0,03	S	3	S	8	I	4	S	0,25	S
2.1.13	c03	4	I	12	S	0,38	S	0,38	S	48	S	0,03	S	3	S	8	I	4	S	0,25	S
2.2.1	c03	4	I	8	S	0,25	S	0,38	S	32	S	0,02	S	2	S	12	R	3	S	0,19	S
2.2.2	c04	12	I	8	S	0,38	S	0,25	S	32	S	0,02	S	4	S	8	I	8	S	0,25	S
2.2.3	c06	4	I	12	S	0,125	S	0,5	S	48	S	0,02	S	4	S	16	R	6	S	0,25	S
2.2.4	c04	4	I	8	S	0,125	S	0,38	S	256	R	0,03	S	4	S	2	S	6	S	0,5	S
2.2.5	c06	8	I	6	S	0,38	S	0,25	S	32	S	0,03	S	4	S	12	R	6	S	0,25	S
2.2.6	c06	4	I	16	S	0,125	S	0,5	S	128	I	0,02	S	4	S	16	R	6	S	0,25	S
2.2.7	c06	4	I	16	S	0,125	S	0,5	S	128	I	0,02	S	4	S	12	R	6	S	0,25	S
2.2.8	c04	8	I	12	S	0,38	S	0,38	S	256	R	0,03	S	6	S	24	R	8	S	0,25	S
2.2.9	c04	8	I	12	S	0,38	S	0,38	S	96	I	0,03	S	4	S	24	R	8	S	0,25	S
2.2.10	c03	8	I	12	S	0,25	S	0,25	S	256	R	0,02	S	3	S	12	R	4	S	0,19	S
3.1.3	c07	6	I	8	S	0,125	S	0,19	S	48	S	0,02	S	2	S	6	I	3	S	0,25	S
3.1.4	c07	4	I	6	S	0,125	S	0,25	S	48	S	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,25	S
3.1.6	c07	4	I	12	S	0,19	S	0,19	S	32	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,19	S
3.1.7	c07	4	I	8	S	0,125	S	0,19	S	32	S	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,25	S
3.1.8	c07	4	I	8	S	0,125	S	0,19	S	32	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
3.1.9	c07	6	I	8	S	0,125	S	0,25	S	64	S	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,25	S
3.1.10	c07	4	I	6	S	0,125	S	0,19	S	64	S	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,25	S
3.1.11	c07	4	I	6	S	0,125	S	0,25	S	256	R	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
3.1.12	c07	6	I	12	S	0,19	S	0,25	S	64	S	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,25	S
3.2.1	c07	6	I	8	S	0,125	S	0,25	S	64	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,38	S
3.2.3	c07	4	I	12	S	0,125	S	0,25	S	32	S	0,03	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
3.2.4	c08	0,75	S	6	S	0,032	S	0,13	S	8	S	0,09	S	512	R	2	S	4	S	0,125	S
3.2.11	c07	6	I	8	S	0,125	S	0,25	S	64	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
3.2.12	c07	6	I	8	S	0,19	S	0,25	S	64	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
3.2.13	c07	4	I	8	S	0,19	S	0,25	S	96	I	0,02	S	3	S	6	I	4	S	0,25	S
3.2.15	c07	6	I	8	S	0,125	S	0,25	S	48	S	0,02	S	3	S	6	I	4	S	0,25	S
3.2.16	c07	6	I	12	S	0,125	S	0,19	S	48	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
3.2.17	c07	6	I	8	S	0,19	S	0,19	S	256	R	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,038	S
3.2.19	c07	4	I	8	S	0,25	S	0,25	S	128	I	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
4.2.2	c09	8	I	32	S	0,38	S	0,25	S	96	I	0,03	S	2	S	12	R	8	S	0,25	S
4.2.3	c10	1	S	8	S	0,125	S	0,19	S	512	R	0,01	S	3	S	512	R	4	S	0,19	S
4.2.4	c10	1	S	8	S	0,125	S	0,13	S	512	R	0,01	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
4.2.5	c10	0,75	S	12	S	0,094	S	0,13	S	512	R	0,01	S	2	S	192	R	3	S	0,125	S
4.2.6	c09	6	I	16	S	0,38	S	0,19	S	64	S	0,02	S	2	S	12	R	6	S	0,19	S
4.2.7	c10	1	S	6	S	0,094	S	0,13	S	512	R	0,01	S	2	S	128	R	4	S	0,125	S
4.2.8	c09	12	I	24	S	0,38	S	0,19	S	48	S	0,03	S	3	S	8	I	8	S	0,19	S
4.2.9	c09	6	I	24	S	0,38	S	0,19	S	24	S	0,03	S	2	S	12	R	6	S	0,25	S
4.2.10	c10	0,75	S	4	S	0,094	S	0,09	S	512	R	0,01	S	2	S	256	R	3	S	0,25	S
4.2.11	c09	8	I	24	S	0,38	S	0,5	S	512	R	0,02	S	6	S	16	R	6	S	0,25	S

Vedlegg 1b: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) bestemt ved E-test og tolkning av disse som sensitiv (S), intermediær (I) eller resistent (R) for isolatene i det fekale normalmateriale. Utført i en tidligere studie ved as Telelab.

NR	Nyclone	AMP	A	NIT	N	MEC	M	TRI	T	SUL	S	CIP	C	NAL	NA	TET	TE	KLO	K	GEN	G
6.1.3	c11	4	I	4	S	0,19	S	0,38	S	64	S	0,02	S	3	S	8	I	6	S	0,19	S
6.1.4	c11	4	I	6	S	0,19	S	0,38	S	64	S	0,02	S	2	S	8	I	6	S	0,25	S
6.1.5	c11	6	I	6	S	0,25	S	0,38	S	64	S	0,02	S	2	S	8	I	6	S	0,19	S
6.1.6	c11	6	I	6	S	0,19	S	0,38	S	96	I	0,02	S	2	S	8	I	6	S	0,19	S
6.1.7	c11	6	I	8	S	0,25	S	0,38	S	512	R	0,02	S	3	S	8	I	6	S	0,19	S
6.1.8	c11	6	I	8	S	0,19	S	0,38	S	48	S	0,03	S	3	S	12	R	6	S	0,25	S
6.1.9	c11	4	I	8	S	0,25	S	0,5	S	48	S	0,02	S	2	S	8	I	8	S	0,19	S
6.1.10	c11	4	I	8	S	0,25	S	0,38	S	48	S	0,02	S	2	S	8	I	6	S	0,19	S
6.1.11	c11	6	I	8	S	0,25	S	0,38	S	32	S	0,02	S	3	S	8	I	4	S	0,25	S
6.1.12	c11	6	I	6	S	0,25	S	0,38	S	48	S	0,02	S	3	S	8	I	4	S	0,19	S
8.2.2	c12	3	I	4	S	0,25	S	0,19	S	24	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,125	S
8.2.3	c12	2	I	4	S	0,25	S	0,13	S	16	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,19	S
8.2.4	c12	2	I	4	S	0,25	S	0,19	S	12	S	0,01	S	2	S	4	S	3	S	0,19	S
8.2.5	c12	2	I	4	S	0,25	S	0,25	S	8	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,19	S
8.2.6	c12	2	I	4	S	0,25	S	0,19	S	16	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,19	S
8.2.7	c12	2	I	4	S	0,19	S	0,19	S	16	S	0,01	S	1,5	S	3	S	3	S	0,19	S
8.2.8	c12	1,5	I	4	S	0,19	S	0,19	S	16	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,5	S
8.2.9	c12	2	I	4	S	0,19	S	0,19	S	16	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,125	S
8.2.10	c12	2	I	4	S	0,25	S	0,19	S	12	S	0,01	S	1,5	S	4	S	3	S	0,125	S
8.2.11	c12	1,5	I	6	S	0,19	S	0,19	S	8	S	0,01	S	1,5	S	3	S	3	S	0,19	S
9.1.1	c13	3	I	6	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,25	S
9.1.2	c13	2	I	4	S	0,125	S	0,13	S	64	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
9.1.3	c14	3	I	6	S	0,19	S	0,25	S	512	R	0,02	S	2	S	4	S	6	S	0,38	S
9.1.4	c13	2	I	4	S	0,19	S	0,13	S	32	S	0,02	S	2	S	4	S	6	S	0,38	S
9.2.3	c13	3	I	6	S	0,19	S	0,13	S	32	S	0,02	S	2	S	4	S	6	S	0,25	S
9.2.4	c13	3	I	8	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
9.2.5	c13	3	I	4	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,19	S
9.2.6	c13	2	I	4	S	0,125	S	0,13	S	32	S	0,02	S	3	S	4	S	4	S	0,25	S
9.2.7	c13	3	I	6	S	0,19	S	0,19	S	48	S	0,02	S	2	S	6	I	4	S	0,25	S
9.2.8	c13	2	I	4	S	0,19	S	0,19	S	32	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,25	S
9.2.9	c13	2	I	4	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,02	S	2	S	4	S	6	S	0,25	S
9.2.10	c13	2	I	4	S	0,125	S	0,13	S	48	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,38	S
9.2.11	c13	4	I	4	S	0,125	S	0,19	S	24	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,25	S
9.2.12	c13	3	I	4	S	0,19	S	0,13	S	24	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,25	S
10.1.1	c15	4	I	32	S	0,25	S	0,75	S	24	S	0,02	S	4	S	4	S	4	S	0,19	S
10.1.2	c15	4	I	24	S	0,25	S	0,5	S	64	S	0,02	S	4	S	6	I	8	S	0,19	S
10.1.3	c15	4	I	24	S	0,25	S	0,75	S	512	R	0,02	S	4	S	8	I	8	S	0,19	S
10.1.4	c15	4	I	24	S	0,19	S	0,5	S	48	S	0,02	S	4	S	8	I	6	S	0,19	S
10.1.5	c15	4	I	32	S	0,38	S	0,5	S	512	R	0,02	S	6	S	12	R	8	S	0,19	S
10.1.6	c15	4	I	16	S	0,125	S	0,5	S	32	S	0,02	S	6	S	8	I	6	S	0,125	S
10.1.7	c15	4	I	16	S	0,125	S	0,5	S	32	S	0,02	S	4	S	8	I	6	S	0,19	S
10.1.8	c16	4	I	3	S	0,19	S	0,5	S	32	S	0,01	S	3	S	8	I	4	S	0,25	S
10.1.9	c15	4	I	8	S	0,125	S	0,5	S	32	S	0,02	S	6	S	6	I	6	S	0,19	S
10.1.10	c15	4	I	24	S	0,125	S	0,5	S	64	S	0,02	S	6	S	8	I	6	S	0,19	S
10.2.1	c17	4	I	8	S	0,38	S	0,25	S	16	S	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,19	S
10.2.2	c17	4	I	12	S	0,38	S	0,38	S	16	S	0,02	S	2	S	12	R	6	S	0,19	S
10.2.3	c17	4	I	12	S	0,38	S	0,38	S	512	R	0,02	S	2	S	8	I	4	S	0,19	S
10.2.4	c17	4	I	12	S	0,38	S	0,38	S	32	S	0,02	S	3	S	16	R	4	S	0,19	S
10.2.5	c17	4	I	16	S	0,38	S	0,38	S	24	S	0,02	S	3	S	12	R	4	S	0,19	S
10.2.6	c17	4	I	24	S	0,38	S	0,38	S	512	R	0,02	S	2	S	8	I	6	S	0,25	S
11.1.1	c18	3	I	8	S	0,19	S	0,13	S	8	S	0,02	S	1,5	S	4	S	6	S	0,19	S
11.1.2	c18	2	I	6	S	0,19	S	0,13	S	12	S	0,02	S	1,5	S	4	S	3	S	0,19	S
11.1.3	c18	3	I	12	S	0,19	S	0,13	S	24	S	0,02	S	1,5	S	8	I	6	S	0,19	S
11.1.4	c18	4	I	16	S	0,19	S	0,13	S	12	S	0,02	S	3	S	4	S	6	S	0,19	S
11.1.5	c18	4	I	8	S	0,19	S	0,19	S	16	S	0,02	S	3	S	6	I	6	S	0,19	S
11.1.6	c18	4	I	6	S	0,125	S	0,19	S	12	S	0,02	S	2	S	4	S	6	S	0,19	S
11.1.7	c18	3	I	12	S	0,25	S	0,19	S	16	S	0,02	S	1,5	S	4	S	4	S	0,125	S
11.1.8	c18	3	I	24	S	0,19	S	0,13	S	8	S	0,02	S	1,5	S	4	S	4	S	0,19	S
11.1.9	c18	3	I	8	S	0,19	S	0,13	S	8	S	0,02	S	2	S	4	S	4	S	0,125	S
11.1.10	c18	3	I	6	S	0,19	S	0,13	S	8	S	0,02	S	1,5	S	4	S	4	S	0,125	S

Vedlegg 1c: MIC-verdier bestemt ved E-test og tolkning av disse som sensitiv (S), intermediær (I) eller resistent (R) for isolatene i det fekale normalmateriale. Utført i en tidligere studie ved as Telelab.

NR	Nyclone	AMP	A	NIT	N	MEC	M	TRI	T	SUL	S	CIP	C	NAL	NA	TET	TE	KLO	K	GEN	G
12.1.1	c19	6	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
12.1.2	c19	4	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	1,5	S	512	R	4	S	0,19	S
12.1.3	c19	6	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	6	S	0,25	S
12.1.4	c19	4	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	3	S	512	R	4	S	0,19	S
12.1.5	c19	6	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,25	S
12.1.6	c19	4	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,5	S
12.1.7	c19	4	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
12.1.8	c19	4	I	12	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,25	S
12.1.9	c19	4	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
12.1.10	c19	4	I	6	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	4	S	512	R	6	S	0,19	S
12.2.1	c19	4	I	6	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	1,5	S	512	R	4	S	0,25	S
12.2.2	c19	6	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	6	S	0,19	S
12.2.3	c19	6	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,25	S
12.2.4	c19	4	I	8	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,25	S
12.2.5	c19	4	I	6	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
12.2.6	c19	4	I	6	S	0,19	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
12.2.7	c19	4	I	6	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	4	S	0,19	S
12.2.8	c19	6	I	8	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S		S	512	R	6	S	0,19	S
12.2.9	c20	3	I	6	S	0,25	S	0,19	S	16	S	0,02	S	4	S	4	S	6	S	0,19	S
12.2.10	c19	6	I	6	S	0,25	S	64	R	512	R	0,02	S	2	S	512	R	6	S	0,25	S

Vedlegg 2a: Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmateriale som er benyttet i konjugasjonsforsøk med sulfonamid som seleksjonsmiddel.

Donor		Mottaker	
Stamme	Klon	DH5alfa	J53
ColiClon 1.2.1	1	x	x
ColiClon 1.2.2	2	x	Se komm
ColiClon 1.2.3	1	x	x
ColiClon 1.2.7	1	x	x
ColiClon 1.2.8	1	x	x
ColiClon 1.2.9	1	x	x
ColiClon 1.2.10	1	x	x
ColiClon 1.2.11	1	x	x
ColiClon 1.2.12	1	x	x
ColiClon 2.1.4	5	x	Se komm
ColiClon 2.1.8	6	x	Se komm
ColiClon 2.2.4	4	x	Se komm
ColiClon 2.2.8	4	x	Se komm
ColiClon 2.2.10	3	x	Se komm
ColiClon 3.1.11	7	x	Se komm
ColiClon 3.2.17	7	x	Se komm
ColiClon 4.2.3	10	x	Se komm
ColiClon 4.2.4	10	-	Se komm
ColiClon 4.2.5	10	-	Se komm
ColiClon 4.2.7	10	-	Se komm
ColiClon 4.2.10	10	-	Se komm
ColiClon 4.2.11	9	x	Se komm
ColiClon 6.1.7	11	x	Se komm
ColiClon 9.1.3	14	x	Se komm
ColiClon 10.1.3	15	x	Se komm
ColiClon 10.1.5	15	x	Se komm
ColiClon 10.2.3	17	x	Se komm
ColiClon 10.2.6	17	x	Se komm
ColiClon 12.1.1	19	x	x
ColiClon 12.1.2	19	-	x
ColiClon 12.1.3	19	-	x
ColiClon 12.1.4	19	-	x
ColiClon 12.1.5	19	-	x
ColiClon 12.1.6	19	-	x
ColiClon 12.1.7	19	-	x
ColiClon 12.1.8	19	-	x
ColiClon 12.1.9	19	-	x
ColiClon 12.1.10	19	-	x
ColiClon 12.2.1	19	-	x
ColiClon 12.2.2	19	-	x
ColiClon 12.2.3	19	-	x
ColiClon 12.2.4	19	-	x
ColiClon 12.2.5	19	-	x
ColiClon 12.2.6	19	-	x
ColiClon 12.2.7	19	-	x
ColiClon 12.2.8	19	-	x
ColiClon 12.2.10	19	-	x

Se komm = Ikke mulig å bruke stammer med MIC = 256 µg/ml, for på den konsentrasjonen vokser også J53. Der hvor MIC=512 µg/ml og en ikke har utført konjugasjonsforsøk får en ikke stammen til å vokse på ISA m/500 µg/ml sulfonamid.

Vedlegg 2b: Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmateriale som er benyttet i konjugasjonsforsøk med trimetoprim som seleksjonsmiddel.

Donor		Mottaker	
Stamme	Klon	DH5alfa	J53
Coliclon 1.2.1	1	-	x
Coliclon 1.2.3	1	-	x
Coliclon 1.2.7	1	-	x
Coliclon 1.2.8	1	-	x
Coliclon 1.2.9	1	-	x
Coliclon 1.2.10	1	-	x
Coliclon 1.2.11	1	-	x
Coliclon 1.2.12	1	-	x
Coliclon 12.1.1	19	-	x
Coliclon 12.1.2	19	-	x
Coliclon 12.1.3	19	-	x
Coliclon 12.1.4	19	-	x
Coliclon 12.1.5	19	-	x
Coliclon 12.1.6	19	-	x
Coliclon 12.1.7	19	-	x
Coliclon 12.1.8	19	-	x
Coliclon 12.1.9	19	-	x
Coliclon 12.1.10	19	-	x
Coliclon 12.2.1	19	-	x
Coliclon 12.2.2	19	-	x
Coliclon 12.2.3	19	-	x
Coliclon 12.2.4	19	-	x
Coliclon 12.2.5	19	-	x
Coliclon 12.2.6	19	-	x
Coliclon 12.2.7	19	-	x
Coliclon 12.2.8	19	-	x
Coliclon 12.2.10	19	-	x

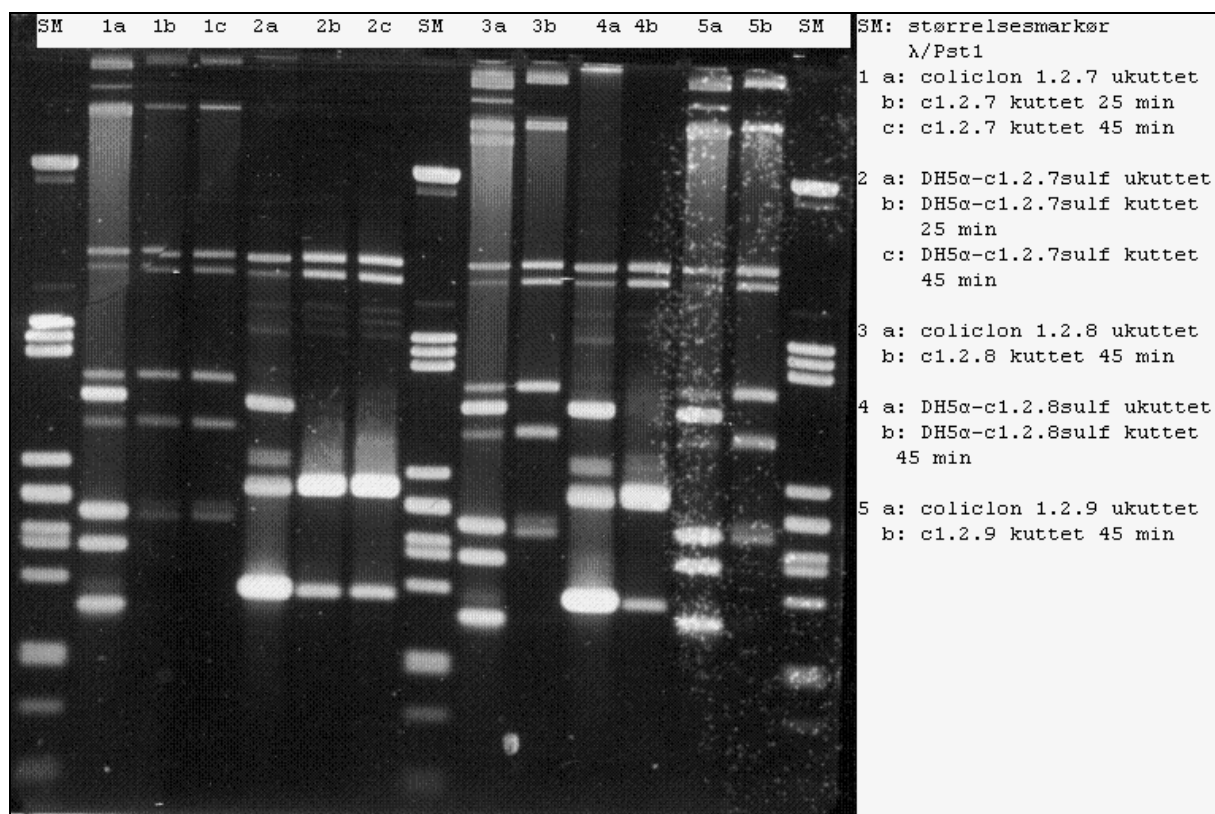
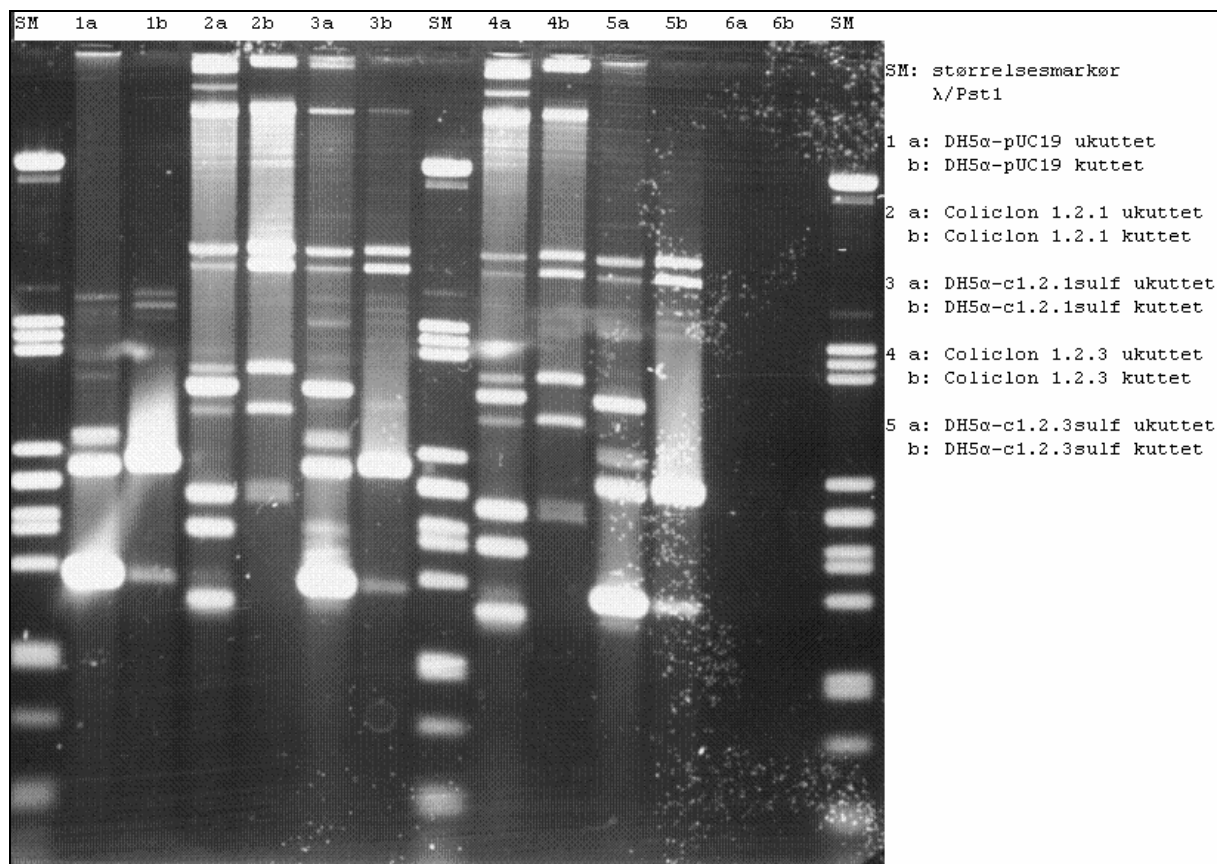
Vedlegg 2c: Oversikt over hvilke isolater i det fekale normalmateriale som er benyttet i konjugasjonsforsøk med tetracyclin som seleksjonsmiddel.

Donor		Mottaker	
Stamme	Klon	DH5alfa	J53
Coliclon 1.2.1	1	x	x
Coliclon 1.2.3	1	-	x
Coliclon 1.2.7	1	-	x
Coliclon 1.2.9	1	-	x
Coliclon 1.2.10	1	x	x
Coliclon 1.2.11	1	-	x
Coliclon 1.2.12	1	-	x
Coliclon 2.1.8	6	x	-
Coliclon 2.2.3	6	x	-
Coliclon 2.2.8	4	x	-
Coliclon 4.2.3	10	-	x
Coliclon 4.2.4	10	-	x
Coliclon 4.2.10	10	-	x
Coliclon 4.2.11	9	x	-
Coliclon 10.1.5	15	x	-
Coliclon 12.1.2	19	x	x
Coliclon 12.1.3	19	-	x
Coliclon 12.1.4	19	-	x
Coliclon 12.1.5	19	-	x
Coliclon 12.1.6	19	-	x
Coliclon 12.1.7	19	-	x
Coliclon 12.1.8	19	-	x
Coliclon 12.1.9	19	-	x
Coliclon 12.1.10	19	-	x
Coliclon 12.2.1	19	-	x
Coliclon 12.2.2	19	-	x
Coliclon 12.2.3	19	-	x
Coliclon 12.2.4	19	-	x
Coliclon 12.2.5	19	-	x
Coliclon 12.2.6	19	-	x
Coliclon 12.2.7	19	-	x
Coliclon 12.2.8	19	-	x
Coliclon 12.2.10	19	-	x

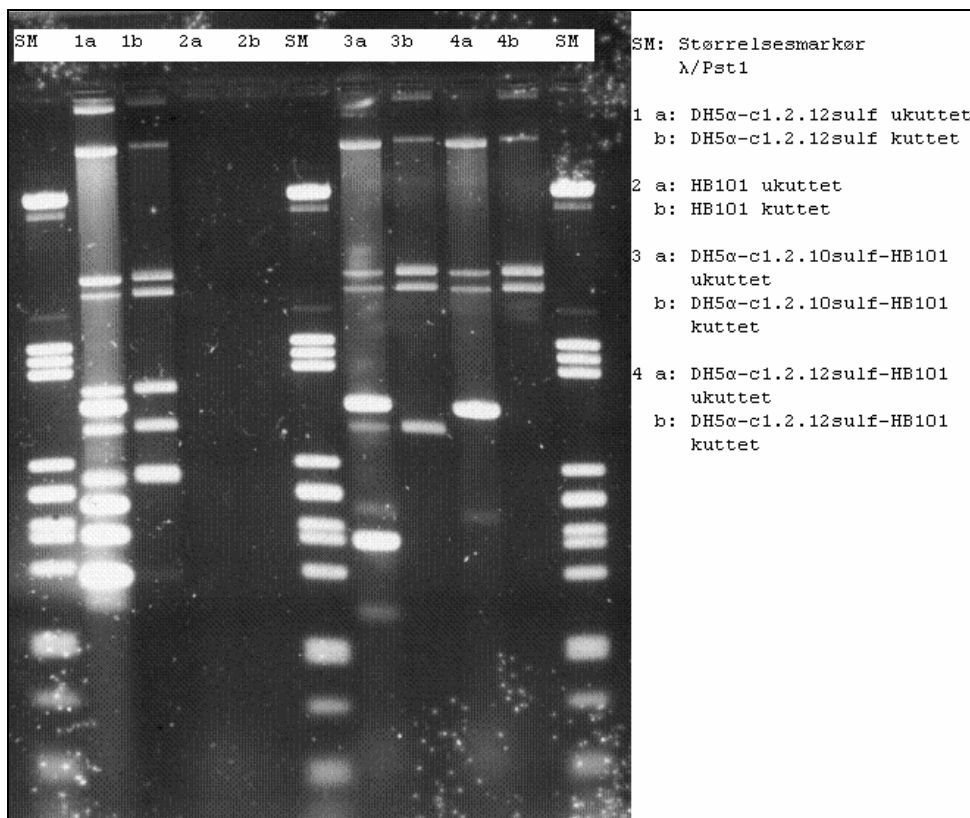
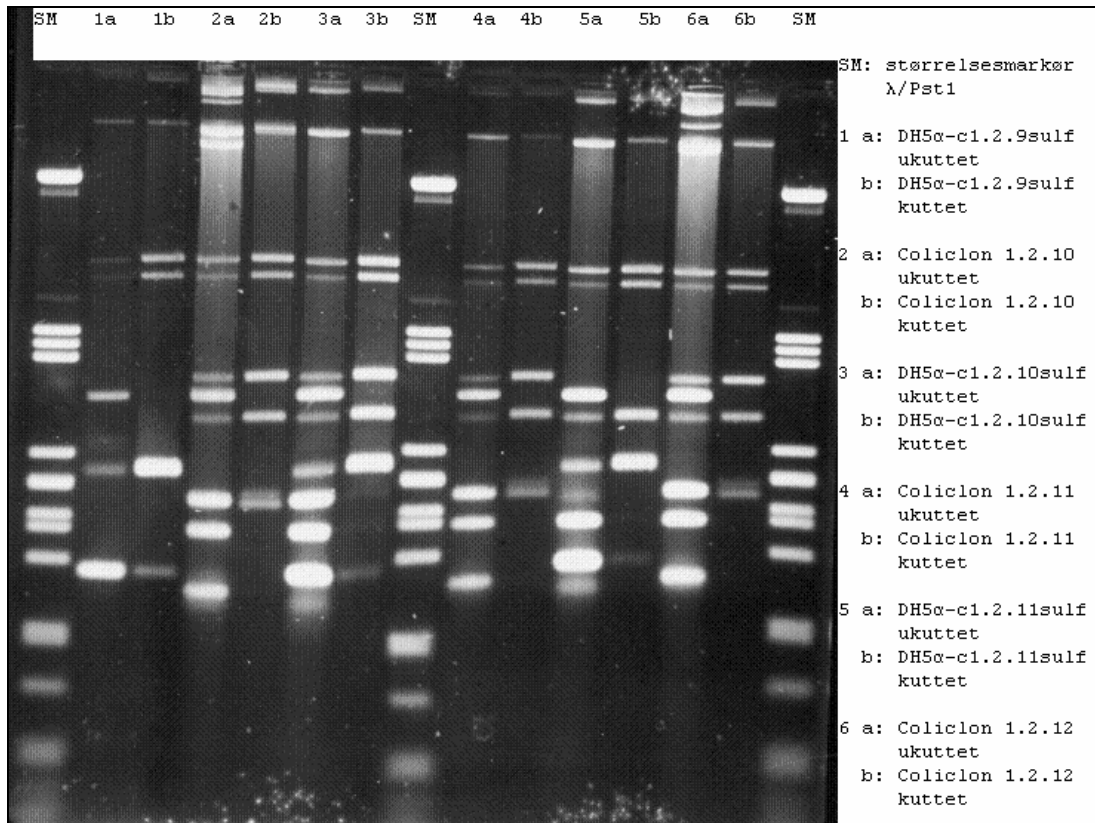
Vedlegg 3: Millimetersoner fra resistensundersøkelse med agardiffusjon for transpienter med fekalt normalmateriale som donor, deres donorer og mottakere.

Donor	Millimetersoner									
	Sul	Trim	Tet	Amp	Klor	Nit	Mec	Gen	Nal	Cip
Coliclon 1.2.1	0	0	-	18	-	23	29	-	-	36
Coliclon 1.2.3	0	0	-	18	-	23	31	-	-	38
Coliclon 1.2.7	0	0	-	19	-	22	32	-	-	38
Coliclon 1.2.8	0	0	-	19	-	23	31	-	-	39
Coliclon 1.2.9	0	0	-	19	-	23	30	-	-	38
Coliclon 1.2.10	0	0	-	19	-	23	31	-	-	38
Coliclon 1.2.11	0	0	-	18	-	22	32	-	-	39
Coliclon 1.2.12	0	0	-	18	-	23	32	-	-	39
Primær mottaker										
<i>E. coli DH5α</i>	> 30	> 30	-	0	-	> 30	17	-	-	> 30
Primære transpienter										
DH5α-cl.2.1 sulf	0	0	-	0	-	> 30	18	-	-	> 30
DH5α-cl.2.3 sulf	0	0	-	0	-	> 30	17	-	-	> 30
DH5α-cl.2.7 sulf	0	0	-	0	-	> 30	20	-	-	> 30
DH5α-cl.2.8 sulf	0	0	-	0	-	> 30	17	-	-	> 30
DH5α-cl.2.9 sulf	0	0	-	0	-	> 30	16	-	-	> 30
DH5α-cl.2.10 sulf	0	0	-	0	-	> 30	20	-	-	> 30
DH5α-cl.2.11 sulf	0	0	-	0	-	> 30	20	-	-	> 30
DH5α-cl.2.12 sulf	0	0	-	0	-	> 30	20	-	-	> 30
Primær mottaker										
<i>E. coli J53</i>	31	32	30	22	26	25	25	29	25	42
Primære transpienter										
J53-cl.2.1 liten sulf	0	0	31	20	29	27	34	31	25	42
J53-cl.2.1 medium sulf	0	0	31	21	30	27	33	32	25	42
J53-cl.2.3 liten sulf	0	0	32	21	29	26	34	31	24	42
J53-cl.2.3 medium sulf	0	0	32	20	28	26	35	32	25	43
J53-cl.2.7 sulf	0	0	31	20	28	25	34	32	25	42
J53-cl.2.8 liten sulf	0	0	31	22	29	27	35	31	25	42
J53-cl.2.8 medium sulf	0	0	32	22	28	26	35	31	24	43
J53-cl.2.9 sulf	0	0	31	21	29	26	35	31	25	42
J53-cl.2.10 sulf	0	0	32	21	29	27	36	32	24	43
J53-cl.2.11 sulf	0	0	31	22	30	27	34	31	24	42
J53-cl.2.12 sulf	0	0	32	22	29	28	34	31	25	43
J53-cl.2.1 Trim	0	0	32	20	29	26	34	31	26	43
J53-cl.2.7 Trim	0	0	31	22	29	27	32	30	24	42
J53-cl.2.8 liten Trim	0	0	32	22	29	28	34	31	24	42
J53-cl.2.8 medium Trim	0	0	32	22	28	26	34	31	25	42
J53-cl.2.9 Trim	0	0	31	21	29	27	34	31	24	41
J53-cl.2.10 Trim	0	0	32	20	29	26	34	31	26	41
J53-cl.2.11 Trim	0	0	32	22	29	26	33	31	24	41
J53-cl.2.12 Trim	0	0	31	21	29	26	32	32	25	41
Sekundær mottaker										
<i>E. coli HB101</i>	44	50	39	22	36	46	40	40	31	> 50
Sekundære transpienter										
DH5α-cl.2.10sul-HB101	0	0	-	18	-	> 40	42	34	-	> 30
DH5α-cl.2.12sul-HB101	0	0	-	19	-	> 40	41	34	-	> 30
J53-cl.2.1med sulf-HB101	0	0	35	24	34	44	40	39	33	> 50
J53-cl.2-8 liten sulf-HB101	0	0	41	24	36	45	44	39	31	> 50
J53-cl.2.10 sulf-HB101	0	0	38	25	37	45	42	39	32	> 50
J53-cl.2.11 sulf-HB101	0	0	38	24	37	44	42	39	32	> 50
J53-cl.2.12 sulf-HB101	0	0	38	25	37	46	42	39	31	> 50

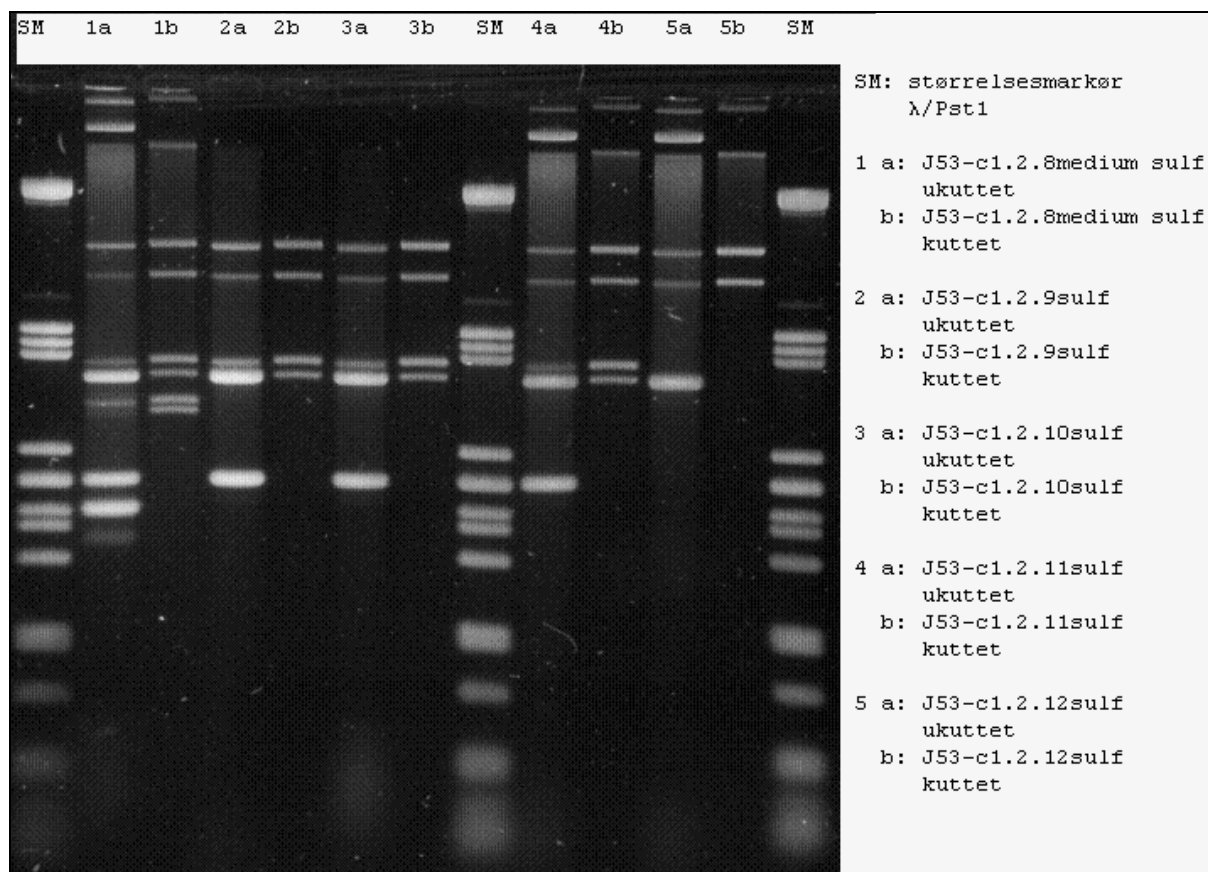
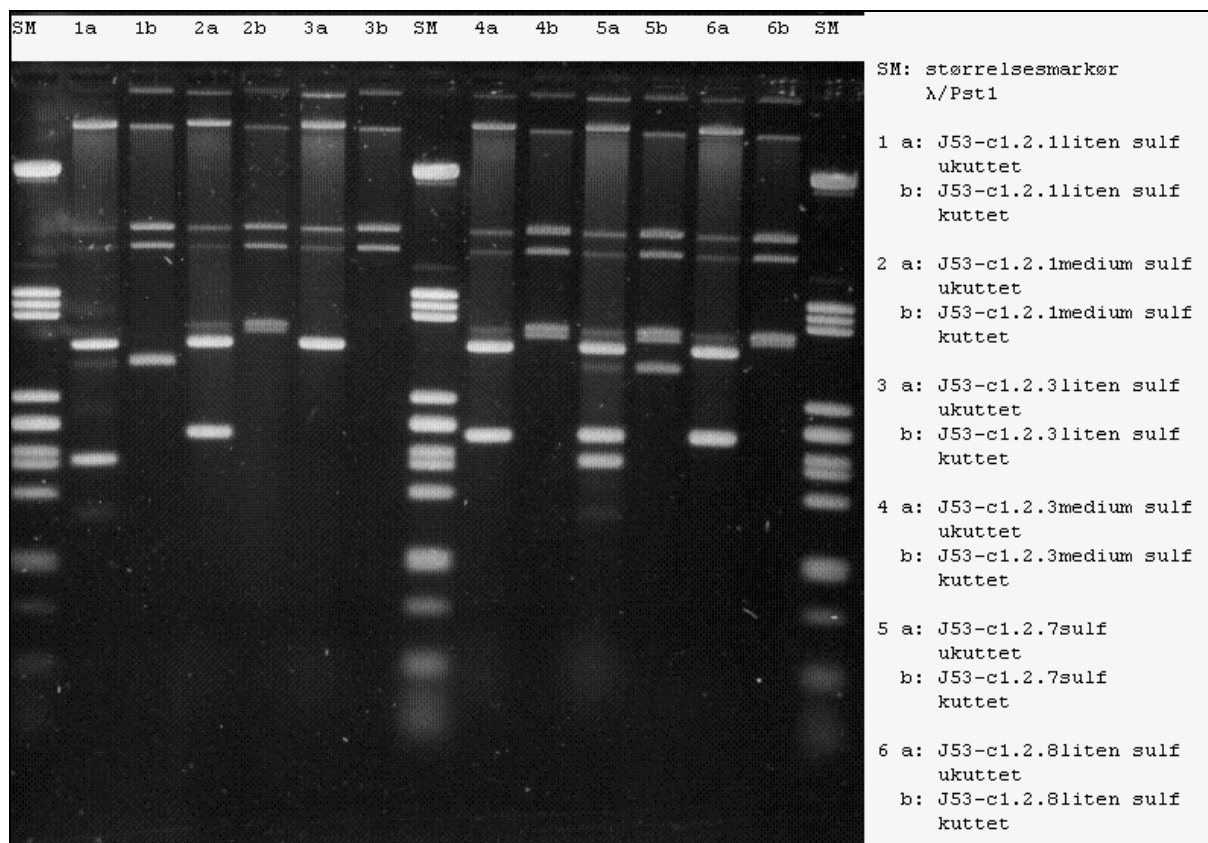
Vedlegg 4a: Gelbilder fra kutting med S1-nuklease av plasmider isolert med miniprep fra fekalt normalmateriale.



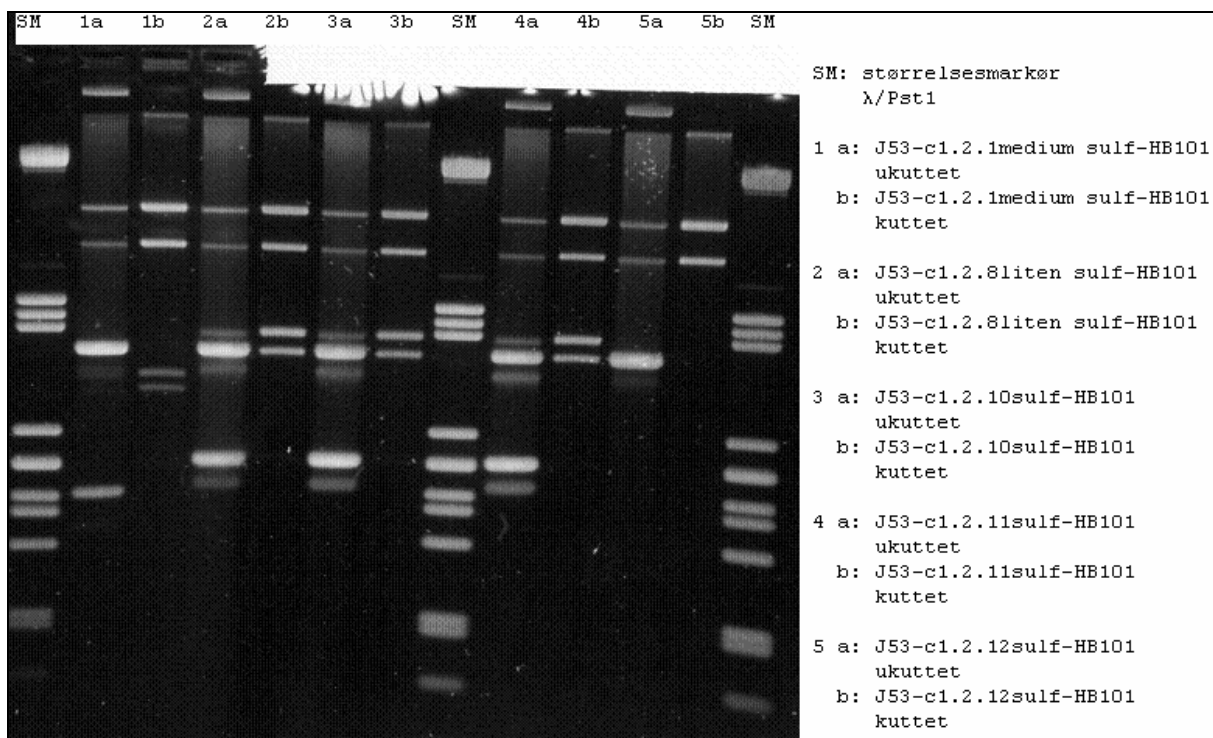
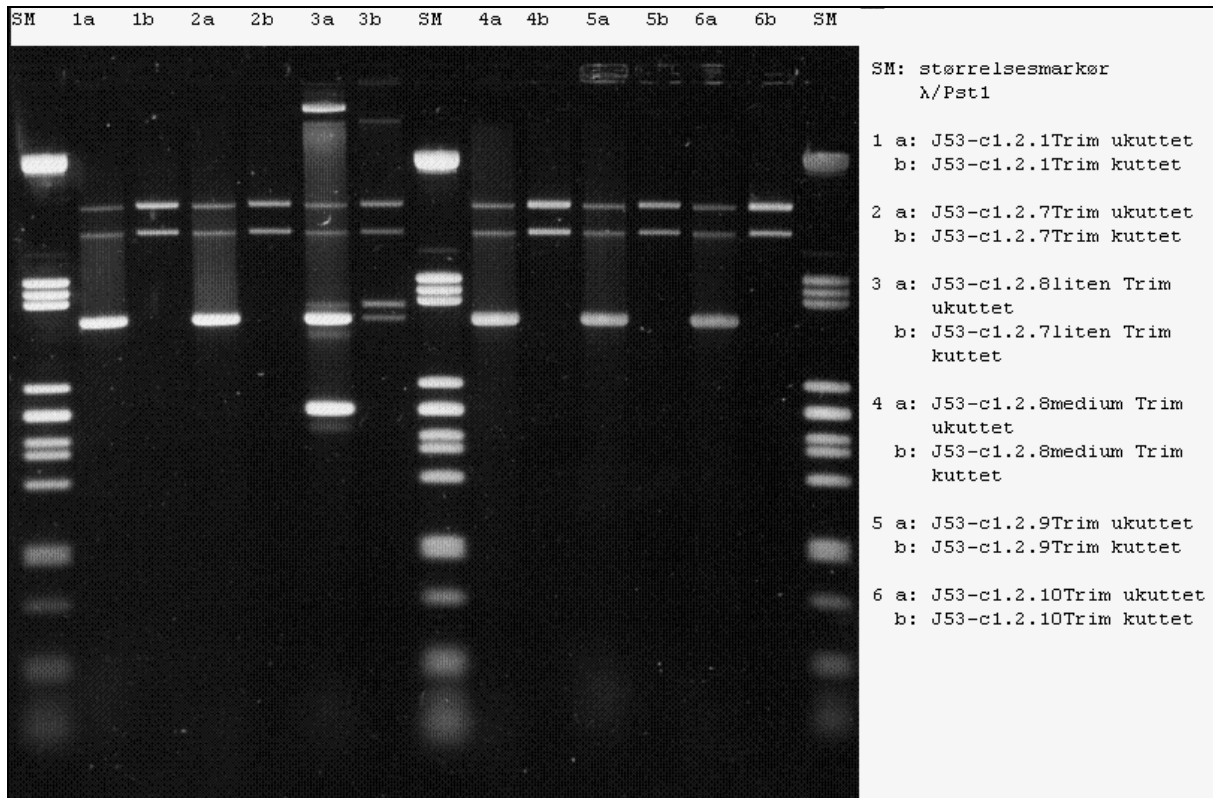
Vedlegg 4b: Gelbilder fra kutting med S1-nuklease av plasmider isolert med miniprep fra fekalt normalmateriale.



Vedlegg 4c: Gelbilder fra kutting med S1-nuklease av plasmider isolert med miniprep fra fekalit normalmateriale.



Vedlegg 4d: Gelbilder fra kutting med S1-nuklease av plasmider isolert med miniprep fra fekal normalmateriale.



Vedlegg 5: MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) for ciprofloxacin og nalidixinsyre hos *E. coli* J53 Az^R og *E. coli* CCUG17620.

<i>E. coli</i> CCUG 17620		
Dato	MIC Nali ($\mu\text{g/ml}$)	MIC Cipro ($\mu\text{g/ml}$)
22.12.2006	1,0	0,008
22.12.2006	1,5	0,008
7.2.2007	1,5	0,006
15.2.2007	1,5	0,008
21.2.2007	1,0	0,006
30.6.2007	1,5	0,008

<i>E. coli</i> J53 Az^R		
Dato	MIC Nali ($\mu\text{g/ml}$)	MIC Cipro ($\mu\text{g/ml}$)
1998*	4	0,008
22.12.2006	3	0,006

* = Martinez-Martinez, Pascual et al. 1998

Vedlegg 6: Millimetersoner fra resistensundersøkelse med agardiffusjon for transpienter med ciprofloxacinresistent UVI-materiale som donor og tolkning av disse som S, I eller R etter AFAs retningslinjer.

Transpient	Millimetersoner og tolkning som sensitiv, intermediær eller resistent									
	Amp	Nit	Mec	Tri	Sul	Cip	Nal	Tet	Klor	Gen
<i>E. coli</i> J53	22 I	25 S	25 S	32 S	31 S	40 S	25 S	30 S	26 S	29 S
J53-FQ 5 Amp	0 R	18 S	19 I	26 S	0 R	35 S	14 R	0 R	14 R	30 S
J53-FQ 5 Sul	0 R	19 S	17 I	25 S	0 R	38 S	16 R	0 R	14 R	29 S
J53-FQ 5 Trim	0 R	26 S	26 S	0 R	0 R	42 S	25 S	0 R	24 S	21 S
J53-FQ 5 Tet	0 R	19 S	26 S	26 S	0 R	38 S	16 S	0 R	13 R	30 S
J53-FQ 5 Klor	0 R	22 S	23 S	0 R	0 R	38 S	16 R	0 R	10 R	20 I
J53-FQ8 Trim	0 R	27 S	26 S	0 R	0 R	41 S	25 S	0 R	27 S	31 S
J53-FQ 18 Kan	22 I	27 S	33 S	34 S	32 S	38 S	22 S	28 S	28 S	29 S
J53-FQ19 Amp	0 R	26 S	33 S	33 S	0 R	35 S	24 S	38 S	26 S	29 S
J53-FQ19 Sul	0 R	27 S	25 S	34 S	0 R	40 S	26 S	31 S	26 S	29 S
J53-FQ19 Kan	0 R	27 S	33 S	35 S	0 R	35 S	24 S	27 S	28 S	31 S
J53-FQ25 Trim	0 R	25 S	21 S	0 R	0 R	40 S	25 S	0 R	27 S	33 S
J53-FQ 27 Kan	0 R	11 R	22 S	0 R	29 S	0 R	0 R	0 R	0 R	20 I
J53-FQ28 Klor	0 R	18 S	24 S	0 R	0 R	38 S	14 R	0 R	8 R	30 S
J53-FQ28 Trim	0 R	16 I	24 S	0 R	0 R	37 S	14 R	0 R	0 R	33 S
J53-FQ30 Kan	0 R	25 S	26 S	0 R	0 R	39 S	23 S	0 R	26 S	28 S
J53-FQ32 Kan	0 R	25 S	29 S	31 S	31 S	36 S	23 S	29 S	27 S	20 S
J53-FQ36 Klor	0 R	19 S	23 S	0 R	0 R	38 S	15 R	0 R	0 R	30 S
J53-FQ 39 Sulf	0 R	26 S	16 I	32 S	0 R	40 S	25 S	29 S	25 S	29 S
J53-FQ47 Amp	0 R	25 S	26 S	34 S	34 S	38 S	23 S	27 S	26 S	19 I
J53-FQ47 Kan	22 I	26 S	34 S	38 S	31 S	38 S	23 S	28 S	29 S	28 S
J53-FQ50 Kan	22 I	25 S	33 S	33S	34 S	40 S	31 S	31 S	29 S	29 S
J53-FQ51 Sul	0 R	26 S	16 I	32 S	0 R	40 S	24 S	29 S	0 R	30 S
J53-FQ53 Kan	20 I	26 S	32 S	30 S	31 S	39 S	24 S	32 S	28 S	29 S
J53-FQ56 Trim	0 R	28 S	31 S	0 R	0 R	42 S	25 S	0 R	28 S	32 S

Vedlegg 7: Nøyaktig avleste MIC-verdier ($\mu\text{g/ml}$) ved E-test for transipienter fra det ciprofloxacinresistente UVI-materialet.

Transipient	Amp	Tri	Sul	Cip	Nal	Tet	Klor	Gen	Kan
<i>E. coli</i> J53	3,0	0,25	8,0	0,006	3,0	1,0	6,0	0,094	1,5
J53-FQ 5 Amp	> 256	i.u.	> 1024	0,032	12,0	192	16,0	i.u.	i.u.
J53-FQ 5 Sul	> 256	i.u.	> 1024	0,032	8,0	> 256	24,0	i.u.	1,0
J53-FQ 5 Trim	> 256	> 32,0	> 1024	0,006	3,0	256	i.u.	i.u.	i.u.
J53-FQ 5 Tet	> 256	i.u.	> 1024	0,032	8,0	> 256	16,0	i.u.	i.u.
J53-FQ 5 Klor	> 256	> 32,0	> 1024	0,032	12,0	> 256	32,0	6,0	> 256
J53-FQ8 Trim	> 256	> 32,0	> 1024	0,012	2,0	256	i.u.	i.u.	i.u.
J53-FQ 18 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	0,012	4,0	i.u.	i.u.	i.u.	8,0
J53-FQ19 Amp	> 256	0,25	> 1024	0,032	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	16,0
J53-FQ19 Sul	> 256	i.u.	> 1024	0,032	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	24
J53-FQ19 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	0,032	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	48,0
J53-FQ25 Trim	> 256	> 32,0	> 1024	0,012	3,0	256	i.u.	i.u.	i.u.
J53-FQ 27 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	32,0	256	i.u.	i.u.	i.u.	> 256
J53-FQ28 Klor	> 256	> 32,0	> 1024	0,023	3,0	192	> 256	0,094	1,0
J53-FQ28 Trim	> 256	> 32,0	> 1024	0,023	12,0	256	> 256	i.u.	i.u.
J53-FQ30 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	0,008	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	2,0
J53-FQ32 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	0,047	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	24,0
J53-FQ36 Klor	> 256	> 32,0	> 1024	0,023	3,0	192	> 256	0,125	1,5
J53-FQ 39 Sulf	> 256	i.u.	> 1024	0,008	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	-
J53-FQ47 Amp	> 256	i.u.	i.u.	0,012	3,0	i.u.	i.u.	4,0	2,0
J53-FQ47 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	0,012	4,0	i.u.	i.u.	i.u.	64,0
J53-FQ50 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	0,012	3,0	i.u.	i.u.	i.u.	?
J53-FQ51 Sul	> 256	i.u.	> 1024	0,008	3,0	i.u.	48,0	i.u.	i.u.
J53-FQ53 Kan	i.u.	i.u.	i.u.	32,0	256	i.u.	i.u.	i.u.	> 256
J53-FQ56 Trim	> 256	> 32,0	> 1024	0,006	3,0	256	i.u.	i.u.	i.u.

Vedlegg 8a: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

Generelt mikrobiologisk laboratoriestyr (til resistensundersøkelser og konjugasjonsforsøk)		
<i>Artikkel</i>	<i>Produsent</i>	<i>Event. leverandør</i>
Øser: 10 µl og 1 µl (Quadloop PS)	Miniplast, Ein-Shemer kibbutz, Israel	Sarstedt, Ski, Norge
Sterile, ikke-toksiske bomullspinner	Medical Wire & Equipment Co, Bath, England	Montebello Diagnostics, Oslo, Norge
Automatpipetter (Finnpipette) 0,5-10 µl 5-50 µl 40-200 µl 200-1000 µl	Thermo scientific, Waltman, MA, USA	vWR international, Oslo, Norge
Pluggedde tipper til automatpipette (Neptune) 10 µl, 100 µl, 200 µl og 1000 µl	CLP direct, San Diego, CA, USA	vWR international, Oslo, Norge
Sterile pasteurpipetter	LP Italiana SPA, Milano, Italia	Heger, Rjukan, Norge
Sterile pipetter (Sterilin) 5 ml, 10 ml og 25 ml	Barloworld scientific ltd, Stone, Staffordshire, England	-
Sentrifuge	Kubota 5100	-
Kjølesentrifuge	Rotanta 460R	-
Minisentrifuge	IEC Centa-M2	-
Sterile tannpirkere	Vanlige tannpirkere av tre, autoklavert ved 121°C i 15 min	-
Eppendorfrør	Eppendorf, Hamburg, Tyskland	-
Kryorør 1,8 ml	Nalgene Nunc, Roskilde, Danmark	-
15 ml rør med skrukork	-	Sarstedt, Ski, Norge
50 ml rør med skrukork	-	Sarstedt, Ski, Norge
Spektrofotometer (Helios α unicam)	Thermo Fisher Scientific, Leicestershire, England	Nerliens Mezansky, Oslo, Norge
Makrokyvetter	-	Hecolab, Oslo, Norge
Turbidometer	Oxoid, Hampshire, England	Oxoid, Oslo, Norge
Rotator	-	Montebello Diagnostics, Oslo, Norge
Agarskåler, 90 mm	Heger, Rjukan, Norge	-
Inkuberingsrom 36 ± 1,5 °C	-	-

Vedlegg 8b: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

PFGE		
<i>Artikkel</i>	<i>Produsent</i>	<i>Event. leverandør</i>
Pulsfeltapparat med tilhørende utstyr (CHEF Mapper)	Biorad, Hercules, CA, USA	-
Gelstøpingsform og kam	Biorad, Hercules, CA, USA	-
Vertikalt roteringshjul	SBS AS	Heger, Rjukan, Norge
Pluggform (CHEF disposable plugmold)	Biorad, Hercules, CA, USA	-
Skalpell (Paragon)	Rotex International, Sheffield, England	-

Gelelektroforese, farging, fotografering og fotobearbeidelse		
<i>Artikkel</i>	<i>Produsent</i>	<i>Event. leverandør</i>
Gelstøpingskammer og kam	-	BRP
Elektroforesekammer (Max submarine agarose gel unit HE99)	Hoefer scientific instruments, San Fransisco, CA, USA	BRP
Strømkilde, Biorad model 250/2,5	Biorad, Hercules, CA, USA	-
Kamera med 302 nm UV-lys	MP-4 Land Camera (Polaroid)	-
	GelDoc XR, Biorad (digitalt)	-
665 polaroidfilm	Polaroid, Concorde, MA, USA	Polaroid Norge, Skårer, Norge
Fargekar	-	vWR international, Oslo, Norge
Rister (Ika-schüttler mts4)	IKA-Werke GmbH & Co, Staufen, Tyskland	vWR international, Oslo, Norge
Varmeskap med vippe	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA	-
GelCompareII	Applied maths, Saint-Martens-Latem, Belgia	-

Vedlegg 8c: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

Diverse		
<i>Artikkel</i>	<i>Produsent</i>	<i>Event. leverandør</i>
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Tyskland	Qiagen, Oslo, Norge
CYBR Gold	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA	vWR international, Oslo, Norge
Restriksjonsenzym HindIII 10U/μl + buffer E	Promega, Madison, WI, USA	Nerliens Meszansky AS, Oslo, Norge
Restriksjonsenzym PstI 10U/μl + buffer + buffer H	Promega, Madison, WI, USA	Nerliens Meszansky AS, Oslo, Norge
Restriksjonsenzym SmaI 10U/μl + buffer + buffer J	Promega, Madison, WI, USA	Nerliens Meszansky AS, Oslo, Norge
Antibiotikaimpregnerte lapper - sulfonamid, 100 μg - trimetoprim, 5 μg - tetracyclin, 30 μg - ampicillin, 10 μg - kloramfenikol, 30 μg - nitrofurantoin, 100 μg - mecillinam, 10 μg - gentamicin, 30 μg - nalidixinsyre, 30 μg - ciprofloxacin, 5 μg	Oxoid, Basingstoke, UK	Oxoid Norge, Oslo, Norge
E-tester - Sulfonamid 0,064 - 1024 μg/ml - Trimetoprim 0,002 - 32 μg/ml - Ampicillin 0,016 – 256 μg/ml - Kanamycin 0,016 – 256 μg/ml - Nalidixinsyre 0,016 – 256 μg/ml - Ciprofloxacin 0,002 – 32 μg/ml - Kloramfenikol 0,016 – 256 μg/ml - Tetracyclin 0,016 – 256 μg/ml - Gentamicin 0,064 – 1024 μg/ml	AB Biodisk, Solna, Sverige	Montebello diagnostics, Oslo, Norge
Lambda DNA (D1501)	Promega, Madison, WI, USA	-

Vedlegg 8d: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

PFGE		
PIV-buffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
NaCl (S0520.1000; Duchefa biochemie, Harlem, NL)	58,4 g	1 M
Tris-base (T1501.1000; Duchefa biochemie, Harlem, NL)	1,2 g	10 mM
dH ₂ O	1 liter	
Løses på magnetrører. Juster pH til 8,0 med 1 M HCl. Autoklaveres ved 121°C i 15 min. Oppbevares i kjøleskap.		
PIV-sukrose-buffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
PIV-buffer	100 ml	
Sucrose (K20780087; Merk, Darmstadt, Tyskland)	20,0 gram	200 mg/ml
Løses på magnetrører, sterilfiltreres. Oppbevares i kjøleskap.		
Pluggagarose		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Agarose (A3054-16; Sigma, St. Luis, MO, USA)	600 µl x (n + 1)	2 %
PIV-buffer	prøver	
Løses ved koking. Avkjøles til 50 °C før blanding med bakteriesuspensjon.		
RNase		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
RNase (Sigma, St. Luis, MO, USA)	10 mg	500 µg/ml
Tris-CaCl ₂ -Glycerol (Substratseksjonen, Telelab)	20 ml	
RNasen blandes med Tris-CaCl ₂ -Glycerol og fordeles i eppendorfrør à 500 µl og oppbevares ved -20°C.		
Lysozym		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Lysozym (Sigma, St. Luis, MO, USA)	100 mg	100 mg/ml
Sterilt dH ₂ O (Fresenius Kabi, Halden, Norge)	1 ml	
Lysozym veies opp i et eppendorfrør og løses i dH ₂ O. Må lages like før bruk.		

Vedlegg 8e: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

PFGE		
Grunnbuffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Tris-HCL (T3263; Sigma, St. Luis, MO, USA)	0,945 g	6 mM
EDTA fri syre (Triplex II) (K1000317; Merck, Darmstadt, Tyskland)	2,9 g	10 mM
Deoxycholate natriumsalt (D6750; Sigma, St. Luis, MO, USA)	2 g	0,2 %
dH ₂ O	1 liter	
Tris-HCl løses i 950 ml dH ₂ O og pH justeres til 8,0 med 1 M NaOH. EDTA tilsettes under røring før pH justeres på nytt. Deretter tilsettes deoxycholate og pH sjekkes før volum justeres til 1 liter. Autoklaveres ved 121°C i 15 min og oppbevares i romtemperatur.		
Lyseringsbuffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Grunnbuffer	30 ml	
N-lauroylsarcosin natriumsalt (L9150-100G; Sigma, St. Luis, MO, USA)	0,15 g	-
RNase (500 µg/ml)	300 µl	
Lysozym (100 mg/ml)	120 µl	
N-lauroylsarcosin natriumsalt veies opp i 50 ml nunc-rør med skrukork, tilsettes grunnbuffer og løses opp ved vending. Tilsettes RNase og lysozym. Lages like før bruk. Nok til 10 prøver.		
ES-buffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
EDTA fri syre (Triplex II) (K1000317; Merck, Darmstadt, Tyskland)	146 g	0,5 M
N-lauroylsarcosin natriumsalt (L9150-100G; Sigma, St. Luis, MO, USA)	10 g	1 %
dH ₂ O	1 liter	
EDTA løses i dH ₂ O på magnetrører og justeres til pH 8,0 med 5M NaOH. Deretter tilsettes N-lauroylsarcosin natriumsalt og pH justeres på nytt til 5M NaOH. Volum justeres til 1 liter og bufferen autoklaveres ved 121°C i 15 min. Oppbevares i romtemperatur.		

Vedlegg 8f: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

PFGE		
ESP-buffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
ES-buffer	100 ml	1 mg/ml
Proteinase K (Promega, Madison, WI, USA)	100 mg	
Proteinasen løses i ES-buffere i en steril glassflaske. Oppbevares i kjøleskap.		
TBE-tørrstoff		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Tris-base (T1501.1000; Duchefa biochemie, Harlem, NL)	16,2 g	-
Borsyre (B0503.1000; Duchefa biochemie, Harlem, NL)	8,26 g	
EDTA (Merck, Darmstadt, Tyskland)	0,372 g	
Veies opp og oppbevares i plastbegere med skrukork.		
TBE-buffer		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
TBE-tørrstoff (substratseksjonen, Telelab)	24,832 g	0,5 x TBE
Sterilt dH ₂ O (Fresenius Kabi, Halden, Norge)	3 liter	
TBE-tørrstoffet løses i dH ₂ O på magnetrører og pH justeres til 8,2 med HCl.		
TBE-buffer med thiourea		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
0,5 x TBE-buffer, pH 8,2	2,2 liter	50 mM
Thiourea (Sigma, St. Luis, MO, USA)	8,4 g	
Thiourea veies opp i avtrekk og tilsettes bufferen. Løses ved vending.		
Pulsfeltagarosegel		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Pulsed-Field Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade Agarose (Biorad, Hercules, CA, USA)	1,5 g	1,0 %
0,5 x TBE-buffer, pH 8,2	150 ml	
Agarosen løses i bufferen ved koking og avkjøles på magnetrører til 50 °C før støping.		

Vedlegg 8g: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

S1-kutting		
Fortynningsbuffer til S1-nuklease		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Natriumacetat (Art nr 6268; Merck, Darmstadt, Tyskland)	0,492 g	30 mM
NaCl (S0520.1000 ; Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	0,584 g	50 mM
ZnCl ₂ (8816.0259 ; Merck, Darmstadt, Tyskland)	0,0273 g	1 mM
Glycerol (G1345.1000 ; Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	100 ml	
dH ₂ O	200 ml	
<p>Natriumacetat ble veid opp i begerglass, tilsatt dH₂O og pH justert med eddiksyre til 4,6. Deretter ble NaCl og ZnCl₂ tilsatt og løst opp på magnetrører før glycerol ble tilsatt og hele løsningen autoklavert ved 121°C i 15 min. Oppbevares i kjøleskap.</p>		
Reaksjonsbuffer til S1-nuklease		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Natriumacetat (6268; Merck, Darmstadt, Tyskland)	0,492 g	30 mM
NaCl (S0520.1000; Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	0,584 g	50 mM
ZnCl ₂ (8816.0259; Merck, Darmstadt, Tyskland)	0,1363 g	5 mM
dH ₂ O	200 ml	
<p>Natriumacetat ble veid opp i begerglass, tilsatt dH₂O og pH justert med eddiksyre til 4,5. Deretter ble NaCl og ZnCl₂ tilsatt og løst opp på magnetrører før løsningen ble autoklavert ved 121°C i 15 min. Oppbevares i kjøleskap.</p>		
S1-nuklease		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
S1-nuklease 315 000 U/ml (N5661: Sigma, Missouri, USA)	1 µl	10 U/ µl
Fortynningsbuffer til S1-nuklease	30,5 µl	
<p>Fortynningsbuffer ble tilsatt S1-nuklease og det hele godt blandet i et eppendorfrør før oppbevaring i -20°C.</p>		
TE-buffer x 10		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Tris ultrapure (T1501; Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	60,6 g	0,1 M
EDTA di-natriumsalt (S051423; Saveen, Malmø, Sverige)	18,6 g	0,01 M
dH ₂ O	5 liter	

Vedlegg 8h: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

S1-kutting		
EDTA		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
EDTA disalt (Sigma, Missouri, USA) dH ₂ O		0,5 M
EDTA løses i dH ₂ O på magnetrører. For 20 mM fortynnes 0,5 M i dH ₂ O.		
Tris-HCl		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Tris-base (T1501; Duchefa biochemie, Haarlem, NL) dH ₂ O	0,122 g 100 ml	10 mM
Tris løses opp i 75 ml dH ₂ O og pH justeres til 8,0 med konsentrert HCl. La stå to dager i ro før pH justeres til 8,0 nok en gang og juster volum til 100 ml. Autoklaveres ved 121°C i 15 minutter og oppbevares i romtemperatur.		

Konvensjonell agarosegel		
GRB-buffer x 10		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
TRIS (Tris hydroxymethylaminomethan) (T1501: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	1090 g	0,9 M
Borsyre (B0503: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	560 g	0,9 M
EDTA di-natriumsalt (S051423: Saveen, Malmø, Sverige)	93 g	25 mM
dH ₂ O	Til 10 liter	
Tørrstoff tilsettes ca 8,5 liter vann og løses under magnetrøring. pH justeres til 8,2 med 5 N HCl eller 5N NaOH og volum justeres til 10 liter. Blandes og fordeles på 500 ml flasker som autoklaveres. Holdbar 2 år i romtemperatur. Før bruk fortynnes en flaske 1:10 med dH ₂ O til en bruksløsning på x 1.		
Agarosegel		
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>
Agarose LE, Analytical grade (Promega, Madison, WI, USA) GRB-buffer x 1		0,7 % eller 0.8 %
Agarose has i GRB-buffer til ønsket konsentrasjon og løses ved koking. Avkjøles til ca 50 grader og helles i støpeform.		

Vedlegg 8i: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

Resistensbestemmelse og PFGE	
Fosfatbufret saltvann (PBS) (5 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
NaCl (S0520: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	40 g
Kaliumklorid (4936: Merck, Darmstadt, Tyskland)	1 g
Di-natrium-hydrogenphosphat-dihydrat (6580: Merck, Darmstadt, Tyskland)	7 g
dH ₂ O	5 liter
Tørrstoffene løses i 5 liter dH ₂ O ved magnetrøring. pH justeres til 7,3 for autoklaving ved 121 °C i 15 min. Holdbar i ett år ved 2-8 °C hvis ikke krystaller, sopp eller bunnfall.	

Seleksjons- og kontraseleksjonsmidler	
<i>Artikkel</i>	<i>Produsent</i>
Sulfamethoxazol, S7507	Sigma, Steinheim, Tyskland
Trimetoprim laktat, T0181	Duchefa biochemie, Haarlem, Nederland
Doxycyclin (tetracyclin)	Alpharma, Oslo, Norge
Kloramfenikol, C0378	Duchefa biochemie, Haarlem, Nederland
Kanamycin monosulfat, K0126.0025	Duchefa biochemie, Haarlem, Nederland
Pentrexyl (ampicillin)	Bristol-Myers-Squibb, Bromma, Sverige
Nalidixinsyre, N8878	Sigma, Steinheim, Tyskland
Ciprofloxacin, 17850	Fluka/Sigma, Steinheim, Tyskland
Streptomycin sulfat, S0148.0050	Duchefa biochemie, Haarlem, Nederland
Natriumazid, S2002	Sigma, Steinheim, Tyskland

Vedlegg 8j: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

Dyrkningsmedier	
Frysebuljong (brain-heart)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
Brain Heart Infusion (CM225: Oxoid, Basingstoke, England)	3,3 g
Glyserol (G1345: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	10 ml
dH ₂ O	90 ml
Brain Heart Infusion og vann blandes og settes i damper til alt er løst. Deretter tilsettes glycerol og blandingen sterilfiltreres. Fordeles aseptisk à 1 ml på 1,8 ml nunc-rør. Holdbart 1 år på kjølerom.	
Cystine lactose electrolyte deficient (CLED) agar (28 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
CLED Medium (DM110: Mast Laboratories, Merseyside, England)	1060 g
dH ₂ O	28 l
1 N NaOH (Substratseksjonen, as Telelab. Fra NaOH: S0523: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	Ca 150 ml
Alt blandes og autoklaveres ved 121 °C i 15 min. Avkjøles til 48 °C. pH måles og event. justeres til mellom 7,1 og 7,5. Helles opp i skåler à 23 ml. Holdbart 2 mnd.	
Isosensitivitetsagar (ISA) (1 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
Iso-sensitest agar (CM471: Oxoid, Basingstoke, England)	31,4 g
dH ₂ O	1 l
Blandes og autoklaveres ved 121 °C i 15 min. Avkjøles til 48 °C før pH måles og eventuelt justeres til mellom 7,2 og 7,6. Helles opp på skåler à 25 ml.	
Müller-Hinton (MH) agar (1 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
Mueller Hinton agar (CM 337: Oxoid, Basingstoke, England)	38 g
dH ₂ O	1 l
Blandes og autoklaveres ved 121 °C i 15 min. Avkjøles til 48 °C før pH måles og eventuelt justeres til mellom 7,3 og 7,5. Helles opp på skåler à 25 ml.	

Vedlegg 8k: Reagenser, utstyr, leverandører og oppskrifter.

Dyrkningsmedier	
LB-agar (1 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
Bacteriological Pepton (L37: Oxoid, Basingstoke, England)	10 g
Yeast Extract (212750/127: Difco, Sparks, MD, USA)	5 g
Natriumklorid (S0520: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	10 g
Agar Bacto (213010/140: Difco, Sparks, MD, USA)	20 g
Sterilt, dH ₂ O	1 l
1 N NaOH	5 ml
<p>Blandes på benk i 15 min og settes deretter i damper i 30 min. Blandes til løsningen er homogen, før pH måles og justeres til 7,0 - 7,4. Fordeles på to flasker à 500 ml, avkjøles til under 50 °C og autoklaveres ved 121 °C i 15 min. Holdbart 1 år på kjølerom.</p>	
LB-buljong (2 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
Bacteriological Pepton (L37: Oxoid, Basingstoke, England)	20 g
Yeast Extract (212750/127: Difco, Sparks, MD, USA)	10 g
Natriumklorid (S0520: Duchefa biochemie, Haarlem, NL)	20 g
Sterilt, dH ₂ O	2 l
1 N NaOH	14 ml
<p>Blandes på benk i 15 min og settes i damper i 15 min. pH måles og justeres til 7,0 – 7,4. Fordeles på flasker à 500 ml. Avkjøles til under 50 °C og autoklaveres ved 121 °C i 15 min. Holdbart 1 år på kjølerom.</p>	
Blodskål (human) (8 liter)	
<i>Reagens</i>	<i>Mengde</i>
Blood Agar Base Special (DM 101, Mast Laboratories, Merseyside, England)	312 g
dH ₂ O	8 l
1 N NaOH	35 ml
Humant fullblod	480 ml
<p>NaOH tilsettes vannet, før pulveret has oppi. Blandes og autoklaveres ved 121 °C i 20 min. Avkjøles til 45 °C før pH måles og justeres til 7,3 – 7,5. Deretter tilsettes romtemperert humant fullblod. Helles opp på skåler à 23 ml. Holdbart 4 uker.</p>	

