

Melanie Schreier

Vannforsyningens rolle for spredning av antibiotika-resistente bakterier og antibiotikaresistensgener i Norge.



Universitetet i Sørøst-Norge
Fakultet for teknologi, naturvitenskap og maritime fag
Institutt for natur, helse og miljø
Postboks 235
3603 Kongsberg

<http://www.usn.no>

© 2022 Melanie Schreier

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Bilde på forsiden viser vannforekomsten Vansjø – Storefjorden og er tatt fra Langøya av Melanie Schreier.

Forord

Min masteravhandling var en del av et toårig masterprogram i natur-, helse- og miljøvern ved Universitetet i Sørøst-Norge, avdeling Bø. Oppgaven besto i å vurdere vannforsyningens rolle for spredning av antibiotikaresistente bakterier og antibiotikaresistensgener i Norge. Masteroppgaven ble delfinansiert av Norsk Vann, og var et forarbeid for å gi innspill til om det er behov for å gjennomføre et større Norsk Vann prosjekt for å kartlegge antibiotikaresistens i norsk rå- og drikkevann.

I 2014 var jeg ferdigutdannet bioingeniør og har jobbet på to ulike mikrobiologiske laboratorier i totalt seks år. Interessen for resistensproblematikken fikk jeg allerede første året på jobb og har siden da deltatt på workshops, konferanser og kurs. Det å kunne forske på antibiotikaresistens i norsk miljø var et stort ønske da jeg begynte på masterutdanningen. Derfor en ekstra stor takk til Norsk Vann for at dere hadde tillit i meg og at jeg kunne bidra til deres spennende prosjekt.

Jeg vil takke min veileder Andrew Jenkins (Mikrobiologi/Bioteknologi, USN) for veldig god veiledning og tilbakemeldinger under PCR-metodeutvikling, skriveprosessen og laboratoriearbeid. Jeg vil videre takke min eksterne veileder Ingun Tryland (Rådgiver teknologiutvikling, Norsk Vann) for mange gode innspill underveis og gode råd gjennom skriveprosessen, særlig når det gjaldt drikkevannsproduksjon og -forskriften. Forslaget til Norsk Vann prosjektet kom blant annet fra Wolfgang Uhl (Aquateam COWI AS) som var min andre eksterne veileder og ønsker å takke han for innspill. Videre vil jeg takke Hans Jørgen Halvorsen (Sivilingeniør, MOVAR IKS) for all informasjon jeg fikk om Vansjø Vannverk og ikke minst at vannverket kunne bidra med prøver. Dessuten ønsker jeg å takke Sofie G. Sevatdal (Stipendiat, USN), Jorunn Hellekås (MSc, USN) og Jørn Henrik Sønstebo (Førsteamanuensis, USN) for hjelp ved sekvensering. Jeg ønsker også å takke Andreas Zedrosser (Professor, USN) for gode råd og tilbakemeldinger til de statistiske utfordringene. En stor takk rettes også til familien Klovholt for god hjelp med korrekturlesing, og ikke minst til akademisk skrivesenteret ved USN.

Til slutt en stor takk til min arbeidsplass mikrobiologisk avdeling på Sykehuset i Vestfold for at jeg fikk utføre filtrering, dyrkning og identifisering hos dere. En herlig gjeng som har stått på gjennom hele pandemien!

Melanie Schreier

Bø i Telemark, 17.05.2022

Forkortelser

ANOVA	Variansanalyse (engelsk: Analysis of variance)
ARB	Antibiotikaresistente bakterier
ARG	Antibiotikaresistensgener
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCUG	Culture Collection University Of Gothenburg
CFU	Kolonidannende enheter (engelsk: Colony forming units)
C_q	Kvantifiserings syklus (engelsk: Quantification cycle)
DDD	Definerte døgndoser
ESBL	Betalaktamaser med utvidet spektrum (engelsk: Extended spectrum betalactamase)
KI	Konfidensintervall
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MOVAR	Mosseregionen vann, avløp, og renovasjon
MRSA	Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
NORM	Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober
NORM-VET	Norsk overvåkingsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler
qPCR	Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (engelsk: Quantitative polymerase chain reaction)
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre (engelsk: Ribosomal ribonucleic acid)
UMI	Unik molekylær identifikator
UV	Ultrafiolett (engelsk: Ultraviolet)
VRE	Vankomycinresistente enterokokker
16S	Ribosomenes subenhet 16

Sammendrag

Norge har et lavt forbruk av antibiotika som gjenspeiles i den lave forekomsten av antibiotikaresistens blant befolkningen sammenlignet med andre land. Samtidig er antimikrobiell resistens lite undersøkt i det norske miljøet og per dags dato finnes det ikke noe data om omfanget av forekomsten av antibiotikaresistente bakterier (ARB) og antibiotikaresistensgener (ARG) i drikkevannet. Vannverks-eiere skal ha god kontroll for å hindre spredning av sykdomsfremkallende mikroorganismer, og det anslås at råvannsbeskyttelse og vannbehandling også hindrer spredning av antibiotikaresistens via drikkevannet. Denne antakelsen skulle testes med denne studien og hypotesen var at vannforsyningen spiller en minimal rolle for spredning av antibiotikaresistens i Norge.

I denne studien ble forekomsten av ti utvalgte genetiske markører for antibiotikaresistens undersøkt i rå- og drikkevann fra ett norsk vannverk ved hjelp av kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR). ARG som ble valgt koder for resistens mot klinisk relevante antibiotika: Betalaktamer (*CTX-M-15*, *CTX-M-27*, *CTX-M-32*, *TEM*, *OXA-48*, *OXA-58*), sulfonamider (*sul1*), tetrasykliner (*tetM*), glykopeptider (*vanA*) og polymyxiner (*mcr-1*). Det ble ikke påvist noen av de undersøkte genene i hverken rå- eller drikkevannet. Videre ble bakteriene i vannprøvene dyrket på non-selektive og selektive medier, identifisert med Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) og karakterisert med qPCR mot ti ARG. I råvannet vokste det gjennomsnittlig 2 244 kolonier/100 mL, mens det vokste gjennomsnittlig 1 koloni/100 mL i ferdig behandlet drikkevann. 25 ulike bakteriearter fikk en akseptabel identifikasjon, og levedyktige patogene bakterier ble ikke påvist i noen av prøvene, men opportunistisk patogene miljømikrober som *Stenotrophomonas maltophilia* i råvannet. Ingen av de 25 undersøkte isolatene fikk påvist noen av de ti utvalgte genetiske markørene for antibiotikaresistens. Basert på 16S/23S rRNA sekvensering ble det påvist indikatorbakterier for fekal forurensning (*Escherichia coli*, intestinale enterokokker og *Clostridium perfringens*). Til slutt ble også bakterieforekomsten i rå- og drikkevannet undersøkt ved både måling av DNA konsentrasjon og 16S rRNA qPCR. I løpe av vannbehandlingen ble DNA konsentrasjonen redusert med 99 %, og 16S rRNA gen-kopiantallet var under deteksjonsgrensen for 2 av 3 drikkevannsprøver.

Denne studien antyder at råvannskilden var lite belastet av klinisk relevante ARB og ARG, samt at vannbehandling på det undersøkte vannverket var svært gode både med henblikk på å fjerne/minimere levedyktige bakterier og DNA. Samlet sett støtter derfor arbeidet opp om hypotesen at vannforsyningen spiller en minimal rolle til spredning av antibiotikaresistens i Norge.

Abstract

Norway has a low consumption of antibiotics, which is reflected in the low incidence of antibiotic resistance among the population compared with other countries. At the same time, antimicrobial resistance has not been studied a lot in the Norwegian environment and there is no data on the extent of the presence of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in drinking water. Waterworks must have control to prevent the spread of disease-causing microorganisms and it is estimated that raw water protection and water treatment also prevent the spread of antibiotic resistance via drinking water. This assumption was to be tested with this study and the hypothesis was that the water supply plays a minimal role in the spread of antibiotic resistance in Norway.

In this study, the presence of ten selected genetic markers for antibiotic resistance was investigated in raw and drinking water from one Norwegian waterworks using a quantitative polymerase chain reaction (qPCR). ARG selected codes for resistance to clinically relevant antibiotics: Betalactams (*CTX-M-15*, *CTX-M-27*, *CTX-M-32*, *TEM*, *OXA-48*, *OXA-58*), sulfonamides (*sul1*), tetracyclines (*tetM*), glycopeptides (*vanA*) and polymyxins (*mcr-1*). None of the ten ARG were detected in either the raw or drinking water. Furthermore, the bacteria in the water samples were grown on non-selective and selective media, identified by Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) and characterized by qPCR against ten ARG. In the raw water, an average of 2 244 colonies/100 mL grew, while an average of 1 colony/100 mL grew in drinking water. 25 different bacterial species were given an acceptable identification and viable pathogenic bacteria were not detected in any of the samples, but opportunistically pathogenic environmental microbes such as *Stenotrophomonas maltophilia* in the raw water. None of the 25 isolates detected any of the ten ARG. Based on 16S/23S rRNA sequencing, indicator bacteria for fecal contamination (*Escherichia coli*, intestinal enterococci and *Clostridium perfringens*) were detected. Finally, the bacterial presence in the raw and drinking water was examined by measuring both DNA concentration and 16S rRNA qPCR. During the water treatment, the DNA concentration was reduced by 99 %, and the 16S rRNA gene copy number was below the detection limit for 2 of 3 drinking water samples.

This study suggests that the raw water source was little burdened by clinically relevant ARB and ARG, and that the water treatment at the investigated waterworks was good both in terms of removing/minimizing viable bacteria and DNA. Overall, therefore, the work supports the hypothesis that the water supply plays a minimal role in spreading antibiotic resistance in Norway.

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Forkortelser	III
Sammendrag.....	IV
Abstract.....	V
Innholdsfortegnelse	VI
1. Innledning.....	1
2. Bakgrunn.....	2
2.1. Drikkevann	2
2.1.1. Vannforsyningen og drikkevannskildene i Norge	2
2.1.2. Drikkevannsproduksjon i Norge	3
2.2. Antibiotika og antibiotikaresistens.....	5
2.2.1. Antibiotika og antibiotikagrupper	5
2.2.2. Naturlig og ervervet resistens	6
2.2.3. Antibiotikaresistente bakterier og gener som koder for resistensmekanismer	6
2.2.4. Seleksjon, resistensdrivere og utvikling av antibiotikaresistens	8
2.2.5. Spredningsveier av antibiotikaresistens	9
2.3. Epidemiologi og globale utfordringer	14
2.3.1. Forekomst av antibiotikaresistens i det norske samfunnet og i resten av verden	15
2.3.2. Forekomst av antibiotikaresistens i natur og miljø	21
3. Materialer og metoder	23
3.1. Valg og beskrivelse av vannverk og dens drikkevannskilde.....	23
3.2. Prøvetaking	26
3.3. Analysemetoder.....	26
3.3.1. Filtrering av vannprøver	28
3.3.2. Dyrkning, kvantifisering og identifisering av bakterier	30
3.3.3. DNA ekstraksjon og isolasjon	34
3.3.4. Kvantifisering av antibiotikaresistensgener og estimering av bakterieforekomsten ved qPCR.....	37
3.3.5. Påvisning og identifisering av bakterier ved sekvensering	47
3.4. Dataanalyse og statistiske metoder	53
4. Resultater	54
5. Diskusjon	62
6. Konklusjon	77
Referanseliste	VII
Vedlegg	XIV

1. Innledning

Antimikrobiell resistens er en global helsetrussel siden resistensutviklingen og spredningen av legemiddelresistente patogener går forttere enn ny legemiddelutvikling. Når legemidler ikke virker lenger innebærer det at infeksjoner er vanskeligere å behandle og resistente mikrober vil dermed kunne føre til økt sykkelighet og dødelighet. ([WHO, 2020](#))

I følge Verdens helseorganisasjon er feil bruk og overforbruk av antibiotika en viktig årsak til antibiotikaresistente bakterier (ARB), og spredningen av disse skyldes blant annet mangelen på tilgang til rent vann og sanitære forhold ([WHO, 2020](#)).

I de siste årene kom også ferdigbehandlet drikkevann i fokus som en mulig spredningsvei av antibiotikaresistens ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). Når drikkevannskilden er forurenset med for eksempel avrenning fra landbruk eller kloakk, kan det føre til økt konsentrasjon av ARB og antibiotikaresistensgener (ARG) i drikkevannssystemer ([Zhang et al., 2021](#)). Belastningen av råvannet og behandlingsprosessene er delvis ulikt i verden ([Zhang et al., 2021](#)), og ARB og/eller ARG ble funnet i avløpsvann ([Cacace et al., 2019](#)), råvannskilder ([Khan et al., 2020](#); [Voigt et al., 2020](#)), ferdigbehandlet drikkevann ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)) og springvann ([Khan et al., 2020](#)). I Norge ble det påvist ARG i avløpsvann og i elven Nitelva ([Schwermer & Uhl, 2021](#)).

Det er kun få studier om antibiotikaresistens i norsk miljø ([Simonsen et al., 2020](#)), og det er ikke blitt offentlig gjort noe forskning på ARB og/eller ARG i drikkevann i Norge. Imidlertid skal vannbransjen vurdere alle farer og disse skal håndteres og reduseres til et akseptabelt nivå ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)). Drikkevannsprodusentene har per i dag fokus på å hindre spredning av sykdomsfremkallende mikroorganismer og det anslås at dersom det er god kontroll på å hindre spredning av disse, så er det samtidig god nok kontroll for å hindre spredning av antibiotikaresistens med drikkevannet.

Målet med denne avhandlingen er dermed å vurdere vannforsyningens rolle for spredning av ARB og ARG i Norge også sett i forhold til andre spredningsveier. Vurderingen gjøres på grunnlag av tilgjengelig vitenskapelig litteratur og analysering av råvann og drikkevann fra et vannverk. Hypotesen er at det er ubetydelig spredning av ARB og/eller ARG via drikkevann i Norge.

2. Bakgrunn

For å kunne vurdere vannverkens rolle og vannforsyningens betydning for spredning av ARB og ARG i Norge, trengs det en forståelse for hvilke type drikkevannskilder som brukes, i hvilken grad disse er påvirket av fekal forurensning og hvordan drikkevannsproduksjonen foregår. Videre behøves det grunnleggende kunnskap om antibiotikaresistens, og da særlig med tanke på mulige spredningsveier av både ARB og ARG. I tillegg må det også sees på hvordan forekomsten av antibiotikaresistens er i Norge og i resten av verden.

2.1. Drikkevann

Drikkevann er vann som stilles strenge krav til i Norge for å sikre at det ikke utgjør en helserisiko ved drikking og ved bruk i matlaging. Krav som at det ikke skal inneholde sykdomsfremkallende mikroorganismer og at antall eller konsentrasjon av bakterier ikke skal utgjøre en helsefare, sikres i forskriften om vannforsyning og drikkevann. ([Drikkevannsforskriften, 2017](#))

2.1.1. Vannforsyningen og drikkevannskildene i Norge

Vannforsyningen er et system som sørger for at samfunnet har tilgang på rent vann. Systemet består vanligvis av at råvannet, vannet som brukes til produksjon av drikkevann, blir rensert på et vannverk. Derfra pumpes ferdigbehandlet drikkevann til et renvannsmagasin. I magasinene oppbevares drikkevannet frem til det fordeles videre til forbrukerne gjennom ledningsnettet. ([Norsk Vann, 2021](#))

Bransjeorganisasjonen Norsk Vann anslå at rundt 90 % av den norske befolkningen får drikkevannet fra ett av de i underkant 2000 vannverk, mens resten har egen brønn eller et mindre fellesanlegg ([Norsk Vann, 2021](#)). Vannverkene benytter seg av ulike typer vannkilder til drikkevannsproduksjon hvorav overflatevannkilder, som innsjøer og elver, utgjør det største volumet med 90 % ([Steinberg et al., 2021](#)). Grunnvannskilder er det mer av enn overflatevannkilder, men bidrar med mindre volum til drikkevannsproduksjon totalt sett ([Steinberg et al., 2021](#)). Dette skyldes at mindre samfunn ofte bruker borebrønner, mens de største byene forsynes fra store innsjømagasiner ([Steinberg et al., 2021](#)). Kommunene eier stort sett vannanleggene, der noen er organisert i interkommunale selskaper ([Norsk Vann, 2021](#)). Videre har kommunene ansvar for ledningsnettet som består av nesten 50 000 km med vannledninger ([Norsk Vann, 2021](#)).

I Norge er råvannskildene, vannforekomsten som råvannet hentes fra, lovbeskyttet mot forurensning. Der skal for eksempel vannverkseiere kartlegge mulige farer for forurensning og så planlegge nødvendige tiltak for å beskytte råvannskilden. I samarbeid med kommunen skal dermed vannverkseieren vurdere behovet for blant annet restriksjoner. Videre har kommunen plikt til å ta hensyn til drikkevann ved utarbeidelse av kommuneplan og reguleringsplaner. På samme måte skal fylkeskommunen ta hensyn når den utarbeider regionale planer. ([Drikkevannsforskriften, 2017](#))

Forurensning av drikkevannskilder kan skje på grunn av avløpsvann, kloakk, landbruk, bosetning og industri, samt bading og friluftsliv ved drikkevannskildene ([Andersen, 2016](#)). Generelt sett har overflatevann større fare for forurensning enn grunnvann ([Nester et al., 2019](#)) siden grunnvannet er under et tykt lag av beskyttende løsmasser eller leire ([Andersen, 2016](#)).

For å forhindre at sykdomsfremkallende mikrober finnes i drikkevannet skal drikkevannet passere hygieniske barrierer. Disse kan være naturlige eller konstruerte. I følge mattilsynets veiledning til drikkevannsforskriften er en naturlig hygienisk barriere at råvannet har en god kvalitet med få forurensningskilder og dypt vanninntak ([Mattilsynet, 2020](#)). En konstruert hygienisk barriere kan være i form av restriksjoner ved drikkevannskilden og i form av vannbehandling ([Mattilsynet, 2020](#)).

2.1.2. Drikkevannsproduksjon i Norge

Drikkevannsproduksjonen er prosessen fra råvann til ferdig behandlet drikkevann og følger krav som er gitt i drikkevannsforskriften. Forskriften sier blant annet at vannbehandlingen skal tilpasses forurensningsfarene som ble identifisert og etter råvannskvaliteten ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)).

Vannbehandlingsmetodene

Det finnes mange forskjellige prosesser for å behandle råvannet, og de viktigste vannbehandlingsmetodene som er brukt i Norge er filtrering og desinfisering.

- Ved filtrering kan kjemiske stoffer og mikroorganismer fjernes fra vannet som partikler ([Mattilsynet, 2020](#)). Filtreringsmetoder kan være basert på sandfiltrering og membranfiltrering som omvendt osmose, nanofiltrering, ultrafiltrering og mikrofiltrering ([Ødegaard et al., 2016](#)). Det er også vanlig i Norge å kombinere ulike former for kjemisk felling med påfølgende filtrering ([Mattilsynet, 2020](#)).

- Under desinfeksjonsprosessen inaktiveres mikroorganismer og dette er den viktigste hygieniske barrieren mot sykdomsfremkallende mikroorganismer i drikkevann. Desinfeksjonsmidler som benyttes er ultrafiolett lys (UV), klor og ozon ([Mattilsynet, 2020](#)).
 - UV-bestråling er den mest brukte metoden for desinfeksjon av vann i Norge ([Steinberg et al., 2021](#)) og inaktiverer både bakterier, virus og parasitter ([Mattilsynet, 2020](#)).
 - Klorering er fortsatt brukt hos noen vannverk ([Steinberg et al., 2021](#)) og var den tradisjonelle desinfeksjonsmetoden før UV-bestråling hadde tatt over ([Ødegaard et al., 2016](#)). Klor har en tilfredsstillende hygienisk barriere mot bakterier og virus, men er lite egnet for å inaktivere parasitter ([Mattilsynet, 2020](#)).
 - Ozonering er brukt i mindre grad som desinfeksjonsprosess i Norge ([Steinberg et al., 2021](#)), og kan gi en hygienisk barriere ovenfor bakterier og virus ([Mattilsynet, 2020](#)).

Kontroll av drikkevannskvalitet og grenseverdier

Etter vannbehandlingen skal ferdig produsert drikkevann ikke utgjøre en helsefare og drikkevannsforskriften angir hvor mange prøver som skal tas og hva grenseverdien er for de ulike parameterne ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)).

For at drikkevann holder drikkevannsforskriftens kvalitetskrav benyttes det blant annet indikatororganismer. *Escherichia coli* (*E. coli*) er vanlig forekommende i tarmen hos mennesker og mange dyr, og brukes som indikasjon på fekal forurensning ([Ødegaard et al., 2016](#)). Dersom *E. coli* påvises kan dette tyde på at det også finnes andre patogene mikroorganismer i vannet. *E. coli* og de andre fekale indikatorbakteriene (koliforme bakterier, intestinale enterokokker og *Clostridium perfringens*) benyttes dessuten for å dokumentere effektiviteten av vannbehandlingsprosessen ([Ødegaard et al., 2016](#)). I henhold til den norske drikkevannsforskriften skal drikkevannet ha mindre enn én *E. coli* koloni per 100 ml vann ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)).

Vannverkseiere har ansvar for at kravene i drikkevannsforskriften følges. Dersom drikkevannsprøven overskrider grenseverdien for en parameter skal årsaken til avviket undersøkes umiddelbart. Videre skal avviket rettes raskt, og vannverkseiere skal varsle abonnentene dersom avviket fører til at drikkevannet ikke er helsemessig trygt. Mattilsynet fører tilsyn med vannforsyningsystemene for å kontrollere at regelverket følges. ([Drikkevannsforskriften, 2017](#))

2.2. Antibiotika og antibiotikaresistens

Mikroorganismer som bakterier, virus og sopp kan forårsake infeksjonssykdommer hos mennesker og dyr ([Nester et al., 2019](#)). En fellesbetegnelse på medisin som har effekt på mikroorganismer kalles antimikrobielle midler, mens det omtales for antimikrobiell resistens dersom mikroorganismer er motstandsdyktige mot disse midlene ([WHO, 2020](#)). Det deles inn i antibakterielle-, antivirale- og antimykotiske midler ([Bennett et al., 2019](#)), og i denne oppgaven er fokuset på antibakterielle midler og resistensproblematikken.

2.2.1. Antibiotika og antibiotikagrupper

Antibakterielle legemidler deles inn i antibiotika og kjemoterapeutika, der antibiotika er kjemiske substanser som naturlig produseres av mikroorganismer, mens kjemoterapeutika blir fremstilt syntetisk ([Nester et al., 2019](#)). Betegnelsen antibiotika blir i dag ofte brukt for alle antibakterielle midler som brukes i behandling av infeksjoner fremkalt av bakterier.

Antibiotika ble oppdaget for rundt 100 år siden ([Durand et al., 2019](#)) og kan virke mot et bredt spekter av bakterier, mens andre typer virker kun mot et smalt spektrum ([Nester et al., 2019](#)). Videre klassifiseres disse om de kan hemme veksten til bakterier (bakteriostatisk virkning) eller drepe de (baktericid virkning), som igjen er avhengig av hvilke virkningsmekanisme antibiotika har på bakteriecellen ([Bennett et al., 2019](#)). Antibiotikagruppene betalaktamer og glykopeptider er for eksempel rettet mot den bakterielle celleveggen, mens polymyxiner er rettet mot cellemembranen ([Bennett et al., 2019](#)). Tetrasykliner er blant antibiotikagruppene som hemmer proteinsyntesen, og sulfonamider er rettet mot essensielle metabolske prosesser. Antibiotikagruppene kan videre deles inn i undergrupper ([Bennett et al., 2019](#)). Betalaktamantibiotika kan for eksempel deles inn i penicilliner, cefalosporiner, cefamyciner, monobaktamer og karbapenemer ([Nester et al., 2019](#)).

Nesten alle antibiotika som brukes i dag ble oppdaget før 1970 og utviklingen av nye virkestoffer har nærmest stoppet opp ([Durand et al., 2019](#)). For legemiddelindustrien er det ikke økonomisk lønnsomt lenger å finne nye typer antibiotika ([Nester et al., 2019](#)). Årsaken er blant annet at antibiotika skal gis i kortere perioder enn før og i tillegg kan bakteriene utvikle resistens mot antibiotika ([Nester et al., 2019](#)).

2.2.2. Naturlig og ervervet resistens

Antibiotikaresistens betyr at bakterier kan overleve og formere seg selv i nærvær av antibiotika, og mange bakterier har en naturlig, iboende, resistens ([Nester et al., 2019](#)). Resistensmekanismene var altså allerede til stede før antibiotika ble brukt i klinisk sammenheng, og ble til og med påvist i 30 000 år gamle bakterier fra permafrosten ([D'Costa et al., 2011](#)). Bakteriene videreføre genene via celledeling, vertikal genoverføring ([Sanseverino et al., 2018](#)).

Bakterier kan også utvikle resistens som kan skje spontant på grunn av mutasjoner i DNAet eller gjennom opptak av genetisk materiale via horisontal genoverføring ([Bennett et al., 2019](#)). Opptak av fremmed DNA kan skje ved at to bakterier er direkte forbundet med hverandre, og der både kromosomalt og ekstrakromosomalt DNA kan overføres ([Nester et al., 2019](#)). Prosessen kalles konjugasjon. En annen mekanisme for overføring av genetisk materiale er transduksjon der DNA fragmenter kan overføres via et bakteriofag ([Nester et al., 2019](#)). En tredje mekanisme er transformasjon. Ved denne tar bakterien opp fritt DNA-fragmenter fra miljøet ([Yuan et al., 2019](#)). De mest kompetente mikrobene kan ta opp fritt DNA uavhengig av kilden, mens noen arter kun tar opp DNA fra nære beslektete arter ([Nester et al., 2019](#)). Horisontal genoverføring skjer allikevel lettest mellom beslektede bakterier slik at miljøbakterier sannsynligvis er kilden til resistens hos beslektete patogene arter ([Bennett et al., 2019](#)). Ervervet resistens er årsaken til at antibiotikaresistens spres så raskt i mellom bakterier og gir de stor genetisk variasjon og tilpasningsdyktighet ([Nester et al., 2019](#)).

2.2.3. Antibiotikaresistente bakterier og gener som koder for resistensmekanismer

Bakterier finnes hos mennesker, dyr og i miljø, og hos alle typer kan det forekomme antibiotikaresistens ([WHO, 2020](#)). Mikrobene har trolig utviklet mekanismer for resistens mot naturlige antibiotika over tid ([Bennett et al., 2019](#)). Bakterier benytter seg av ulike typer resistensmekanismer, og resistensassosierte gener mot antibiotika betegnes som ARG ([Nester et al., 2019](#)). ARG brukes som genetiske markører for resistens både i overvåkning og i diagnostikken ([Peirano & Pitout, 2019](#)).

Resistente miljøbakterier kan være et reservoar for ARG, men påvirker sjelden helsen til mennesker ([Andersen, 2016](#)). Derfor er det ofte mer fokus på bakterier av klinisk betydning og resistens mot antibiotika som er viktige i infeksjonsbehandlingen. Infeksjoner forårsaket av patogene resistente bakterier er vanskeligere å behandle enn sensitive stammer ([Bennett et al., 2019](#)).

ARG som er av klinisk relevans er ofte plassert på mobile genetiske elementer, inkludert plasmider som er ekstrakromosomalt DNA. En bakteriecelle kan ha flere typer plasmider og på hvert plasmid kan det være flere ulike ARG. Hver av disse genene koder for resistensmekanismer mot antimikrobielle midler. ([Nester et al., 2019](#))

Deaktivering av antibiotika

En resistensmekanisme som bakterier kan bruke er produksjon av enzymer som bryter ned eller inaktiverer antibiotika ([Bennett et al., 2019](#)). Betalaktamaser er en stor familie av enzymer som kan produseres av både grampositive og gramnegative bakterier og resulterer i resistens mot betalaktamer ved å hydrolysere amidbindingen i betalaktamringen ([Bennett et al., 2019](#)). Den først kjente betalaktamasen var penicillinase som inaktiverer penicillin ([Bennett et al., 2019](#)). Andre betalaktamaser kan ha en mye mer utvidet substratspesifisitet og det er særlig plasmidmedierte bredspektrede betalaktamaser (ESBL) hos gramnegative bakterier som skaper en stor resistenstrussel spesielt på sykehus ([Peirano & Pitout, 2019](#)). CTX-M-betalaktamaser består av mer enn 220 forskjellige enzymer som er aktive mot cefotaksim og ceftriaxon, og der *CTX-M-15* og *CTX-M-27* koder for enzymer som i tillegg har økt evne til å hydrolysere ceftazidim ([Peirano & Pitout, 2019](#)). *TEM* koder for betalaktamaser som er i stand til å hydrolysere både penicilliner, tredjegerasjons cefalosporiner og monobaktamer ([Bennett et al., 2019](#)). *OXA* koder for karbapenemaser, som er betalaktamaser med aktivitet mot karbapenemer ([Hegstad et al., 2021](#)). Dette er viktige reserveantibiotika i behandling mot alvorlige infeksjoner, og karbapenemase produserende bakterier har i tillegg ofte andre mekanismer som gjør de resistente mot nesten alle antibiotika ([Nester et al., 2019](#)).

Endring av målsete

En annen resistensmekanisme bakterier kan bruke er å endre bindingsstedet til antibiotika, slik at legemidlet ikke kan bindes lenger og dermed ikke kan utøve effekt ([Nester et al., 2019](#)). Kolistin tilhører antibiotikagruppen polymyxiner ([Khan et al., 2020](#)) og bindes til lipid A som er tilstede i cellemembranen til gramnegative bakterier, som så igjen fører til økt permeabilitet og dermed celledød ([Li et al., 2020](#)). *mcr-1* koder for et enzym som fører til en modifisert lipid A slik at kolistin har mye lavere affinitet ([Li et al., 2020](#)).

Tilsvarende koder *sul-1* for en modifisert dihydropteroatsyntase (som er en katalysator i folsyresyntesen) og resulterer i at sulfonamider har lavere affinitet til enzymet ([Bennett et al., 2019](#)).

Med en lignende taktikk koder *tetM* for ribosomale beskyttelsesproteiner, som fester seg på det stedet der tetrasyklin skulle bindes. Dermed hindrer proteinene at tetrasyklin hemmer proteinsyntesen. ([Bennett et al., 2019](#))

Glykopeptidresistens hos bakterier skyldes også at bindingsstedet endres, men resistensmekanismen bygges på et helt sett med gener som er nødvendige for å få til en resistens ([Patel et al., 2000](#)). Det screenes ofte for spesifikke gener som er involvert som for eksempel *vanA* ([Patel et al., 2000](#)). Genet koder for en ligase som kobler sammen D-alanin med D-laktat, mens målmolekylet til glykopeptid-antibiotika er D-alanin-D-alanin-komplekset i celleveggen ([Patel et al., 2000](#)). Når for eksempel *Enterococcus spp.* (enterokokker) uttrykker *vanA*, har stammen fått en alternativ cellevegg og vil være motstandsdyktige både overfor virkestoffet vankomycin og teikoplanin ([Patel et al., 2000](#)). Vankomycinresistente enterokokker (VRE) er fryktet særlig på sykehus siden vankomycin brukes til behandling av hud-, sår- og bløtvevsinfeksjoner med meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) ([Nester et al., 2019](#)). Overføring av vankomycinresistens til disse allerede multiresistente bakteriene kan føre til at infeksjoner ikke kan behandles effektivt lenger ([Nester et al., 2019](#)).

Andre resistensmekanismer

I celleveggen kan det finnes integrerte membranproteiner, efflukspumper, som pumper antibiotika aktivt ut fra bakteriecellen, slik at de ikke får mulighet til å utøve noen virkning. Videre må noen antibiotika passere porinkanaler som sitter i celleveggen, og dersom bakterien endrer eller reduserer disse kanalene i antall vil dette føre til nedsatt opptak antibiotika. ([Bennett et al., 2019](#))

2.2.4. Selektering, resistensdrivere og utvikling av antibiotikaresistens

Bakterier og sopp kan produsere antibiotika og er utbredt i miljøet ([Bennett et al., 2019](#)). Antibiotika kan selektere for resistens ved at den har en bakteriostatisk eller baktericid virkning på de sensitive bakteriestammene ([Nester et al., 2019](#)). Videre kan antibiotika aktivere resistensmekanismer, øke forekomsten av mutasjoner og bidra til økt overføring av arvestoff mellom bakteriene ([Bennett et al., 2019](#)). Antibiotika kan dermed føre til at resistente stammer overlever og etter hvert vil dominere. For eksempel var mindre enn 3 % av *Staphylococcus aureus* (gule stafylokokker) stammer resistente mot penicillin da antibiotikumet ble introdusert på 1940-tallet ([Nester et al., 2019](#)). Stor forbruk og feilbruk av antibiotika i mange år (særlig i helsevesen, landbruk og miljø ([Holmes et al., 2016](#))) har ført til at de følsomme stammene er nærmest eliminert, slik at rundt 90 % av gule stafylokokker nå

er resistente mot penicillin ([Nester et al., 2019](#)). Det er altså en kjent sammenheng mellom høyt forbruk av antibiotika og økt forekomst av resistens ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). Videre blir antibiotika ikke fullstendig brytt ned i kroppen og utslipp gjennom kloakken medfører at legemidlene ender opp i naturen ([Voigt et al., 2020](#)). Nyere studier har vist at selv lave antibiotika konsentrasjoner kan ha betydning for utvikling av resistens ([Bengtsson-Palme & Larsson, 2016](#)).

Derimot antyder forskning at den raske spredningen av antibiotikaresistens ikke bare er knyttet til ervervet resistens, men ofte også er knyttet til spesifikke bakteriekloner og at disse også spres i fravær av det direkte seleksjonspresset. Et eksempel er CTX-M produserende *E. coli* med sekvenstypen 131. ([Peirano & Pitout, 2019](#)).

Det er videre dokumentert at andre stoffer enn antibiotika, som tungmetaller, desinfeksjonsmidler (som blant annet biocider) og andre legemidler også kan fremme utvikling av antibiotikaresistens ([Tronsmo et al., 2016](#)). Hva effekten av andre resistensdrivere enn antibiotika i miljøet betyr er fortsatt mangelfull i følge rapporten fra Folkehelseinstituttet som handler om kunnskapshull som er knyttet til antibiotikaresistens ([Simonsen et al., 2020](#)).

2.2.5. Spredningsveier av antibiotikaresistens

Mennesker har en stor mengde av mikroorganismer på og i kroppen der noen har en essensiell rolle for helsen ([Nester et al., 2019](#)). Hvor kolonisering av uønskede bakterier skjer er blant annet avhengig av hvilke mikrober man har kontakt med og hvordan ([Bennett et al., 2019](#)). Mulig kolonisering av ARB kan forekomme ved inntak, via sår eller slimhinner ([Döhla et al., 2020](#)), og ved direkte eller indirekte kontakt ([Bennett et al., 2019](#)).

MRSA for eksempel koloniseres på huden og i slimhinnen, og kan smittes ved direkte kontakt enten via hud og slimhinnen eller ved å ta på kontaminerte overflater ([Bennett et al., 2019](#)). Det er også påvist spredning av MRSA fra griser til mennesker rundt om i verden ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). Kolonisering av MRSA kan saneres, men prosessen er omfattende ([Folkehelseinstituttet, 2019a](#)).

Det er derimot mye større fokus på resistente patogene bakterier som har hovedreservoaret i tarmen til mennesker og dyr. Kolonisering av disse kan ikke behandles, men studier antyder at ervervete

multiresistente tarmbakterier kan forsvinne over tid ([Langford & Schwartz, 2018](#)). Smittemåten er i hovedsak fekal-oral smitte ([Folkehelseinstituttet, 2019a](#)), og smitekilden kan være forurenset mat og vann. Fekal forurensningen av mat kan for eksempel skje på grunn av dårlig håndhygiene. Vann kan imidlertid forurennes på svært mange måter.

Forurenset vann som kilde til antibiotikaresistens

Avløps-, rå- og drikkevann

Utviklingsland og da spesielt samfunn i landlige områder har verken renseanlegg for kloakken eller til drikkevannsproduksjonen, og avføring fra mennesker og dyr slippes ubehandlet ut til kilder som brukes som drikkevann ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). I de fleste industriland blir derimot kloakken rensert før det slippes ut, men antall mikrobene blir kun skikkelig redusert dersom avløpsvannet blir desinfisert ([Nester et al., 2019](#)). Selv om bakteriekonsentrasjoner blir redusert betraktelig vil anleggene ikke klare å fjerne alle bakteriene ([Schwermer et al., 2018](#)). I tillegg er det vanskeligere å fjerne gener fra avløpsvann enn bakterier på grunn av størrelsen ([Krzeminski et al., 2020](#)). Dermed kan avløpssystemet være en potensiell kilde for forekomsten og spredningen av ARB og ARG i akvatiske miljø ([Voigt et al., 2020](#)). Dersom råvannskilden har en stor fekal belastning er det videre utfordrende å ha tilstrekkelig nok med renseprosesser under drikkevannsproduksjonen ([Andersen, 2016](#)). Det er videre ikke bare avløpsvannet som kan gi økt belastning av råvannskilder, men også avføring fra dyr som lever i eller ved drikkevannskilden ([Sanseverino et al., 2018](#)). Avrenning fra overflaten av gjødslet mark bidrar også til økt forekomst av mikrober i råvannskilder ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). At belastningen av råvannet er så store at vannbehandlingen ikke fjerner mikrobene effektivt nok er én utfordring, en annen er at dersom anlegget som produserer drikkevann skulle svikte under renseprosessene ([Schwermer & Uhl, 2021](#)). Dersom svikten ikke oppdages med en gang kan dette også bidra til spredning av antibiotikaresistens ([Andersen, 2016](#)).

Det er imidlertid ikke bare fekal forurensning som bidrar til spredning av antibiotikaresistens. En annen type vannforurensning er avløpsvann fra industri, som kan drive resistens. I India for eksempel blir mesteparten av antibiotika produsert og det farmasøytiske avfallsvannet slippes uten tilstrekkelig behandling ut i elvene som brukes både til hygiene og som drikkevann ([Taneja & Sharma, 2019](#)). Antibiotika er i tillegg vanskelig å fjerne under drikkevannsbehandling og har dermed potensiale til å drive og spre resistens ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)).

En studie fra Kina viser også at til og med avanserte vannbehandlingsprosesser ikke effektivt kan fjerne ARG. Der ble det påvist *mcr-1* i drikkevann og forskerne har videre sett på om tilstedeværelsen av *mcr-1* i drikkevann kan overføres til tarmflora i mus. Først ble det isolert *Bacillus cereus*, som bærer *mcr-1*, fra springvann i Shanghai. Så ble bakterien tilført til drikkevannet til musene under kontrollerte forhold. Musene som var frie for *mcr-1* før eksperimentet fikk etterhvert påvist *mcr-1*. Videre ble forskerne overrasket over at *mcr-1* også ble funnet i *Enterococcus hirae* etter eksperimentet. Denne studien antyder dermed at drikkevann også kan spille en rolle i spredning av ARG og støtter videre at ARG kan overføres via horisontal genoverføring i tarmsystemet. ([Khan et al., 2020](#))

Vannledninger og biofilm

Smittespredning gjennom drikkevann kan også skje etter vannbehandlingen på grunn av et utett vannledningssystem der forurensningen suges inn ved undertrykk ([Mattilsynet, 2020](#)). En annen utfordring med ledningsnettene er at det kan dannes et innvendig belegg, biofilm, i rørene ([Andersen, 2016](#)). Biofilmen oppstår ved at mikroorganismer fester seg på overflaten ([Nester et al., 2019](#)) og disse som har ferskvann som naturlig voksested har evnen til å etablere seg i vannledninger ([Andersen, 2016](#)). Dersom vanntemperaturen er lavt nok (under 10 °C) og det er lite næring tilgjengelig i vannet, vil det derimot være vanskelig for patogene bakterier å formere seg ([Andersen, 2016](#)). Biofilm viser seg også å være et utmerket miljø for horisontal genoverføring ([Zhang et al., 2021](#)). Noe som kan fremme beleggdannelsen er avsetning av kalk i vannledninger ([Andersen, 2016](#)). Dermed har områder med kalkrikt vann ofte mer problemer med biofilm, men i følge Folkehelseinstituttet er dette sjelden et problem i Norge ([Andersen, 2016](#)). Enda mer gir plast et godt vekstmiljø for biofilm ([Simonsen et al., 2020](#)) og mange vannrør i Norge er laget av plast ([Steinberg et al., 2021](#)). Forbrukere oppdager at det er biofilm i ledningsnettene ved at fargen på vannet er endret og at det kan lukte og smake vondt. Har biofilmdannelsen kommet veldig langt vil det også kunne oppdages av vannprodusenten ved at kimtall i vannet øker ([Andersen, 2016](#)). Biofilmen består av et helt samfunn av mikroorganismer som er innkapslet i en matriks av ekstracellulære polymere forbindelser som blant annet polysakkarider og DNA ([Nester et al., 2019](#)). Denne matriksen beskytter bakteriene mot antibiotika og desinfeksjonsmidler ([Nester et al., 2019](#)), og kan dermed være en utfordring for vannforsyningen. I Norge spyles fordelingsnettene når det er behov ([Andersen, 2016](#)).

Næringsmiddel

Kontaminert drikke og mat kan være en spredningsvei for antibiotikaresistens ([Simonsen et al., 2020](#)), men også dyr som brukes i matproduksjon kan være et reservoar for multiresistente bakterier ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). ARB i næringskjeden kan dermed potensielt ha en innvirkning på resistensutviklingen i menneskelige bakteriepopulasjoner ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). Forekomsten av antimikrobiell resistens hos dyr i Norge er på et relativt lav nivå ([Simonsen et al., 2020](#)), men det har blitt påvist ARG i svinekjøtt i blant annet USA, Vietnam og i Europa ([Cacace et al., 2019](#)). Videre har *mcr-1* blitt identifisert i isolater fra dyr og matvarer over hele verden ([Khan et al., 2020](#)). I tillegg bidrar også bruk av antibiotika i landbruket (for å fremme veksten av dyr) til utvikling av antibiotikaresistens ([Sanseverino et al., 2018](#)).

Miljø

I tillegg til den direkte eksponeringen for ARB og ARG via mat og vann finnes det også en indirekte spredningsvei via miljøet. Det er anerkjent at patogene bakterier spres ved utilstrekkelig kloakkinfrastruktur, fekal forurensning av vann eller organisk gjødsel ([Larsson et al., 2018](#)). Videre finnes det bakterier naturlig i alle miljøer og kan ha en iboende resistens ([Nester et al., 2019](#)). Blir et miljø i tillegg utsatt for resistensdrivere, ARB og/eller ARG kan dette føre til at miljøet blir et reservoar og at antibiotikaresistens kan overføres fra miljøet til klinisk relevante bakterier ([Simonsen et al., 2020](#)). Det antas for eksempel at jordbakterien *Paenibacillus popilliae* har bidratt til den høye forekomsten av VRE i USA ([Patel et al., 2000](#)). Bakterien har en iboende resistens overfor vankomycin og i mer enn 50 år ble mikroben brukt som insektdrepende middel i jordbruket i USA ([Patel et al., 2000](#)). Det mistenkes at *vanA* fra miljøbakterien ble overført via horisontal genoverføring til patogene bakterier som enterokokker ([Patel et al., 2000](#)).

En mindre nasjonal studie antyder forsiktig også en sammenheng mellom forekomsten av ARB i det akvatiske miljøet, kolonisering av disse bakteriene i tarmen hos eksponerte mennesker, samt infeksjoner hos disse personer ([Jørgensen et al., 2017a](#)). Dette styrkes også av en internasjonal studie der bading i innsjøer og elver med høyere forekomst av ARB, ARG og/eller andre resistensdrivere kan bidra til spredning ([Döhla et al., 2020](#)). Derimot påpeker en artikkel i *Environment International* at omfanget av helsepåvirkningene som følge av miljøeksponering for ARB er uklar, og at gode kvantitative data er avgjørende for å kunne tilskrive en økt sykdomsbyrde også sett i forhold til andre eksponeringsveier ([Larsson et al., 2018](#)).

Det er fremdeles et stort kunnskapsbehov for hvilken rolle miljøet spiller for utvikling og spredning av ARB og ARG ([Simonsen et al., 2020](#)). Det er lite forståelse om hvordan antibiotikaresistens spres i mellom miljøet og da inkludert ville dyr, mennesker og husdyr ([Simonsen et al., 2020](#)). For å få økt kunnskap og ikke minst bedre forståelse har WHO introdusert antibiotikaresistens-problematikken som en helhet (En helse perspektiv) der helsen til mennesker må sees i sammenheng med dyr og miljø ([WHO, 2021](#)). Dette perspektivet er nødvendig fordi bakterier og bakteriegener ofte har evnen til å bevege seg i mellom alle de tre faktorene ([Larsson et al., 2018](#)).

Globalisering og internasjonal reisevirksomhet

Godt dokumentert er derimot at globalisering og internasjonal reisevirksomhet bidrar svært mye til spredning av multiresistente mikrober over hele verden ([Simonsen et al., 2020](#)). Det er flere studier som indikerer at risikoen for å bli kolonisert av ARB øker dersom man reiser til et sted med høy forekomst av antibiotikaresistens ([Langford & Schwartz, 2018](#)). I oversiktsartikkelen til Langford & Schwartz 2018 påpeker de en større studie der 75 % av reisende ble bekreftet kolonisert med ESBL etter hjemkomst fra Sør-Asia ([Langford & Schwartz, 2018](#)). Et viktig poeng fra den påpekte studien var også at median til varighet av kolonisering etter reise var 30 dager, men at rundt 11 % forble kolonisert etter 12 måneder ([Langford & Schwartz, 2018](#)). Risikoen for kolonisering av multiresistente mikrober er enda høyere for personer som måtte oppsøke helsehjelp, og da særlig i land med høy antibiotikaresistens forekomst ([Langford & Schwartz, 2018](#)). Det samme gjelder også dersom reisende oppsøker tannhelsetjeneste i land utenfor Norden ([Simonsen et al., 2020](#)).

Videre er det ikke bare koloniserte enkeltpersoner som reiser eller migrer som kan være kilden til spredning av antibiotikaresistens, men også handel og import av matvarer ([Simonsen et al., 2020](#)).

Smittevern

Dårlig smittevern i helsetjenester, samt dårlig infeksjon- og sykdomsforebygging kan også bidra til spredning ([WHO, 2020](#)). I Norge screenes det pasienter som skal legges inn på sykehus for MRSA, ESBL og VRE dersom pasienten ha vært innlagt i helseinstitusjon utenfor Norden det siste året eller som oppfyller andre kriterier som er oppgitt i smittevernveilederen ([Folkehelseinstituttet, 2019a](#)). Videre screenes helsearbeider for MRSA hvis den ha jobbet eller ha fått behandling ved en helseinstitusjon utenfor Norden ([Folkehelseinstituttet, 2019a](#)).

2.3. Epidemiologi og globale utfordringer

Antibiotikabruk

Feilbruk og alt for høyt antibiotikabruk er en svært stor utfordring globalt sett ([Nester et al., 2019](#)). Befolkningen mangler ofte kunnskap om riktig antibiotikabruk, og feilbruk kan selektere for ARB blant normalfloraen, som så igjen kan bli et reservoar for ARG med potensialet for overføring til en infeksjons patogen ([Nester et al., 2019](#)). Ubegrenset og lett tilgang til antibiotika i mange land forsterker feilbruken ([Nester et al., 2019](#)). I Norge har den totale bruken av antibiotika gått ned etter strenge strategier for å bekjempe spredning av antibiotikaresistens ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). Dermed har Norge et forholdsvis lavt forbruk av antibiotika både i næringsmiddelindustrien, veterinær- og humanmedisinen ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). I 2017 var antibiotika til systemisk bruk hos mennesker 14,37 definerte døgndoser (DDD) per 1000 innbyggere per døgn i Norge som er mye lavere enn sammenlignet med 32,5 DDD per 1000 innbygger per døgn i Hellas det samme året ([Bruyndonckx et al., 2021](#)). I 2020 har tallet gått enda mer ned til 11,5 definerte døgndoser per 1000 innbyggere per døgn i Norge for antibiotika til systemisk bruk ([NORM/NORM-VET, 2021](#)).

Tilgang til rent vann

En annen global utfordring er tilgang til rent vann. I Norge har 99 % av befolkningen tilgang til rent og trygt drikkevann ([Steinberg et al., 2021](#)), mens tilgangen på rent vann til drikke og hygiene, samt gode sanitære forhold er fremdeles en stor utfordring over store deler av verden. WHO og UNICEF anslår at om lag 1 av 4 mennesker i verden manglet tilgang til trygt kontrollert drikkevann i 2020 ([WHO & UNICEF, 2021](#)). Dette utgjør hele 2 milliarder mennesker og hvorav 122 millioner drakk overflatevann ([WHO & UNICEF, 2021](#)). Videre manglet nesten halvparten av verdens befolkning akseptable sanitære forhold i 2020 ([WHO & UNICEF, 2021](#)).

Urbanisering

Urbanisering er også en utfordring over store deler av verden. De forente nasjoner anslår at innen 2050 vil hele 70 % av verdens befolkning bo i urbane strøk ([FN, 2021](#)). Rask urbanisering kan skape miljøproblemer og det anslås at rundt 890 millioner mennesker bor i urbane fattige områder i 2020 ([FN, 2021](#)). I Norge bodde allerede rundt 82 % av den norske befolkningen i tettsteder i 2021 ([Statistisk sentralbyrå, 2021b](#)). Norge har ikke såkalte slumområder med dårlige boforhold, men utfordring med byer som vokser er at det skapes blant annet press på drikkevannssystemer og det vil være større behov for å beskytte råvannkildene ([Andersen, 2016](#)).

2.3.1. Forekomst av antibiotikaresistens i det norske samfunnet og i resten av verden

Antibiotikaresistens er en viktig samfunnsutfordring over hele verden. WHO anslår at det er rundt 700 000 dødsfall per år som følge av resistente mikrober, og at tallet kan stige til 10 millioner innen 2050 ([IACG, 2019](#)). En studie publisert i *The Lancet* anslår at det dør rundt 33 000 personer hvert år i Europa av infeksjoner som ikke kan behandles ([Cassini et al., 2019](#)). Den samme studien estimerer videre at det årlig dør 69 mennesker i Norge av antibiotikaresistente bakterier ([Cassini et al., 2019](#)). Nøyaktige tall som knytter død mot antibiotikaresistens finnes ikke siden antibiotikaresistens ikke har en egen kategori i det norske dødsårsaksregisteret. I følge bokforfatteren Erik Martiniussen fikk 8 446 pasienter i Norge påvist en infeksjon av en resistent bakterie i perioden 2007–2018 ([Martiniussen, 2021](#)). 216 av disse pasientene døde mindre enn 30 dager senere, der tallet for 2018 var 14 dødsfall ([Martiniussen, 2021](#)). Selv om tallene er usikre har Norge et forholdsvis lavt antall med døde som kan relateres til infeksjoner med resistente mikrober sammenlignet med andre land. I studien som ble publisert i *The Lancet* ble det estimert at i underkant av 11 000 mennesker dør hvert år i Italia som følge av infeksjoner med ARB og tallet for Hellas er rundt 1 600 dødsfall ([Cassini et al., 2019](#)). At tallene varierer kan forklares med at forekomsten av antibiotikaresistens er ulik over hele verden. WHO har i 2015 introdusert et globalt overvåkingssystem for antimikrobiell resistens som er et viktig verktøy for å vurdere spredningen av antibiotikaresistens og overvåke virkningen av lokale, nasjonale og globale strategier ([WHO, 2021](#)).

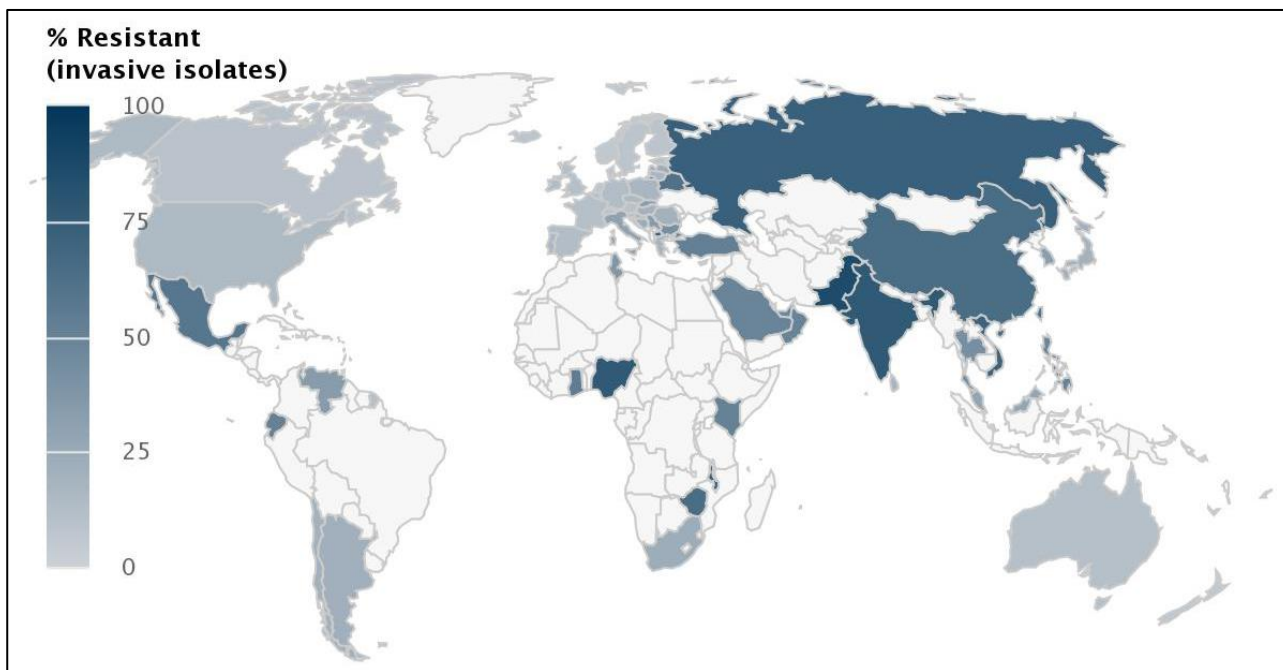
Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae er en stor og mangfoldig familie i orden *Enterobacterales*, med over 30 slekter og 120 identifiserte arter ([Rock & Donnenberg, 2014](#)). Det er ti slekter som er av klinisk interesse der noen eksempler er *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* og *Serratia* ([Rock & Donnenberg, 2014](#)). Videre er det forholdsvis få arter (mindre enn 25 arter) som kan gi infeksjoner ([Rock & Donnenberg, 2014](#)), men likevel nevnes ofte hele familien og noen ganger også orden når det grupperes og omtales et spesifikt resistensmønster.

ESBL-produserende Enterobacteriaceae

Produserer medlemmer av familien *Enterobacteriaceae* ESBL, er stammene resistente mot en hel rekke av betalaktamantibiotika ([Folkehelseinstituttet, 2019a](#)).

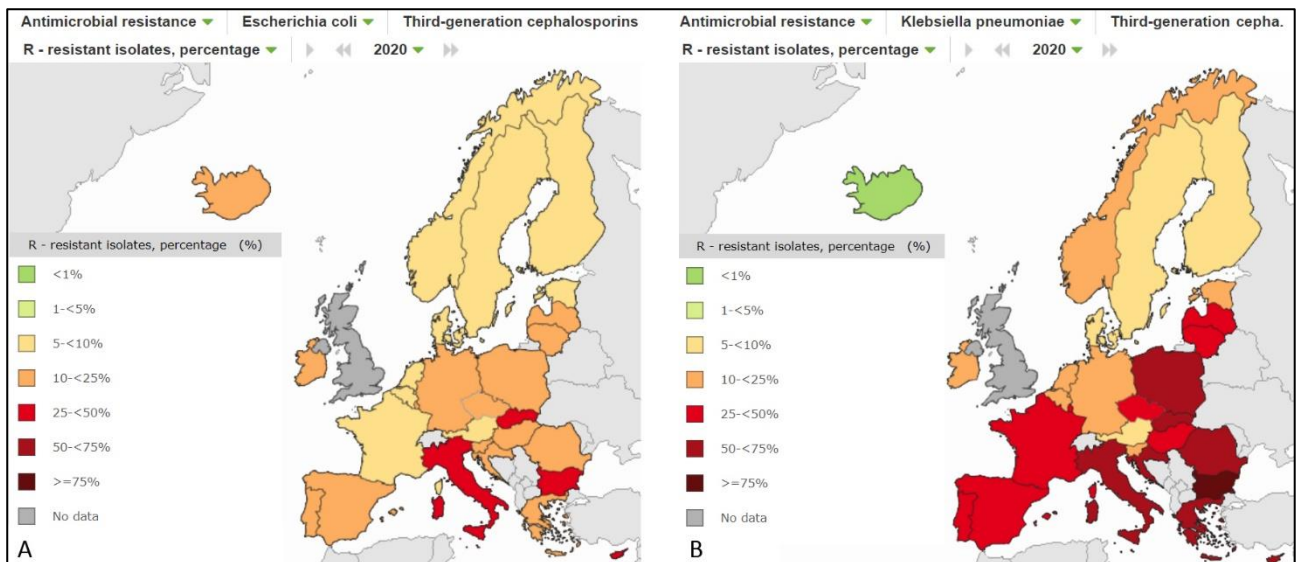
E. coli kan forårsake urinveisinfeksjon, gastroenteritt og sepsis ([Bennett et al., 2019](#)), og resistens hos *E. coli* mot cefalosporiner har spredt seg til alle regioner i verden. Figur 2.1 viser at fra de 109 landene som rapporterer data til WHO's overvåkingssystem ([WHO, 2021](#)) hadde Pakistan den største andelen av resistente *E. coli* mot tredje generasjons cefalosporiner med 86 % i 2017 ([CDDEP, 2022](#)). Norge hadde i samme året 6 % med cefalosporinresistente *E. coli* stammer i invasive isolater ([CDDEP, 2022](#)).



Figur 2.1: Prosentvis andel av resistente *Escherichia coli* mot tredje generasjons cefalosporiner i invasive isolater fra store deler av verden. Dataene inkluderer isolater fra blod og spinalvæske fra inneliggende pasienter i alle aldre. Figuren er hentet fra The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ([CDDEP, 2022](#))

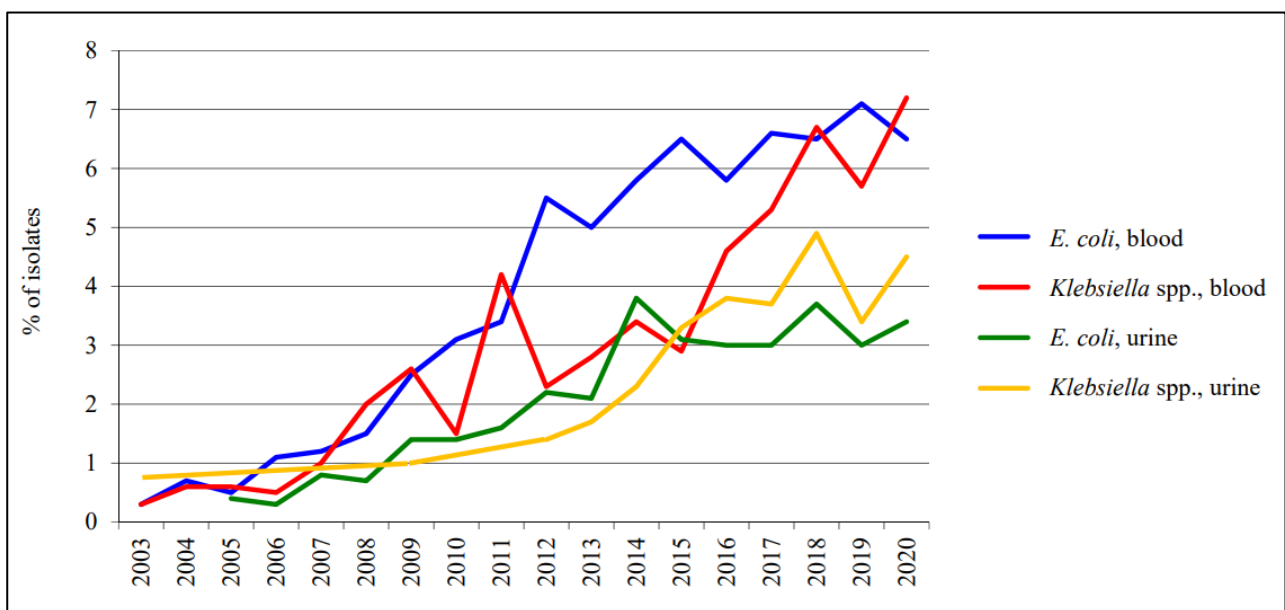
Sett i Europa har Bulgaria høyest forekomst (41 %) og Norge lavest forekomst (6 %) av resistente *E. coli* isolater mot tredje generasjons cefalosporiner i 2020 (figur 2.2-A) ([ECDC, 2020](#)).

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) er også vanlige tarmbakterier og kan gi sepsis, sårinfeksjoner, infeksjoner i respirasjonstrakt og i urinveiene ([Nester et al., 2019](#)). Forekomsten av resistens mot tredje generasjons cefalosporiner hos *K. pneumoniae* var enda høyere enn hos *E. coli*. Egypt rapporterte i 2017 om 98 % resistente *K. pneumoniae* stammer i invasive isolater fulgt av Zambia med 94 % ([CDDEP, 2022](#)). I Norge ble det meldt om 7 % cefalosporinresistente *K. pneumoniae* stammer i 2017 ([CDDEP, 2022](#)) og 10 % i 2020 ([ECDC, 2020](#)). I Sør-Europa er forekomsten høy som figur 2.2-B illustrerer ([ECDC, 2020](#)).



Figur 2.2: Prosentvis forekomst av resistente *Escherichia coli* (A) og *Klebsiella pneumoniae* (B) mot tredje generasjons cefalosporiner i invasive (blod og cerebrospinalvæske) isolater fra Europa i 2020. Figuren er hentet fra European Centre for Disease Prevention and Control og modifisert av Melanie Schreier. ([ECDC, 2020](https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-reports/2020-report))

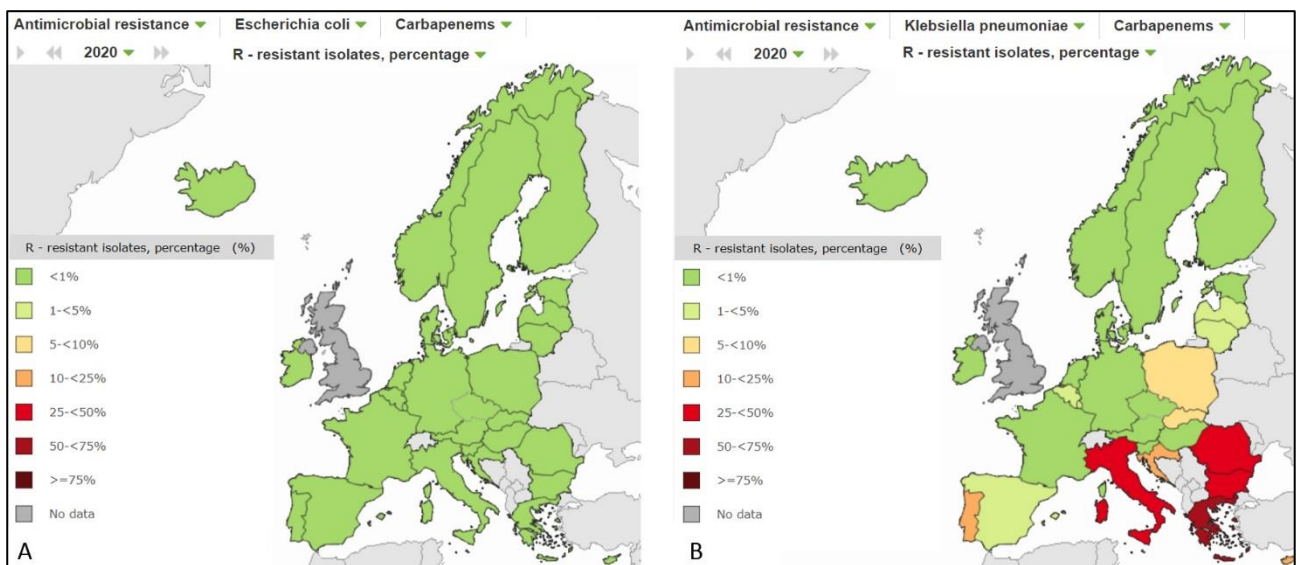
I 2019 var den samlede rapporterte medianen av resistensandelen mot tredje generasjons cefalosporiner fra 109 land mellom 40 og 50 % for sepsis forårsaket av *K. pneumoniae* og urinveisinfeksjon forårsaket av begge *E. coli* og *K. pneumoniae* ([WHO, 2021](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)). Selv om forekomsten av ESBL-produserende *Enterobacteriaceae* fremdeles er relativt lav i Norge i forhold til andre land så viser figur 2.3 at den har steget kraftig i de siste 10 til 15 år ([NORM/NORM-VET, 2021](https://www.norm-norm-vet.no/rapport-2020)).



Figur 2.3: Forekomst av ekstendert spektrum betalaktamase (ESBL) produksjon blant *Escherichia coli* og *Klebsiella* spp. isolert fra blod og urin i Norge 2003-2020. Grafikken er hentet fra NORM/NORM-VET rapporten 2020. ([NORM/NORM-VET, 2021](https://www.norm-norm-vet.no/rapport-2020))

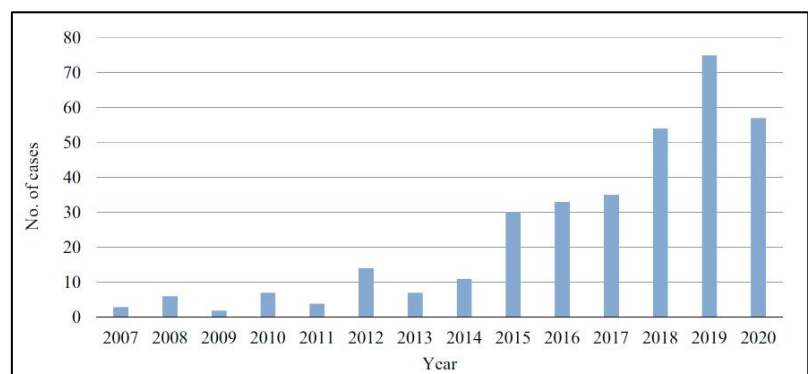
Karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae*

Infeksjoner forårsaket av *Enterobacteriaceae* som er resistente mot karbapenemer er vanskelig eller helt umulige å behandle ([Nester et al., 2019](#)). Disse multiresistente bakteriene har ikke spredd seg like mye i verden enda og forekomsten varierer fra 0 % til 18 % for *E. coli* og fra 0 % til 72 % for *K. pneumoniae* i invasive isolater i 2017 ([CDDEP, 2022](#)). I Europa er det påvist svært lite karbapenemase-produserende *E. coli* (figur 2.4-A), mens 66 % av invasive *K. pneumoniae* isolater i Hellas var karbapenem resistente i 2020 (figur 2.4-B) ([ECDC, 2020](#)).



Figur 2.4: Prosentvis forekomst av karbapenemase-produserende *Escherichia coli* (A) og *Klebsiella pneumoniae* (B) i invasive (blod og cerebrospinalvæske) isolater fra Europa i 2020. Figuren er hentet fra European Centre for Disease Prevention and Control og modifisert av Melanie Schreier. ([ECDC, 2020](#))

Meldte tilfeller av karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* til meldingsystemet for smittsomme sykdommer (MSIS) har økt i Norge fra 2013 til 2019, men hadde en nedgang fra 2019 til 2020 som figur 2.5 illustrerer ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). I 2020 fikk 57 personer påvist karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* som er en reduksjon fra 75 personer i 2019 ([NORM/NORM-VET, 2021](#)).



Figur 2.5: Antall påviste tilfeller med karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* i Norge 2007-2020. Grafikken er hentet fra NORM/NORM-VET rapporten 2020. ([NORM/NORM-VET, 2021](#))

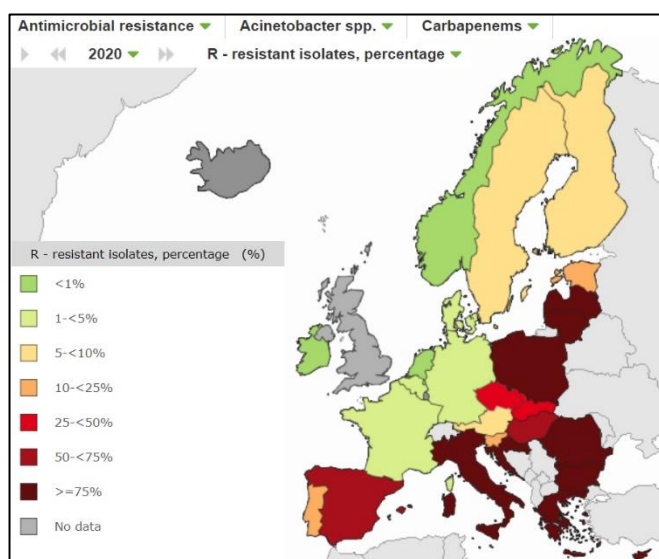
Kolistin resistens

Kolistin er det eneste siste reserveantibiotikumet for behandlingen av livstruende infeksjoner forårsaket av karbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (Khan et al., 2020). Bakterier som er resistente mot polymyxiner er påvist i flere land som Pakistan, Saudi-Arabia, Kina, India og Russland (CDDEP, 2022). I 2020 ble det i Norge påvist to isolater (*K. pneumoniae* og *Enterobacter spp.*) med et overførbart kolistinresistensgen (*mcr-9.1*) fra en pasient, men isolatene var fenotypisk følsomme for kolistin (Hegstad et al., 2021).

Karbapenem-resistente *Acinetobacter*

Acinetobacter tilhører familien *Moraxellaceae* og orden *Moraxellales* (Schoch et al., 2020), og finnes vidt spredt i naturen (Bennett et al., 2019).

Acinetobacter er et relativt nytt patogen som kan forårsake sykehusinfeksjoner (WHO, 2021). Medianen av karbapenem-produserende *Acinetobacter spp.* i blodbane-infeksjoner fra 109 land var på 66 % (WHO, 2021). I Europa varierer forekomsten av karbapenem-resistente *Acinetobacter spp.* kraftig som figur 2.6 viser, og hvorav Kroatia med 96 % har høyest utbredelse, fulgt av Hellas med 95 % i 2020 (ECDC, 2020). 2019 ble det i Norge påvist 23 tilfeller og i 2020 10 tilfeller av karbapenemase-produserende *Acinetobacter spp.* (Hegstad et al., 2021).

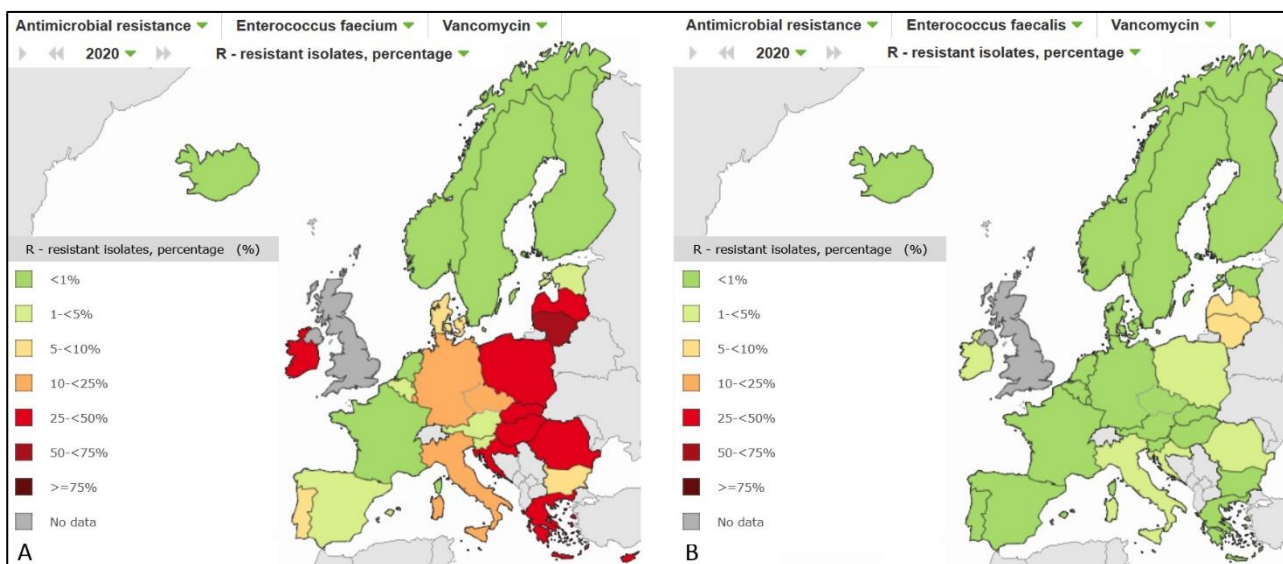


Figur 2.6: Prosentvis forekomst av karbapenem-produserende *Acinetobacter spp.* fra invasive (blod og cerebrospinalvæske) isolater fra Europa i 2020. Figuren er hentet fra European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC, 2020)

VRE

Enterokokker tilhører familien *Enterococcaceae* og orden *Lactobacillales* (Schoch et al., 2020), og er en del av den normale tarmfloraen (Bennett et al., 2019). Enterokokker kan være årsak til infeksjoner i sår, urinveisinfeksjoner og sepsis, der *Enterococcus faecalis* og *Enterococcus faecium* er av størst klinisk interesse (Folkehelseinstituttet, 2019a). Enterokokker er naturlig resistente mot mange antibiotika og VRE er resistente mot nesten alle antimikrobielle midler (Nester et al., 2019).

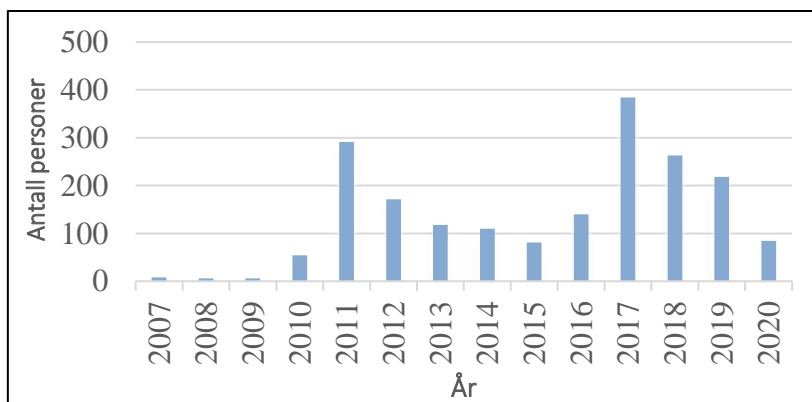
I USA, Argentina og Australia er forekomsten av vankomycinresistente *Enterococcus faecium* høyest med henholdsvis 68, 69 og 50 % i invasive isolater ([CDDEP, 2022](#)). I Europa varierer forekomsten som figur 2.7-A illustrerer, og der Litauen med 57 % har høyest utbredelse av *Enterococcus faecium* i invasive isolater i 2020 ([ECDC, 2020](#)). Vankomycinresistente *Enterococcus faecalis* er mindre utbredt i Europa, der Litauen og Latvia har høyest forekomst av disse stammene i invasive isolater i 2020 med henholdsvis 7 og 6 % (figur 2.7-B) ([ECDC, 2020](#)).



Figur 2.7: Prosentvis forekomst av vankomycinresistente *Enterococcus faecium* (A) og *Enterococcus faecalis* (B) i invasive (blod og cerebrospinalvæske) isolater fra Europa i 2020. Figuren er hentet fra European Centre for Disease Prevention and Control og modifisert av Melanie Schreier. ([ECDC, 2020](#))

I Norge ble det rapportert at 10 blodkulturisolater hadde VRE i 2020, men at ingen av dem hadde en overførbart vankomycinresistens. Isolatene var *Enterococcus gallinarum* (n=6) og *Enterococcus casseliflavus* (n=4) som har en iboende resistens mot vankomycin på grunn av *vanC*. Selv om overførbart vankomycinresistens

ikke har etablert seg i kliniske enterokokkisolater enda, har det forekommet utbrudd på forskjellige steder i Norge i de siste årene. Dette gjenspeiles også ved at innmeldte tilfeller av VRE til



MSIS har variert kraftig i de siste 10 årene som figur 2.8 viser. ([NORM/NORM-VET, 2021](#))

Figur 2.8: Antall personer med vankomycinresistente enterokokker (VRE) meldt til meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) 2007-2020 ([Folkehelseinstituttet, 2021b](#)).

2.3.2. Forekomst av antibiotikaresistens i natur og miljø

Resistente bakterier både med iboende og ervervet antibiotikaresistens er tilstede i miljøet ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)) og selv om det er ingen krav til overvåkning peker studier på en økning på forekomsten av antibiotikaresistens i miljøet ([Simonsen et al., 2020](#)). Fra 2015 til 2020 ble ARB studert i ulike norske økosystemer og på utvalgte dyr med ulik grad av eksponering av antibiotika ([Miljødirektoratet, 2018](#)). Gjennom femårsperioden ble det frembrakt noe kunnskap, men totalt sett er det begrenset data om forekomst av ARB og ARG i norsk natur ([Simonsen et al., 2020](#)).

Akvatiske miljø

Globalt sett ble ARG påvist i ulike akvatiske miljø ([Zhang et al., 2021](#)). En nyere europeisk studie, som inkluderte ti europeiske land, fant seks av de ni analyserte ARG i alle avløps- og elvevannsprøver ([Cacace et al., 2019](#)). I Tyskland ble det funnet både ARG og ARB i innsjøer og elver der det bades i ([Döhla et al., 2020](#)), og i India ble det rapportert om en veldig høy forekomst av multiresistente bakterier i forskjellige vannkilder ([Taneja & Sharma, 2019](#)). De to største elvene i India, Ganges og Yamuna, hadde en andel av ESBL-produserende bakterier (*NDM-1* og *OXA48*) på 17,4 % blant gramnegative bakterier ([Taneja & Sharma, 2019](#)). Videre var alle undersøkte *E. coli* isolatene (n = 283) fra den sørindiske elven Cauvery resistente mot tredje generasjons cefalosporiner ([Taneja & Sharma, 2019](#)). For grunnvannet og overflatevannet som brukes til drikke- og rekreasjonsformål i India var andelen av *E. coli* som er resistent mot tredje generasjons cefalosporiner rapportert fra 17 til 100 % ([Taneja & Sharma, 2019](#)). I Sveriges største drikkevannsreservoar ble det påvist 150 ARG som gir resistens mot 11 antibiotikagrupper ([Lai et al., 2021](#)).

Forekomsten av antibiotikaresistens i norsk vannsektor er fremdeles lite dokumentert per dags dato. I Oslo området ble tre kommunale avløpsrensingsanlegg undersøkt for ARG og det ble påvist blant annet gener som koder for resistens mot betalaktamer, tetrasykliner og sulfonamider ([Schwermer & Uhl, 2021](#)). Videre ble det påvist ESBL-produserende *E. coli* både i fersk- og saltvann fra forskjellige strender rundt Oslo ([Jørgensen et al., 2017a](#)). Fra samme prøvetakingen ble det også for første gang i en norsk miljøprøve påvist *mcr-1* i ESBL-produserende *E. coli* ([Jørgensen et al., 2017b](#)). Allikevel antyder forskere ved Havforskningsinstituttet og Veterinærinstituttet i en mindre studie at det er lite antibiotikaresistens i det akvatiske miljø ([Svanevik et al., 2021](#)). Samtidig viser en annen norsk studie at ARB finnes i norske miljøer selv med begrenset menneskeskapt eksponering etter å ha undersøkt slam fra 23 drikkevannsbehandlingsanlegg ([Ullmann et al., 2019](#)).

Drikkevann

Selv om mange land har drikkevannsbehandlingsanlegg som bruker multibarriere prinsipp ble ARB og ARG påvist over hele verden i springvann ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). I en nyere studie ble det påvist *mcr-1* i springvann fra Kina, USA, Pakistan, Korea, Dubai og Tyskland ([Khan et al., 2020](#)), og i India ble det funnet karbapenemase-produserende bakterier i drikkevann ([Tanner et al., 2015](#)).

I Norge måles ikke ARB og/eller ARG rutinemessig hos vannprodusenter ([Simonsen et al., 2020](#)). Det er heller ikke offentliggjort noen studier på forekomsten av antibiotikaresistens i drikkevann, men i følge Folkehelseinstituttet er den generelle norske drikkevannskvaliteten god ([Steinberg et al., 2021](#)). Likevel ble det rapportert med jevne mellomrom vannbårne sykdommer i Norge som skyldes inntak av forurenset drikkevann, der i de siste 20 årene ble registrert 78 drikkevannsbårne utbrudd med til sammen 17 000 sykdomstilfeller ([Folkehelseinstituttet, 2019b](#)).

3. Materialer og metoder

Det er kun få studier om antibiotikaresistens i miljøet og det finnes ikke standardiserte metoder for å påvise ARB og ARG i akvatisk miljø ([Simonsen et al., 2020](#)). I flere av studiene ble det benyttet forskjellige metoder, og for å ha et visst sammenligningsgrunnlag av resultatene ble det tatt utgangspunkt i en studie som ble gjort i Norge ([Schwermer & Uhl, 2021](#)) og studier som bruker omtrent samme fremgangsmåten i land der lignende ble undersøkt ([Cacace et al., 2019](#); [Müller et al., 2018](#)).

Som et bidrag til å sjekke hypotesen at vannforsyningen kun minimalt bidra til spredning av ARB og ARG i Norge, ble det analysert råvann og ferdigbehandlet drikkevann fra et vannverk.

3.1. Valg og beskrivelse av vannverk og dens drikkevannskilde

Valg av vannverk

Mosseregionen vann, avløp, og renovasjon (MOVAR) er forslagstiller til Norsk Vann prosjektet: «Kartlegging av antibiotikaresistens i norsk rå- og drikkevann». Forslaget kom etter forespørsel fra forbrukere om drikkevannet er trygt med tanke på antibiotikaresistens. Derfor ble det et naturlig valg å inkludere MOVAR i en pilotstudie. Videre var et kriterium at vannverket har en overflatevannkilde siden disse har høyere potensiale for fekal forurensing fremfor grunnvannskilder. Vannkilden er også generelt mer fekalt belastet enn de fleste store norske drikkevannskilder. Disse opplysningene er innhentet fra Ingun Tryland (Rådgiver teknologiutvikling, Norsk Vann) september 2021.

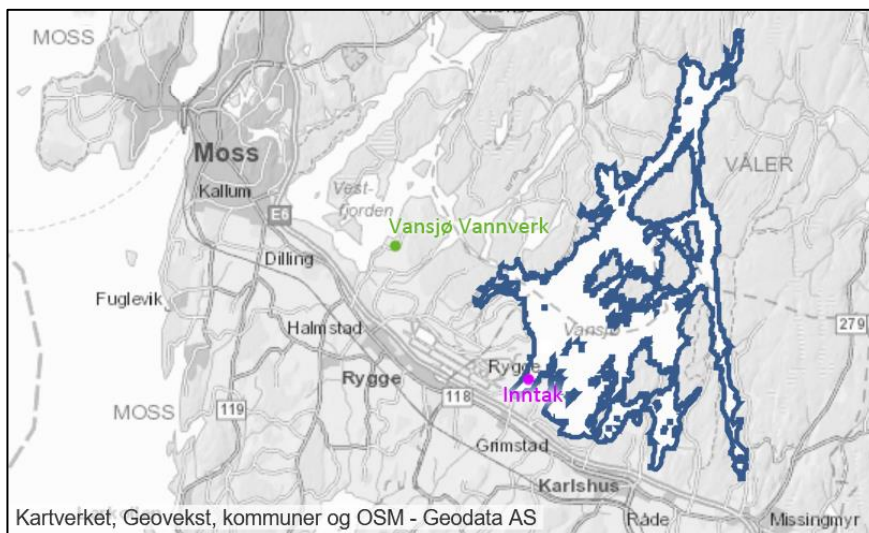
Beskrivelse av vannverket

MOVAR driver et moderne vannverk i Rygge som ligger i Moss kommunen og forsyner rund 70 000 personer med rensed drikkevann ([MOVAR, 2021](#)). I følge vannverksregisteret ble det produsert nesten 8 millioner kubikkmeter drikkevann i 2020 ([Mattilsynet, 2021](#)).

Beskrivelse av råvannskilden og beskyttelsestiltak

Vannverket benytter Vansjø som råvannskilde ([MOVAR, 2021](#)) og er den største innsjøen i Morsa vannområdet ([Vannportalen, 2022](#)). Hele vassdragets nedbørfelt dekker hele 1 052 km² og strekker seg helt inn i Oslo kommune ([Noregs vassdrags- og energidirektorat, 2022](#)), og har rundt 100 000 innbyggere ([Skarbøvik et al., 2021](#)). Vansjø har et areal på 35,6 km² ([Vannmiljø, 2022](#)) og deles inn i vannforekomstene Storefjorden, Vanemfjorden og Grepperødfjorden ([Vann-Nett, 2022](#)). Storefjorden

(figur 3.1) er det dypeste bassenget i Vansjø ([Skarbøvik et al., 2021](#)) og brukes av vannverket som hovedinntak, det vil si hvor råvannet blir tatt ut til drikkevannsproduksjon ([MOVAR, 2021](#)). Nedbørfeltet til Storefjorden består mest av skog og noe dyrka mark, og vanntypen er kalkfattig og humøs ([Skarbøvik et al., 2021](#)). I følge Vann-Nett har Storefjorden moderat økologisk tilstand og dårlig kjemisk tilstand ([Vann-Nett, 2020](#)), men ligger helt på grensen mot god økologisk tilstand i 2020 ([Skarbøvik et al., 2021](#)). Den moderate økologiske statusen skyldes blant annet forekomsten av planteplankton ([Vann-Nett, 2020](#)), og MOVAR har derfor økt overvåkingen av vannkvaliteten i sommerhalvåret ([MOVAR, 2021](#)). I følge MOVAR ble det aldri påvist toksiner (som cyanobakterier kan produsere) i ferdigbehandlet drikkevann fra Vansjø vannverk ([MOVAR, 2021](#)). En annen grunn for at Storefjorden ble karakterisert moderat økologisk er at det er høy forekomst av totalfosfor ([Vann-Nett, 2020](#)). I følge nyere data skyldes dette diffus avrenning fra erosjon og ras i tilløpselvene som er naturlige prosesser og dermed styrt av blant annet nedbørmengde ([Skarbøvik et al., 2021](#)). Eutrofiering er en kjent påvirkning på råvannskvaliteten ([Skarbøvik et al., 2021](#)), og dette skyldes blant annet menneskelig aktivitet. Rapporter viser tidvis tilførsel av avløpsvann, som kommer fra lekkasjer fra avløpsnett og/eller overløp fra pumpestasjoner ved store nedbørmengder ([Norconsult, 2016](#)). Videre slippes det også ut rensert avløpsvann fra Svinndal avløpsanlegg i vassdraget med til renning til Vansjø ([Våler kommune, 2017](#)). Motorveien E6 går direkte langs deler av Vansjø og en befaring viste også at det er boliger, gårder og hytter rundt Vansjø. Vansjølandskapet blir også benyttet som friluftsområde for kanopadling, båtferdsel, bading og fiske ([Noregs vassdrags- og energidirektorat, 2021](#)). I følge Moss kommune er det en rekke tiltak som skal beskytte drikkevanskilden. Det ble for eksempel etablert en sikringssone som inneholder en buffersone langs industri og næringsområder ([Moss kommune, 2021](#)). Videre restriksjoner er byggeforbud langs vassdraget og tilknytningsplikt til offentlig vann og avløp ([Moss kommune, 2021](#)).

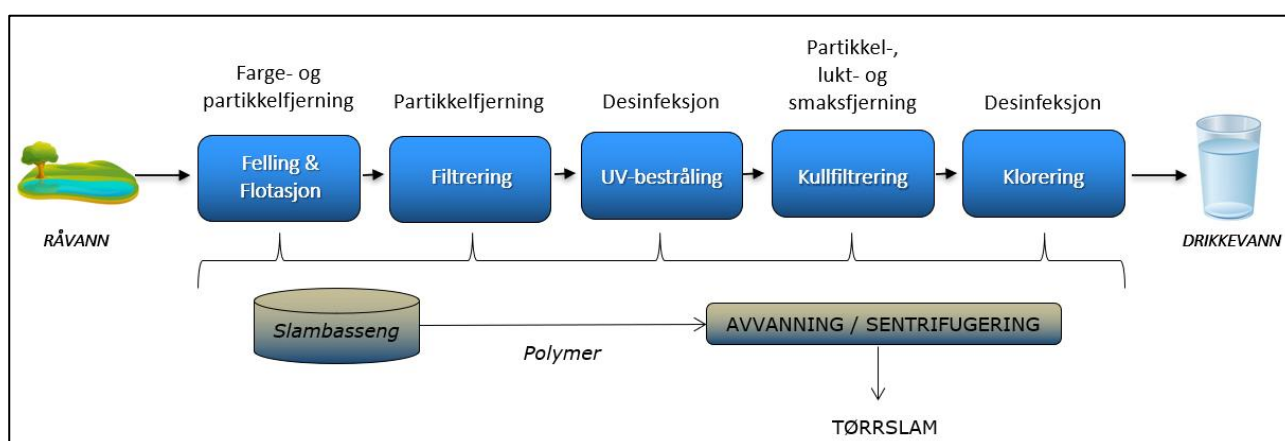


Figur 3.1: Vannforekomsten Vansjø - Storefjorden er markert blå, den grønne prikken viser Vansjø Vannverk og den lilla prikken viser råvannsinntaket til vannverket. Figuren er hentet fra Vann-Nett ([Vann-Nett, 2020](#)) og ble modifisert av Melanie Schreier.

Vannbehandling

Inntaket i Storefjorden er på 25 meters dybde og er i følge MOVAR plassert i den delen av Vansjø med best råvannskvalitet. Råvannet passerer flere vannbehandlingsprosesser i vannverket før det leveres til forbrukerne som drikkevann (figur 3.2). Vansjø Vannverk benytter tre rensetrinn og to desinfiseringstrinn. Første rensetrinnet er en forbehandling av vannet der det brukes flotasjonsprinsippet. Der blir det tilsatt trykkluft i vannet slik at luftbobler tar med seg partikler til overflaten som så igjen blir fjernet. Andre rensetrinnet består av filtrering der vannet passerer flere filter, som sand, pukk og lecamateriale, slik at små partikler som ikke ble fjernet under forbehandlingen fjernes. Etter mediefiltrering passerer vannet UV-anlegget og går videre til kullfiltrering. Kull absorberer kjemiske stoffer og det siste rensetrinnet fjerner også små partikler som har kommet seg gjennom mediefiltreringen. Vannet blir videre tilsatt klor som et siste desinfeksjonstrinn før det ferdig behandlede drikkevannet sendes ut via ledningsnettet til forbrukerne. ([MOVAR, 2021](#))

Under vannbehandlingsprosessene benyttes også kjemikalier. For pH-justering og alkalisering i starten av vannbehandlingen brukes kullsyre (CO_2) og hydratkalk ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Til kjemisk felling brukes det prepolymerisert aluminiumsklorid (type fabrikat PAX-18) og en polymer (Superfloc C492-PWG). Etter siste filtreringen kloreres vannet ved å tilsette natriumhypokloritt (NaOCl). Det siste kjemiske trinnet består av å tilsette hydratkalk ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) og ammoniak (NH_3) for pH-justering og kloramindannelse. Disse opplysningene er innhentet fra Hans Jørgen Halvorsen (Sivilingeniør, MOVAR IKS) januar 2022.



Figur 3.2: Forenklet skjematisk fremstilling av vannbehandlingsprosessene på Vansjø Vannverk. Råvannsbehandlingen består av blant annet forbehandlingen med flotasjon, fulgt av filtrering og UV-bestråling, samt kullfiltrering og desinfeksjon med klor. Figuren er modifisert av Melanie Schreier der rå- og drikkevannsillustrasjon er hentet fra Colourbox ([Colourbox, 2022](#)) og flytskjema er fått ut hendt fra MOVAR ([MOVAR, 2021](#)).

3.2. Prøvetaking

Totalt ble det samlet inn 18 prøver i henhold til vannverkets prøvetakingsprosedyrer, som omfatter at prøveuttak brennes med propanbrenner, vannet renner i 3 til 5 minutter og at hender vaskes med desinfeksjonsmiddel. Råvannsprøvene ble hentet fra inntakspunktet på 25 meters dyp og drikkevannsprøvene ble tatt rett før vannet sendes ut i fordelingsnettet.

Det ble tatt trippelprøver av både rå- og drikkevannet på tre etterfølgende dager (15., 16. og 17.12.2021). Triplikatene skulle brukes for å vurdere metodenes presisjon, samt å redusere tilfeldige feil før undersøkelsen av dagsvariasjoner. Samlet sett ga prøvetakingsstrategien dermed et mer nøyaktig prøvesvar for rå- og drikkevannet på det undersøkte tidspunktet på året.

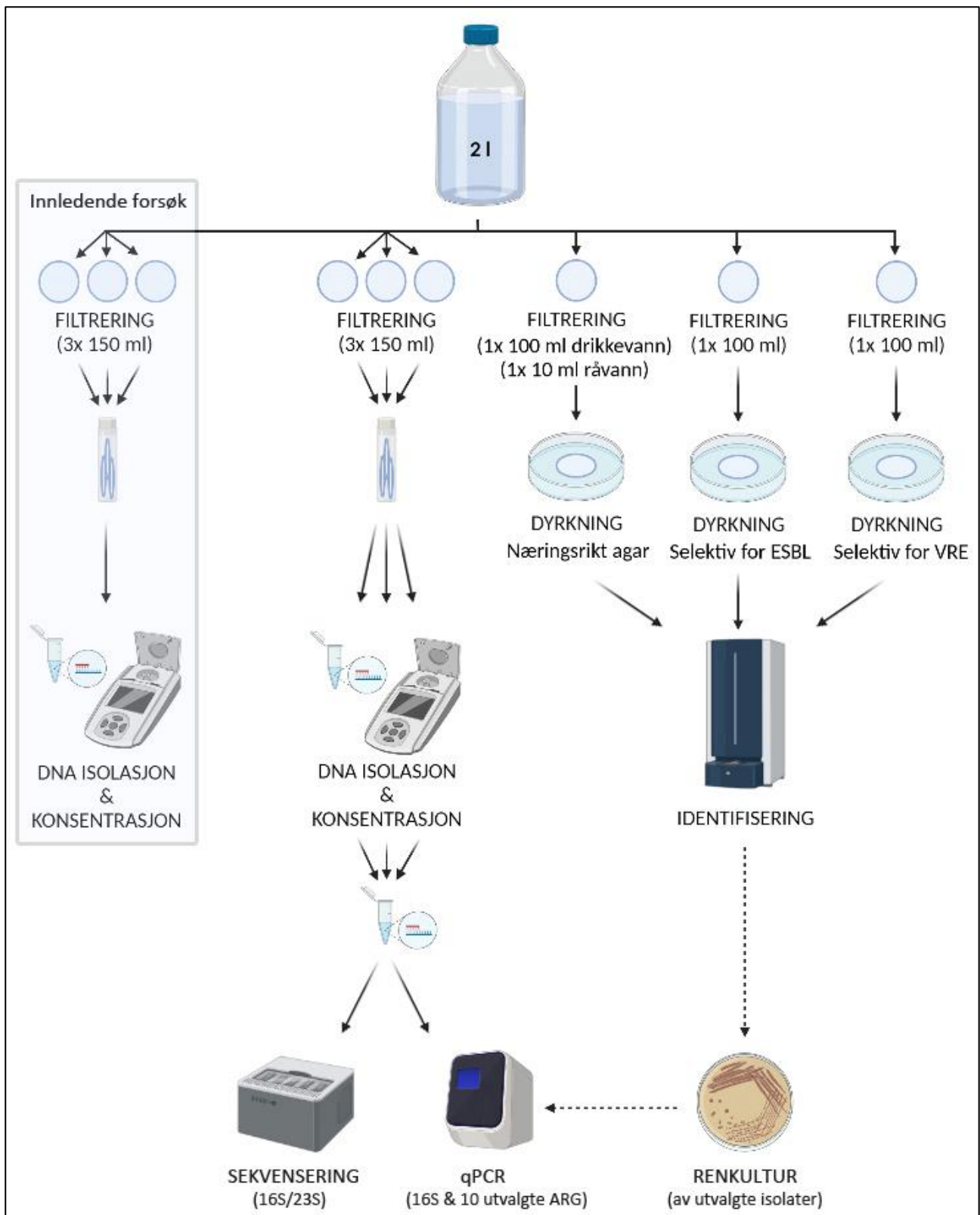
2 000 mL DURAN™ glassflasker (DWK, Germany) ble sterilisert ved hjelp av autoklaving, slik at disse var fri for mikrober som kunne formere seg. Flaskene ble deretter markert med prøvenummer, vanntype og prøvetakingsdato. Glassflaskene ble fylt med 2 L vann og prøvene ble transportert nedkjølt (4-10 °C) til laboratoriet og så oppbevart i kjølerom (5 °C) frem til analysen. Lave temperaturer over frysepunktet skulle hemme bakterievekst ([Nester et al., 2019](#)).

Etiske vurderinger

Det er ingen etiske spørsmål knyttet til vannprøvetaking og -testing, og derfor var ingen etisk godkjenning nødvendig for denne studien.

3.3. Analysemetoder

Det ble valgt metoder som var gjennomførbart på laboratoriene på Universitetet i Sørøst-Norge (avdeling Bø) og på Sykehuset i Vestfold (mikrobiologisk avdeling). Ved å kombinere dyrkningsbaserte- og molekylære metoder var det i teorien mulig å tildele en resistens til en bestemt bakterie. Videre kunne på den måten vannbehandlingen vurderes både med henhold til levedyktige bakterier, bakterielt DNA og forekomsten av ARG. I tillegg ble bakteriesamfunnet i både rå- og drikkevannsprøvene undersøkt for å se om det var patogene bakterier og indikatorbakterier til fekal forurensning tilstede. En forenklet, skjematisk fremgangsmåte av arbeidsprosessen (inkludert et innledende forsøk) er vist i figur 3.3. Hver av de 18 vannprøvene ble filtrert, dyrket og undersøkt for ti utvalgte ARG.



Figur 3.3: Forenklet flytskjema av arbeidsprosessen til hver av de 18 prøvene. Etter filtrering ble filteret enten dyrket eller triplikatene samlet i sterile universalcontainer. DNA ble ekstrahert, isolert og konsentrasjonen målt før molekylæranalysene. Deretter ble prøven undersøkt for ti utvalgte antibiotikaresistensgener (ARG) samt bakterieforekomsten estimert ved 16S qPCR. Videre ble prøven sekvensert for identifisering av patogener og indikatorbakterier for fekal forurensning. Levedyktige bakterier ble også identifisert og undersøkt for de ti ARG. Illustrasjonen ble laget med BioRender av Melanie Schreier ([BioRender, 2021](#)).

3.3.1. Filtrering av vannprøver

Ved filtrering blir partikler separert fra vannet og formålet var å oppkonsentrere bakterier i vannprøven. Metoden som ble brukt var vakuumfiltrering der vannet ble dratt gjennom filteret ved hjelp av undertrykk. Filtre finnes med ulike størrelser av porene og der valget er avhengig av formålet. Bakterier har en størrelse fra 0,3 til 2 µm og det er vanlig å bruke filtre med en porestørrelse på 0,2 µm for å fange opp bakterier. Partikler større en 0,2 µm holdes dermed igjen, mens mindre partikler og vannet slippes gjennom. ([Nester et al., 2019](#))

Filtre kan videre lages av ulike materialer og det ble valgt nitrocellulose membran filtre siden de er fleksible. Det samme filtermateriale ble også brukt i flere lignende studier tidligere ([Müller et al., 2018](#); [Schwermer et al., 2018](#)).

Utstyr

Det ble brukt følgende utstyr:

- Nitrocellulose membran filter med 0,2 µm porestørrelse og 47 mm i diameter
- Filtreringssystem
- Bunsenbrenner
- Vask
- Brunagar
- Engangstrakter
- Pinsett
- Sterile universalcontainer
- ESBL-agar
- Vakuumslange
- Målesylinder
- Prøver
- VRE-agar

Fremgangsmåte

Filtreringssystemet Millipore Microfil™ (Merck, Tyskland) ble koblet til vasken med vakuumslangen og vannkranen ble slått på. Nitrocellulose filteret fra Whatman™ (LOT A29882637, Cytiva, United States of America) med 0,2 µm porestørrelse og 47 mm i diameter ble lagt på filtreringssystemet ved hjelp av pinsetten. Engangstrakten (resirkulerbart polypropylen) ble deretter satt på systemet. Flaskene med vannprøvene ble forsiktig vendt opp ned ti ganger og prøven ble deretter overført til en målesylinder før den videre ble tilsatt til trakten. Vakuumbryteren på filtreringssystemet ble slått på slik at prøven ble filtrert. Filtratet ble direkte tømt i vasken og da alt vann i trakten var filtrert ble vakuumbryteren slått av. Trakten ble fjernet og filteret med retentat ble ved hjelp av pinsetten direkte lagt på vekstmediet eller overført i sterile universal polypropylene container (25 x 90 mm) (mabsEmballasje AS, Norge), avhengig av hvilken analyse som skulle utføres.

Hver prøve ble filtrert totalt gjennom 9 filtre:

- 1x 100 ml drikkevann eller 1x 10 ml råvann til dyrkning på næringsrike medier,
- 1x 100 ml drikke-/råvann til dyrkning på selektive medier for ESBL,
- 1x 100 ml drikke-/råvann til dyrkning på selektive medier for VRE,
- 3x 150 ml drikke-/råvann for ARG-analysen og sekvensering, og
- 3x 150 ml drikke-/råvann for et innledende forsøk for å vurdere en enklere DNA-ekstraksjon.

For de molekylæranalysene ble filtertriplikater samlet i hvert sitt steril universal container og fryst ned ved -18 °C.

Kvalitetssikring

Målesylindere og pinsetten ble autoklavert før bruk og hver prøve har fått hver sin målesylinder. Flaskene ble forsiktig vendt opp ned flere ganger for å få en homogen blanding. Både plastkorken og flasketoppen ble sterilisert rett før prøvetaking ved hjelp av en bunsenbrenner. Videre ble også pinsetten sterilisert hver gang før bruk og det samme ble Microfil™ filterstøtten som er en del av filtreringssystemet og som har direkte kontakt med filteret. Hele prosessen foregikk på benk.

Alle prøvene ble filtrert innen 8 timer etter prøvetaking for å få et riktig øyeblikksbilde av bakteriemengden av både miljøbakterier og mulige patogene bakterier. Videre ble drikkevannsprøvene filtrert før råvannsprøvene for å utelukke mulig kontaminering.

Volumet av vann som filtreres påvirker den mikrobielle mengden og det er flere studier som filtrerte 150 mL vann til de molekylær baserte analysene i triplikater ([Cacace et al., 2019](#)) ([Schwermer & Uhl, 2021](#)). Filtertriplikatene skulle bidra blant annet til å redusere tilfeldige feil under prøvetaking og filtreringsprosessen ([Cacace et al., 2019](#)). Filtrene ble fryst ned siden det stopper bakterieveksten frem til videre analyser ([Nester et al., 2019](#)).

I følge Standard Norge er det anbefalt å bruke retentat fra 100 mL vann til dyrkning ([Standard Norge, 2014](#)) og det er flere studier som brukte samme volum ([Müller et al., 2018](#); [Voigt et al., 2020](#)). Ved innledende forsøk har det derimot vist seg at det var høy forekomst av levedyktige bakterier i råvannet i forhold til drikkevannet, slik at det var best å bruke retentat fra 10 mL råvann til dyrkning på det mest næringsrike mediet.

Kontroll av filter

Hver dag ble det utført en negativ kontroll av filteret, ved å legge et ubrukt filter på det mest næringsrike vekstmediet som så ble inkubert sammen med de andre prøvene.

Begrensninger og feilkilder

Den bakterielle biomassen er svært lav i behandlet drikkevann ([Khan et al., 2020](#)). Videre avgjør porestørrelsen på filteret hva som kan påvises. I følge Nester's Microbiology er bakterier større enn 0,2 µm, mens gener er mindre enn det ([Nester et al., 2019](#)). Dermed fanges det opp bakterier slik at det kan påvises intracellulært DNA, mens ekstracellulært DNA derimot ikke kan påvises. En annen ulempe med små porestørrelser er at vannprøver med høy turbiditet kan tette filtere ([QIAGEN, 2020](#)).

Siden vannprøven ble overført flere ganger kan det være noen få vanddråper igjen i både målesylindren og trakten. Videre ble engangstraktene av hensyn til miljøet kun byttet for hver ny prøve, men ikke for de ni filtreringene innenfor en prøve. Det samme gjelder målesylindren. Dermed kan det være en høyere konsentrasjon av mikrober i den sist utførte filtreringen (som var dyrkingen) sammenlignet med den første.

Selv om det er lagt stor vekt på en steril prosess kan kontaminering ikke utelukkes.

3.3.2. Dyrkning, kvantifisering og identifisering av bakterier

Ved dyrkningsbaserte metoder er det mulig å identifisere og kvantifisere levedyktige mikrober i prøven. Dette tillater også evaluering av effektiviteten av vannbehandlingen. Videre kunne disse isolater spesifikk undersøkes for forekomsten av ti utvalgte ARG. Det ble valgt ut tre ulike dyrkningsmedier. Den mest næringsrike agaren var brunagar ([Thermo Fisher Scientific, 2020](#)) og ble brukt for å fremme mest mulig vekst av levedyktige bakterier i prøven, og da spesielt med henblikk på patogene bakterier. Videre ble det brukt antibiotika tilsatte, selektive kromogene medier for ESBL og VRE. ESBL-agaren tillater påvisning og differensiering av ESBL-produserende stammer og hemmer vekst av andre bakterier ([Rambach, 2020](#)). VRE-agaren ble brukt for isolering og differensiering av VRE fra andre vankomycinresistente bakterier ([Rambach, 2021](#)).

Det ble lagt vekt på dyrkning av klinisk relevante bakterier og særlig de som er oppført i listen over globale prioriterte patogener av WHO. Listen inkluderer karbapenemresistente *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Enterobacteriaceae*, inkludert *Enterobacteriaceae* med resistens mot tredje generasjon cefalosporiner. Dessuten er det oppført *Enterococcus faecium* med vankomycinresistens. ([WHO, 2017](#))

Videre ble det kun dyrket aerobt. Dette på grunn av praktiske årsaker, men også fordi forekomsten av patogene anaerobe bakteriearter i norske blodkulturer er svært lav ([NORM/NORM-VET, 2021](#)).

Identifiseringen av bakteriekolonien ble gjort ved bruk av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) massespektrometri. En reagensløsning ekstraherer proteiner fra mikroorganismene og en laser i massespektrometeret bestråler prøven som fører til at positivt ladede proteinfragmenter blir frigjort. Disse ionene akselerer i et elektrisk felt og siden ulike fragmenter har forskjellige masser vil ionene ankomme til detektoren til forskjellige tider. Et massespektrometer måler altså tiden mellom akselerasjon og detektorsignalet, og hastigheten konverteres til en molekylmasse. Mikroorganismens spektrale proteinmønster sammenliknes med en database og likheten angis som en tallverdi (score). Resultater med score over 2,00 anses som en akseptabel sannsynlighet for identifikasjon på artsnivå. Videre deles svaret inn i kategorier der A beskriver en identifikasjon av høy-konfidens, B en lav- konfidens og C ingen konfidens. ([Bruker Daltonik GmbH, 2016](#))

Utstyr og reagenser

Det ble brukt følgende utstyr og reagenser:

- MALDI-TOF
- 70 % maursyre
- Øser
- Brunagar
- MBT Biotarget 96
- Mixing sticks
- Fryserør (Mikrobank™)
- ESBL-agar
- HCCA portioned Matriks
- Pipette og pipettespisser
- Inkubator med og uten CO₂
- VRE-agar

Fremgangsmåte

Etter filtrering av vannet ble filteret med retentat lagt på agarskål. Brunagar (LOT 3404519, Oxoid, Tyskland) ble inkubert ved 35±1 °C og med 5 % CO₂ i Thermo Steri-Cycle CO₂ inkubatoren (HOUM, Norge), mens de selektive skålene for ESBL (CHROMagar™ ESBL, Frankrike) og VRE (CHROMagar™ VRE, Frankrike) ble inkubert ved 35±2 °C og uten CO₂ i inkubatorromet. Alle primærskålene ble inkubert i 24 og 48 timer (se vedlegg 1 for utfyllende informasjon om dyrkningsmedier).

Skålene ble for første gang undersøkt etter 24 timer. For hver prøve ble det valgt opptil 10 kolonier der det ble prioritert kolonier som ligner morfologisk på patogener og da særlig fargede kolonier som vokste på ESBL- og VRE-mediet. Koloniene ble strøket ut på nye brunagar-skåler og ble inkubert ved 35 ± 1 °C og med 5 % CO₂ over natt. Etter å ha dyrket frem renkulturer ble isolatene identifisert ved hjelp av MALDI-TOF smart (Bruker, Tyskland) utstyrt med MALDI Biotyper™ Compass databasen (versjon 4.1.100) som inneholder 9 883 bakteriearter. For å kunne identifisere bakterien ble en liten del av kolonien overført på MALDI Biotyper™ Biotarget 96 (LOT 20375052, Bruker, Tyskland) ved hjelp av mixing sticks (Pro-Lab Diagnostics, Canada). Deretter ble 1 µL 70 % maursyre tilført. Etter lufttørring ble det tilsatt 1 µL HCCA portioned matriks (LOT 7020121034, Bruker, Tyskland) og engangsplaten ble stående på benk frem til brønnene var helt tørre. Platen ble satt inn i MALDI-TOF instrumentet og analysen startet. Primærskålene ble på nytt undersøkt etter 48 timer inkubasjon og mistenkte kolonier ble spredt til identifisering. For hver bakterieart med en score større eller lik 2,00 og i tillegg er i kategori A eller B, ble en stamme fryst ned i Mikrobank™ (Med Kjemi AS, Norge) ved -18 °C frem til videre undersøkelser.

Dessuten ble alle bakteriekoloniene på alle primærskålene visuelt telt både etter 24 og 48 timer fordi det var ønsket at deteksjonsmetoden skulle være så sensitiv som mulig.

Kvalitetssikring

Da filteret ble lagt på agaren ble det passet på at det ikke var luftbobler innimellom. Dyrkningen ble utført på mikrobiologisk avdeling på Sykehuset i Vestfold som er akkreditert. Samtlige prosedyrer for dyrkning, inkubering og identifisering ble fulgt. Temperaturen i inkubatorene ble automatisk og kontinuerlig overvåket. Atmosfæreforhold i inkubatorskapet ble også overvåket jevnlig ved å avlese og dokumentere CO₂-konsentrasjon ved første åpning av skapet om morgenen.

Kontroll av vekstmediene

Ferdigprodusert brunagar ble kjøpt inn fra Oxoid, mens ESBL- og VRE-mediene ble produsert på mikrobiologisk avdeling. Alle skålene brukes også i rutinedriften på avdelingen og hver batch ble kontrollert på laboratoriet.

Det brukes sertifiserte referansestammer som kvalitetskontroll til dyrkningsmedier. De positive vekstkontrollene for brunagaren var *Haemophilus influenzae* stamme American Type Culture

Collection (ATCC) 49766 og *Neisseria meningitidis* ATCC 13090. Disse ble dyrket over natten ved 35 ± 1 °C og med 5 % CO₂, mens det ble inkubert en ubrukt brunagarskål som kontroll av sterilitet for mediet i 48 timer. For ESBL-agaren ble det brukt *K. pneumoniae* ATCC 700603 og *E. coli* ATCC 25922 som positiv kontroll. Disse ble dyrket over natt ved 35 ± 2 °C og uten CO₂ sammen med en sterilkontroll. *Enterococcus faecalis* stamme ATCC 51299 og ATCC 29212 ble brukt som positiv kontroll for VRE-agaren og en ubrukt VRE skål som sterilkontroll. Disse ble inkubert ved 35 ± 2 °C og uten CO₂ i 48 timer.

Kontroll av identifisering

Referansestammene benyttes også som kontroll av identifikasjon av bakteriestammer. For hvert oppsett ble det brukt *E. coli* ATCC 25922 som positiv kontroll mens en brønn tilsatt kun matriks fungerte som en negativ kontroll. Videre ble det kun godtatt prøvesvar som hadde en score like eller over 2,00 og som i tillegg er i kategori A eller B.

MALDI-TOF instrumentet har både daglig, ukentlig og månedlig vedlikeholdsrutiner som sikrer riktige prøvesvar. I vedlikeholdet inngår blant annet daglige kontroller og ukentlige kalibreringer.

Begrensninger og feilkilder

Det er kun 1 % av bakteriearter som kan dyrkes under kontrollerte forhold i laboratorier. Det er dermed kun de bakteriene som vokser best under gitte forhold og ikke nødvendigvis de som dominerer i prøven. ([Nester et al., 2019](#))

En begrensning til MALDI-TOF er referansedatabasen dersom den ikke inneholder informasjonen om mikroben som skal identifiseres. Problemet er også når den på grunn av manglende informasjon i databasen ikke kan skille lignende profiler fra hverandre. I tillegg har referansedatabasen fokus på medisinsk relevante stammer og ikke miljøbakterier. ([Nester et al., 2019](#))

Videre fulgte kvantifisering av levedyktige bakterier i en miljøprøve ingen ISO-standarder. Telling av kolonier som er bittesmå eller store feite kolonier som flyter inni hverandre bidrar også til usikkerhet.

3.3.3. DNA ekstraksjon og isolasjon

Formålet med DNA ekstraksjon og isolasjon er å få tilstrekkelig og rene nukleinsyrer som kreves i videre analyser. Det finnes ulike metoder avhengig av materialet som DNA skal ekstraheres fra. Ekstraksjon av nukleinsyrer består av tre grunnleggende trinn: Lysering, separasjon og rensing ([Ramesh, 2019](#)). Ved første trinn lyseres bakteriecellen for å frigjøre intracellulært DNA ([Ramesh, 2019](#)). For lysering av bakteriecellene som ble oppkonsentrert på filteret ble det brukt både kjemisk og mekanisk lysering ([QIAGEN, 2020](#)), mens det ble brukt varme for å lysere bakterieisolatene ([Müller et al., 2018](#)). For å separere nukleinsyren fra andre celledeler og forbindelser ble det brukt en silikamembran for filterprøvene, der DNA bindes selektivt til membranen ([QIAGEN, 2020](#)). For isolatprøvene ble det brukt en sentrifuge der cellerester sedimenteres mens DNA forblir i den vandige fasen (supernatanten) ([Ramesh, 2019](#)). I rensetrinnet fjernes uønsket materiale i DNA-ekstraktet, og nukleinsyren utfelles og elueres i en buffer for stabilisering ([Ramesh, 2019](#)).

En spektrofotometer ble brukt for å måle konsentrasjonen og renheten til det ekstraherte DNAet. Instrumentet bruker lys med bestemte bølgelengder, og måler absorpsjonen av stoffet i prøven. DNA absorberer lys ved rundt 260 nm, mens andre forbindelser som proteiner absorberer ved andre bølgelengder. Dermed er det mulig å bestemme DNA konsentrasjon ved å måle absorbansen ved 260 nm. Ved å bestemme forholdet mellom absorbans ved 260 nm og absorbans ved 280 nm (A_{260}/A_{280}) vil dette gi informasjon om renheten til det ekstraherte DNAet. For en ren DNA-prøve er forholdet 1,8. ([Thermo Fisher Scientific, 2012](#))

Siden det forventes lave DNA konsentrasjoner i prøvene, ble DNAet også målt med et fluorometer. Ved fluorimetri tilsettes det en løsning som inneholder fluoriserende fargestoffer som fester seg til dobbeltstrenget DNA i prøven, og avgir et lys som detekteres ([Thermo Fisher Scientific, 2014](#)).

Utstyr og reagenser

Det ble brukt følgende utstyr og reagenser:

- DNA ekstraksjons Kit
- Bunsenbrenner
- Pinsett
- Pipette og pipettespisser
- Sentrifuge
- Varmeblokk
- NanoDrop™ Lite / Qubit 3.0
- Prøvestativ
- Kjøleskap
- Vortex
- Inkubator
- Brunagar
- Øser
- Sterilt vann
- Eppendorfrør

Fremgangsmåte

DNA ekstraksjon fra filteret med retentat

Alle vannprøver (n = 18) ble filtrert i tre eksemplarer, og i et innledende forsøk ble alle tre filter per prøve overført til PowerWater DNA Bead Tube som følger med DNeasy™ PowerWater™ Kit (LOT 169050265 & LOT 172013408, QIAGEN, Tyskland). DNAet ble deretter ekstrahert i henhold til produsentens instruksjoner. Renset DNA i 100 µL elueringsbuffer ble forsiktig blandet med vortex (AH diagnostic, Denmark). DNA konsentrasjonen ble deretter målt både med NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) og Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) med Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (LOT 2219290, Thermo Fisher Scientific, USA) i henhold til produsentens instruksjoner.

I det endelige forsøket ble DNAet ekstrahert fra hver filter ved bruk av DNeasy™ PowerWater™ Kit (LOT 169050265, QIAGEN, Tyskland). Det genomiske DNAet ble ekstrahert i henhold til produsentens instruksjoner, og DNAet eluert i 100 µL buffer ble forsiktig blandet med vortex (AH diagnostic, Denmark). DNA konsentrasjonen ble deretter målt med NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA). De filtertriplikatene ble samlet til en DNA-pool (totalt 300 µl) og forsiktig blandet med vortex (AH diagnostic, Denmark). DNAet til de 18 prøvene ble kvantifisert med både NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) og Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) med Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (LOT 2219290, Thermo Fisher Scientific, USA) i henhold til produsentens instruksjoner.

Alle prøvene ble lagret ved -20 °C i påvente av videre analyse.

DNA ekstraksjon fra bakterieisolatene

Stammene ble dyrket på brunagar (LOT 3404519, Oxoid, Tyskland) over natt ved 35±1 °C (Termaks, Sweden). Ekstrahering av DNA fra bakteriekolonier ble utført ved en kokemetode som ble publisert tidligere ([Müller et al., 2018](#)), men med noen få endringer. Tre enkeltkolonier ble resuspendert i 100 µL sterilt vann (Fresenius Kabi, Tyskland) og varmet opp til 95 °C for 15 min. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 13 000 g i 5 min. Supernatanten ble overført i ett nytt mikrosentrifugerør (Thermo Fisher Scientific, USA) og forsiktig blandet med Vortex (AH diagnostic, Denmark). DNA konsentrasjonen ble målt med NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) og deretter lagret ved -20 °C frem til qPCR analysen.

Kvalitetssikring

For DNA ekstraksjon fra filteret med retentat ble det valgt et kit som er egnet til formålet siden det er tenkt for filtrerte vannprøver, inkludert uklart vann ([QIAGEN, 2020](#)). Videre fjernes det forbindelser som kan hemme PCR ([QIAGEN, 2020](#)). Dessuten ble kittet brukt i flere andre lignende studier ([Cacace et al., 2019](#); [Schwermer & Uhl, 2021](#)). Hvert parti av DNeasy PowerWater Kits er testet av produsenten mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre kvaliteten ([QIAGEN, 2020](#)).

Eluatet fra filtertriplikatene ble samlet for å redusere tilfeldige feil under DNA ekstrahering, og ga i tillegg et større elueringsvolum til analysene som skulle utføres, samt muligheten for ytterligere oppkonsentrering ved behov.

Ekstrahering pågikk i avtrekkskapet (Waldner, Tyskland) som ble vasket både med 70 % alkohol (Kiilto, Norge) og RNase/DNA fjerner (Thermo Fisher Scientific, USA). Videre ble det brukt hansker.

NanoDrop Lite er kalibrert på produksjonstidspunktet og gir i følge produsenten nøyaktige og reproduerbare målinger ([Thermo Fisher Scientific, 2012](#)). Det ble utført en kalibreringssjekk rett før målingene av prøvene med kalibrerings-sjekk-løsningen-1 fra Thermo Fisher Scientific for å bekrefte at instrumentet fungerer innenfor spesifikasjonene. Elueringsbufferet fra ekstraksjonskittet ble brukt for å måle bakgrunnsabsorpsjonen for vannprøvene, mens det ble brukt sterilt vann som blankprøve for isolatprøvene.

Qubit 3.0 er høysensitiv og gir svært nøyaktig kvantifisering, særlig siden det brukes fargestoffer som er selektiv for dobbeltrådet DNA ([Thermo Fisher Scientific, 2014](#)). Til kalibrering ble det brukt 2 standarder (0 ng/μL og 10 ng/μL) som var inkludert i Qubit™ dsDNA HS Assay kit (LOT 2219290, Thermo Fisher Scientific, USA). I følge produsenten har denne en kvantifiseringsområde mellom 0,2 og 100 ng/μL dobbeltrådet DNA ([Thermo Fisher Scientific, 2014](#)).

Begrensninger og feilkilder

DNeasy PowerWater Kit protokollen gjør oppmerksom på at filteret skulle rulles til en sylinder med oversiden vendt innover, og at det ikke skulle rulles tett eller brettes ([QIAGEN, 2020](#)). Dette var helt umulige å oppnå når tre filtrene skulle samles i et PowerWater DNA Bead Tube, og det innledende forsøket ble derfor stoppet etter måling av DNA konsentrasjon.

Den laveste deteksjonsgrensen for NanoDrop Lite er 4,0 ng/ μ L (\pm 2,0 ng/ μ L) til dobbeltrådet DNA ([Thermo Fisher Scientific, 2012](#)). Videre vil prøver med lav biomasse føre til lav DNA utbytte (< 20 ng/ μ L) som resulterer også i at ratio kan falle under 1,5 ([Thermo Fisher Scientific, 2012](#)). På grunn av de små volumene (1 μ L) som kreves av NanoDrop Lite må prøven som måles være homogen. I følge produsenten kan prøver som inneholder store molekyler som genomisk DNA være spesielt utsatt for heterogenitet ([Thermo Fisher Scientific, 2012](#)), som dermed kan føre til feilmåling. Videre er det flere forbindelser enn DNA som absorberer ved 260 nm ([Ramesh, 2019](#)). Dette bidrar til at vurderingen av DNA-renheten med A260/A280-forholdet ikke er veldig robust ([Schy & Plewa, 1989](#)).

Utførelsen av DNA ekstraksjon av vannprøvene ble fordelt på tre dager, der seks prøver (etter dato) ble ekstrahert per dag. Prøvene ble ikke ekstrahert på samme dag på grunn av det store volumet (18 prøver \times 3 filter) og kan ha bidratt til tilfeldige feil. Videre ble det ikke utført en negativ kontroll før etter at alle prøvene ble ekstrahert. Som negativ kontroll ble tre autoklaverte sterile vannprøver filtrert med samme fremgangsmåte og utstyret som ble brukt for vannprøvene. Håndteringen av de negative kontrollene fulgte dermed ikke prøvene fra start og kan også ha ført til tilfeldige feil. Det ble ikke utført positive ekstraksjonskontroller siden det virket tilstrekkelig med positive dyrkningsprøver og følgende molekylærbiologiske analyser.

Det ekstraherte DNAet til isolatprøve ble ikke rensert noe ytterligere, og kjemiske forurensninger kan påvirke effektiviteten til videre analyser.

3.3.4. Kvantifisering av antibiotikaresistensgener og estimering av bakterieforekomsten ved qPCR

Undersøkelsen av ARG ble utført ved hjelp av kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR). Dette er en sensitiv metode og kan brukes til påvisning og kvantifisering av ARG i et miljø eller direkte fra bakterieisolater. PCR er en teknikk for å øke (amplifisere) en spesifikk sekvens i DNAet ved å repetere en tre trinns amplifikasjons syklus. I første trinnet denatureres DNA slik at det enkelttrådet DNAet fungerer som en mal for spesifikke korte DNA-molekyler (primere) som bindes komplementært i trinn to. Primerne er designet slik at de fester seg i ytterkant av det området av nukleinsyren som skal amplifiseres. I trinn tre syntetiseres DNA ved hjelp av DNA polymerase, der enzymet inkorporerer komplementære nukleotider til det eksisterende DNA fragmentet. For hvert trinn brukes det temperaturer som er tilpasset formålet og for hver syklus dobles mål-sekvensen. ([Nester et al., 2019](#))

I denne studien ble det brukt SYBR green for å detektere PCR produktet. SYBR green er fluorescerende molekyler som bindes til dobbeltrådet DNA og avgir et signal som registreres i PCR instrumentet ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)). Signalet øker dersom dobbeltrådet DNA finnes i prøven, og for hver syklus med amplifisering foretas en avlesning av produktet som kan følges på skjermen i sanntid ([Nester et al., 2019](#)). Fluorescensen som blir generert reflekterer mengden dobbeltrådet DNA som blir amplifisert under PCR slik at det er mulig å kvantifisere DNA-sekvensen som undersøkes ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)).

Formålet med qPCR-analysen var å detektere klinisk relevante genetiske markører for antibiotika-resistens i både vannprøvene og bakterieisolatene. ARG ble valgt ut etter deres rapporterte tilstedeværelse i det norske akvatiske miljøet og forekomsten i befolkningen (tabell 3.1).

Tabell 3.1: Funn av ti utvalgte antibiotikaresistensgener (ARG) i vannmiljøet i Norge og i pasient-isolater fra norske helseinstitusjoner.

Antibiotika-gruppe og ARG	Påvisning	Referanse
Betalaktamer		
<i>CTX-M-15</i>	Mest forekommende ARG fra ESBL ¹ -produserende isolater i blodkulturer som ble innsendt i 2019.	(NORM/NORM-VET, 2020)
	Gjentatte funn over tid i avløpsvann indikerer at genet sirkulerer rikelig i samfunnet.	(Paulshus et al., 2019)
	Påvist i avløpsvann fra renseanlegg og i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
<i>CTX-M-27</i>	Nest mest forekommende ARG fra ESBL ¹ -prod. isolater i blodkulturer som ble innsendt i 2019.	(NORM/NORM-VET, 2020)
<i>CTX-M-32</i>	Påvist i avløpsvann fra renseanlegg og i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
<i>TEM</i>	Påvist i avløpsvann fra renseanlegg og i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
<i>OXA-48</i>	Påvist i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
<i>OXA-58</i>	Påvist i avløpsvann fra renseanlegg og i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
Glykopeptider		
<i>vanA</i>	Flere utbrudd i Norge gjennom de siste årene.	(NORM/NORM-VET, 2021)
Tetrasykliner		
<i>tetM</i>	Påvist i avløpsvann fra renseanlegg og i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
Polymyksiner		
<i>mcr-1</i>	Påvist i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)
	Påvist i badevann i Oslo	(Jørgensen et al., 2017b)
Sulfonamider		
<i>sul1</i>	Påvist i avløpsvann fra renseanlegg og i Nitelva.	(Schwermer & Uhl, 2021)

¹ ESBL: Ekstendert spektrum betalaktamase

Videre ble ribosomenes mindre subenhet (16S), ribosomal RNA (rRNA), kvantifisert ved qPCR. Dette ble brukt som et estimat for den totale forekomsten av bakterier i vannprøvene ([Cacace et al., 2019](#)), samt som en internkontroll for kvantifisering av utvalgte ARG. 16S rRNA genet ble brukt som genetisk markør siden det finnes i nærmest alle bakteriearter og dens sekvensbevaring, samt at variable regioner tillater diskriminering ([Perisin et al., 2016](#)).

Utstyr og reagenser

Det ble brukt følgende utstyr og reagenser:

- PCR instrument
- Sterilt vann
- 96-brønns plate
- Mikrosentrifuge
- Primere
- Tris-EDTA buffer
- Optisk teip
- Mikrosentrifugerør
- SYBR green Mastermiks
- Pipette og pipettespisser
- Vortex
- Standarder og kontroller

Fremgangsmåte

ARG qPCR-analyse

For analysen av ARG ved bruk av qPCR ble det brukt spesifikke PCR primersett som var tidligere publisert og er gitt i tabell V7.1. PCR-reaksjonene ble utført i en 25 µL reaksjonsblanding bestående av 5 µL prøve (0,0208 - 4,60 ng/µL DNA), 12,5 µL SYBRTM Green Master Mix (LOT 2112534 & 2201535, Thermo Fisher Scientific, USA), 0,25 µL av hver av de gjeldende primerne (10 µM) (Integrated DNA technologies, USA) og 7 µL sterilt vann (Fresenius Kabi, Tyskland). Alle qPCR-reaksjoner til vannprøvene ble utført i en MicroAmpTM 96-brønns plate (REF 4346906, Thermo Fisher Scientific, USA) forseglet med med MicroAmpTM optisk teip (LOT 33FA8M, Thermo Fisher Scientific, USA) og analysert ved bruk av StepOnePlusTM (Thermo Fisher Scientific, USA). Isolatprøvene og bestemmelsen av deteksjonsgrensen til alle ARG qPCR analyser ble utført i en MicroAmpTM 48-brønns plate (REF 4375816, Thermo Fisher Scientific, USA) forseglet med med MicroAmpTM optisk teip (LOT 2021621014, Thermo Fisher Scientific, USA) og analysert ved bruk av StepOneTM (Thermo Fisher Scientific, USA). Alle oppsettene hadde følgende qPCR reaksjonsbetingelser: Varmstart ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 45 sykluser med denaturering ved 95 °C i 15 sekunder, annealing ved 47-68°C i 30 sekunder og forlengelse ved 72 °C i 2 min. Et siste forlengelse trinnet ble utført ved 72 °C i 5 min. Annealingstemperaturen for de ulike primerparene var følgende:

- *tetM*: 47,0 °C
- *mcr-1*: 57,0 °C
- *OXA-48*: 63,0 °C
- *CTX-M-32* og *vanA*: 55,0 °C
- *CTX-M-27*: 59,0 °C
- *sul1*: 68,0 °C.
- *CTX-M-15* og *OXA-58*: 56,0 °C
- *TEM*: 60,0 °C

Alle amplikonsekvensene (vedlegg 7) til de ti ARG ble bygd inn i et plasmid (pUC57), klonet og isolert fra en *E. coli* stamme av GenScript (GenScript Biotech Corporation, USA). Frysetørket plasmid-DNA ble resuspendert i 750 μL Tris-EDTA buffer og deretter laget en bruksløsning som var fortynnet 1:1000. Plasmidet ble brukt som positiv kontroll og en syv punkts 10-gangers fortynningsserie ble brukt som standarder. Beregning av antall plasmider/genkopier er vist i vedlegg 10.

For hvert gen som skulle undersøkes ble det satt opp 2 qPCR analyser bestående av:

- Vannprøvene (n=18), negativ kontroll (autoklavert, filtrert og DNA ekstrahert sterilt vann; n=3), negativ PCR kontroll (1:100 Tris-EDTA buffer; n=1), 10-gangers seriefortynnede plasmid-DNA standarder (n=7).
- Isolatprøvene (n=25), negativ PCR kontroll (1:100 Tris-EDTA buffer; n=2), 10-gangers seriefortynnede plasmid-DNA standarder (n=7).

Alle vannprøvene, kontroller og standarder ble satt opp som tre replikaer, med unntak hos oppsettene av isolatprøvene der det ble satt opp kontrollen i to replikaer. Isolatprøvene ble av praktiske årsaker ikke satt opp som replikaer.

16S qPCR-analyse

For amplifisering av 16S rRNA-genet ble det brukt et primerpar (341F/785R) som dekket de hypervariable regionene V3-V4. Primerne var publisert tidligere og sekvensene er oppgitt i tabell V7.2. PCR-reaksjonen ble utført i en 25 μL reaksjonsblanding bestående av 5 μL prøve (0,0208 - 4,60 ng/ μL DNA), 12,5 μL Power SYBRTM Green Master Mix (LOT 2201620, Thermo Fisher Scientific, USA), 0,25 μL av hver primer (10 μM) (Integrated DNA technologies, USA) og 7 μL sterilt vann (Fresenius Kabi, Tyskland). qPCR-reaksjoner ble utført i en MicroAmpTM 96-brønn-plate (REF 4346906, Thermo Fisher Scientific, USA) forseglet med med MicroAmpTM optisk teip (LOT 33FA8M, Thermo Fisher Scientific, USA), analysert ved bruk av StepOnePlusTM (Thermo Fisher Scientific, USA), og med følgende qPCR reaksjonsbetingelser: Varmstart ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 45 sykluser med denaturering ved 95 °C i 15 sekunder, annealing ved 51°C i 30 sekunder og forlengelse ved 72 °C i 2 minutter. Et siste forlengelses trinnet ble utført ved 72 °C i 5 min.

Som positiv kontroll ble det brukt *E. coli* stamme Culture Collection University Of Gothenburg (CCUG) 10970. Det ble laget en ni punkts 10-gangers fortyningsserie av stammen som ble brukt som standarder og er nærmere beskrevet i vedlegg 8.

qPCR oppsett for 16S amplifisering bestå av vannprøvene (n=18), negativ kontroll (autoklavert, filtrert og DNA ekstrahert sterilt vann; n=3), negativ PCR kontroll (Tris-EDTA buffer, n=1), 10-gangers seriefortynnede DNA-standarder (n=9). Alle prøver, kontroller og standarder ble satt opp som tre replikaer.

Kvalitetssikring

Kontroller

For å kontrollere både instrumentet, reagensene og metoden ble det benyttet kontroller. For 16S qPCR-analysen ble det brukt *E. coli* (CCUG 10979) DNA som positiv kontroll, mens for ARG qPCR-analysen ble et plasmid med innsatt gen-fragmentene brukt som positiv kontroll. Som negativ PCR kontroll ble det brukt Tris-EDTA buffer. Videre ble det brukt autoklavert, filtrert og DNA ekstrahert sterilt vann som negativ kontroll for hele metoden (fra DNA ekstrahering til qPCR analysen). Kontrollene ble analysert til hvert qPCR oppsett og de negative kontrollene ble i tillegg brukt for å korrigere for bakgrunnsstøy.

Utstyr og reagenser

Vedlikehold av PCR-instrumentet blir utført av laboratorieansvarlig personell, og alle reagensene ble oppbevart som anbefalt av produsenten.

SYBR™ Green Master Mix gir svært sensitiv nukleinsyre kvantifisering (≤ 10 kopier) og produserer pålitelige DNA amplifikasjonsresultater, med minimal variasjon i følge produsenten ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)).

Optimalt valg og kvalitetssikring av primersekvensene

Alle primersett ble tidligere publisert, men ble på nytt evaluert ved bruk av BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) eller primerdatabasen. Primerdatabasen angir spesifisiteten av primerne i prosent og sier hvor målrettet primerparet er for amplifikasjon av en variant av det ønskete resistensgenet ([Gorecki et al., 2019](#)). Er primeren ikke spesifikk vil dette resultere i falsk positive

prøvesvar. Primerdatabasen angir også den prosentvise effektiviteten til et PCR-primerpar, som gjenspeiler den effektive amplifikasjonen av alle mulige varianter av det undersøkte resistensgenet ([Gorecki et al., 2019](#)).

- Primerpar til *CTX-M-27* har en spesifisitet på 100 % og en effektivitet på 29 % ([Gorecki et al., 2019](#)).
- Primerpar til *vanA* har en spesifisitet på 100 % og en effektivitet på 85 % ([Gorecki et al., 2019](#)).
- Primerpar til *tetM* har en spesifisitet på 100 % og en effektivitet på 83 % ([Gorecki et al., 2019](#)).
- Primerpar til *mcr-1* har en spesifisitet på 100 % og en effektivitet på 88 % ([Gorecki et al., 2019](#)).
- Primerpar til *sul-1* har en spesifisitet på 100 % og en effektivitet på 100 % ([Gorecki et al., 2019](#)).

BLAST ble brukt for å sjekke spesifisiteten til primerne til detektering av *CTX-M-15*, *CTX-M-32*, *TEM*, *OXA-48* og *OXA-58* ([Sayers et al., 2022](#)), som ikke var oppgitt i primerdatabasen.

Primerne ble ved hjelp av en kalkulator for oligonukleotidegenskaper undersøkt om de kan danne sekundære strukturer ([Kibbe, 2007](#)), som kan føre til lavere PCR-effektivitet og utbytte ([Ramesh, 2019](#)). Bortsett fra revers primeren for detektering av *OXA-48* har ingen primer potensiale for å danne sekundære strukturer.

Det ble videre utført en primer-dimer undersøkelse for å sikrestille at de seks betalaktamresistensmålsekvensene ikke er for like og dermed selvkomplementære. Ved hjelp av BLAST ble to og to undersøkt mot hverandre og det var ingen likheter mellom primersekvensene fra *CTX-M-15*, *CTX-M-27*, *CTX-M-32*, *TEM*, *OXA-48* og *OXA-58*. Ved en multiple primer analyse ble det derimot oppdaget at *tetM*-forward primer kan danne en «self-dimer» ([Thermo Fisher Scientific, 2022a](#)), og at diverse primere kan danne «cross primer dimers». Disse er *CTX-M-15*-forward primer som kan bindes komplementært til *sul1*-forward primer, *CTX-M-27*-revers primer med *OXA-58*-revers primer, *CTX-M-32*-revers primer med *OXA-48*-revers primer, *OXA-48*-forward primer med *tetM*-revers primer, *OXA-48*-forward primer med *mcr-1*-forward primer, *OXA-58*-forward primer med *mcr-1*-revers primer og *vanA*-forward primer med *tetM*-revers primer ([Thermo Fisher Scientific, 2022a](#)). Primer-dimer-dannelsen i amplifikasjonsreaksjonen kan variere og er avhengig av PCR-forholdene ([Thermo Fisher Scientific, 2022a](#)). «Cross primer dimers» var kun en bekymring for standardene siden prøvene fikk tilsatt bare en primerpar per PCR-oppsett. Det ble også lagt merke til at *CTX-M-27*-primerparet har to basepar i 3'-enden som er komplementære. Allikevel er de ønskede PCR-produktene minst 68 bp lange og kan derfor skilles fra primer-dimer som muligens kunne dannes.

Optimale primere skal helst ikke ha lange (> 4) repetisjoner av enkeltbaser siden dette kan bidra til feilpriming ([Ramesh, 2019](#)), og det er kun forward primeren til detektering av *TEM* som har fem repetisjoner av basen tymin (T).

Videre skal det velges primere som har et guanin-cytosin (GC) innhold mellom 40–60 % ([Ramesh, 2019](#)). Ved hjelp av «Multiple Primer Analyzer» ble GC-innhold til alle primere beregnet ([Thermo Fisher Scientific, 2022a](#)).

- Følgende primer var under anbefalingen: *tetM*-forward primer (23,8 %)
- Følgende primer var over anbefalingen: *CTX-M-27*-forward primer (61,1 %), *mcr-1*-revers primer (61,1 %), *sul1*-forward primer (63,6 %) og *sul1*-revers primer (63,6 %), samt 16S-forward primer (73,5 %).

Optimal tilpassing av analysen til instrumentet

Primerne som bindes komplementært til mål-DNAet i trinn to krever en bestemt temperatur. PCR-annealingstemperaturen er basert på primerparsekvensen, primerkonsentrasjonen og polymerasen som ble brukt ([Ramesh, 2019](#)). Teoretisk optimal annealingstemperatur ble beregnet ved bruk av en kalkulator fra Thermo Fisher Scientific ([Thermo Fisher Scientific, 2022b](#)).

For 16S qPCR analysen ble det i tillegg utført en primerkonsentrasjon-optimalisering. Bestemmelse av teoretisk og praktisk beste 16S primer konsentrasjon er nærmere beskrevet i vedlegg 8.

Utførelse

Tillaging av reaksjonsblandingen (bortsett fra prøvene) ble utført på benk i et eget rom (PCR-1) hvor det ikke håndteres noe DNA. Videre arbeid foregikk på en avlukket benk i et annet rom (PCR-2) der ikke PCR-instrumentene sto, for å unngå kontaminering av allerede amplifisert materiale. Alle benker ble vasket med 10 % klorin før arbeidet. Utførelse og håndtering av prøvene og reagensene pågikk ved riktig hanskebruk.

Det ble ikke jobbet på is siden DNA polymerasen (som er en bestanddel av SYBRTM Green Master Mix) kommer i en inaktiv tilstand og aktiveres først i varmstartfasen (95 °C). Videre ble det passet på gode grunnleggende pipetteringsteknikk som for eksempel å holde pipetten loddrett og å sette tippene like under væskeoverflaten slik at det ikke ble feil volum på grunn av væsken som sitter på utsiden av spissen. Det ble bare brukt pipettespisser med filter og det ble åpnet ett og ett rør av gangen.

Prøvene ble tint, blandet og om nødvendig spinnet ned før bruk. Reagensene, kontrollene og standardene ble oppbevart i kjøleskap frem til bruk, og ble blandet og spinnet ned.

Det ble videre laget et arbeidsskjema for hvert PCR oppsett for å sikre at prøvene ble pipettert i riktig brønn.

Smeltepunktsanalyse

Etter endt amplifikasjonsreaksjon ble det utført en smeltekurveanalyse for hver enkelt analyse. Smeltepunktet er definert som den temperaturen der 50 % av DNA-produktet er enkelttrådet og 50 % er dobbeltrådet ([Applied Biosystems, 2010](#)). Når halvparten av produktet er denaturert er avhengig av produktets lengde samt GC-innhold, siden hydrogenbindingene er sterkere (3 bindinger i stedet for 2) mellom G og C og følgelig resulterer i et høyere smeltepunkt enn adenin (A) og tymin (T) rike sekvenser ([Alberts et al., 2020](#)). Dermed er det mulig å påvise forskjellige PCR-produkter. Ved bruk av standarder (med kjent sekvens) kan smeltetemperaturen til et spesifikk PCR-produkt bestemmes. Uspesifikke produkter som primer-dimer er mindre i størrelse enn det ønskede produktet og vil derfor ofte ha lavere smeltetemperaturer ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)). Smeltekurveanalysen ble dermed brukt for å kontrollere produktspesifisitet, og en optimal SYBR™ Green qPCR-analyse burde ha en enkelt topp i smeltekurven.

Standardkurve, linearitet, effektivitet, presisjon og sensitivitet

For å lage en standardkurve til 16S rRNA- og ARG qPCR analysene ble en ti gangers fortynningsserie laget av henholdsvis *E. coli* og plasmid-DNA (tilsatt ARG-mål-sekvensene). Fortynningsserien ble brukt til å bestemme gen-kopiantall i vann- og isolatprøvene, samt metodens linearitet og amplifiserings effektivitet. Videre ble fortynningsserien satt opp i tre replikaer for å vurdere presisjonen til de ulike qPCR-analysene. Den analytiske sensitiviteten ble bestemt i et eget oppsett ved å analysere ti replikaer av de fire standardene i fortynningsserien med de laveste gen-kopiantallene.

Lineariteten er metodens evne til å gi resultater som er direkte proporsjonale med utgangskonsentrasjonen, der bestemmelseskoeffisienten (R^2) med en teoretisk verdi på 1,00 indikerer en perfekt sammenheng uten usikkerhet mellom to variabler ([Applied Biosystems, 2010](#)). Videre ble det tilstrebet at standardkurvenes lineære område dekket de laveste og høyeste kvantifiserbare gen-kopiantallene, samt at kurven inkluderte minst 5 \log_{10} konsentrasjoner som også er anbefalt av The

MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) ([Bustin et al., 2009](#)).

Effektiviteten til qPCR-analysen antyder hvor god amplifiseringen er, og der 1,00 (100 %) indikerer at hvert PCR-produkt dobles med hver syklus. Beregning av PCR effektiviteten er basert på stigningstallet som kommer frem av standardkurven ([Bustin et al., 2009](#)), og der stigningstallet $-3,3$ indikerer optimalt amplifisering ([Applied Biosystems, 2010](#)).

Det ble satt en terskel (Threshold) som vises som en horisontal linje i amplifikasjonskurven og forteller analysesoftwaren hvor den skal ta data. Når de produserte amplikonene (fluorescensnivået) overstiger terskelen angir brytningspunktet ved hvilket syklusnummer produktet ble påvist og kalles for kvantifiserings syklus (C_q). Terskelen settes i eksponentiell fase av amplifikasjonskurven og kan settes automatisk av analysesoftwaren der standardavviket til replikaene er lavest ([Applied Biosystems, 2010](#)). Jo høyere C_q -verdien er jo senere i PCR-reaksjonen har produktet blitt dannet, og gjenspeiler hvor mye DNA det i utgangspunktet var i prøven. C_q -verdier over 8 og under 35 er ønskelig ([Applied Biosystems, 2010](#)), men siden vannprøvene hadde en lav biomasse ble det valgt å ikke sette en C_q cut-off, som kunne ha ført til at sanne positive prøver ble forkastet. Høye C_q -verdier øker imidlertid sjansen for falsk positive resultater ([Bustin et al., 2009](#)) og kan resultere i høyere standard avvik ([Applied Biosystems, 2010](#)).

Presisjonen sier noe om analysens repeterbarhet og der C_q -verdiene til replikaene skal helst være like i samme oppsett ([Bustin et al., 2009](#)).

Sensitiviteten til analysen angir minste antall kopier i en prøve som lar seg påvise med en viss sikkerhet, og betegnes også som deteksjonsgrense ([Bustin et al., 2009](#)). I denne analysen ble av praktiske årsaker deteksjonsgrensen definert som den laveste konsentrasjonen der 90 % av de sanne positive prøvene detekteres. Den minste teoretisk mulige deteksjonsgrensen er 3 genkopier per PCR ([Bustin et al., 2009](#)).

Normalisering

Power SYBRTM green Master Mix inneholdt en passiv referanse (ROXTM-fargestoff) som ikke deltok i selve PCR-amplifikasjonen. Dette fargestoffet ble brukt til normalisering av signalet som avgis av DNA-

komplekset med SYBRTM green fargestoffet. Normaliseringen skjedde automatisk under dataanalysen og var nødvendig for å korrigere for fluorescens variasjoner forårsaket av endringer i konsentrasjon eller i volum. ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#))

Tolkning av resultatene, akseptkriterier og kvantitering

Amplikoner med uspesifikke smeltekurver og flere topper (basert på helningen til smelteprofiler) ble ansett for å være falske positive og ble derfor forkastet fra analysen. Videre ble prøver som krysset terskelen og ikke hadde en tydelig sigmoid kurve ekskludert fra videre beregninger.

Bortsett fra isolatprøvene ble alle qPCR-reaksjoner utført i tre replikaer. Gener identifisert i bare en av de tre replikaene ble sett på som falske positive og ekskludert fra videre analyser. Når et gen ble påvist i bare to av tre replikaer, ble gjennomsnittlig C_q av de to replikaene beregnet.

Ved absolutt kvantifisering sammenlignes C_q av en ukjent prøve med C_q -verdien i standardkurven som ble generert av standarder med kjent kopiantall ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)). Standardkurver (samt amplifikasjons- og smeltekurver) ble visualisert ved bruk av Standard Curve Analysis Software (Version 4.0, Thermo Fisher Scientific, USA), men siden dette programmet ikke tillot eksport av resultater i Microsoft Excel format ble programvaren StepOne Software (Version 2.3, Thermo Fisher Scientific, USA) brukt for eksport av rådataene, som inkluderte kopiantall av gener.

Begrensninger og feilkilder

SYBRTM green bindes til all dobbeltrådet DNA og er dermed ikke spesifikk for selve mål-sekvensene. ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)). Dersom det både ble dannet uspesifikke og spesifikke PCR-produkter og fluorescenssignalet krysser terskelen, så blir kopiantallet beregnet på grunnlag av alle PCR-produkter. Dette resulterer i falsk forhøyet kopiantall av mål-genet.

Sekundære strukturer og primer-dimer kan redusere PCR-effektiviteten og dermed også nøyaktigheten til qPCR-analysen ([Bustin et al., 2009](#)). Som påpekt under kvalitetssikring finnes det noen primer som både er selv- og kryss-komplementære. Dette kan generere falsk positive prøvesvar og er oftest utbredt i negative kontroller og prøver med lave konsentrasjoner av mål-sekvensen ([Thermo Fisher Scientific, 2011](#)).

Annealingstemperaturen er en kritisk parameter for reaksjonsspesifisitet. For lav temperatur kan føre til amplifisering av uspesifikke PCR-produkter, og for høy temperatur reduserer utbyttet av ønsket PCR-produkt ([Rychlik et al., 1990](#)). *tetM*-forward primer har en smeltetemperatur ved 46,5 °C, mens *tetM*-revers primeren har en smeltetemperatur ved 59,4 °C, og en forskjell på mer enn 5 °C er ikke anbefalt ([Thermo Fisher Scientific, 2022b](#)). Samme utfordring gjald også for 16S-primerparet. Videre kunne ikke den faktiske optimale temperaturen for annealing bestemmes eksperimentelt.

Falske positive prøvesvar kan oppstå på grunn av kontaminasjon. Selv om det ble passet på god hanskebruk og vask av benken, kan kontaminering ikke helt utelukkes. Dette var særdeles aktuelt ved 16S qPCR analysen, siden selv mikrober i luften lett kan kontaminere prøvene.

Falsk negative prøvesvar er et sensitivitets problem på grunn av reaksjonshemming, få mikroorganismer i prøvematerialet og sekvensulikheter.

Pipetteringsfeil kan ikke utelukkes selv med god teknikk, og det er usikkert når pipettene som ble brukt ble kalibrert sist. Ikke god nok kalibrerte pipetter kan bidra til feil.

Videre kan manuell registrering av resultater fra Excel til masteroppgaven bidra til feil.

3.3.5. Påvisning og identifisering av bakterier ved sekvensering

Ved sekvensering bestemmes nukleotidsekvensen av et DNA molekyl ([Nester et al., 2019](#)), og for påvisning og identifisering av bakterier ble det brukt 16S-23S rRNA regionen innenfor et operon ([Karst et al., 2021](#)). Formålet med sekvensering var å undersøke om vannprøvene inneholdt prioriterte patogener ([WHO, 2017](#)) og/eller indikatorbakterier for fekal belastning (Tabell V22.5). Videre ble isolatprøvene med usikker artsbestemmelse (MALDI-TOF: Score over 2.0 og kategori B) undersøkt.

16S/23S rRNA gener ble sekvensert ved hjelp av nanoporeteknologien, der det ble brukt en MinION flowcelle fra Oxford Nanopore Technologies. Dette er en chip med en elektrisk motstandsdyktig membran ([ONT, 2022b](#)) bestående av minst 800 nanoporer ([ONT, 2021](#)). På hver side av membranen er det en konstant spenning og porene er tilkoblet til en sensorbrikke ([ONT, 2022b](#)). DNAet som skal undersøkes prepareres med et motorprotein og en adaptersekvens som leder DNAet inn i poren. Ved

hjelp av motorproteinet tvinnes det dobbeltrådet DNA ut til enkeltrådet DNA ([ONT, 2022b](#)). Nukleotidene har forskjellige strømledninger og endringene i spenning (volt) registreres i sensoren når enkeltrådet DNA passerer gjennom poren ([ONT, 2022b](#)). Et program oversetter målingen av endringen i strøm til basepar (basecalling) og dermed bestemmes nukleotidrekkefølgen til DNAet ([ONT, 2022b](#)). Sekvensen til 16S/23S-genet sammenlignes med andre kjente sekvenser i databasen og dermed kan bakterier identifiseres.

Før sekvensering ble DNA-kvaliteten kontrollert blant annet ved gelelektroforese. Det er en metode som separerer DNA fragmenter basert på størrelse og ladning. DNAet blir tilført en gel bestående av et nettverk med porer, og ved å påføre en elektrisk spenning vil de negativ ladete nukleinsyre-molekylene bevege seg til den positive elektroden. Kortere molekyler beveger seg raskere og lenger enn lengre molekyler. Videre brukes det en markør der størrelsen på DNA-fragmentene er kjent. For visualisering benyttes et fluoriserende fargestoff der DNAet lyses opp når gelen utsettes for UV-lys. Dermed kan DNA undersøkes om den har lengden som ønskes før sekvensering. ([Alberts et al., 2020](#))

Utstyr og reagenser

Det ble brukt følgende utstyr og reagenser:

- PCR instrument
- Pipette og pipettespisser
- Magnetstativ
- Mastermix og primere
- 10 mM Tris-buffer
- Gel til elektroforese
- Sekvenseringsinstrument
- Vortex
- PCR- og eppendorfrør
- 3 M NaCl
- sterilt vann og is
- Gelelektroforese utstyr
- NanoDrop™ Lite / Qubit 3.0
- Mikrosentrifuge
- Rensekit (AMPure)
- Etanol (70 og 100 %)
- Sekvenseringsreagenser
- Gelelektroforese reagenser

Fremgangsmåte

Prøveforberedelse

Trippelprøvene (tatt 15., 16. og 17.12.2021) ble samlet ved at 10 µL av hver trippelprøve av råvannet ble samlet i et nytt eppendorfrør (30 µL totalt). For drikkevannsprøvene ble 50 µL av hver av triplikatene samlet (150 µL totalt) og DNA oppkonsentrert (30 µL totalt). En detaljert fremgangsmåte til oppkonsentrering av DNAet i drikkevannsprøvene er gitt i vedlegg 22. DNA-konsentrasjonen av både rå- og drikkevannsprøvene (for hver prøvetakingsdag) ble målt både med NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) og Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) med Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (LOT 2219290, Thermo Fisher Scientific, USA) i henhold til produsentens instruksjoner.

PCR-1: Merking av 16S-23S rRNA regionen

16S-23S rRNA regionen ble merket med et 16S/23S-primersett og et overheng/adapter i endene bestående av en unik molekylær identifikator (UMI) og en primer som ble bindingssted til PCR-2. Primerne (inklusive adaptore) ble publisert tidligere og er oppgitt i tabell V21.1. Merkingen foregikk ved en to syklus PCR foreslått av Karst et al. (2021) ([Karst et al., 2021](#)), med noen få endringer. Reaksjonsblandingen (50 µL) besto av 20,0 µL prøve (0,24-3,22 ng/µL DNA), 2,5 µL 16S-8F primer (10 µM; Merck, Tyskland), 2,5 µL 23S-2490R primer (10 µM; Merck, Tyskland) og 25,0 µL LongAmp™ Hot Start *Taq* 2X Master Mix (LOT 10125136, BioLabs, Storbritannia). Det ble brukt MicroAmp™ 8-Tube Strips (Thermo Fisher Scientific, USA) med Wall Cap Strips (BIO-RAD, USA) og analysert med PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, USA). Reaksjonsbetingelsene er oppgitt i tabell 3.2. Prøven ble derpå rensset med AMPure XP (Beckman Coulter, USA) i henhold til prosedyren oppgitt i vedlegg 22.

Tabell 3.2: PCR-reaksjonsbetingelsene til merkingen av 16S/23S-genområdet.

Steg	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Varmstart	95	1 minutt	1
Denaturering	95	20 sekunder	2
Annealing	55	30 sekunder	2
Forlengelse	65	6 minutter	2
Avsluttende forlengelse	65	5 minutter	1
Hold	4	∞	

PCR-2: Amplifikasjon (inkl. strekkoder)

Det UMI-merkede PCR-produktet (DNA-amplikonkopi av 16S/23S-området, UMI-ene og primersteder i begge ender) ble deretter amplifisert ved PCR rettet mot de primerstedene i endene. Primerne inneholdt i tillegg en sekvens som ble brukt som strekkode for prøvene, der sekvensene er oppgitt i tabell V21.1. Primer-/strekkodekombinasjonen til prøvene er oppgitt i tabell V22.2. Reaksjonsblandingen (50 µL) besto av 10,0 µL rensset PCR produkt, 10,0 µL sterilt vann (Fresenius Kabi AG, Tyskland), 2,5 µL av den gjeldende forward primeren (10 µM; Merck, Tyskland), 2,5 µL av den gjeldende revers primeren (10 µM; Merck, Tyskland) og 25,0 µL LongAmp™ Hot Start *Taq* 2X Master Mix (LOT 10125136, BioLabs, Storbritannia). Det ble brukt MicroAmp™ 8-Tube Strips (Thermo Fisher Scientific, USA) med Wall Cap Strips (BIO-RAD, USA) og analysert med PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, USA). Reaksjonsbetingelsene er oppgitt i tabell 3.3. Prøven ble deretter rensset med AMPure XP (Beckman Coulter, USA) i henhold til protokollen oppgitt i vedlegg 22. DNA konsentrasjon ble deretter målt med Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) og Qubit™ dsDNA HS Assay Kit

(LOT 2219290, Thermo Fisher Scientific, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. Lengden på DNAet ble kontrollert ved polyakrylamid gelelektroforese som er nærmere omtalt i vedlegg 22.

Tabell 3.3: PCR-reaksjonsbetingelsene til amplifikasjon av 16S-genområdet.

Steg	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Varmstart	95	1 minutt	1
Denaturering	95	20 sekunder	25
Annealing	60	30 sekunder	25
Forlengelse	65	6 minutter	25
Avsluttende forlengelse	65	5 minutter	1
Hold	4	∞	

Forberedelse av biblioteket

Samling av prøvene i en pool ble volumtilpasset etter DNA-konsentrasjonen (Tabell V22.3). Det samlede volumet (88 µL) ble deretter redusert ved hjelp av AMPure XP (Beckman Coulter, USA) og er nærmere oppgitt i vedlegg 22.

For videre preparering av prøvene ble det brukt Ligation Sequencing Kit (SQK-Q20 Early Access Kit) (LOT Q20EA.20.0002, Oxford Nanopore Technologies, Storbritannia) og utført i henhold til produsentens protokoll (Ligation sequencing amplicons (SQK-LSK112)). Kort fortalt ble endene til ampliconene reparert og tilsatt adenin på 3'-enden. På de forberedte endene ble det deretter ligert på sekvenseringsadaptere. Reagenser som ikke er en del av Ligation Sequencing Kit, men som inngår i protokollen SQK-LSK112 er oppført i tabell V22.4.

Sekvensering og dataanalyse

Det ferdig preparerte biblioteket (13,6 ng/µL) ble tilført MinION Flow Cell R10 (FLO-MIN112) (LOT 11002180, Oxford Nanopore Technologies, Storbritannia) i henhold til produsentens protokoll (Ligation sequencing amplicons (SQK-LSK112)). Sekvensering av de amplifiserte 16S/23S-gener ble utført på MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies, Storbritannia). Programmet MinKNOW versjon 21.10.4 (Oxford Nanopore Technologies, Storbritannia) samlet inn rådata og konverterte signalet til avlesninger (reads). For dataanalysen ble det brukt programmet EPI2ME (Oxford Nanopore Technologies, Storbritannia) med analyseverktøyet WIMP (What`s in my pot).

Kvalitetssikring

Kontroller

Det ble totalt brukt to negative kontroller. Trippelprøvene (NK1, NK2 og NK3) ble samlet i en DNA pool ved at 10 µL av hver av det autoklaverte, filtrerte og DNA ekstraherte sterile vannet ble samlet i et nytt eppendorfrør (30 µL totalt). Den andre negative kontrollen besto av sterilt vann og skulle kontrollere sekvenseringsanalysen.

Primer- og adapter valg

I motsetning til qPCR ble det brukt 16S/23S-primerpar som dekket både 16S og 23S rRNA genene. Den lange sekvensen (rundt 4 400 bp) inneholdt flere variable regioner som økte sjansen til å bestemme bakterier på artsnivå ([Karst et al., 2021](#)). Videre ble flere konserverte regioner sekvensert som gjorde det mulig å plassere arter fylogenetisk i høyere taksonomiske nivåer ([Karst et al., 2021](#)).

Rådataene generert ved nanopore-sekvensering er kjent for å ha en relativ høy feilrate (5-25 %), som resulterer i usikre artsbestemmelse. For å minimere feilrater ble det brukt en helt ny teknikk som gir høyere nøyaktighet på enkeltmolekylnivå og mindre artefakter (Chimera). Hvert 16S/23S-molekyl i prøvene ble merket med en unik sekvens (UMI) med en kjent lengde på 10 til 20 tilfeldige baser og som inneholder et gjenkjennelige indre mønstre. Etter sekvensering brukes UMIene til å sortere og analysere reads basert på deres originale 16S/23S-molekyl. ([Karst et al., 2021](#))

Videre ble det brukt et sekvenserings-kit som var i følge produsenten optimalisert for å oppnå en sekvenseringsnøyaktighet på 99 % eller mer ($Q \geq 20$) ([ONT, 2022c](#)).

Sekvensering og dataanalyse

Reads av dårlig kvalitet (Q-score under 8) ble fjernet. Videre ble kun reads med en lengde mellom 2 500 og 6 500 bp tatt med i dataanalyseringen.

Utførelse

Benken ble vasket med 10 % klorin før arbeidet. Utførelse og håndtering av prøvene og reagensene pågikk ved riktig hanskebruk. Videre ble det passet på gode grunnleggende pipetteringsteknikk og det ble utelukkende brukt pipettespisser med filter. All blanding der selve prøvematerialet og

enzymmer var inkludert ble utført ved å pipettere opp og ned fremfor vortex. Reagensene ble oppbevart i kjøleskap/fryseren frem til bruk, og det ble benyttet is for reagensene som krevde det.

DNAet til sekvensering var gjennom flere bearbeidingsstrinn oppbevart og stabilisert i Tris-buffer. DNAet ble rensset i henhold til protokollen Ligation sequencing amplicons (SQK-LSK112), og det ble passet på at vaskemidler (som etanol) ble fjernet for ikke å skade/inaktivere porene som dermed kan hemme sekvensering ([ONT, 2016](#)). Ved priming og tilførselen av biblioteket til flowcellen ble det passet på at ikke luftbobler ble introdusert, som også kan skade porene ([ONT, 2016](#)).

Begrensninger og feilkilder

Arbeid foregikk på benk (siden laboratoriet ikke var utstyrt med sikkerhetsbenk klasse 2 (LAF)), og særlig trinn i prosedyren som krevde tørking av pelleten i omgivelsesluft økte faren for forurensning.

Metoden som ble brukt krevde 1 µg amplicon DNA, men utbyttet etter samling av prøvene ga litt mindre DNA (0,901 µg (17 µL × 0,053 µg)). Videre krevdes ikke fragmentert DNA og selv om ikke vortex ble brukt kan også opp og ned pipettering føre til noe mekanisk fragmentering. Videre ble prøven tint og fryst to ganger før prepareringen til sekvensering startet. Dessuten ble drikkevannsprøvene oppkonsentrert og flere behandlingstrinn økte faren for både fragmentering og kontaminering. Renheten til DNAet ble bestemt ved hjelp av absorbansratio (NanoDrop Lite), men var svært usikker på grunn av lav biomasse. DNAet som ikke oppfyller kravene til mengde og kvalitet kan påvirke effektiviteten til sekvenseringen ([ONT, 2022c](#)).

Ved en feil ble det brukt Short Fragment Buffer i Ligation Sequencing Kit i stedet for Long Fragment Buffer. I følge protokollen brukes Long Fragment Buffer for DNA fragmenter lenger enn 3 000 bp, og Short Fragment Buffer for alle størrelser ([ONT, 2021](#)). Dette kan ha bidratt til at alle fragmentene ble rensset likt, fremfor å berike DNA-fragmenter som er lengre enn 3 000 bp ([ONT, 2021](#)).

Pipetteringsfeil kan ikke utelukkes selv med god teknikk, og det er usikkert når pipettene som ble brukt ble kalibrert sist. Ikke god nok kalibrerte pipetter kan bidra til feil.

En annen begrensning ved sekvensering er hvis referansedatabasen ikke inneholder informasjonen om mikroben som skal identifiseres, og dette gjelder særlig 16S–23S rRNA-regiondatabasen ([Peker et al., 2019](#)).

3.4. Dataanalyse og statistiske metoder

Alle dataanalyser ble utført i Excel™ 2016 versjon 2202 (Microsoft Corporation, USA). Fordeling av dataene ble vurdert ved bruk av histogrammer, sammenligning av gjennomsnitt og median, samt bestemmelsen av skjevhet.

Antatt normalfordelte data ble tolket ved hjelp av deskriptiv statistikk som gjennomsnitt, standardavvik, 95 % konfidensintervall (KI) og variasjonskoeffisienten. Tydelig skjev fordelte data ble beskrevet ved hjelp av median og minste og største verdi. Deskriptiv statistikk ble særlig brukt ved å vurdere presisjonen til metodene (tatt utgangspunkt i triplikatprøvene).

På grunn av svært lavt prøvevolum (tre avhengige [triplikater] og tre uavhengige [prøvetakingsdatoer] data per vanntype) mangles det på statistisk kraft i denne studien, og resultatene må tolkes med forsiktighet. Videre krevde testene for ikke normalfordelte data minst fire uavhengige observasjoner. Dermed ble det brukt toveis variansanalyse (ANOVA) (med gjentatte målinger) for vurderingen av både forskjellen mellom rå- og drikkevann, og forskjellen mellom prøvetakingsdatoene på alle dataene (uavhengig av fordelingen). Toveis ANOVA (med gjentatte målinger) ble imidlertid utført på \log_{10} transformerte data der prøveresultatene tydelig var skjevfordelt. Statistiske tester ble ansett som signifikante ved en p-verdi $< 0,05$.

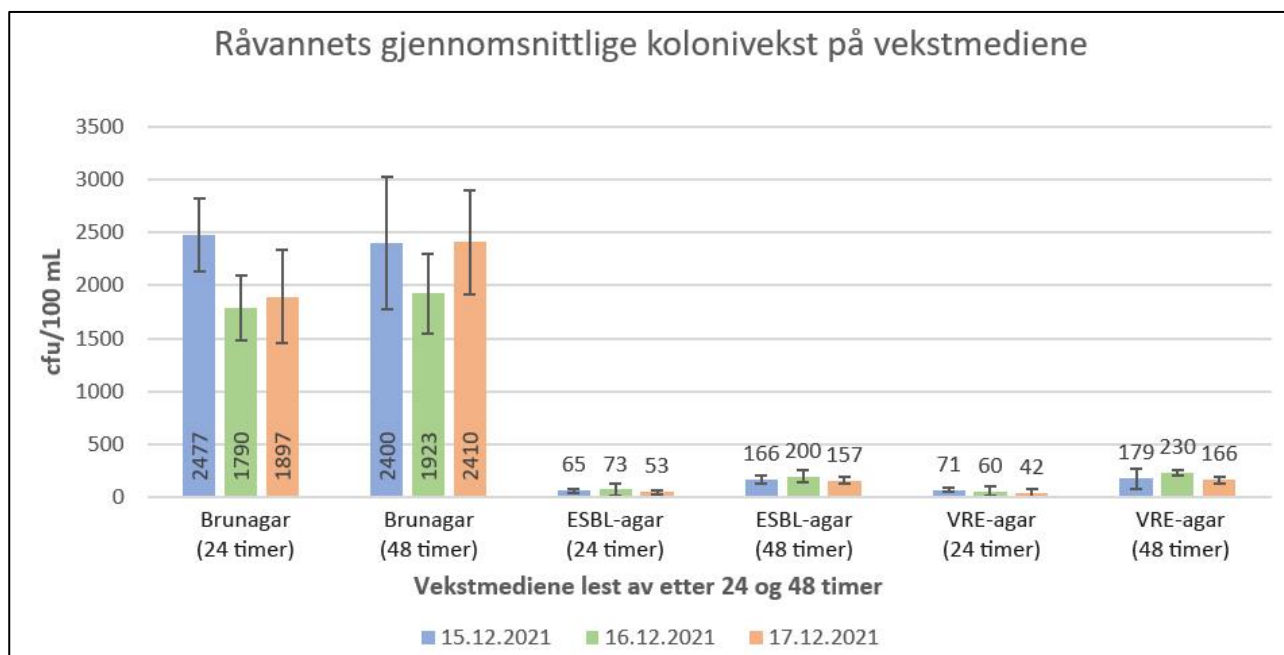
4. Resultater

4.1. Kvantifisering av dyrkbare bakterier

Temperaturen i både inkubatorskap og -rom var innenfor gitte grenser og CO₂ nivået på 5 % i inkubatorskapet hadde heller ingen avvik. De positive og negative kontrollene av vekstmediene ble godkjent og er oppført i vedlegg 1. Kontrollen av filtrene var negative, det vil si at det ikke var vekst på de tre filtrene etter 48 timer (vedlegg 2, figur V2.1). Et eksempel av veksten av både rå- og drikkevann er vist i vedlegg 2, henholdsvis figur V2.2 og V2.3. De telte koloniene på dyrkningsmediene er gitt i vedlegg 3, tabell V3.1, og tilhørende statistiske resultater er også oppført i vedlegg 3.

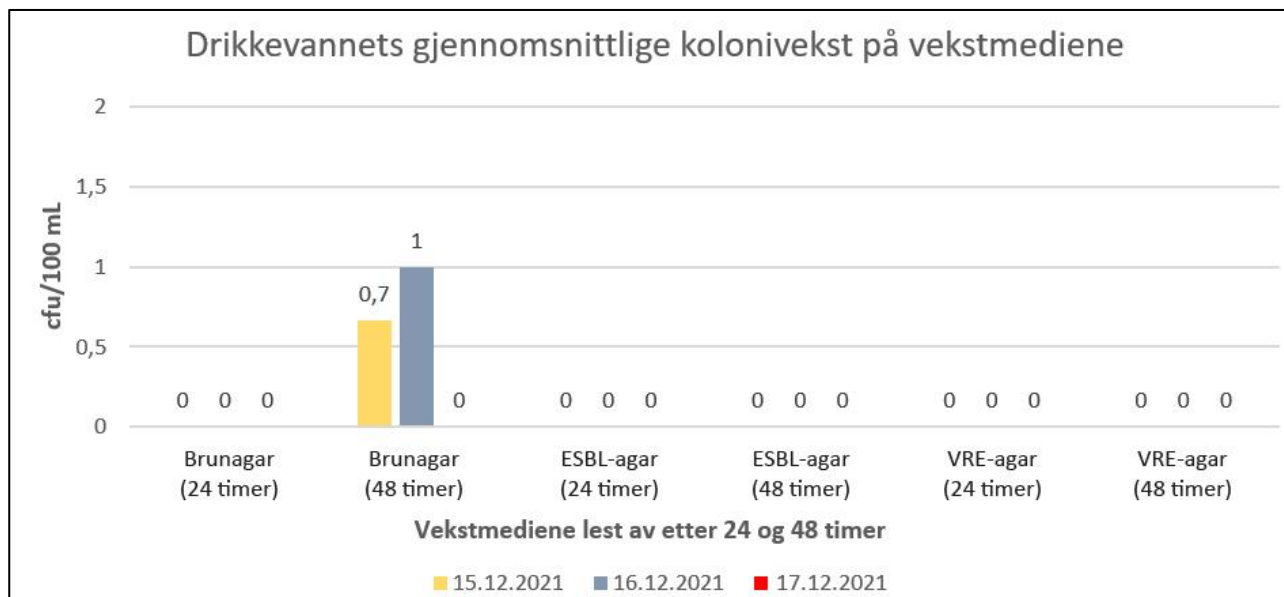
Det gjennomsnittlige antallet kolonidannende enheter (cfu) per 100 mL råvann er vist i figur 4.1. Samlet sett (for alle tre dager) vokste det gjennomsnittlig:

- 2 244 kolonier per 100 mL råvann på brunagar etter 48 timers inkubering, der minste verdien var 1 923 kolonier og største verdien 2 410 kolonier (95 % KI: 1 554 til 2 935 kolonier),
- 174 kolonier per 100 mL råvann på ESBL-agar etter 48 timers inkubering, der minste verdien var 157 kolonier og største verdien 200 kolonier (95 % KI: 119 til 230 kolonier),
- 192 kolonier per 100 mL råvann på VRE-agar etter 48 timers inkubering, der minste verdien var 166 kolonier og største verdien 230 kolonier (95% KI: 107 til 276 kolonier).



Figur 4.1: Det gjennomsnittlige antallet kolonidannende enheter (cfu) per 100 mL råvann på ulike vekstmedier lest av etter 24 og 48 timer. Usikkerhetsstolpene gjenspeiler 95 % konfidensintervall av triplikaten. Figuren er laget i Excel av Melanie Schreier.

Gjennomsnittlig cfu per 100 mL drikkevann er vist i figur 4.2. Av drikkevannsprøvene var det kun vekst på to vekstmedier (brunagar etter 48 timers inkubering) med henholdsvis 2 og 3 kolonier (prøvene tatt 15. og 16.12.2021). Tatt utgangspunkt på samme mediet og inkubasjonstiden vokste det gjennomsnittlig 1 koloni per 100 mL ferdig behandlet drikkevann, der største verdien var 3 kolonier og minste verdi var 0 kolonier (95 % KI: 0 til 1 koloni).



Figur 4.2: Det gjennomsnittlige antallet kolonidannende enheter (cfu) per 100 mL drikkevann på ulike vekstmedier lest av etter 24 og 48 timer. Figuren er laget i Excel av Melanie Schreier.

4.2. Identifisering av dyrkbare bakterier

Kontrollene for hvert oppsett ble godkjent og er vist i tabell 4.1, mens identifikasjon av utvalgte kolonier på vekstmediene som har en score over 2,00 er gitt i tabell 4.2. I tillegg finnes i vedlegg 4 MALDI-TOF analysesvarene fra alle undersøkte isolatene.

Tabell 4.1: Positiv og negativ kontroll for identifikasjon av kolonier ved bruk av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (Maldi-TOF).

Positiv kontroll			Negativ kontroll		
Identifikasjon	Score	Oppsett	Identifikasjon	Score	Oppsett
<i>Escherichia coli</i>	2,44	18.12.2021	-	0,00	18.12.2021
<i>Escherichia coli</i>	2,45	19.12.2021 plate 1	-	0,00	19.12.2021 plate 1
<i>Escherichia coli</i>	2,37	19.12.2021 plate 2	-	0,00	19.12.2021 plate 2

Tabell 4.2: Identifikasjon av utvalgte kolonier på vekstmediene som fikk en score over 2,00 ved bruk av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF). Score-verdien refererer til prøven som ikke står i parentes og «x» referer på hvilket vekstmedium bakterien ble identifisert med en score over 2,00.

Identifikasjon	Score og kategori	Påvist på prøve	Påvist på vekstmediet		
			Brun	ESBL ¹	VRE ²
<i>Aeromonas bestiarum</i>	2,26 (A)	1	x		
<i>Aeromonas encheleia</i>	2,08 (A)	2 (15)	x		
<i>Bacillus cereus</i>	2,24 (A)	14	x		
<i>Bacillus mycoides</i>	2,29 (A)	15	x		
<i>Bacillus pumilus</i>	2,14 (A)	7 (13)	x		
<i>Bacillus subtilis</i>	2,06 (A)	3 (7, 9, 13)	x		
<i>Elizabethkingia miricola</i>	2,25 (A)	2 (9)			x
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	2,19 (B)	7	x		
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	2,06 (B)	14	x		
<i>Micrococcus luteus</i>	2,24 (A)	6 (10)	x		
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2,37 (A)	1 (3)		x	
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	2,08 (A)	13	x		
<i>Paenibacillus macerans</i>	2,32 (A)	1			x
<i>Rahnella aquatilis</i>	2,49 (A)	1 (2, 7, 8, 13)		x	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,01 (A)	14		x	
<i>Pseudomonas corrugata</i>	2,05 (B)	13			x
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	2,24 (B)	8			x
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,31 (B)	9			x
<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,09 (A)	2 (3, 7, 8, 9, 13, 15)		x	x
<i>Pseudomonas protegens</i>	2,46 (B)	1 (2, 8, 14)		x	x
<i>Pseudomonas putida</i>	2,08 (A)	3			x
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	2,07 (B)	10	x		
<i>Serratia fonticola</i>	2,57 (A)	1 (2, 3, 7, 9, 13, 14, 15)		x	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,11 (A)	10	x		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,10 (A)	3			x

¹ ESBL: Ekstendert spektrum betalaktamase

² VRE: Vankomycinresistente enterokokker

4.3. DNA konsentrasjon til de filtrerte vannprøvene

Konsentrasjonen til det ekstraherte DNAet ble målt både med NanoDrop Lite og Qubit 3.0 og er oppgitt i vedlegg 5, tabell V5.1. Siden DNA konsentrasjonen er under deteksjonsgrensen til NanoDrop Lite er disse tallverdiene meget usikre og ikke tatt med i videre beregninger. Den gjennomsnittlige DNA konsentrasjonen i råvannsprøvene målt med Qubit 3.0 var 3,08 ng/μL, fra 1,88 ng/μL til 4,60 ng/μL (95 % KI: 2,09 til 4,07 ng/μL). Den gjennomsnittlige DNA konsentrasjonen i drikkevannsprøvene målt med Qubit 3.0 var 0,03 ng/μL, fra 0,02 ng/μL til 0,03 ng/μL (95 % KI: 0,02 til 0,04 ng/μL). Beregningen er vist i vedlegg 6. Det gjøres oppmerksom på at DNA konsentrasjonene til samtlige drikkevannsprøvene var under kvantifiseringsgrensen til Qubit 3.0 og er derfor usikre.

4.4. DNA konsentrasjon til isolatprøvene

DNA-konsentrasjon, absorbans og absorbansratio fra isolatene er oppgitt i vedlegg 5, tabell V5.2. Den gjennomsnittlige DNA konsentrasjonen i isolatprøvene målt med NanoDrop Lite var 55,4 ng/μL, fra 11,9 ng/μL til 195,8 ng/μL (95 % KI: 33,8 til 77,0 ng/μL). Beregningen er vist i vedlegg 6. Alle absorbansratio er like eller over 1,80 bortsett fra *Bacillus subtilis* som var på 1,45. Stammen var veldig seig og klissen, og dette kan ha bidratt til at renheten til DNAet ikke var tilstrekkelig.

4.5. Estimert av den totale bakteriemengden og 16S qPCR analyseparameter

77 reaksjoner hadde mer enn én topp ved smeltekurveanalysen og det ble påvist multiple topper i minst 1 replika i samtlige kontroller, standarder og prøver (tabell V9.1). Dette tyder på at det har oppstått et systematisk feil under 16S rRNA qPCR analysen, ved at det ble dannet uspesifikke PCR produkter i tillegg til målsekvensen. Siden de uspesifikke PCR produktene hadde topper særlig ved lavere smeltetemperaturer, kan det tyde på primer-dimer dannelse. Denne systematiske feilen bidrar til en usikker kvantifisering av 16S rRNA-gensekvensen.

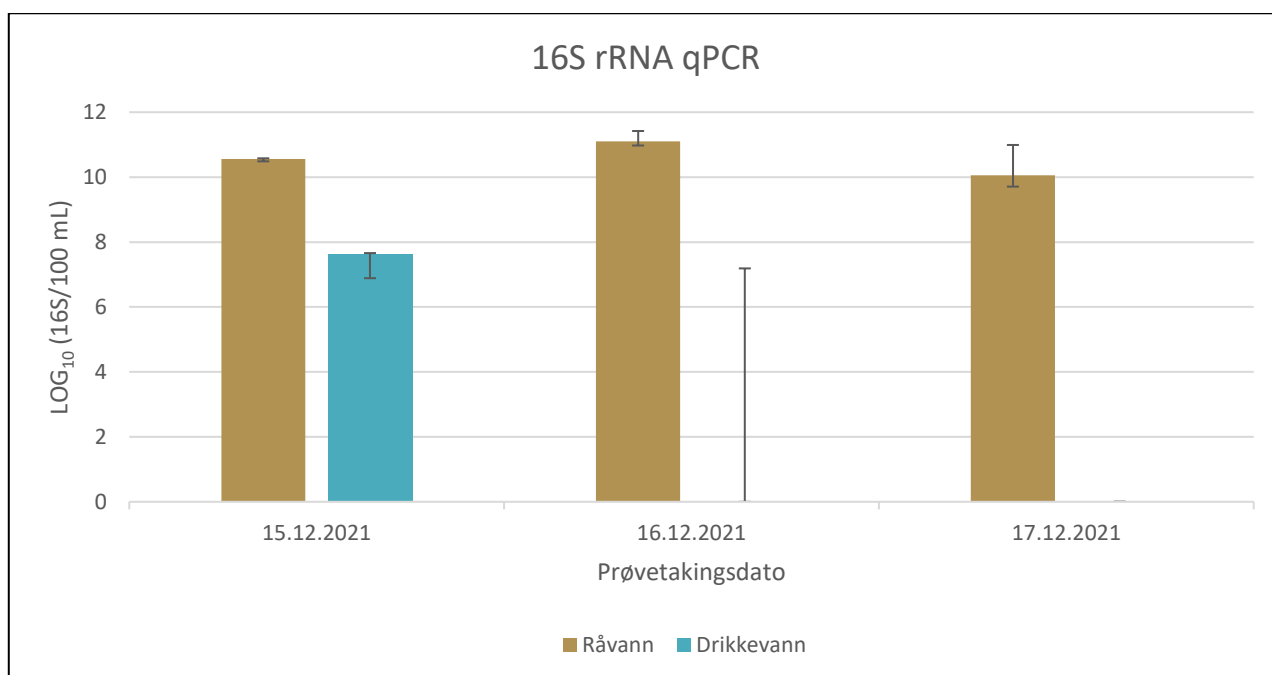
Kontaminering kan heller ikke utelukkes siden to replikaer av de negative PCR-kontrollene krysset terskelen ved syklus 39 og 40 (tabell V9.2). Smeltekurven til kontrollene (figur V9.1) viste tydelige topper rundt målsekvensens smeltetemperatur. Nærmere beskrivelse av mulige kontamineringsårsaker og hvorfor oppsettet likevel ble godkjent er gitt i vedlegg 9. Amplifikasjons-, smelte- og standardkurven til bestemmelsen av deteksjonsgrensen er vist i figur V9.3 og rådataene fra analysen er gitt i tabell V9.4.

Ved hjelp av standardkurven for 16S rRNA qPCR analysen (figur V9.2-C) ble det med programvaren Applied Biosystems StepOne Software v2.3 beregnet følgende parametre:

- Regresjonslinjen: $Y = -3,763 \times X + 44,115$
- Standardavvik: 11,274 sykluser
- Linearitet: $R^2 = 0,898$
- Standardfeil: 0,265 sykluser
- Amplifikasjons effektivitet: 84,387 %

Presisjonen til analysen ble dårligere ved lavere konsentrasjoner (<820 16S/5 μL) der standardenes standardavvik (til C_q) er vist i tabell V9.3. Det samme går også visuelt frem av standardkurven (figur V9.2-C), der spredning og avviket fra regresjonslinjen er høyere for standard 7 og 9. C_q over 36 ga dermed et mer unøyaktig svar.

Én replika av prøve nummer 7 (råvann, 16.12.2021) ble ekskludert fra videre statistiske analyser siden både amplifikasjons- og smeltekurven avviket for mye (striplet linje figur V9.4-B). Alle tre replikaer av prøve 4 og 10 lå under deteksjonsgrensen, men ble inkludert i videre beregning på grunn av smeltekurveanalysen og ved at fire av de seks replikaene lå direkte under deteksjonsgrensen (tabell V9.5). Dette har imidlertid bidratt til usikkerhet siden prøve 10 (drikkevann, 16.12.2021) ble vurdert som positiv, mens de to andre prøvene som var tatt samtidig var negative (tabell V9.5). Analyseresultater under deteksjonsgrensen var mer usikre på grunn av større standardavvik, og kan ha ført til falske positive prøvesvar. På annen side var analysens sensitivitet dårlig og kan har ført til falske negative prøvesvar. Siden resultatene til drikkevannsprøvene gjennom de tre prøvetakingsdatoene var tydelig skjev fordelt, ble det brukt ikke parametriske metoder for å beskrive dataene. Under forbehold av den systematiske feilen og analysens svakheter er medianen til vanntypene for hver prøvetakingsdato vist i figur 4.3 som \log_{10} (16S/100 mL).



Figur 4.3: Medianen til 16S rRNA gen-kopiantallet angitt log-transformert i 100 mL rå- og drikkevann. Prøvene ble tatt den 15., 16. og 17.12.2021. Usikkerhetsstolpene viser største og minste verdi av triplikatene. Figuren er laget i Excel av Melanie Schreier

Samlet sett (fra alle tre prøvetakingsdagene) var medianen i råvannsprøvene $3,6 \times 10^{10}$ 16S/100 mL, fra $1,1 \times 10^{10}$ til $2,0 \times 10^{11}$ 16S/100 mL. I drikkevannsprøvene var medianen under deteksjonsgrensen og største verdien var $4,3 \times 10^7$ 16S/100 mL.

4.6. Forekomsten av ARG

Alle rådataene (inkludert kvalitetsoppsummeringer/-vurderinger, smeltekurver, amplifikasjonskurver og standardkurver) og tolkning av resultatene er oppgitt i vedlegg 11-20. Det ble ikke påvist noen av de ti undersøkte ARG i hverken vann- eller isolatprøvene, og deteksjonsgrensen i denne studien varierte fra 5 til 50 genkopier per 5 µL (tabell 4.3).

Tabell 4.3: Deteksjonsgrensen til qPCR analysene, samt påvisning av de ti undersøkte antibiotika-resistensgenene i rå- og drikkevann, og isolatprøvene.

qPCR analysen	Deteksjonsgrense (GU/5 µL)	Målsekvensen påvist	
		Vannprøver	Isolatprøver
<i>CTX-M-15</i>	50	-	-
<i>CTX-M-27</i>	50	-	-
<i>CTX-M-32</i>	50	-	-
<i>TEM</i>	5	-	-
<i>OXA-48</i>	50	-	-
<i>OXA-58</i>	50	-	-
<i>vanA</i>	50	-	-
<i>tetM</i>	5	-	-
<i>mcr-1</i>	5	-	-
<i>sul1</i>	5	-	-

4.7. Bakteriepåvisning/-identifikasjon

DNA-kvaliteten før sekvensering er oppgitt i vedlegget, der DNA-lengden er vist ved hjelp av gelelektroforese i figur V22.1 (isolatprøver) og i figur V22.2 (vannprøver). Tabell V5.3 og V5.4 oppgir DNA konsentrasjon (ng/µL) og absorbansratio (A260/A280) for henholdsvis vann- og isolatprøver.

Informasjonen om analysen etter sekvensering fra MinKNOW er gitt i tabell V23.1. Translokasjons-grafen (Figur V23.8-A) viser hastigheten av DNA-tråder som passerte gjennom porene i løpe av sekvenseringstiden. Medianen til translokasjonshastigheten holdt seg relativt stabil slik at DNA-trådene har brukt omtrent samme tid til å bevege seg gjennom porene i løpe av sekvenserings-eksperimentet. Videre var rundt 1 000 kanaler aktive ved sekvenseringsstart (Figur V23.6), og aktiviteten til porene gjennom sekvenseringen er vist i figur V23.4 og figur V23.5. Et bibliotek av god kvalitet vil bli indikert med en høyere andel porer i sekvenseringstilstand enn åpne tilgjengelige porer, porer i gjenopprettingstilstand eller inaktive porer ([ONT, 2016](#)). Dette har vært tilfelle i starten av

sekvensering frem til rundt 24 timer (Figur V23.4). Siden det heller ikke var en stor andel inaktive porer i starten av eksperimentet (figur V23.4 og figur V23.5) kan det tyde på at det ikke ble luftbobler introdusert ved priming og/eller tilførselen av biblioteket til flowcellen. Dette gir samlet sett en indikasjon på at DNA-biblioteket var av god kvalitet og at flowcellen fungerte godt.

Q-score-grafen (Figur V23.8-B) viser en median på Q 9 i starten av eksperimentet som betyr litt under 90 % nøyaktighet av basecalling, men sank under Q 8 etter rund 32 timer.

Etter sekvenseringen skulle prøvene skilles fra hverandre og UMI-sekvensene brukes for å sortere reads. Imidlertid bidro den relativt dårlige nøyaktigheten av basecalling til at primerkombinasjonene/strekkodene til prøvene var utfordrende til å skilles fra hverandre, samt at «pipeline»-kommandoer publisert av Karst et al. (2021) ([Karst et al., 2021](#)) ikke fungerte på dataene. Det var heller ikke mulig å skille prøvene fra hverandre i programmet EPI2ME med den type merking av prøvene som ble brukt. Dette og mangelen på tidskapasitet førte også til at reads ikke kunne kvalitetsikres utover grensesetting på Q-score (Q 8) og read lengde (2 500 – 6 500 bp) i EPI2ME-plattformen.

Under forbehold av dårlig basecalling-nøyaktighet og utilstrekkelig kvalitetssikring til sekvenseringsdataene ble totalt 2 653 959 reads generert med en gjennomsnittlig lengde på 2 168 bp, hvorav 495 508 reads kunne tilordnes til bakterier etter lengde og Q-score filter. Antall reads per art/slekt av interesse er gitt i tabell 4.4. Utfyllende dataanalysestatistikk for de samlede prøvene fra EPI2ME rapporten er oppført i tabell V23.2.

Tabell 4.4: Antall reads per art eller slekt av interesse i de samlede prøvene (DNA-pool).

Årsak av interesse		Art / slekt	Antall reads
	Indikatorbakterier (fekal forurensning)	<i>Clostridium perfringens</i>	39
		<i>Enterococcus faecalis</i>	6
		<i>Enterococcus faecium</i>	51
		<i>Escherichia coli</i>	628
Prioriterte patogener		<i>Acinetobacter baumannii</i>	128
		<i>Campylobacter spp.</i>	246
		<i>Enterobacter spp.</i>	29
		<i>Haemophilus influenzae</i>	0
		<i>Helicobacter pylori</i>	5
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	437
		<i>Morganella spp.</i>	9
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	14
		<i>Proteus spp.</i>	11
		<i>Providencia spp.</i>	10
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	156
		<i>Salmonella spp.</i>	1 194
		<i>Serratia spp.</i>	16
		<i>Shigella spp.</i>	1
		<i>Staphylococcus aureus</i>	234
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6

4.8. Analyser utført av MOVAR og Eurofins

MOVAR hadde utført analyser av rå- og drikkevann i samme uken som prøvene til denne studien ble tatt. Resultater fra undersøkelsen av farge og turbiditet av vannprøvene er gitt i tabell V24.2. Videre bruker MOVAR et akkreditert eksternt laboratoriet som hadde undersøkt flere parameter til rå- og drikkevann, samt tre stasjoner på ledningsnett. Resultatene fra Eurofins er oppgitt i vedlegg 24, tabell V24.1 og V24.3.

5. Diskusjon

Drikkevannskvaliteten er generelt svært god i Norge ([Steinberg et al., 2021](#)), men forurensning av akvatiske miljø ved tilføring av både ARB, ARG og antibiotika utgjør en trussel mot menneskers helse ([Simonsen et al., 2020](#)). Årsaker til vannforurensning i Norge kan være avrenning fra landbruk og kloakkutslipp ([Jørgensen et al., 2017a](#)). I 2018 ble det brukt gjennomsnittlig rundt 2,8 tonn husdyrgjødsel per dekar jordbruksareal ([Rivedal et al., 2022](#)), og 15 % av befolkningen var ikke tilknyttet til kommunal avløpstjeneste i Norge i 2020 ([Statistisk sentralbyrå, 2021a](#)). Videre ble det i 2021 avslørt at 50 av 55 kontrollerte kommuner ikke hadde god nok oversikt over tilstanden til avløpssystemet, og at nesten halvparten manglet oversikt over utslippet fra avløpssystemet ([Miljødirektoratet, 2022](#)). Avløpsrensaneanlegg vil dessuten bare delvis fjerne bakterier i renseprosessen, slik at rensset avløpsvann fortsatt kan inneholde betydelige mengder ([Schwermer et al., 2018](#)).

Selv om antibiotikaforbruk i Norge i forhold til andre land er lavt ([Bruyndonckx et al., 2021](#)), og attpå til har gått ned i de siste årene, har allikevel forekomsten av antibiotikaresistens steget ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). Økt reisevirksomhet har ført til at stadig mer multiresistente bakterier oppdages her i landet ([Simonsen et al., 2020](#)), og disse mikrobenes kan finne veien via kloakken til drikkevannskilden. Råvannet som brukes til drikkevannsproduksjonen skal beskyttes mot forurensning ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)), men 100 % beskyttelse er umulig å oppnå. Forurensning av akvatiske miljø inkluderer også antibiotika som ikke er lett å fjerne med eksisterende vannbehandlingsprosesser, og kan dermed bidra til at ARG kan spre seg blant bakterier via horisontal genoverføring ([Khan et al., 2020](#)). I en nyere studie ble ARG påvist i norsk avløpsvann og i Nitelva ([Schwermer & Uhl, 2021](#)), og ARG i menneskelige patogener kan ha sin opprinnelse fra miljøet ([Bennett et al., 2019](#)). Det er en rekke utenlandske studier som viser at det ble funnet ARB ([Tanner et al., 2015](#)) og ARG ([Zhang et al., 2021](#)) i vannmiljøer og at drikkevann kan være en potensiell spredningsvei, der ARG ble påvist i drikkevannet både i Europa, Asia og Amerika ([Khan et al., 2020](#)).

Kommunene Moss, Råde og Vestby henter vann fra Vansjø og Vansjø Vannverk leverer drikkevann til 70 000 mennesker ([MOVAR, 2021](#)). Drikkevannskilden og dens omkringliggende nedbørfelt er stort og er sterkt påvirket av menneskelig aktivitet. Vannbransjen har ansvar for å kunne raskt håndtere og vurdere risikoen overfor trusler mot vannforsyningen. Siden det ikke finnes noe data om omfanget av forekomsten av antibiotikaresistens i drikkevann, og Vansjø vannverk etter egne utsagn ikke har spesifikt undersøkt vannet med tanke på antibiotikaresistens, var det derfor hensiktsmessig å

analysere forekomsten av ARG og ARB i rå- og drikkevannet til Vansjø Vannverk. Videre skulle det vurderes om norsk drikkevann er bidragsyter til spredning av antibiotikaresistens.

Prøvene fra et av Norges rundt 2 000 vannverk kan bare gi en liten pekepinn og utvalget er derfor ikke representativt for å konkludere for hele Norge. Videre var utvalget av vannverket ikke tilfeldig og er dermed ikke en randomisert studie.

Det påpekes at alle reagenser og vekstmediene som ble brukt i denne studien var oppbevart i henholdt til produsentenes anbefalinger og innenfor holdbarhetsdato. Videre ble alt laboratoriearbeid utført av én person som minimerer tilfeldige feil.

5.1. Kvantifisering av dyrkbare bakterier og identifisering av utvalgte stammer

18 vannprøver (triplikater på tre etterfølgende dager) fra to ulike vanntyper (rå- og drikkevann) ble analysert for levedyktige og dyrkbare bakterier, med vekt på prioriterte patogene bakterier. Det var vekst i alle råvannsprøver på alle dyrkningsmedier, mens det kun var svært lite vekst i 2 av 9 drikkevannsprøver, og kun på det mest næringsrike mediet. Ingen patogene bakterier ble detektert.

5.1.1. Kvantifisering av dyrkbare bakterier

I rutinedriften inkuberes ESBL-skålene i opptil 24 timer og VRE-skålene inntil 48 timer. I denne studien ble alle skålene, inkl. brunagaren, inkubert i opptil 48 timer. Videre ble det ikke fulgt noen standarder for kvantitering av bakterier i vannprøver, som resulterte i at telling av kolonier fra det filtrerte råvannet på brunagaren ga et meget usikkert tall. Etter 48 timer hadde bakteriekoloniene blitt så store at de dekket over de mindre koloniene. Triplikatprøvene tatt den 15. desember 2021 av råvannet dyrket på det mest næringsrike mediet, hadde en variasjonsbredde på 440 kolonier/100 mL etter 48 timers inkubering. Dette ga en variasjonskoeffisient på 10 %. Differansen mellom største og minste verdi på ESBL- og VRE-mediene med henholdsvis 31 og 71 kolonier/100 mL resulterte i variasjonskoeffisienter på 9 % og 21 %. Liknende høy spredning mellom triplikatene sees også på råvannprøvene fra 16. og 17.12.2021. Selv avlesning etter 24 timers inkubering ga en stor variasjonsbredde med 250, 240 og 340 kolonier/100 mL av det filtrerte råvannet dyrket på brunagaren henholdsvis den 15., 16. og 17.12.2021. Kvantitering av dyrkbare bakterier fra råvannet hadde

dermed en dårlig presisjon (tabell V3.2). Presisjonen av kvantitering av dyrkbare bakterier fra drikkevannet kunne ikke vurderes nærmere, siden det kun var vekst på 2 av totalt 27 dyrkningsmedier og kun henholdsvis 2 og 3 kolonier/100 mL etter 48 timers dyrkning.

Siden det kun var vekst av drikkevannsprøvene på brunagar etter 48 timers inkubasjon ble denne tatt som utgangspunkt for å vurdere forskjellen av dyrkbare bakterier ved de tre prøvetakningsdatoene, og for å vurdere forskjellen mellom rå- og drikkevann generelt. Toveis ANOVA (med gjentatte målinger) antyder at det var en signifikant forskjell både mellom prøvetakningsdatoer ($p < 0,05$) og mellom rå- og drikkevann ($p < 0,01$) (tabell V3.3).

Videre hadde Eurofins analysert prøver av rå- og drikkevann tatt den 13.12.2021. Der ble det påvist 25 koliforme bakterier per 100 mL råvann, mens det ikke ble påvist bakterier i drikkevann (kimtall: 0/mL). Selv om dataene på grunn av ulike datoer og metoder ikke direkte er sammenlignbare med resultatene fra studien så antyder alle analysesvarene at vannbehandlingen var svært effektive når det gjelder å fjerne/inaktivere dyrkbare bakterier.

5.1.2. Isolering og identifisering av utvalgte stammer

Identifisering av opptil ti kolonier per prøve ga et tilfeldig utvalg basert på morfologi som liknet patogener og da særlig fargede kolonier på kromskålene. Det ble totalt 95 isolater undersøkt ved hjelp av MALDI-TOF hvorav 54 stammer fikk en score lik eller over 2,00. Av disse 54 stammer var det 25 ulike arter der syv ble kategorisert med «B». Dette gjelder to *Lysinibacillus spp* og fem *Pseudomonas spp* som betyr at disse artsbestemmelsene hadde en lav konfidens. Det vokste 2 kolonier med *Micrococcus luteus* på drikkevannsprøven tatt 15.12.2021 og 3 kolonier med henholdsvis *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas spp* og *Staphylococcus epidermidis* på drikkevannsprøven tatt 16.12.2021. Av de 25 stammene var det kun én som var av klinisk interesse, *Stenotrophomonas maltophilia*, og ble isolert og identifisert i én råvannsprøve.

5.2. Estimat av den totale bakteriemengden i vannprøvene

Den gjennomsnittlige DNA konsentrasjonen i råvannsprøvene målt med Qubit 3.0 var 3,08 ng/ μ L, fra 1,88 til 4,60 ng/ μ L (95 % KI: 2,09 til 4,07 ng/ μ L). Den gjennomsnittlige DNA konsentrasjonen i drikkevannsprøvene målt med Qubit 3.0 var 0,03 ng/ μ L, fra 0,02 til 0,03 ng/ μ L (95 % KI: 0,02 til 0,04 ng/ μ L).

Siden biomassen var svært lav i drikkevannsprøvene og under kvantifiseringsgrensen (0,2 ng) til Qubit 3.0 ville 16S qPCR gitt et bedre estimat for den totale bakteriemengden enn DNA konsentrasjonsmålingen. På grunn av at det har oppstått en systematisk feil under 16S rRNA qPCR analysen (ved at det ble dannet uspesifikke PCR produkter i tillegg til mål-sekvensen) har estimatet av den totale bakteriemengden i vannprøvene blitt usikker.

På bakgrunn av dataene fra en ni punkts 10-gangers fortyningsserie av *E. coli* CCUG 10979 (EC1-EC9) (fra $8,2 \times 10^7$ til 0,82 16S-genkopier/5 μ L) ble det generert en standardkurve. Metodens effektivitet ble deretter beregnet til 84,4 %, som ikke er helt optimalt. Dette kan skyldes blant annet en ikke optimal annealingstemperatur og dannelsen av uspesifikke PCR-produkter som minker tilgang til reagenser til dannelsen av spesifikke produkter. Videre tilsier metodens linearitet at rundt 90 % ($R^2 = 0,898$) av resultatene viste en direkte sammenheng mellom C_q -verdiene og antall 16S-genkopier per 5 μ L. Basert på at fortyningsserien ble satt opp i tre replikaer kunne det konkluderes med at repeterbarheten til 16S rRNA qPCR-analysen var god for prøver med et kopiantall av 16S-gener over 820 GU/5 μ L (standardavvik C_q for standardene EC1-EC6: 0,048-0,226 sykluser (tabell V9.3)). For prøver med mindre 16S-genkopier enn 820 GU/5 μ L var analysens presisjon dårligere (standardavvik C_q for standard EC7 (82 GU/5 μ L): 2,031 sykluser (tabell V9.3)). Analyseringen av ti replikaer av EC9 (0,82 GU (6/10 positive)), EC8 (8,2 GU (3/10 positive)), EC7 (82 GU (8/10)) og EC6 (820 GU (10/10)) ga en deteksjonsgrense på 820 GU/5 μ L.

Under forbehold at det har oppstått et systematisk feil og metodens begrensninger, var medianen av 16S-genkopier i råvannsprøvene (fra alle tre dagene) $3,6 \times 10^{10}$ 16S/100 mL, fra $1,1 \times 10^{10}$ til $1,3 \times 10^{11}$ 16S/100 mL. På grunn av uspesifikke PCR-produkter er medianen mest sannsynlig noe lavere og 16S-gen-kopiantallet er omtrent på en lignende nivå som i Nitelva, som hadde rundt $3,2 \times 10^8$ 16S/100 mL ([Schwermer & Uhl, 2021](#)). I tillegg ble det ikke brukt eksakt samme metoden som gjør en direkte sammenligning utfordrende.

I drikkevannsprøvene var medianen under deteksjonsgrensen med en største verdi på $4,3 \times 10^7$ 16S/100 mL. Det fantes ingen sammenligningsgrunnlag tilgjengelig for vurderingen om maks-verdien var bra eller dårlig.

Videre kan ikke 16S-genkopiantallet direkte brukes for å si noe om antall bakterieceller, siden forekomsten av 16S-genet i bakterier varierer fra 1 til 15 eksemplarer ([Perisin et al., 2016](#)).

Toveis ANOVA (med gjentatte målinger) antyder at det var en signifikant forskjell både mellom prøvetakningsdatoer ($p < 0,01$) og mellom rå- og drikkevann ($p < 0,01$) (tabell V9.7). Denne analysen må likevel tolkes med forsiktighet siden dataene selv etter transformeringen var tydelig skjev fordelt, samt at variasjonen innenfor triplikatprøvene var store. Dersom det tas kun utgangspunkt av minste verdi, median og største verdi til vannprøvene som ble tatt på de tre prøvetakingsdatoene, så ses det en trend der 16S-gen forekomsten viste ingen betydelig variasjon på alle tre dagene i råvannsprøvene (figur 4.3). For drikkevannsprøvene varierte 16S-gen forekomsten derimot tydelig på de tre dagene (figur 4.3). Den store variasjonen skyldes mest sannsynlig lav biomasse i utgangspunktet for særlig drikkevannsprøvene og at 16S rRNA qPCR analysen hadde en noe dårligere sensitivitet. Metodens begrensninger kan ha ført til både falske positive og falske negative prøvesvar til drikkevannet og resultatene må tolkes med forsiktighet.

Tatt utgangspunkt i både DNA konsentrasjonsmålinger og 16S rRNA qPCR analysen for vannprøvene, så ser det ut som at bakterie DNA reduseres en god del (99 % ifølge DNA-konsentrasjonsmåling) i løpet av vannbehandlingsprosessen. Samtidig antyder drikkevannsprøvene fra 15.12.2021 at ikke alt DNAet ble fjernet, slik at det potensielt også kunne finnes ARG i det resterende materialet. Dette ville støttes av en internasjonal studie ([Zhang et al., 2019](#)). På en annen side kan dette ikke fastslås med de metodene som ble brukt i denne studien. DNA konsentrasjonen til drikkevannsprøvene var svært lave og under kvantiteringsgrensen til måleinstrumentet, og 16S rRNA qPCR analysen var preget av en systematisk feil, slik at vurderingen av spredningspotensialet ut i fra denne studien ikke har godt nok grunnlag.

5.3. Forekomsten av 10 utvalgte antibiotikaresistensgener

ARG kan gi bakterien resistens mot en hel rekke av antibiotika og multiresistente bakterier skaper en enorm behandlingsutfordring.

5.3.1. Kvantifisering av ulike ARG i vannprøvene

Vannprøvene (n=18) ble screenet for tilstedeværelse av ti klinisk relevante ARG mot 5 antibiotikaklasser: betalaktamer (*CTX-M-15*, *CTX-M-27*, *CTX-M-32*, *TEM*, *OXA-48*, *OXA-58*), sulfonamider (*sul1*), tetrasykliner (*tetM*), glykopeptider (*vanA*) og polymyxiner (*mcr-1*). Det var overraskende at det ikke ble påvist noen av de undersøkte ARG i vannprøvene, siden det ble funnet lave konsentrasjoner av ARG i norske drikkevannsslamprøver ([Ullmann et al., 2019](#)), samt at det ble detektert diverse ARG i Nitelva ([Schwermer & Uhl, 2021](#)). Imidlertid kan ikke vannprøvene fra Vansjø direkte sammenlignes med disse studiene. Slammet er stoffer som renses ut av råvannet sammen med fellingskjemikalier, og slamprøvene er svært oppkonsentrert i forhold til råvann. Siden Ullmann et al. (2019) påviste kun lave konsentrasjoner av ARG i slammet, så er det en forklaring at de undersøkte ARG ikke ble påvist i råvannet. Videre viser Ullmann et al. (2019) at vannbehandlingsmetodene renses bort ARG fra drikkevannet. Heller ikke prøvene fra Nitelva kan direkte sammenlignes med Vansjø, siden Nitelva er en forholdsvis liten elv som er mottaker for avløpsvann fra et større avløpsrenseanlegg ([Schwermer & Uhl, 2021](#)). Selv om innsjøen Vansjø også mottar noe kloakkforurensning, så er fortynningen mye større. Det finnes ikke data om forekomsten av ARG i norske råvannskilder, slik at det ikke finnes gode nok sammenligningsgrunnlag for resultatene fra denne studien. At det ikke ble påvist *sul1* kan tyde på at råvannet var lite påvirket av mennesker under prøvetakingstidspunktet, siden dette genet også ble brukt som genetisk markører assosiert med antropogen påvirkede miljøer ([Cacace et al., 2019](#)).

At det ikke ble påvist noen av de ti undersøkte ARG betyr ikke nødvendigvis at de ikke er tilstede i vannprøvene. Det er flere faktorer som kan innvirke på testresultater, og det mistenkes at en kombinasjon av lav forekomst av ARG og den lave biomassen i denne studien, kan være en forklarende årsak. Siden det ble lite eller ingen 16S rRNA-gener påvist i drikkevannsprøvene, ble det heller ikke forventet å kunne påvise ARG i disse prøvene.

Det kan heller ikke utelukkes en metode-feil. Siden standarden (plasmid med syntetisk sekvens av alle mål-gensekvenser) ikke kunne måles var beregningen av gen-kopiantallet basert på teoretisk GU/5 µL. En deteksjonsgrense på 5 GU/5 µL kan dermed i praksis ha vært høyere og testingen for deteksjonsgrensen burde muligens ha inkludert enda en log₁₀ reduksjonen. Særlig *sul1* qPCR analysen kan tyde på at kriteriene for å kalle en prøve for falsk positiv på grunnlag av lavt GU (i forhold til den teoretisk lavest mulige kopi antallet), kan ha vært feil. Dermed ville sanne positive prøver feilaktig bli tolket som falsk positiv.

At prøver har krysset terskelen og ble likevel tolket som falsk positiv kan også ha vært hensiktsmessig, siden kryssreaksjoner ikke kunne utelukkes ved primerne som ble valgt. Dette kan styrkes ved å se nærmere på isolatprøvene som krysset terskelen, men likevel ble tolket som falsk positiv. Der var gen-kopiantallet (selv under forbehold at gen-kopi-beregningen var basert på unøyaktig angitte standardkonsentrasjoner) likevel svært lav i forhold til DNA-utgangskonsentrasjonen til isolatprøven.

5.3.2. Påvisning av ulike ARG i isolatene

Isolatprøvene (n=25) ble også undersøkt for de samme ti ARG, men ingen stammer ble vurdert til å være positive for ett eller flere av mål-genene. Imidlertid kan heller ikke her utelukkes en metodefeil, siden DNAet til isolatprøvene ikke ble rensset og kan ha inneholdt stoffer som hemmet PCR. Absorbansratioen (A260/A280) til samtlige isolatprøver var imidlertid $\geq 1,80$ (bortsett fra *Bacillus subtilis* (1,45)) som indikerer ren DNA.

5.4. Påvisning av indikatorbakterier og patogener, samt identifisering av utvalgte isolater

Ved 16S/23S rRNA sekvensering var det mulig å undersøke vannprøvene (n=6) om tilstedeværelsen av indikatorbakterier for fekal forurensning og global prioriterte patogener. Videre ble isolatprøvene (n=7) sekvensert som fikk en usikker artsbestemmelse ved MALDI-TOF analysen.

Både isolatprøvene (Figur V22.1) og vannprøvene (Figur V22.2) viste tydelige bånd ved rundt 600 bp og 4 400 bp. Bånd ved rundt 600 bp kan tyde på uspesifikke PCR-produkter, mens det forventete PCR-produktet hadde en lengde på rundt 4 400 bp. Imidlertid var båndet «slørete» som indikerer varierende lengder av den ønskede sekvensen. Absorbansratioen (A260/A280) til vannprøvene varierte fra 1,18 til 1,94, der 5 av 6 prøver var under 1,8. Den lave absorbansratioen kan tyde på dårlig renhet til DNAet, men skyldes mest sannsynlig analysens begrensning ved lav biomasse. DNA kvaliteten før sekvenseringen var dermed noe usikker.

Sekvenseringsrapporten fra MinKNOW er i samsvar med resultatet fra gelelektroforesen når det gjelder read-lengden i forhold til antall baser (Figur V23.2 og Figur V23.3). Figur V23.3-B indikerer at flest baser ble avlest under den forventede read-lengden for eksperimentet. Den kumulative output grafen (Figur V23.1) viser videre at en stor andel reads/baser ikke har bestått kvalitetsfilter på Q 8. Kvalitetsanalysen av sekvenseringseksperimentet indikerte at DNA-biblioteket var av god kvalitet,

men en oppbygging av porer som var i gjenopprettingstilstand og inaktive over tid kan tyde på at biblioteket kan ha inneholdt forurensninger. Forurensninger og osmotisk ubalanse kan blokkere porene og/eller skade membranen ([ONT, 2016](#)). DNAet til isolatprøvene ble ikke rensset noe ytterligere etter DNA ekstraksjon med kokemetoden, bortsett med AMPure. Siden alle prøvene ble samlet i en pool kan dermed biblioteket ha inneholdt stoffer som kunne hemme både PCR og sekvensering. På den annen side er sekvenseringstiden til flowcellen begrenset til rundt 72 timer, avhengig av tilstrekkelig med buffer og om nanoporene er oppbrukt ([ONT, 2022a](#)). Grafene som viser aktiviteten til porene (V23.4-23.6) indikerer at kjøringen burde ha blitt stoppet etter rundt 32 timer siden kvaliteten på sekvenseringeksperimentet ble dårligere. Etter 52 timer ble det videre nesten ikke sekvensert noen flere baser lenger (Figur V23.1).

Nøyaktigheten ved basecalling var ikke så god som forventet med en median på litt under 90 % (Q9). Hva som var årsaken til den relativ lave nøyaktigheten kan være sammensatt. Både Flow Cell R10 (FLO-MIN112) og Ligation Sequencing Kit (SQK-Q20+) var tidlig tilgangsprodukter og dermed helt nye produkter på markedet. Imidlertid peker resultater fra gelelektroforesen på fragmentert og/eller uspesifikke PCR produkter. Lav biomasse, usikkerheten om renheten til DNAet og feil fragment-buffer brukt, kan videre ha bidratt til den lave kvaliteten på sekvenseringsdataene. Med en basecalling-nøyaktighet på litt under 90 %, mangelen på kvalitetssikringen av reads og en stor andel reads (ca. 80 %) som ikke passerte filtrene, ble det vurdert å klassifisere taxa med en sekvenslikhet på minst 90 %. Likevel var antall reads for bakteriene av interesse delvis svært lav (Tabell 4.4). Det ble heller ikke utført en nærmere analyse på fylogenetisk beslektede arter. Alt dette resulterte i at artsbestemmelsen ble meget usikkert. Denne studien klarer derfor ikke å skille mellom arter som har høye sekvenslikheter, som for eksempel er kjent for *E. coli* og *Shigella spp.* der 16S rRNA-genene deler over 99 % sekvensidentitet ([Peker et al., 2019](#)). Det samme gjelder for enterokokkoker, som også kan ha en sekvenslikhet på 99 % for 16S-23S rRNA regionen ([Kosecka-Strojek et al., 2019](#)).

Under forbehold av den dårlige kvaliteten av analysen, ble det funnet både *E. coli*, intestinale enterokokker og *Clostridium perfringens* i den samlede prøven (bestående av råvann (n=3), drikkevann (n=3), isolater (n=7) og kontroller (n=2)). Dette er i samsvar med tidligere analyser av Vansjø vannverk ([COWI AS, 2017](#)), og indikerer både fersk og eldre fekal forurensning.

Det ble også påvist 17 av 18 bakteriearter/-slekter som er oppført på WHO's liste over antibiotika-resistente prioriterte patogener. Siden analysen kun bekrefter tilstedeværelsen av prioriterte

patogener, men ikke bestemmer resistensmønsteret, kan det dermed ikke fastslås at disse 17 arter/slekter faktisk oppfyller resistenskravene til WHO's liste.

Siden prøvene ikke kunne skilles fra hverandre etter sekvenseringen, var det dermed ikke mulig å fastslå hvilke bakterier som ble funnet i råvann og/eller i drikkevann. Heller ikke isolatprøvene kunne bestemmes noe nærmere.

5.5. Evaluering av helserisikoen ved tilstedeværelse av ARB og/eller ARG i drikkevann

Helserisikoen ved forekomst av ARB og/eller ARG i drikkevann kan vurderes utfra flere standpunkt som for eksempel hvor i verden man bor, helsetilstand og i forhold til et rent statistisk synspunkt. Selv om antimikrobiell resistens er et globalt problem vil helserisikoen være sannsynligvis høyere i utviklingsland enn i industriland ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). Dette fordi utviklingsland har dårligere tilgang til rent vann og gode sanitære forhold, samt dårligere helsevesen preget av mangel på grunnleggende fasiliteter og medisiner ([WHO, 2020](#)). En trussel for helsen kan være dersom mennesker blir direkte infisert av patogene ARB etter inntak av forurenset vann, mens en annen fare kan være at ARG fra miljøbakterier i drikkevannet kan overføres til patogene bakterier via horisontal genoverføring ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). Imidlertid er det uklart om resistente miljøbakterier i rå- og ferdigbehandlet drikkevann har en betydning for patogene bakterier som finnes i drikkevann eller kroppen ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). Dette kan være avhengig av om det er resistensdrivere tilstede, men omfattende kunnskap om mekanismene og veiene for resistensoverføring under vannbehandlingen og i distribusjonssystemer mangler ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). Det er i tillegg krevende å estimere sannsynligheten av horisontal genoverføring fra ARB og ARG fra miljøet til andre bakterier, samt som det er vanskelig å studere omfanget og hyppigheten av eksponering for ARB og ARG i drikkevannet ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). Dette gjør det utfordrende å angi nøyaktig helserisiko av antibiotikaresistens i drikkevann.

I tillegg finnes det svært få epidemiologiske studier der det dokumenteres en sammenheng mellom ARB og/ eller ARG i drikkevannet og infeksjoner, men den potensielle helsefaren kan bestemmes ved å studere eksponering for patogene ARB ved vannbårne sykdomsutbrudd ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)). I Norge ble det rapportert om 17 000 sykdomstilfeller etter inntak av forurenset drikkevann i de siste 20 årene ([Folkehelseinstituttet, 2019b](#)). Det var imidlertid ikke oppgitt om stammene var resistente.

En annen mulighet for å vurdere eksponering, helseeffekt og risiko av antibiotikaresistens i drikkevann er ved å benytte seg av et systematisk verktøy der det kobles kvantitative miljø- og befolkningsdata sammen. Ved bruk av dette verktøyet fant en studie at risikoen for overføring av antibiotikaresistens gjennom drikkevann var moderat i Sørøst-Asia fordi 35 % av befolkningen ble eksponert for ubehandlet og forurenset drikkevann ([Chereau et al., 2017](#)). Et slikt verktøy er ikke tilgjengelig i Norge enda.

En annen studie brukte metagenomanalyser for farevurderingen av ARB og ARG i drikkevann ([Ma et al., 2019](#)). Ma et al. (2019) identifiserte den potensielle helserisikoen ved å klassifisere drikkevannsprøvene i tre kategorier basert på påviste patogener og ARG. Drikkevannsprøver som inneholdt patogener ARB ble klassifisert som utrygt og dersom det ble påvist både ARG og patogener, men ikke patogener ARB, ble prøven kategorisert som sannsynligvis utrygge, mens drikkevann kun med ARG var relativt trygge ([Ma et al., 2019](#)). Dette systemet kan imidlertid ikke brukes på drikkevannsprøvene tatt fra Vansjø vannverk siden kun ti ARG ble undersøkt.

For altså å kunne evaluere helserisikoen ved funn av ARB og/eller ARG i drikkevann er det behov for å utvikle gode risikovurderingsmodeller og regelmessig overvåking av antibiotikaresistens i rå- og drikkevann. ([Sanganyado & Gwenz, 2019](#))

5.5.1 Helsemessig relevans av det som er målt i denne studien

Drikkevannet er ikke sterilt og det er helsefarlige mikroorganismer det skal finnes barrierer imot. Det ble påvist levedyktige *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas spp* og *Staphylococcus epidermidis* i filtrerte drikkevannsprøver. Både *Micrococcus luteus* og *Staphylococcus epidermidis* finnes naturlig på huden ([Bennett et al., 2019](#)) og forurensning under prøvetaking eller filtrering kan dermed ikke utelukkes. *Pseudomonas* arter finnes naturlig i mange miljø, inkludert vann, hvorav *Pseudomonas aeruginosa* er den mest viktigste arten som kan forårsake alvorlige infeksjoner hos mennesker ([Bennett et al., 2019](#)). Siden stammen ikke fikk en god nok artsidentifikasjon er vurderingen av helserisikoen svært vanskelig. Referansedatabasen til MALDI-TOF har imidlertid fokus på medisinsk relevante stammer ([Kosecka-Strojek et al., 2019](#)), og *Pseudomonas aeruginosa* blir etter egne erfaringer svært ofte identifisert på mikrobiologiske avdelinger på norske sykehus. Dermed er sannsynligheten høy for at stammen i drikkevannsprøven ikke var *Pseudomonas aeruginosa*.

Det ble videre påvist én levedyktig opportunistisk patogen miljømikrobe i råvannet. *Stenotrophomonas maltophilia* kan gi mange ulike infeksjoner (lungebetennelse, sepsis, sår/hud- og urinveisinfeksjoner) hos pasienter med nedsatt immunforsvar ([Bennett et al., 2019](#)). Særlig pasienter med cystisk fibrose og pasienter som får kreft og/eller intensiv behandling er mest utsatt for infeksjoner ([Bennett et al., 2019](#)). Dette er bekymringsverdig siden *Stenotrophomonas maltophilia* er naturlig resistente mot en hel rekke av antibiotika ([Bennett et al., 2019](#)). Imidlertid ble det ikke påvist levedyktige stammer i drikkevannet og siden arten forekommer naturlig i miljøet skjer eksponering for disse bakteriene ofte på andre måter enn via drikkevannet.

5.6. Faren for spredning av resistens via norsk drikkevann i forhold til andre spredningsveier

I Norge velges drikkevannskilder som i utgangspunktet har god kvalitet og som er lite utsatt for forurensning ([Mattilsynet, 2020](#)). I tillegg er disse lovbeskyttet mot forurensning ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)). Norge har et godt utbygd avløpssystem, og råvannet har derfor en lav belastning med fekal forurensning der medianen av 11 252 analyser var 0 *E. coli* per 100 mL råvann i 2020 ([Steinberg et al., 2021](#)). Dessuten er råvannet fra dype innsjøer stort sett kaldt gjennom hele året, og lave temperaturer hemmer bakterieveksten ([Nester et al., 2019](#)). Videre har Norge et lavt forbruk av antibiotika ([NORM/NORM-VET, 2021](#)), som er gunstig med tanke på utslipp av slike mulige resistensdrivere til miljøet. En nyere internasjonal studie viste at Norge var blant landene med lavest totalkonsentrasjon av antibiotika i akvatiske miljø ([Rodriguez-Mozaz et al., 2020](#)). I samme studien ble det også kommet frem til at antibiotika-konsentrasjonen ga en lav risiko for innvirkning på vannmiljøet med henhold til seleksjon for antibiotikaresistens i det mikrobielle samfunn ([Rodriguez-Mozaz et al., 2020](#)). Foruten er det forholdsvis lav forekomst av antibiotikaresistens i den norske befolkningen ([NORM/NORM-VET, 2021](#)) som gir også mindre belastning av ARB og/eller ARG til råvannskildene. Tross alt finnes det bakterier i akvatiske miljø som har resistensgener ([Schwermer & Uhl, 2021](#)), og faren for at råvannet kan inneholde både resistente og sykdomsfremkallende mikroorganismer er tilstede. Derfor skal drikkevannsbehandlingen i Norge tilpasses forurensningsfarene og råvannskvaliteten, og kontrolleres nøye ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)). Med alt dette som bakgrunn er det samlet sett antatt en lav sjanse for å spre ARB og/eller ARG via norsk drikkevann. Dette støttes av denne studien ved at det ikke ble påvist noen av de undersøkte ARG i hverken rå- eller drikkevannet. Videre tydet DNA konsentrasjonsmålinger og 16S rRNA qPCR analysen av rå- og drikkevannet på at vannbehandlingen hadde fjernet en stor del av biomassen (og følgelig mulige ARG). Likevel kan det ikke helt utelukkes at lave mengder med ARG kan passere vannbehandlingen.

Det må videre innimellom forventes å finne ARB og ARG i overflatevannkilder som er påvirket av kloakkforurensning og landbruksavrenning. Slike vannkilder kan brukes både for vanning av grønnsaker og bær, drikkevann for dyr, som badevann og som kilder til drikkevannsproduksjon. Mens vanningsvann og drikkevann for dyr gjerne benyttes uten vannbehandling, og det bades direkte i vannet, så behandles råvannet med flere rensetrinn/desinfeksjon på vannverket før det distribueres som drikkevann.

Videre er det mye større risiko for å bli kolonisert av ARB ved reise, som reiserestriksjonene i forbindelse med Covid-19-pandemien har tydeliggjort. I den nyeste rapporten fra Norsk overvåkings-system for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) og NORM fra fôr, dyr og næringsmidler (NORM-VET) er det i 2020 observert en reduksjon i antall gramnegative bakterier som produserer karbapenemaser sammenlignet med 2019 ([NORM/NORM-VET, 2021](#)). Dette underbygges av utsagn av Folkehelseinstituttet før pandemien, som ga uttrykk for at mange av infeksjoner i Norge med ARB skyldes importsmitte ([Folkehelseinstituttet, 2021a](#)).

Også importert mat fra land med høyere forekomst av ARB enn Norge kan potensielt bidra til spredning ([Simonsen et al., 2020](#)).

5.7. Behov for kartlegging av antibiotikaresistens i rå- og drikkevann

Tilgang og kvaliteten til trygt vann er av stor betydning, og forurensning av vannressurser kan utgjøre en potensiell helserisiko ([Sanseverino et al., 2018](#)). Eksponering for ARG via drikkevann ble påvist rundt om i verden ([Zhang et al., 2021](#)), og det er derfor viktig å begrense spredning av både ARG og ARB i drikkevannssystemer. Vannverkseiere er lovpålagt å identifisere hvilke farer som kan hindre å produsere trygt drikkevann ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)), men farene kan endre seg over tid, særlig når det kommer ny kunnskap. Farekartlegging ved Vansjø vannverk ble utført i henhold til veilederen som vannverkets ROS-analyse bygger på, men i følge Hans Jørgen Halvorsen (sivilingeniør hos MOVAR IKS) ble ARB og ARG ikke vurdert. Det står ikke spesifikt om antibiotikaresistens i drikkevannsforskriften og det finnes heller ingen grenseverdier for forekomsten eller tilstedeværelsen av ARB og ARG. Dette gjør det derfor meget vanskelig for vannverkseiere å ta stilling til en slik ny problemstilling.

Selv om resistenssituasjonen i Norge er god sett i et internasjonalt perspektiv er dette feltet lite undersøkt. Det er derfor viktig å kartlegge forekomsten av ARB og ARG i norske akvatiske miljø (og da

særlig råvannskildene), og ikke minst følge utviklingen i disse over tid. Dette vil generere kunnskap som for eksempel forekomsten av reservoarer, og mulige spredningsveier for ARB og ARG, som til slutt kan bidra til vurdering om innføring av tiltak. ([Simonsen et al., 2020](#))

5.8. Begrensninger og videre anbefalinger

Selv om dataene fra denne studien viser at vannbehandlingen er bra, må det tas høyde for at det finnes i overkant av 50 000 km vannrør som i stor grad er i plast som ble lagt fra 1971 til 2000, og der lekkasjen ligger på rundt 30 % ([Steinberg et al., 2021](#)). Dette innebærer altså en risiko for at det behandlede vannet kan bli kontaminert på veien til forbrukeren og prøver fra ledningsnettene burde absolutt tas med i videre studier. Eurofins hadde analysert vannprøver (som kommer fra Vansjø vannverk) fra tre ulike ledningsnett (Bjørnåsen, Kolsrød, Solli) henholdsvis 13., 27. og 6.12.2021 der det verken var vekst for koliforme bakterier eller enterokokker (tabell V24.3). Kimtallanalysen viste 0/100 mL for Bjørnåsen og Kolsrød, mens Solli viste 2/100 mL (tabell V24.3). Drikkevannsforskriften sier at ved kimtall over 100 per mL skal årsaken undersøkes ([Drikkevannsforskriften, 2017](#)), slik at prøvene fra ledningsnettene indikerer ingen kontaminasjon. Det ble ikke spesifikt undersøkt for ARG/ARB.

Prøvene fra denne studien ble tatt i midten av desember med mye nedbør i forveien som ga en reel fare for avrenning fra land, men på prøvetakingstidspunktet var det også frost om nettene som minimerer avrenningsrisikoen igjen. Det anbefales derfor å ta prøver på ulike tidspunkt i året og da særlig om sommeren når fritidsaktiviteter er høyt, samt om våren under snøsmeltingen.

Kvantifiseringen av dyrkbare bakterier ble upresist siden det ikke ble brukt standardiserte metoder. Det anbefales derfor å følge ISO-standarden for kimtallanalysen. Videre finnes det ikke standardiserte metoder for kulturbasert påvisning av klinisk relevante ARB i vannmiljøprøver og det ble i ettertid funnet en studie der forskerne hadde optimalisert dyrkning på ESBL- og VRE-agaren. Der ble det funnet ut at dersom prøvene inkuberes ved 42 °C, vil miljøbakgrunnsfloraen på agar platene hemmes mens klinisk relevante stammer overlever ([Schreiber et al., 2021](#)).

Det burde også vurderes om helgenomsekvensering ville ha vært en bedre metode for første gangs kartlegging av antibiotikaresistens i rå- og drikkevannet. Fordelen med metagenomstudier er at det analyseres det totale mikrobegenomet i et miljø og ikke bare noen utvalgte ([Nester et al., 2019](#)).

Dermed kan det kartlegges alle ARG som finnes i et miljø, og ikke minst hvilke bakterier som bærer genet og om det sitter på et mobilt element ([Jiang et al., 2018](#)). Ulempen er at metagenomanalyser gir en overveldende mengde informasjon og krever et omfattende arbeid knyttet til databearbeiding og tolkning ([Nester et al., 2019](#)). Hvis ARB og ARG som kan utgjøre en helserisiko først har blitt kartlagt, åpner det for å gå over til overvåkning ved bruk av enklere metoder som blant annet ble brukt i denne masteravhandlingen.

Den fluorescensbaserte qPCR kan påvise og måle små mengder nukleinsyrer, gir et raskt svar og er en anerkjent metode som er godt etablert i fagmiljøet ([Bustin et al., 2009](#)). Samtlige elleve qPCR analysene som ble brukt i denne studien krever imidlertid ytterligere optimalisering, siden det ble dannet uspesifikke PCR-produkter som ga både falske positive prøvesvar og falsk forhøyet kvantifisering av målsekvensen. Å finne optimal annealingtemperatur eksperimentelt kan være et naturlig første skritt. Det ville også ha vært interessant om det finnes programmer som kan beregne arealet under toppen til smeltetemperaturen til målsekvensen, og relatere arealet til riktig genkopiantall. Alternativt kan bruk av prober fremfor SYBRTM green vurderes.

En annen ulempe med denne studien var at det kun ble sett på intracellulære ARG siden porestørrelsen på filteret (0,22 µm) kun har fanget opp bakterieceller. Prøvebehandling burde muligens optimaliseres ved å inkludere for eksempel omvendt osmose for å inkludere også ekstracellulært DNA ([Krzeminski et al., 2020](#)). En studie viste imidlertid at det er høyere forekomst av ARG intracellulært enn ekstracellulært i et miljø ([Yuan et al., 2019](#)). I tillegg antyder en artikkel at reduksjonen av ARG for ekstracellulære ARG var raskere ved UV-behandling enn for intracellulære ARG ([Sanganyado & Gwenzi, 2019](#)), og i Norge bruker de fleste vannverkene UV-behandling som del av vannbehandlingen ([Steinberg et al., 2021](#)).

Kvaliteten til sekvenseringsresultatet var dårlig og metoden har et stort forbedringspotensial. Optimalisering av PCR-1 ved for eksempel bruk av flere sykluser ville ha vært et forslag. Videre kreves det en bedre dataanalyse enn det som ble gjort i denne studien.

Den største feilkilden i denne studien var den lave biomassen med gjennomsnittlig 3,08 ng DNA per µL råvann og 0,03 ng DNA per µL drikkevann. Det anbefales å finne en metode som gir et høyere DNA utbytte. I et innledende forsøk ble 3 × 150 mL vann filtrert og filtrene samlet i et rør til ekstraksjon. Det viste seg å være helt umulige å få alle tre filtrene ned i PowerWater DNA Bead Tube, som følger med kittet, uten at disse ble liggende veldig tett inntil hverandre. Dette er ugunstig og kan være

årsaken til variable DNA konsentrasjoner blant parallellprøvene og lavere DNA utbytte sammenlignet med DNA ekstrahert der filtrerne ble ekstrahert hver for seg. I følge DNeasy PowerWater Kit Handbook kan mellom 100 mL og 10 L med klart vann filtreres, mens det er større usikkerhet rundt uklare prøver ([QIAGEN, 2020](#)). Derfor ville det vært interessant å finne ut hvor mye DNA som kan ekstraheres fra ulike volum som blir filtrert av vannprøver med ulik turbiditet. Også andre typer filter burde vurderes som tillater filtrering av større mengder med uklart vann.

Til slutt er det også viktig å påpeke at selv om ARG skulle påvises betyr det ikke at bakterier uttrykker disse ([Simonsen et al., 2020](#)). Det er flere eksempler der bakterier har fått påvist ARG, men likevel var følsom for antibiotika som genene var rettet i mot ([Hegstad et al., 2021](#); [Sivertsen et al., 2016](#)). Det er særlig gener som aktiveres først når bakterien utsettes for antibiotika at den kan uttrykke resistens ([Sivertsen et al., 2016](#)). Dersom bakterien uttrykker resistensgenet er det videre av betydning om nivået er av klinisk betydning ([Simonsen et al., 2020](#)). I denne studien ble det ikke påvist noen av de undersøkte ARG, men dersom isolater skulle ha fått påvist ARG burde disse også testes om genene faktisk uttrykkes.

5.8.1 Forslag i å begrense spredning blant den norske befolkningen på generelt grunnlag

Økt bevissthet om resistensproblematikken og smittemåten gjennom god folkeopplysning ville ha vært et bra tiltak for å begrense spredning av antibiotikaresistens ([Larsson et al., 2018](#)). Da særlig med tanke på reiseaktivitet til land med høy forekomst av antibiotikaresistens. Dette kunne skje via legekontorer ved planlagt behandling utenlands eller på vaksinasjonskontorer dersom folk skal reise til steder der det anbefales/kreves vaksinasjon ([Langford & Schwartz, 2018](#)).

Ut ifra denne studien er det vanskelig å fastslå om vannverkene burde igangsette tiltak for å forhindre spredning av resistens utover tiltakene de allerede har innført for å hindre spredning av sykdomsfremkallende mikroorganismer generelt. På globalt grunnlag ble det anbefalt å utvikle effektive metoder for å redusere ARG gjennom drikkevannsbehandlingen ([Zhang et al., 2021](#)). Imidlertid viste arbeidet i denne masteroppgaven en reduksjon av DNA konsentrasjonen på rundt 99 % over vannbehandlingen på Vansjø vannverk.

Både nasjonale og internasjonale studier pekte derimot i den retningen at kloakkrensaneanlegg burde vurdere ytterligere rensetrinn for å minimere tilførsel av ARB og/eller ARG til miljøet, inkludert drikkevannskildene ([Schwermer & Uhl, 2021](#); [Voigt et al., 2020](#)).

6. Konklusjon

I Norge er forekomsten av antibiotikaresistens i befolkningen lav, som skyldes lavt forbruk av antibiotika og godt smittevern på helseinstitusjoner. Få norske studier indikerer også at det er lite antibiotikaresistens i det akvatiske miljøet. Det har vist seg at drikkevannet kan være en potensiell kilde for ARB og/eller ARG, særlig i land med dårlig tilgang til rent vann. Norge bruker drikkevannskilder av god kvalitet og med lite fekalbelastning. I tillegg er det lovfestet at drikkevannskildene skal beskyttes mot forurensning. Videre skal drikkevannsbehandling fjerne kjemiske, fysiske og mikrobielle forurensninger, men vannbehandlingsprosessene er ikke spesifikk designet for å hindre spredning av antibiotikaresistens. Dyrkningsresultatene fra denne studien viste ingen vekst av patogene bakterier i drikkevannet og at vannbehandlingen på Vansjø vannverk var svært effektive ($p < 0,01$). Det ble heller ikke påvist ARG i noen av vannprøvene, og siden DNA konsentrasjon ble redusert med 99 % i løpe av vannbehandlingen, ville dermed også eventuelle ARG bli kraftig minimert.

Etter en grundig litteraturgjennomgang og ved hjelp av denne eksperimentelle studien ansees det at faren for spredning av antibiotikaresistens via norsk drikkevann er svært lav, særlig sett i forhold til andre spredningsveier. Studien var i midlertid veldig begrenset siden det ble undersøkt rå- og drikkevannsprøver fra kun et vannverk. Det ble heller ikke inkludert vannprøver fra ledningsnettet, samt at prøvene ikke ble tatt i løpet av et år for å kunne undersøke mulige sesongsvingninger. Videre ble det kun undersøkt for ti utvalgte resistensgener og kun på intracellulært genomisk DNA.

For første gangs kartlegging av råvannskildene og ferdigprodusert drikkevann for antibiotikaresistens burde det vurderes en metagenomisk undersøkelse. Ved å bruke metagenomanalyser kan det kartlegges hele bakteriesamfunnet i et miljø og studere både den taksonomiske diversiteten og den genetiske evnen til å gi sykdom og resistens.

Avslutningsvis støtter resultatene fra denne studien hypotesen om at vannforsyningen spiller kun en minimal rolle i spredning av ARB og ARG, men siden det mangler andre norske studier for å kunne sammenlignes med er generalisering av disse resultatene fortsatt usikre. Ytterligere studier er nødvendige for å bekrefte disse foreløpige resultatene. På grunn av dette tynne grunnlaget er det vanskelig å vurdere om vannverkene generelt i Norge (spesielt de små) burde ha ekstra tiltak for å bekjempe spredning av antibiotika resistens. Videre kan denne studien om rå- og drikkevann ikke uten videre direkte sammenlignes med andre land, fordi resistenssituasjonen varierer, samt at vannbehandlingen er basert på ulike renseprosesser.

Referanseliste

- Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2020). *Essential cell biology* (5. utg.). Ww Norton & Co.
- Andersen, E. (2016). *Vannforsyning og helse – veiledning i drikkevannshygiene* (127). Folkehelseinstituttet. <https://www.fhi.no/contentassets/10f6285109df44af96a0de9dd283c5ed/vanrapport-127---vannforsyning-og-helse.pdf>
- Applied Biosystems. (2010). *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems - Standard Curve Experiments* (4376784 Rev. F). Applied Biosystems. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_046735.pdf
- Bengtsson-Palme, J. & Larsson, D. G. J. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 86, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Bennett, J. E., Dolin, R. & Blaser, M. J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (9. utg.). Elsevier - Health Sciences Division.
- BioRender. (2021). *Tool to create and share professional scientific figures*. Hentet 4.12.2021 fra <https://biorender.com/>
- Bruker Daltonik GmbH. (2016). *MBT Compass User Manual Revision B* (1828475). Bruker Daltonik GmbH.
- Bruyndonckx, R., Adriaenssens, N., Versporten, A., Hens, N., Monnet, D. L., Molenberghs, G., Goossens, H., Weist, K. & Coenen, S. (2021). Consumption of antibiotics in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(12 Suppl 2), ii7–ii13. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab172>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., Vries, D. d., Schwermer, C. U., Meric, S., Ozkal, C. B., Pons, M.-N., Kneis, D. & Berendonk, T. U. (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320-330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L. & The Burden of AMR Collaborative Group. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56 - 66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- CDDEP. (2022). *ResistanceMap: Antibiotic resistance*. The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. Hentet 15.1.2022 fra <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>
- Chereau, F., Opatowski, L., Tourdjman, M. & Vong, S. (2017). Risk assessment for antibiotic resistance in South East Asia. *The British Medical Journal (BMJ)*, 358, 2-8. <https://doi.org/10.1136/bmj.j3393>
- Colourbox. (2022). *Bildedatabase*. Hentet 6.2.2022 fra www.colourbox.com
- COWI AS. (2017). *Vansjø vannverk - Mikrobiell barriere analyse* (A082311-023). MOVAR. <http://projects.cowiportal.com/ps/A082311/Documents/03>
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N. & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Döhla, M., Sib, E., Dericks, B., Grobe, S., Behringer, K., Frechen, M., Simon, K., Färber, H., Lenz, F., Parcina, M., Skutlarek, D., Voigt, A., Felder, C., Exner, M. & Schmithausen, R. M. (2020). Assessment of the Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria and the Concentration of Antibiotics in EU Bathing

- Waters in Western Germany. *Exposure and Health*, 12, 323–334. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00313-z>
- Drikkevannsforskriften. (2017). *Forskrift om vannforsyning og drikkevann* (FOR-2016-12-22-1868). Helse- og omsorgsdepartementet. <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-12-22-1868?q=drikkevannsforskriften>
- Durand, G. A., Raoult, D. & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
- ECDC. (2020). *Surveillance Atlas of Infectious Diseases*. European Centre for Disease Prevention and Control Hentet 15.01.2022 fra <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>
- FN. (2021). *Befolkning, migrasjon og urbanisering*. Hentet 6.12.2021 fra <https://www.fn.no/tema/fattigdom/befolkning>
- Folkehelseinstituttet. (2019a). *Smittevernveilederen*. Hentet 5.2.2022 fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/>
- Folkehelseinstituttet. (2019b). *Vannhygiene - veileder for helsepersonell*. Hentet 6.2.2022 fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/temakapitler/10.-vannhygiene---veileder-for-hels/#smittespredning-gjennom-drikkevann>
- Folkehelseinstituttet. (2021a). *Antibiotikaresistens i Norge*. Hentet 11.1.2022 fra <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/>
- Folkehelseinstituttet. (2021b). *Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS)*. Hentet 6.12.2021 fra <http://msis.no>
- Gorecki, A., Decewicz, P., Dziurzynski, M., Janeczko, A., Drewniak, L. & Dziewit, L. (2019). Literature-based, manually-curated database of PCR primers for the detection of antibiotic resistance genes in various environments. *Water Research*, 161, 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.009>
- Hegstad, K., Samuelsen, Ø., Janice, J., Elstrøm, P., Kacelnik, O. & Sundsfjord, A. (2021). *Forekomst og molekylære genetiske analyser av bakterier med spesielle resistensmønstre i Norge 2020 – rapport fra nasjonalt referanselaboratorium* (2020). Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens. <https://unn.no/fag-og-forskning/k-res/bakterier-med-spesielle-resistensmonstre-i-norge-2020-forekomst-og-molekylere-genetiske-analyser>
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J. & Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- IACG. (2019). *No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections*. Interagency coordination group on antimicrobial resistance & World Health Organization. https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6
- Jiang, H., Zhou, R., Zhang, M., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., Chen, B., Zou, S. & Yang, Y. (2018). Exploring the differences of antibiotic resistance genes profiles between river surface water and sediments using metagenomic approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.044>
- Jørgensen, S. B., Søråas, A. V., Arnesen, L. S., Leegaard, T. M., Sundsfjord, A. & Jenum, P. A. (2017a). A comparison of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186576>
- Jørgensen, S. B., Søråas, A. V., Arnesen, L. S., Leegaard, T. M., Sundsfjord, A. & Jenum, P. A. (2017b). First environmental sample containing plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* detected in Norway. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 125(9), 822-825. <https://doi.org/10.1111/apm.12720>
- Karst, S. M., Ziels, R. M., Kirkegaard, R. H., Sørensen, E. A., McDonald, D., Zhu, Q., Knight, R. & Albertsen, M. (2021). High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nature Methods*, 18, 165–169. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01041-y>

- Khan, H., Miao, X., Liu, M., Ahmad, S. & Bai, X. (2020). Behavior of last resort antibiotic resistance genes (mcr-1 and bla_{NDM-1}) in a drinking water supply system and their possible acquisition by the mouse gut flora. *Environmental Pollution*, 259, 113818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113818>
- Kibbe, W. A. (2007). *OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator*. Hentet 13.02.2022 fra <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- Kosecka-Strojek, M., Sabat, A. J., Akkerboom, V., Kooistra-Smid, A. M. D., Miedzobrodzki, J. & Friedrich, A. W. (2019). Development of a reference data set for assigning *Streptococcus* and *Enterococcus* species based on next generation sequencing of the 16S–23S rRNA region. *BioMed Central (BMC) - Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8, 178. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0622-3>
- Krzeminski, P., Feys, E., d'Auriac, M. A., Wennberg, A. C., Umar, M., Schwermer, C. U. & Uhl, W. (2020). Combined membrane filtration and 265 nm UV irradiation for effective removal of cell free antibiotic resistance genes from feed water and concentrate. *Journal of Membrane Science*, 598, 117676. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117676>
- Lai, F. Y., Muziasari, W., Virta, M., Wiberg, K. & Ahrens, L. (2021). Profiles of environmental antibiotic resistomes in the urban aquatic recipients of Sweden using high-throughput quantitative PCR analysis. *Environmental Pollution*, 287, 117651-117651. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117651>
- Langford, B. J. & Schwartz, K. L. (2018). Bringing home unwelcome souvenirs: Travel and drug-resistant bacteria. *Canada communicable disease report*, 44(11), 277-282. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v44i11a02>
- Larsson, D. G. J., Andreumont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K. K., Husman, A. M. d. R., Fagerstedt, P., Ficki, J., Flach, C.-F., Gaze, W. H., Kuroda, M., Kvint, K., Laxminarayan, R., Manaia, C. M., Nielsen, K. M., Plant, L., Ploy, M.-C., Segovia, C., Simonet, P., Smalla, K., Snape, J., Topp, E., Hengel, A. J. v., Verner-Jeffreys, D. W., Virta, M. P. J., Wellington, E. M. & Wernersson, A.-S. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International*, 117, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.041>
- Li, B., Yin, F., Zhao, X., Guo, Y., Wang, W., Wang, P., Zhu, H., Yin, Y. & Wang, X. (2020). Colistin Resistance Gene mcr-1 Mediates Cell Permeability and Resistance to Hydrophobic Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03015>
- Ma, L., Li, B. & Zhang, T. (2019). New insights into antibiotic resistome in drinking water and management perspectives: A metagenomic based study of small-sized microbes. *Water Research*, 152, 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.069>
- Martiniussen, E. (2021). *Krigen mot bakteriene : helsekrisen som truer oss og hvordan vi kan løse den* (1. utg.). Forlaget Press.
- Mattilsynet. (2020). *Veiledning til drikkevannsforskriften*. Hentet 22.09.2021 fra https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/drikkevann/veileder_til_drikkevannsforskriften.26628/binary/Veileder%20til%20drikkevannsforskriften
- Mattilsynet. (2021). *Vannforsyningssystemer til lands*. Hentet 6.2.2022 fra https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/drikkevann/opplysninger_om_vannforsyningssystemer/vannforsyningssystemer_til_lands.36094
- Miljødirektoratet. (2018). *Har kartlagt antibiotikaresistens i norsk natur*. Hentet 6.12.2021 fra <https://nettarkiv.miljodirektoratet.no/hoeringer/tema.miljodirektoratet.no/no/Nyheter/Nyheter/2018/Mars-2018/Har-kartlagt-antibiotikaresistens-i-norsk-natur/index.html>
- Miljødirektoratet. (2022). *Resultater fra tilsynsaksjon ved kommunale avløpsanlegg 2021* (2021). <https://www.miljodirektoratet.no/sharepoint/downloaditem?id=01FM3LD2WEYM2UWFCVY5FJT5BEA3FLC3G>
- Moss kommune. (2021). *Kommuneplanens arealdel for Moss 2021-2032*. Moss kommune. https://webhotel3.gisline.no/GisLinePlanarkiv/3002/KP_3002/Dokumenter/Planbeskrivelse%20til%20kommuneplanens%20arealdel%202021-2032.pdf
- MOVAR. (2021). *Mosseregionen vann, avløp og renovasjon*. Hentet 4.12.2021 fra www.movar.no
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R. M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C. & Bierbaum,

- G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>
- Nester, E. W., Anderson, D. G., Salm, S. N. & Allen, D. P. (2019). *Nester's Microbiology - A Human Perspective* (9. utg.). McGraw-Hill Education.
- Norconsult. (2016). *Hovedplan Vann og Avløp 2016 - 2031*. Moss kommune. <https://docplayer.me/storage/66/55978426/1651609596/SVd9bbQzZVT9imBPTulemg/55978426.pdf>
- Noregs vassdrags- og energidirektorat. (2021). *Mossevassdraget*. Hentet 16.1.2022 fra <https://www.nve.no/vann-og-vassdrag/vassdragsforvaltning/verneplan-for-vassdrag/viken/003-1-mossevassdraget/>
- Noregs vassdrags- og energidirektorat. (2022). *Kartkatalog*. Hentet 21.1.2022 fra <https://temakart.nve.no/tema/nedborfelt>
- NORM/NORM-VET. (2020). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway* (2019). Folkehelseinstituttet og Veterinærinstituttet. https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2020/norm-norm-vet-rapport/norm-norm-vet-2019_komplett.pdf
- NORM/NORM-VET. (2021). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway* (2020). Folkehelseinstituttet og Veterinærinstituttet. <https://www.fhi.no/contentassets/0e4492710a9142909eff79e618faf1f7/norm-og-norm-vet-usage-of-antimicrobial-agents-and-occurrence-of-antimicrobial-resistance--in-norway.pdf>
- Norsk Vann. (2021). *Vannbransjen i Norge*. Hentet 3.2.2022 fra <https://norskvann.no/fakta-om-vannbransjen/>
- Ødegaard, H., Østerhus, S. & Melin, E. (2016). *Veiledning i mikrobiell barriere analyse (MBA) – Revidert utgave av Veiledning til bestemmelse av god desinfeksjonspraksis* (209-2014). Norsk Vann. <https://va-kompetanse.no/butikk/a-209-veiledning-i-mikrobiell-barriere-analyse-mba/>
- ONT. (2016). *Nanopore Protocol - MinKNOW*. Oxford Nanopore Technologies.
- ONT. (2021). *Nanopore Protocol - Ligation sequencing amplicons (SQK-LSK112)*. Oxford Nanopore Technologies.
- ONT. (2022a). *Flow Cell (R10.4)*. Oxford Nanopore Technologies,. Hentet 12.5.2022 fra <https://store.nanoporetech.com/flow-cell-r9-4-1.html>
- ONT. (2022b). *How nanopore sequencing works*. Oxford Nanopore Technologies,. Hentet 24.4.2022 fra <https://nanoporetech.com/how-it-works>
- ONT. (2022c). *Ligation Sequencing Kit (Q20+)*. Oxford Nanopore Technologies,. Hentet 25.4.2022 fra <https://store.nanoporetech.com/ligation-sequencing-kit-112.html>
- Patel, R., Piper, K., III, F. R. C., Steckelberg, J. M. & Yousten, A. A. (2000). The Biopesticide *Paenibacillus popilliae* Has a Vancomycin Resistance Gene Cluster Homologous to the Enterococcal VanA Vancomycin Resistance Gene Cluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 705-709. <https://doi.org/10.1128/aac.44.3.705-709.2000>
- Paulshus, E., Thorell, K., Guzman-Otazo, J., Joffre, E., Colque, P., Kühn, I., Möllby, R., Sørsum, H. & Sjöling, Å. (2019). Repeated Isolation of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Positive *Escherichia coli* Sequence Types 648 and 131 from Community Wastewater Indicates that Sewage Systems Are Important Sources of Emerging Clones of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(9). <https://doi.org/10.1128/aac.00823-19>
- Peirano, G. & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*, 79, 1529–1541. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- Peker, N., Garcia-Croes, S., Dijkhuizen, B., Wiersma, H. H., Zanten, E. v., Wisselink, G., Friedrich, A. W., Kooistra-Smid, M., Sinha, B., Rossen, J. W. A. & Couto, N. (2019). A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S–23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. *Frontiers in Microbiology*, 10, 620. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00620>
- Perisin, M., Vetter, M., Gilbert, J. A. & Bergelson, J. (2016). 16Stimator: statistical estimation of ribosomal gene copy numbers from draft genome assemblies. *The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal*, 10(4), 1020-1024. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.161>

- QIAGEN. (2020). *DNeasy PowerWater Kit Handbook*. QIAGEN.
<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=75765ef9-2a6f-4f5d-a36b-dbd9beb43079&lang=en>
- Rambach, A. (2020). *CHROMagar™ ESBL*. Hentet 16.1.2022 fra <https://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-esbl-focus-on-esbl-resistance-31.html>
- Rambach, A. (2021). *CHROMagar™ VRE*. Hentet 16.1.2022 fra <https://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-vre-focus-on-vre-29.html>
- Ramesh, V. (2019). *Biomolecular and Bioanalytical Techniques: Theory, Methodology and Applications* (1. utg.). John Wiley & Sons, Incorporated.
- Rivedal, S., Bechmann, M. & Kvitte, Å. M. (2022). *Husdyrgjødseltiltak og klimagassutslepp - Vurdering av årlege aktivitetsdata og ein del utsleppsfaktorar* (978-82-17-03012-6). Norsk institutt for bioøkonomi. https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/bitstream/handle/11250/2978626/NIBIO_RAPPORT_2022_8_20.pdf?sequence=1
- Rock, C. & Donnenberg, M. D. (2014). Human Pathogenic Enterobacteriaceae. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7>
- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Giustina, S. V. D., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T. U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J. L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K. M. M., Virta, M., Do, T. T., Walsh, F. & Manaia, C. M. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International*, 140, 105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
- Rychlik, W., Spencer, W. J. & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409-6412. <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409>
- Sanganyado, E. & Gwenzi, W. (2019). Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. *Science of The Total Environment*, 669, 785-797. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.162>
- Sanseverino, I., Cuenca, A. N., Loos, R., Marinov, D. & Lettieri, T. (2018). *State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance* (EUR 29592 EN). Publications Office of the European Union. https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC114775/amr_jrc_technical_report_final_online_15jan.2019.pdf
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B. W., Pruitt, K. D. & Sherry, S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-S26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S. & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*, 2020(baaa062). <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schreiber, C., Zacharias, N., Essert, S. M., Wasser, F., Müller, H., Sib, E., Precht, T., Parcina, M., Bierbaum, G., Schmithausen, R. M., Kistemann, T. & Exner, M. (2021). Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments – An optimized culture-based approach. *Science of The Total Environment*, 750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142265>
- Schwermer, C. U., Krzeminski, P., Wennberg, A. C., Vogelsang, C. & Uhl, W. (2018). Removal of antibiotic resistant *E. coli* in two Norwegian wastewater treatment plants and by nano- and ultra-filtration processes. *Water Science & Technology*, 77(4), 1115-1126. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.642>
- Schwermer, C. U. & Uhl, W. (2021). Calculating expected effects of treatment effectivity and river flow rates on the contribution of WWTP effluent to the ARG load of a receiving river. *Journal of Environmental Management*, 288, 112445. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112445>
- Schy, W. E. & Plewa, M. J. (1989). Use of the Diaminobenzoic Acid Fluorescence Assay in Conjunction with UV Absorbance as a Means of Quantifying and Ascertaining the Purity of a DNA Preparation. *Analytical Biochemistry*, 180, 314-318. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90438-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90438-7)

- Simonsen, G. S., Berdal, J. E., Grave, K., Hauge, K., Juvet, L. K., Lunestad, B. T., Riisberg, I., Rørtveit, G., Urdahl, A. M. & Årdal, C. (2020). *Antibiotikaresistens: Kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak* (978-82-8406-153-5). Folkehelseinstituttet. <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2020/amr-kunnskapshull-rapport.pdf>
- Sivertsen, A., Pedersen, T., Larssen, K. W., Bergh, K., Rønning, T. G., Radtke, A. & Hegstad, K. (2016). A Silenced *vanA* Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4119–4127. <https://doi.org/10.1128/AAC.00286-16>
- Skarbøvik, E., Haande, S., Bechmann, M. & Skjelbred, B. (2021). *Vannovervåking i Morsa 2020. Innsjøer, elver og bekker, november 2019 - oktober 2020* (978-82-17-02807-9). Norsk institutt for bioøkonomi. <https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/handle/11250/2758688>
- Standard Norge. (2014). *Vannundersøkelse - Påvisning og telling av Escherichia coli og koliforme bakterier - Del 1: Membranfiltreringsmetode for vann med lav bakgrunnsverdi for bakterietall* (NS-EN ISO 9308-1:2014). <https://standard.no/no/Nettbutikk/produktkatalogen/Produktpresentasjon/?ProductID=724972>
- Statistisk sentralbyrå. (2021a). *Kommunalt avløp*. Hentet 7.2.2022 fra <https://www.ssb.no/natur-og-miljo/vann-og-avlop/statistikk/kommunalt-avlop>
- Statistisk sentralbyrå. (2021b). *Tettsteders befolkning og areal*. Hentet 4.2.2022 fra <https://www.ssb.no/befolkning/folketall/statistikk/tettsteders-befolkning-og-areal>
- Steinberg, M., Nordheim, C. F. & Lyngstad, T. M. (2021). *Rapportering av data for vannforsyningsystemer i Norge for 2020* (978-82-8406-270-9). Folkehelseinstituttet. https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2021/vannverksrapport_2021_endelig-versjon.pdf
- Svanevik, C. S., Urdahl, A. M., Lunestad, B. T., Norström, M., Slette-meås, J. S., Nilsen, H. & Storesund, J. (2021). *Screening for antimicrobial- and heavy metal resistant bacteria in copper contaminated areas* (2021-18). Havforskningsinstituttet. <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-en-2021-18>
- Taneja, N. & Sharma, M. (2019). Antimicrobial resistance in the environment: The Indian scenario. *Indian journal of medical research*, 149(2), 119-128. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_331_18
- Tanner, W. D., VanDerslice, J. A., Toor, D., Benson, S., Porucznik, C. A., Goel, R. K. & Atkinson, R. M. (2015). Development and field evaluation of a method for detecting carbapenem-resistant bacteria in drinking water. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(5), 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.010>
- Thermo Fisher Scientific. (2011). *Power SYBR® Green PCR Master Mix Reagents Kit User Guide* (4367218 Rev. E). Thermo Fisher Scientific. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fcms_042179.pdf
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *NanoDrop Lite User Guide* (269-275200). Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2FUser-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *Qubit 3.0 Fluorometer User Guide* (MAN001086). Thermo Fisher Scientific. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_3_fluorometer_man.pdf
- Thermo Fisher Scientific. (2020). *Product Specification Sheet: Chocolate Agar with Vitox* (PO5090A-06). Thermo Scientific. <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Specification-Sheets/PS-PO5090A-V6.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2022a). *Multiple Primer Analyzer*. Hentet 13.02.2022 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2022b). *Tm Calculator*. Hentet 14.02.2022 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html

- Tronsmo, A., Gjøen, T., Sørsum, H., Godfroid, J., Yazdankhah, S. P., Jelmert, A., Klein, J., Okoli, A. S., Ytrehus, B. & Skaar, I. (2016). *Antimicrobial resistance due to the use of biocides and heavy metals: a literature review* (2016:63). Vitenskapskomiteen for mat og miljø.
<https://vkm.no/download/18.2375207615dac0245aee254d/1503322083023/f83c89d553.pdf>
- Ullmann, I. F., Tunsjø, H. S., Andreassen, M., Nielsen, K. M., Lund, V. & Charnock, C. (2019). Detection of Aminoglycoside Resistant Bacteria in Sludge Samples From Norwegian Drinking Water Treatment Plants. *Frontiers in Microbiology*, 10(487). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00487>
- Våler kommune. (2017). *Saneringsplan avløp 2018-2022*.
<https://d3drm168xorg4j.cloudfront.net/assets/Vann-og-avlop/Saneringsplan-Avlop.pdf>
- Vann-Nett. (2020). *Vansjø - Storefjorden*. Hentet 4.12.2021 fra <https://vann-nett.no/portal/#/waterbody/003-291-2-L>
- Vann-Nett. (2022). *Vansjø*. Hentet 16.1.2022 fra <https://vann-nett.no/portal/>
- Vannmiljø. (2022). *Vansjø*. Hentet 16.1.2021 fra <https://vannmiljo.miljodirektoratet.no/>
- Vannportalen. (2022). *Om Morsa vannområde*. <https://www.vannportalen.no/vannregioner/innlandet-og-viken/vannomrader-i-vannregion-innlandet-og-viken2/morsa/om-morsa-vannomrade/>
- Voigt, A. M., Ciorba, P., Döhla, M., Exner, M., Felder, C., Lenz-Plet, F., Sib, E., Skutlarek, D., Schmithausen, R. M. & Faerber, H. A. (2020). The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224, 113449.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113449>
- WHO. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. World Health Organization.
https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- WHO. (2020). *Antimicrobial resistance*. Hentet 13.09.2021 fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- WHO. (2021). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report (2021)*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240027336>
- WHO & UNICEF. (2021). *Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2020: Five years into the SDGs* (9789240030848). World Health Organization.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240030848>
- Yuan, K., Wang, X., Chen, X., Zhao, Z., Fang, L., Chen, B., Jiang, J., Luan, T. & Chen, B. (2019). Occurrence of antibiotic resistance genes in extracellular and intracellular DNA from sediments collected from two types of aquaculture farms. *Chemosphere*, 234, 520–527.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.085>
- Zhang, T., Hu, Y., Jiang, L., Yao, S., Lin, K., Zhou, Y. & Cui, C. (2019). Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water. *Chemical Engineering Journal*, 358, 589-597.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.218>
- Zhang, T., Lv, K., Lu, Q., Wang, L. & Liu, X. (2021). Removal of antibiotic-resistant genes during drinking water treatment: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 104, 415-429.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.12.023>

Vedlegg oversikt

Vedlegg 1: Utfyllende informasjon om dyrkningsmedier og dens kontroller	XV
Vedlegg 2: Filterkontroll og bildeeksempler fra dyrkningen	XVI
Vedlegg 3: Rådata og statistikk fra kvantifisering av dyrkbare bakterier	XVII
Vedlegg 4: Rådata fra MALDI-TOF identifikasjon fra alle undersøkte isolater	XIX
Vedlegg 5: DNA-konsentrasjoner målt med NanoDrop Lite og Qubit 3.0.....	XXII
Vedlegg 6: Statistiske beregninger fra DNA-konsentrasjonsmålingene	XXVI
Vedlegg 7: Primer- og plasmidsekvenser som ble brukt ved qPCR	XXVII
Vedlegg 8: Forberedelse til 16S rRNA qPCR analysen	XXXIII
Vedlegg 9: Data fra 16S rRNA qPCR analysen	XLI
Vedlegg 10: Forberedelse til ARG qPCR analysen	XLIX
Vedlegg 11: Data fra <i>CTX-M-15</i> qPCR analysen.....	LI
Vedlegg 12: Data fra <i>CTX-M-27</i> qPCR analysen.....	LIX
Vedlegg 13: Data fra <i>CTX-M-32</i> qPCR analysen.....	LXX
Vedlegg 14: Data fra <i>TEM</i> qPCR analysen	LXXXVIII
Vedlegg 15: Data fra <i>OXA-48</i> qPCR analysen	LXXXVIII
Vedlegg 16: Data fra <i>OXA-58</i> qPCR analysen	XCVII
Vedlegg 17: Data fra <i>vanA</i> qPCR analysen	CVIII
Vedlegg 18: Data fra <i>tetM</i> qPCR analysen.....	CXVIII
Vedlegg 19: Data fra <i>mcr-1</i> qPCR analysen	CXXIX
Vedlegg 20: Data fra <i>sul1</i> qPCR analysen	CXL
Vedlegg 21: Primer- og adaptersekvenser som ble brukt ved sekvensering.....	CLI
Vedlegg 22: Forberedelse til sekvensering (inkludert gelelektroforese).....	CLII
Vedlegg 23: Data fra sekvensering.....	CLIX
Vedlegg 24: Analyseresultater fra MOVAR og Eurofins.....	CLXV

Vedlegg 1: Utfyllende informasjon om dyrkningsmedier og dens kontroller

Brunagaren

Opprinnelig navn: CHOCOLATE AGAR WITH VITOX

Produsent: Oxoid, Tyskland

LOT: 3404519

Holdbar til: 7.03.2022

Positiv vekstkontroll *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 godkjent: 9.12.2021

Positiv vekstkontroll *Neisseria meningitidis* ATCC 13090 godkjent: 9.12.2021

Sterilkontroll: Ingen vekst etter 48 timers inkubasjon.

ESBL

Opprinnelig navn: CHROMagar™ ESBL

Produsent: CHROMagar, Frankrike

2 komponenter: CHROMagar Orientation RT412 LOT: P002023

ESBL supplement ES372 LOT: P002173

Produsert: 7.12.2021

Holdbar til: 11.01.2022

Positiv vekstkontroll *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 godkjent: 8.12.2021

Positiv vekstkontroll *Escherichia coli* ATCC 25922 godkjent: 8.12.2021

Sterilkontroll: Ingen vekst etter 24 timers inkubasjon.

VRE

Opprinnelig navn: CHROMagar™ VRE

Produsent: CHROMagar, Frankrike

2 komponenter: CHROMagar VRE base VR952(B) LOT: P001811

VRE supplement VR952(S) LOT: P001944

Produsert: 7.12.2021

Holdbar til: 11.01.2022

Positiv vekstkontroll *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 godkjent: 9.12.2021

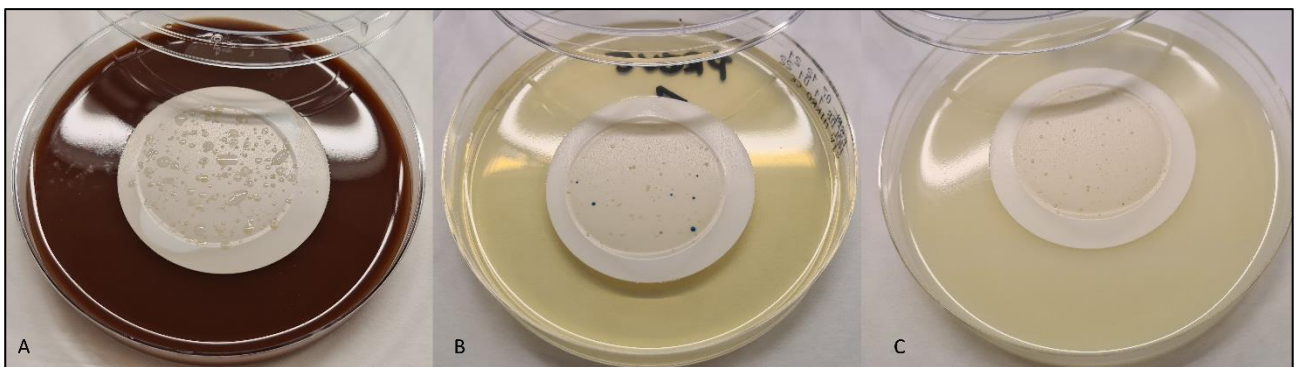
Positiv vekstkontroll *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 godkjent: 9.12.2021

Sterilkontroll: Ingen vekst etter 48 timers inkubasjon.

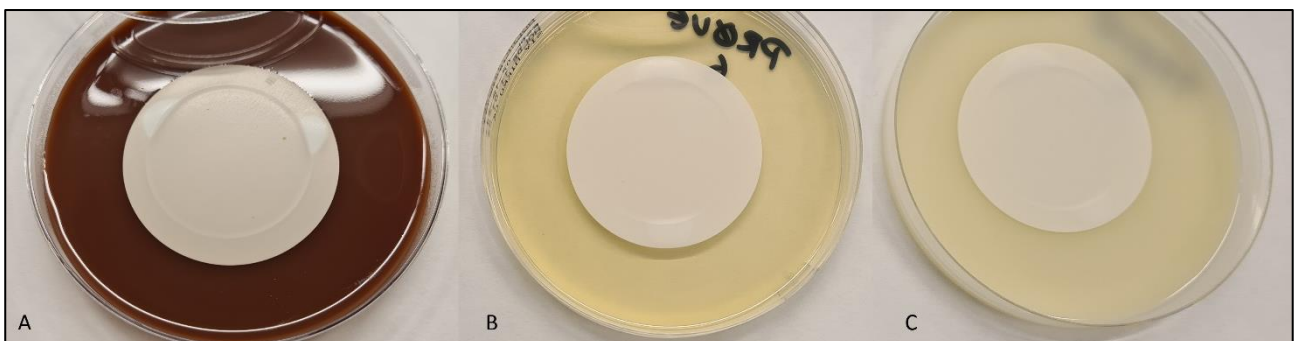
Vedlegg 2: Filterkontroll og bildeeksempler fra dyrkningen



Figur V2.1: Sterilkontroll av filterpapiret fra prøvetakingsdatoene og etter 48 timers inkubering. Bilde er tatt og redigert av Melanie Schreier.



Figur V2.2: Dyrkningsmediene brunagar (A), ekstandert spektrum betalaktamase (ESBL) agar (B) og vankomycinresistente enterokokker (VRE) agar (C) etter 24 timers inkubering av råvannsprøven 1. A viser kolonivekst av 10 ml filtrert råvann, mens B og C viser kolonivekst av 100 ml filtrert råvann. Bilde er tatt og redigert av Melanie Schreier.



Figur V2.3: Dyrkningsmediene brunagar (A), ekstandert spektrum betalaktamase (ESBL) agar (B) og vankomycinresistente enterokokker (VRE) agar (C) etter 48 timers inkubering av drikkevannsprøven 6. A viser 2 små kolonier, mens B og C ikke har noe vekst. For alle 3 filtrene ble det filtrert 100 ml drikkevann. Bilde er tatt og redigert av Melanie Schreier.

Vedlegg 3: Rådata og statistikk fra kvantifisering av dyrkbare bakterier

Tabell V3.1: Antall kolonier på vekstmediene brun-, ESBL- og VRE-agar etter 24 og 48 timers inkubering. Koloniene av råvannsprøvene på brunagar ble ganget med 10 siden disse ble filtrert med kun 10 mL råvann, mens resten ble filtrert med 100 mL vann. Videre vises statistiske parametere som gjennomsnitt, variasjonsbredde, gjennomsnittets standardfeil (SEM) og konfidensnivå (95 %).

Prøve	Vanntype	Prøvetakings dato	Antall kolonier per 100 mL vann					
			Brunagar		ESBL ¹ -agar		VRE ² -agar	
			24 t	48 t	24 t	48 t	24 t	48 t
1	Råvann	15.12.2021	2540	2690	67	151	72	136
2	Råvann	15.12.2021	2320	2250	71	182	79	207
3	Råvann	15.12.2021	2570	2260	56	164	61	194
Gjennomsnitt: Råvann		15.12.2021	2477	2400	65	166	71	179
Variasjonsbredde: Råvann		15.12.2021	250	440	15	31	18	71
SEM: Råvann		15.12.2021	79	145	4	9	5	22
Konfidensnivå (95 %)³: Råvann		15.12.2021	339	624	19	39	23	94
4	Drikkevann	15.12.2021	0	0	0	0	0	0
5	Drikkevann	15.12.2021	0	0	0	0	0	0
6	Drikkevann	15.12.2021	0	2	0	0	0	0
Gjennomsnitt: Drikkevann		15.12.2021	0	1	0	0	0	0
7	Råvann	16.12.2021	1830	2100	100	224	81	237
8	Råvann	16.12.2021	1890	1830	68	192	56	218
9	Råvann	16.12.2021	1650	1840	50	183	42	235
Gjennomsnitt: Råvann		16.12.2021	1790	1923	73	200	60	230
Variasjonsbredde: Råvann		16.12.2021	240	270	50	41	39	19
SEM: Råvann		16.12.2021	72	88	15	12	11	6
Konfidensnivå (95 %)³: Råvann		16.12.2021	310	380	63	54	49	26
10	Drikkevann	16.12.2021	0	3	0	0	0	0
11	Drikkevann	16.12.2021	0	0	0	0	0	0
12	Drikkevann	16.12.2021	0	0	0	0	0	0
Gjennomsnitt: Drikkevann		16.12.2021	0	1	0	0	0	0
13	Råvann	17.12.2021	1760	2640	60	164	57	151
14	Råvann	17.12.2021	2100	2290	53	166	36	176
15	Råvann	17.12.2021	1830	2300	45	142	32	170
Gjennomsnitt: Råvann		17.12.2021	1897	2410	53	157	42	166
Variasjonsbredde: Råvann		17.12.2021	340	350	15	24	25	25
SEM: Råvann		17.12.2021	104	115	4	8	8	8
Konfidensnivå (95 %)³: Råvann		17.12.2021	446	495	19	33	33	32
16	Drikkevann	17.12.2021	0	0	0	0	0	0
17	Drikkevann	17.12.2021	0	0	0	0	0	0
18	Drikkevann	17.12.2021	0	0	0	0	0	0
Gjennomsnitt: Drikkevann		17.12.2021	0	0	0	0	0	0

¹ ESBL: Ekstendert spektrum betalaktamase

² VRE: Vankomycinresistente enterokokker

³ $t_{0,05(2);2} (4,303) \times \text{SEM}$

Tabell V3.2: Variasjonskoeffisienten til triplikatene av råvannet (tatt på tre ulike dager) dyrket på vekstmediene brun-, ESBL- og VRE-agar i 24 og 48 timer.

Prøvetakingsdato	Variasjonskoeffisienten (%)					
	Brunagar		ESBL ¹ -agar		VRE ² -agar	
	24 t	48 t	24 t	48 t	24 t	48 t
15.12.2021	6	10	12	9	13	21
16.12.2021	7	8	35	11	33	5
17.12.2021	9	8	14	8	32	8

¹ ESBL: Ekstendert spektrum betalaktamase

² VRE: Vankomycinresistente enterokokker

Tabell V3.3: Toveis variansanalyse (ANOVA) for kvantiteringen av bakterier fra vannprøvene (tatt den 15., 16. og 17.12.2021), dyrket på brunagar og inkubert i 48 timer.

Utgangspunkt for analysen (kolonier per 100 mL vann)						
	Vannstype	Råvann	Prøvetakingsdato			
			15.12.2021	16.12.2021	17.12.2021	
			2 690	2 100	2 640	
			2 250	1 830	2 290	
			2 260	1 840	2 300	
		Drikkevann	0	3	0	
			0	0	0	
			2	0	0	
Sammendrag: Råvann						
			Prøvetakingsdato			Totalt
			15.12.2021	16.12.2021	17.12.2021	
<i>Prøveantall</i>			3	3	3	9
<i>Summe (kolonier per 100 mL vann)</i>			7 200	5 770	7 230	20 200
<i>Gjennomsnitt (kolonier per 100 mL vann)</i>			2 400	1 923	2 410	2 244
<i>Varians</i>			63 100	23 433	39 700	89 578
Sammendrag: Drikkevann						
			Prøvetakingsdato			Totalt
			15.12.2021	16.12.2021	17.12.2021	
<i>Prøveantall</i>			3	3	3	9
<i>Summe (kolonier per 100 mL vann)</i>			2	3	0	5
<i>Gjennomsnitt (kolonier per 100 mL vann)</i>			1	1	0	1
<i>Varians</i>			1	3	0	1
ANOVA						
Variasjonskilde	Frihetsgrader (df)	Kvadratavvik (SS)	Varians (MS)	F-verdi	p-verdi	Kritisk F-verdi
<i>Vanntyper</i>	1	22 657 668	22 657 668	1 076,91	4,1 × 10 ⁻¹³	4,75
<i>Dager</i>	2	231 426	115 713	5,50	0,02	3,89
<i>Interaksjon</i>	2	232 731	116 365	5,53	0,02	3,89
<i>Error</i>	12	252 475	21 040			
<i>Total</i>	17	23 374 301				

Vedlegg 4: Rådata fra MALDI-TOF identifikasjon fra alle undersøkte isolater

Tabell V4.1: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) analysesvar med både beste og nest beste match og den tilhørende score-verdien til alle undersøkte isolatene.

Prøve ID	Kategori	Organisme (beste match)	Score	Organisme (neste beste match)	Score
1A ESBL (lilla)	A	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,49	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,41
1B ESBL (lyse blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,57	<i>Serratia fonticola</i>	2,54
1C ESBL (mørke blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,54	<i>Serratia fonticola</i>	2,49
1D ESBL (feit klar)	A	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2,37	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2,07
1E ESBL (orange)	B	<i>Pseudomonas protegens</i>	2,46	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,17
1F VRE (blå)	A	<i>Paenibacillus macerans</i>	2,32	<i>Paenibacillus macerans</i>	2,19
1G BRUN (feit klar)	B	<i>Bacillus subtilis</i>	1,79	<i>Bacillus subtilis</i>	1,75
1H BRUN (gul)	A	<i>Aeromonas bestiarum</i>	2,26	<i>Aeromonas bestiarum</i>	2,25
1I BRUN (hvit)	B	<i>Peribacillus muralis</i>	1,75	<i>Peribacillus simplex</i>	1,74
1J BRUN (gul)	B	<i>Peribacillus simplex</i>	1,83	<i>Peribacillus muralis</i>	1,77
2A ESBL (lyse blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,51	<i>Serratia fonticola</i>	2,36
2B ESBL (mørke blå)	A	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,49	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,48
2C ESBL (gul)	B	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,90	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,89
2D ESBL (hvit)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,03	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	1,83
2E ESBL (orange)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,09	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1,95
2F VRE (blå)	A	<i>Elizabethkingia miricola</i>	2,25	<i>Elizabethkingia miricola</i>	2,22
2G VRE (gul)	B	<i>Pseudomonas protegens</i>	2,48	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,24
2H BRUN (feit klar)	C	-	0,00	-	0,00
2I BRUN (feit gul)	A	<i>Aeromonas encheleia</i>	2,08	<i>Aeromonas encheleia</i>	1,83
2J BRUN (tørr)	C	-	1,44	-	1,36
3A ESBL (lyse blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,32	<i>Serratia fonticola</i>	2,26
3B ESBL (mørke blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,43	<i>Serratia fonticola</i>	2,41
3C ESBL (turkis)	A	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2,17	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1,83
3D ESBL (orange)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,05	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,92
3E VRE (lilla)	A	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,05
3F VRE (orange)	A	<i>Pseudomonas putida</i>	2,08	<i>Pseudomonas putida</i>	1,92
3G BRUN (feit klar)	A	<i>Bacillus subtilis</i>	2,06	<i>Bacillus subtilis</i>	2,02
3H BRUN (gul)	B	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	1,90	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	1,89
3I BRUN (gul)	B	<i>Bacillus pumilus</i>	1,79	-	1,66
3J BRUN (tørr)	B	<i>Bacillus mycoides</i>	1,74	<i>Bacillus mycoides</i>	1,74
6A BRUN (gul)	A	<i>Micrococcus luteus</i>	2,08	<i>Micrococcus luteus</i>	2,05
6B BRUN (gul)	A	<i>Micrococcus luteus</i>	2,24	<i>Micrococcus luteus</i>	2,19
7A ESBL (lyse blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,16	<i>Serratia fonticola</i>	2,15
7B ESBL (mørke blå)	A	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,39	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,32
7C ESBL (orange)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,04	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,02
7D VRE (feit klar)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,05	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,01

7E VRE (liten)	B	<i>Acinetobacter brisouii</i>	1,89	<i>Acinetobacter brisouii</i>	1,83
7F BRUN (feit klar)	A	<i>Bacillus subtilis</i>	2,10	<i>Bacillus subtilis</i>	2,09
7G BRUN (feit gul)	A	<i>Bacillus pumilus</i>	2,14	<i>Bacillus pumilus</i>	1,90
7H BRUN (rosa)	B	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	2,19	<i>Lysinibacillus spp.</i>	2,19
7I BRUN (hvit)	C	-	1,65	-	1,64
7J BRUN (gul)	B	<i>Bacillus pumilus</i>	1,84	-	1,65
8A ESBL (blå)	A	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,49	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,41
8B ESBL (orange)	C	-	1,67	-	1,60
8C ESBL (gul)	C	-	1,45	-	1,44
8D ESBL (hvit)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,01	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,99
8E VRE (hvit)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,02	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,95
8F VRE (rosa)	A	<i>Pseudomonas protegens</i>	2,03	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,95
8G VRE (liten)	B	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	2,24	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	2,11
8H BRUN (rosa)	B	<i>Peribacillus simplex</i>	1,79	<i>Peribacillus muralis</i>	1,77
8I BRUN (gul)	B	<i>Bacillus pumilus</i>	1,85	-	1,56
8J BRUN (feit klar)	C	-	0,00	-	0,00
9A ESBL (lyse blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,24	<i>Serratia fonticola</i>	2,23
9B ESBL (mørke blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,32	<i>Serratia fonticola</i>	2,29
9C ESBL (gul)	C	-	1,62	-	1,62
9D ESBL (hvit)	B	<i>Pseudomonas migulae</i>	1,82	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	1,81
9E VRE (stor blank)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,21	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,94
9F VRE (liten)	B	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,31	<i>Pseudomonas antarctica</i>	2,09
9G BRUN (lilla)	A	<i>Bacillus subtilis</i>	2,25	<i>Bacillus subtilis</i>	2,14
9H BRUN (gul)	C	-	1,59	-	1,58
9I BRUN (feit klar)	A	<i>Bacillus subtilis</i>	2,00	<i>Bacillus subtilis</i>	2,00
9J VRE (blå)	A	<i>Elizabethkingia miricola</i>	2,14	<i>Elizabethkingia miricola</i>	2,12
10A BRUN (gul)	A	<i>Micrococcus luteus</i>	2,41	<i>Micrococcus luteus</i>	2,30
10B BRUN (hvit)	A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,11
10C BRUN (liten)	B	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	2,07	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	2,03
13A ESBL (stor blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,46	<i>Serratia fonticola</i>	2,41
13B ESBL (liten blå)	A	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,30	<i>Rahnella aquatilis</i>	2,20
13C ESBL (hvit)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,02	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,93
13D VRE	B	<i>Pseudomonas corrugata</i>	2,05	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,01
13E BRUN (feit klar)	A	<i>Bacillus subtilis</i>	2,00	<i>Bacillus subtilis</i>	1,98
13F BRUN (rosa)	A	<i>Bacillus subtilis</i>	2,19	<i>Bacillus subtilis</i>	2,08
13G BRUN (gul)	B	<i>Peribacillus simplex</i>	1,85	-	1,60
13H BRUN (tørr)	B	<i>Bacillus mycoides</i>	1,84	<i>Bacillus cereus</i>	1,81
13I BRUN (gul)	A	<i>Bacillus pumilus</i>	2,12	<i>Bacillus pumilus</i>	1,97
13J BRUN	A	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	2,08	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1,88
14A ESBL (blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,31	<i>Serratia fonticola</i>	2,27

14B ESBL (gul)	A	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,01	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1,99
14C ESBL (hvit)	C	-	1,68	-	1,65
14D VRE (gul)	B	<i>Pseudomonas protegens</i>	2,28	<i>Pseudomonas corrugata</i>	2,07
14E VRE (hvit)	B	<i>Pseudomonas japonica</i>	1,72	-	1,62
14F BRUN (feit klar)	C	-	0,00	-	0,00
14G BRUN (gul)	B	<i>Bacillus pumilus</i>	1,90	<i>Bacillus pumilus</i>	1,88
14H BRUN (gul)	B	<i>Peribacillus simplex</i>	1,83	<i>Peribacillus muralis</i>	1,78
14I BRUN (tørr)	A	<i>Bacillus cereus</i>	2,24	<i>Bacillus cereus</i>	2,13
14J BRUN (rosa)	B	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	2,06	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,03
15A ESBL (blå)	A	<i>Serratia fonticola</i>	2,37	<i>Serratia fonticola</i>	2,36
15B ESBL (gul)	C	-	1,30	-	1,30
15C ESBL (hvit)	A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,17	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,98
15D VRE (liten)	C	-	1,42	-	1,38
15E BRUN (feit klar)	C	-	0,00	-	0,00
15F BRUN (gul)	B	<i>Bacillus pumilus</i>	1,95	<i>Bacillus pumilus</i>	1,94
15G BRUN (gul)	B	<i>Peribacillus muralis</i>	1,84	<i>Peribacillus simplex</i>	1,79
15H BRUN (gul)	B	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	1,91	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	1,72
15I BRUN (feit gul)	A	<i>Aeromonas encheleia</i>	2,12	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1,89
15J BRUN (tørr)	A	<i>Bacillus mycoides</i>	2,29	<i>Bacillus mycoides</i>	2,25

Vedlegg 5: DNA-konsentrasjoner målt med NanoDrop Lite og Qubit 3.0

Tabell V5.1: DNA konsentrasjon (ng/ μ L), absorbans ved 260 nm (A260) og absorbansratio (A260/A280) fra både innledende forsøk og det endelige forsøket som var utgangspunktet før kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR). Ved innledende forsøk ble de tre filter-eksemplarene (per prøve) ekstrahert samlet, mens ved det endelige forsøket ble de tre filterene per prøve ekstrahert hver for seg og deretter samlet til en DNA-pool.

Prøve	Innledende forsøk (Filtertriplikatene ekstrahert samlet)				Endelige forsøk (Filtertriplikatene ekstrahert hver for seg)						
	NanoDrop Lite			Qubit 3.0	NanoDrop Lite						Qubit 3.0
	A260	A260/A280	ng/ μ L	ng/ μ L	A260	A260/A280	ng/ μ L	A260	A260/A280	ng/ μ L	ng/ μ L
1	0,153	1,42	7,6	1,22	0,128	1,27	6,4	1,149	1,56	7,5	2,29
					0,146	1,39	7,3				
					0,126	1,62	6,3				
2	0,131	1,73	6,6	0,712	0,137	1,43	6,9	0,142	1,41	7,1	2,75
					0,161	1,39	8,0				
					0,151	1,37	7,6				
3	0,160	1,47	8,0	0,878	0,161	1,53	8,1	0,163	1,49	8,2	4,04
					0,167	1,55	8,3				
					0,166	1,36	8,3				
4	0,167	1,28	8,4	For lav ¹	0,118	1,44	5,9	0,107	1,28	5,3	0,0268
					0,172	1,42	8,6				
					0,009	0,29	0,5				
5	0,142	1,39	7,1	For lav ¹	0,109	1,33	5,5	0,124	1,35	6,2	0,0232
					0,112	1,20	5,6				
					0,136	1,38	6,8				
6	0,119	1,30	6,0	For lav ¹	0,139	1,49	6,9	0,111	1,36	5,5	0,0328
					0,099	1,08	5,0				
					0,123	1,10	6,1				
7	0,175	1,40	8,8	0,394	0,183	1,41	9,1	0,169	1,39	8,5	2,65
					0,155	1,35	7,8				
					0,150	1,44	7,5				
8	0,136	1,37	6,8	0,522	0,186	1,42	9,3	0,178	1,42	8,9	4,60
					0,210	1,45	10,5				
					0,163	1,45	8,1				
9	0,190	1,59	9,5	2,08	0,153	1,37	7,6	0,166	1,36	8,3	3,22
					0,164	1,46	8,2				
					0,173	1,39	8,6				
10	0,190	1,33	9,5	For lav ¹	0,132	1,35	6,6	0,138	1,44	6,9	0,0232
					0,117	1,31	5,9				
					0,124	1,35	6,2				
11	0,158	1,20	7,9	For lav ¹	0,136	1,40	6,8	0,156	1,31	7,8	0,0300
					0,149	1,22	7,4				
					0,173	1,31	8,6				

12	0,098	1,34	4,9	For lav ¹	0,156	1,39	7,8	0,165	1,20	8,2	0,0324
					0,122	1,21	6,1				
					0,154	1,29	7,7				
13	0,171	1,52	8,6	1,64	0,208	1,37	10,4	0,196	1,40	9,8	1,88
					0,235	1,47	11,8				
					0,191	1,32	9,6				
14	0,170	1,47	8,5	2,08	0,213	1,45	10,7	0,189	1,39	9,5	2,32
					0,171	1,35	8,6				
					0,160	1,37	8,0				
15	0,112	1,67	5,6	0,118	0,197	1,54	9,9	0,196	1,51	9,8	3,94
					0,204	1,49	10,2				
					0,175	1,41	8,8				
16	0,138	1,64	6,9	For lav ¹	0,163	1,49	8,1	0,153	1,31	7,7	0,0208
					0,141	1,42	7,1				
					0,130	1,40	6,5				
17	0,021	1,67	1,0	For lav ¹	0,159	1,34	8,0	0,146	1,54	7,3	0,0224
					0,145	1,44	7,2				
					0,153	1,51	7,6				
18	0,054	1,11	2,7	For lav ¹	0,137	1,22	6,9	0,162	1,35	8,1	0,0236
					0,143	1,46	7,2				
					0,138	1,63	6,9				

¹ Prøve utenfor standardkurve: For lavt

Tabell V5.2: DNA konsentrasjon (ng/μL) til tre negative kontroller (autoklavert sterilt vann) som ble brukt til kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR) og 16S sekvensering målt med Qubit 3.0.

Prøve	DNA konsentrasjon (ng/μL)
Negativ kontroll (NK1)	For lav ¹
Negativ kontroll (NK2)	For lav ¹
Negativ kontroll (NK3)	For lav ¹

¹ Prøve utenfor standardkurve: For lavt

Tabell V5.3: DNA konsentrasjon (ng/μL), absorbans ved 260 nm (A260) og absorbansratio (A260/A280) fra de samlede trippelprøvene av rå- og drikkevann på tre etterfølgende dager, som var utgangspunktet før amplifisering og før 16S-sekvensering. Drikkevannsprøvene ble oppkonsentrert.

Vann-type	Prøvetakings-dato	Prøve-nummer	NanoDrop Lite			Qubit 3.0
			A260	A260/A280	ng/μL	ng/μL
Råvann	15.12.2021	1-2-3	0,119	1,65	6,0	3,22
	16.12.2021	7-8-9	0,151	1,47	7,6	2,22
	17.12.2021	13-14-15	0,225	1,94	11,3	2,97
Drikkevann	15.12.2021	4-5-6	1,113	1,31	55,6	0,242
	16.12.2021	10-11-12	0,246	1,37	12,3	0,247
	17.12.2021	16-17-18	0,586	1,18	29,3	0,250

Tabell V5.4: DNA konsentrasjon (ng/ μ L), absorbans ved 260 nm (A260) og absorbansratio (A260/A280) fra isolatene målt med NanoDrop Lite.

Isolat	Stamme isolert fra prøve	Prøvenummer qPCR (dyrkning)	A260	A260/A280	ng/ μ L
<i>Aeromonas bestiarum</i>	1	A (1H)	2,498	2,01	124,9
<i>Aeromonas encheleia</i>	2	B (2I)	3,230	1,80	161,5
<i>Bacillus cereus</i>	14	C (14I)	1,171	1,85	58,6
<i>Bacillus mycoides</i>	15	D (15J)	3,916	2,16	195,8
<i>Bacillus pumilus</i>	7	E (7G)	1,925	2,07	96,3
<i>Bacillus subtilis</i>	3	F (3G)	0,969	1,45 ¹	48,5
<i>Elizabethkingia miricola</i>	2	G (2F)	0,342	1,98	17,1
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	7	H (7H)	0,319	2,36	16,0
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	14	I (14J)	0,244	2,26	12,2
<i>Micrococcus luteus</i>	6	J (6B)	0,238	2,33	11,9
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	1	K (1D)	0,250	2,06	12,5
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	13	L (13J)	0,491	2,30	24,6
<i>Paenibacillus macerans</i>	1	M (1F)	0,480	1,80	24,0
<i>Rahnella aquatilis</i>	1	N (1A)	2,854	2,00	142,7
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	14	O (14B)	1,262	1,93	63,1
<i>Pseudomonas corrugata</i>	13	P (13D)	0,753	1,95	37,6
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	8	Q (8G)	1,171	2,03	58,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9	R (9F)	0,267	2,05	13,4
<i>Pseudomonas koreensis</i>	2	S (2D)	0,437	2,01	21,9
<i>Pseudomonas protegens</i>	1	T (1E)	0,439	1,86	22,0
<i>Pseudomonas putida</i>	3	U (3F)	0,521	1,99	26,1
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	10	V (10C)	0,330	1,99	16,5
<i>Serratia fonticola</i>	1	W (1B)	1,387	1,97	69,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	X (10B)	0,314	2,35	15,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	Y (3E)	1,893	2,00	94,7

¹ Stammen var veldig seig og klissen, og det var ikke synlig bunnfall etter 5 minutters sentrifugering

Tabell V5.5: DNA konsentrasjon (ng/ μ L) fra de samlede trippelprøvene av rå- og drikkevann (på tre etterfølgende dager) og de negative kontrollene (NK1, NK2 og NK3), samt den negative sekvenseringskontrollen (NK5) og utvalgte isolatprøver (n=7). Konsentrasjonen ble målt med Qubit 3.0 etter amplifisering (PCR-2) og før samling av alle prøvene (forberedelse av sekvenseringsbiblioteket). Drikkevannsprøvene ble tidligere oppkonsentrert.

Prøve	Prøvetakingsdato	Prøve-nummer	Identifikasjon	DNA konsentrasjon (ng/ μ L)
Råvann	15.12.2021	1-2-3	-	0,792
	16.12.2021	7-8-9	-	38,4
	17.12.2021	13-14-15	-	39,2
Drikkevann	15.12.2021	4-5-6	-	25,0
	16.12.2021	10-11-12	-	8,64
	17.12.2021	16-17-18	-	6,72
Negativ kontroll (autoklavert, filtrert og DNA ekstrahert sterilt vann)	-	NK1-NK2-NK3	-	For lav ¹
Negativ kontroll (sekvensering)	-	NK5	-	For lav ¹
Isolat	-	H	<i>Lysinibacillus spp.</i>	20,0
	-	I	<i>Lysinibacillus spp.</i>	12,1
	-	P	<i>Pseudomonas spp.</i>	11,5
	-	Q	<i>Pseudomonas spp.</i>	For lav ¹
	-	R	<i>Pseudomonas spp.</i>	13,2
	-	T	<i>Pseudomonas spp.</i>	18,2
	-	V	<i>Pseudomonas spp.</i>	14,5

¹ Prøve utenfor standardkurve: For lavt

Tabell V5.6: DNA konsentrasjon (ng/ μ L) målt med Qubit 3.0 i de ulike trinn under forberedelsen av biblioteket til sekvensering.

Trinn	DNA konsentrasjon (ng/ μ L)
Etter samling av alle prøvene og oppkonsentrering ved AMPure XP	53,0
Etter ende reparering og -preparering og rensing	11,5
Etter adapter ligering og rensing	13,6

Vedlegg 6: Statistiske beregninger fra DNA-konsentrasjonsmålingene

Tabell V6.1: Statistiske parameter (beregnet i Microsoft Excel) av DNA-konsentrasjonsmålingene til råvannsprøvene målt med Qubit 3.0.

Parameter	ng/ μ L
Gjennomsnitt	3,08
Gjennomsnittets standardfeil (SEM)	0,23
Standardavvik (SD)	0,39

Beregning av 95 % KI til råvannets DNA-konsentrasjon målt med Qubit 3.0:

$$t_{0,05(2);2} = 4,303$$

$$95 \% \text{ KI} = \text{gjennomsnitt} \pm t \times \text{SEM} = 3,08 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 4,303 \times 0,23 \text{ ng}/\mu\text{L} = 3,08 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 0,99 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

95 % KI: 2,09 til 4,07 ng/ μ L

Tabell V6.2: Statistiske parameter (beregnet i Microsoft Excel) av DNA-konsentrasjonsmålingene til drikkevannsprøvene målt med Qubit 3.0.

Parameter	ng/ μ L
Gjennomsnitt	0,03
Gjennomsnittets standardfeil (SEM)	0,002
Standardavvik (SD)	0,003

Beregning av 95 % KI til drikkevannets DNA-konsentrasjon målt med Qubit 3.0:

$$t_{0,05(2);2} = 4,303$$

$$95 \% \text{ KI} = \text{gjennomsnitt} \pm t \times \text{SEM} = 0,03 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 4,303 \times 0,002 \text{ ng}/\mu\text{L} = 0,03 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 0,009 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

95 % KI: 0,02 til 0,04 ng/ μ L

Tabell V6.3: Statistiske parameter (beregnet i Microsoft Excel) av DNA-konsentrasjonsmålingene til isolatprøvene målt med NanoDrop Lite.

Parameter	ng/ μ L
Gjennomsnitt	55,42
Gjennomsnittets standardfeil (SEM)	10,47
Standardavvik (SD)	52,35

Beregning av 95 % KI til isolatenes DNA-konsentrasjon målt med Nanodrop Lite:

$$t_{0,05(2);24} = 2,064$$

$$95 \% \text{ KI} = \text{gjennomsnitt} \pm t \times \text{SEM} = 55,42 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 2,064 \times 10,47 \text{ ng}/\mu\text{L} = 55,42 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 21,61 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

95 % KI: 77,0 til 33,8 ng/ μ L

Vedlegg 7: Primer- og plasmidsekvenser som ble brukt ved qPCR

Tabell V7.1: Forward (F) og revers (R) primersekvenser som ble brukt for påvisning av antibiotika-resistensgener (ARG) ved hjelp av kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR). Amplikonstørrelse er angitt i basepar (bp).

Antibiotika-gruppe og ARG	qPCR primersekvens (5'-3')	Amplikon størrelse (bp)	Referanse
Betalaktamer			
<i>CTX-M-15</i>	F: CTATGGCACCACCAACGATA R: ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT	103	Cacace et al., 2019
<i>CTX-M-27</i>	F: GAGGCGTGACGGCTTTTG R: CGTAGGTTCAAGTGCATCCCA	68	Hartmann et al., 2012
<i>CTX-M-32</i>	F: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA R: CGCTCATCAGCACGATAAAG	156	Cacace et al., 2019
<i>TEM</i>	F: TTCCTGTTTTGCTCACCCAG R: CTAAGGATCTTACCGCTGTTG	113	Cacace et al., 2019
<i>OXA-48</i>	F: TTCGGCCACGGAGCAAATCAG R: GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA	240	Voigt et al., 2020
<i>OXA-58</i>	F: CACGCATTTAGACCGAGCA R: TGGCTTTCCATCCCCTT	127	Müller et al., 2018
Glykopeptider			
<i>vanA</i>	F: TCTGCAATAGAGATAGCCGC R: GGAGTAGCTATCCCAGCATT	377	Stoll et al., 2012
Tetrasykliner			
<i>tetM</i>	F: ACAGAAAGCTTATTATATAAC R: TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	171	Stoll et al., 2012
Polymyxiner			
<i>mcr-1</i>	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTT R: CTTGGTCCGGTCTGTAGGG	309	Müller et al., 2018
Sulfonamider			
<i>sul1</i>	F: CGCACCGGAAACATCGCTGCAC R: TGAAGTTCCGCGCAAGGCTCG	162	Cacace et al., 2019

Tabell V7.2: Forward (F) og revers (R) primer sekvenser for V3-V4 hypervariabel 16S rRNA-genområdet brukt til kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR).

Primer	qPCR primersekvens (5'-3')	Posisjon i <i>E. coli</i>	Amplikon størrelse (bp)	Referanse
341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	341–357	444	Thijs et al., 2017
785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	785–805		Thijs et al., 2017

ARG qPCR amplikon produkt og primersett

Amplikon for *CTX-M-15*:

CTATGGCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTC
ACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGT (Alcock et al., 2020).

Forward primer: CTATGGCACCAACGATA

Revers primer: ACGGCTTCTGCCTTAGGTT

Revers komplementær tråd (5'-3'): AACCTAAGGCAGAAAGCCGT

Amplikon for *CTX-M-27*:

GAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACG
(Alcock et al., 2020).

Forward primer: GAGGCGTGACGGCTTTTG

Revers primer: CGTAGGTTCAAGTGCATCCA

Revers komplementær tråd (5'-3'): TGGATCGCACTGAACCTACG

Amplikon for *CTX-M-32*:

CGTCACGCTGTTGTTAGGAAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATT
AGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATC
GTGCTGATGAGCG (Alcock et al., 2020).

Forward primer: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA

Revers primer: CGCTCATCAGCAGATAAAG

Revers komplementær tråd (5'-3'): CTTTATCGTGCTGATGAGCG

Amplikon for *TEM*:

TTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG (Alcock et al., 2020).

Forward primer: TTCCTGTTTTGCTCACCCAG

Revers primer: CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG

Revers komplementær tråd (5'-3'): CAACAGCGGTAAGATCCTTGAG

Amplikon for *OXA-48*:

TTCGGCCACGGAGCAAATCAGCTTTTTAAGAAAGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATCGGAGCGCAGCCA
GCGTATTGTCAAACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGA CTATATTATTCGGGCTAAA ACTGGATACTC
GACTAGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGTTCGGTTGGGTTGAACTTGATGATAATGTGTGGTTTTTTGCG
GATGAATATGGATATGCCACATC (Alcock et al., 2020).

Forward primer: TTCGGCCACGGAGCAAATCAG

Revers primer: GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA

Revers komplementær tråd (5'-3'): TCGGATGAATATGGATATGCCACATC

Amplikon for *OXA-58*:

CACGCATTTAGACCGAGCAAAAACAGCTTATATTCCTGCATCTACATTTAAAATTGCCAATGCACTAATTGGTT
TAGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAAATATTTAAGTGGGATGGAAAGCCA (Alcock et al., 2020).

Forward primer: CACGCATTTAGACCGAGCA

Revers primer: TGGCTTTCCATCCCACTT

Revers komplementær tråd (5'-3'): AAGTGGGATGGAAAGCCA

Amplikon for *vanA*:

TCTGCAATAGAGATAGCCGCTAACATTAATAAAGAAAAATACGAGCCGTTATACATTGGAATTACGAAATCT
GGTGTATGGAAAATGTGCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAAAACGACAATTGCTATTCAGCTGTACTCTCG
CCGGATAAAAAAATGCACGGATTACTTGTTAAAAAGAACCATGAATATGAAATCAACCATGTTGATGTAGCA
TTTTAGCTTTGCATGGCAAGTCAGGTGAAGATGGATCCATACAAGGTCTGTTTGAATTGTCCGGTATCCCTT
TTGTAGGCTGCGATATTCAAAGCTCAGCAATTTGTATGGACAAATCGTTGACATACATCGTTGCGAAAATGCG
TGGGATAGCTACTCC (Alcock et al., 2020).

Forward primer: TCTGCAATAGAGATAGCCGC

Revers primer: GGAGTAGCTATCCCAGCATT

Revers komplementær tråd (5'-3'): AATGCTGGGATAGCTACTCC

Amplikon for *tetM*:

ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGTACAACGAGGAC
GGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAA
TACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCA (Alcock et al., 2020).

Forward primer: ACAGAAAGCTTATTATATAAC

Revers primer: TGGCGTGTCTATGATGTTCCAC

Revers komplementær tråd (5'-3'): GTGAACATCATAGACACGCCA

Amplikon for *mcr-1*:

CGGTCAGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGAT
AAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCG
CGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATC
ATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCC
CTACAGACCGACCAAG (Alcock et al., 2020).

Forward primer: CGGTCAGTCCGTTTGTTCT

Revers primer: CTTGGTCGGTCTGTAGGG

Revers komplementær tråd (5'-3'): CCCTACAGACCGACCAAG

Amplikon for *sul1*:

CGCACCGGAAACATCGCTGCACGTGCTGTGGAACCTTCAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGGCTCCGCTATT
GGTCTCGGTGTGCGGAAATCCTTCTTGGGCGCCACCGTTGGCCTTCTGTAAAGGATCTGGGTCCAGCGAG
CCTTGCGGCGGAACTTCA (Alcock et al., 2020).

Forward primer: CGCACCGGAAACATCGCTGCAC

Revers primer: TGAAGTTCGCGCAAGGCTCG

Revers komplementær tråd (5'-3'): CGAGCCTTGCGGCGGAACTTCA

Syntetisk sekvens (2 191 bp) som ble tilsatt plasmid pUC57 (2 710 bp)

CTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTC
ACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTAAAGCCTGCCGATCTGGTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAA
CACGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGAAGTGAAGCGCGCCGCGTTGCAGTACAGCGACAATACCGCCAT
GAACAAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGAGAGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGCGATCGGCGATGAGA
CGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCCCGGCGACCCGAGAGACACCACCACGC
CGCGGGCGATGGCGCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGTCATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCA
GTTGGTGACGTGGCTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTGGGCGCGCTTACCGACGTCGTGGA
CTGTGGGTGATAAGACCGGCAGCGGCGGCTACGGCAAGTACAGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATG
CGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAATTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACTGGGTGTGGC
ATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGTTCCCTGTTTTTGCTCACCCAGAA
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAA
CAGCGGTAAGATCCTTGAGTTCGGCCACGGAGCAAATCAGCTTTTTAAGAAAGCTGTATCACAATAAGTTAC
ACGTATCGGAGCGCAGCCAGCGTATTGTCAAACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGACTATATTATTC
GGGCTAAAACCTGGATACTCGACTAGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTCGGTTGGGTTGAACTTGAT
GATAATGTGTGGTTTTTTGCGATGAATATGGATATGCCACATCACGCAATTTAGACCGAGCAAAAACAGCTT
ATATTCCTGCATCTACATTTAAATGCCAATGCACTAATTGGTTTAGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAA
ATATTTAAGTGGGATGGAAAGCCATCTGCAATAGAGATAGCCGCTAACATTAATAAAGAAAAATACGAGCCG
TTATACATTGGAATTACGAAATCTGGTGTATGGAAAATGTGCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAAAACGAC
AATTGCTATTCAGCTGTACTCTCGCCGATAAAAAATGCACGGATTACTTGTTAAAAAGAACCATGAATATG
AAATCAACCATGTTGATGTAGCATTTTCAGCTTTCATGGCAAGTCAGGTGAAGATGGATCCATACAAGGTC
TGTTTGAATTGTCCGGTATCCCTTTTGTAGGCTGCGATATTCAAAGCTCAGCAATTTGTATGGACAAATCGTT
GACATACATCGTTGCGAAAATGCTGGGATAGCTACTCCACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATT
ACAGAATTAGGAAGCGTGACAAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAAT
TACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCACGGTC
AGTCCGTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAAT
CAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGAT
GCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGG
GCGCGGTGACCAGTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACA
GACCGACCAAGCGCACCGGAAACATCGCTGCACGTGCTGTGCAACCTTCAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGG
GCTCCGCTATTGGTCTCGGTGTCGCGGAAATCCTTCTTGGGCGCCACCGTTGGCCTTCTGTAAAGGATCTG
GGTCCAGCGAGCCTTGCGGCGGAACTTCA

De grå markerte sekvensene tilhører CTX-M-27-fragmentet. Det ble gått bort fra primerpar som var vurdert da plasmidet ble bestilt, men ble etter hvert byttet mot primerpar som var bedre egnet.

- Opplysninger fra produsenten GenScript™:
- Plasmid lengden (totalt): 4 901 bp
 - Vektorkilde: Standardvektor
 - Plasmid navn: pUC57
 - Ekspress kloning: AbR_pUC57
 - Levering: Standard 4 µg frysetørket plasmid-DNA

Referanser

- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., Vries, D. d., Schwermer, C. U., Méric, S., Ozkal, C. B., Pons, M.-N., Kneis, D. & Berendonk, T. U. (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320-330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Hartmann, A., Amoureux, L., Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Gueneau, E., Neuwirth, C. (2012). Occurrence of CTX-M Producing Escherichia coli in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Frontiers in Microbiology*, 3, 83. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00083>
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R. M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C. & Bierbaum, G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>
- Stoll, C., Sidhu, J.P., Tiehm, A., Toze, S. (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental Science & Technology*, 46(17), 9716-9726. <https://doi.org/10.1021/es302020>
- Thijs, De Beeck, M. O., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J. D., Weyens, N., & Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 494–494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00494>
- Voigt, A. M., Ciorba, P., Döhla, M., Exner, M., Felder, C., Lenz-Plet, F., Sib, E., Skutlarek, D., Schmithausen, R. M. & Faerber, H. A. (2020). The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224, 113449. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113449>

Vedlegg 8: Forberedelse til 16S rRNA qPCR analysen

Standarder

Det ble brukt *E. coli* CCUG 10979 som referanse. DNAet fra stammen ble direkte bestilt fra CCUG, avdeling klinisk bakteriologi, og ble levert i frysetørket form. Ampullen inneholdt i følge leverandøren 80 til 100 ng/μL DNA og ble resuspendert med 100 μL Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland). Det ble laget en 1:10 fortynning av stamløsningen med Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland) og målt med Qubit 3.0 til 12,0 ng/μL DNA.

Beregning av antall 16S-gener

Genomet til *E. coli* (CCUG 10979) består av 4 746 218 bp (NCBI, 2021). Den gjennomsnittlige vekten av et basepar er på rundt 650 dalton (IDT, 2011), slik at vekten til et komplett *E. coli*-genom er 3 085 041 700 dalton. 1 dalton er $1,67 \times 10^{-24}$ g (IDT, 2011), slik at en genomisk enhet (GU) veier $5,2 \times 10^{-15}$ g som er $5,2 \times 10^{-6}$ ng. Beregning av antall GU i 1 ng DNA er som følgende:

$$1 \text{ GU} = 5,2 \times 10^{-6} \text{ ng DNA}$$

$$X \text{ GU} = 1 \text{ ng DNA}$$

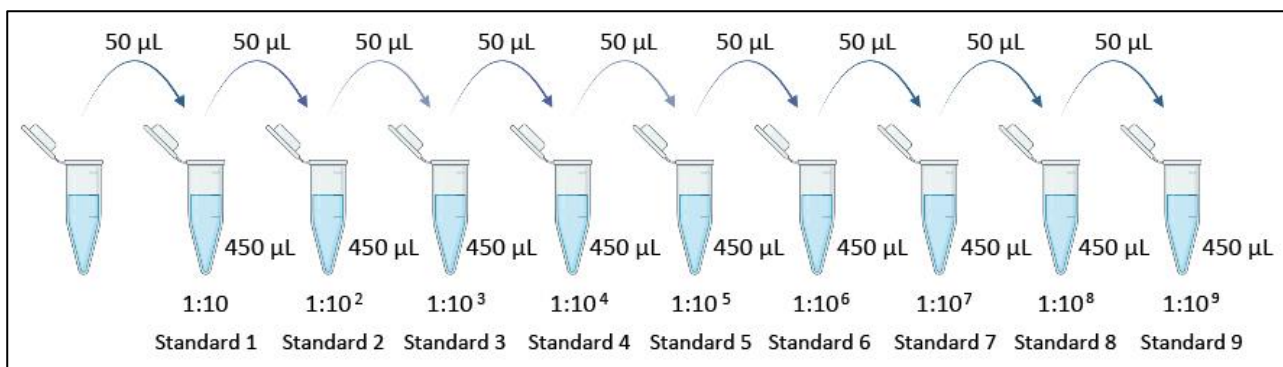
$$X = (1 \text{ GU} \times 1 \text{ ng DNA}) / (5,2 \times 10^{-6} \text{ ng DNA}) = 1,9 \times 10^5 \text{ GU}$$

Bruksløsningen ble målt til 12,0 ng/μL *E. coli* DNA. 12,0 ng DNA per μL løsning gir dermed rundt $2,3 \times 10^6$ GU. I denne analysen ble det brukt 5 μL prøvevolum til qPCR slik at det er $1,2 \times 10^7$ GU.

Videre inkluderer et typisk *E. coli*-genom syv 16S rRNA-gener som også er tilfelle med referansestammen (NCBI, 2021), slik at det er $8,2 \times 10^7$ 16S-genkopier i 5 μL DNA-løsning.

Fortynningsserie

Det ble laget en 10-gangers fortynningsserie (1:10 til 1:10⁹) som er illustrert i figur V8.1. 50 μL av *E. coli* CCUG 10979 stamløsningen (80-100 ng/μL) ble overført til et mikrosentrifugerør som inneholdt 450 μL Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland) og representerer standard EC1 (12,0 ng/μL). Antall 16S-gener er dermed 1:10 av det opprinnelige. Løsningen ble forsiktig blandet med vortex før 50 μL ble overført til et nytt mikrosentrifugerør med 450 μL Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland). Denne 1:10² fortynningen er standard EC2. Denne fremgangsmåten ble videreført til standard EC9 der den relative forekomsten av 16S-genet per 5 μL løsning er rundt 1 (Tabell V8.1).



Figur V8.1: Illustrasjon på tillaging av en 10-gangers fortyningsserie. Illustrasjonen ble laget med BioRender av Melanie Schreier (BioRender, 2022).

Tabell V8.1: 10-gangers fortyning av *E. coli* CCUG 10979 (12,0 ng/µL) som viser utregningen av konsentrasjon, genomisk enhet (GU) og 16S-gen forekomsten både per µL og 5 µL av standardene.

Standard	DNA konsentrasjon (ng/µL)	GU/µL	16S/µL	GU/5µL	16S/5µL
Standard EC1	12	$2,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$
Standard EC2	$1,2 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$
Standard EC3	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$8,2 \times 10^5$
Standard EC4	$1,2 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$
Standard EC5	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$
Standard EC6	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$8,2 \times 10^2$
Standard EC7	$1,2 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^0$	$1,6 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$
Standard EC8	$1,2 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^0$	$1,2 \times 10^0$	$8,2 \times 10^0$
Standard EC9	$1,2 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-1}$	0,82

Primere

Primere ble levert av Integrated DNA Technologies der opplysningene fra produsenten om de ulike primerne er gitt i tabell V8.2. Primerne ble levert med en konsentrasjon på 100 µM oligonukleotid i IDTE buffer. Det ble laget en primerbruksløsning som hadde en sluttkonsentrasjon av 10 µM oligonukleotid (100 µL av levert primerløsningen ble blandet med 900 µL Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland)).

Tabell V8.2: Opplysningene om forward (F) og revers (R) primerne fått av produsenten Integrated DNA Technologies som ble brukt for 16S kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR).

Primer	Produkt	Mengde av oligo	Baser	Tm (50 mM NaCl) ¹ (°C)	GC innhold (%)
341F	250 nmole DNA	100 µM in 1597 µL IDTE buffer	17	60,1	73,5
785R	25 nmole DNA	100 µM in 287 µL IDTE buffer	21	51,3	47,6

¹ Tm (smeltetemperatur) som er oppgitt tar ikke hensyn til Mg²⁺ og dNTP konsentrasjon

Optimalisering av primerkonsentrasjon

Formålet var å bestemme minimum primer konsentrasjon som gir en lav kvantifiseringscyklus (C_q) samt høy spesifisitet (Thermo Fisher Scientific, 2011), ved et reaksjonsvolum på 25 μL .

Teoretisk

Best primerkonsentrasjon for qPCR-analysen ved SYBRTM green er mellom 50 og 900 nM (Thermo Fisher Scientific, 2011). Primerne ble levert med en konsentrasjon på 100 μM i en buffer og ble fortynnet med Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland) 1:10 til 10 μM som er 10 000 nM. Utgangskonsentrasjonen til primeren er 10 000 nM, der tilstrebet slutt konsentrasjon er 100 nM i et totalt reaksjonsvolum på 25 μL . Ligningen blir da som følgende:

$$X \mu\text{L} \times 10\,000 \text{ nM} = 25 \mu\text{L} \times 100 \text{ nM}$$

$$X = (25 \mu\text{L} \times 100 \text{ nM}) / 10\,000 \text{ nM} = 0,25 \mu\text{L} \text{ av primeren er det ideelle teoretiske volumet}$$

Praktisk

Ni standarder (EC1-EC9) ble analysert i hver av de ni forholdene vist i tabell V8.3, hvorav volumet til SYBRTM green Master Mix (12,5 μL) og standardene (5,0 μL) var konstant. Volumet til det sterile vannet ble tilpasset for å oppnå et totalt volum på 25 μL . I tillegg ble det analysert en negativ kontroll til hver av de ni forholdene og som bestå av Tris-EDTA buffer (5,0 μL).

Tabell V8.3: Forward og revers primer volum in μL og de testede konsentrasjonsvariasjonene som ble brukt for bestemmelse av den optimale primerkonsentrasjonen til 16S rRNA qPCR analysen.

		Forward primer (μL)		
		0,25	1,5	3,75
Revers primer (μL)	0,25	0,25/0,25	1,5/0,25	3,75/0,25
	1,5	0,25/1,5	1,5/1,5	3,75/1,5
	3,75	0,25/3,75	1,5/3,75	3,75/3,75

SYBRTM green Master Mix (LOT 2201620, Thermo Fisher Scientific, USA), primersettet 341F/785R (Integrated DNA technologies, USA) og sterilt vann (Fresenius Kabi, Tyskland) til de ni ulike konsentrasjonssammensetningene (Tabell V8.4) ble blandet i hvert sitt mikrosentrifugerør (VWR, USA). Denne prosessen foregikk i et eget rom der det ikke ble utført noen PCR-oppsett eller amplifisering. Disse ni reaksjonsblandningene ble tatt med til en nytt rom der PCR-oppsett ble utført. Hver av de ni løsningene ble forsiktig blandet ved vortex (AH diagnostic, Denmark) og deretter kort sentrifugert med en mikrosentrifuge (Merck, Tyskland) for å fjerne luft bobler. 20 μL av blandningene

ble pipettert på en 96-brønnsplate (LOT 4346906, Thermo Fisher Scientific, USA). Til slutt ble 5 μL av standardene og negative kontrollene tilført. Platen ble forseglet med MicroAmp™ optisk teip (LOT 33FA8M, Thermo Fisher Scientific, USA) og analysert med reaksjonsbetingelsene oppgitt i metoden.

Tabell V8.4: Ni 16S qPCR reaksjonsblandinger (RB1-RB9) uten prøvematerialet, der det beregnede volumet er til ti prøver.

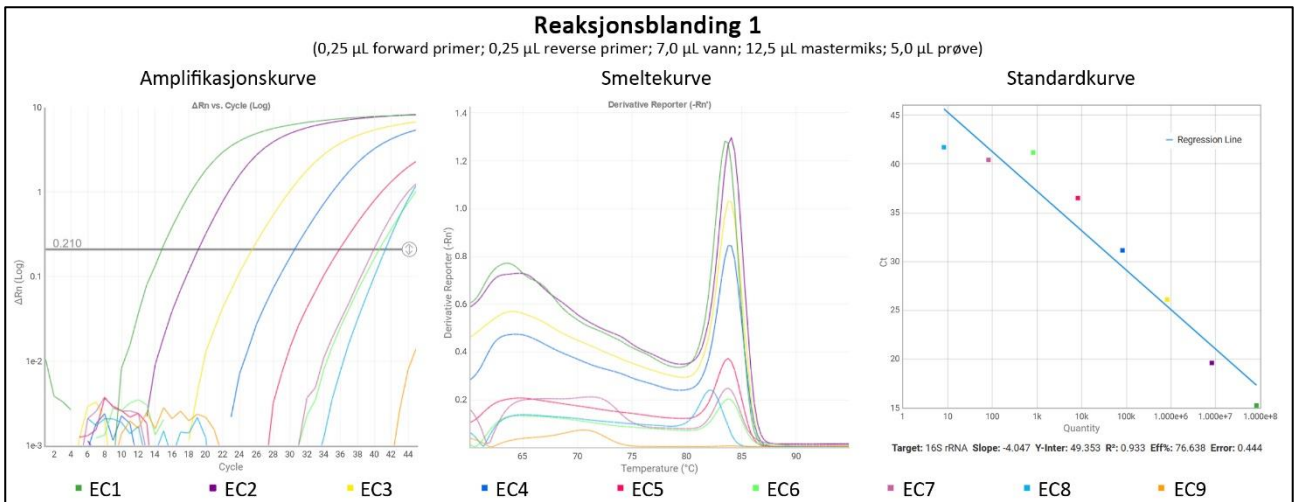
	RB1	RB2	RB3	RB4	RB5	RB6	RB7	RB8	RB9
SYBR™ green Master Mix (μL)	125	125	125	125	125	125	125	125	125
341 Forward primer (μL)	2,5	15	37,5	2,5	2,5	15	15	37,5	37,5
785 Revers primer (μL)	2,5	15	37,5	15	37,5	2,5	37,5	2,5	15
Sterilt vann (μL)	70	45	-	57,5	35	57,5	22,5	35	22,5
Totalt (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Resultatene og diskusjon

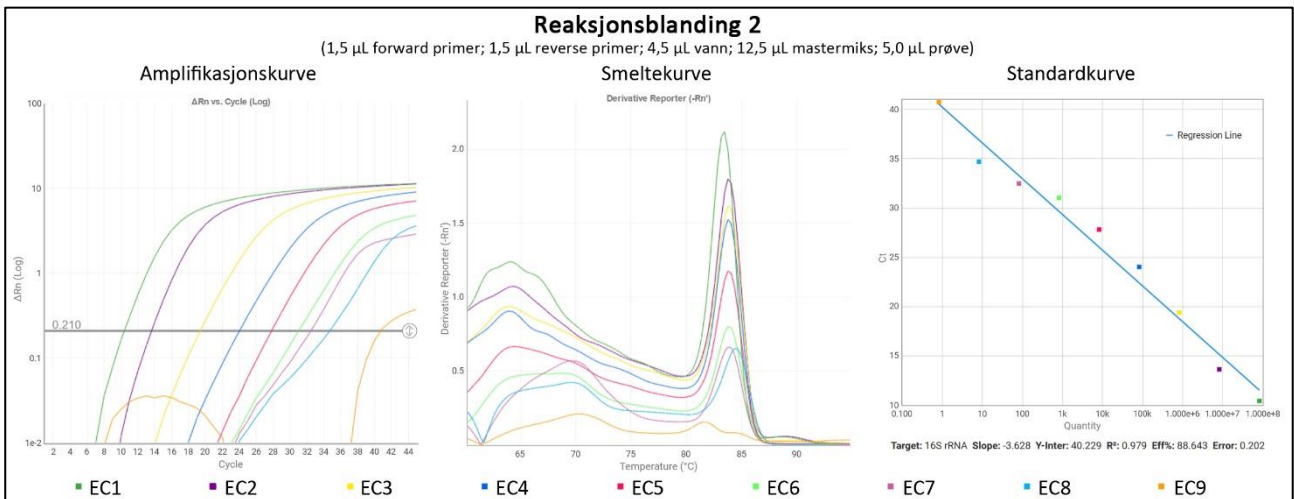
Amplifikasjons-, smelte- og standardkurvene til de ni ulike reaksjonsblandingene er vist i figurene V8.2-V8.10. Syklus terskel på 0,210 ble satt automatisk og vurdert som optimal. Både reaksjonsblanding 1 og 5 ble vurdert som bra. Ved bruk av reaksjonsblanding 1 hadde to av de ni standardene multiple toppe ved smeltekurveanalysen mot tre av ni standarder ved bruk av reaksjonsblanding 5. Derimot hadde blanding 5 resultert i en lavere C_q . C_q -verdien samt smeltetemperaturen (T_m) til standard EC1 er oppgitt i tabell V8.5. Den negative kontrollen ble vurdert positiv for reaksjonsblandingen 2, 3, 4 og 7 (Figur V8.11). Videre ble det dannet uspesifikke PCR produkter i kontrollene for reaksjonsblandingen 5, 6, 8 og 9. Det viste seg at kun den negative kontrollen for reaksjonsblanding 1 ikke hadde noen amplifikasjoner gjennom de 45 syklusene. Til slutt ble det valgt reaksjonsblanding 1 til videre analyse og da særlig med tanke på for å minimere faren for primer-dimer dannelse. Kontaminering av både bakterier i luften og under pipetteringen har mest sannsynlig bidratt til de positive negative kontrollene, samt dannelsen av uspesifikke PCR-produkter. Dersom C_q cut-off ville blitt satt til 35 sykluser (som det egentlig settes automatisk fra programvaren) ville også de negative kontrollene for reaksjonsblandingene 4 og 5 vært negative. Siden det ikke ble analysert noen prøver (og kun primerkonsentrasjon som skulle vurderes) ble oppsettet godkjent.

Tabell V8.5: Kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til standard EC1 i de ni ulike reaksjonsblandingene (RB1-RB9) ved syklusterskelen 0,210.

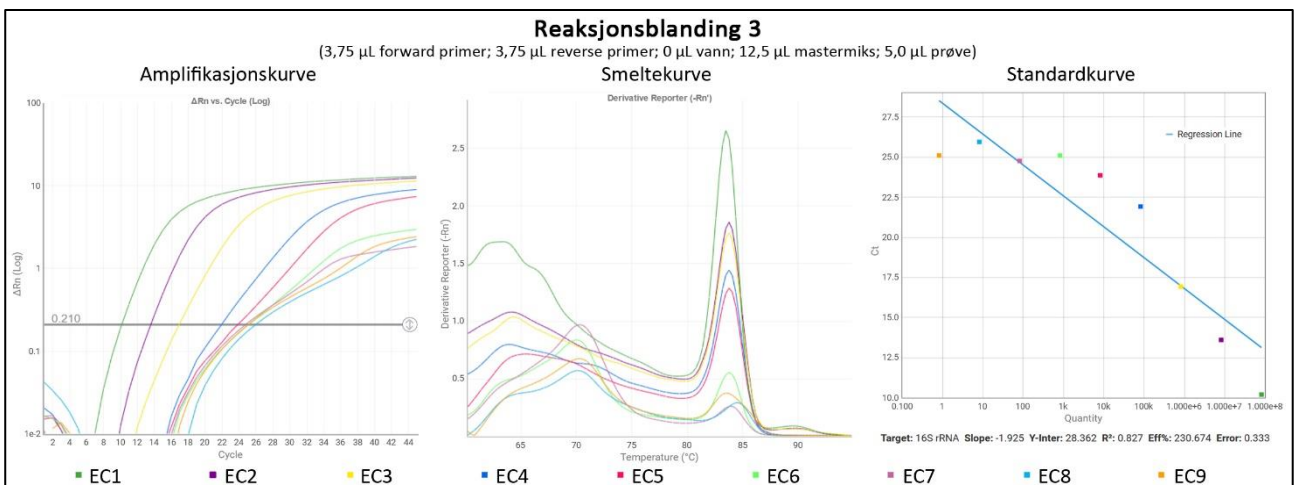
	RB1	RB2	RB3	RB4	RB5	RB6	RB7	RB8	RB9
C_q	14,9	10,5	10,3	12,0	11,8	13,3	10,4	13,1	11,0
T_m	83,6	83,3	83,5	83,6	83,8	83,9	83,6	83,8	83,6



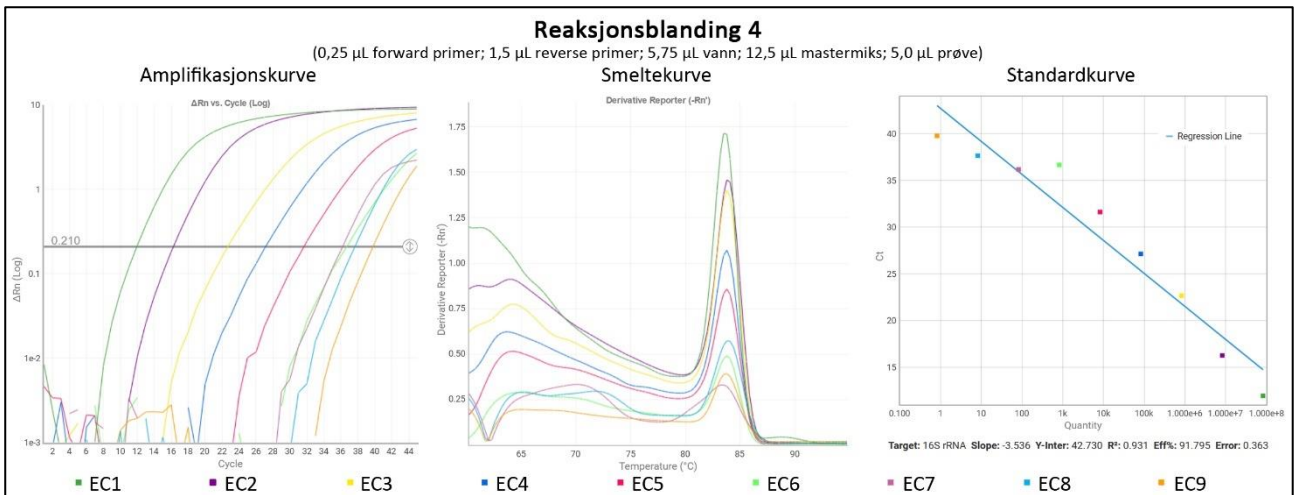
Figur V8.2: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 1. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



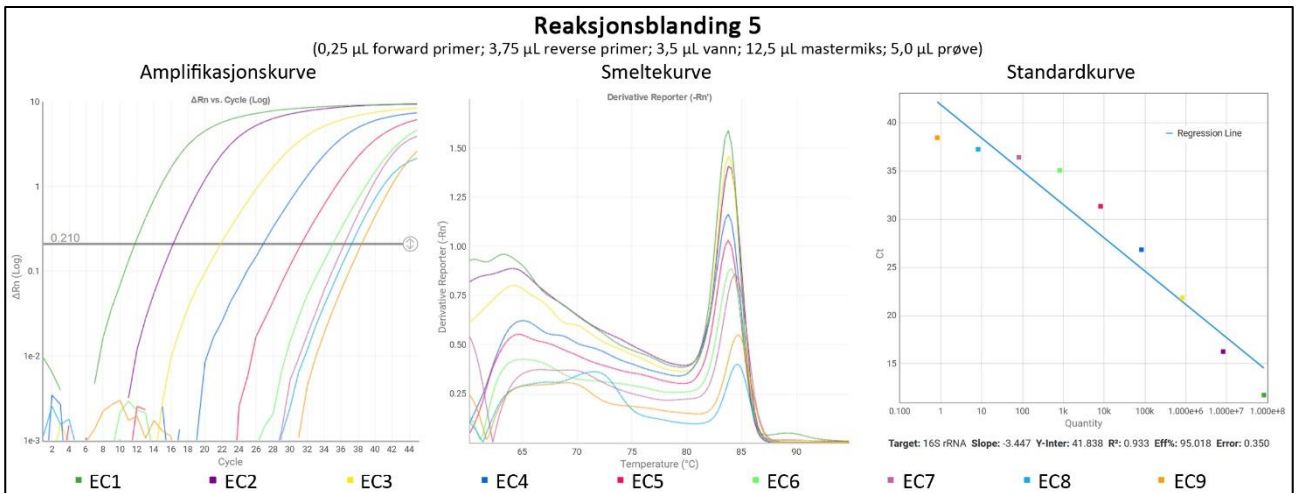
Figur V8.3: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 2. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



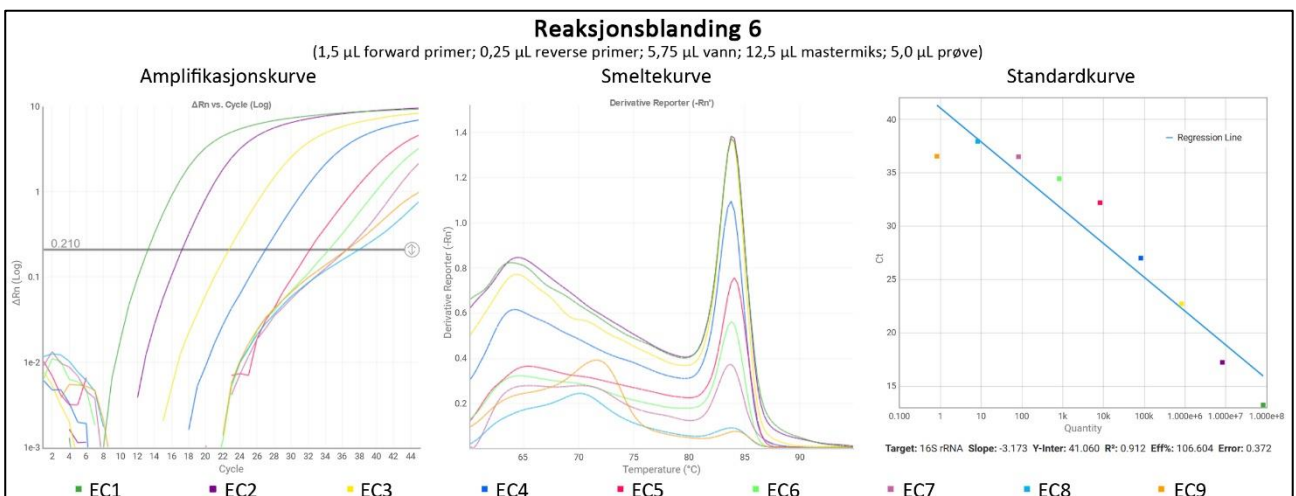
Figur V8.4: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 3. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



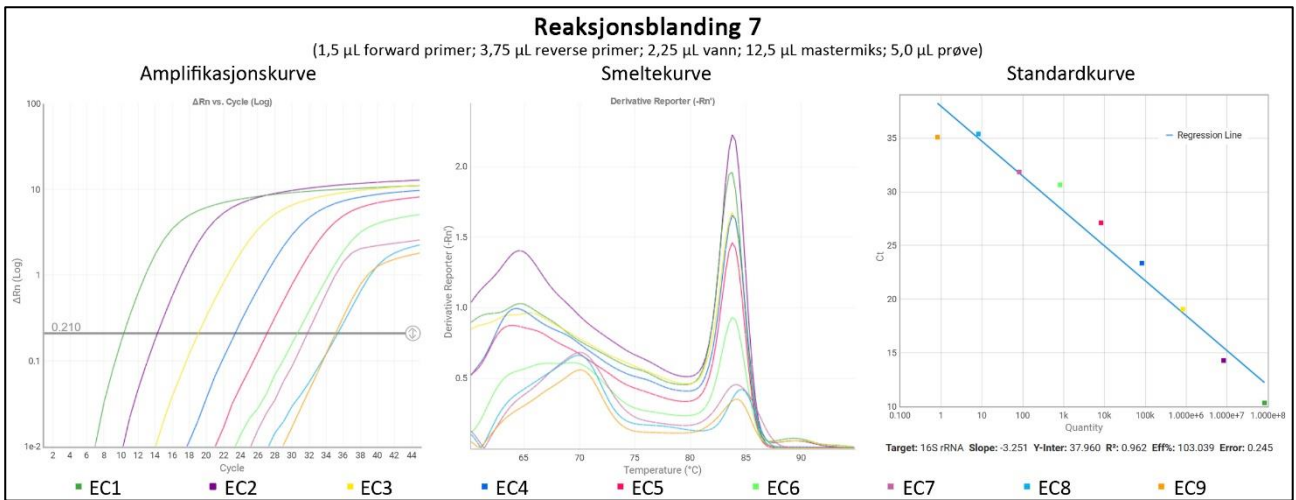
Figur V8.5: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 4. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



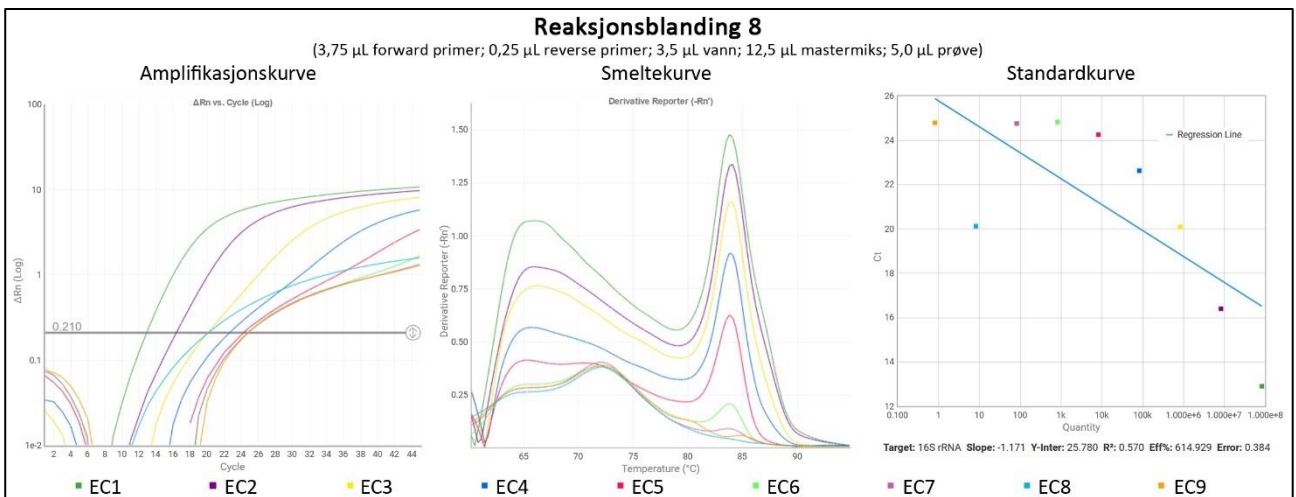
Figur V8.6: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 5. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



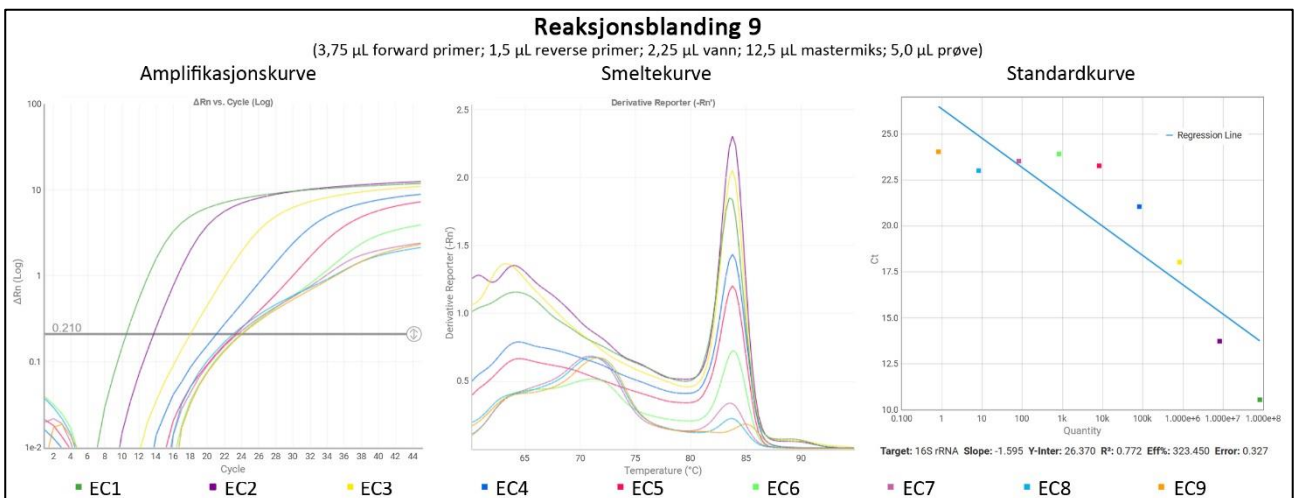
Figur V8.7: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 6. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



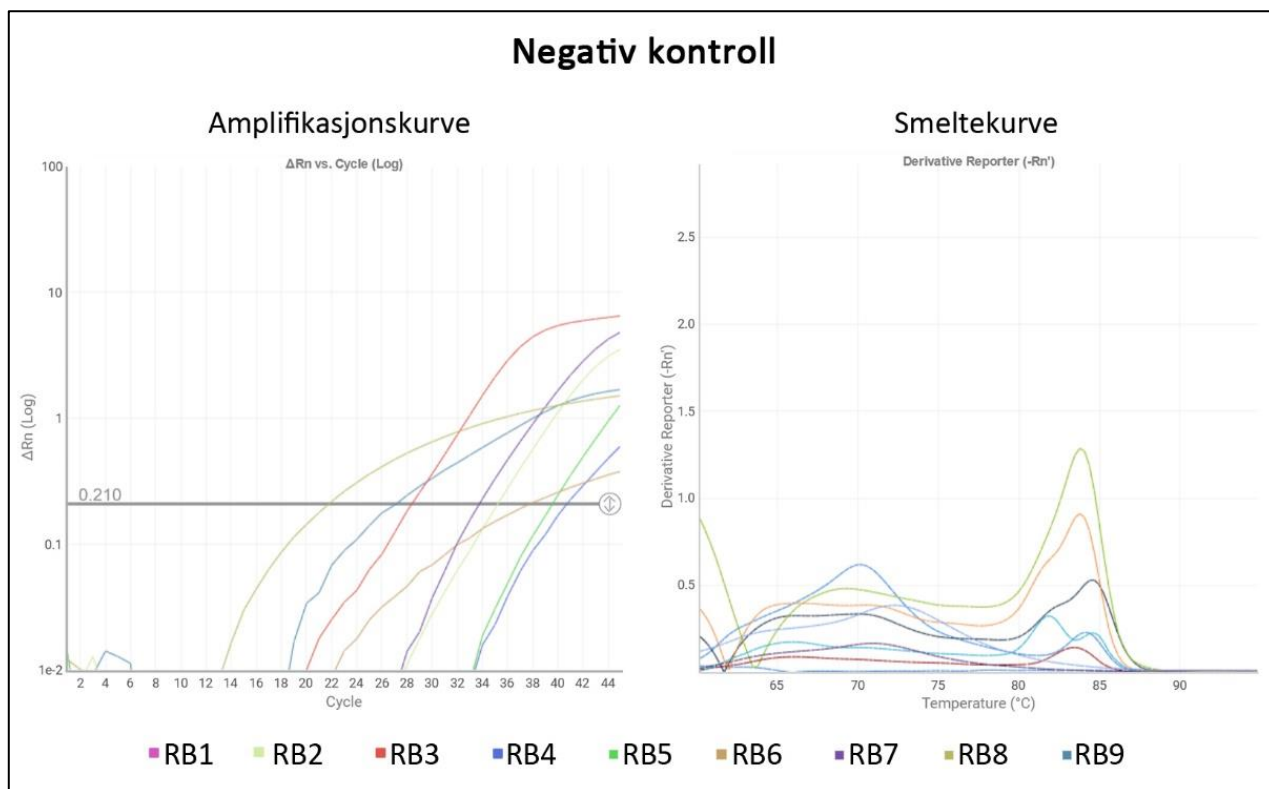
Figur V8.8: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 7. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



Figur V8.9: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 8. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



Figur V8.10: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979 ved bruk av reaksjonsblanding 9. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.



Figur V8.11: Amplifikasjons- og smeltekurve til den negative kontrollen i de ni reaksjonsblandingene. Figurene fra eksperimentet ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Referanser

BioRender. (2022). *Tool to create and share professional scientific figures*. Hentet 2.03.2022 fra <https://biorender.com/>

IDT. (2011). *Molecular Facts and Figures*. Integrated DNA Technologies. https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/biotech-basics/molecular-facts-and-figures.pdf?sfvrsn=4563407_4

NCBI. (2021). *Escherichia coli ATCC 8739, complete sequence*. Hentet 14.03.2023 fra https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_010468

Thermo Fisher Scientific. (2011). *Power SYBR® Green PCR Master Mix Reagents Kit User Guide* (4367218 Rev. E). Thermo Fisher Scientific. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fcms_042179.pdf

Vedlegg 9: Data fra 16S rRNA qPCR analysen

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,033 og ble vurdert som optimal.

Tabell V9.1: Kvalitetsoppsummering fra 16S rRNA qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	2	NK4 (2×)	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	21	-	EC7 (3×), EC9 (3×)	4 (3×), 7 (3×), 8 (3×), 9 (3×), 13 (3×)
Ingen amplifikasjon i prøvene	10	-	-	11 (3×), 12 (1×), 16 (1×), 17 (2×), 18 (3×)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	1	-	-	1 (1×)
Eksponentiell algoritme feil	16	-	EC8 (2×)	11 (3×), 12 (2×), 16 (3×), 17 (3×), 18 (3×)
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	1	-	-	7 (1×)
Multiple T _m ² topper	77	Minst én replika i samtlige reaksjoner		

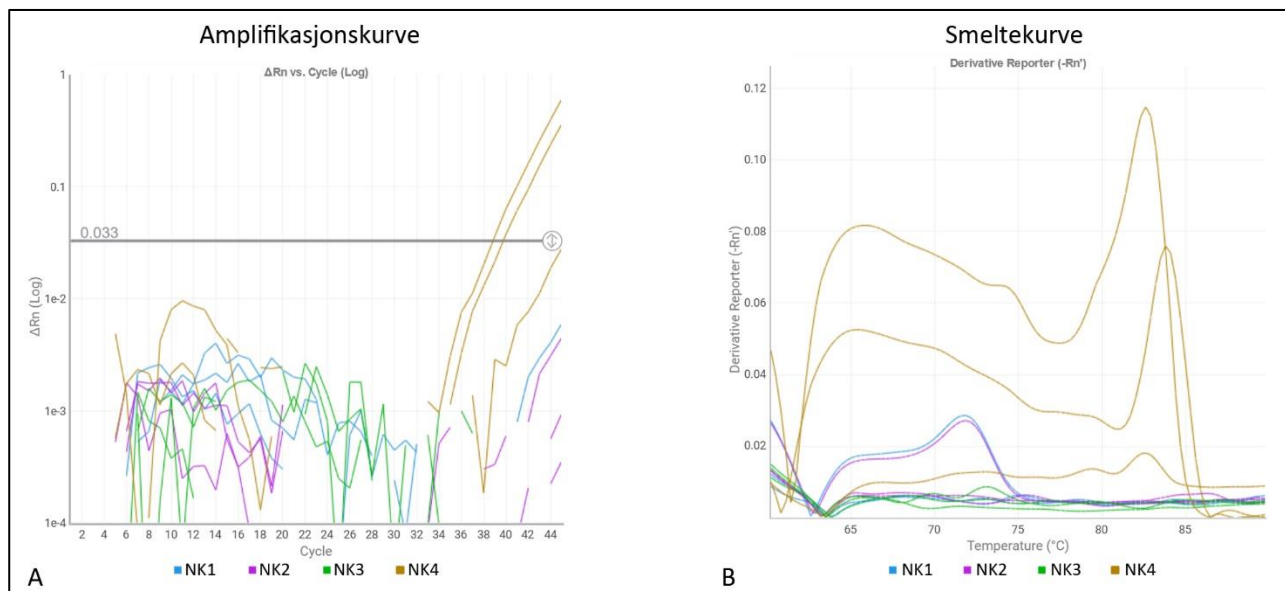
¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

To replikaer til den negative PCR-kontrollen (NK4) krysset terskelen ved henholdsvis syklus 38,857 og 39,798 (Figur V9.1-A). Smeltetemperaturen til disse replikaene var 82,6 °C og 83,8 °C (Figur V9.1-B), og var dermed noe lavere enn smeltetemperaturen til mål-sekvensen (84,1 °C, gjennomsnittlig TM1 av EC1-EC6). Videre viste replikaene multiple topper, og under forbehold at det ble også dannet uspesifikke PCR-produkter var det beregnede gen-kopiantallet svært lav for de to replikaene til NK4 med henholdsvis 14 og 25 16S/5 µL. Deteksjonsgrensen til analysen ble bestemt til 820 16S/5 µL (Tabell V9.4) og replikaene til NK4 kan være falsk positive. Samtidig kan kontaminering ikke utelukkes. Den negative PCR-kontrollen består av en 1:50 fortynnet Tris-EDTA buffer, og siden Tris-EDTA bufferen ble kjøpt inn for denne studien mistenkes at det sterile vannet som ble brukt for å fortygne stamløsningen muligens var kontaminert. Det sterile vannet var en allerede åpnede flaske og ble brukt av andre studenter og ansatte på universitetet. Kontaminering fra reagenser og/eller under pipetteringen (av andre prøver eller fra luft) kan heller ikke utelukkes. Oppsettet ble likevel godkjent

siden smeltetemperaturerne til replikaene til NK4 avviket noe fra målsekvensen. Videre ser det ut til at en mulig kontaminering var begrenset til NK4, siden de andre negative kontrollene ikke krysset terskelen (Tabell V9.2). Én replika av NK1 og NK2 (autoklavert, filtrert og DNA ekstrahert sterilt vann) hadde imidlertid også en tydelig topp ved en smeltetemperatur på 72 °C som indikerer en større uspesifikk amplifisering (Figur V.9.1-B).

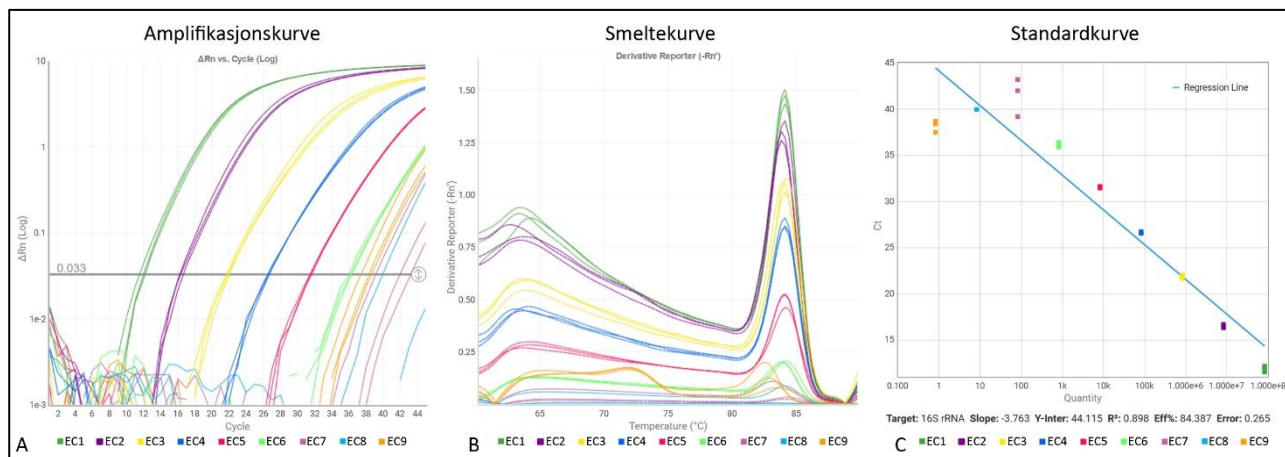


Figur V9.1: 16S rRNA qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til fire negative kontrollere (i tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V9.2: 16S rRNA qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturerne (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene).

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	68,1	87,4	83,1
	Ubestemt	75,0	81,9	68,0
	Ubestemt	71,7	-	-
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	87,3	65,5	71,3
	Ubestemt	71,9	-	-
	Ubestemt	65,3	75,3	-
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	87,3	76,8	82,5
	Ubestemt	65,0	87,8	-
	Ubestemt	66,4	69,8	72,9
NK4 (Tris-EDTA buffer)	39,798	83,8	65,6	-
	38,857	82,6	66,4	-
	Ubestemt	82,6	72,9	72,0

Standarder



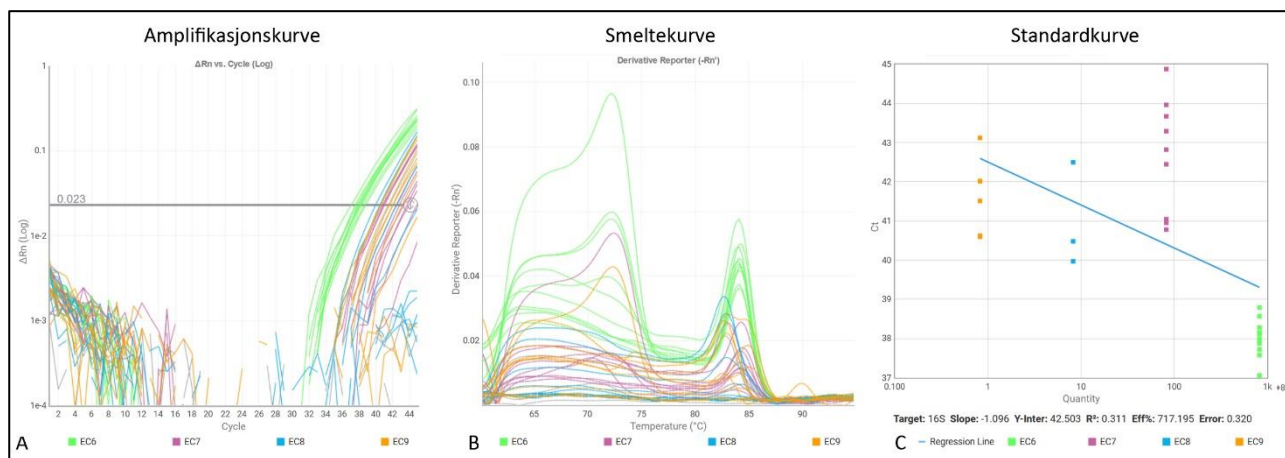
Figur V9.2: 16S rRNA qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurven til fortynningsrekken (3 × EC1-EC9) av *E. coli* CCUG 10979. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V9.3: 16S rRNA qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (EC1-EC9), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)
EC1	11,922	11,731	0,210	84,1	65,5
	11,765			84,1	-
	11,507			84,1	-
EC2	16,643	16,395	0,226	84,1	-
	16,340			83,8	-
	16,201			83,8	-
EC3	22,100	22,029	0,113	84,3	-
	21,898			84,0	-
	22,088			84,1	64,9
EC4	26,814	26,759	0,111	84,1	64,9
	26,631			84,1	-
	26,831			84,1	64,9
EC5	31,512	31,529	0,048	84,1	65,0
	31,492			84,1	64,7
	31,583			84,1	65,2
EC6	36,375	36,291	0,171	84,3	65,0
	36,094			83,8	64,9
	36,405			84,0	65,6
EC7	42,021	41,465	2,031	84,3	65,9
	43,159			84,1	66,1
	39,214			83,1	65,9
EC8	Ubestemt	39,978	-	83,2	66,4
	39,978			84,1	65,6
	Ubestemt			68,3	-
EC9	37,493	38,179	0,607	82,5	71,9
	38,396			71,7	82,8
	38,648			71,9	83,5

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,023 og ble vurdert som optimal. Videre var alle fire negative PCR-kontroller negative.



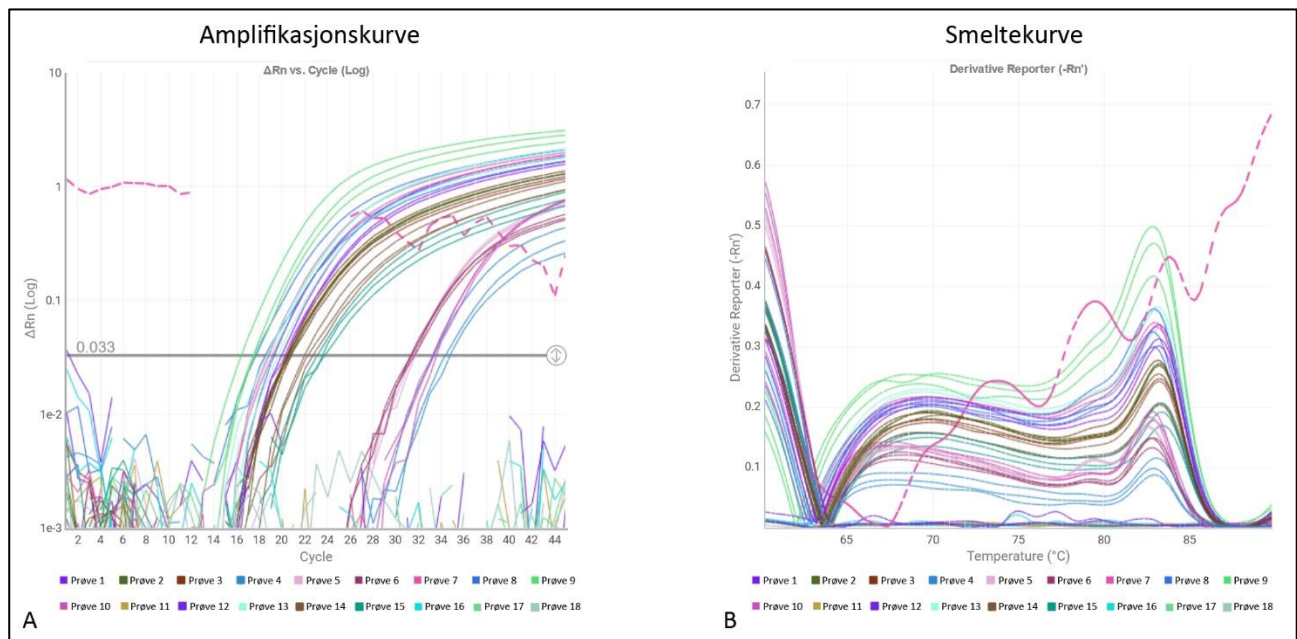
Figur V9.3: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10 × EC6-EC9) av *E. coli* CCUG 10979. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V9.4: Kvantifiseringssyklus (C_q), smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (EC6-EC9), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	16S/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
EC6	820	37,337	38,179	0,477	83,9	72,1	-
		37,983			72,1	84,1	-
		39,035			84,1	66,0	-
		38,273			84,1	66,0	-
		37,658			84,2	66,0	-
		38,139			84,2	66,3	-
		38,230			83,9	-	-
		38,381			72,1	84,1	-
		38,661			84,1	66,3	-
		38,089			84,1	66,3	-
EC7	82	43,419	42,333	1,138	84,2	65,3	-
		41,057			83,0	67,2	-
		43,156			84,2	66,9	-
		42,679			84,2	-	-
		41,144			72,4	84,4	-
		Ubestemt			70,2	83,8	-
		40,984			84,2	66,5	-
		Ubestemt			72,0	83,8	-
		43,822			83,9	64,8	93,3
		42,407			84,2	-	-

EC8	8,2	Ubestemt	41,037	1,249	61,4	92,7	68,4
		40,108			82,7	-	-
		Ubestemt			65,4	83,9	76,9
		Ubestemt			61,3	92,6	66,8
		Ubestemt			90,5	61,3	81,8
		42,457			82,9	66,5	-
		Ubestemt			92,7	89,0	83,2
		Ubestemt			84,5	64,8	88,5
		40,545			82,9	66,5	-
		Ubestemt			61,6	90,9	84,5
EC9	0,82	Ubestemt	41,651	0,895	92,4	61,6	78,3
		Ubestemt			61,3	85,4	90,3
		43,021			72,3	82,6	-
		41,977			84,8	66,5	-
		Ubestemt			65,1	84,4	-
		41,974			85,0	74,4	65,3
		Ubestemt			68,1	61,7	92,9
		40,665			66,5	83,0	-
		41,585			82,9	66,2	-
		40,684			82,7	66,0	-

Vannprøvene



Figur V9.4: 16S rRNA qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Den striplette linjen viser én replika av prøve nummer 7. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V9.5: 16S rRNA qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall 16S-genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q og 16S-genkopi-antall til replikaene. Dataene er direkte overført fra StepOne Software (Version 2.3).

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	16S/5 μ L	Gjennomsnitt (16S/5 μ L)	Standardavvik (16S/5 μ L)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	19,913	20,310	0,344	2 724 257	2 170 492	479 597	68,1	87,4	83,1
	20,505			1 898 298			75,0	81,9	68,0
	20,513			1 888 921			71,7	-	-
2	20,880	20,798	0,121	1 509 543	1 590 388	119 504	87,3	65,5	71,3
	20,659			1 727 657			71,9	-	-
	20,854			1 533 963			65,3	75,3	-
3	20,822	20,626	0,176	1 564 465	1 769 947	185 888	87,3	76,8	82,5
	20,575			1 818 957			65,0	87,8	-
	20,481			1 926 420			66,4	69,8	72,9
4	33,460	34,277	0,748	702	458	217	83,8	65,6	-
	34,929			287			82,6	66,4	-
	34,441			386			82,6	72,9	72,0
5	31,475	31,594	0,106	2 357	2 195	143	83,2	69,5	-
	31,629			2 145			83,2	70,5	-
	31,677			2 083			83,2	68,7	-
6	31,523	31,615	0,196	2 288	2174	250	83,2	68,7	-
	31,840			1 887			83,2	69,6	-
	31,483			2 346			83,2	70,5	-
7	19,313	19,015	0,420	3 928 224	4 786 793	1 214 200	83,2	69,8	-
	Ekskl. ¹			Ekskl. ¹			83,2	69,8	-
	18,718			5 645 363			83,1	70,5	-
8	17,750	18,540	0,804	10 191 682	6 804 243	3 202 784	83,1	67,5	-
	18,513			6 395 732			82,9	68,1	-
	19,356			3 825 313			82,9	67,7	-
9	17,328	17,161	0,599	13 179 646	15 284 077	5 847 331	82,6	67,8	-
	16,496			21 892 354			82,6	68,0	79,3
	17,658			10 780 235			67,8	82,5	-
10	33,264	33,404	0,209	791	730	90	82,9	68,3	-
	33,645			627			82,8	67,4	-
	33,304			772			82,8	68,0	-
11	Ubest.	-	-	-	-	-	83,1	69,6	-
	Ubest.			-			78,3	72,8	83,5
	Ubest.			-			82,9	-	-
12	Ubest.	-	-	-	-	-	82,9	69,5	-
	Ubest.			-			82,8	-	-
	Ubest.			-			82,8	69,8	-
13	19,731	19,152	0,509	3 043 304	4 465 069	1 261 682	82,9	67,8	-
	18,950			4 900 669			82,8	-	-
	18,775			5 451 234			82,9	69,8	-
14	22,484	22,443	0,303	567 546	588 776	110 205	82,9	67,6	-
	22,723			490 731			82,8	67,2	-
	22,122			708 053			82,6	67,8	-
15	23,791	23,731	0,440	255 735	271 731	74 125	71,4	64,4	81,4
	24,138			206 910			83,7	79,6	65,2
	23,265			352 549			73,4	66,2	77,7
16	Ubest.	-	-	-	-	-	75,9	70,7	83,1
	Ubest.			-			66,4	-	-
	Ubest.			-			71,7	76,7	88,3
17	Ubest.	-	-	-	-	-	83,2	68,4	-
	Ubest.			-			83,1	68,6	-
	Ubest.			-			83,1	68,6	-
18	Ubest.	-	-	-	-	-	83,2	69,3	-
	Ubest.			-			83,2	70,1	-
	Ubest.			-			83,2	69,9	-

¹ Ekskludert fra videre statistiske beregninger på grunn av avvikende smeltekurve

Tabell V9.6: 16S rRNA qPCR analysens statistiske parameter til trippelprøvene av rå- og drikkevannet, som oppfylte satte kriterier. Parameterne er beregnet for 16S-gen-kopiantall per 100 mL vann.

Vannstype	Prøvetakingsdato	Prøve	Replikaer (16S/100 mL)	Median replikaer (16S/100 mL)	Median triplikater (16S/100 mL)	Minste verdi triplikater (16S/100 mL)	Største verdi triplikater (16S/100 mL)	Div. parameter vannstype (16S/100 mL)
Råvann	15.12.2021	1	$5,4 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	Median: $3,6 \times 10^{10}$ Minste verdi: $1,1 \times 10^{10}$ Største verdi: $1,3 \times 10^{11}$
			$3,8 \times 10^{10}$					
			$3,8 \times 10^{10}$					
		2	$3,0 \times 10^{10}$					
			$3,5 \times 10^{10}$					
			$3,1 \times 10^{10}$					
	3	$3,1 \times 10^{10}$						
		$3,6 \times 10^{10}$						
		$3,9 \times 10^{10}$						
	16.12.2021	7	$7,9 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{11}$	$9,6 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^{11}$	
			$1,1 \times 10^{11}$					
		8	$2,0 \times 10^{11}$					
			$1,3 \times 10^{11}$					
			$7,7 \times 10^{10}$					
		9	$2,6 \times 10^{11}$					
$4,4 \times 10^{11}$								
$2,2 \times 10^{11}$								
17.12.2021	13	$6,1 \times 10^{10}$	$9,8 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^9$	$9,8 \times 10^{10}$		
		$9,8 \times 10^{10}$						
		$1,1 \times 10^{11}$						
	14	$1,1 \times 10^{10}$						
		$9,8 \times 10^9$						
		$1,4 \times 10^{10}$						
15	$5,1 \times 10^9$							
	$4,1 \times 10^9$							
	$7,1 \times 10^9$							
Drikkevann	15.12.2021	4	$1,4 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$	
			$5,7 \times 10^6$					
			$7,7 \times 10^6$					
		5	$4,7 \times 10^7$					
			$4,3 \times 10^7$					
			$4,2 \times 10^7$					
	6	$4,6 \times 10^7$						
		$3,8 \times 10^7$						
		$4,7 \times 10^7$						
	16.12.2021	10	$1,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	0	0	$1,5 \times 10^7$	
			$1,3 \times 10^7$					
			$1,5 \times 10^7$					
11	0 / 0 / 0	0						
12	0 / 0 / 0	0						
17.12.2021	16	0 / 0 / 0	0	0				0
	17	0 / 0 / 0	0	0	0			
	18	0 / 0 / 0	0	0	0			

Tabell V9.7: Toveis variansanalyse (ANOVA) for 16S rRNA qPCR fra vannprøvene tatt den 15., 16. og 17.12.2021. Beregning er utført på \log_{10} transformerte data (16S/100 mL).

Utgangspunkt for analysen (\log_{10} (16S/100 mL))							
		Prøvetakingsdato					
		15.12.2021	16.12.2021	17.12.2021			
Vanntype	Råvann	10,6	11,0	11,0			
		10,5	11,1	10,1			
		10,6	11,4	9,7			
	Drikkevann	6,9	7,2	0			
		7,6	0	0			
		7,7	0	0			
Sammendrag: Råvann							
		Prøvetakingsdato			Totalt		
		15.12.2021	16.12.2021	17.12.2021			
Prøveantall		3	3	3	9		
Summe (\log_{10} (16S/100 mL))		31,6	33,5	30,8	95,9		
Gjennomsnitt (\log_{10} (16S/100 mL))		10,5	11,2	10,3	10,7		
Varians		0,0	0,1	0,4	0,3		
Sammendrag: Drikkevann							
		Prøvetakingsdato			Totalt		
		15.12.2021	16.12.2021	17.12.2021			
Prøveantall		3	3	3	9		
Summe (\log_{10} (16S/100 mL))		22,2	7,2	0	29,4		
Gjennomsnitt (\log_{10} (16S/100 mL))		7,4	2,4	0	3,3		
Varians		0,2	17,4	0	15,0		
ANOVA							
Variasjonskilde	Frihetsgrader (df)	Kvadratavvik (SS)	Varians (MS)	F-verdi	p-verdi	Kritisk F-verdi	
Vanntyper	1	245,8	245,8	82,32	$1,0 \times 10^{-6}$	4,75	
Dager	2	44,6	22,3	7,46	0,008	3,89	
Interaksjon	2	42,1	21,1	7,05	0,009	3,89	
Error	12	35,8	3,0				
Total	17	368,3					

Vedlegg 10: Forberedelse til ARG qPCR analysen

Beregning av antall plasmider / GU

Det ble brukt pUC57 som vektor der en syntetisk sekvens ble innsatt som referanse. Vektoren har i følge produsenten en lengde på 2 710 bp og den syntetiske sekvensen er 2 191 bp lang. Dermed har plasmidet en total lengde på 4 901 bp. Den gjennomsnittlige vekten av et basepar er på rundt 650 dalton (IDT, 2011), slik at vekten til et plasmid er dermed 3 185 650 dalton. 1 dalton er $1,67 \times 10^{-24}$ g (IDT, 2011), slik at en GU veier $5,3 \times 10^{-18}$ g som er $5,3 \times 10^{-12}$ μ g.

Plasmidet ble levert i form av 4 μ g frysetørket plasmid-DNA, slik at beregning av antall GU i 4 μ g DNA er som følgende:

$$1 \text{ GU} = 5,3 \times 10^{-12} \mu\text{g DNA}$$

$$X \text{ GU} = 4 \mu\text{g DNA}$$

$$X = (1 \text{ GU} \times 4 \text{ ng DNA}) / 5,3 \times 10^{-12} \text{ ng DNA} = 7,5 \times 10^{11} \text{ GU}$$

Plasmiden ble løst opp i 750 μ L Tris-EDTA buffer, slik at det var rundt 10^9 GU/ μ L. Videre ble det laget en bruksløsning (1:1000), der 1 μ L av plasmidløsningen ble tilsatt 999 μ L Tris-EDTA buffer. Dermed hadde bruksløsningen 10^6 GU/ μ L.

I denne analysen ble det brukt 5 μ L prøvevolum til qPCR slik at det var 5×10^6 GU.

Plasmidkonsentrasjonen ble ikke målt og beregningen kan bare gi et estimat.

Fortynningsserie

Det ble laget en 10-gangers fortynningsserie med samme fremgangsmåte som beskrevet i vedlegg 8 (bortsett fra at det ble brukt plasmid i stedet for *E. coli* CCUG 10979. Den relative forekomsten av plasmidet og dermed hvert ARG i de syv standardløsningene (PL1-PL7) er gitt i tabell V10.1.

Tabell V10.1: 10-gangers fortynning av plasmid som viser utregningen av genomisk enhet (GU) både per μ L og 5 μ L av standardene.

Standard	Standard PL1	Standard PL2	Standard PL3	Standard PL4	Standard PL5	Standard PL6	Standard PL7
GU/ μ L	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
GU/5 μ L	5×10^6	5×10^5	5×10^4	5×10^3	5×10^2	5×10^1	5

Primere

Alle primere ble levert av Integrated DNA Technologies der opplysningene fra produsenten om de ulike primerne er gitt i tabell V10.2. Primerne ble levert med en konsentrasjon på 100 µM oligonukleotid i IDTE buffer. Det ble laget en primerbruksløsning som hadde en sluttkonsentrasjon av 10 µM oligonukleotid (100 µL av levert primerløsningen ble blandet med 900 µL Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland)).

Tabell V10.2: Opplysningene om forward (F) og revers (R) primerne fått av produsenten Integrated DNA Technologies som ble brukt for påvisning av antibiotikaresistensgener ved hjelp av kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR). Opplysningene inkluderer mengde, konsentrasjon og volumet oligonukleotider ble levert, samt antall baser, smeltetemperatur (T_m) og guanin-cytosin (GC) innhold.

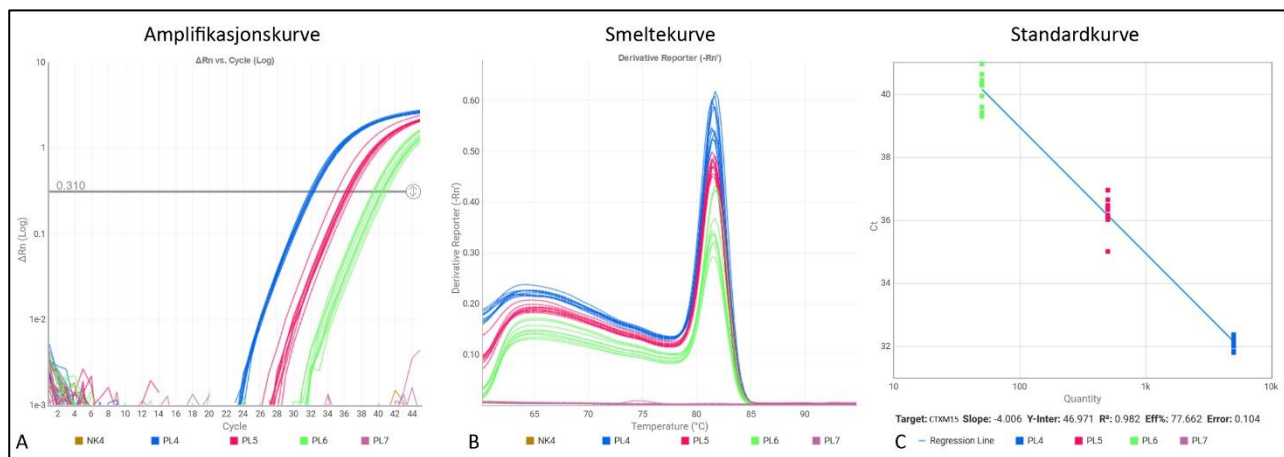
Primer	Oligo mengde (nmol)	Oligo konsentrasjon (µM) og volum (µL)	Baser	T _m (50 mM NaCl) ¹ (°C)	GC innhold (%)
CTXM15F	25	100 µM i 314 µL IDTE buffer	20	54,6	50,0
CTXM15R	25	100 µM i 316 µL IDTE buffer	20	56,8	50,0
CTXM27F	25	100 µM i 243 µL IDTE buffer	18	57,1	61,1
CTXM27R	25	100 µM i 205 µL IDTE buffer	20	56,9	55,0
CTXM32F	25	100 µM i 240 µL IDTE buffer	20	55,3	50,0
CTXM32R	25	100 µM i 285 µL IDTE buffer	20	53,8	50,0
TEMF	25	100 µM i 317 µL IDTE buffer	21	55,8	47,6
TEMR	25	100 µM i 274 µL IDTE buffer	22	55,5	50,0
OXA48F	25	100 µM i 368 µL IDTE buffer	21	60,4	57,1
OXA48R	25	100 µM i 270 µL IDTE buffer	27	58,9	44,4
OXA58F	25	100 µM i 217 µL IDTE buffer	19	55,4	52,6
OXA58R	25	100 µM i 321 µL IDTE buffer	18	54,1	50,0
VANAF	25	100 µM i 289 µL IDTE buffer	20	54,3	50,0
VANAR	25	100 µM i 314 µL IDTE buffer	20	53,9	50,0
TETMF	25	100 µM i 283 µL IDTE buffer	21	42,8	23,8
TETMR	25	100 µM i 305 µL IDTE buffer	21	55,0	47,6
MCR1F	25	100 µM i 362 µL IDTE buffer	18	53,6	55,6
MCR1R	25	100 µM i 275 µL IDTE buffer	18	54,6	61,1
SUL1F	25	100 µM i 309 µL IDTE buffer	22	63,8	63,6
SUL1R	25	100 µM i 264 µL IDTE buffer	22	64,6	63,6

¹ tar ikke hensyn til Mg²⁺ og dNTP konsentrasjon

Vedlegg 11: Data fra CTX-M-15 qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,310 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V11.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10 × PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt CTX-M-15-målekvensen, samt negativ kontroll (NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V11.1: CTX-M-15 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replikaer av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL4	5 000	31,850	32,114	0,199	81,5	66,8	-
		31,817			81,4	66,6	-
		32,202			81,5	67,5	-
		32,026			81,5	67,7	-
		32,025			81,7	67,4	-
		32,170			81,7	67,5	-
		32,386			81,5	67,4	-
		32,257			81,5	-	-
		32,027			81,4	66,8	-
		32,379			81,5	68,1	-
PL5	500	36,116	36,269	0,513	81,4	-	-
		36,488			81,5	-	-
		35,028			81,7	66,0	-
		36,961			81,7	-	-
		36,383			81,5	66,3	-
		36,357			81,5	-	-

		36,040			81,5	66,5	-
		36,180			81,4	-	-
		36,668			81,5	-	-
		36,474			81,5	68,0	-
PL6	50	39,313	40,117	0,571	81,7	-	-
		40,654			81,7	66,9	-
		40,299			81,5	-	-
		39,950			81,5	66,5	-
		Ubestemt			61,4	87,9	92,9
		40,346			81,5	65,7	-
		40,467			81,5	66,8	-
		40,971			81,5	67,4	-
		39,441			81,7	66,3	-
		39,613			81,7	66,3	-
PL7	5	Ubestemt	-	-	61,7	92,7	87,9
		Ubestemt			61,6	92,3	79,9
		Ubestemt			61,4	84,1	88,5
		Ubestemt			61,4	83,5	78,9
		Ubestemt			61,6	87,6	93,8
		Ubestemt			61,4	78,9	83,2
		Ubestemt			61,4	82,7	93,2
		Ubestemt			74,7	-	-
		Ubestemt			61,4	93,5	87,9
		Ubestemt			92,6	87,5	62,5

Vedlegg 11.1: Data fra CTX-M-15 qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,333 og ble vurdert som optimal.

Tabell V11.2: Kvalitetsoppsummering fra CTX-M-15 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

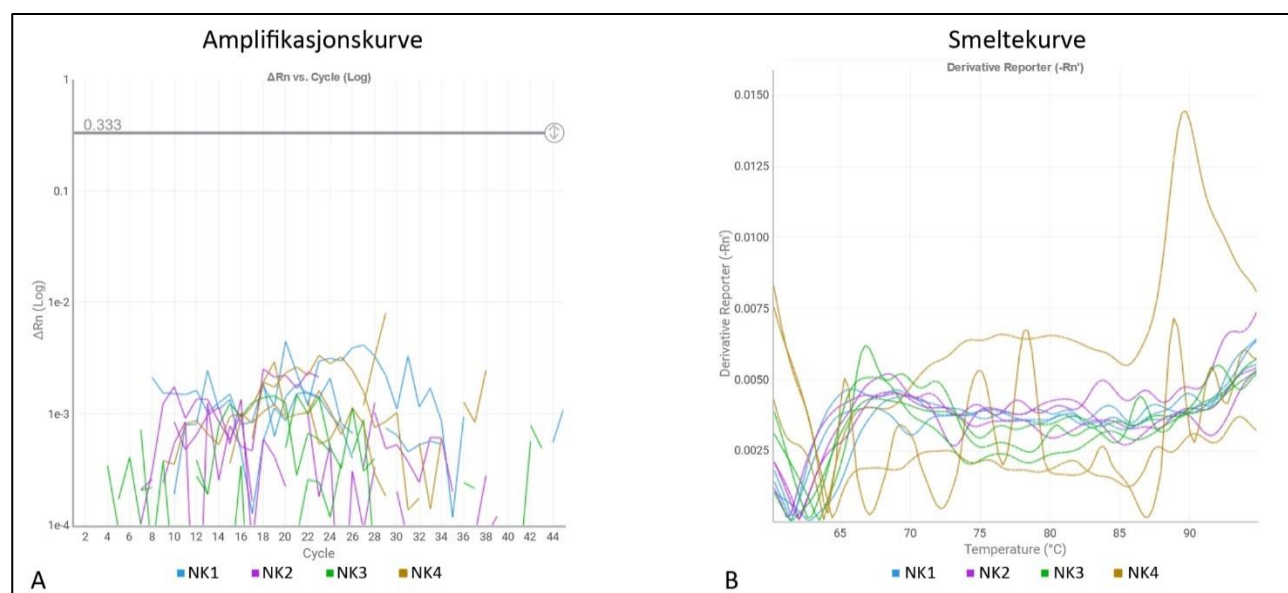
	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	2	-	PL7 (2x) ³	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	0	-	-	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	53	-	-	Alle replikaer av alle prøvene (bortsett fra én replika av prøve 7 og 8)
Ingen signal i brønn	2	-	PL7 (2x) ³	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	56	-	PL3 (1x), PL7 (1x)	Alle replikaer av alle prøvene
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	80	Minst én replika i samtlige reaksjoner		

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

³ Gått tomt for mastermiksen

Negativ kontroll

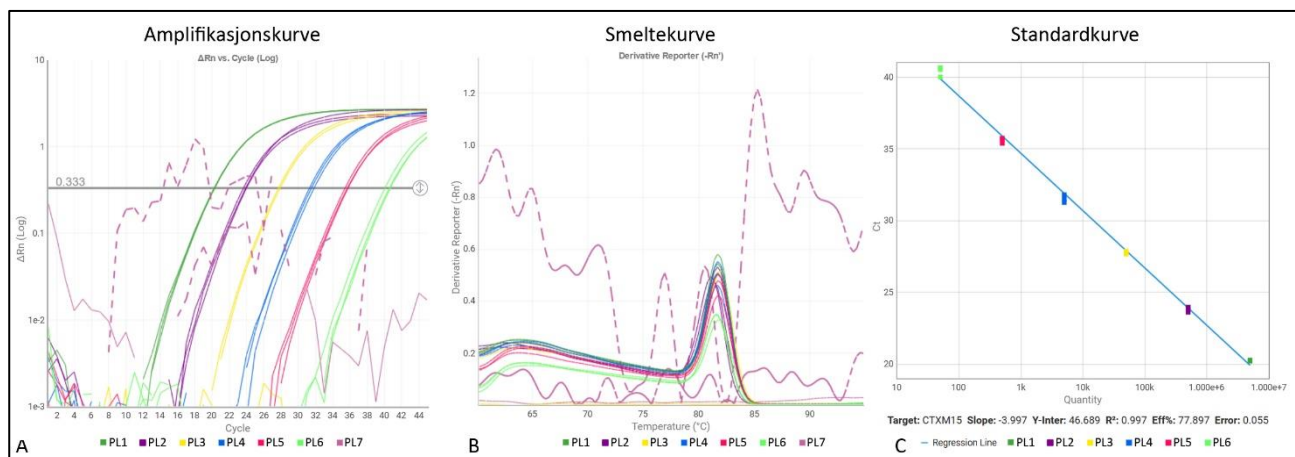


Figur V11.2: CTX-M-15 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontroller (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V11.3: CTX-M-15 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	68,7	93,2	89,9
	Ubestemt	93,2	87,7	65,6
	Ubestemt	66,9	93,3	71,9
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	68,0	93,3	89,7
	Ubestemt	66,3	75,3	93,3
	Ubestemt	68,1	93,0	83,5
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	67,1	87,5	-
	Ubestemt	66,4	-	-
	Ubestemt	66,8	80,2	92,6
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	89,7	82,1	67,2
	Ubestemt	65,4	69,2	74,8
	Ubestemt	89,6	-	-

Standarder



Figur V11.3: CTX-M-15 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. De to striplette linjene viser to replikaer av PL7 (tilsatt for lite mastermiks) som ble ekskludert. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V11.4: CTX-M-15 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

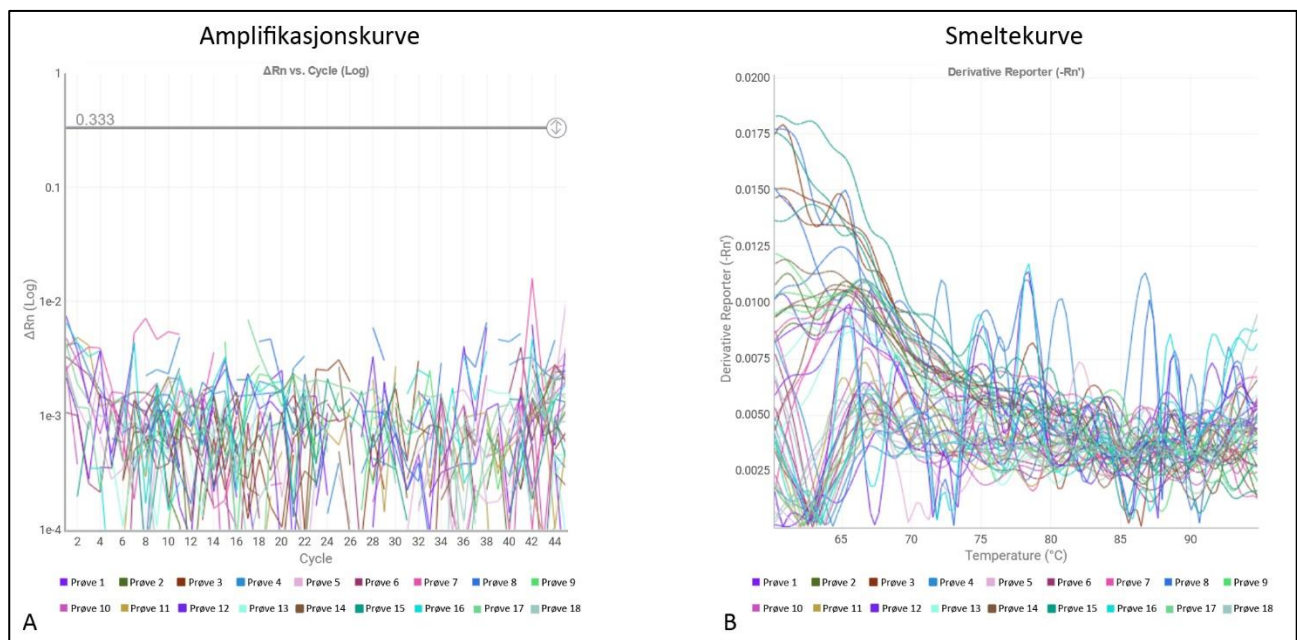
Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	20,261	20,257	0,053	81,7	65,6	-
	20,203			81,7	66,2	-
	20,309			81,7	-	-
PL2	23,884	23,828	0,177	81,7	66,2	-
	23,971			81,1	65,6	-
	23,630			81,4	66,3	-

PL3	27,677	27,773	0,136	81,8	65,7	-
	Ubestemt			67,1	77,8	87,1
	27,869			81,7	-	-
PL4	31,277	31,533	0,268	81,7	66,4	-
	31,811			81,7	65,8	-
	31,512			81,7	66,5	-
PL5	35,410	35,614	0,181	81,7	66,4	-
	35,754			81,7	66,1	-
	35,679			81,8	65,6	-
PL6	40,034	40,419	0,341	81,8	66,3	-
	40,679			81,5	66,8	-
	40,545			81,5	66,6	-
PL7	Ubestemt	-	-	92,9	81,5	74,8
	Ekskl. ¹			93,0	-	-
	Ekskl. ¹			93,0	79,5	74,5

¹ Ekskludert på grunn av tilsatt for lite mastermiks

Vannprøvene

Alle vannprøvene (n=18; inkl. replikaene) var negative, der ingen C_q ble bestemt.



Figur V11.4: CTX-M-15 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 11.2: Data fra CTX-M-15 qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,045 og ble vurdert som optimal.

Tabell V11.5: Kvalitetsoppsummering fra CTX-M-15 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	3	-	PL7 (3×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	21	-	-	D, F-N, Q-V, X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	28	-	PL1 (1×), PL2 (1×), PL3 (3×)	A-O, Q-V, X, Y
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	35	NK4 (1×)	PL1 (2×), PL2 (2×), PL3 (1×), PL4 (2×), PL5 (3×), PL6 (3×), PL7 (2×)	A, B, D-N, P, R, U, V, X, Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

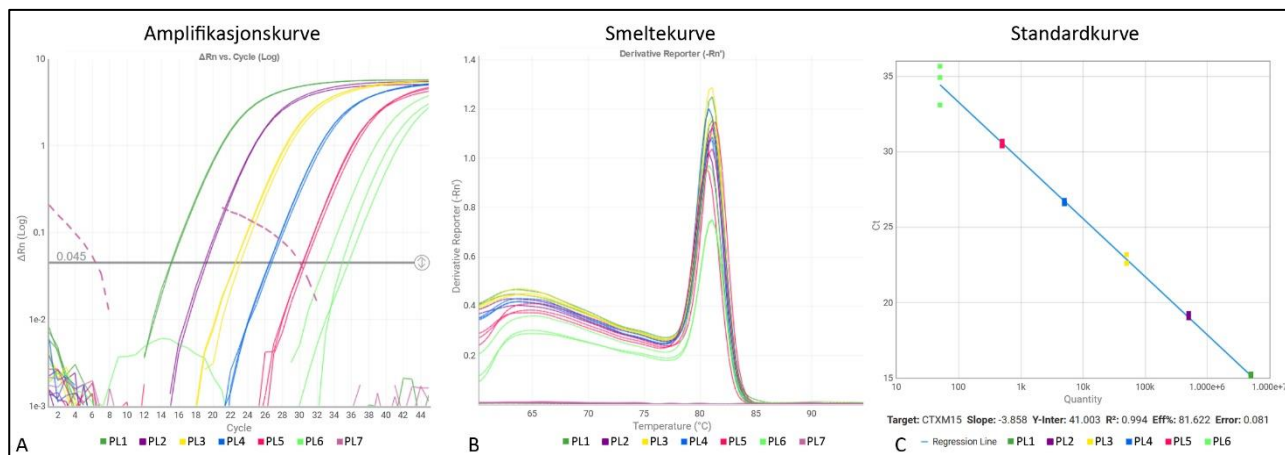
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negativ.

Tabell V11.6: CTX-M-15 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	75,6	-	-
	Ubestemt	61,3	90,3	92,7

Standarder



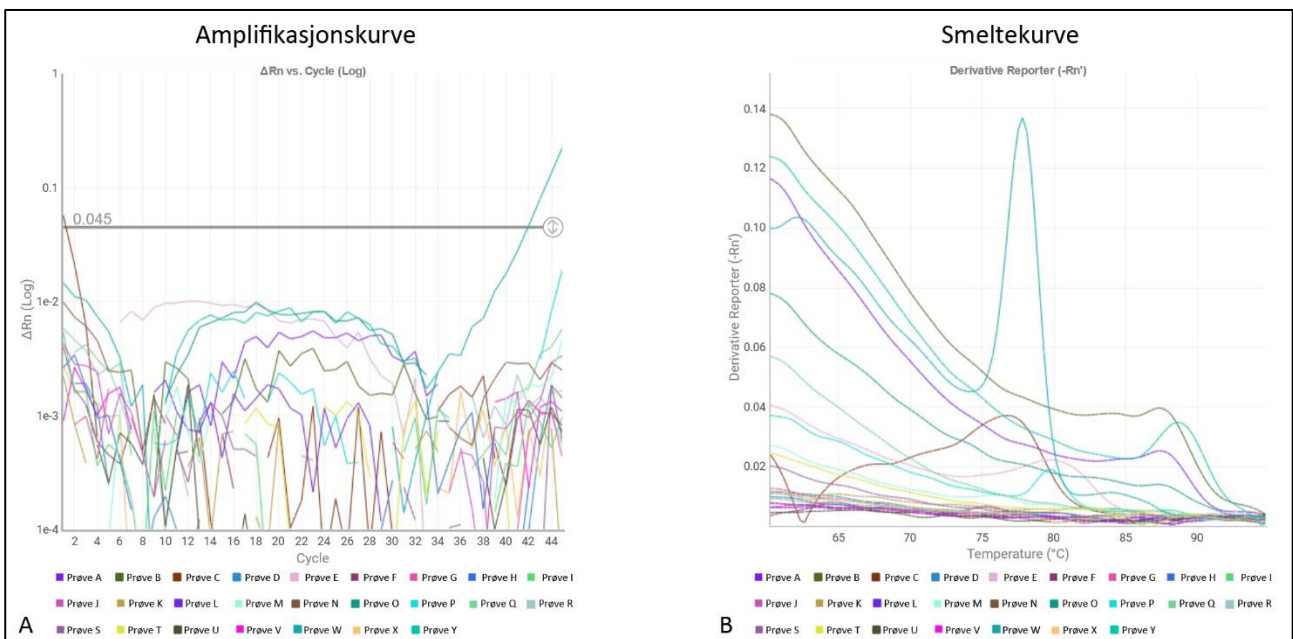
Figur V11.5: CTX-M-15 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden til isolatprøvenes oppsett. Den striplette linjen viser én replika av PL7. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V11.7: CTX-M-15 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	15,130	15,198	0,096	81,1	66,9	-
	15,266			80,9	-	-
	Ubestemt			91,2	61,6	81,8
PL2	Ubestemt	19,127	0,208	61,6	93,5	87,3
	18,980			81,1	-	-
	19,274			80,8	66,6	-
PL3	23,182	22,840	0,297	81,1	-	-
	22,650			80,9	66,2	-
	22,689			81,1	-	-
PL4	26,603	26,697	0,128	80,9	66,2	-
	26,644			80,8	66,0	-
	26,843			81,1	-	-
PL5	30,444	30,544	0,174	81,1	66,8	-
	30,745			81,2	67,1	-
	30,442			80,6	67,1	-
PL6	34,927	34,585	1,340	81,1	66,3	-
	33,107			80,8	66,3	-
	35,721			80,9	66,3	-
PL7	Ubestemt	-	-	61,4	90,2	80,9
	Ubestemt			61,4	89,6	83,9
	Ubestemt			61,7	-	-

Isolatprøvene

Alle isolatprøver (n=25) var negative, der ingen C_q ble bestemt, med unntatt av prøve W (*Serratia fonticola*). Prøve W krysset terskelen ved syklus 42 (Figur V11.6-A) og hadde en tydelig topp ved 77,8 °C (Figur V11.6-B). Denne prøven ble vurdert som falsk positiv siden smeltetemperaturen lå noe under målsekvensen sin smeltetemperatur (80,5 °C; tatt utgangspunktet i gjennomsnittlig TM-1 til PL1-PL6). Videre var *CTX-M-15*-gen-kopiantallet svært lav (< 1 GU/5 µL) og langt under deteksjonsgrensen (50 GU/5 µL) og det teoretisk lavest mulige gen-kopiantallet (3 GU).

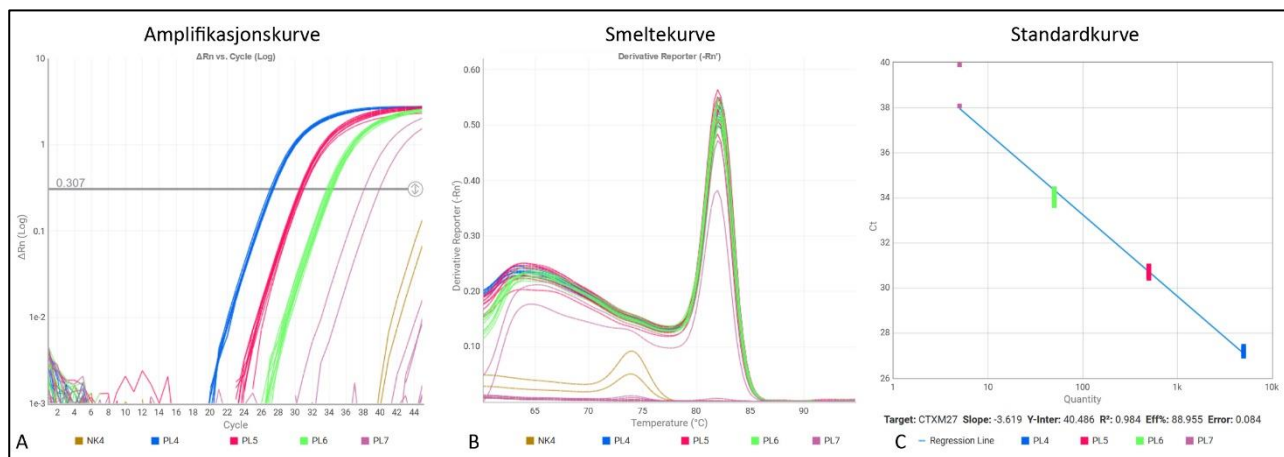


Figur V11.6: *CTX-M-15* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 12: Data fra CTX-M-27 qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,307 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V12.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10 × PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt CTX-M-27-målekvensen, samt negativ kontroll (NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V12.1: CTX-M-27 qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL4	5 000	27,189	27,220	0,141	82,1	-	-
		26,996			82,1	66,5	-
		27,284			82,1	67,2	-
		27,342			82,1	68,3	-
		27,201			82,3	66,6	-
		27,225			82,1	67,4	-
		27,416			82,1	-	-
		27,312			82,1	68,6	66,6
		27,262			82,1	66,6	-
		26,974			82,0	68,0	-
PL5	500	30,522	30,698	0,179	82,0	-	-
		30,636			82,0	-	-
		30,674			82,3	-	-
		30,433			82,1	-	-
		30,573			82,1	67,7	-

		30,850			82,1	-	-
		30,656			82,0	-	-
		30,950			82,0	-	-
		30,979			82,0	66,3	-
		30,708			82,0	67,4	-
PL6	50	33,973	34,047	0,251	82,3	-	-
		33,965			82,1	-	-
		34,238			82,1	67,5	-
		33,652			82,0	-	-
		33,783			82,0	67,4	-
		34,349			82,0	-	-
		33,819			82,0	66,5	-
		34,183			82,0	-	-
		34,408			82,3	67,5	-
		34,100			82,1	-	-
PL7	5	38,066	38,979	1,291	82,0	67,4	-
		Ubestemt			61,4	92,3	88,7
		39,892			82,0	-	-
		Ubestemt			61,4	89,3	92,3
		Ubestemt			73,9	61,6	-
		Ubestemt			73,8	61,4	91,7
		Ubestemt			61,6	92,9	84,2
		Ubestemt			82,0	61,4	74,1
		Ubestemt			61,6	74,2	80,8
		Ubestemt			61,6	92,7	-

Vedlegg 12.1: Data fra CTX-M-27 qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,018 og ble vurdert som optimal.

Tabell V12.2: Kvalitetsoppsummering fra CTX-M-27 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer. Dataene er overført fra StepOne Software (Version 2.3) før ekskludering av standarder med avvikende smeltekurver.

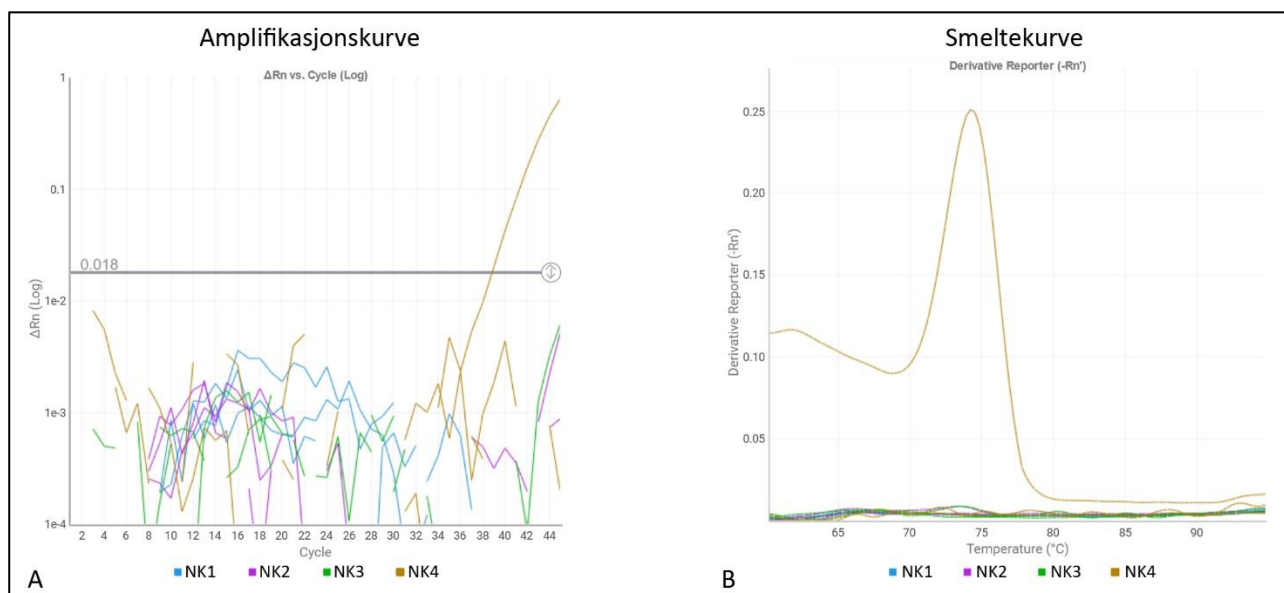
	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	1	NK4 (1×)	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	23	-	PL7 (3×)	1 (3×), 2 (3×), 3 (3×), 8 (3×), 13 (3×), 14 (3×), 15 (2×)
Ingen amplifikasjon i prøvene	25	-	-	4 (3×), 5 (3×), 6 (2×), 10 (2×), 11 (3×), 12 (3×), 15 (1×), 16 (3×), 17 (2×), 18 (3×)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	1	-	PL7 (1×)	-
Ekspontiell algoritme feil	26	-	-	4 (3×), 5 (3×), 6 (2×), 10 (2×), 11 (3×), 12 (3×), 15 (1×), 16 (3×), 17 (2×), 18 (3×)
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	80	Minst én replika i samtlige reaksjoner		

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

Én replika av den negative PCR-kontrollen (NK4) krysset terskelen ved syklus 38,881 (Figur V12.2-A). Smeltetemperaturen til replikaen (74,2 °C) var lavere enn målsekvens smeltetemperatur (82,3 °C) og ble dermed tolket som falsk positiv.



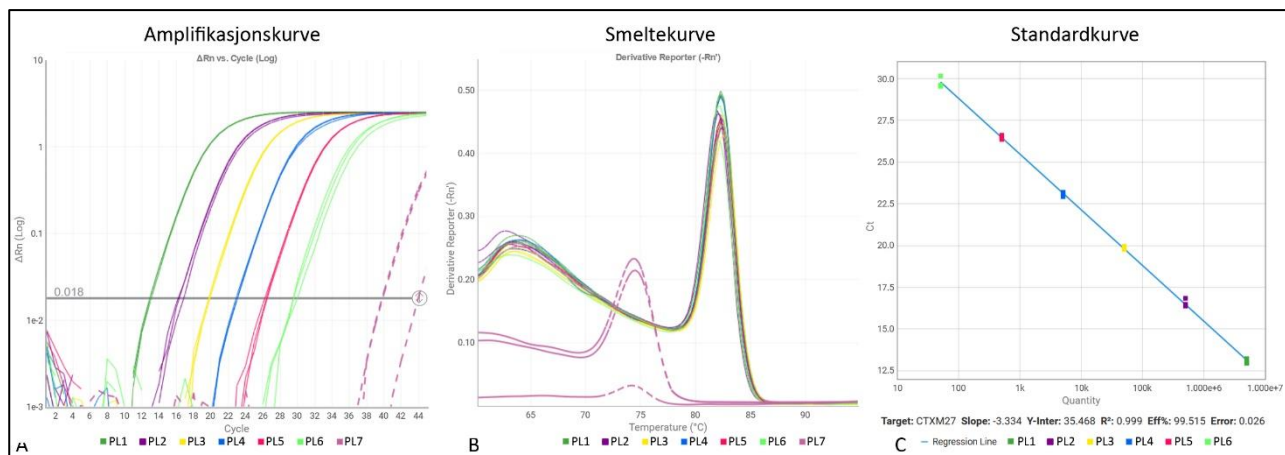
Figur V12.2: CTX-M-27 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontrollere (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V12.3: CTX-M-27 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,5	89,6	93,0
	Ubestemt	66,3	92,9	-
	Ubestemt	65,9	88,5	-
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,2	70,1	93,2
	Ubestemt	66,3	87,8	-
	Ubestemt	73,3	65,9	93,3
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	73,5	66,0	93,2
	Ubestemt	65,9	93,3	-
	Ubestemt	67,7	80,2	84,8
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	67,8	93,0	88,2
	Ubestemt	92,9	72,1	87,8
	38,881	74,2	-	-

Standarder

Alle tre replikaer til standard PL7 ble ekskludert fra videre analyser (inkl. standardkurven), siden smeltekurven viste uspesifikke PCR-produkter (Figur V12.5-B).



Figur V12.3: CTX-M-27 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. De striplette linjene viser alle tre replikaer av PL7 som ble ekskludert. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

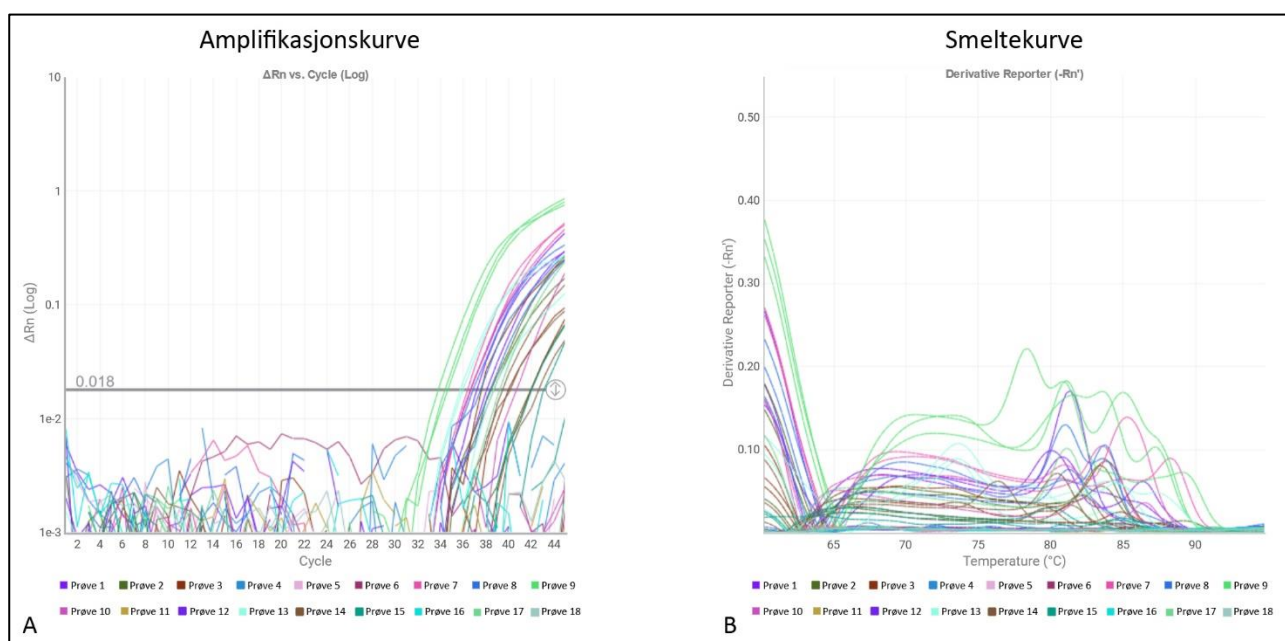
Tabell V12.4: CTX-M-27 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	12,968	13,042	0,153	82,3	65,4	-
	12,941			82,3	67,2	-
	13,218			82,3	-	-
PL2	16,517	16,638	0,172	82,3	66,3	-
	16,835			82,0	65,7	-
	16,562			82,1	67,1	-
PL3	19,951	19,838	0,099	82,6	66,5	-
	19,798			82,4	66,0	-
	19,765			82,4	65,9	-
PL4	23,241	23,155	0,199	82,4	65,3	-
	23,296			82,3	65,4	-
	22,928			82,3	66,2	-
PL5	26,554	26,535	0,081	82,4	66,2	-
	26,446			82,3	66,3	-
	26,604			82,4	65,7	-
PL6	29,616	29,810	0,403	82,4	66,0	-
	30,273			82,1	66,9	-
	29,540			82,1	66,8	-
PL7	Ekskl. ¹	-	-	74,2	66,2	-
	Ekskl. ¹			74,5	-	-
	Ekskl. ¹			74,4	-	-

¹ Ekskludert fra videre statistiske beregninger på grunn av avvikende smeltekurve

Vannprøvene

Alle råvannsprøvene krysset terskelen ved og etter 33,861 sykluser, mens ingen drikkevannsprøvene (med minst to replikaer) krysset terskelen (Figur V12.4-A). Smeltekurven viste multiple toppler (Figur V12.4-B) og der smeltetemperaturen til noen toppler lå rundt smeltetemperaturen til målsekvensen (82,3 °C; gjennomsnittlig TM-1 til PL1-PL6). Det beregnede *CTX-M-27*-gen-kopiantallet ble svært usikre på grunn av uspesifikke PCR-produkter, men varierte fra 0 til 3 genkopier/5 µL. Samtlige prøver ble tolket som falsk positive på grunn av svært lavt gen-kopiantall som lå langt under deteksjonsgrensen (50 GU/5 µL). Smeltekurven kan tyde på krysreaksjoner og uspesifikk primervalg.



Figur V12.4: *CTX-M-27* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V12.5: *CTX-M-27* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q og genkopiantall til replikaene. Dataene er direkte overført fra StepOne Software (Version 2.3) etter ekskludering av standard PL7.

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	kopier/5 µL	Gjennomsnitt (kopier/5 µL)	Standardavvik (kopier/5 µL)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	37,254	37,401	0,765	0	0	0	80,0	86,3	70,5
	36,721			0			81,2	68,0	-
	38,229			0			80,8	68,4	-

2	41,949	39,778	1,886	0	0	0	81,4	65,9	-
	38,552			0			83,5	69,0	-
	38,831			0			83,5	68,0	-
3	40,136	39,892	2,241	0	0	0	82,3	67,4	73,5
	42,002			0			66,8	84,8	-
	37,539			0			83,8	-	-
4	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,7	73,2	93,3
	Ubestemt			-			67,4	84,4	80,6
	Ubestemt			-			72,0	93,3	86,8
5	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,4	93,2	82,3
	Ubestemt			-			65,6	74,1	92,9
	Ubestemt			-			65,1	75,3	88,4
6	Ubestemt	-	-	-	-	-	93,3	65,9	68,7
	Ubestemt			-			67,1	75,3	84,5
	Ubestemt			-			65,7	93,3	-
7	36,737	36,659	0,174	0	0	0	83,6	-	-
	36,460			1			85,3	80,9	-
	36,781			0			88,2	80,6	68,4
8	37,078	37,675	0,695	0	0	0	80,9	70,1	83,6
	37,509			0			83,8	72,1	80,8
	38,438			0			81,2	68,0	-
9	33,861	34,381	0,462	3	2	1	87,2	83,6	81,5
	34,537			2			81,1	85,0	-
	34,744			2			78,4	89,1	70,4
10	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	66,3	75,4	79,5
	Ubestemt			-			64,2	87,5	92,3
	40,880			0			65,4	82,3	86,5
11	Ubestemt	-	-	-	-	-	64,4	91,1	83,2
	Ubestemt			-			67,7	90,2	93,5
	Ubestemt			-			67,7	65,3	85,0
12	Ubestemt	-	-	-	-	-	66,0	81,8	87,3
	Ubestemt			-			66,2	71,8	93,0
	Ubestemt			-			72,0	66,9	87,4
13	35,778	36,884	1,632	1	1	0	73,6	83,9	-
	36,116			1			73,5	84,5	-
	38,759			0			73,5	83,8	-
14	42,484	40,701	1,578	0	0	0	79,6	66,2	-
	40,134			0			76,3	68,0	-
	39,485			0			80,5	65,9	-
15	Ubestemt	42,565	0,752	-	0	0	75,7	64,1	91,2
	42,034			0			67,4	80,0	84,7
	43,096			0			64,7	85,0	-
16	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,6	87,3	78,4
	Ubestemt			-			66,5	79,0	71,8
	Ubestemt			-			66,9	83,8	87,5
17	39,291	Ekskl. ¹	-	0	-	-	81,1	66,3	-
	Ubestemt			-			65,7	87,6	92,9
	Ubestemt			-			66,0	78,7	-
18	Ubestemt	-	-	-	-	-	67,7	79,2	74,4
	Ubestemt			-			65,3	-	-
	Ubestemt			-			65,3	70,5	-

¹ Ekskludert fra videre beregning siden kun én av tre replikaer krysset terskelen

Vedlegg 12.2: Data fra CTX-M-27 qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,021 og ble vurdert som optimal.

Tabell V12.6: Kvalitetsoppsummering fra CTX-M-27 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer. Dataene er overført fra StepOne Software (Version 2.3) før ekskludering av standarder med avvikende smeltekurver.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	12	-	PL1 (3×), PL2 (3×), PL3 (3×), PL5 (3×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	10	-	PL7 (2×)	C, D, J, M, N, Q, T, W
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	10	-	PL7 (2×)	C, D, J, M, N, Q, T, W
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	32	NK4 (2×)	Minst én replika til hver standard	C, D, J, L-O, Q-W, Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

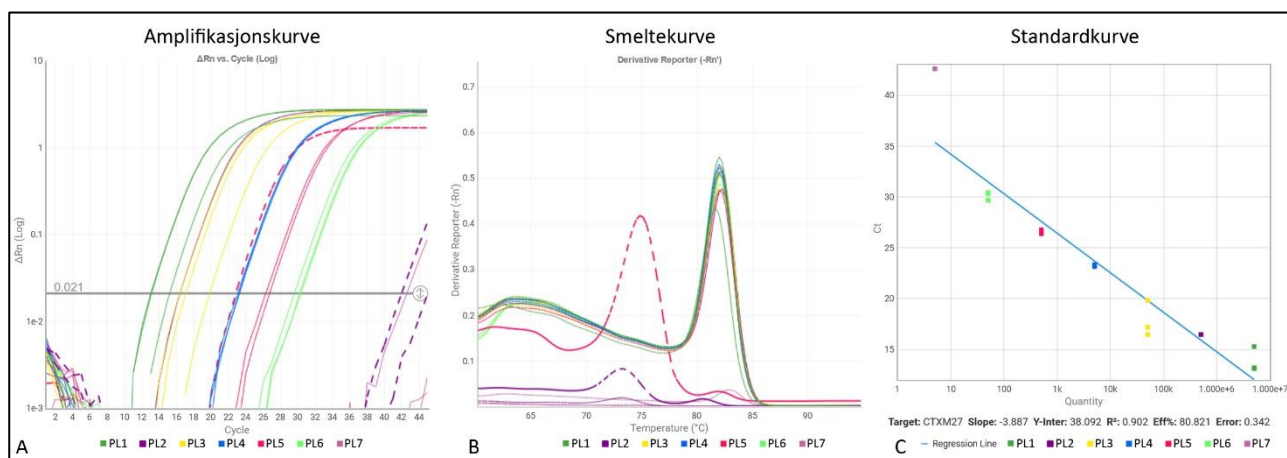
Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V12.7: CTX-M-27 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	61,6	93,6	74,2
	Ubestemt	73,9	61,6	-

Standarder

Totalt tre replikaer (2× PL2, 1× PL5) av standardene ble ekskludert fra videre analyser (inkl. standardkurven), siden smeltekurven viste uspesifikke PCR-produkter (Figur V12.5-B).



Figur V12.5: CTX-M-27 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden med målekvensen, til isolatprøvenes oppsett. De striplette linjene viser én replika av PL5 og to replikaer av PL2 som ble ekskludert. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

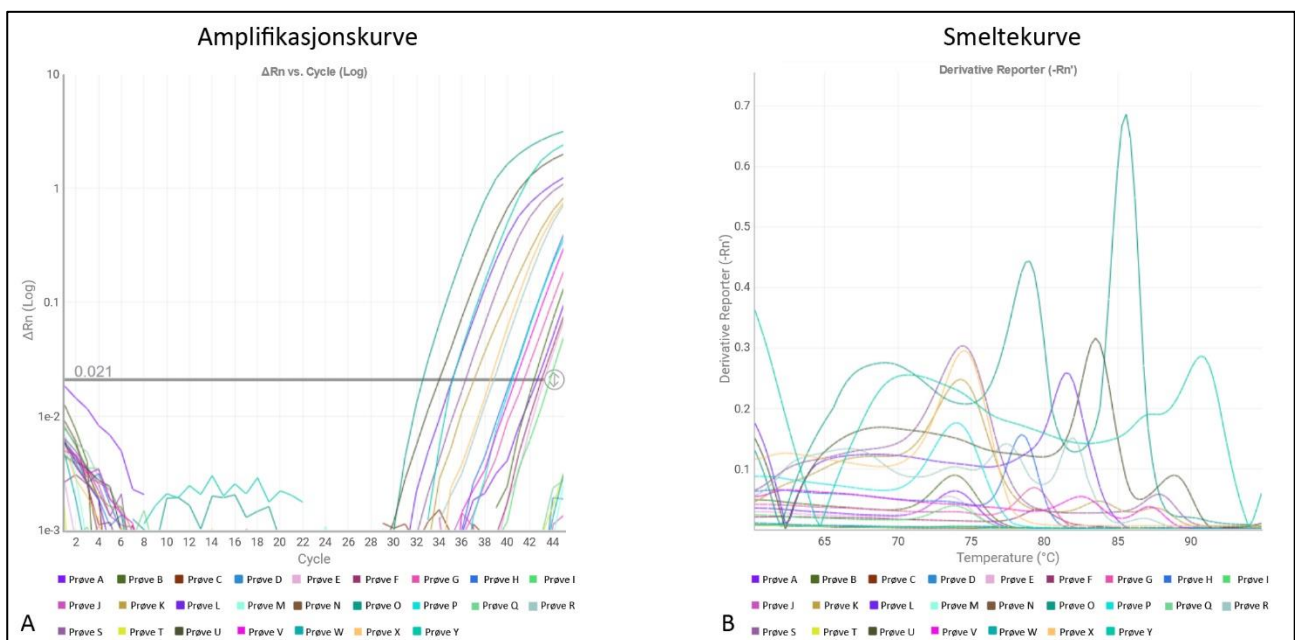
Tabell V12.8: CTX-M-27 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	13,153	13,900	1,228	82,1	65,7	-
	15,317			81,7	-	-
	13,230			82,0	-	-
PL2	Ekskl. ¹	-	-	73,2	80,5	-
	Ekskl. ¹			73,2	-	-
	16,608			82,3	66,8	-
PL3	17,221	17,902	1,724	82,1	-	-
	16,622			82,1	67,7	-
	19,862			82,0	67,1	-
PL4	23,470	23,395	0,085	82,0	-	-
	23,413			82,0	66,8	-
	23,303			82,0	66,5	-
PL5	26,509	26,653	0,204	82,1	66,8	-
	Ekskl. ¹			74,8	-	-
	26,798			82,1	66,8	-
PL6	30,420	30,238	0,418	82,1	67,1	-
	30,535			82,1	66,3	-
	29,761			82,0	67,1	-
PL7	Ubestemt	-	-	61,6	92,7	84,8
	42,630			82,9	62,8	-
	Ubestemt			61,6	74,2	85,9

¹ Ekskludert fra videre beregninger på grunn av avvikende smeltekurve

Isolatprøvene

17 av 25 isolatprøver krysset terskelen ved og etter 32,618 sykluser. Det var prøve O (*Pseudomonas chlororaphis*) som hadde lavest C_q , men begge smeltetoppene (85,6 °C og 78,9 °C) var utenfor målsekvensens smeltetemperatur (82,1 °C) og ble dermed tolket som falsk positiv. Bortsett fra prøve L (*Paenibacillus amylolyticus*), prøve R (*Pseudomonas fluorescens*) og prøve V (*Pseudomonas rhodesiae*) hadde alle isolatprøvene som krysset terskelen dannet utelukkende uspesifikke PCR-produkter. Prøve L, R og V hadde imidlertid også dannet uspesifikke produkter i tillegg til spesifikke produkter, men gen-kopiantallet var likevel svært lav (0-1 GU/5 µL) og under det teoretisk laveste mulige gen-kopiantallet (3 GU). Kopitall langt under deteksjonsgrensen (50 GU/5 µL) er usikre og samtlige prøver som krysset terskelen ble derfor tolket som falsk positive.



Figur V12.6: CTX-M-27 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

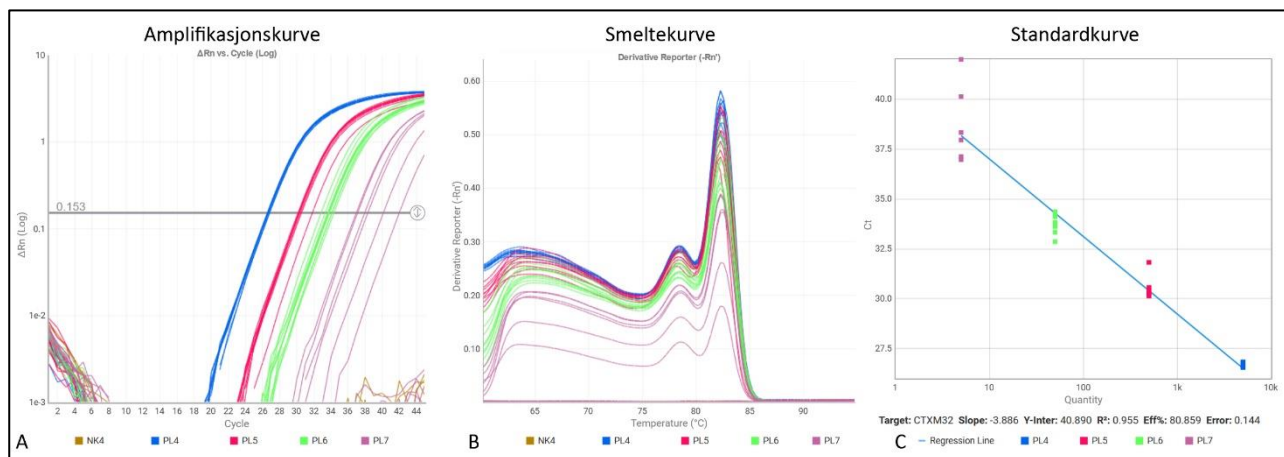
Tabell V12.9: CTX-M-27 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av isolatprøvene. Dataene er direkte overført fra StepOne Software (Version 2.3).

Prøve	C_q	kopier/5 μ L	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
A	42,683	0	73,8	-	-
B	42,448	0	73,8	-	-
C	Ubestemt	-	61,4	90,8	74,2
D	Ubestemt	-	75,4	61,6	-
E	43,185	0	73,5	-	-
F	43,024	0	79,6	-	-
G	41,621	0	79,3	-	-
H	40,485	0	78,4	-	-
I	43,617	0	73,8	-	-
J	Ubestemt	-	61,6	92,3	82,6
K	37,207	0	74,2	-	-
L	35,333	1	81,5	68,3	-
M	Ubestemt	-	61,6	73,5	83,0
N	Ubestemt	-	61,6	89,4	83,9
O	32,618	7	85,6	78,9	-
P	40,579	0	73,9	-	-
Q	Ubestemt	-	61,6	94,1	73,9
R	38,853	0	81,8	77,4	86,8
S	36,476	0	74,4	87,8	-
T	Ubestemt	-	73,6	61,7	84,2
U	34,238	1	83,5	88,8	-
V	40,797	0	82,4	87,1	-
W	Ubestemt	-	73,9	61,6	93,6
X	38,625	0	74,5	-	-
Y	35,308	1	71,4	90,6	-

Vedlegg 13: Data fra CTX-M-32 qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,153 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V13.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10 × PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt CTX-M-32-sekvensen, samt negativ kontroll (NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V13.1: CTX-M-32 qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL4	5 000	26,573	26,677	0,090	82,3	78,4	-
		26,751			82,3	68,1	-
		26,631			82,3	67,8	-
		26,615			82,3	67,2	78,4
		26,654			82,4	67,1	78,5
		26,619			82,4	78,5	-
		26,659			82,4	66,8	78,4
		26,818			82,3	66,8	78,4
		26,620			82,3	66,9	78,4
		26,828			82,3	66,2	78,4
PL5	500	30,162	30,481	0,485	82,3	67,8	78,4
		30,300			82,3	68,1	78,4
		30,330			82,4	78,5	-
		30,293			82,4	78,4	-
		30,275			82,3	67,2	78,5
		30,294			82,3	78,4	-

		30,451			82,3	66,2	78,4
		30,586			82,3	78,2	-
		31,823			81,8	66,9	78,1
		30,293			82,3	78,4	-
PL6	50	32,860	33,750	0,428	82,4	78,5	-
		34,375			82,4	78,5	67,2
		33,793			82,3	66,3	78,4
		33,649			82,3	78,4	-
		33,634			82,3	66,6	78,4
		34,117			82,3	78,2	-
		33,842			82,3	78,2	-
		33,759			82,3	78,4	-
		33,353			82,6	67,8	78,5
		34,118			82,4	78,5	-
PL7	5	41,994	38,757	1,954	82,4	67,1	78,5
		36,970			82,3	67,4	78,4
		Ubestemt			87,6	92,9	61,1
		Ubestemt			87,3	61,7	92,3
		Ubestemt			61,3	-	-
		37,122			82,3	78,5	-
		38,347			82,4	78,5	67,4
		37,956			82,4	67,4	78,5
		40,151			82,4	67,2	78,5
		Ubestemt			84,1	80,2	68,3

Vedlegg 13.1: Data fra CTX-M-32 qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,152 og ble vurdert som optimal.

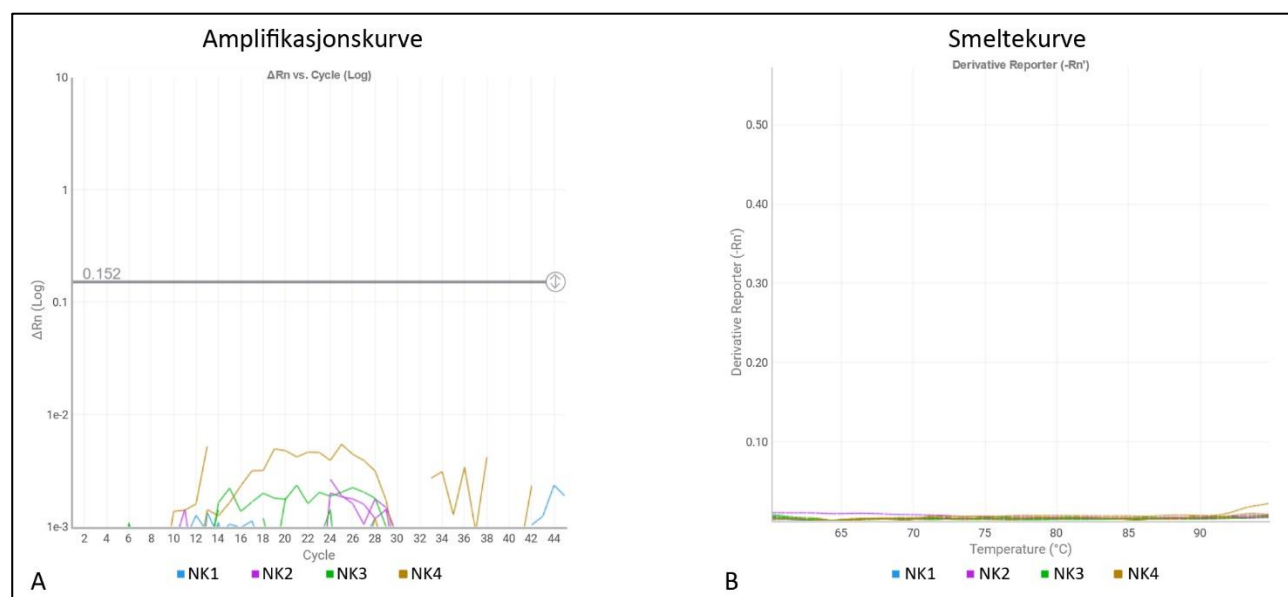
Tabell V13.2: Kvalitetsoppsummering fra CTX-M-32 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	0	-	-	-
Ingen amplifikasjon	53	-	PL7 (2x)	Minst to replikaer i alle prøver
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	55	-	PL7 (2x)	Minst to replikaer i alle prøver
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	80	Minst én replika i samtlige reaksjoner		

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

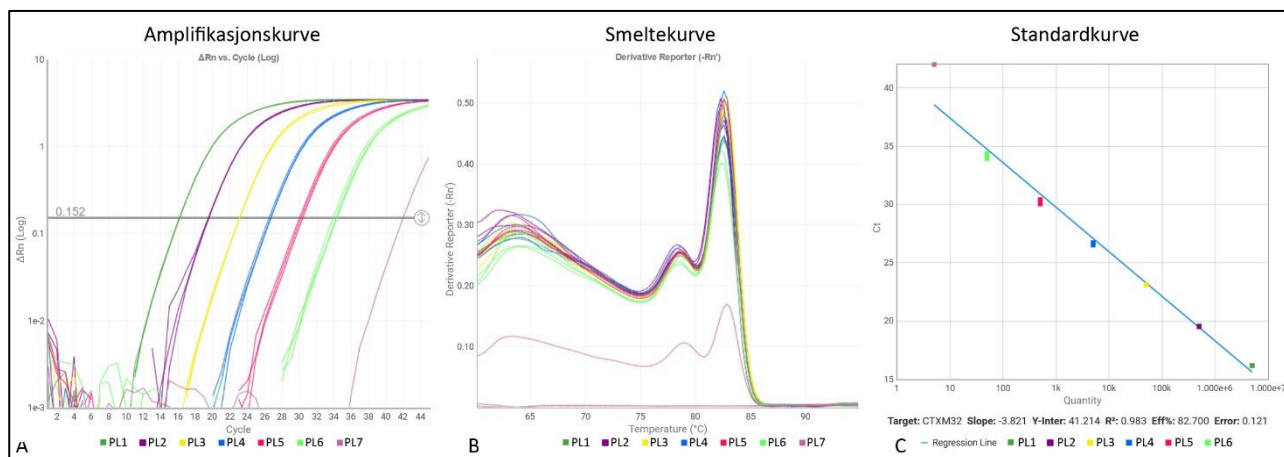


Figur V13.2: CTX-M-32 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontroller (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V13.3: CTX-M-32 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	93,3	69,9	87,6
	Ubestemt	93,0	88,4	67,8
	Ubestemt	67,4	93,0	73,9
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	69,3	93,3	-
	Ubestemt	68,4	78,0	93,0
	Ubestemt	62,1	92,9	88,2
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	93,3	87,7	75,1
	Ubestemt	66,8	93,3	-
	Ubestemt	75,6	80,8	69,0
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	73,5	69,0	93,2
	Ubestemt	71,5	75,0	93,2
	Ubestemt	93,5	88,5	-

Standarder



Figur V13.3: CTX-M-32 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden med målsekvensen, til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

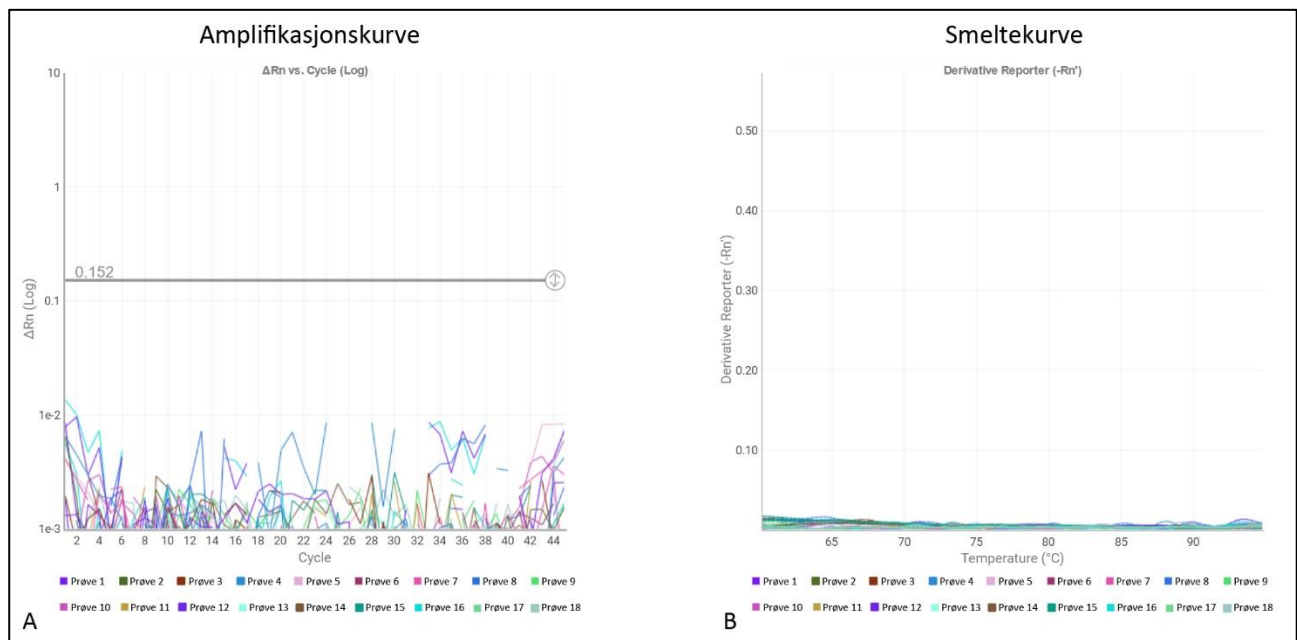
Tabell V13.4: CTX-M-32 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	16,171	16,174	0,010	82,6	67,2	78,6
	16,166			82,6	66,0	78,6
	16,185			82,6	78,6	-
PL2	19,576	19,571	0,007	82,6	-	-
	19,572			82,3	66,6	-
	19,563			82,3	67,7	-

PL3	23,112	23,126	0,032	82,7	66,0	78,7
	23,103			82,7	66,6	78,7
	23,163			82,6	65,7	78,7
PL4	26,726	26,667	0,113	82,6	-	-
	26,538			82,6	65,7	78,6
	26,739			82,6	68,3	78,6
PL5	30,435	30,245	0,191	82,6	-	-
	30,248			82,6	-	-
	30,053			82,6	67,1	-
PL6	34,389	34,198	0,238	82,6	78,7	-
	34,274			82,4	66,3	78,6
	33,932			82,4	67,1	-
PL7	Ubestemt	-	-	67,4	-	-
	42,003			82,9	65,6	79,0
	Ubestemt			93,2	66,9	73,5

Vannprøver

Alle vannprøvene (n=18; inkl. replikaene) var negative, der ingen C_q ble bestemt.



Figur V13.4: CTX-M-32 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 13.2: Data fra CTX-M-32 qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,419 og ble vurdert som optimal.

Tabell V13.5: Kvalitetsoppsummering fra CTX-M-32 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	0	-	-	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	24	-	PL7 (2×)	C-X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	27	-	PL7 (2×)	A-Y
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	42	NK4 (2×)	Minst to replikaer til hver standard	A-M, P-S, U-Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

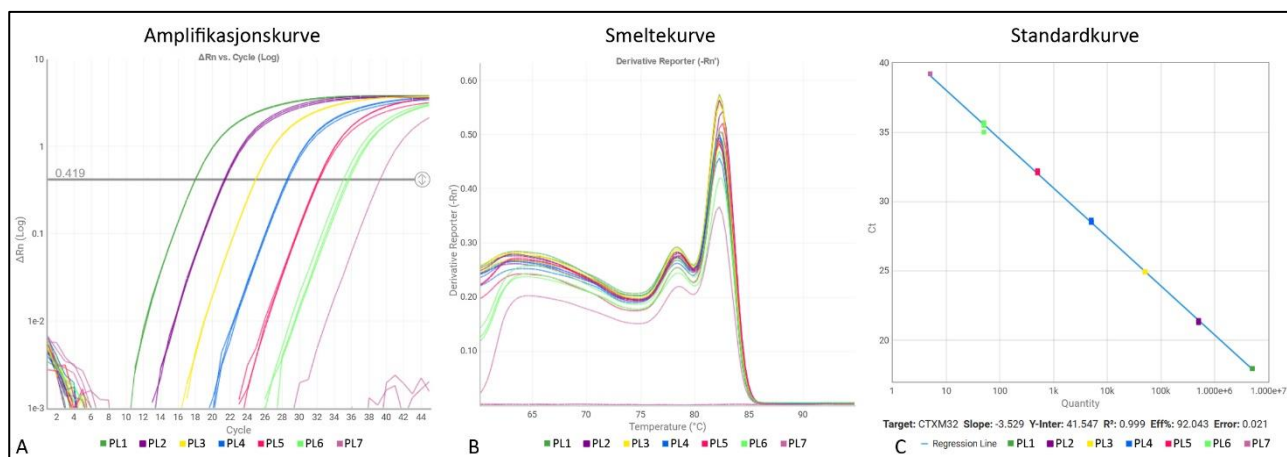
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V13.6: CTX-M-32 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	92,9	65,7	61,6
	Ubestemt	75,6	71,7	61,6

Standarder



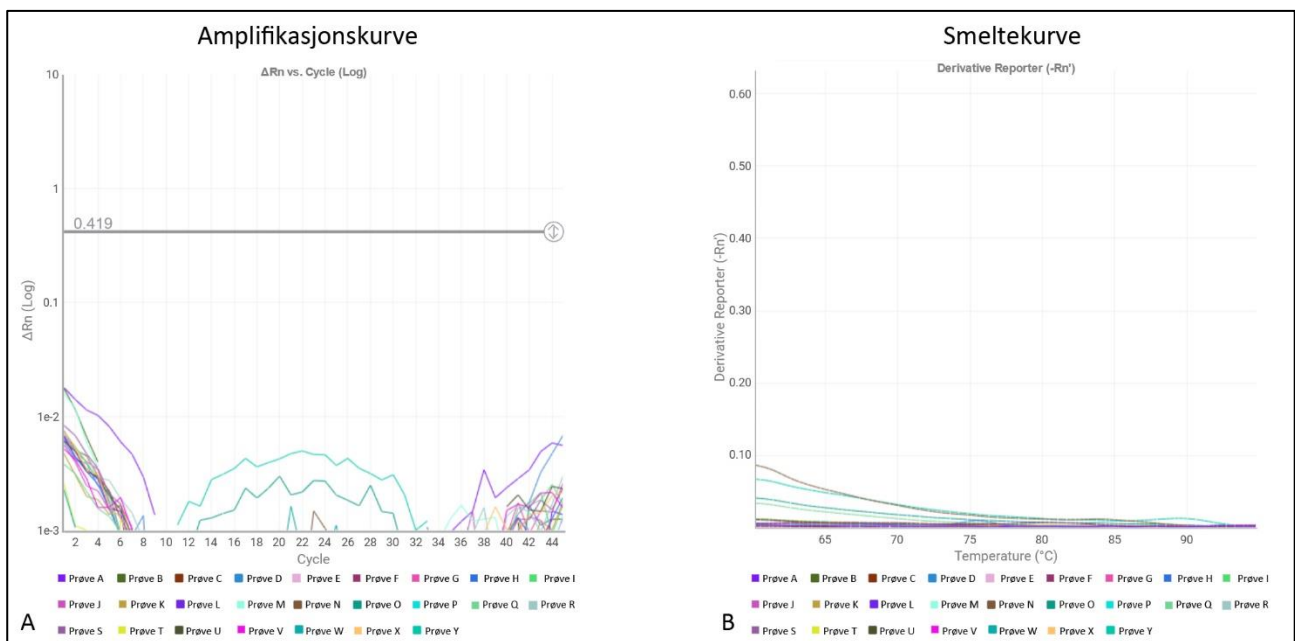
Figur V13.5: CTX-M-32 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden til isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V13.7: CTX-M-32 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	17,961	17,959	0,006	82,3	66,6	78,4
	17,962			82,3	78,4	-
	17,952			82,3	-	-
PL2	21,441	21,359	0,083	82,3	67,7	78,4
	21,359			82,3	-	-
	21,276			82,4	66,5	78,5
PL3	24,912	24,935	0,031	82,4	78,4	-
	24,970			82,3	78,4	-
	24,921			82,3	68,0	-
PL4	28,677	28,568	0,095	82,3	78,4	-
	28,526			82,3	67,8	-
	28,502			82,3	67,1	78,4
PL5	32,237	32,150	0,083	82,3	78,4	-
	32,143			82,6	68,4	78,5
	32,071			82,4	67,7	78,5
PL6	35,696	35,395	0,355	82,4	78,5	-
	35,004			82,3	67,4	78,4
	35,485			82,3	66,8	78,4
PL7	39,225	-	-	82,3	66,9	78,4
	Ubestemt			86,0	62,2	92,1
	Ubestemt			61,4	-	-

Isolatprøvene

Alle isolatprøvene (n=25) var negative, der ingen C_q ble bestemt.

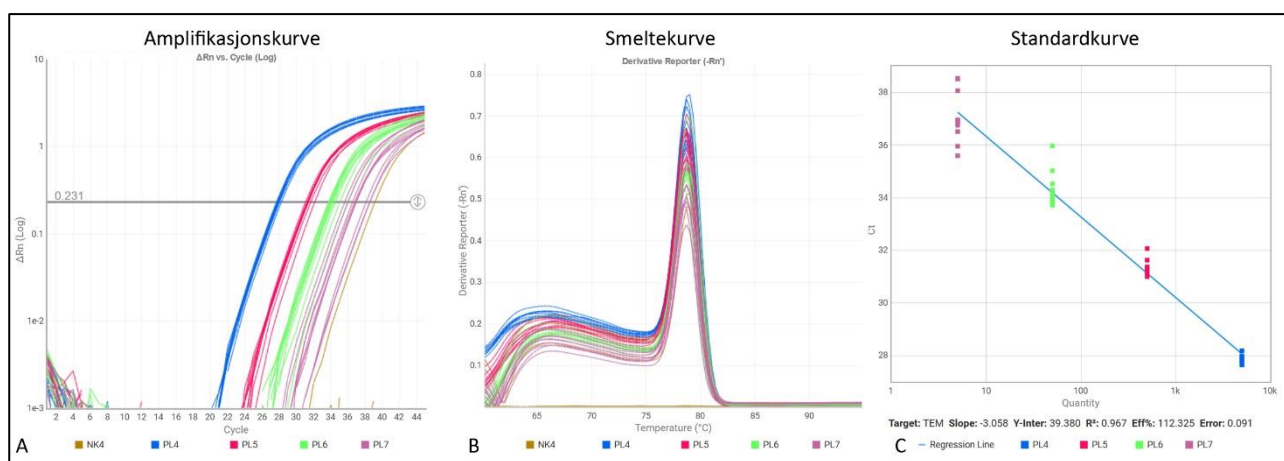


Figur V13.6: CTX-M-32 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 14: Data fra TEM qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,231 og ble vurdert som akseptabel. Én av fire replikaer av den negative PCR-kontrollen (NK4) krysset terskelen ved syklus 39,100 (Figur V14.1-A). Smeltetemperaturen til replikaen (78,8 °C) var likt med målsekvens smeltetemperatur (78,7 °C) og ble dermed tolket som positiv (Figur V14.1-B). Det har mest sannsynlig oppstått en pipetteringsfeil eller kontaminering under pipetteringen, men siden tre replikaer av samme kontrollen var negative (Tabell V14.1), og standardkurven også så ut som forventet ble oppsettet godkjent (Figur V14.1-C).



Figur V14.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10× PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt TEM-sekvensen, samt negativ kontroll (4× NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V14.1: TEM qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,3	61,4	68,6
	39,100	78,8	66,8	-
	Ubestemt	92,7	65,3	87,0
	Ubestemt	74,4	78,1	61,6

Tabell V14.2: TEM qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	27,738	27,871	0,151	78,7
		27,779			78,7
		27,810			78,7
		27,894			78,7
		27,904			78,8
		27,649			78,8
		27,979			78,7
		27,812			78,7
		27,948			78,5
		28,195			78,5
PL5	500	31,191	31,360	0,297	78,7
		31,284			78,5
		32,074			78,5
		31,377			78,7
		30,999			78,7
		31,286			78,7
		31,182			78,5
		31,624			78,5
		31,249			78,7
		31,332			78,7
PL6	50	33,829	34,339	0,678	78,8
		34,047			78,8
		35,924			78,4
		33,884			78,7
		34,297			78,7
		33,710			78,7
		34,150			78,7
		34,531			78,7
		33,982			78,8
		35,031			78,8
PL7	5	35,589	37,076	1,004	78,7
		36,774			78,7
		36,902			78,4
		38,504			78,7
		36,943			78,7
		36,963			78,7
		36,516			79,0
		38,536			78,8
		35,963			78,7
		38,069			78,7

Vedlegg 14.1: Data fra TEM qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,019 og ble vurdert som optimal.

Tabell V14.3: Kvalitetsoppsummering fra TEM qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

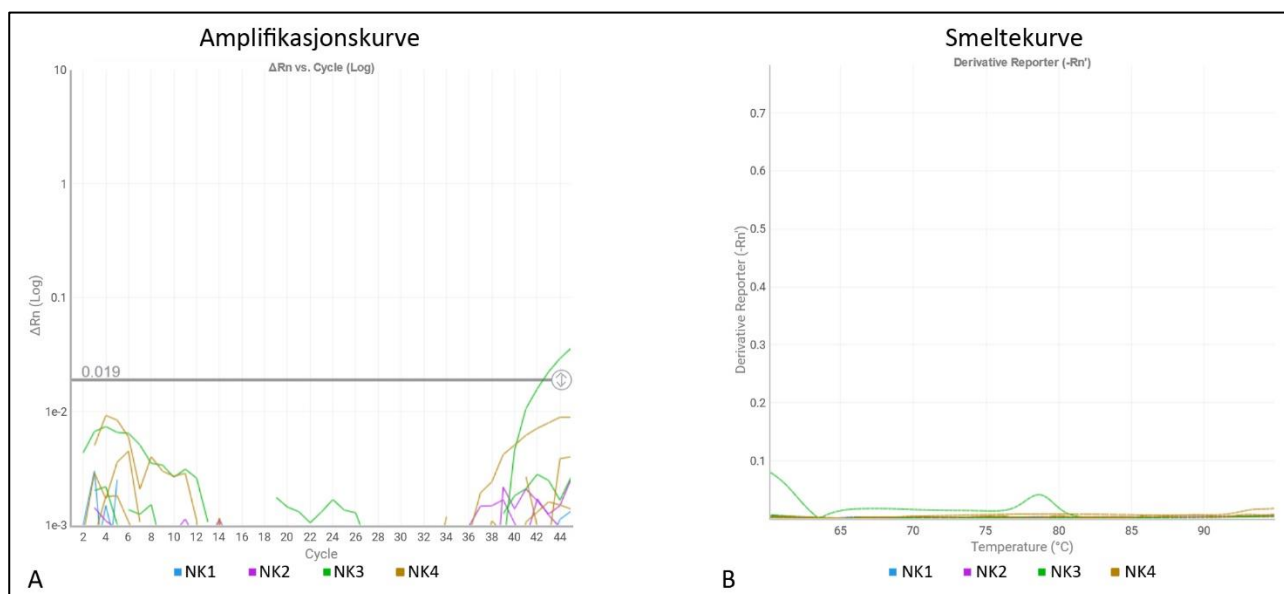
	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	1	NK3 (1x)	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	2	-	PL7 (2x)	-
Ingen amplifikasjon	50	-	PL7 (1x)	Minst to replikaer i alle prøver
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	53	-	PL7 (1x)	Minst to replikaer i alle prøver
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	65	NK1 (3x), NK2 (3x), NK3 (3x), NK4 (2x)	PL5 (1x), PL7 (2x)	Minst to replikaer i alle prøver

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

Én replika av den negative kontrollen (NK3) krysset terskelen ved syklus 42,468 (Figur V14.2-A) og hadde en smeltetemperatur på 78,7 °C (Figur V14.2-B). Det beregnede *TEM*-gen-kopiantallet var svært lav (<1 GU/5 µL) og dermed under det teoretisk lavest mulige gen-kopiantallet (3 GU). Oppsettet ble også godkjent siden kun én av tre replikaer krysset terskelen og fordi de andre negative kontrollene (NK1, NK2 og NK4) var negative (Tabell V14.3).

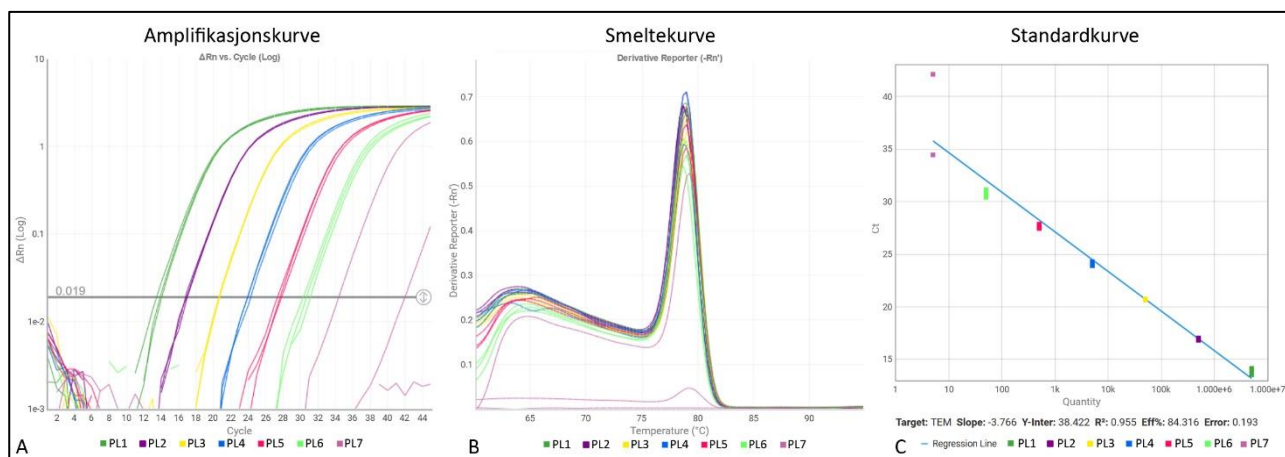


Figur V14.2: *TEM* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontrollere (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V14.4: *TEM* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	93,3	74,1	87,6
	Ubestemt	93,3	88,5	72,1
	Ubestemt	68,4	74,2	92,7
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	67,1	93,3	71,2
	Ubestemt	88,5	68,9	93,3
	Ubestemt	66,2	93,2	78,7
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,9	73,3	93,3
	Ubestemt	67,4	93,3	89,0
	42,468	78,7	67,8	-
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,0	80,5	77,0
	Ubestemt	79,9	92,9	70,2
	Ubestemt	93,3	-	-

Standarder



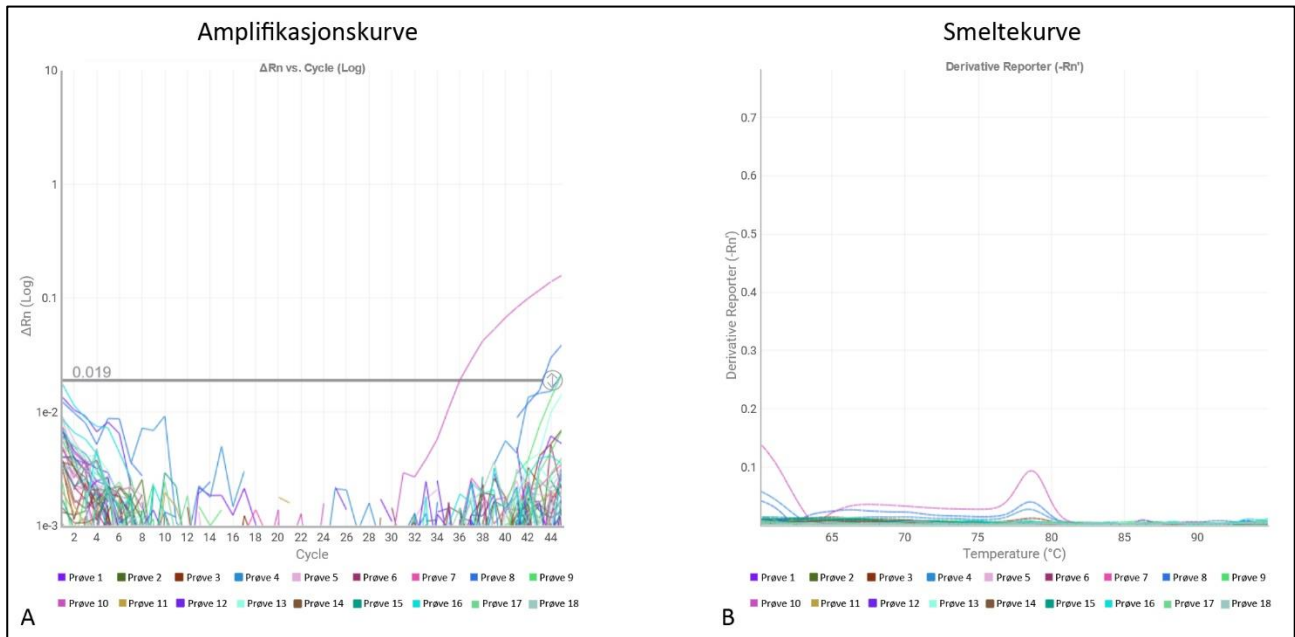
Figur V14.3: TEM qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V14.5: TEM qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)
PL1	14,145	13,918	0,221	79,1	-
	13,704			78,9	-
	13,906			78,8	-
PL2	17,033	17,023	0,199	78,8	-
	16,819			78,7	-
	17,218			78,7	-
PL3	20,754	20,718	0,063	79,1	-
	20,645			79,1	-
	20,754			79,0	-
PL4	24,400	24,231	0,146	78,8	-
	24,140			78,8	-
	24,154			78,8	-
PL5	27,990	27,745	0,224	78,9	-
	27,552			79,0	65,4
	27,694			79,0	-
PL6	30,521	30,833	0,363	79,0	-
	31,232			78,7	-
	30,746			78,7	-
PL7	34,521	38,318	5,369	79,1	-
	42,114			79,3	66,2
	Ubestemt			66,8	93,3

Vannprøver

Én replika av vannprøve 8 (råvann, 16.12.2021) og 10 (drikkevann, 16.12.2021) krysset terskelen ved henholdsvis syklus 41,891 og 36,032 (Figur V14.4). Smeltetemperaturen til prøve 8 (78,5 °C) og prøve 10 (78,7 °C) var likt med målsekvensens smeltetemperatur (78,7 °C). Det beregnete *TEM*-kopianttall til prøve 8 (< 0 GU/5 µL) og prøve 10 (4 GU/5 µL) var svært lavt og begge prøvene ble tolket som falsk positiv siden kun én av tre replikaer krysset terskelen.



Figur V14.4: *TEM* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 14.2: Data fra TEM qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,025 og ble vurdert som optimal.

Tabell V14.6: Kvalitetsoppsummering fra TEM qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	1	-	PL6 (1x)	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	3	-	PL7 (3x)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	15	-	PL6 (1x)	A, C-I, K, L, N, P, W, X
Ingen signal i brønn	1	-	PL (1x)	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	17	-	PL6 (2x)	A-I, K, L, N, P, W, X
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	20	NK4 (2x)	PL6 (1x)	A-D, F, G, I, K, L, O-Q, S, U, W-Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

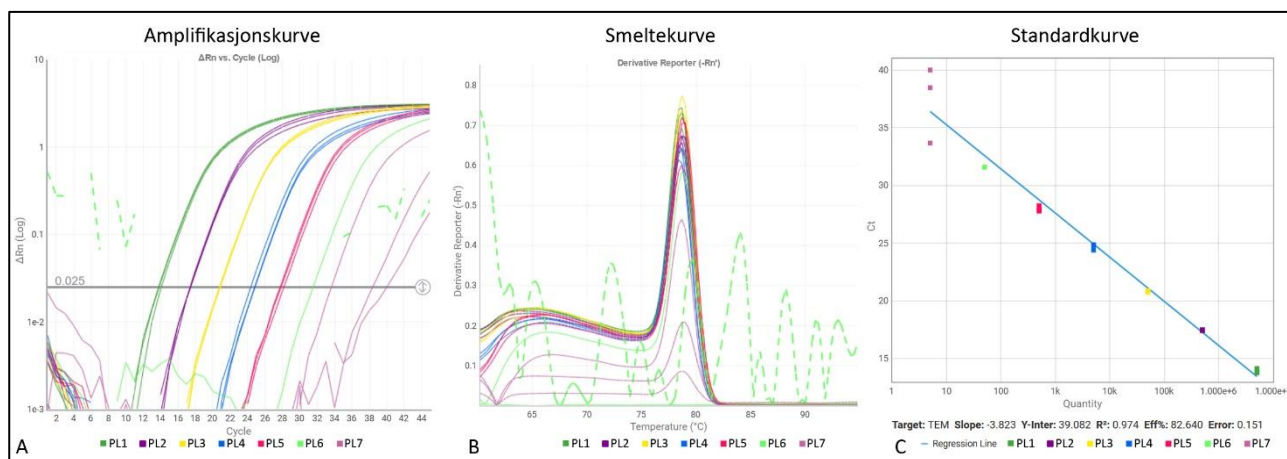
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V14.7: TEM qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,2	75,1	83,9
	Ubestemt	66,2	75,1	61,1

Standarder



Figur V14.5: TEM qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynnings-rekken (3× PL1-PL7) av plasmidet i isolatprøvenes oppsett. Den striplette linjen viser én replika av PL6 som ble ekskludert. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

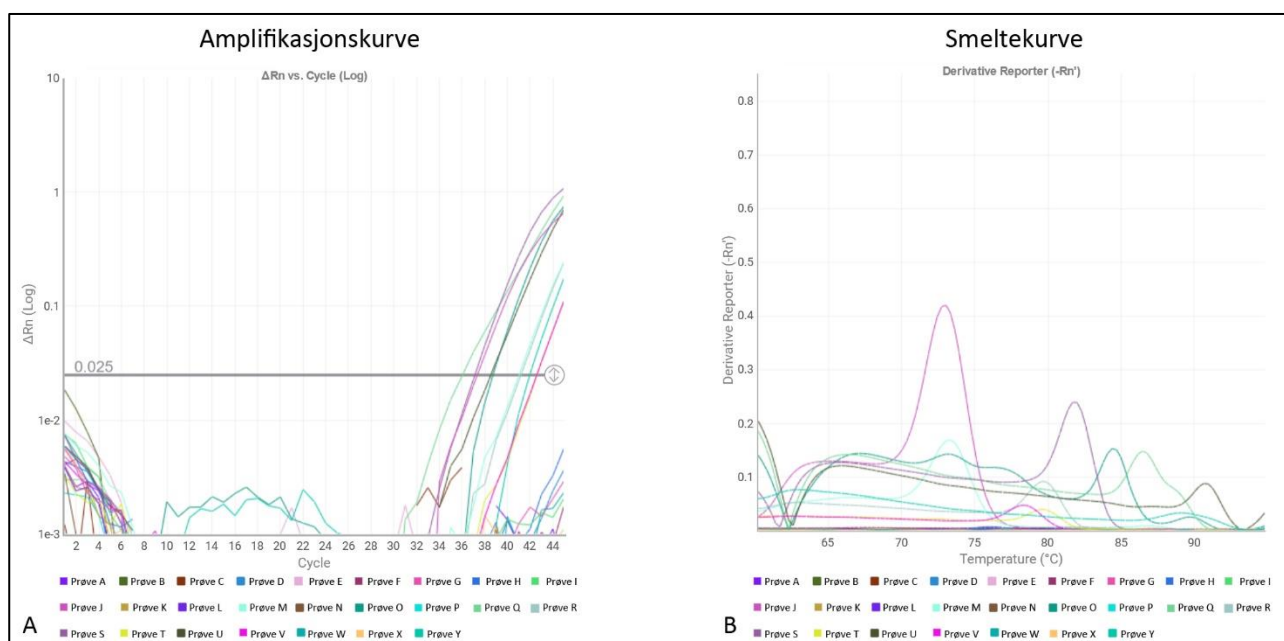
Tabell V14.8: TEM qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	13,949	14,037	0,120	78,7	-	-
	13,987			78,7	-	-
	14,174			78,6	-	-
PL2	17,671	17,596	0,071	78,7	-	-
	17,529			78,7	-	-
	17,587			78,8	-	-
PL3	20,987	20,940	0,048	78,7	-	-
	20,891			78,7	-	-
	20,940			78,7	-	-
PL4	24,962	24,806	0,239	78,6	-	-
	24,925			78,4	-	-
	24,531			78,7	-	-
PL5	28,269	28,037	0,209	78,7	-	-
	27,865			78,8	-	-
	27,976			78,7	-	-
PL6	31,686	-	-	78,8	-	-
	Ubestemt			87,8	-	-
	Ekskl. ¹			92,9	68,7	75,6
PL7	33,746	37,558	3,413	78,7	-	-
	40,328			78,7	-	-
	38,600			78,8	-	-

¹ Ekskludert på grunn av avvikende amplifikasjons- og smeltekurve

Isolatprøvene

10 av 25 isolatprøver krysset terskelen ved og etter 36,280 sykluser, der syv prøver hadde dannet kun uspesifikke PCR produkter. Disse ble dermed tolket som falsk positiv. Prøve R (*Pseudomonas fluorescens*), prøve T (*Pseudomonas protegens*) og prøve V (*Pseudomonas rhodesiae*) hadde smelte-temperaturen (78,3 - 79,6 °C) rund målsekvensens smeltetemperatur (78,7 °C), men gen-kopiantallet var svært lav (< 1 GU/5 µL) og under det teoretisk lavest mulige gen-kopiantallet (3 GU). Derfor ble også disse prøvene tolket som falsk positive.



Figur V14.6: TEM qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V14.9: TEM qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av isolatprøvene.

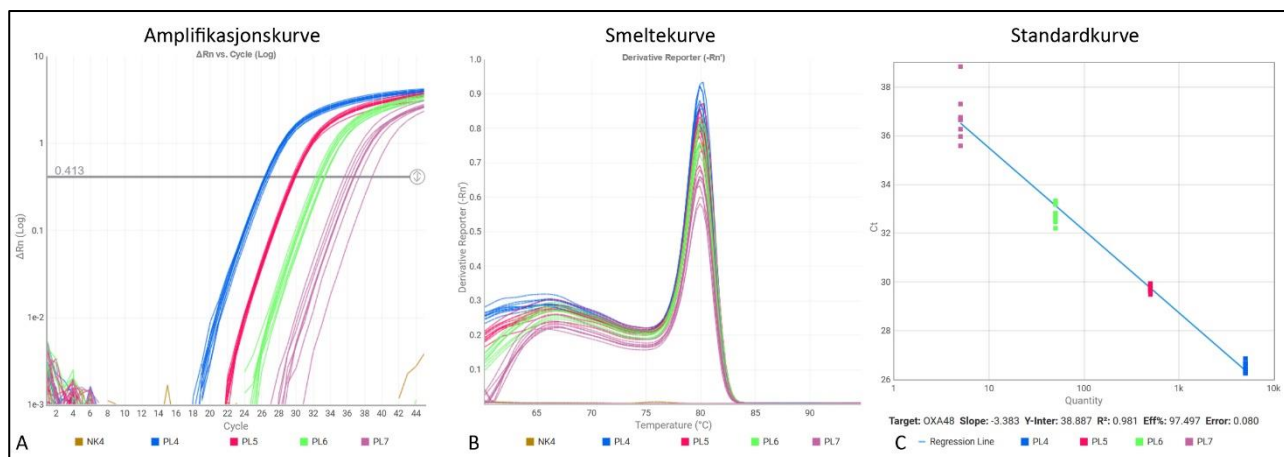
Prøve	C_q	kopier/5 µL	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
A	Ubestemt	-	76,5	92,7	61,7
B	Ubestemt	-	78,8	61,4	93,0
C	Ubestemt	-	70,5	82,7	61,1
D	Ubestemt	-	75,4	61,7	92,3
E	Ubestemt	-	61,6	-	-
F	Ubestemt	-	80,8	93,6	88,7
G	Ubestemt	-	92,9	87,6	77,2
H	Ubestemt	-	76,0	-	-
I	Ubestemt	-	83,8	74,7	66,6
J	37,488	3	72,9	-	-

K	Ubestemt	-	67,4	92,1	61,1
L	Ubestemt	-	92,6	87,3	-
M	41,106	0	73,3	-	-
N	Ubestemt	-	61,4	-	-
O	38,775	1	84,5	73,0	89,7
P	Ubestemt	-	92,9	77,2	88,4
Q	36,280	6	86,4	66,8	-
R	41,290	0	79,7	-	-
S	37,215	3	81,8	66,8	-
T	42,656	0	79,6	-	-
U	38,690	1	67,4	90,8	-
V	42,658	0	78,3	-	-
W	Ubestemt	-	92,6	88,8	82,0
X	Ubestemt	-	93,0	68,7	61,3
Y	42,091	0	89,0	63,4	-

Vedlegg 15: Data fra *OXA-48* qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,413 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V15.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10× PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt *OXA-48*-sekvensen, samt negativ kontroll (4× NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V15.1: *OXA-48* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,3	61,4	76,8
	Ubestemt	61,6	92,4	72,4
	Ubestemt	61,4	83,5	78,0
	Ubestemt	75,9	61,7	-

Tabell V15.2: OXA-48 qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	26,315	26,477	0,194	79,9	-	-
		26,366			79,9	-	-
		26,403			79,9	-	-
		26,652			79,9	-	-
		26,308			80,0	-	-
		26,268			80,0	-	-
		26,870			79,9	-	-
		26,451			80,0	-	-
		26,466			79,9	-	-
		26,668			79,7	-	-
PL5	500	29,939	29,753	0,135	79,7	-	-
		29,752			79,9	-	-
		29,687			80,0	-	-
		29,497			80,0	-	-
		29,666			80,0	-	-
		29,648			79,9	-	-
		29,752			79,9	-	-
		29,811			79,9	-	-
		29,868			79,9	-	-
		29,909			79,9	-	-
PL6	50	32,475	32,830	0,386	80,0	-	-
		32,632			80,0	-	-
		32,215			79,9	-	-
		33,303			79,9	-	-
		Ubestemt			61,4	82,6	93,3
		33,193			79,9	-	-
		32,815			79,9	-	-
		32,839			79,9	-	-
		32,659			80,0	-	-
		33,342			80,0	-	-
PL7	5	37,308	36,756	0,995	80,0	-	-
		36,677			79,9	-	-
		35,934			79,7	-	-
		Ubestemt			61,6	83,0	91,7
		36,280			79,9	-	-
		36,761			79,9	-	-
		38,841			79,9	-	-
		35,593			80,0	-	-
		Ubestemt			91,7	61,4	75,4
		36,655			80,0	-	-

Vedlegg 15.1: Data fra OXA-48 qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,463 og ble vurdert som optimal.

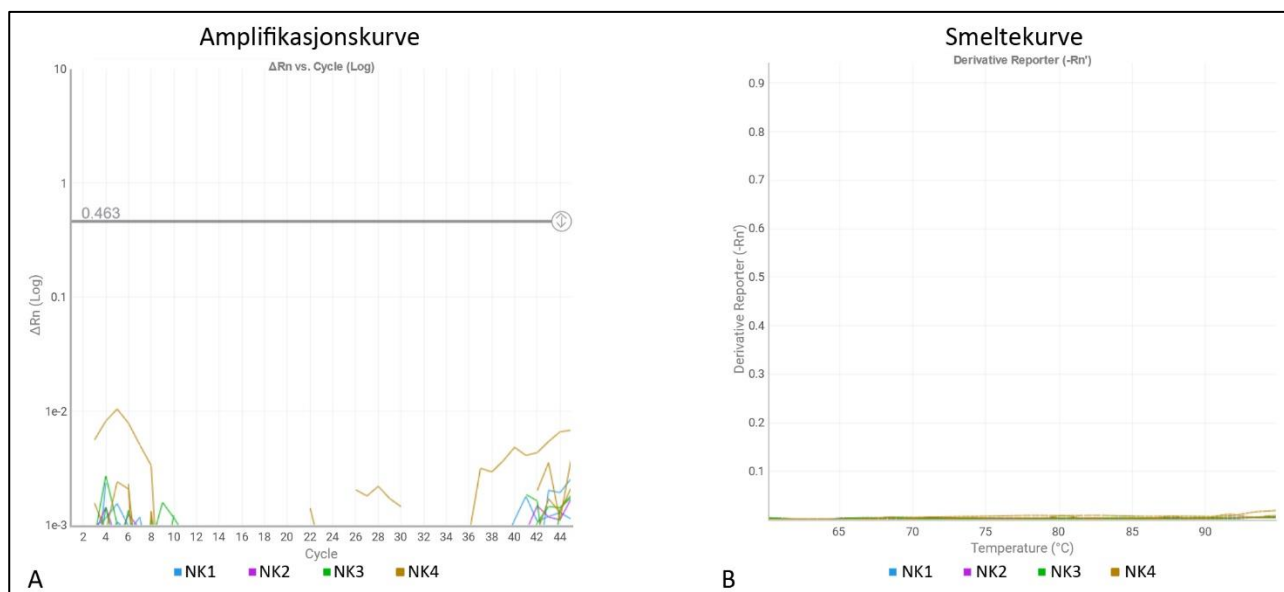
Tabell V15.3: Kvalitetsoppsummering fra OXA-48 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	5	-	PL1 (3×), PL7 (2×)	-
Ingen amplifikasjon	54	-	PL7 (1×)	Minst to replikaer i alle prøver
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	1	-	PL1 (1×)	-
Eksponentiell algoritme feil	55	-	PL7 (1×)	Alle replikaer i alle prøver
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	68	NK1 (3×), NK2 (3×), NK3 (3×), NK4 (2×)	PL1 (2×), PL2 (1×), PL3 (2×), PL4 (2×), PL5 (1×), PL7 (2×)	Minst to replikaer i alle prøver

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

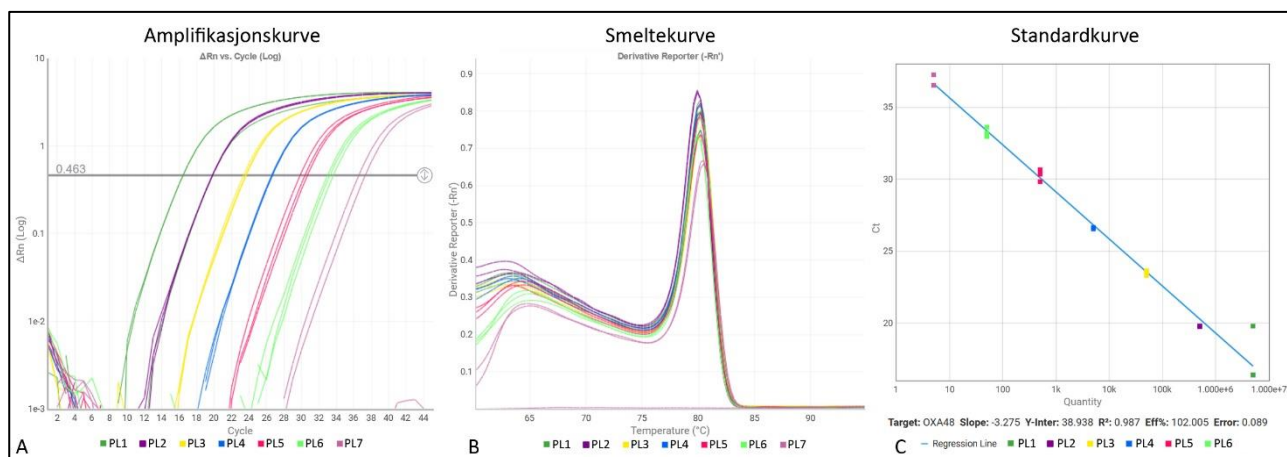


Figur V15.2: OXA-48 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontrollere (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V15.4: OXA-48 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,9	71,5	89,6
	Ubestemt	66,8	80,8	92,9
	Ubestemt	66,9	72,6	87,7
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,8	93,3	-
	Ubestemt	67,2	80,0	93,5
	Ubestemt	66,3	74,2	93,2
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	67,1	80,8	93,2
	Ubestemt	66,8	93,2	73,3
	Ubestemt	93,5	89,6	80,3
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	68,7	93,0	89,4
	Ubestemt	68,4	-	-
	Ubestemt	93,5	-	-

Standarder



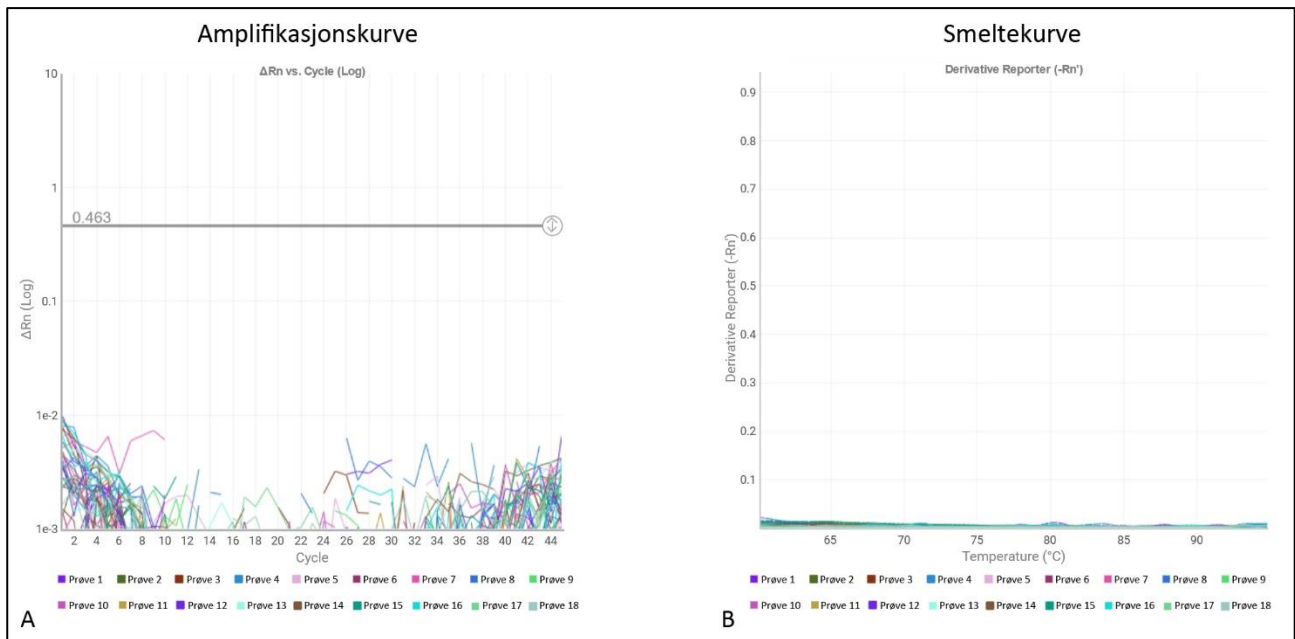
Figur V15.3: OXA-48 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmidet med målsekvensen, til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V15.5: OXA-48 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	19,784	17,532	1,951	80,0	66,0	-
	16,400			80,2	65,4	-
	16,411			80,2	-	-
PL2	19,743	19,776	0,030	80,2	-	-
	19,803			79,9	65,3	-
	19,781			79,9	-	-
PL3	23,555	23,506	0,166	80,3	66,9	-
	23,642			80,2	-	-
	23,320			80,2	65,3	-
PL4	26,547	26,610	0,055	80,2	65,6	-
	26,634			80,0	65,6	-
	26,650			80,0	-	-
PL5	29,830	30,282	0,420	80,2	-	-
	30,358			80,0	-	-
	30,658			80,2	65,3	-
PL6	33,631	33,263	0,344	80,2	-	-
	33,209			80,0	-	-
	32,949			80,0	-	-
PL7	36,549	36,914	0,517	80,5	-	-
	37,279			80,3	66,5	-
	Ubestemt			93,0	67,4	71,0

Vannprøver

Alle vannprøvene (n=18; inkl. replikaene) var negative, der ingen C_q ble bestemt.



Figur V15.4: OXA-48 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 15.2: Data fra OXA-48 qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,052 og ble vurdert som optimal.

Tabell V15.6: Kvalitetsoppsummering fra OXA-48 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	5	-	PL6 (2×), PL7 (3×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	24	-	PL5 (1×), PL6 (1×)	A-D, F-M, O-X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	26	-	PL5 (1×), PL6 (1×)	A-X
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	27	NK4 (2×)	PL5 (1×), PL6 (1×)	A-M, O-V, X, Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

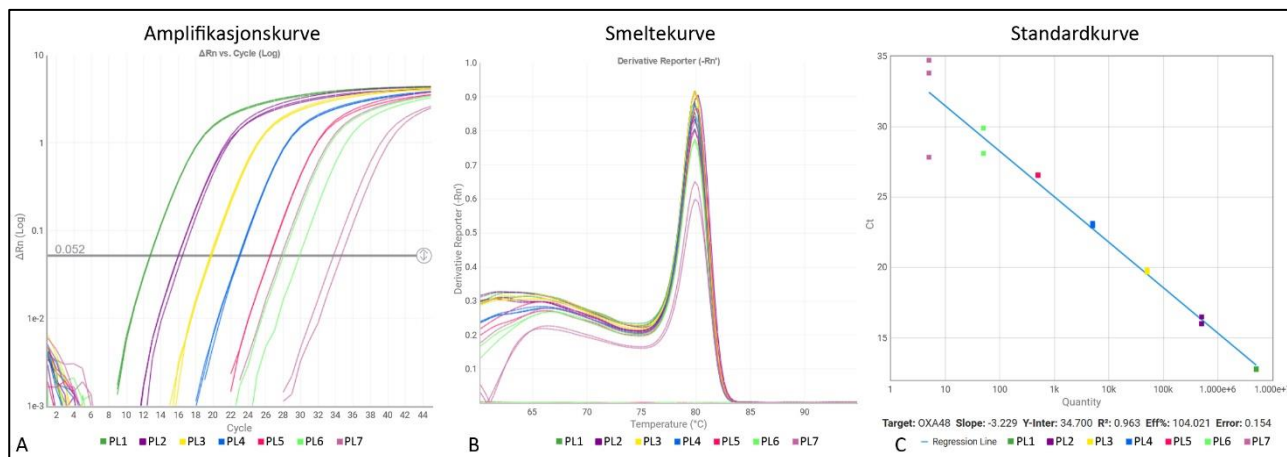
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V15.7: OXA-48 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,2	61,6	66,8
	Ubestemt	61,3	92,7	83,5

Standarder



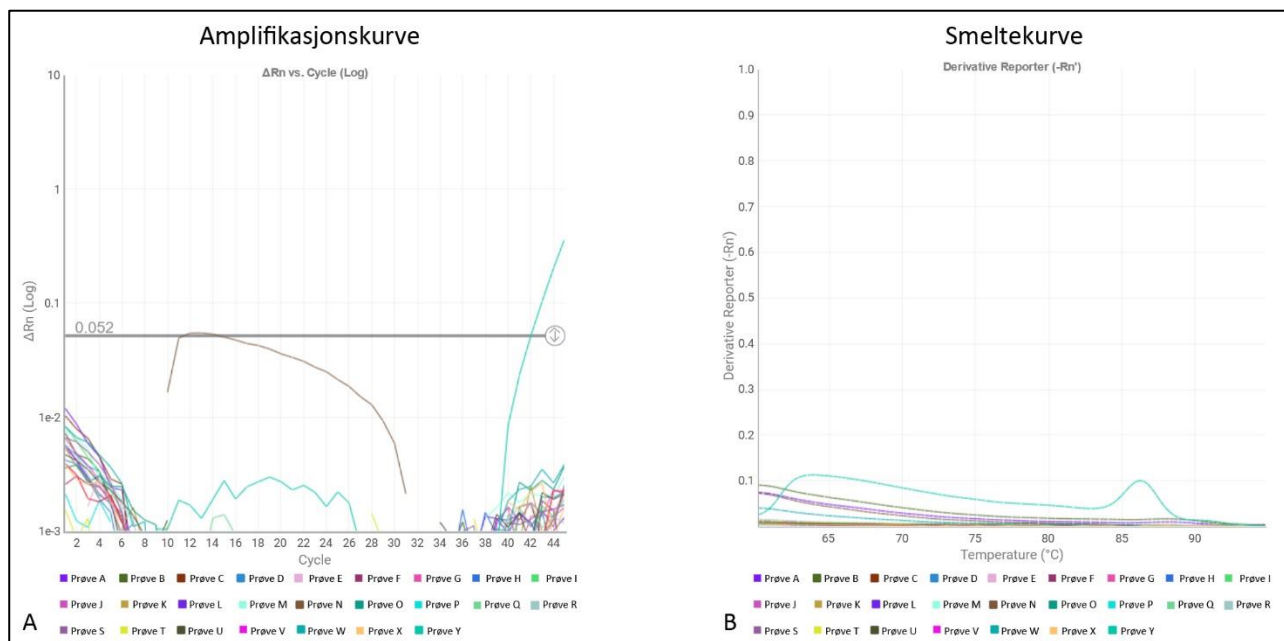
Figur V15.5: OXA-48 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmiden til isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V15.8: OXA-48 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	12,893	12,867	0,023	79,9	-	-
	12,855			79,9	-	-
	12,853			79,9	-	-
PL2	16,128	16,270	0,268	79,9	-	-
	16,579			79,9	-	-
	16,104			80,2	-	-
PL3	19,806	19,804	0,087	80,0	-	-
	19,890			79,9	-	-
	19,716			79,9	-	-
PL4	22,988	23,069	0,072	79,9	-	-
	23,126			79,7	-	-
	23,094			79,9	-	-
PL5	26,575	26,599	0,033	79,9	-	-
	26,622			80,0	-	-
	Ubestemt			61,4	81,5	85,1
PL6	29,925	29,026	1,271	79,9	-	-
	Ubestemt			61,1	73,3	76,9
	28,127			79,9	-	-
PL7	27,859	32,142	3,737	79,9	-	-
	33,828			79,9	-	-
	34,739			80,0	-	-

Isolatprøvene

Bortsett fra prøve Y (*Stenotrophomonas maltophilia*) ble ingen C_q til de resterende isolatprøvene bestemt. Prøve Y krysset terskelen ved syklus 42,079, og hadde to topper i smeltekurven. Siden smeltetemperaturene (86,3 °C og 64,4 °C) avviket fra målsekvensens smeltetemperatur (77,8 °C) ble prøve Y tolket som falsk positiv.

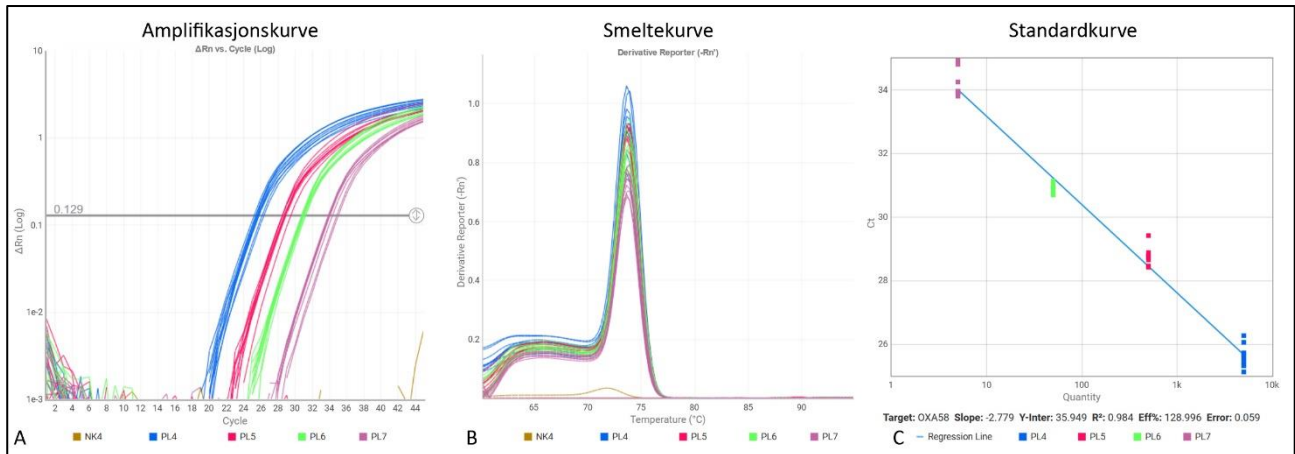


Figur V15.6: OXA-48 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 16: Data fra OXA-58 qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,129 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V16.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10× PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt OXA-58 målsekvensen, samt negativ kontroll (4× NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V16.1: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	71,8	-	-
	Ubestemt	92,6	67,1	77,2
	Ubestemt	71,4	75,4	80,8
	Ubestemt	69,2	-	-

Tabell V16.2: OXA-58 qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	25,563	25,624	0,347	73,8	-	-
		25,145			73,8	-	-
		25,722			73,6	-	-
		25,458			73,6	-	-
		25,336			73,8	-	-
		25,608			73,8	-	-
		25,343			73,8	-	-
		25,705			73,8	-	-
		26,290			73,6	-	-
		26,076			73,6	-	-
PL5	500	28,648	28,724	0,308	73,6	-	-
		Ubestemt			63,9	-	-
		28,417			73,9	-	-
		28,740			73,8	-	-
		29,412			73,6	-	-
		28,768			73,8	-	-
		28,904			73,6	-	-
		28,443			73,6	-	-
		28,730			73,6	-	-
		28,456			73,6	-	-
PL6	50	30,874	30,880	0,148	73,9	-	-
		30,691			73,8	-	-
		30,942			73,8	-	-
		31,145			73,8	-	-
		30,885			73,6	-	-
		30,917			73,8	-	-
		31,052			73,6	-	-
		30,699			73,6	-	-
		30,867			73,9	-	-
		30,724			73,8	-	-
PL7	5	33,820	34,198	0,443	73,8	-	-
		33,973			73,8	-	-
		Ubestemt			92,4	68,9	83,3
		33,913			73,8	-	-
		34,261			73,6	-	-
		34,947			73,8	-	-
		Ubestemt			64,7	-	-
		33,936			73,9	-	-
		34,819			73,8	-	-
		33,913			73,8	-	-

Vedlegg 16.1: Data fra OXA-58 qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,027 og ble vurdert som optimal.

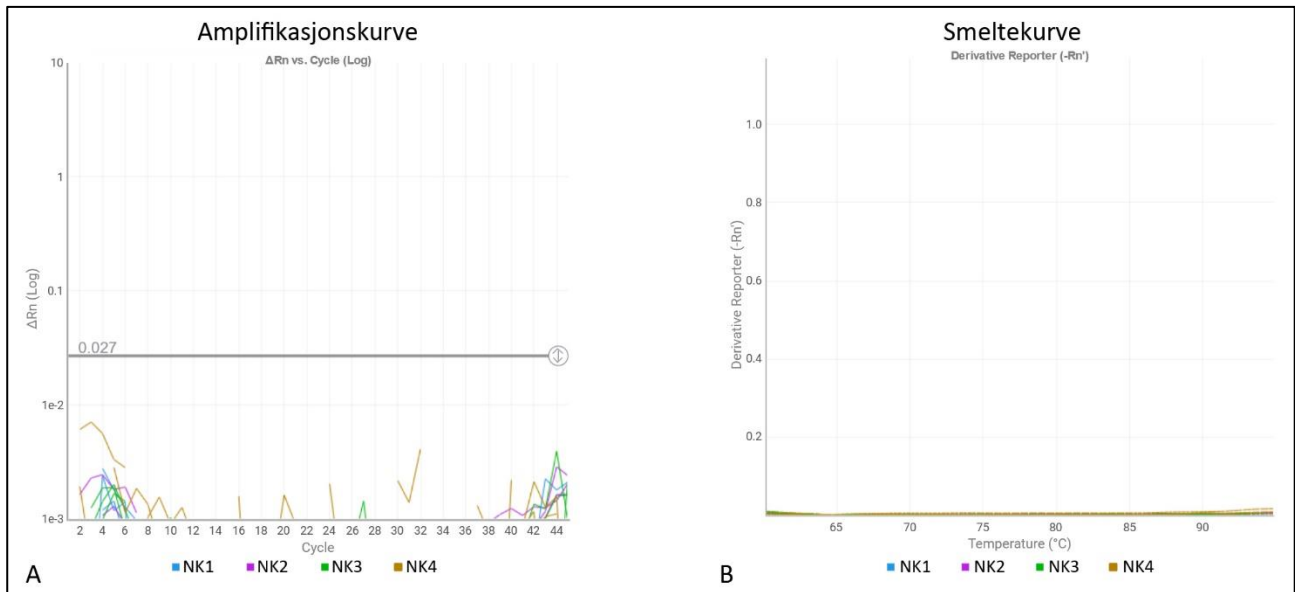
Tabell V16.3: Kvalitetsoppsummering fra OXA-58 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	8	-	PL7 (3×)	9 (3×), 13 (2×)
Ingen amplifikasjon	44	-	-	1 (2×), 2 (3×), 3 (1×), 4 (2×), 5 (3×), 6 (3×), 7 (2×), 8 (3×), 10-12 (3×), 13 (1×), 14-18 (3×)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	1	-	PL4 (1×)	-
Eksponentiell algoritme feil	46	-	-	1 (2×), 2 (3×), 3 (2×), 4 (3×), 5 (3×), 6 (3×), 7 (2×), 8 (3×), 10-12 (3×), 13 (1×), 14-18 (3×)
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	63	-	-	Minst to replikaer i alle prøver

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

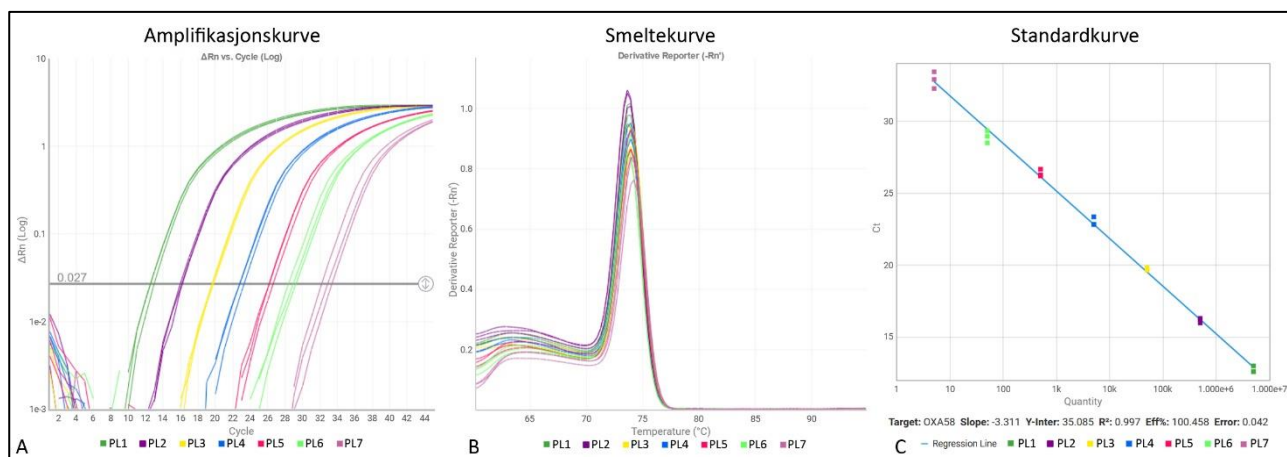


Figur V16.2: OXA-58 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontrollere (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V16.4: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	93,2	78,7	73,0
	Ubestemt	69,8	93,3	87,5
	Ubestemt	68,3	73,2	80,3
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	68,1	93,2	81,7
	Ubestemt	87,3	67,7	93,2
	Ubestemt	67,8	78,4	74,4
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	70,5	87,8	93,2
	Ubestemt	66,8	93,3	72,7
	Ubestemt	93,2	78,4	69,8
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	72,1	83,9	93,3
	Ubestemt	93,2	80,6	90,0
	Ubestemt	93,3	73,8	-

Standarder



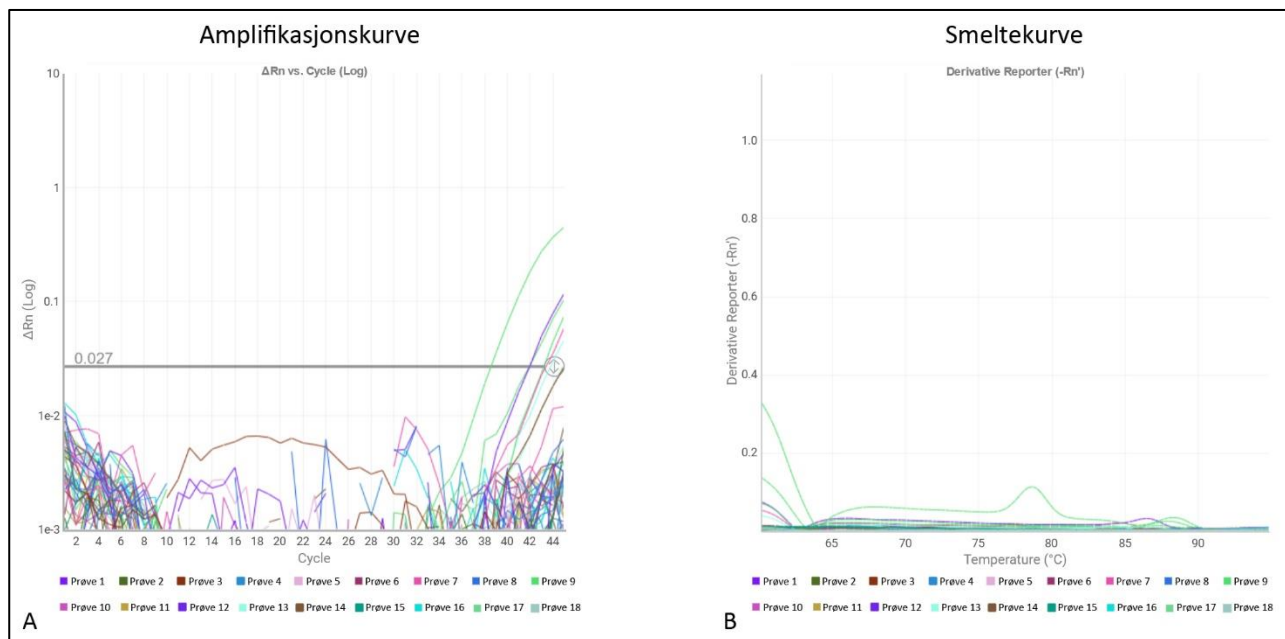
Figur V16.3: OXA-58 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V16.5: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m (°C)
PL1	12,575	12,819	0,289	73,8
	13,139			73,8
	12,744			73,8
PL2	16,297	16,241	0,082	73,8
	16,279			73,6
	16,148			73,6
PL3	19,805	19,810	0,081	74,1
	19,893			74,1
	19,731			73,9
PL4	22,900	23,048	0,255	73,9
	23,342			73,9
	22,902			73,9
PL5	26,255	26,392	0,297	73,9
	26,188			73,9
	26,733			73,9
PL6	29,328	28,947	0,422	73,9
	28,493			73,8
	29,020			73,8
PL7	33,435	32,888	0,585	74,2
	32,958			74,1
	32,271			73,9

Vannprøver

Siden kun én av tre replika krysset terskelen ble prøvene 1, 3 og 7 tolket som falsk positive. Videre krysset alle tre replikaer av prøve 9 (råvann, 16.12.2021) og 2 replikaer av prøve 13 (råvann, 17.12.2021) terskelen ved henholdsvis syklus 41,257 og 44,211 (Figur V16.4). Både prøve 9 og 13 dannet utelukkende uspesifikke produkter og ble tolket som falsk positiv.



Figur V16.4: OXA-58 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V16.6: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q til replikaene.

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	kopier/5 μ L	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	66,8	78,8	92,9
	Ubestemt			-	66,0	82,4	75,4
	41,918			-	86,5	66,2	-
2	Ubestemt	-	-	-	64,7	75,6	87,9
	Ubestemt			-	65,4	72,4	93,0
	Ubestemt			-	64,8	74,4	78,8
3	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	64,8	76,0	93,2
	44,894			-	77,2	65,7	-
	Ubestemt			-	61,1	77,2	93,5
4	Ubestemt	-	-	-	92,3	87,0	75,9
	Ubestemt			-	71,5	-	-
	Ubestemt			-	71,2	93,0	80,8

5	Ubestemt			-	72,7	89,9	68,7
	Ubestemt	-	-	-	67,7	89,7	-
	Ubestemt			-	92,3	87,3	83,8
6	Ubestemt			-	66,5	80,9	76,6
	Ubestemt	-	-	-	68,7	76,6	89,4
	Ubestemt			-	79,4	67,1	93,3
7	Ubestemt			-	65,4	-	-
	43,243	Ekskl. ¹	-	-	84,5	66,0	-
	Ubestemt			-	65,4	87,9	93,0
8	Ubestemt			-	65,1	78,9	-
	Ubestemt	-	-	-	88,2	66,5	76,2
	Ubestemt			-	66,5	61,1	75,1
9	43,145			0	66,0	87,2	81,1
	38,613	41,257	2,359	0	78,5	88,2	67,8
	42,012			0	66,6	87,9	-
10	Ubestemt			-	66,5	87,8	69,8
	Ubestemt	-	-	-	68,3	93,2	76,6
	Ubestemt			-	68,6	93,3	87,9
11	Ubestemt			-	93,3	69,5	72,4
	Ubestemt	-	-	-	78,4	93,3	74,1
	Ubestemt			-	69,3	78,9	89,9
12	Ubestemt			-	75,6	92,7	71,8
	Ubestemt	-	-	-	69,6	-	-
	Ubestemt			-	71,1	67,4	92,6
13	Ubestemt			-	73,2	88,5	80,8
	44,778	44,211	0,801	0	84,1	73,2	-
	43,644			0	66,0	86,5	82,6
14	Ubestemt			-	65,3	69,0	92,4
	Ubestemt	-	-	-	66,2	87,5	93,2
	Ubestemt			-	65,0	78,7	93,3
15	Ubestemt			-	64,7	77,8	93,0
	Ubestemt	-	-	-	64,5	78,4	61,0
	Ubestemt			-	64,5	87,3	-
16	Ubestemt			-	93,2	75,6	71,4
	Ubestemt	-	-	-	93,2	80,0	86,6
	Ubestemt			-	75,0	90,8	84,7
17	Ubestemt			-	88,2	77,1	93,0
	Ubestemt	-	-	-	67,5	80,5	84,2
	Ubestemt			-	66,0	73,9	89,0
18	Ubestemt			-	69,2	85,3	79,7
	Ubestemt	-	-	-	68,1	87,9	83,0
	Ubestemt			-	65,3	74,4	87,5

¹ Ekskludert fra videre beregning siden kun én av tre replikaer krysset terskelen

Vedlegg 16.2: Data fra OXA-58 qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,043 og ble vurdert som optimal.

Tabell V16.7: Kvalitetsoppsummering fra OXA-58 qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	3	-	PL7 (3x)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	17	-	-	B, D-F, H-K, M, P-V, X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	19	-	-	B-F, H-K, M, O-V, X
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	20	NK4 (1x)	-	A, B, F, H-N, P, Q, S-Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

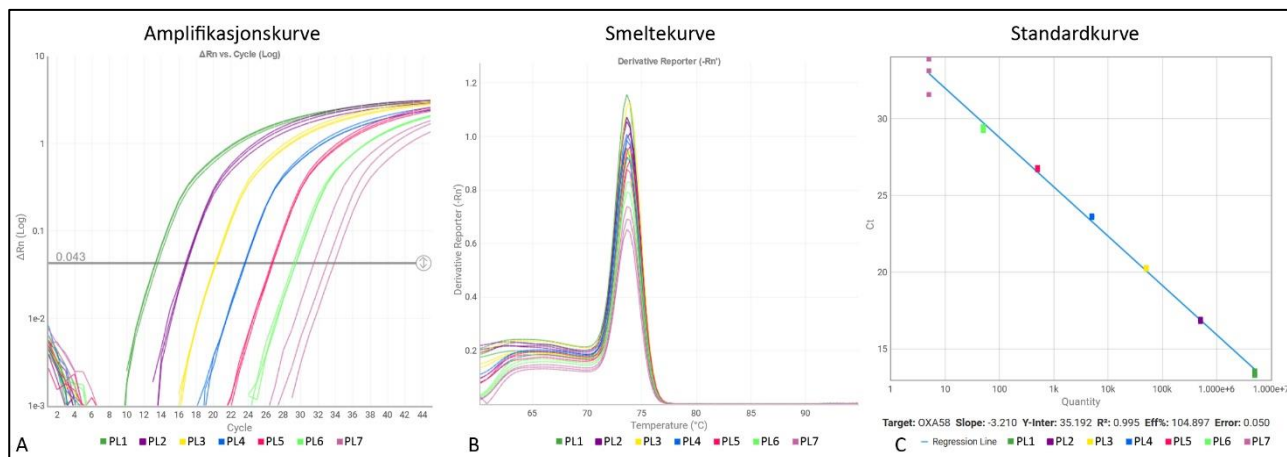
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V16.8: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	69,6	-	-
	Ubestemt	80,8	88,7	93,0

Standarder



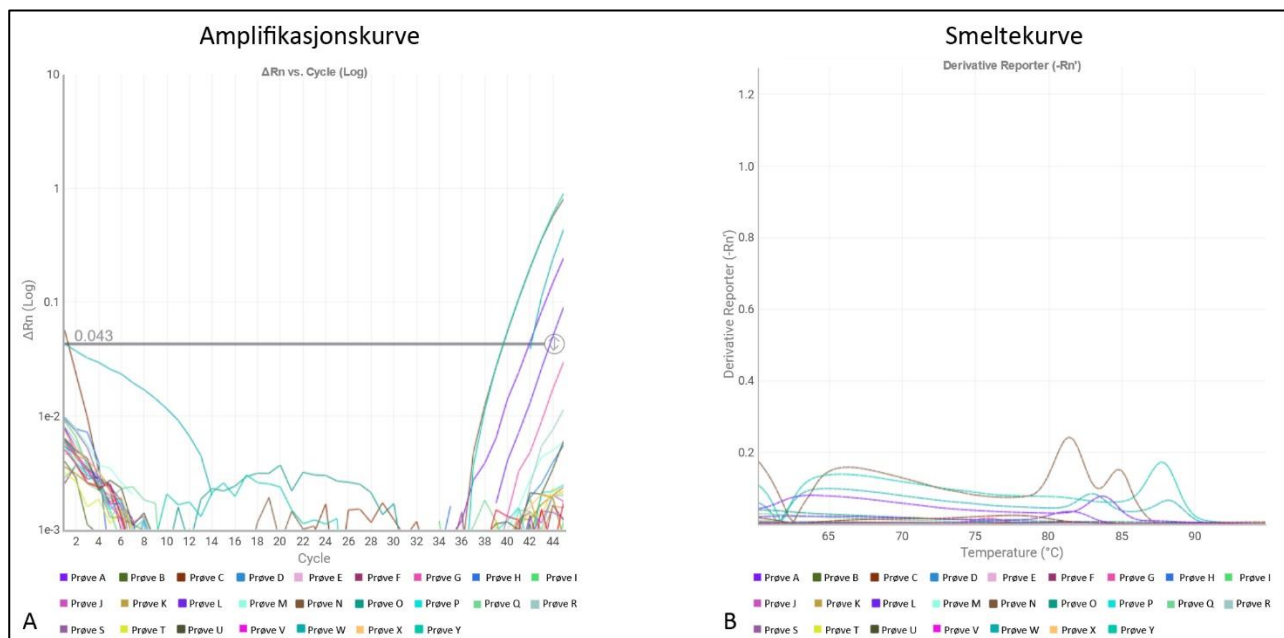
Figur V16.5: OXA-58 qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmidet i isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V16.9: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m (°C)
PL1	13,407	13,518	0,148	73,6
	13,461			73,6
	13,686			73,6
PL2	16,951	16,894	0,054	73,6
	16,886			73,6
	16,845			73,9
PL3	20,195	20,312	0,104	73,8
	20,391			73,8
	20,351			73,8
PL4	23,611	23,669	0,059	73,8
	23,667			73,6
	23,729			73,8
PL5	26,819	26,789	0,066	73,8
	26,713			73,9
	26,833			73,9
PL6	29,544	29,439	0,151	73,8
	29,508			73,8
	29,266			73,8
PL7	33,874	32,882	1,160	73,6
	31,606			73,8
	33,165			73,8

Isolatprøvene

5 av 25 isolatprøver krysset terskelen ved og etter 39,678 sykluser, der alle fem prøver hadde dannet utelukkende uspesifikke produkter og ble derfor tolket som falsk positive.



Figur V16.6: OXA-58 qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V16.10: OXA-58 qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av isolatprøvene.

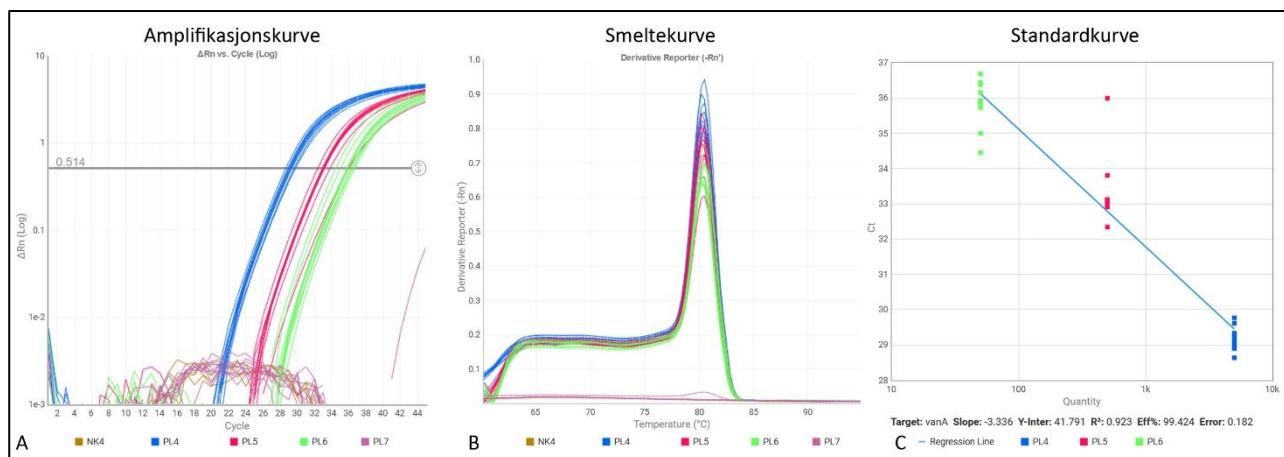
Prøve	C_q	kopier/5 μ L	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
A	42,026	0	83,6	65,1	-
B	Ubestemt	-	92,0	63,6	72,1
C	Ubestemt	-	77,5	-	-
D	Ubestemt	-	75,4	-	-
E	Ubestemt	-	60,8	-	-
F	Ubestemt	-	89,3	62,2	67,4
G	Ubestemt	-	75,9	-	-
H	Ubestemt	-	76,0	93,1	72,9
I	Ubestemt	-	69,2	64,7	75,3
J	Ubestemt	-	92,6	87,3	78,5
K	Ubestemt	-	67,8	92,4	61,7
L	43,649	0	81,4	65,4	-
M	Ubestemt	-	76,0	61,6	83,8
N	39,686	0	81,4	66,5	84,8
O	Ubestemt	-	61,6	-	-
P	Ubestemt	-	93,6	61,3	80,9

Q	Ubestemt	-	61,6	92,7	-
R	Ubestemt	-	75,9	-	-
S	Ubestemt	-	61,4	91,4	87,2
T	Ubestemt	-	61,4	87,9	93,1
U	Ubestemt	-	61,4	87,6	-
V	Ubestemt	-	82,0	90,5	77,2
W	40,782	0	65,3	82,9	88,1
X	Ubestemt	-	69,5	65,7	91,1
Y	39,678	-	87,6	67,5	-

Vedlegg 17: Data fra *vanA* qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,514 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V17.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10 \times PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt *vanA*-sekvensen, samt negativ kontroll (4 \times NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V17.1: *vanA* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 ($^{\circ}C$)	T_m 2 ($^{\circ}C$)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	65,3	-
	Ubestemt	65,1	68,9
	Ubestemt	65,6	67,8
	Ubestemt	66,5	-

Tabell V17.2: *vanA* qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	29,768	29,177	0,338	80,3	-	-
		29,099			80,3	-	-
		28,929			80,3	-	-
		28,638			80,3	-	-
		28,900			80,5	-	-
		29,049			80,5	-	-
		29,614			80,3	-	-
		29,283			80,3	-	-
		29,331			80,3	-	-
		29,160			80,3	-	-
PL5	500	33,121	33,330	0,997	80,3	-	-
		32,342			80,3	-	-
		32,912			80,5	-	-
		32,978			80,5	-	-
		33,089			80,3	-	-
		33,804			80,3	-	-
		35,983			80,3	-	-
		33,037			80,3	-	-
		33,119			80,3	-	-
		32,915			80,3	-	-
PL6	50	35,728	35,850	0,678	80,5	-	-
		34,998			80,5	-	-
		35,867			80,3	-	-
		35,867			80,3	-	-
		36,383			80,3	-	-
		36,447			80,3	-	-
		36,679			80,3	-	-
		36,155			80,3	-	-
		34,447			80,5	-	-
		35,934			80,5	-	-
PL7	5	Ubestemt	-	-	65,7	67,1	86,7
		Ubestemt			65,9	69,3	-
		Ubestemt			66,0	-	-
		Ubestemt			65,1	69,0	-
		Ubestemt			65,1	-	-
		Ubestemt			80,3	65,9	-
		Ubestemt			66,0	-	-
		Ubestemt			65,3	68,6	87,3
		Ubestemt			65,4	67,2	-
		Ubestemt			65,6	-	-

Vedlegg 17.1: Data fra *vanA* qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,011 og ble vurdert som optimal.

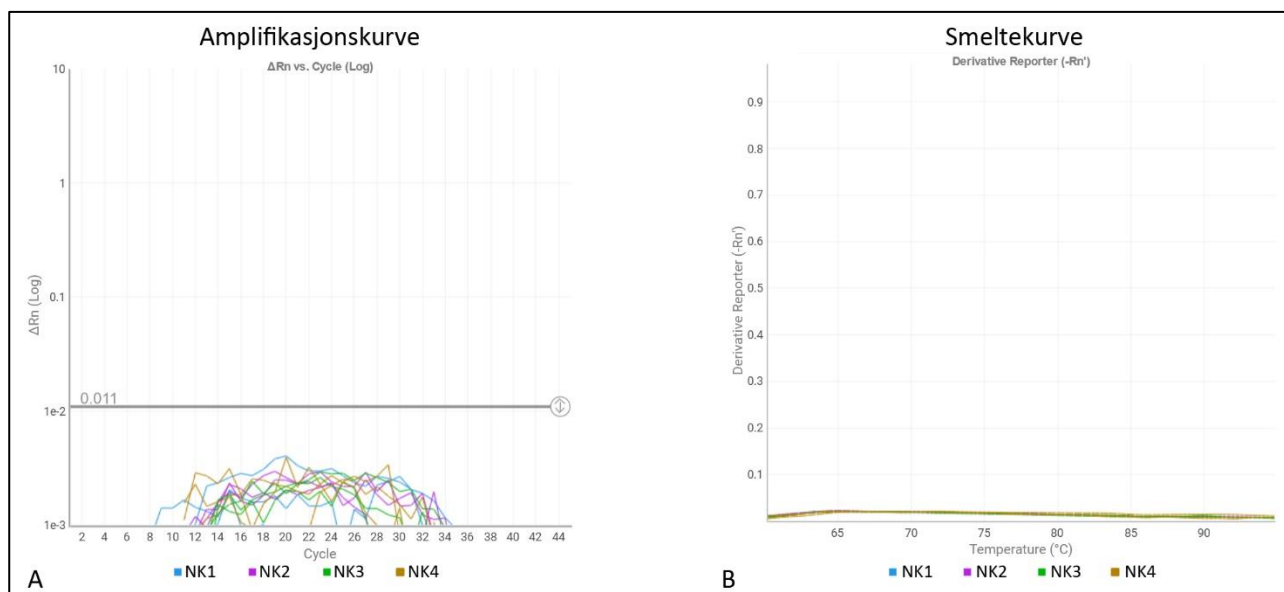
Tabell V17.3: Kvalitetsoppsummering fra *vanA* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer. Dataene er overført fra StepOne Software (Version 2.3) før ekskludering av standarder med avvikende smeltekurver.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	10	-	PL5 (3×)	3 (2×), 9 (2×), 14 (3×)
Ingen amplifikasjon i prøvene	31	-	-	1 (1×), 2 (2×), 3 (1×), 4 (2×), 5 (2×), 6 (3×), 7 (1×), 10 (3×), 11 (3×), 12 (2×), 13 (2×), 15-17 (2×), 18 (3×)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	42	-	PL7 (2×)	1-2 (2×), 3 (1×), 4-6 (3×), 7 (2×), 8 (1×), 9 (1×), 10-12 (3×), 13 (2×), 15 (2×), 16-18 (3×)
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	37	NK1 (1×), NK4 (2×)	-	Minst én replika i alle prøver bortsett fra prøve 17

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll



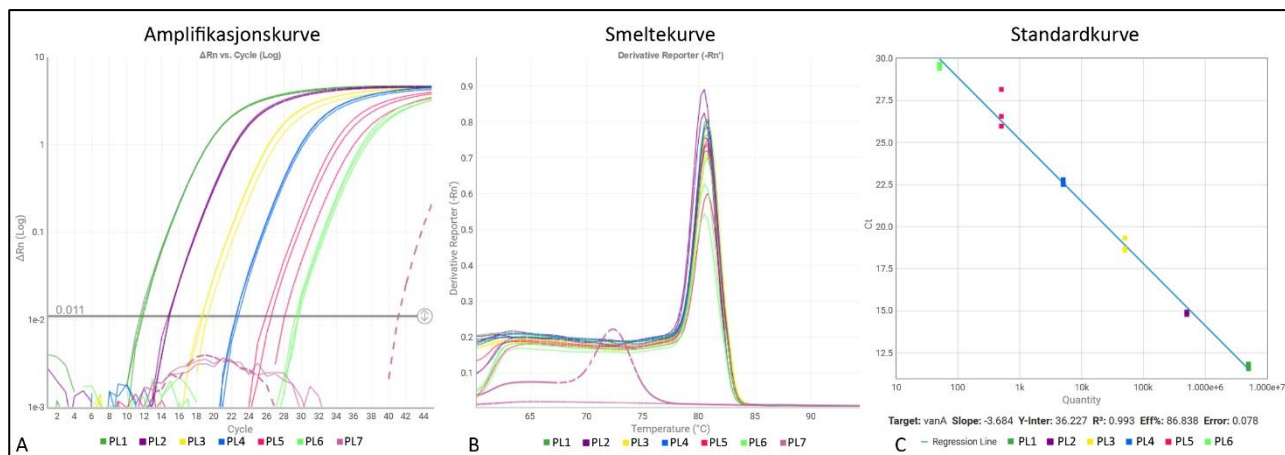
Figur V17.2: *vanA* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontrollere (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V17.4: *vanA* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	65,4	-	-
	Ubestemt	64,8	-	-
	Ubestemt	64,7	67,2	-
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	65,0	-	-
	Ubestemt	64,8	-	-
	Ubestemt	64,7	-	-
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	65,0	-	-
	Ubestemt	64,7	-	-
	Ubestemt	65,4	-	-
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	66,8	-	-
	Ubestemt	71,5	64,4	87,4
	Ubestemt	71,5	66,3	88,5

Standarder

Én replika til standard PL7 ble ekskludert fra videre analyser (inkl. standardkurven), siden smeltekurven viste uspesifikke PCR-produkter (Figur V17.3-B).



Figur V17.3: *vanA* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3 × PL1-PL7) av plasmidet til vannprøvenes oppsett. Den striplette linjen viser én replika av PL7 som ble ekskludert. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

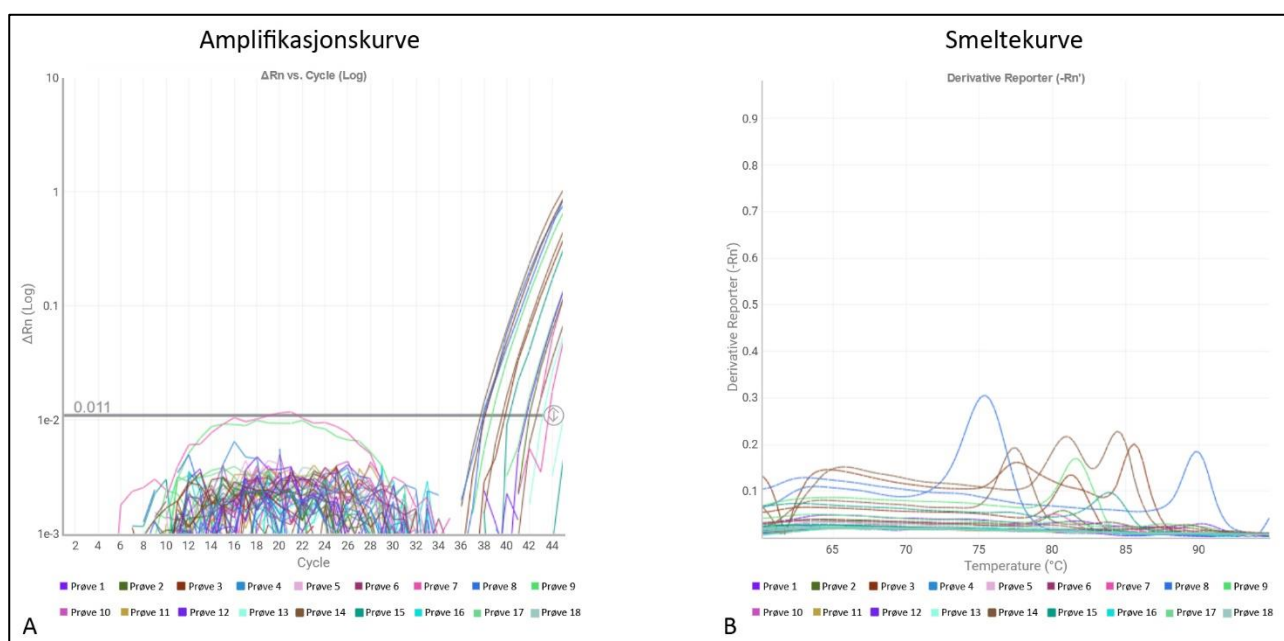
Tabell V17.5: *vanA* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m (°C)
PL1	11,585	11,641	0,116	80,6
	11,563			80,6
	11,775			80,6
PL2	14,815	14,840	0,113	80,6
	14,963			80,5
	14,741			80,5
PL3	18,622	18,893	0,401	80,8
	18,704			80,8
	19,355			80,8
PL4	22,819	22,640	0,157	80,8
	22,529			80,6
	22,573			80,6
PL5	28,126	26,954	1,037	80,8
	26,581			80,8
	26,156			80,8
PL6	29,428	29,567	0,128	80,8
	29,592			80,5
	29,681			80,5
PL7	Ekskl. ¹	-	-	64,8
	Ekskl. ¹			64,8
	Ekskl. ¹			72,4

¹ Ekskludert fra videre statistiske beregninger på grunn av avvikende smeltekurve

Vannprøvene

Alle råvannsprøvene krysset terskelen ved og etter 37,761 sykluser, mens ingen drikkevannsprøvene krysset terskelen (Figur V17.4-A). Ved 5 av 9 råvannsprøvene (prøve 1, 2, 7, 13 og 15) krysset kun én av tre replikaer terskelen og ble dermed tolket som falsk positiv. Smeltekurven til prøve 3 (råvannsprøve, 15.12.2021), prøve 8 og 9 (råvannsprøver, 16.12.2021), og prøve 14 (råvannsprøve, 17.12.2021) viste multiple topper (Figur V17.4-B). Ingen av prøvene hadde kun én topp ved smelte-temperaturen til målsekvensen (80,7 °C; gjennomsnittlig TM-1 til PL1-PL6). Selv om uspesifikke produkter ble inkludert i beregningen av mulige spesifikke produkter ble det beregnede *vanA*-genkopiantallet svært lav (< 1 GU/5 µL), og samtlige prøver ble derfor tolket som falsk positive.



Figur V17.4: *vanA* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V17.6: *vanA* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q og genkopiantall til replikaene. Dataene er direkte overført fra StepOne Software (Version 2.3) etter ekskludering av den avvikende replikaen til standard PL7.

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	kopier/5 µL	Gjennomsnitt (kopier/5 µL)	Standardavvik (kopier/5 µL)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	Ubestemt	Eksl. ¹	-	-	-	-	71,1	64,8	-
	41,804			-			64,4	90,2	81,5
	Ubestemt			-			64,4	-	-

2	42,104	Ekstl. ¹	-	-	-	-	80,6	64,2	-	
	Ubestemt			-			-	63,9	-	-
	Ubestemt			-			-	63,9	-	-
3	Ubestemt	39,006	1,118	-	0	0	65,0	74,1	-	
	38,216			0			85,6	77,5	66,5	
	39,797			0			81,2	-	-	
4	Ubestemt	-	-	-	-	-	64,7	68,7	-	
	Ubestemt			-			-	65,0	69,3	77,5
	Ubestemt			-			-	65,0	87,7	67,5
5	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,1	-	-	
	Ubestemt			-			-	64,8	87,8	68,6
	Ubestemt			-			-	66,9	64,4	-
6	Ubestemt	-	-	-	-	-	64,8	68,9	-	
	Ubestemt			-			-	64,8	-	-
	Ubestemt			-			-	64,2	-	-
7	Ubestemt	Ekstl. ¹	-	-	-	-	63,8	-	-	
	Ubestemt			-			-	87,8	64,2	-
	42,817			-			-	80,0	84,7	65,4
8	38,029	38,065	0,051	0	0	0	89,9	64,4	-	
	38,101			0			75,4	63,9	-	
	Ubestemt			-			64,2	-	-	
9	38,711	40,192	2,095	0	0	0	81,5	-	-	
	Ubestemt			-			64,8	68,7	87,6	
	41,673			0			64,8	87,5	-	
10	Ubestemt	-	-	-	-	-	64,8	66,9	81,2	
	Ubestemt			-			-	63,5	-	-
	Ubestemt			-			-	64,1	-	-
11	Ubestemt	-	-	-	-	-	63,3	66,9	-	
	Ubestemt			-			-	66,2	-	-
	Ubestemt			-			-	65,1	77,1	82,1
12	Ubestemt	-	-	-	-	-	64,5	69,3	73,2	
	Ubestemt			-			-	63,8	71,7	75,7
	Ubestemt			-			-	65,3	80,5	70,4
13	42,789	Ekstl. ¹	-	-	-	-	65,0	84,2	-	
	Ubestemt			-			-	65,0	68,7	88,1
	Ubestemt			-			-	63,5	77,2	-
14	37,761	40,024	2,482	0	0	0	84,5	80,9	67,1	
	39,632			0			77,4	-	-	
	42,678			0			63,6	79,7	85,6	
15	40,405	Ekstl. ¹	-	-	-	-	83,9	63,2	-	
	Ubestemt			-			-	63,3	-	-
	Ubestemt			-			-	64,5	-	-
16	Ubestemt	-	-	-	-	-	64,2	-	-	
	Ubestemt			-			-	71,2	64,1	75,7
	Ubestemt			-			-	65,9	70,4	88,4
17	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,7	-	-	
	Ubestemt			-			-	65,0	-	-
	Ubestemt			-			-	64,7	-	-
18	Ubestemt	-	-	-	-	-	71,5	66,9	80,9	
	Ubestemt			-			-	63,0	71,2	-
	Ubestemt			-			-	63,6	87,5	-

¹ Ekskludert fra videre beregning siden kun én av tre replikaer krysset terskelen

Vedlegg 17.2: Data fra *vanA* qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,018 og ble vurdert som optimal.

Tabell V17.7: Kvalitetsoppsummering fra *vanA* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	8	-	PL5 (3×), PL6 (3×), PL7 (2×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	21	-	PL7 (1×)	A, C, D, F-K, M, O-U, W-Y
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	24	-	PL7 (1×)	A-K, M-U, W-Y
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	14	-	PL7 (1×)	A, C, H, J, L, P, S-Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

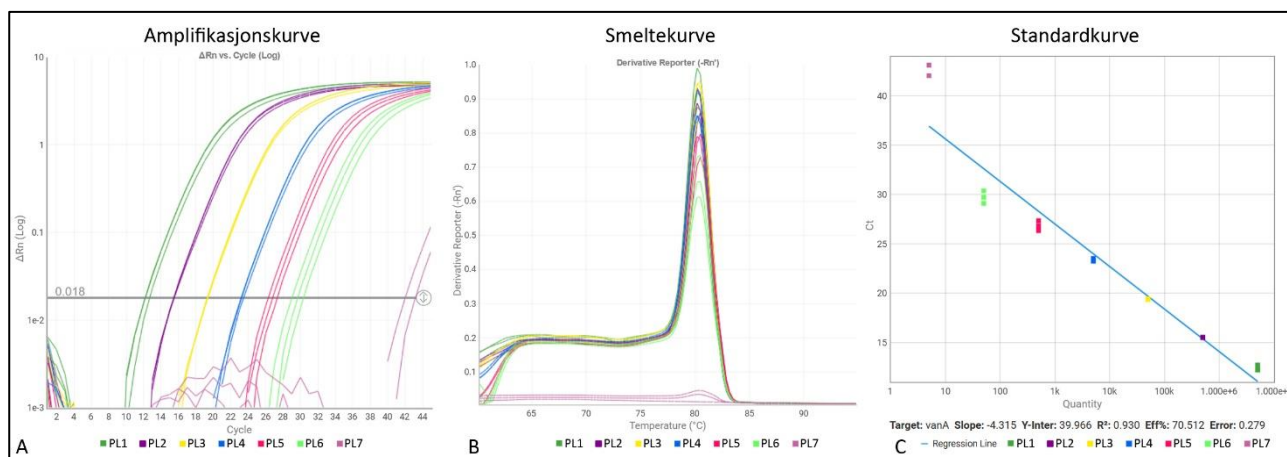
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V17.8: *vanA* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	65,7
	Ubestemt	64,7

Standarder



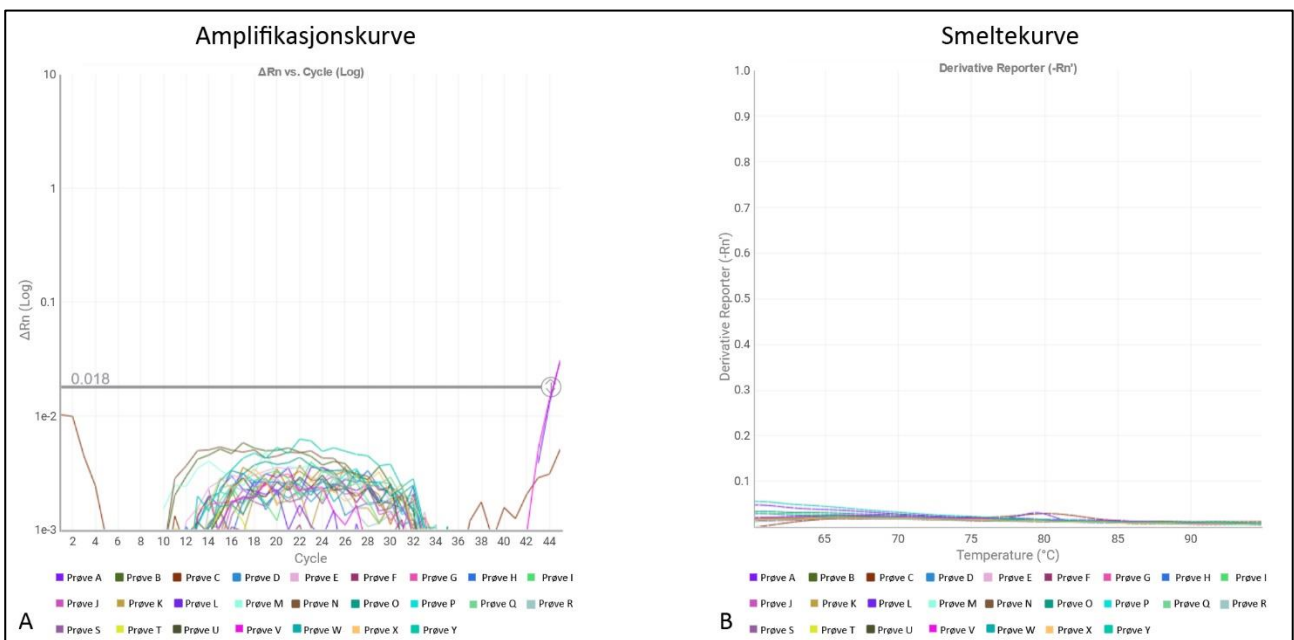
Figur V17.5: *vanA* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortyngningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmidet i isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V17.9: *vanA* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)
PL1	12,251	12,339	0,186	80,3	-
	12,213			80,3	-
	12,553			80,3	-
PL2	15,693	15,617	0,095	80,2	-
	15,510			80,3	-
	15,648			80,5	-
PL3	19,361	19,437	0,097	80,3	-
	19,546			80,3	-
	19,404			80,3	-
PL4	23,525	23,358	0,147	80,3	-
	23,300			80,2	-
	23,248			80,2	-
PL5	26,829	26,870	0,543	80,3	-
	26,348			80,5	-
	27,432			80,5	-
PL6	29,101	29,735	0,640	80,3	-
	29,725			80,3	-
	30,380			80,3	-
PL7	Ubestemt	42,587	0,750	65,1	-
	43,117			80,3	-
	42,056			80,3	66,8

Isolatprøvene

2 av 25 isolatprøver krysset terskelen ved henholdsvis 44,164 og 44,210 sykluser. Både prøve L (*Paenibacillus amylolyticus*) og prøve V (*Pseudomonas rhodesiae*) hadde multiple toppler, der prøve V dannet utelukkende uspesifikke PCR-produkter (TM1: 66,2 °C; TM2: 77,7 °C; TM3: 68,4 °C) og ble tolket som falsk positiv. Prøve L hadde to toppler ved henholdsvis 79,4 °C og 66,0 °C, der første toppen var ved målsekvensens smeltetemperatur (80,7 °C). Det beregnete gen-kopiantallet var likevel svært lav (< 1 GU/5 µL) og under det teoretisk lavest mulige gen-kopiantallet (3 GU), og ble derfor tolket som falsk positive.

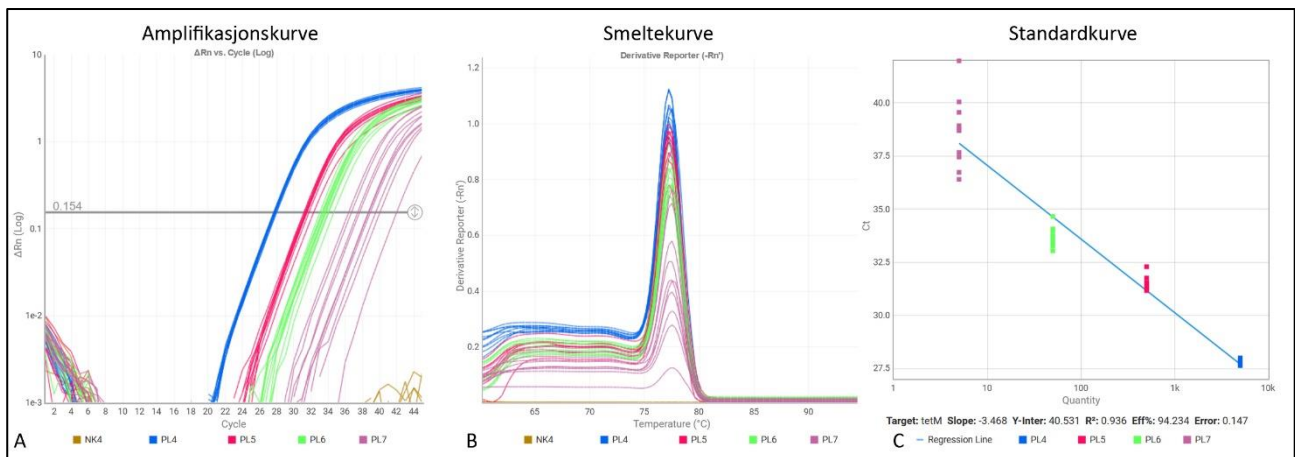


Figur V17.6: *vanA* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Vedlegg 18: Data fra *tetM* qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,154 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V18.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10× PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt *tetM*-sekvensen, samt negativ kontroll (4× NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V18.1: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,5	61,3	-
	Ubestemt	61,4	93,5	77,1
	Ubestemt	61,6	80,9	84,2
	Ubestemt	61,6	87,8	93,6

Tabell V18.2: *tetM* qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	27,782	27,815	0,105	77,4
		27,657			77,2
		27,830			77,2
		27,695			77,2
		27,767			77,5
		27,849			77,4
		27,794			77,2
		27,825			77,2
		28,019			77,2
		27,930			77,2
PL5	500	31,167	31,517	0,324	77,2
		31,561			77,2
		31,345			77,5
		31,367			77,4
		31,423			77,2
		31,502			77,4
		32,292			77,2
		31,778			77,2
		31,518			77,2
		31,214			77,2
PL6	50	33,714	33,706	0,466	77,5
		33,998			77,5
		33,266			77,4
		34,675			77,4
		33,381			77,4
		34,070			77,4
		33,777			77,2
		33,492			77,4
		33,646			77,5
		33,037			77,2
PL7	5	39,577	38,638	1,665	77,5
		38,944			77,5
		41,987			77,5
		38,767			77,4
		37,689			77,4
		40,053			77,5
		38,714			77,7
		36,752			77,5
		37,472			77,5
		36,423			77,4

Vedlegg 18.1: Data fra *tetM* qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,020 og ble vurdert som optimal.

Tabell V18.3: Kvalitetsoppsummering fra *tetM* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

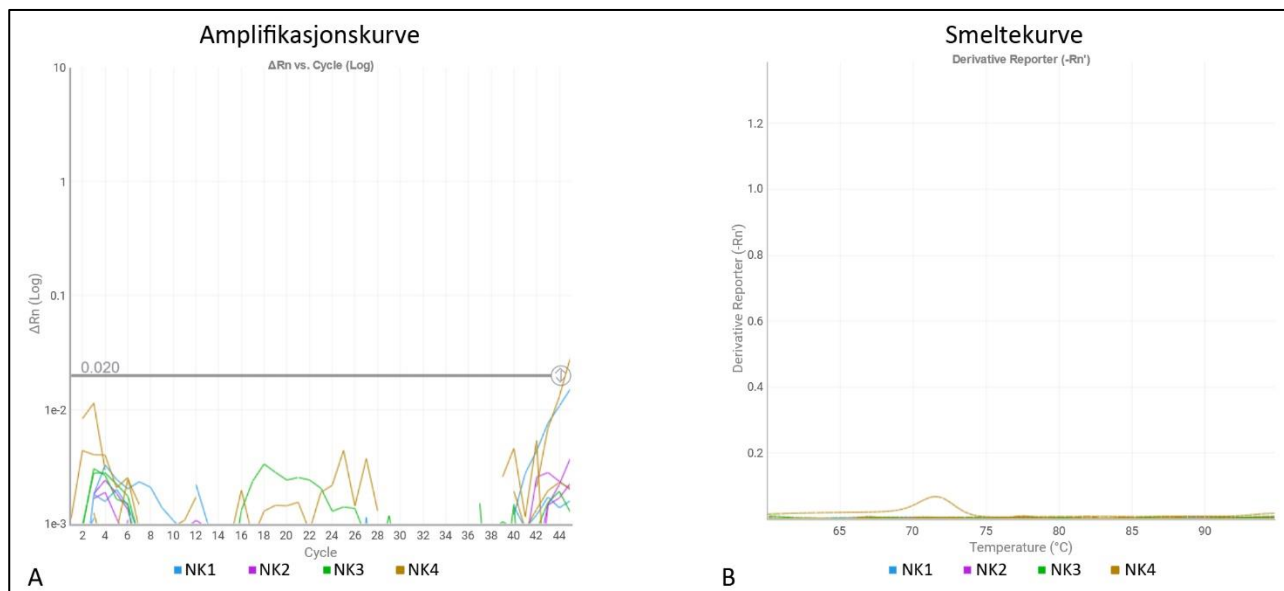
	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	1	NK4 (1x)	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	5	-	PL7 (3x)	9 (2x)
Ingen amplifikasjon	44	-	-	1-3 (2x), 4-6 (3x), 7 (1x), 8 (3x), 10 (2x), 11-16 (3x), 17 (2x), 18 (3x)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	57	-	-	Minst én replikaer i alle prøver
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	58	NK1 (2x), NK2 (3x), NK3-4 (2x)	-	Minst to replikaer i alle prøver

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

Én replika av den negative PCR-kontrollen (NK4) krysset terskelen ved syklus 44,423 (Figur V18.2-A) og hadde en smeltetemperatur på 71,6 °C (Figur V18.2-B). Målsekvensens smeltetemperatur var imidlertid ved 77,5 °C (gjennomsnittlig T_m fra PL1-7). Oppsettet ble også godkjent siden kun én av tre replikaer krysset terskelen og resten av de negative kontrollene var negative (Tabell V18.4).

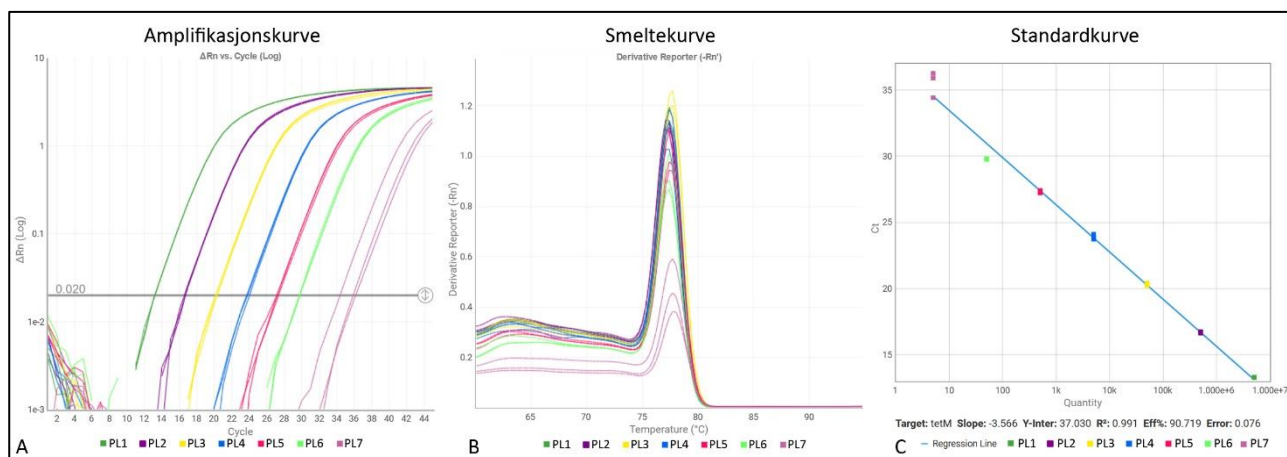


Figur V18.2: *tetM* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontroller (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V18.4: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	68,6	93,3	83,1
	Ubestemt	77,4	-	-
	Ubestemt	67,1	88,2	92,1
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	67,6	72,5	81,3
	Ubestemt	67,3	77,1	85,1
	Ubestemt	66,8	73,3	89,1
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	69,2	88,5	-
	Ubestemt	66,7	-	-
	Ubestemt	67,9	93,3	73,6
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	67,6	73,4	-
	Ubestemt	67,1	77,4	81,8
	44,423	71,6	-	-

Standarder



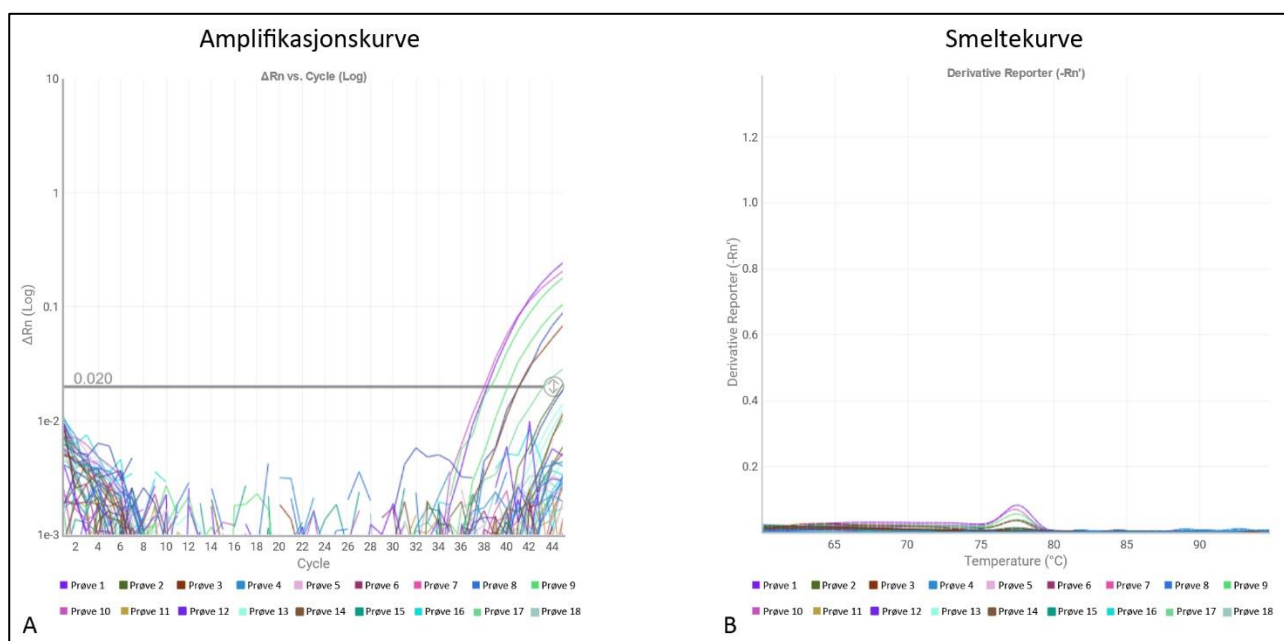
Figur V18.3: *tetM* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortyngningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V18.5: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m (°C)
PL1	13,275	13,357	0,134	77,4
	13,512			77,4
	13,285			77,4
PL2	16,730	16,713	0,022	77,4
	16,688			77,3
	16,722			77,3
PL3	20,393	20,430	0,081	77,6
	20,374			77,6
	20,523			77,4
PL4	24,126	24,052	0,216	77,4
	23,808			77,4
	24,220			77,3
PL5	27,343	27,394	0,081	77,4
	27,488			77,6
	27,351			77,6
PL6	29,758	29,767	0,021	77,4
	29,751			77,4
	29,791			77,4
PL7	35,884	35,565	0,963	77,7
	36,328			77,9
	34,483			77,7

Vannprøver

Replikaer av både rå- og drikkevannsprøvene krysset terskelen ved og etter syklus 38,020 (Figur V18.4-A), der samtlige topper lå ved målsekvensens smeltetemperatur (77,5 °C). Prøver der bare én av tre replikaer fikk bestemt C_q -verdi ble tolket som falsk positiv. Prøve 9 (råvann, 16.12.2021) ble også tolket som falsk positiv siden det beregnete *tetM*-gen-kopiantall var svært lav (< 1 GU/5 µL) og under det teoretisk lavest mulige gen-kopiantallet (3 GU). Resultatene kan tyde på mulig kontaminering fra standardene under pipettering siden drikkevannsprøven 10 ikke fikk amplifisert 16S-genet i 16S rRNA qPCR analysen, men ble falsk positiv ved *tetM* qPCR analysen.



Figur V18.4: *tetM* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V18.6: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q og genkopiantall til replikaene.

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	kopier/5 µL	Gjennomsnitt (kopier/5 µL)	Standardavvik (kopier/5 µL)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	38,308	Eksl. ¹	-	0	-	-	77,4	68,8	-
	Ubestemt			-			66,1	61,5	79,4
	Ubestemt			-			61,8	66,8	87,9

2	Ubestemt			-			77,4	64,9	-
	Ubestemt	-	-	-	-	-	61,5	64,6	-
	Ubestemt			-			77,1	61,8	73,1
3	Ubestemt	Ekstl. ¹	-	-	-	-	61,6	-	-
	Ubestemt			-			77,3	62,2	-
	41,018			0			77,4	64,0	-
4	Ubestemt	-	-	-	-	-	70,7	65,8	93,1
	Ubestemt			-			70,7	74,7	78,5
	Ubestemt			-			70,1	77,1	93,4
5	Ubestemt	-	-	-	-	-	67,3	84,3	76,7
	Ubestemt			-			74,0	89,4	68,9
	Ubestemt			-			66,7	-	-
6	Ubestemt	-	-	-	-	-	66,7	81,9	92,8
	Ubestemt			-			73,9	66,2	88,4
	Ubestemt			-			77,6	84,5	66,4
7	41,192	Ekstl. ¹	-	0	-	-	77,4	64,9	-
	Ubestemt			-			65,2	-	-
	Ubestemt			-			65,8	77,3	73,0
8	Ubestemt	-	-	-	-	-	61,2	87,0	82,2
	Ubestemt			-			77,6	81,8	66,2
	Ubestemt			-			61,4	76,7	-
9	Ubestemt	39,443	0,910	-	0	0	77,4	63,6	-
	40,086			0			77,6	-	-
	38,800			0			77,4	66,5	-
10	Ubestemt	Ekstl. ¹	-	-	-	-	67,0	86,9	76,8
	Ubestemt			-			66,7	85,5	90,7
	38,020			1			77,3	-	-
11	Ubestemt	-	-	-	-	-	67,1	81,8	93,3
	Ubestemt			-			87,2	92,8	68,6
	Ubestemt			-			68,0	73,6	86,6
12	Ubestemt	-	-	-	-	-	83,1	69,2	77,9
	Ubestemt			-			77,7	81,9	88,8
	Ubestemt			-			69,3	93,1	73,7
13	Ubestemt	-	-	-	-	-	77,4	66,2	87,8
	Ubestemt			-			77,4	64,6	69,5
	Ubestemt			-			77,3	65,6	-
14	Ubestemt	-	-	-	-	-	63,7	85,1	66,2
	Ubestemt			-			61,8	93,4	64,7
	Ubestemt			-			64,0	93,0	89,2
15	Ubestemt	-	-	-	-	-	61,3	64,0	-
	Ubestemt			-			61,2	64,6	-
	Ubestemt			-			62,7	93,6	90,1
16	Ubestemt	-	-	-	-	-	78,0	93,4	83,6
	Ubestemt			-			77,4	88,8	81,6
	Ubestemt			-			69,6	85,2	93,3
17	Ubestemt	Ekstl. ¹	-	-	-	-	67,7	81,3	78,2
	43,170			0			77,6	69,8	65,3
	Ubestemt			-			68,6	88,5	81,0
18	Ubestemt	-	-	-	-	-	67,0	75,7	79,8
	Ubestemt			-			87,0	81,9	72,5
	Ubestemt			-			64,6	73,0	71,2

¹ Ekskludert fra videre beregning siden kun én av tre replikaer krysset terskelen

Vedlegg 18.2: Data fra *tetM* qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,025 og ble vurdert som optimal.

Tabell V18.7: Kvalitetsoppsummering fra *tetM* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	3	-	PL7 (3×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	18	-	PL5 (1×)	A, C-E, G-K, P-V, X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	1	-	PL7 (1×)	-
Ekspontiell algoritme feil	21	-	PL5 (1×)	A, C-K, O-V, X, Y
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	23	NK4 (2×)	PL5 (1×)	A-K, P-V, X, Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

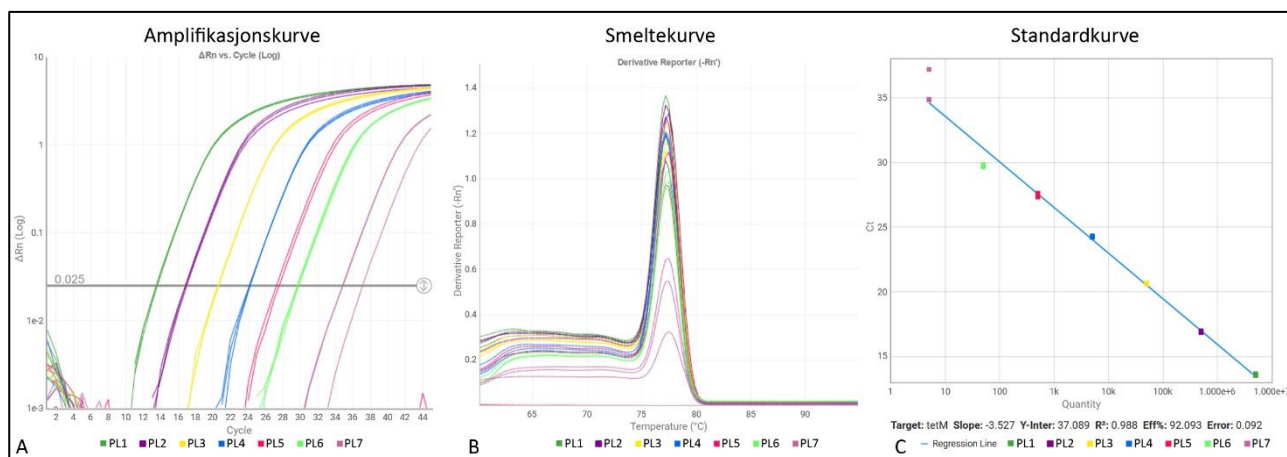
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V18.8: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,6	61,6	76,6
	Ubestemt	61,7	93,1	75,0

Standarder



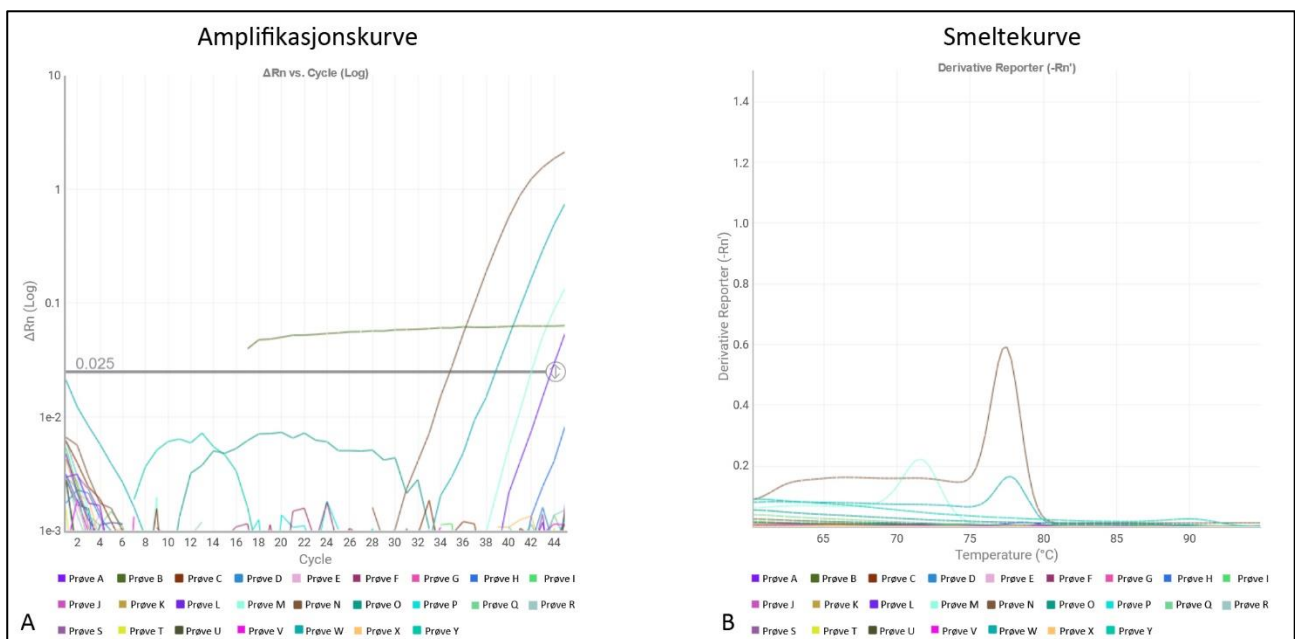
Figur V18.5: *tetM* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmidet i isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V18.9: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	13,709	13,755	0,056	77,2	-	-
	13,738			77,2	-	-
	13,817			77,2	-	-
PL2	17,179	17,075	0,107	77,2	-	-
	17,080			77,2	-	-
	16,965			77,4	-	-
PL3	20,731	20,758	0,035	77,4	-	-
	20,746			77,4	-	-
	20,797			77,4	-	-
PL4	24,302	24,304	0,028	77,2	-	-
	24,276			77,2	-	-
	24,333			77,2	-	-
PL5	27,710	27,523	0,264	77,4	-	-
	Ubestemt			61,4	87,0	90,6
	27,337			77,4	-	-
PL6	29,837	29,832	0,071	77,4	-	-
	29,901			77,4	-	-
	29,759			77,4	-	-
PL7	34,956	35,695	1,314	77,4	-	-
	34,916			77,4	-	-
	37,212			77,5	-	-

Isolatprøvene

5 av 25 isolatprøver krysset terskelen (Figur V18.6). Prøve B (*Aeromonas encheleia*) ble ekskludert på grunn av avvikende amplifikasjonskurve og manglende smeltekurve. Både prøve L (*Paenibacillus amylolyticus*) og prøve M (*Paenibacillus macerans*) hadde dannet utelukkende uspesifikke PCR-produkter og ble tolket som falsk positiv (Tabell V18.10). Prøve N (*Rahnella aquatilis*) og prøve W (*Serratia fonticola*) hadde ingen multiple topper og smeltetemperaturen (N: 77,4 °C; W: 77,7 °C) var rundt målsekvensens smeltetemperatur (77,5 °C). For prøve W var imidlertid det beregnede *tetM*-gen-kopiantallet (< 1 GU/5 µL) svært lav og ble tolket som falsk positiv. For prøve N derimot var det beregnede antallet (4 GU/5 µL) over den teoretisk lavest mulige antall genkopier (3 GU) og akkurat under deteksjonsgrensen (5 GU/5 µL). Dermed oppfyller prøve N kravene som ble satt for tolkning av positive resultater. Tatt i betraktning at utgangskonsentrasjonen til *Rahnella aquatilis* var 142,7 ng/µL (Tabell V5.4) er det likevel svært usannsynlig at kun fire genkopier ble amplifisert i analysen. Standardavviket for analysen er større ved lave konsentrasjoner og faren for falsk positive prøver øker. På denne bakgrunnen ble også prøve N tolket som falsk positiv.



Figur V18.6: *tetM* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V18.10: *tetM* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av isolatprøvene.

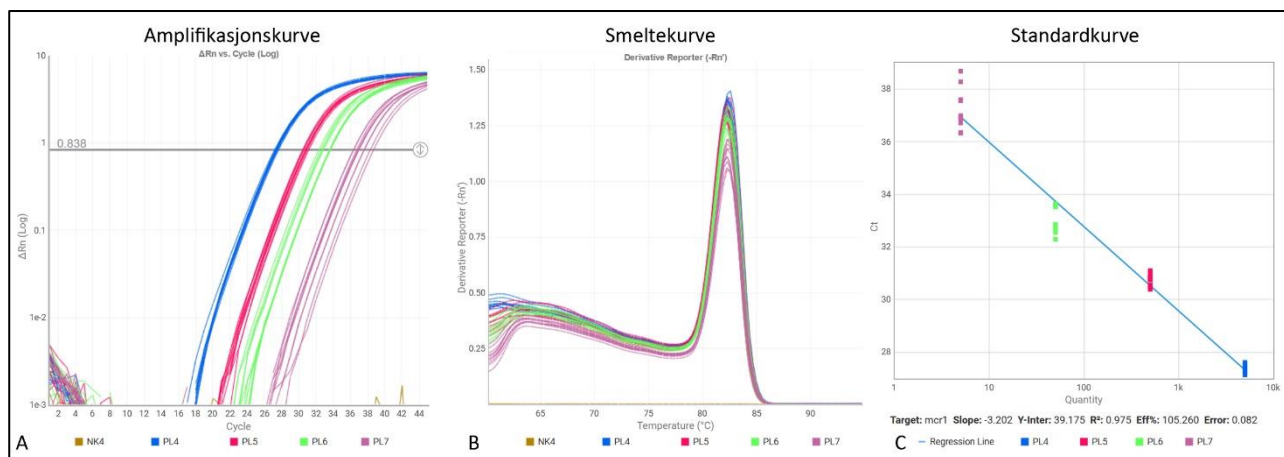
Prøve	C_q	kopier/5 μ L	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
A	Ubestemt	-	61,6	93,1	73,8
B	16,646	Ekskludert ¹	61,6	87,8	-
C	Ubestemt	-	61,6	92,7	78,4
D	Ubestemt	-	61,7	87,2	93,4
E	Ubestemt	-	61,6	84,2	92,9
F	Ubestemt	-	62,3	93,4	88,2
G	Ubestemt	-	69,0	61,7	-
H	Ubestemt	-	62,2	76,5	92,1
I	Ubestemt	-	61,4	85,4	80,6
J	Ubestemt	-	61,4	93,3	78,2
K	Ubestemt	-	92,9	61,1	82,3
L	43,674	0	78,7	-	-
M	41,938	0	71,5	-	-
N	34,907	4	77,4	-	-
O	Ubestemt	-	61,4	-	-
P	Ubestemt	-	62,3	84,4	87,8
Q	Ubestemt	-	61,4	93,1	-
R	Ubestemt	-	61,4	90,9	93,7
S	Ubestemt	-	61,6	87,0	92,7
T	Ubestemt	-	61,4	93,4	83,9
U	Ubestemt	-	61,6	84,5	-
V	Ubestemt	-	61,6	87,0	91,4
W	38,889	0	77,7	-	-
X	Ubestemt	-	61,6	88,7	93,3
Y	Ubestemt	-	89,9	61,3	-

¹ Ekskludert på grunn av avvikende amplifikasjonskurve og manglende smeltekurve

Vedlegg 19: Data fra *mcr-1* qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,838 og ble vurdert som akseptabel. Videre var de negative PCR-kontrollene til oppsettet negative.



Figur V19.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10 \times PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt *mcr-1*-ekvensen, samt negativ kontroll (4 \times NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V19.1: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 ($^{\circ}C$)	T_m 2 ($^{\circ}C$)	T_m 3 ($^{\circ}C$)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	93,0	62,2	73,8
	Ubestemt	61,7	83,6	87,3
	Ubestemt	92,6	61,4	87,6
	Ubestemt	61,6	92,6	73,9

Tabell V19.2: *mcr-1* qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperatur (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	27,335	27,368	0,136	82,3
		27,349			82,3
		27,248			82,3
		27,436			82,3
		27,269			82,4
		27,336			82,4
		27,150			82,4
		27,626			82,3
		27,503			82,3
		27,425			82,1
PL5	500	30,759	30,759	0,216	82,3
		30,773			82,3
		30,397			82,4
		30,980			82,3
		30,841			82,1
		30,502			82,3
		31,105			82,1
		30,827			82,1
		30,567			82,1
		30,843			82,3
PL6	50	33,527	33,201	0,528	82,3
		33,638			82,4
		33,619			82,3
		32,294			82,3
		33,638			82,3
		33,562			82,1
		32,866			82,3
		33,584			82,3
		32,725			82,4
		32,560			82,4
PL7	5	36,328	37,225	0,787	82,3
		38,676			82,3
		36,964			82,1
		36,867			82,3
		36,926			82,3
		36,346			82,3
		36,711			82,4
		37,598			82,4
		38,272			82,4
		37,558			82,3

Vedlegg 19.1: Data fra *mcr-1* qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,019 og ble vurdert som optimal.

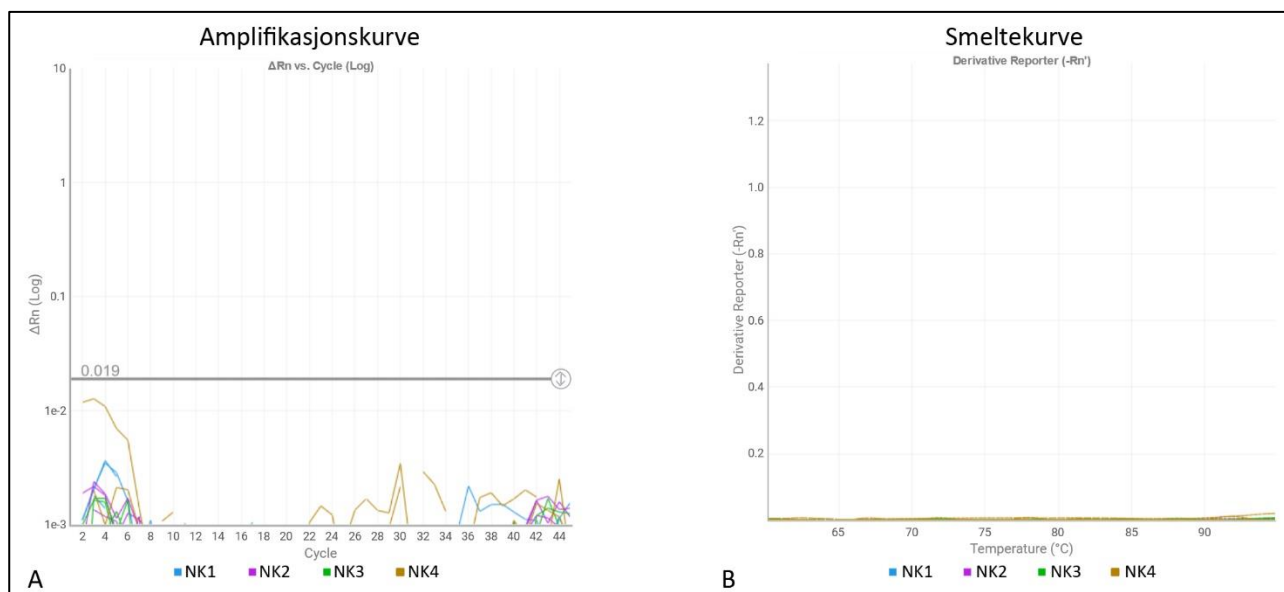
Tabell V19.3: Kvalitetsoppsummering fra *mcr-1* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	9	-	PL6 (3×), PL7 (2×)	9 (2×), 13 (2×)
Ingen amplifikasjon	41	-	PL7 (1×)	1-3 (2×), 4-5 (3×), 6-8 (2×), 9 (1×), 10-11 (3×), 12 (2×), 14-15 (2×), 16-18 (3×)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	45	-	PL7 (1×)	Minst én replika i alle prøver
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	64	NK1-3 (3×), NK4 (1×)	PL7 (2×)	Minst to replikaer i alle prøver

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

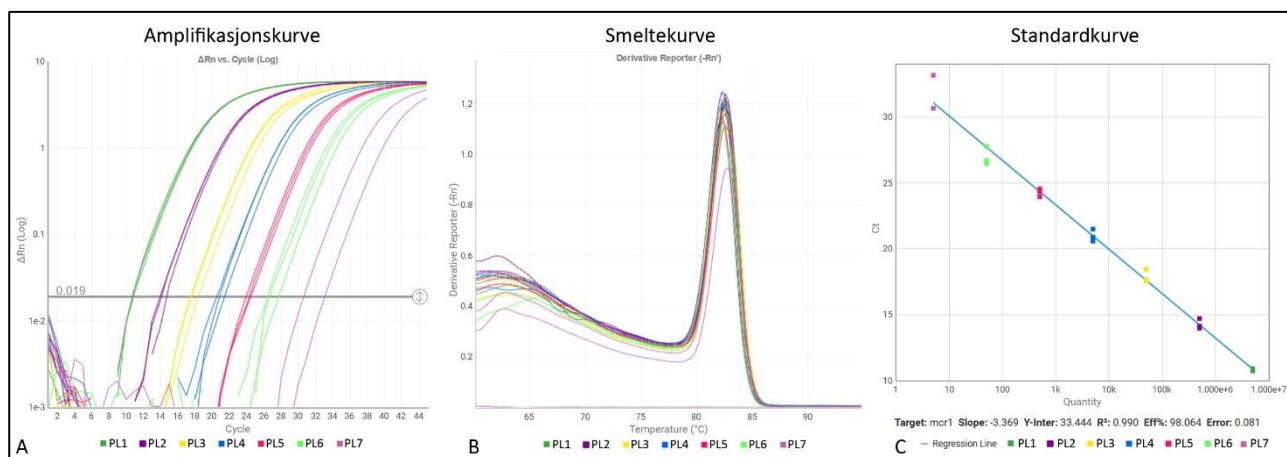


Figur V19.2: *mcr-1* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontroller (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V19.4: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	74,5	93,3	67,8
	Ubestemt	70,6	66,8	92,6
	Ubestemt	67,1	75,0	92,3
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	67,7	89,4	82,1
	Ubestemt	81,2	88,1	93,0
	Ubestemt	89,3	67,1	93,3
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	67,8	76,5	87,9
	Ubestemt	67,1	93,2	-
	Ubestemt	71,7	87,9	82,0
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	87,1	76,9	71,8
	Ubestemt	67,2	-	-
	Ubestemt	93,5	-	-

Standarder



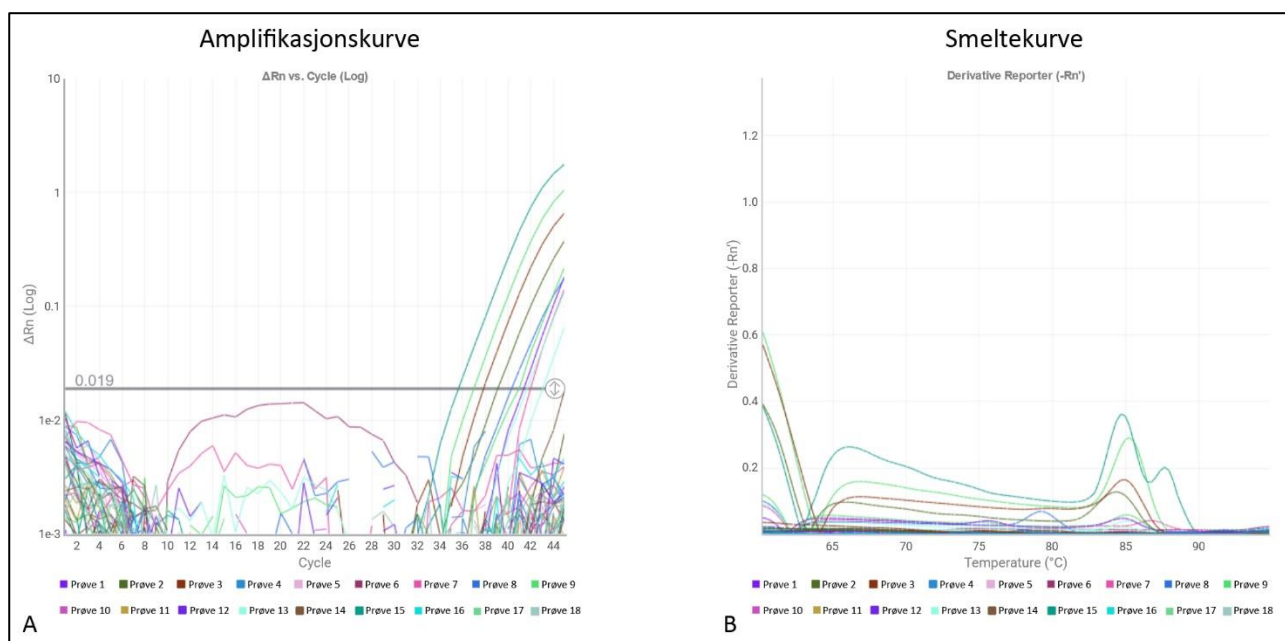
Figur V19.3: *mcr-1* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V19.5: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	10,914	10,808	0,093	82,6	-	-
	10,746			82,6	-	-
	10,763			82,6	-	-
PL2	14,315	14,460	0,228	82,6	-	-
	14,342			82,3	-	-
	14,723			82,3	-	-
PL3	17,700	18,033	0,490	82,7	-	-
	18,596			82,4	-	-
	17,803			82,6	-	-
PL4	20,731	21,082	0,473	82,6	-	-
	20,895			82,6	-	-
	21,620			82,3	-	-
PL5	24,197	24,454	0,241	82,6	-	-
	24,677			82,6	-	-
	24,487			82,6	-	-
PL6	26,565	27,018	0,661	82,6	-	-
	26,712			82,3	-	-
	27,776			82,3	-	-
PL7	33,271	31,978	1,829	82,7	66,6	-
	Ubestemt			68,6	87,8	93,0
	30,684			82,6	-	-

Vannprøver

Flere råvannsprøver krysset terskelen ved og etter syklus 35,750 (Figur V19.4-A), og prøver der bare én av tre replikaer fikk bestemt C_q -verdi ble tolket som falsk positiv (Tabell V19.6). Prøve 9 (råvann, 16.12.2021) og prøve 13 (råvann, 17.12.2021) hadde dannet utelukkende uspesifikke PCR-produkter der smeltetemperaturen avviket fra målsekvensens smeltetemperatur (82,5 °C, gjennomsnittlig T_{m1} til PL1-7 (bortsett fra negativ replika til PL7)). Dermed ble samtlige prøver som krysset terskelen tolket som falsk positive.



Figur V19.4: *mcr-1* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V19.6: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q og genkopiantall til replikaene.

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	kopier/5 μ L	Gjennomsnitt (kopier/5 μ L)	Standardavvik (kopier/5 μ L)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	41,533	Ekskl. ¹	-	0	-	-	84,8	65,9	75,6
	Ubestemt			-			65,4	87,5	-
	Ubestemt			-			65,7	77,1	88,1
2	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	75,1	65,3	61,3
	Ubestemt			-			65,1	71,8	81,5
	39,270			0			84,4	65,9	-

3	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	61,6	75,7	65,7
	37,886			0			84,8	67,1	-
	Ubestemt			-			61,1	75,0	78,4
4	Ubestemt	-	-	-	-	-	67,1	79,3	74,5
	Ubestemt			-			73,6	-	-
	Ubestemt			-			93,3	73,5	88,1
5	Ubestemt	-	-	-	-	-	66,9	73,6	84,7
	Ubestemt			-			66,6	75,7	79,9
	Ubestemt			-			67,4	78,4	75,4
6	Ubestemt	-	-	-	-	-	81,1	72,6	90,0
	Ubestemt			-			74,1	66,8	93,8
	Ubestemt			-			66,0	74,5	92,7
7	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	61,0	63,2	86,9
	Ubestemt			-			64,4	93,6	-
	42,029			0			86,8	71,7	-
8	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	61,4	93,5	78,7
	Ubestemt			-			66,6	78,0	61,1
	40,454			0			79,2	66,5	-
9	Ubestemt	39,112	2,751	-	0	0	65,0	84,7	-
	37,167			0			85,3	66,9	-
	41,057			0			85,1	65,1	-
10	Ubestemt	-	-	-	-	-	72,7	68,6	89,4
	Ubestemt			-			67,4	88,2	76,2
	Ubestemt			-			66,0	83,2	69,6
11	Ubestemt	-	-	-	-	-	71,0	76,6	65,0
	Ubestemt			-			73,8	79,3	87,9
	Ubestemt			-			72,1	87,9	82,3
12	Ubestemt	-	-	-	-	-	74,7	79,3	85,7
	Ubestemt			-			66,9	-	-
	Ubestemt			-			75,4	79,3	71,0
13	Ubestemt	42,378	0,887	-	0	0	65,9	61,1	87,3
	41,751			0			85,1	66,0	-
	43,005			0			65,7	84,8	-
14	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,0	88,4	77,5
	Ubestemt			-			62,9	81,1	-
	Ubestemt			-			65,0	84,7	79,4
15	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	61,1	86,9	63,3
	Ubestemt			-			61,3	87,8	-
	35,750			0			84,8	87,6	-
16	Ubestemt	-	-	-	-	-	66,6	75,0	90,5
	Ubestemt			-			66,8	77,8	92,4
	Ubestemt			-			93,3	67,7	75,4
17	Ubestemt	-	-	-	-	-	88,1	82,0	93,2
	Ubestemt			-			67,1	80,8	92,0
	Ubestemt			-			66,8	87,9	75,4
18	Ubestemt	-	-	-	-	-	81,4	72,4	77,5
	Ubestemt			-			67,2	77,5	74,2
	Ubestemt			-			88,7	65,9	74,2

¹ Ekskludert fra videre beregning siden kun én av tre replikaer krysset terskelen

Vedlegg 19.2: Data fra *mcr-1* qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,017 og ble vurdert som optimal.

Tabell V19.7: Kvalitetsoppsummering fra *mcr-1* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	6	-	PL4 (3×), PL7 (3×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	15	-	-	A, C, D, F-L, N, R, U, V, X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avvik i replikagruppen	2	-	PL2 (1×), PL7 (1×)	-
Ekspontiell algoritme feil	15	-	-	A, C, D, F-L, N, R, U, V, X
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	24	NK4 (2×)	PL7 (1×)	A, C, D, F-M, O, Q-Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

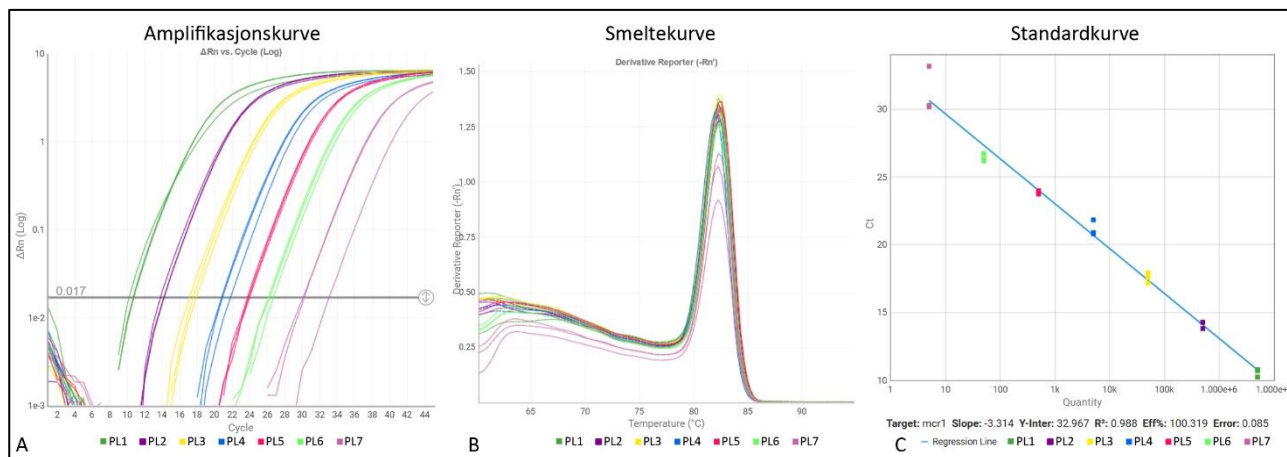
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V19.8: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	92,9	61,4	75,7
	Ubestemt	92,7	85,7	81,5

Standarder



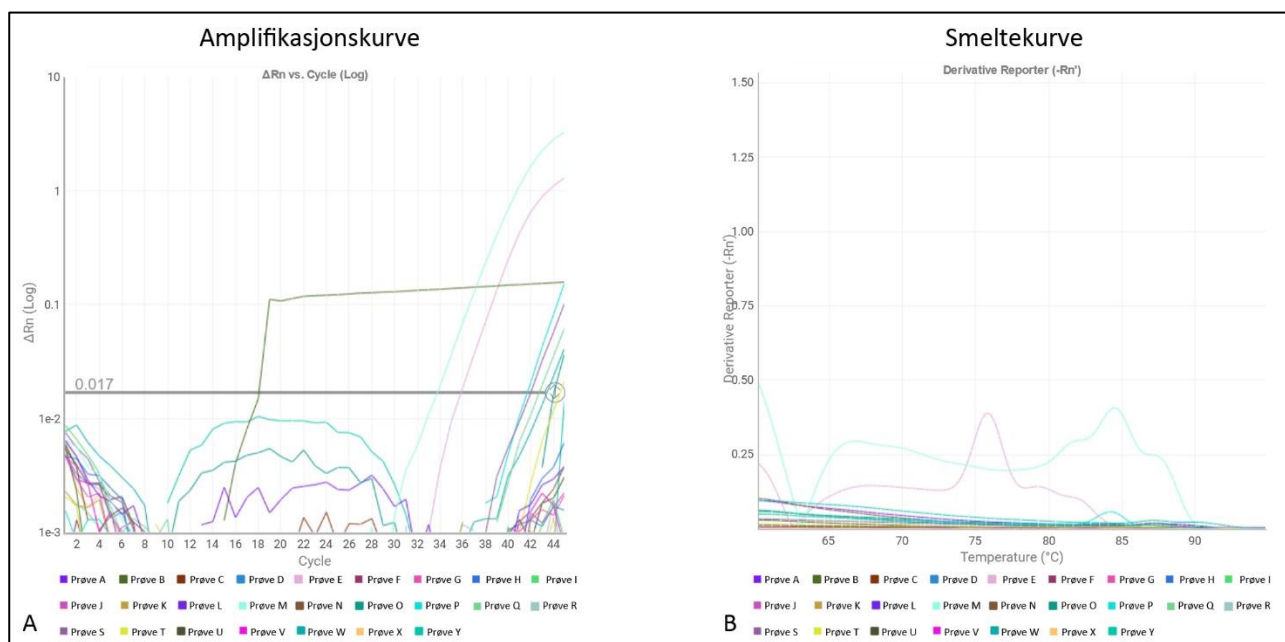
Figur V19.5: *mcr-1* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmidet i isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V19.9: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)
PL1	10,704	10,477	0,471	82,3	-
	10,791			82,3	-
	9,935			82,3	-
PL2	14,454	14,239	0,367	82,1	-
	13,816			82,3	-
	14,448			82,4	-
PL3	17,331	17,705	0,442	82,4	-
	17,592			82,3	-
	18,194			82,1	-
PL4	20,806	21,229	0,657	82,3	-
	20,895			82,1	-
	21,986			82,0	-
PL5	23,740	23,983	0,229	82,3	-
	24,012			82,4	-
	24,196			82,4	-
PL6	26,728	26,494	0,216	82,4	-
	26,449			82,3	-
	26,304			82,3	-
PL7	33,263	31,313	1,689	82,3	67,8
	30,378			82,3	-
	30,299			82,3	-

Isolatprøvene

9 av 25 isolatprøver krysset terskelen (Figur V19.6). Prøve B (*Aeromonas encheleia*) ble ekskludert på grunn av avvikende amplifikasjonskurve og manglende smeltekurve. Syv prøver hadde dannet utelukkende uspesifikke PCR-produkter og ble tolket som falsk positiv. Prøve M (*Paenibacillus macerans*) hadde dannet både uspesifikke (TM: 84,5 °C; 68,0 °C) og spesifikke (TM: 82,1 °C) PCR-produkter (Tabell V19.10). Deteksjonsgrensen til analysen ble bestemt til 5 GU/5 µL (Tabell V19.2), og siden det beregnete gen-kopiantallet til prøve M (1 GU/5 µL) var basert på både uspesifikke og spesifikke produkter, tolkes prøven som falsk positiv.



Figur V19.6: *mcr-1* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V19.10: *mcr-1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av isolatprøvene.

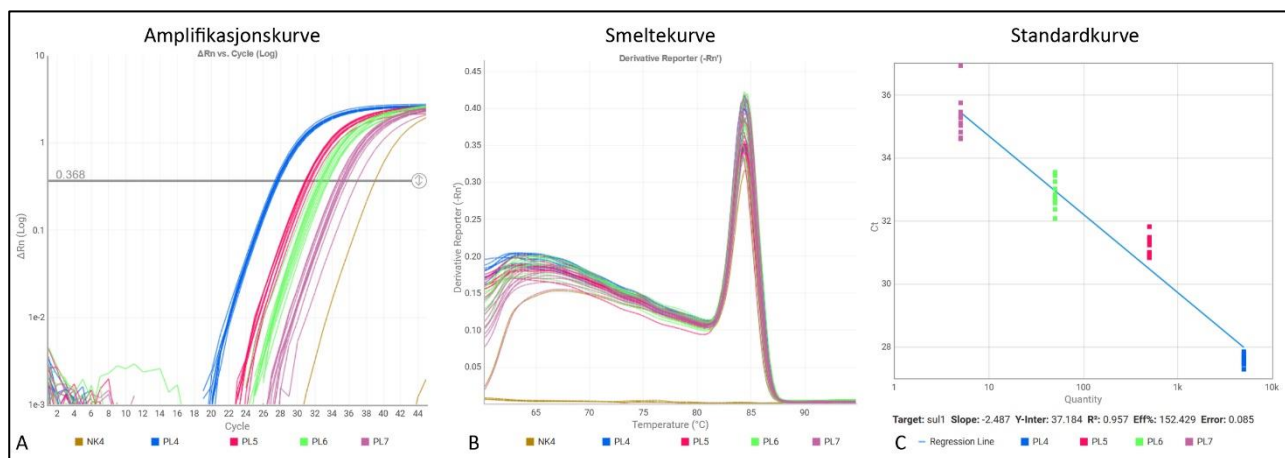
Prøve	C_q	kopier/5 μ L	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)	T_m 3 ($^{\circ}$ C)
A	Ubestemt	-	61,6	87,9	-
B	17,299	Ekskludert ¹	61,6	-	-
C	Ubestemt	-	93,4	61,6	84,7
D	Ubestemt	-	61,4	75,4	92,9
E	35,972	0	75,9	-	-
F	Ubestemt	-	81,7	64,2	92,4
G	Ubestemt	-	61,4	93,0	84,2
H	Ubestemt	-	77,8	93,2	87,5
I	Ubestemt	-	93,0	61,6	80,9
J	Ubestemt	-	61,6	92,7	88,1
K	Ubestemt	-	84,7	78,0	63,6
L	Ubestemt	-	92,6	61,4	82,1
M	33,939	1	84,5	82,1	68,0
N	Ubestemt	-	61,4	-	-
O	44,049	0	61,4	87,2	83,5
P	41,734	0	84,2	-	-
Q	42,715	0	87,3	61,4	93,3
R	Ubestemt	-	92,4	61,3	88,1
S	42,062	0	87,2	61,4	-
T	44,467	0	87,0	61,4	83,8
U	Ubestemt	-	61,6	88,2	93,6
V	Ubestemt	-	61,6	83,8	92,1
W	43,210	0	61,6	83,8	86,6
X	Ubestemt	-	61,9	93,0	84,5
Y	Ubestemt	-	87,2	61,6	-

¹ Ekskludert på grunn av avvikende amplifikasjonskurve og manglende smeltekurve

Vedlegg 20: Data fra *sul1* qPCR analysen

Metodens analytiske sensitivitet

Syklus terskelen for oppsettet til å bestemme deteksjonsgrensen, ble satt automatisk til 0,368 og ble vurdert som akseptabel. Én av fire replikaer av den negative PCR-kontrollen (NK4) krysset terskelen ved syklus 38,960 (Figur V20.1-A), og smeltetemperaturen til replikaen (84,5 °C) var likt med målsekvens smeltetemperatur (84,4 °C). Det mistenkes pipetteringsfeil eller kontaminering under pipettering, men siden tre replikaer av den negative kontrollen var negativ ble oppsettet godkjent.



Figur V20.1: Amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (10× PL4-PL7) av plasmiden med tilsatt *sul1* målsekvensen, samt negativ kontroll (4× NK4). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V20.1: *sul1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de fire reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til oppsettet for å bestemme deteksjonsgrense.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	38,960	84,5	68,4	-
	Ubestemt	74,4	61,4	83,6
	Ubestemt	61,4	92,6	84,7
	Ubestemt	76,0	61,6	93,0

Tabell V20.2: *su1* qPCR kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til 10 replika av standardene (PL4-PL7), samt gjennomsnitt og standardavvik (SD) av C_q .

Standard	GU/5 μ L	C_q	Gjennomsnitt C_q	SD C_q	T_m 1 ($^{\circ}$ C)	T_m 2 ($^{\circ}$ C)
PL4	5 000	27,541	27,579	0,164	84,5	-
		27,453			84,4	66,3
		27,514			84,4	-
		27,453			84,4	67,5
		27,302			84,7	-
		27,627			84,5	-
		27,675			84,4	-
		27,770			84,4	-
		27,593			84,4	67,1
		27,861			84,2	67,2
PL5	500	30,881	31,145	0,328	84,4	-
		30,833			84,4	-
		30,960			84,4	-
		31,012			84,4	67,1
		30,869			84,4	-
		31,364			84,2	-
		31,483			84,2	-
		30,973			84,2	-
		31,247			84,4	-
		31,832			84,1	-
PL6	50	32,849	32,855	0,470	84,5	67,8
		32,760			84,5	67,8
		32,620			84,4	-
		32,568			84,4	-
		33,032			84,4	-
		33,259			84,2	-
		33,547			84,1	-
		32,095			84,4	-
		32,367			84,4	68,1
		33,451			84,7	-
PL7	5	35,323	35,301	0,680	84,5	-
		34,610			84,4	-
		36,943			84,4	-
		34,833			84,2	-
		35,467			84,4	-
		35,280			84,4	-
		35,038			84,5	68,0
		35,120			84,5	-
		35,752			84,5	67,7
		34,642			84,5	-

Vedlegg 20.1: Data fra *su1* qPCR analysen - vannprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,030 og ble vurdert som optimal.

Tabell V20.3: Kvalitetsoppsummering fra *su1* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og vannprøver som ble satt opp i tre replikaer.

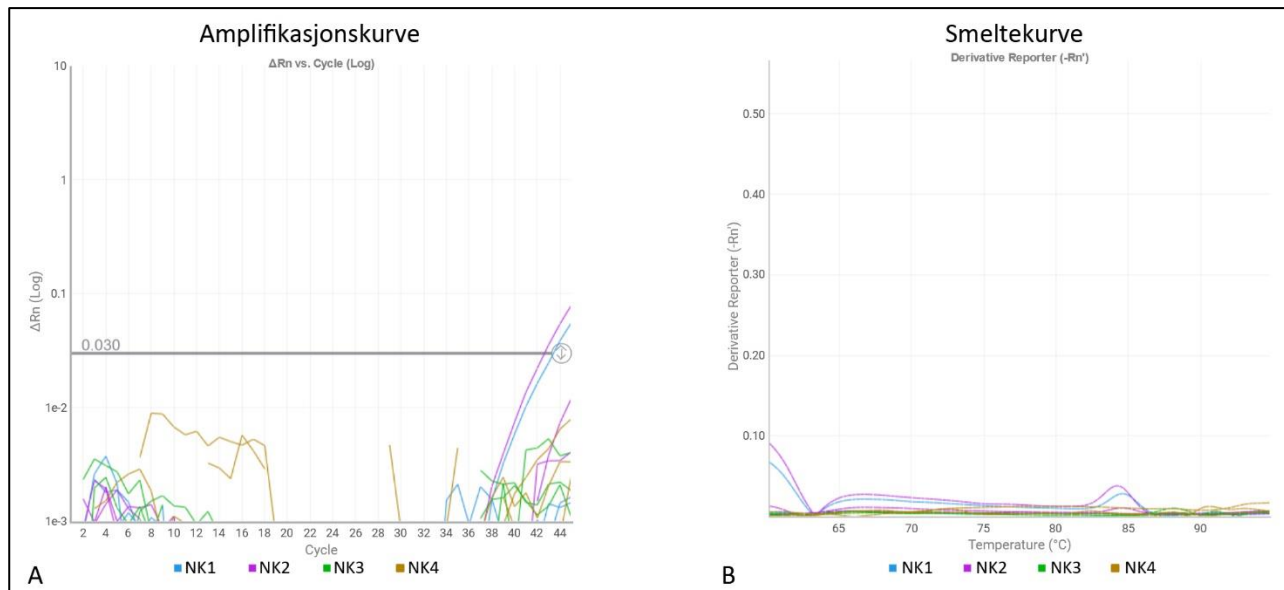
	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	27	-	PL4 (3x)	1-3 (3x), 7-8 (2x), 11 (2x), 13-15 (3x),
Ingen amplifikasjon	23	-	PL1 (1x)	4 (2x), 5-6 (3x), 7 (1x), 9 (1x), 10 (3x), 11 (1x), 12 (2x), 16-18 (2x)
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Ekspontiell algoritme feil	25	-	PL7 (1x)	4 (2x), 5-6 (3x), 7 (1x), 9 (1x), 10 (3x), 11 (1x), 12 (2x), 16 (3x), 17-18 (2x)
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	78	Minst én replika i alle prøver		

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

Negativ kontroll

Én av tre replikaer til NK1 og NK2 krysset terskelen og ble tolket som falsk positiv.

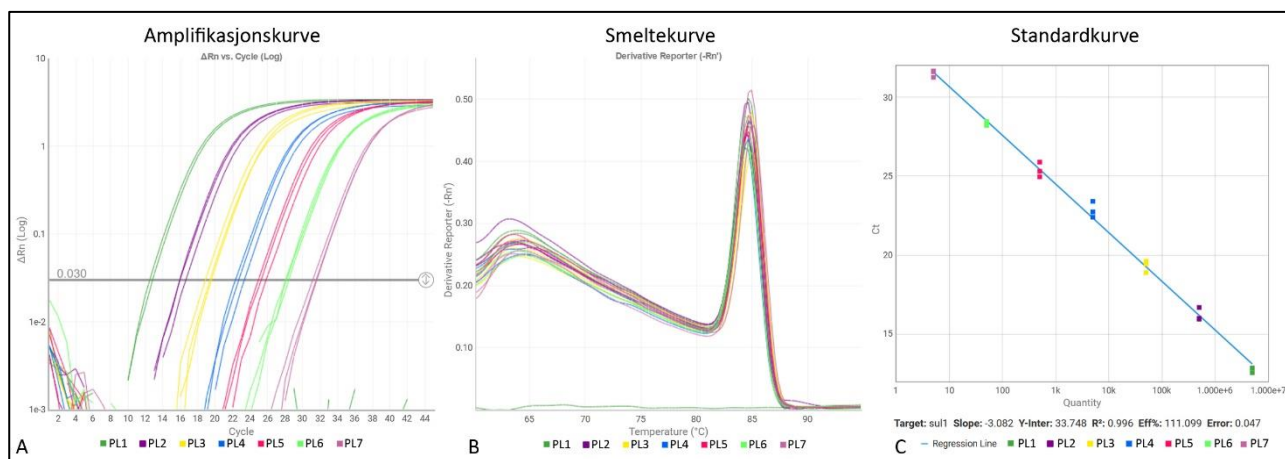


Figur V20.2: *su1* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurven til fire negative kontrollere (tre replikaer) til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V20.4: *su1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av de negative kontrollene (inkl. replikaene) til vannprøvenes oppsett.

Kontroll	C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
NK1 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	43,367	84,7	66,8	-
	Ubestemt	66,3	93,3	-
	Ubestemt	65,7	93,3	61,1
NK2 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,8	84,5	-
	42,611	84,2	66,8	-
	Ubestemt	65,6	71,8	93,3
NK3 (autoklavert, filtrert, DNA ekstrahert sterilt vann)	Ubestemt	66,0	87,9	93,5
	Ubestemt	65,9	93,2	70,2
	Ubestemt	88,1	67,1	93,5
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	67,1	93,0	87,9
	Ubestemt	67,8	61,4	72,3
	Ubestemt	93,3	78,8	-

Standarder



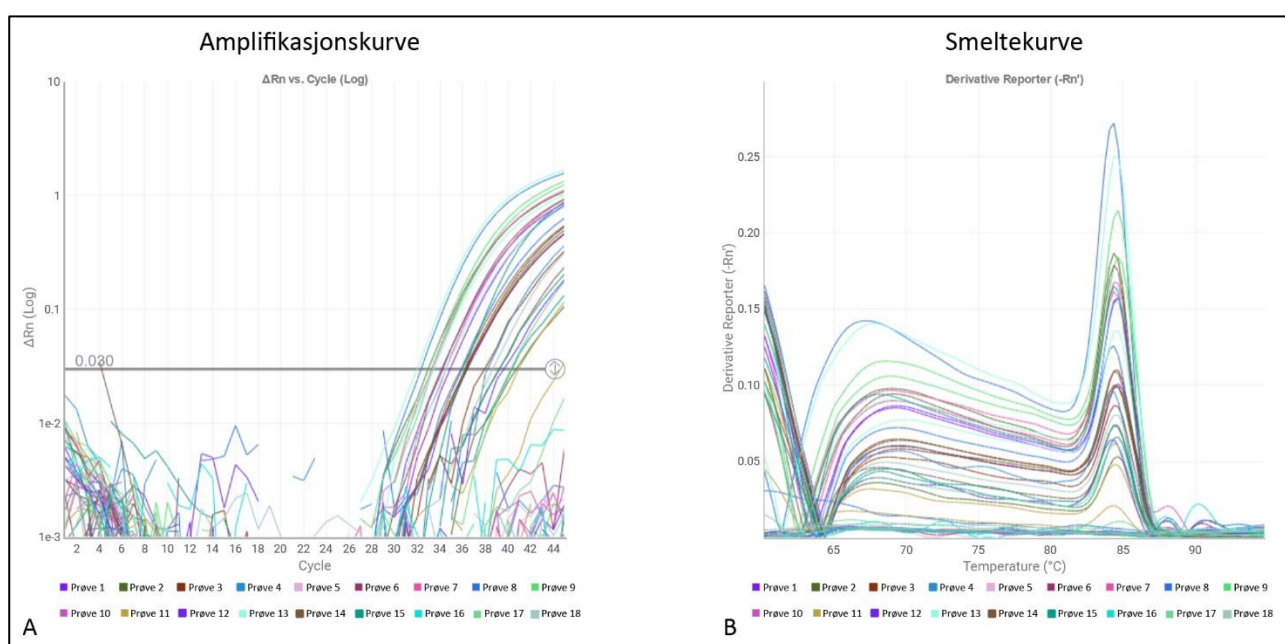
Figur V20.3: *sul1* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmiden til vannprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V20.5: *sul1* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q) og smeltetemperaturer (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i vannprøver-oppsett), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
PL1	Ubestemt	12,765	0,304	83,6	65,6	68,0
	12,551			84,8	65,6	-
	12,980			84,7	66,3	-
PL2	16,684	16,266	0,380	84,5	65,7	-
	15,940			84,5	-	-
	16,175			84,5	67,2	-
PL3	19,439	19,344	0,323	85,0	66,6	-
	19,609			84,8	65,9	-
	18,985			85,0	66,2	-
PL4	22,402	22,876	0,505	84,8	66,2	-
	22,818			84,7	65,6	-
	23,408			84,5	65,7	-
PL5	25,366	25,442	0,471	84,8	-	-
	25,014			84,7	66,0	-
	25,946			84,8	-	-
PL6	28,467	28,317	0,135	84,5	-	-
	28,207			84,5	66,3	-
	28,278			84,5	66,5	-
PL7	31,607	31,549	0,212	85,1	66,3	-
	31,315			84,7	67,1	-
	31,726			84,8	66,3	-

Vannprøver

Både rå- og drikkevannsprøver krysset terskelen ved og etter syklus 32,108 (Figur V20.4-A), og prøver der bare én av tre replikaer fikk bestemt C_q -verdi ble tolket som falsk positiv (Tabell V20.6). Samtlige prøver der to eller tre replikaer krysset terskelen hadde dannet spesifikke PCR-produkter. Dette var alle trippelprøvene som var tatt fra råvannet på alle tre dager og én av tre drikkevannsprøver som ble tatt den 16.12.2021 (prøve 11). Videre hadde alle prøver multiple toppler og selv om både uspesifikke og spesifikke PCR-produkter inngår i beregningen av gen-kopiantallet var den svært lav (0-3 GU/5 μ L). Det lavest teoretisk mulige kopiantallet er 3 GU og siden kun én av samtlige replikaer oppnådde denne, ble alle prøvene tolket som falsk positive.



Figur V20.4: *sul1* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 18 vannprøver (inkl. tre replikaer). Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V20.6: *sul1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av vannprøvene, samt gjennomsnitt og standardavvik av C_q og genkopianteall til replikaene.

Prøve	C_q	Gjennomsnitt C_q	Standardavvik C_q	kopier/5 μ L	Gjennomsnitt (kopier/5 μ L)	Standardavvik (kopier/5 μ L)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)	T_m 3 (°C)
1	34,255	35,243	1,151	1	0	0	84,5	69,3	-
	36,507			0			84,7	70,6	-
	34,968			0			84,5	69,8	-

2	40,844	36,804	3,901	0	1	1	84,7	68,3	-
	33,059			2			84,4	-	-
	36,508			0			84,5	69,4	-
3	36,481	36,961	0,994	0	0	0	84,5	69,2	-
	36,298			0			84,5	69,2	-
	38,105			0			84,5	-	-
4	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	66,2	93,6	90,5
	38,289			0			84,2	69,7	75,4
	Ubestemt			-			68,6	93,2	-
5	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,4	61,7	87,8
	Ubestemt			-			65,6	76,2	89,7
	Ubestemt			-			76,3	89,3	65,0
6	Ubestemt	-	-	-	-	-	92,3	65,3	86,4
	Ubestemt			-			65,7	91,8	75,0
	Ubestemt			-			65,3	-	-
7	33,292	33,948	0,928	1	1	1	84,5	69,5	-
	Ubestemt			-			66,2	93,6	87,8
	34,605			1			84,4	69,2	-
8	32,358	34,129	2,504	3	2	2	84,2	67,5	-
	Ubestemt			-			61,4	90,5	82,0
	35,899			0			84,4	69,9	-
9	33,451	33,263	0,265	1	1	0	84,7	68,9	-
	33,076			2			84,7	69,4	-
	Ubestemt			-			65,0	72,4	87,9
10	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,3	93,3	86,9
	Ubestemt			-			65,1	87,9	91,7
	Ubestemt			-			65,1	79,4	93,2
11	Ubestemt	42,778	2,434	-	0	0	65,1	87,9	93,3
	44,499			0			84,4	66,0	-
	41,056			0			84,5	67,4	-
12	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	90,8	65,6	81,1
	39,953			0			84,2	68,0	-
	Ubestemt			-			61,2	66,2	76,9
13	33,532	33,429	1,272	1	2	2	84,7	69,0	-
	32,108			3			84,5	67,5	-
	34,646			1			84,5	70,2	-
14	34,293	36,584	2,619	1	0	0	84,4	69,8	-
	39,439			0			84,5	68,0	-
	36,019			0			84,5	69,4	-
15	40,449	38,659	2,184	0	0	0	84,5	68,3	-
	36,225			0			84,4	68,3	-
	39,304			0			84,5	-	-
16	Ubestemt	-	-	-	-	-	65,6	85,0	90,9
	Ubestemt			-			90,0	72,6	79,1
	Ubestemt			-			66,8	77,1	93,2
17	Ubestemt	Ekskl. ¹	-	-	-	-	66,8	-	-
	Ubestemt			-			84,7	66,0	89,9
	40,279			0			84,4	68,3	-
18	38,757	Ekskl. ¹	-	0	-	-	84,5	68,3	-
	Ubestemt			-			69,9	93,3	90,5
	Ubestemt			-			64,5	88,7	83,8

¹ Ekskludert fra videre beregning siden kun én av tre replikaer krysset terskelen

Vedlegg 20.2: Data fra *su1* qPCR analysen - isolatprøver

Analyseinnstilling og kvalitets oppsummering

Syklus terskelen for oppsettet ble satt automatisk til 0,016 og ble vurdert som optimal.

Tabell V20.7: Kvalitetsoppsummering fra *su1* qPCR analysen som inkluderer negative kontroller, standarder og isolatprøver. Standarder ble satt opp i tre og kontrollen i to replikaer.

	Frekvens	Kontroll	Standard	Prøve
Amplifikasjon i negativ kontroll	0	-	-	-
Dårlig passiv referanse signal (ROX)	0	-	-	-
Fluorescens er «offscale»	0	-	-	-
Stor standardavvik i replikaene	3	-	PL6 (3×)	-
Ingen amplifikasjon i prøvene	17	-	-	A, C-L, N, P-R, V, X
Ingen signal i brønn	0	-	-	-
Avviker i replikagruppen	0	-	-	-
Eksponentiell algoritme feil	17	-	-	A, C-L, N, P-R, V, X
Baseline algoritme feil	0	-	-	-
C _q ¹ algoritme feil	0	-	-	-
Multiple T _m ² topper	37	NK4 (2×)	PL2-3 (2×), PL4 (3×), PL5-7 (2×)	A, B, D-K, M-R, T-Y

¹ C_q: Kvantifiseringssyklus

² T_m: Smeltetemperatur

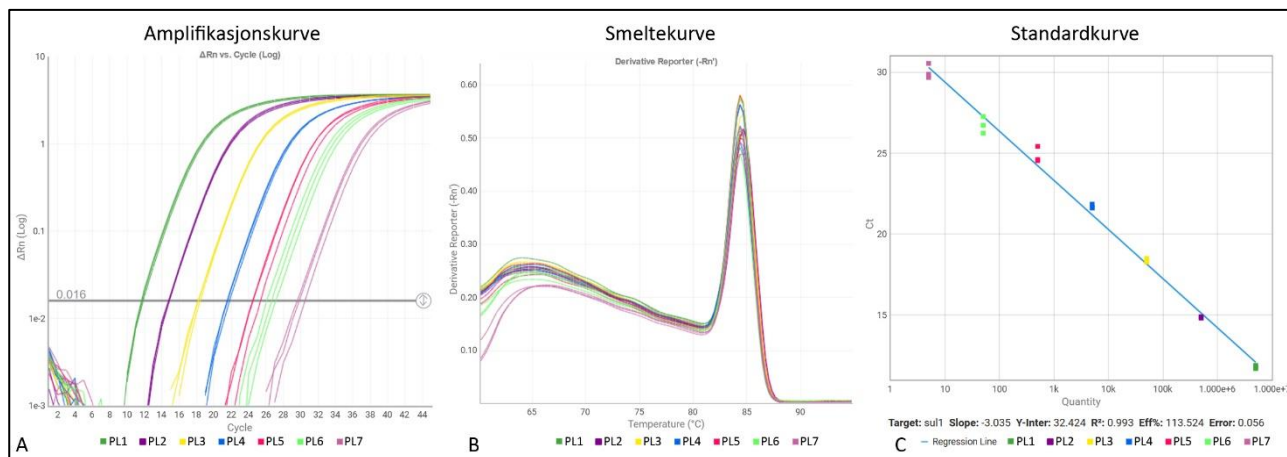
Negativ kontroll

Den negative kontrollen (to replikaer) til oppsettet var negative.

Tabell V20.8: *su1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til de to reaksjonene av den negative PCR-kontrollen (NK4) til isolatprøvenes oppsett.

Kontroll	C _q	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
NK4 (Tris-EDTA buffer)	Ubestemt	61,4	93,5	-
	Ubestemt	61,4	93,3	88,5

Standarder



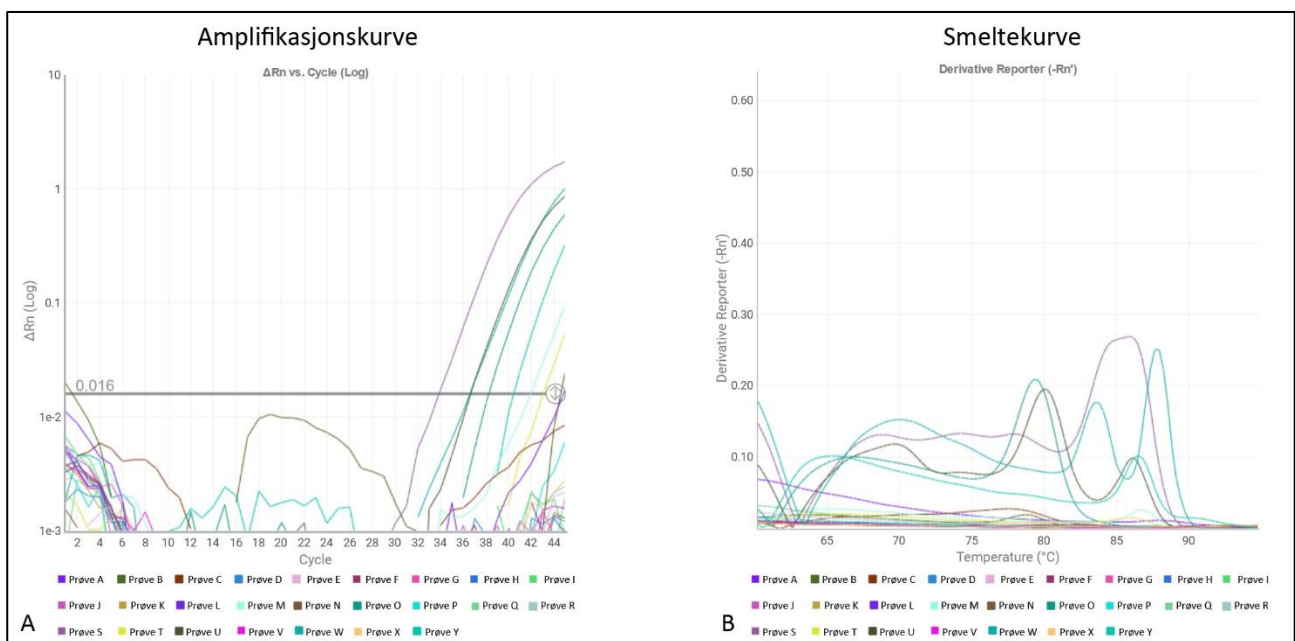
Figur V20.5: *sul1* qPCR analysens amplifikasjons-, smelte- og standardkurve til fortynningsrekken (3× PL1-PL7) av plasmidet i isolatprøvenes oppsett. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V20.9: *sul1* qPCR analysens kvantifiseringssyklus (C_q) og smeltetemperaturene (T_m) til alle reaksjonene av standardene (i isolatprøver-oppsettet), samt gjennomsnittet og standardavvik til C_q til replikaene.

Standard	C_q	gjennomsnitt C_q	standard avvik C_q	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)
PL1	11,728	11,818	0,100	84,5	-
	11,800			84,4	-
	11,925			84,4	-
PL2	15,203	15,191	0,034	84,4	-
	15,218			84,5	68,6
	15,152			84,7	67,5
PL3	18,472	18,488	0,037	84,5	-
	18,463			84,5	67,7
	18,530			84,4	67,8
PL4	21,649	21,737	0,131	84,4	67,1
	21,672			84,4	67,4
	21,888			84,4	66,9
PL5	24,574	24,892	0,489	84,5	67,4
	24,646			84,7	68,1
	25,455			84,4	-
PL6	27,395	26,842	0,520	84,4	67,8
	26,365			84,5	-
	26,765			84,4	68,0
PL7	30,129	30,187	0,372	84,5	68,7
	30,586			84,4	69,5
	29,848			84,5	-

Isolatprøvene

8 av 25 isolatprøver krysset terskelen (Figur V20.6), men ingen av prøvene hadde dannet spesifikke PCR-produkter. Prøve W (*Serratia fonticola*) hadde multiple topper der én hadde en smelte-temperatur (83,6 °C) nærme smeltetemperaturen til målsekvensen 84,4 °C (gjennomsnitt av TM 1 til PL1-7). Siden det beregnete gen-kopiantallet til prøve W var svært lav (< 1 GU/5 µL), samtidig som det var basert på både uspesifikke og spesifikke produkter, ble også denne prøven tolket som falsk positiv.



Figur V20.6: *su1* qPCR analysens amplifikasjons- og smeltekurve til 25 isolatprøver. Figurene fra analysen ble generert i Thermo Fisher Cloud (Standard Curve Analysis Software, v4.0) og modifisert av Melanie Schreier.

Tabell V20.10: *sul1* qPCR analysens kvantifiseringscyklus (C_q), antall genkopier og smelte-temperaturene (T_m) til alle reaksjonene av isolatprøvene.

Prøve	C _q	kopier/5 µL	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	T _m 3 (°C)
A	Ubestemt	-	61,7	87,8	-
B	44,537	0	78,7	63,6	-
C	Ubestemt	-	77,5	-	-
D	Ubestemt	-	61,6	75,0	93,0
E	Ubestemt	-	61,4	79,7	93,0
F	Ubestemt	-	61,6	77,7	90,0
G	Ubestemt	-	61,6	93,0	-
H	Ubestemt	-	61,6	77,8	92,3
I	Ubestemt	-	61,4	92,7	-
J	Ubestemt	-	61,6	93,0	89,1
K	Ubestemt	-	61,4	92,7	88,8
L	Ubestemt	-	61,6	-	-
M	42,092	0	86,7	66,3	-
N	Ubestemt	-	61,6	90,0	-
O	38,404	0	79,4	68,3	-
P	Ubestemt	-	61,4	86,9	92,3
Q	Ubestemt	-	61,6	93,3	-
R	Ubestemt	-	61,4	92,4	88,2
S	34,145	0	85,9	-	-
T	43,021	0	65,7	85,9	-
U	36,720	0	80,0	86,1	69,9
V	Ubestemt	-	61,4	92,7	76,5
W	36,801	0	87,8	83,6	69,8
X	Ubestemt	-	92,7	77,4	88,1
Y	40,567	0	65,6	86,4	-

Vedlegg 21: Primer- og adaptersekvenser som ble brukt ved sekvensering

Tabell V21.1: Forward (F) og revers (R) primer- og adaptersekvenser som ble brukt for sekvensering av 16S-23S rRNA region.

	Primernavn	Primersekvens (5'-3')	Referanse
Primer og adapter brukt ved PCR-1			
16S-23S rRNA primer, UMI-sekvens ¹ og primer	lu_16S_8F_v7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT NNNYRNNNYRNNNYRNNN AGRGTTYGATYMTGGCTCAG	Karst et al., 2021
	lu_23S_2490R_v	AATGATACGGCGACCACCGAGATC NNNYRNNNYRNNNYRNNN CGACATCGAGGTGCCAAAC	Karst et al., 2021
Bibliotekamplifisering og strekkoder brukt ved PCR-2			
PCR strekkoder med primer	F1 (lu_pcr_i1_fw_v7)	ACGAGACTGATT CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	Karst et al., 2021
	F2 (lu_pcr_i2_fw_v7)	GCTGTACGGATT CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	Karst et al., 2021
	F3 (lu_pcr_i3_fw_v7)	ATCACCAGGTGT CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	Karst et al., 2021
	F4 (lu_pcr_i4_fw_v7)	TGGTCAACGATA CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	Karst et al., 2021
	F5 (lu_pcr_i5_fw_v7)	ATCGCACAGTAA CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	Karst et al., 2021
	R1 (lu_pcr_i1_rv_v7)	TACAGCGCATAC AATGATACGGCGACCACCGAGATC	Karst et al., 2021
	R2 (lu_pcr_i2_rv_v7)	ACCGGTATGTAC AATGATACGGCGACCACCGAGATC	Karst et al., 2021
	R3 (lu_pcr_i3_rv_v7)	AATTGTGTCCGA AATGATACGGCGACCACCGAGATC	Karst et al., 2021
	R4 (lu_pcr_i4_rv_v7)	TGCATACACTGG AATGATACGGCGACCACCGAGATC	Karst et al., 2021
	R5 (lu_pcr_i5_rv_v7)	AGTCGAACGAGG AATGATACGGCGACCACCGAGATC	Karst et al., 2021

¹UMI: Unik molekylær identifikator

Referanser

Karst, S. M., Ziels, R. M., Kirkegaard, R. H., Sørensen, E. A., McDonald, D., Zhu, Q., Knight, R. & Albertsen, M. (2021). High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nature Methods*, 18, 165–169.

<https://doi.org/10.1038/s41592-020-01041-y>

Vedlegg 22: Forberedelse til sekvensering (inkludert gelelektroforese)

Oppkonsentrering av drikkevannsprøvene

Det ble fulgt en prosedyre som var oppgitt i DNeasy PowerWater Kit Handbook.

Beregninger:

Tillaging av en 3 M NaCl-løsning:

$$V_1 = x \text{ mL NaCl}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL NaCl}$$

$$C_1 = 5 \text{ M NaCl}$$

$$C_2 = 3 \text{ M NaCl}$$

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$x \text{ mL NaCl} \times 5 \text{ M NaCl} = 10 \text{ mL NaCl} \times 3 \text{ M NaCl}$$

$$x = (10 \text{ mL NaCl} \times 3 \text{ M NaCl}) / 5 \text{ M NaCl} = 6 \text{ mL NaCl}$$

Volumberegninger:

$$100 \text{ } \mu\text{L eluert DNA} = 5 \text{ } \mu\text{L 3 M NaCl (QIAGEN, 2020)}$$

$$150 \text{ } \mu\text{L eluert DNA} = x$$

$$x = (150 \text{ } \mu\text{L DNA} \times 5 \text{ } \mu\text{L 3 M NaCl}) / 100 \text{ } \mu\text{L DNA} = 7,5 \text{ } \mu\text{L 3 M NaCl}$$

$$100 \text{ } \mu\text{L eluert DNA} = 200 \text{ } \mu\text{L 100 \% etanol (QIAGEN, 2020)}$$

$$150 \text{ } \mu\text{L eluert DNA} = x$$

$$x = (150 \text{ } \mu\text{L DNA} \times 200 \text{ } \mu\text{L 100\% etanol}) / 100 \text{ } \mu\text{L DNA} = 300 \text{ } \mu\text{L 100 \% etanol}$$

Utførelse:

6 mL 5 M NaCl (LOT 200203, G-Biosciences, USA) ble blandet med 4 mL sterilt vann ((nyåpnet flaske) Fresenius Kabi AG, Tyskland) for å oppnå 3 M NaCl. 7,5 μ L 3 M NaCl ble tilsatt til hvert av de 3 rør som inneholdt 150 μ L av drikkevannsprøvene (15., 16. og 17.12.2021) og vendt forsiktig 3-5 ganger. Deretter ble det tilsatt 300 μ L 100 % kald etanol (antibac, Norge) og vendt 3-5 ganger for å blande. Videre ble prøvene sentrifugert ved 10 000 \times g i 5 minutter ved rom-temperatur. Supernatanten ble fjernet og prøven lufttørket for at gjenværende etanol fordampet. Utfelt DNA ble resuspendert i 30 μ L 10 mM Tris (Elution Buffer, LOT 169037831, QIAGEN, Tyskland).

Primere

Alle primere ble levert av Merck der opplysningene fra produsenten om de ulike primerne er gitt i tabell V22.1. Primerne ble levert med en konsentrasjon på 100 µM oligonukleotid i buffer. Det ble laget en primerbruksløsning som hadde en sluttkonsentrasjon på 10 µM oligonukleotid (100 µL av levert primerløsningen ble blandet med 900 µL Tris-EDTA buffer (LOT SLCJ4389, Sigma, Tyskland)).

Tabell V22.1: Opplysningene om forward (F) og revers (R) primerne fått av produsenten Merck som ble brukt for sekvensering. Opplysningene inkluderer mengde, optisk tetthet, molekylær vekt og smeltetemperatur.

Primer	Mengde (nmol)	Optisk tetthet	Dalton (g/M)	Smeltetemperatur (°C)
lu_16S_8F_v7	24,4	14,76	19 220	79,4
lu_23S_2490R_v	26,5	15,64	18 786	86,9
lu_pcr_i1_fw_v7	42,8	15,96	11 160	78,6
lu_pcr_i2_fw_v7	43,9	14,04	11 167	79,6
lu_pcr_i3_fw_v7	26,9	9,9	11 136	80,5
lu_pcr_i4_fw_v7	18,1	6,7	11 160	79,5
lu_pcr_i5_fw_v7	29,5	11	11 129	78,8
lu_pcr_i1_rv_v7	20,7	7,4	11 032	82,4
lu_pcr_i2_rv_v7	37,8	13,5	11 063	80,9
lu_pcr_i3_rv_v7	44,1	15,8	11 118	82,3
lu_pcr_i4_rv_v7	44,2	15,6	11 063	82,8
lu_pcr_i5_rv_v7	43,2	15,8	11 137	83,3

Primer-/strekkodekombinasjon til prøvene

Tabell V22.2: Primer kombinasjon til prøvene til PCR-2 før sekvensering.

Vannprøver							
Prøve	1/2/3	7/8/9	13/14/15	4/5/6	10/11/12	16/17/18	
Forward primer	F1	F2	F3	F4	F5	F2	
Revers primer	R1	R2	R3	R4	R5	R1	
Isolatprøver							
Prøve	H	I	P	Q	R	T	V
Forward primer	F3	F4	F5	F1	F3	F4	F5
Revers primer	R1	R1	R1	R2	R2	R2	R2
Kontroller							
Prøve	NK1/NK2/NK3	NK5					
Forward primer	F1	F2					
Revers primer	R3	R3					

Prosedyre til rensing av prøvene med AMPure XP etter PCR

For rensing av prøvene ble det brukt en prosedyre fra Universitetet i Sørøst-Norge som var følgende:

1. Overfør prøven til et nytt 1,5 mL eppendorfrør.
2. Vortex røret med AMPure XP
3. Tilsett 30 μ L AMPure til hver prøve og bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.
4. La prøven stå 5 minutter i romtemperatur.
5. Spinn prøven ned (bare noen sekunder) og sett den på magnetstativ.
6. Vent til AMPure-kulene har festet seg på magneten og fjern forsiktig supernatanten.
7. La røret være på magneten og vask kolene med 200 μ L fersk laget 70 % etanolløsning.
8. Fjern supernatanten forsiktig med pipetten.
9. Repeter vaskingen med etanol (steg 7 og 8).
10. Spinn ned og sett røret tilbake på magneten, fjern rester av etanol med en 20 μ L pipette.
11. La pelleten tørke i 30 sekunder.
12. Prøven fjernes fra magneten, tilsett 10 μ L nukleasefritt vann (PCR-1) eller 10 μ L 10 mM Tris (PCR-2) og bland forsiktig ved pipettering.
13. Inkuber i romtemperatur i 2 minutter.
14. Sett prøven tilbake på magneten og vent til perlene har lagt seg nær magnetfeltet.
15. Ta supernatanten over i et nytt PCR rør (PCR-1) eller eppendorfrør (PCR-2).

Utfyllende informasjon og resultater fra polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE)

For tillaging og støping av gelen ble det brukt en prosedyre fra Universitetet i Sørøst-Norge som var følgende:

1. Tillaging av 6 % PAGE bruksløsning (i en farget glassflaske):
 - 15 mL Acrylamide-bis-ready-to-use solution 40 % (Merck, Tyskland)
 - 2 mL 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 83 mL dH₂O
2. Tillaging av 10 % Ammonium persulfat (APS) (i eppendorf rør):
 - 0,14 g APS (BIO-RAD, USA)
 - 1,4 mL dH₂O
3. Støping av gel:
 - 5,0 mL begerglass (VWR Chemicals, USA) fylles med PAGE til toppen av etiketten, 10 μ L N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED) (VWR Chemicals, USA) og 80 μ L APS

- Bland forsiktig ved å vippe begerglass
- Sett begerglasset mot kanten av glassplatene og hell i gil til det når toppen
- Sett i kammen og la stivne i 10-15 minutter

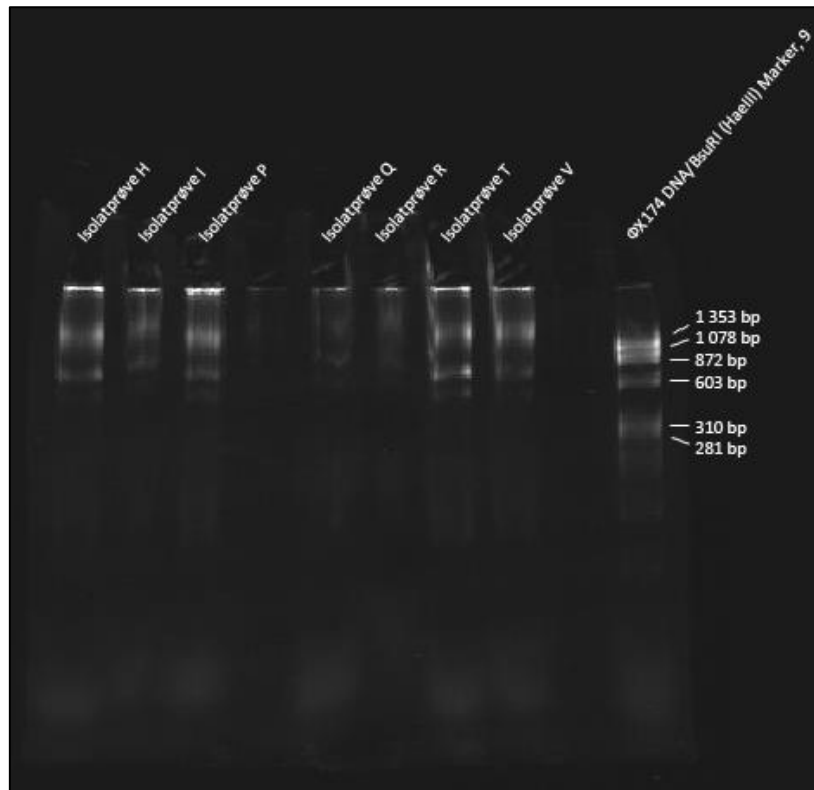
Gelelektroforesen ble satt opp i Mini PROTEAN™ Tetra System (BIO-RAD, USA), der det ble brukt 2 µL DNA og 1 µL 6X GelRed™ loading dye (Biotium, USA) med 1X TAE-buffer. Det ble brukt følgende DNA-størrelsesmarkører:

- 72 – 1 353 bp: ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII), 9 (Thermo Fisher Scientific, USA) og
- 125 – 23 130 bp: λ DNA / Hind III Markers (Promega, USA).

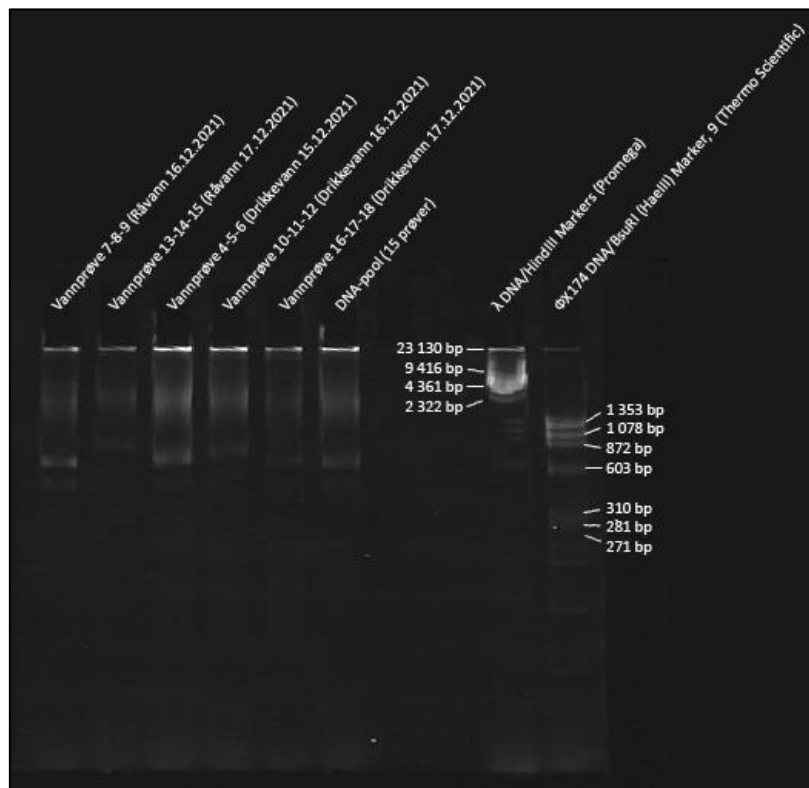
Gelelektroforesen ble utført ved 150 V i 30 minutter. For visualisering av resultatene ble det benyttet GeneGenius (SYNGENE, Storbritannia) og programvaren GeneSnap V7.12 (SYNGENE, Storbritannia).

Resultater

Første gelelektroforese-oppsett bestå av totalt 15 prøver (6 vannprøver; 7 isolatprøver) og 2 DNA-størrelsesmarkører (λ DNA / Hind III Markers (Promega, USA)) fordelt på to geler. For vannprøvene ble gelelektroforesen mislykket på grunn av feil tillaging av gelet. Siden vannprøven 1-2-3 hadde svært lite DNA (0,792 ng/µL) ble det prioritert å bruke resten av DNAet (7 µL) til pool. Dermed ble ikke denne prøven tatt med i et nytt oppsett.



Figur V22.1: Polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE) med PCR produkter fra isolatprøvene, samt DNA-størrelsesmarkører (λ DNA / Hind III Markers (Promega, USA)).



Figur V22.2: Polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE) med PCR produkter fra vannprøvene og DNA-pool, samt DNA-størrelsesmarkører (λ DNA / Hind III Markers (Promega, USA)); Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII), 9 (Thermo Fisher Scientific, USA)).

Utfyllende informasjon om fremgangsmåten til biblioteksforberedelse

Det samlede volumet (88 µL) til alle prøvene ble redusert ved hjelp av AMPure XP (Beckman Coulter, USA). 88 µL av de resuspenderte AMPure XP perlene ble tilsatt DNA-pool og forsiktig blandet ved hjelp av opp og ned pipettering. Prøven ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter. Prøven ble i noen sekunder sentrifugert ned og satt på et magnetstativ. Etter at perlene hadde festet seg til magneten ble supernatanten forsiktig fjernet. Deretter ble prøven vasket med 200 µL fersk laget 70 % etanol-løsning. Supernatanten ble forsiktig fjernet med pipetten og vaskingen med etanolen ble gjentatt enda en gang. Prøven ble igjen sentrifugert ned og satt tilbake på magneten. Rester av etanolen ble fjernet med en 20 µL pipette og pelleten ble tørket i 30 sekunder i omgivelsesluft. Prøven ble fjernet fra magneten og resuspendert i 20 µL 10 mM Tris (Elution Buffer, LOT 169037831, QIAGEN, Tyskland). Etter inkubering i romtemperatur i 2 minutter ble prøven satt tilbake på magneten og supernatanten ble pipettert over i et nytt eppendorfrør.

1 µL av de samlede prøvene ble brukt for å måle DNA-konsentrasjon og 2 µL til gelelektroforese. Resterende materialet ble brukt til videre preparering til sekvensering.

Tabell V22.3: DNA konsentrasjoner (ng/µL) og volumet (µL) som ble brukt for å lage DNA-pool til sekvensering. Verdiene er angitt til de samlede trippel-vannprøvene og trippel negative kontrollene (NK1, NK2 og NK3), samt den negative sekvenseringskontrollen (NK5) og utvalgte isolatprøver (n=7). Konsentrasjonen ble målt med Qubit 3.0 etter amplifisering (PCR-2) som en ledd til sekvenseringsforberedelse. Drikkevannsprøvene ble tidligere oppkonsentrert.

Vannprøver							
Prøve	1/2/3	7/8/9	13/14/15	4/5/6	10/11/12	16/17/18	
DNA konsentrasjon (ng/µL)	0,792	38,4	39,2	25,0	8,64	6,72	
Volum (µL)	7	3	3	4	5	5	
Isolatprøver							
Prøve	H	I	P	Q	R	T	V
DNA konsentrasjon (ng/µL)	20,0	12,1	11,5	For lav ¹	13,2	18,2	14,5
Volum (µL)	5	7	7	7	7	7	7
Kontroller							
Prøve	NK1/NK2/NK3		NK5				
DNA konsentrasjon (ng/µL)	For lav ¹		For lav ¹				
Volum (µL)	7		7				

¹ Prøve utenfor standardkurve: For lavt

Tabell V22.4: Reagenser som ikke er en del av Ligation Sequencing Kit, men som inngår i protokollen SQK-LSK112 til biblioteksforberedelse.

Reagens	LOT	Produsent
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	10107938	BioLabs, Storbritannia
NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	10107939	BioLabs, Storbritannia
NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	10109296	BioLabs, Storbritannia
NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	10109297	BioLabs, Storbritannia
NEBNext Quick T4 DNA Ligase	10107572	BioLabs, Storbritannia

Tabell V22.5: Oversikt over indikatorbakterier for fekal forurensning som var av interesse ved sekvenseringsanalysen.

Bakterie	Indikator	Referanse
<i>E. coli</i>	Fersk fekal belastning	Ødegaard et al., 2016
<i>Clostridium perfringens</i>	Eldre fekal belastning	Ødegaard et al., 2016
Intestinale enterokokker	Fekal belastning	Ødegaard et al., 2016

Referanser

QIAGEN. (2020). *DNeasy PowerWater Kit Handbook*. QIAGEN.

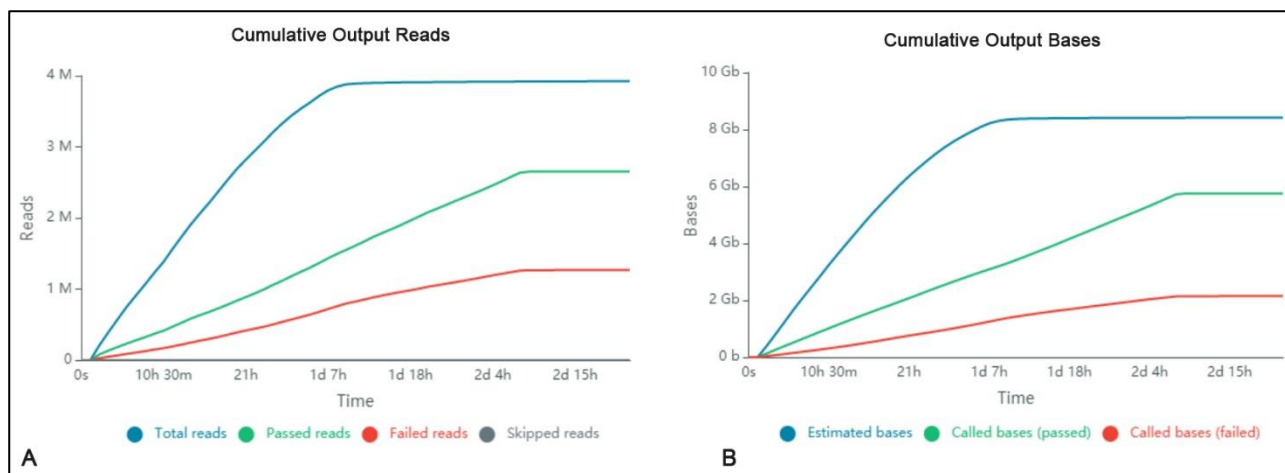
<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=75765ef9-2a6f-4f5d-a36b-dbd9beb43079&lang=en>

Ødegaard, H., Østerhus, S. & Melin, E. (2016). *Veiledning i mikrobiell barriere analyse (MBA) – Revidert utgave av Veiledning til bestemmelse av god desinfeksjonspraksis (209-2014)*. Norsk Vann. <https://va-kompetanse.no/butikk/a-209-veiledning-i-mikrobiell-barriere-analyse-mba/>

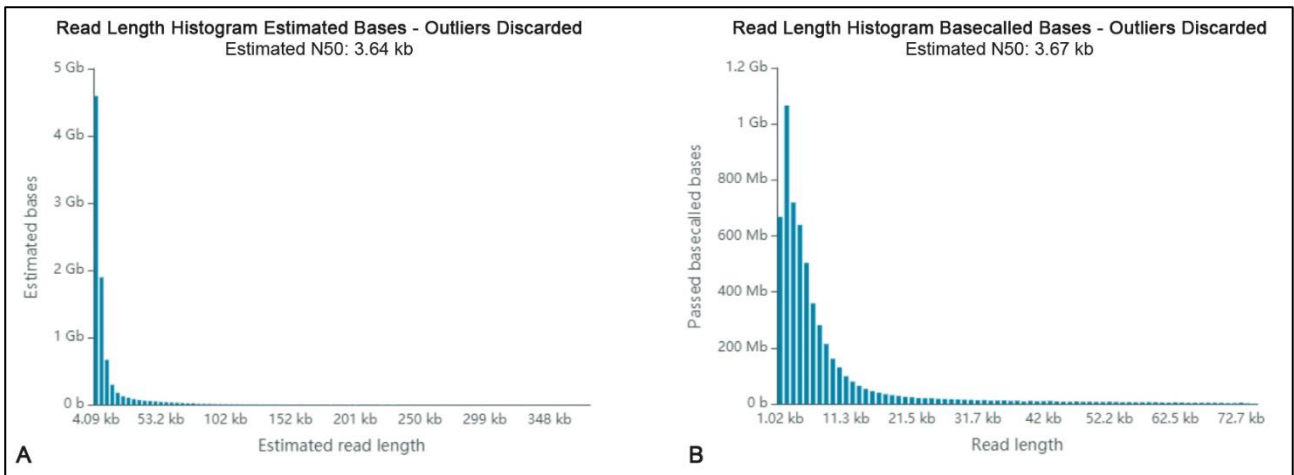
Vedlegg 23: Data fra sekvensering

Tabell V23.1: Rapport fra MinKNOW etter sekvensering med informasjon om analysen.

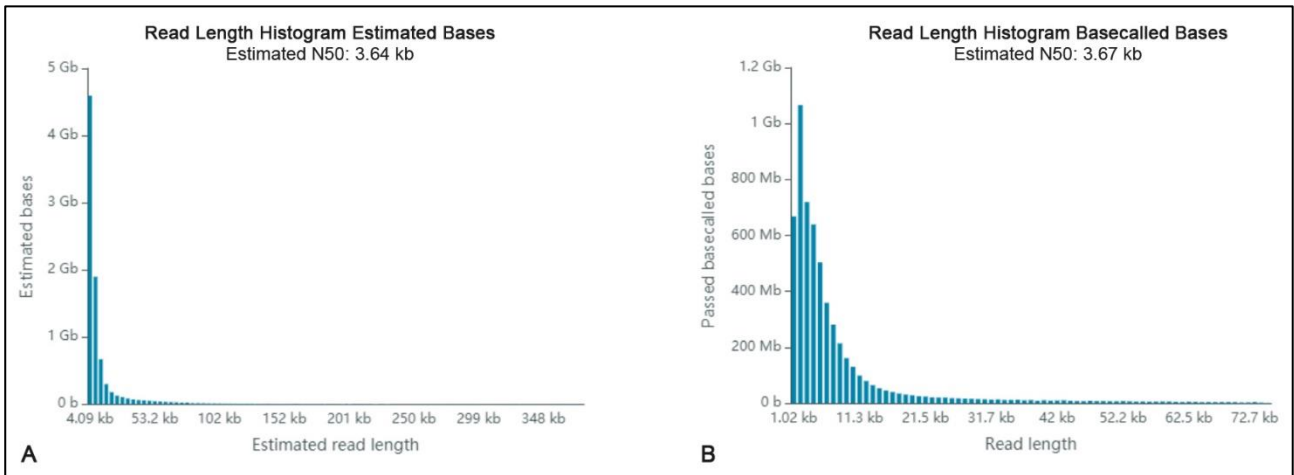
Analyse-informasjon	
Sekvenseringstid	2 dager, 20 timer
Flow Cell identifikasjon	FAT53296
Sekvenserings-oppsummering	
Genererte reads	3,92 M
Passerte baser	5,75 Gb
Mislykte baser	2,15 Gb
Estimerte baser	8,42 Gb
Analyse-parameter	
Flow Cell type	FLO-MIN112
Kit	SQK-Q20EA
Initial bias voltage	-200 mV
FAST5 output	Aktivert
FASTQ output	Aktivert
Aktivt kanalvalg	Aktivert
FAST5 reads per file	4000
FASTQ reads per file	4000
Mux skanneperiode	1 time, 30 minutter
Reserverte porer	0 %
Basecall model	dna_r10.4_e8.1_fast.cfg
Read filter	min_qscore=8
Versjoner	
MinKNOW	21.10.4
MinKNOW Core	4.4.3
Bream	6.3.5
Guppy	5.0.17



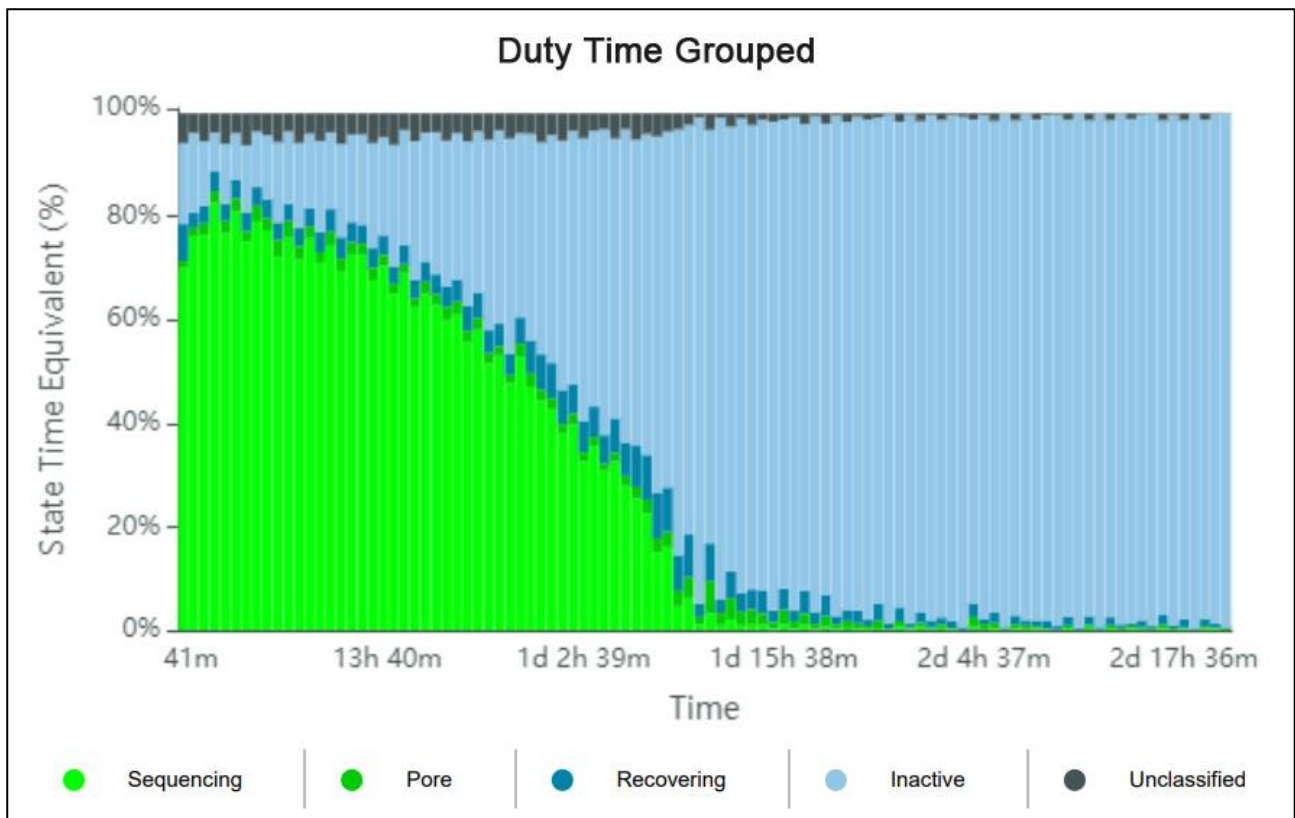
Figur V23.1: Kumulativ output gjennom sekvenseringen (2 dager, 20 minutter). Antall reads som har blitt produsert, samt reads som har bestått eller mislyktes i kvalitetsfiltrene (A). Antall baser som har blitt sekvensert og basekalt (B). Figuren er hentet fra MinKNOW rapporten etter sekvensering.



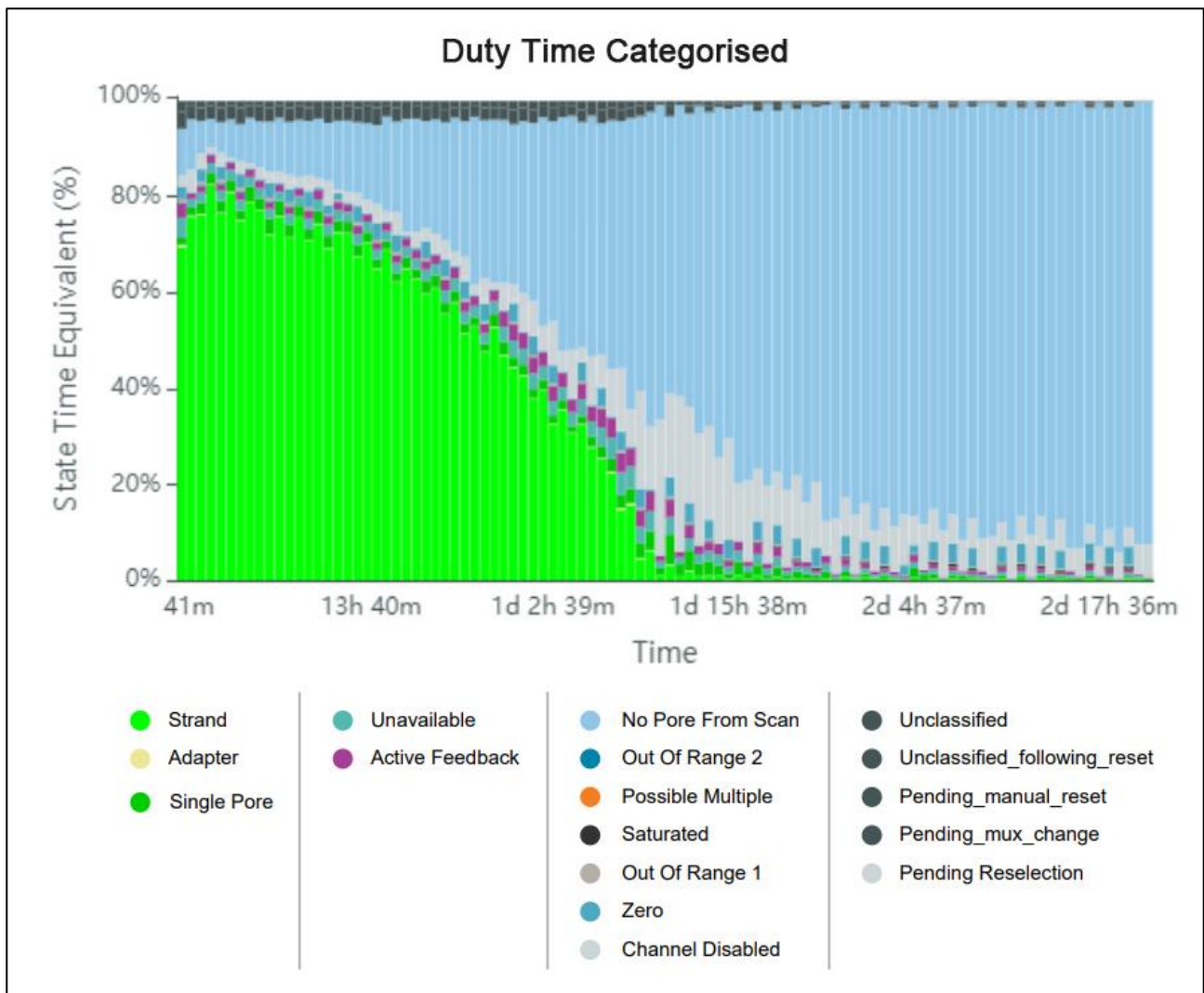
Figur V23.2: Det totale antallet baser til «outliere» i forhold til read lengde. På Y-aksen vises anslåtte baser (A) eller basekalte baser (B), og på X-aksen vises anslåtte read lengde (A) eller sekvensert read lengde (B). Figuren er hentet fra MinkNOW rapporten etter sekvensering.



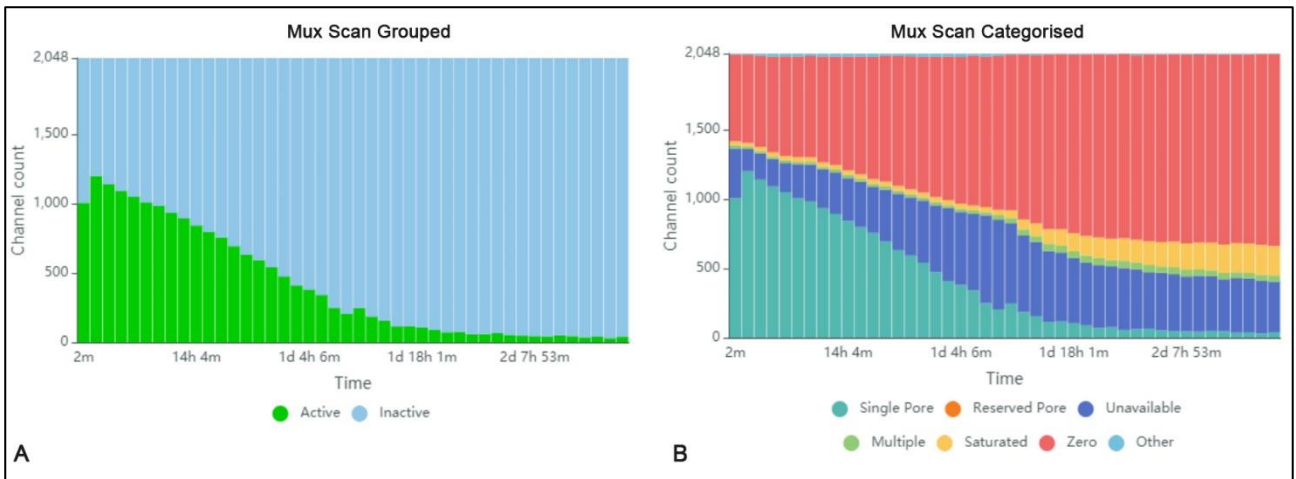
Figur V23.3: Det totale antallet baser i forhold til read lengde. På Y-aksen vises anslåtte baser (A) eller basekalte baser (B), og på X-aksen vises anslåtte read lengde (A) eller sekvensert read lengde (B). Figuren er hentet fra MinkNOW rapporten etter sekvensering.



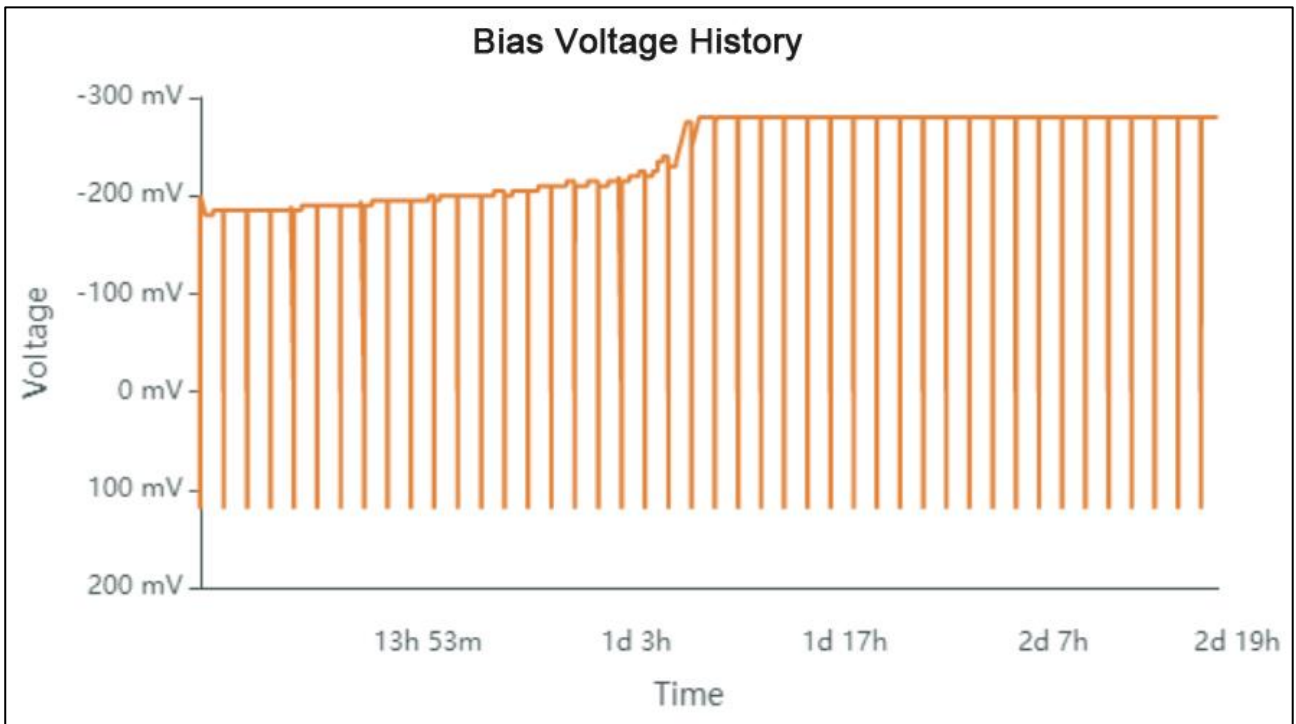
Figur V23.4: Aktiviteten til porene gjennom sekvenseringeksperimentet (2 dager, 20 minutter): Sekvenseringstilstand (lyse grønn), åpen pore (mørke grønn), gjenoppretelse / porer som kan bli tilgjengelige for sekvensering igjen (mørke blå), inaktiverede porer (lyse blå) og uklassifisert (svart). Hver balken viser summen av kanaltilstander i en bestemt tidsperiode. Figuren er hentet fra MinkNOW rapporten etter sekvensering.



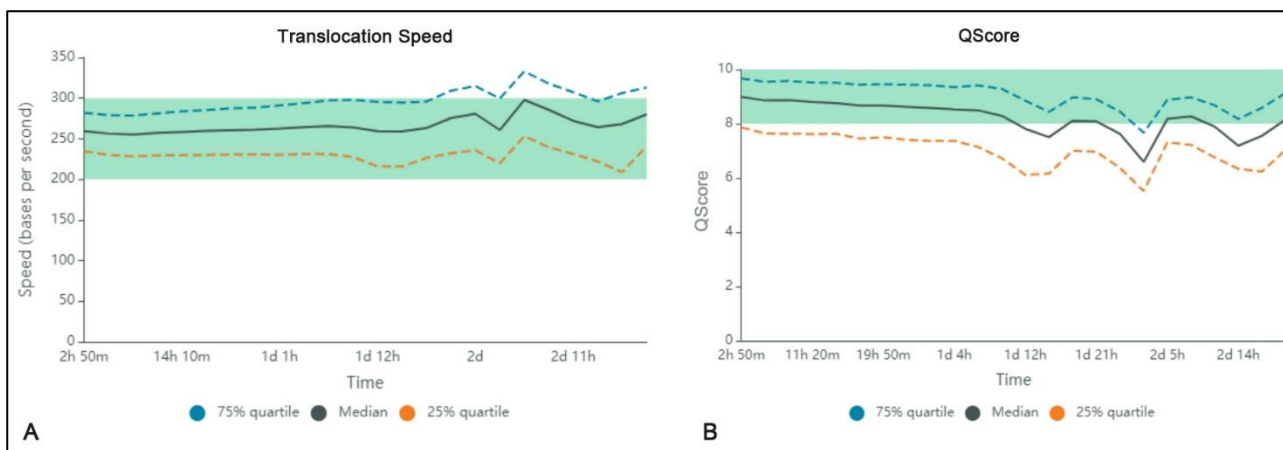
Figur V23.5: Aktiviteten til porene gjennom sekvenseringeksperimentet (2 dager, 20 minutter) med detaljerte kanaltilstander: Strand (kanalen har DNA tråd), adapter (poren sekvenserer kun den uligerte sekvenseringsadapteren (inntil DNA-tråden starter), single pore (tilgjengelig for sekvensering), unavailable (foreløpig utilgjengelig for sekvensering), active feedback (kanalen reverserer strømstrømmen for å kaste ut analytten), no pore from scan (Mux-skanningen har ikke oppdaget en pore i brønnen), out of range 2 (strømnivået er mellom 10 og 9999 pA og foreløpig utilgjengelig for sekvensering), possible multiple (kanalen viser mer enn én pore og var ikke tilgjengelig for sekvensering), saturated (kanalen er slått av på grunn av strømnivåer som overskrider hardware begrensninger), out of range 1 (strømnivået er mellom -5 og -9999 pA og foreløpig utilgjengelig for sekvensering) og zero (gjeldende nivå er mellom -5 og 10 pA og foreløpig utilgjengelig for sekvensering). Hver balken viser summen av all kanalaktivitet i en bestemt tidsperiode. Figuren er hentet fra MinKNOW rapporten etter sekvensering og informasjon fra Nanopore protokollen «MinKNOW» (ONT, 2016).



Figur V23.6: Poreskanning (antall kanaler) gruppert (A) og kategorisert (B) gjennom sekvenseringen (2 dager, 20 minutter). Figuren er hentet fra MinKNOW rapporten etter sekvensering.



Figur V23.7: Spenningen gjennom sekvenseringeksperimentet (2 dager, 20 minutter). Figuren er hentet fra MinKNOW rapporten etter sekvensering.



Figur V23.8: Translokasjonshastighet (A) og Q-score (B) gjennom sekvenseringeksperimentet (2 dager, 20 minutter). Figuren er hentet fra MinKNOW rapporten etter sekvensering.

Tabell V23.2: Informasjon fra dataanalysen hentet fra EPI2ME (Fastq WIMP (What`s in my pot)).

Parameter	Verdi
Reads	
Antall reads totalt	2 653 959
Antall reads som ikke passerte satt lengde filter (2 500-6 500 bp)	2 124 281
Antall reads som ikke passerte satt Q-score grense (Q 8)	8 763
Antall reads klassifisert	520 728
Antall reads uklassifisert	187
Antall reads klassifisert som bakterier	495 508
Utbytte	
Totalt (Gb)	5,8
Gjennomsnittlig sekvenslengde (bp)	2 168
Modus (bp)	621
Q-score	
Gjennomsnitt	9,31
Modus	9,15

Referanser

ONT. (2016). *Nanopore Protocol - MinKNOW*. Oxford Nanopore Technologies.

Vedlegg 24: Analyseresultater fra MOVAR og Eurofins

Tabell V24.1: Råvann og drikkevanns analyser utført av Eurofins for prøver tatt 13.12.2021.

Parameter	Råvann	Drikkevann
Koliforme (antall/100 mL)	25	0
E. coli (antall/100 mL)	0	0
Intestinale enterokokker (antall/100 mL)	0	0
Kimtall (antall/mL)	-	0
pH	7,1	7,6
Alkalitet (mmol/L)	0,26	-
Turbiditet (FNU)	8,6	0,05
Farge (mg Pt/L)	55	2
TOC (mg C/L)	8,9	2,7
Total klor (mg Cl/mL)	-	0,07
Konduktivitet (m S/m)	-	13,7
Lukt/smak (Terskelverdi)	-	0

Tabell V24.2: Råvann og drikkevanns analyser utført av MOVAR for prøver tatt fra 13. til 17.12.2021.

Dato	Råvann		Drikkevann		
	Farge (mg Pt/L)	Turbiditet (FNU)	Farge (mg Pt/L)	Turbiditet (FNU)	pH
13.12.2021	59	8,6	2	0,09	7,10
14.12.2021	-	-	-	0,09	8,00
15.12.2021	-	-	-	0,09	7,90
16.12.2021	-	-	-	0,07	8,00
17.12.2021	-	-	-	0,11	8,48

Tabell V24.3: Analyser utført av Eurofins på prøver tatt fra ulike ledningsnett (Bjørnåsen, Kolsrød og Solli) der vannet kommer fra Vansjø vannverk. Prøvetakingsdato var 13.12.2021 for Bjørnåsen, 27.12.2021 for Kolsrød og 6.12.2021 for Solli.

Parameter	Bjørnåsen (13.12.2021)	Kolsrød (27.12.2021)	Solli (6.12.2021)
Koliforme (antall/100 mL)	0	0	0
E. coli (antall/100 mL)	0	0	0
Intestinale enterokokker (antall/100 mL)	0	0	0
Kimtall (antall/mL)	0	0	2
pH	7,7	8,0	7,7
Turbiditet (FNU)	0,05	0,05	0,05
Farge (mg Pt/L)	3	4	3
TOC (mg C/L)	2,9	2,6	3,4
Total klor (mg Cl/mL)	0,05	0,03	0,03
Konduktivitet (m S/m)	14	14	15
Lukt/smak (Terskelverdi)	0	0	0