

# Påvisning av antibiotikaresistens hos Gram-negative stavbakterier fra pasienter med periodontitt

Et reservoar for overføring av resistens til munnhulens normalflora.

Thea Smedsrud Bjørnstad

Veiledere: Førsteamanuensis Morten Enersen og Anne Karin Kristoffersen



Masteroppgave i odontologi

Det Odontologiske Fakultet

UNIVERSITET I OSLO

2019

© Thea Smedsrud Bjørnstad

2019

Påvisning av antibiotikaresistens hos Gram-negative stavbakterier fra pasienter med periodontitt.

Thea Smedsrud Bjørnstad. Veiledere: Morten Enersen og Anne Karin Kristoffersen.

<http://www.duo.uio.no>

# Forord

I 2015 utgav Apollo et blad hvor tema omhandlet økende antibiotikaresistens hos mennesker. Dette var noe som fanget min oppmerksomhet og et emne jeg kunne skrive om i min masteroppgave. Derfor tok jeg kontakt med førsteamanuensis Morten Enersen. I samarbeid med ham og Anne Karin Kristoffersen ved Institutt for oral biologi, utarbeidet vi et prosjekt som omhandlet forekomst av antibiotikaresistens i en gruppe bakteriearter fra periodontitt (tannløsning).

Etter innledende møter kom vi frem til at dette ville bli et tidkrevende prosjekt med mye laboratoriearbeid. Jeg samlet, rendyrket og lagret bakterier i omtrent et halvt år i tillegg til vanlig undervisning. Etterhvert fikk jeg mye materiale å arbeide videre med sommeren 2017 da jeg mottok sommerstipend fra Odontologisk Fakultet.

Ved Mikrobiologisk Diagnostisk Service har man gjennom de siste år observert økt forekomst av antibiotikaresistens i bakterieprøver fra pasienter med periodontitt. Vi ønsket derfor å kartlegge forekomsten av resistens hos Gram-negative stavbakterier samlet fra denne pasientgruppen og videre kartlegge/detektere mulige antibiotikaresistensgener i det innsamlede materialet.

Sommeren 2017 var veldig innholdsrik, og jeg lærte mye mikrobiologi samtidig med laboratoriearbeidet jeg måtte sette meg inn i. Jeg vil takke veilederne mine for god veiledning, hjelp, tålmodighet og oppfølging gjennom hele prosjektet. I tillegg må det rettes en stor takk til Odontologisk Fakultet, Universitetet i Oslo for tildelingen av sommerstipend i 2017. Jeg vil også takke for fem flotte studieår.

# Abstract:

**Bakgrunn:** Forekomsten av antibiotikaresistens har i mange år vært et tiltagende problem på verdensbasis, også i Norge. Hos noen pasienter med behandlingsresistent periodontitt ser man økt forekomst og kliniske tegn på mulig superinfeksjon som kan være forårsaket av Gram-negative fakultative stavbakterier (tarmbakterier). Ofte er disse artene også bærere av antibiotikaresistensgener. **Mål:** Vi hadde som hovedmål å undersøke andelen av beta-laktam resistente stavbakterier i et bestemt tidsrom fra pasienter med periodontitt for deretter å undersøke mulige mekanismer for beta-laktam resistent hos disse bakteriene. **Resultater:** Alle bakterieprøvene i denne studien viste resistens mot en eller flere typer antibiotika. Det ble kartlagt resistensgener i noen av bakterieprøvene, men ikke alle lot seg detektere. **Konklusjon:** Man kan ikke utfra resultatene i dette prosjektet konkludere med at det er økt forekomst av resistens i Norge, men resultatene kan indikere at forekomsten blant pasienter med periodontitt er høy, også her i Norge. Det ble kartlagt noen resistensgener i de orale prøvene, men hvor mange resistensgener og hvilke mekanismer hver enkelt bakterie har er noe det bør arbeides videre med. Denne studien støtter nyere publikasjoner om at periodontal mikrobiota kan representere et reservoar for antibiotikaresistens hos pasienter med periodontitt.

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>6</b>
1.1 Periodontale sykdommer .....	6
1.2 Gram-negative stavbakterier .....	8
1.3 Antibiotika og antibiotikaresistens .....	10
1.3.1 Betalaktam-antibiotika .....	12
1.3.2 Betalaktamaser .....	13
1.4 Hensikt .....	15
<b>2. Materiale og metode</b> .....	<b>16</b>
2.1 Mikrobiologisk Diagnostisk Service .....	16
2.1.1 Rendyrkning av bakterieprøvene .....	17
2.2 Antibiotikaresistens testing (AST)- resistensprofil .....	18
2.2.1 Nedfrysning av bakterier .....	18
2.3. CHROMagar påvisning av resistensgener hos Gram-negative bakterier .....	19
2.4 DNA-isolering .....	20
2.4.1 Elektroforese-sjekk av kvalitet på DNA-isoleringen .....	20
2.5 Polymerase chain reaction (PCR) .....	21
2.5.1 Primere .....	22
2.5.2 16S rRNA genet: .....	23
2.6 Sangersekvensering .....	24
<b>3. Resultater</b> .....	<b>26</b>
3.1 Identifikasjon ved Mikrobiologisk Diagnostisk Service .....	26
3.2 Antibiotikasensitivitets testing (AST) .....	27
3.3 Påvisning av extended spectrum betalactamase (ESBL) i bakterier ved dyrkning på ESBL- CHROMagar-skåler .....	29
3.4 DNA-isolering .....	31
3.5 PCR-påvisning av resistensgener .....	32
3.5.1 PCR 1 .....	32
3.5.2 PCR 2 .....	33
3.5.3 PCR 3 .....	34
3.6 Sangersekvensering .....	37
<b>4. Diskusjon</b> .....	<b>39</b>
<b>5. Ordliste</b> .....	<b>41</b>
<b>6. Oppskrifter:</b> .....	<b>45</b>
<b>Litteraturliste</b> .....	<b>51</b>

# 1. Introduksjon

## 1.1 Periodontale sykdommer

Periodontale sykdommer (periodontitt) er en gruppe infeksjoner i vevet som omgir tennene, som ubehandlet medfører tap av tannfeste, og i endel tilfelle tap av tenner. Tap av tannfeste er irreversibelt, men ved riktig behandling kan videre progresjon av tannkjøtt sykdommen i de fleste tilfeller forhindres eller stoppes helt. Alvorlighetsgraden av periodontale sykdommer kan variere fra mild reversibel inflammasjon i gingiva (gingivitt) til kronisk ødeleggelse av periodontalt feste med etterfølgende tanntap. De to viktigste diagnosene er kronisk og aggressiv periodontitt [2]. Det har nylig kommet et nytt klassifikasjonssystem for periodontitt, men jeg har valgt å bruke gammel klassifikasjon fordi diagnosene som er nevnt ovenfor, er så godt innarbeidet etter å ha vært gyldige i ca. 20 år. Kronisk periodontitt er regnet som den formen for periodontitt som har høyest prevalens [3].

Hovedprinsippet for behandling av periodontitt er mekanisk behandling der den subgingivale biofilm ødelegges mekanisk. Første trinn i behandlingen i tillegg til diagnostikk og behandlingsplanlegging, er instruksjon i supragingivalt renhold med tett oppfølging. I den videre behandlingen gjennomføres subgingival depurasjon som inkluderer fjerning av tannstein og rotplanering. I de tilfellene som blir belyst her, har tannlegen tatt en mikrobiologisk prøve for å kartlegge hvilke bakterier som er tilstede og om det kan være indikasjon for å benytte antibiotika som supplerende behandling (se senere).

Munnhulefloraen er en del av kroppens normalflora og utviser stor diversitet og variasjon av mikrobearter, samtidig som den også representerer en viktig inngangsport for mikroorganismer som ikke har sitt naturlige tilhold der [4]. Selv om noen virus og sopparter er endel av normalfloraen, blir bare bakterier diskutert videre i denne oppgaven. Bare bakteriefloraen i tykktarmen er mer kompleks enn munnhulens bakterieflora. Det finnes mye kunnskap om normalfloraen i munnhulen, men mange av bakteriene i munnhulen er fortsatt ukjente fordi de ikke lar seg dyrke. Noen arter er spesifikke for bestemte habitat i munnhulen, mens andre kan være spesifikke for individet. I 2006 påviste Jørn Arne Aas nye arter i munnhulefloraen, og antallet bakterier som finnes der ble oppjustert fra ca. 500 til ca 800 [5] [6]. Senere er antallet ytterligere justert opp til > 1000 arter, mens man regner at innen hvert individ kan man detektere mellom 300 og 400 arter [7].

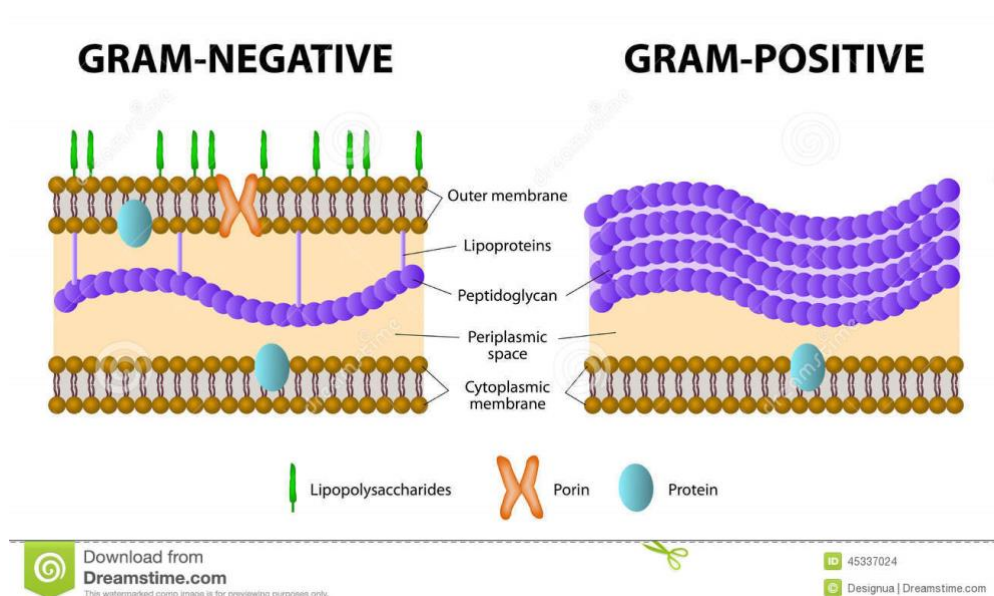
Ettersom tenneses overflate består av mineralisert vev som i motsetning til andre vevsoverflater i kroppen ikke fornyes, får bakteriene gode muligheter til å etablere og organisere seg som et belegg som kalles dental biofilm. Dette forutsetter at biofilmen ikke blir ødelagt mekanisk av tannbørsten, tannstikker eller av andre tannrengjøringshjelpemidler. Kvaliteten av pasientens eget supragingivale renhold er derfor en viktig faktor for å forebygge, opprettholde eller gjenopprette friske forhold i et tannsett. Dental biofilm på tennene er sentralt i utviklingen av periodontale sykdommer. Det finnes varierende mengde biofilm hos alle mennesker blant annet avhengig av hvor god munnhygien er. Biofilmen på tennene utgjøres av bakterieceller fra forskjellige arter som omgir seg med en matriks av ekstracellulære polysakkarider. Den ekstracellulære matriksen er en god beskyttelse for bakteriene som er tilstede. En rekke av bakterieartene som finnes i den subgingivale biofilm blir assosiert til patogenesen ved periodontitt [8].

Betydningen av bakteriefloraen ved periodontitt har fått mye oppmerksomhet innen forskning i de siste tiårene. For å forstå etiologi og patogenese for denne gruppen av sykdommer, er det viktig å kjenne til munnhulens normalflora. I munnhulen og under tannkjøttet finnes det både anaerobe, aerobe og fakultative bakteriearter. Hos pasienter med behandlingsresistent periodontitt (refraktær periodontitt) ser man ofte forekomst av forskjellige Gram-negative fakultative stavbakterier, som oppfattes å være representanter for superinfiserende bakteriearter; bakteriearter som vanligvis ikke er assosiert til den normale orale mikrobiotaen. For å kartlegge bildet i en blandingsinfeksjon der behandlingsresultat og respons på behandling ikke er tilfredsstillende, kan mikrobiologisk diagnostikk være et hjelpemiddel. Klinikeren kan da innhente supplerende informasjon om sammensetning og resistensprofil som kan benyttes som hjelpemiddel for adekvat tilleggsbehandling[9].

Uttrykket ”superinfeksjon” benyttes når et klinisk bilde forstyrres av rik oppvekst av bakteriearter som vanligvis ikke er en del av normalfloraen. Tilstedeværelse av disse bakterieartene kan være medvirkende årsak til manglende respons på konvensjonell mekanisk periodontal behandling uten at man kjenner bakenforliggende mekanismer. Disse artene er også hyppig bærere av forskjellige antibiotikaresistensgener (se senere)[1, 9]. Erfaringsmessig har det vist seg at supplerende bruk av antibiotika kan gi effekt på noen former for periodontitt, blant annen refraktær periodontitt der det kan være forekomst av Gram-negative fakultative stavbakterier.

## 1.2 Gram-negative stavg bakterier

Gram-positive og Gram-negative bakterier er to klasser bakterier som kan klassifiseres ut fra om de lar seg gramfarge eller ikke. Gramfarging er en fargemetode av bakterier som kan skille bakterier fra hverandre fordi de har ulik celleveggstruktur. Gram-positive bakterier er blå eller fiolette ved mikroskopering, mens Gram-negative er røde eller rosa. Ved gramfarging brukes krystallfiolett, jod, etanol og safran. Krystallfiolett dissosierer til ioner i vandig løsning og trenger gjennom celleveggen og cellemembranen hos både Gram-positive og -negative bakterier. Ionene reagerer med negative ioner i cellemembranen og farger den lilla/blå. Jod binder seg til store kompleks med krystallfiolett. Gram-positive bakterier har en tykk cellevegg som består av et ytre peptidoglykanlag. Etanol blir benyttet til å vaske bort overskudds-fiolettfargen ved å løse opp lipidlaget. Hos Gram-positive bakterier har fargen trengt godt ned i den tykke celleveggen, og porene lukker seg som følge av etanol's dehydrerende virkning og fargen blir derfor værende. Gram-negative bakterier har et tynt lag med både peptidoglykaner og lipopolysakkarider. Hos disse bakterieartene blir den ytterste membranen borte og all farge fra den tynne celleveggen viskes ut, derav ingen blå farge. Safran brukes som kontrast for å gi farge til de fargeløse Gram-negative bakteriene. Slik kan man skille Gram-negative og Gram-positive bakterier fra hverandre.



Figur 1 Viser forskjellen på Gram-negativ og Gram-positiv celleveggoppbygging [10].



Gram-negative fakultative stavbakterier omfatter blant annet arter på ordernivå av gruppen enterobacteriaceae. Noen viktige slekter er *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Noen arter som også kan påvises intraoralt kan være *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Stenoprophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii* og *Pseudomonas aeruginosa*[11]. Flere av disse artene er bakterier som finnes i tarmen som en del av normalfloraen hos mennesket. *E. coli* forekommer normalt i store mengder i tarmsystemet hos dyr og mennesker, mens *Pseudomonas aeruginosa* finnes i små mengder hos relativt mange [12]. Bakteriene som er nevnt ovenfor og andre arter i samme gruppe, kan forekomme subgingivalt hos de med alvorlig kronisk periodontitt eller refraktær periodontitt og er av interesse med tanke på antibiotikaresistens (se senere) [11].

### 1.3 Antibiotika og antibiotikaresistens

Antibiotika er et fellesnavn for medikamenter som hemmer vekst av eller dreper bakterier. Det benyttes i noen tilfeller i periodontal behandling (se ovenfor). Antibiotika angriper bakterien på ulike måter, og antibiotikaresistens innebærer at bakterier kan bli motstandsdyktige overfor antibiotika. Det vil si at antibiotika ikke lenger virker, og bakteriene vil derfor ikke leve videre, formere seg og fremkalle sykdom. Bakterier som er resistente mot antibiotika er et økende problem både nasjonalt og internasjonalt. I Norge har vi et system som heter «Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober», NORM. Overvåkningssystemet utgir årlig en statusrapport med oversikt over antibiotikaresistens i human og veterinærmedisin, landbruk og matproduksjon mm. NORM-rapporten har gjennom en rekke år vist forekomst av økende antibiotikaresistens også i Norge, selv om mange vil hevde at det er beskjedent i forhold til andre land. Innen human mikrobiologi er det spesielt en økende antibiotikaresistens hos gule stafylokokker og enterobakterier [13, 14], men de siste 10 årene har det skjedd en dramatisk økning i forekomst av antibiotikaresistente mikrober i nesten alle økologiske nisjer. Menneskets munnhuleflora kan også være et eksempel på dette [15, 16]. Globalt sett er overforbruk og feilbruk av antibiotika parallelt med lite kontroll av salg og distribusjon, en svært viktig drivkraft for utviklingen av antibiotikaresistens [13].

Bakterier finnes i de fleste miljøer, både i og på mennesker og dyr. De er assosiert til planter og matvarer og finnes i jordsmonn og vann. Både matvarer og drikkevann kan lett forurennes med bakterier, og etablering av mikrobeflora hos mennesker og dyr skyldes kontaminasjon av ulike mikrober, vanligvis gjennom føde og/eller via kontaktsmitte[13].

Antibiotikaresistens er et naturlig fenomen hos mikrober og finnes i varierende grad i alle økologiske nisjer hvor det finnes bakterier. *Naturlig resistens* innebærer en genetisk betinget egenskap som overføres ved arv koblet til bakteriemultiplikasjon. Resistens kan også være *ervert* og kan skyldes at bakterien har endret angrepsmålet for antibiotika, slik at det ikke lenger kan binde seg og «angripe». Et eksempel på dette kan være cefalosporinresistens hos enterokokker på grunn av beta-laktam gruppens manglende evne til binding av penicillinbindende protein [13].

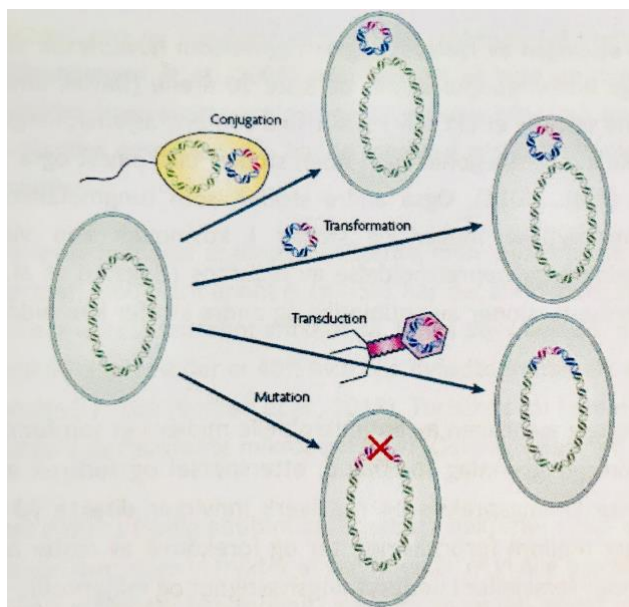
Horisontal genoverføring (se nedenfor) har stor betydning for bakterienes evne til å unnsnippe virkningen av antibakterielle midler, fordi resistensen kan spre seg raskt. Resistensgener kan overføres fra celle til celle innen samme art, til andre arter innen samme slekt og til andre

slekter. Det finnes tre mekanismer for horisontal genoverføring; konjugasjon, transduksjon og transformasjon.

Konjugasjon: genetisk materiale (plasmider) overføres fra en bakterie til en annen ved aktiv celle-til-celle-kontakt. Dette skjer vanligvis ved at et plasmid overføres fra en bakterie til en annen. Et plasmid er ekstrakromosomale DNA-molekyler som finnes i mange bakterierarter, og gene i et plasmid kan replikeres uavhengig av det kromosomale DNA. Plasmider er en viktig faktor i bakteriens suksess til å danne og videreføre resistensgener [9, 13, 17, 18].

Transduksjon: overføring resistensgener mellom bakterier ved hjelp av bakterievirus (bakteriofag) [13].

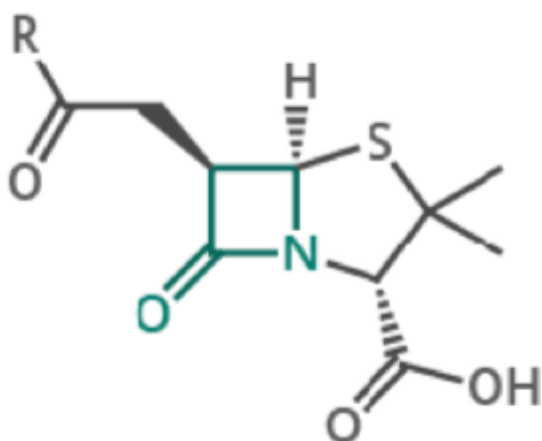
Transformasjon: direkte opptak av genetisk materiale (fritt DNA) fra omgivelsene (kan stamme fra døde bakterier) [13, 19].



Figur 2. Viser transformasjon, transduksjon og konjugasjon [20].

### 1.3.1 Betalaktam-antibiotika

Betalaktam-antibiotika representerer en vid gruppe antibiotika som er karakterisert ved at de inneholder en betalaktamring (merket grønn i figur 3). Beta-laktam-antibiotika omfatter blant annet penicillinene som er den viktigste gruppen av antibiotika som benyttes innen odontologi. Denne gruppen antibiotika griper inn i bakteriens oppbygging av nytt celleveggsmateriale, slik at bakterien går i apoptose etter noen få delinger [21]. De virker ved å binde seg til penicillin-bindende protein (PBP) i bakteriens cellevegg. PBP katalyserer kryssbinding av celleveggen, men blir blokkert når betalaktam antibiotika binder seg.



Figur 3. Betalaktam-ringstruktur. Figuren over viser penicillinstruktur [22].

Betalaktam-antibiotika er delt inn i undergrupper ut fra hvilke molekylær ringstruktur som er festet til betalaktamringen. Eksempler på betalaktamantibiotika er penicilliner, cephalosporiner, monobactamer og carbapenems.

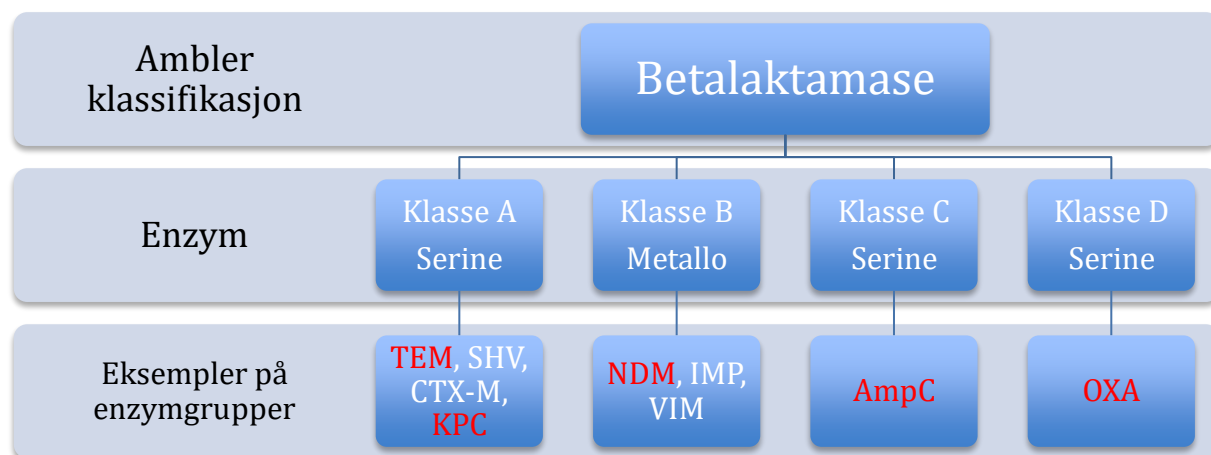
Egenskapene til betalaktamringen gjør at de kan drepe bakterier effektivt uten at de utgjør en stor toksisk effekt på humane celler. Dette er svært ønskelig og derfor en av faktorene til at betalaktam den er mest brukte antibiotikatypen [17].

### 1.3.2 Betalaktamaser

Betalaktamaser er kjent som penicillinaser, enzymer som hydrolyserer betalaktam ringstrukturen. Disse enzymene er utviklet gjennom millioner av år av bakterier som konkurrerer om vekstområder. Utvidet (extended) spektrum betalaktamaser (ESBL) ble først beskrevet i 1983 hvor det oppstod en punktmutasjon i et naturlig forekommende betalaktamase gen. Mutasjonen førte til at genet forandret seg fra et stabilt bakteriegen hos bestemte bakteriearter til å bli et gen som lett kunne overføres til andre bakteriearter [17].

For Gram-negative stavbakterier er forekomsten av betalaktamaser en viktig resistensmekanisme. Bakterier som produserer betalaktamaser er for eksempel *E. coli* og *Klebsiella* arter som er slekter i familien *Enterobacteriaceae*[19].

Enzymene er klassifisert og beskrevet på to hovedmåter, den første, molekylært, dvs likhet mellom aminosyresekvenser, kalt Ambler klassifisering (A-D) [23]. Den andre klassifiseringen baserer seg på den funksjonelle profilen til betalaktamasene [24].



Figur 4. Funksjonell klassifisering (enzymgrupper) satt sammen med Ambler klassifisering av betalaktamaser [17].

Figuren ovenfor viser Ambler klassifiseringen. Betalaktamasene er klassifisert i fire molekylære klasser, A, B, C, D. Tre av fire klasser (A, C, D) inneholder serin i sitt aktive sete, mens klasse B betalaktamaser inneholder et metall-ion i sitt aktive sete. Det er beskrevet flere nye undergrupper av klassene, basert på spesifikke egenskaper for individuelle enzymer. Den funksjonelle klassifiseringen er koblet til Ambler- klassifiseringen, som for eksempel de enzymgruppene som er farget rødt i tabellen over. Disse er igjen relevante resistensgener i

denne oppgaven [24] [25].

TEM er en av de vanligste plasmid-medierte betalaktamasene hos Gram-negative bakterier, inkludert *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* og *Neisseria gonorrhoeae* [26, 27]. SHV er mest vanlig hos klebsiella-arter.

New Delhi metallo-beta-laktamase (NDM) er et annet plasmidmediert enzym som gir bred motstand mot alle tilgjengelige betalaktamer (inkludert karbapenemene). Dette genet er koblet til andre resistensgener på plasmidet som gir resistens mot alle tilgjengelige antibiotika, med unntak av Kolistin og Tigercyklin [26, 27].

Karbapenemer har det bredeste antibakterielle spektrumet av alle betalaktam. De er stabile ovenfor de fleste betalaktamaser inkludert bredspektrede betalaktamaser (ESBL). Men de hydrolyseres av karbapenemaser (NDM, KPC, OXA) som har økende utbredelse i mange land. Karpapenemer er de av betalaktamene som har størst økoskygge gjennom påvirkning av pasientens normalflora [26, 28].

Studier viser at produksjon av ESBL i enterobakterier nå er et globalt problem, spesielt blant *Klebsiella pneumoniae* og *Escherichia coli*. Forekomsten er spesielt høy i Asia, men de er blitt et betydelig problem også i Europa [29]. De første karakteriserte ESBL som ble detektert i enterobakterier, var mutasjoner av TEM og SHVgenene [30].

## 1.4 Hensikt

I første del av prosjektet ønsket vi å samle og identifisere Gram-negative fakultative stavbakterier fra pasienter med periodontitt. I andre del av prosjektet ønsket vi å kartlegge forekomst av betalaktamaser (Fig. 4 i innledningen) hos de innsamlede Gram-negative stavbakteriene med spesielt fokus på de rødmerkede enzymgruppene i Fig 4.

## 2. Materiale og metode

### 2.1 Mikrobiologisk Diagnostisk Service

Mikrobiologisk Diagnostisk Service ved Institutt for Oral biologi representerer en mulighet for å samle bakteriekolonier fra pasienter med periodontitt fordi orale bakterieprøver mottas regelmessig for mikrobiologisk analyse som en del av tannbehandlingen. Den største andelen av prøvematerialet kommer fra pasienter med periodontitt. Det ble fortløpende fra høsten 2016 til høsten 2017 samlet inn bakteriekolonier fra pasientprøver der det ble detektert rik bakterievekst på selektivt medium for enterobakterier (MacConkey agar, BD puls). Det ble samlet inn totalt 42 bakteriekolonier.

Identifikasjonen av disse ble gjort ved hjelp av en fenotypisk analysemetode kalt Vitek2 som kan identifisere en mikroorganisme ved hjelp av metaboliske prosesser (biokjemisk metode). En database i Vitek2-maskinen oppdateres jevnlig (fra produsent, Biomerieux) overfor de vanligste bakterieartene innen medisinsk mikrobiologi. Identiteten bestemmes ut fra hvilke metabolitter den aktuelle bakteriekoloni testes positivt for. Nøyaktighet av identifikasjonen angis i prosentcore. Er prosentcoren høy (99-100%), i tillegg til at den benevnes som en excellent match angis det korrekt identifikasjon. Etter identifisering av bakteriene gjennom Vitek2 ble det senere i prosjektet også gjennomført en identifikasjon ved hjelp av *16S rRNA* gensekvensering (Sanger-sekvensering) som kontroll for den biokjemiske identifikasjonen. (tabell 26)

Materialet som inkluderes i denne undersøkelsen utgjøres av rendyrkede bakteriekolonier av gram negative stavbakterier høstet fra anonymiserte pasientprøver fra Mikrobiologisk Diagnostisk Service. Personopplysninger i materialet var utilgjengelig da agar-skålene med bakteriekolonier ble mottatt. Videre inneholdt ikke prøvematerialet humane celler, og bare bakterielt DNA ble analysert. Materialet ble fortløpende destruert når det var ferdig analysert.



### 2.1.1 Rendyrkning av bakterieprøvene

Rendyrkning er å fremdyrke arvemessig like mikroorganismer (single cell colony technique). Det ble brukt næringsrike skåler, Brucella blodagar (BD Puls), for dyrkning av tarmbakterier (se kapittel 6) [31]. Brucella blodagar (BD Puls) er et svært næringsrikt medium for isolering og dyrkning av aerobe bakterier og krevende fakultative bakterier [32].

Etter utsåing ble agar-skålene satt i inkubator ved 37 °C i 1-3 dager for vekst. Etter 24-48t inkubasjonstid, ble agar-skålene med bakteriene tatt ut og inspisert for kontaminasjon (forurensning). Hvis agar-skålene var uten kontaminasjon ble de ført videre i prosjektet for antibiotikaresistens-testing og for påvisning av antibiotikaresistente gener.



*Figur 5. Blodagar-skål med vekst[33].*

De valgte bakteriekoloniene ble nedfrosset i fryseskap på -80 °C, deretter ble de sådd ut på Brucella blodagar-skåler og satt i varmeskap 37 °C i 24 timer for vekst. Eppendorfrør med 250 µl PBS ble tilsatt noen få kolonier fra agar-skålen. Bakteriene i eppendorfrøret kunne så brukes til DNA-isolering.

## 2.2 Antibiotikaresistens testing (AST)- resistensprofil

De rendyrkende koloniene ble slemmet opp i 0,85 % NaCl (celletetthet på 0,5 McFarland) og overført til Mueller Hinton agar-skåler (se kapitel 6). Antibiotikalapper (Sensi-Disk fra BD Puls) ble påført skålen vha en dispenser (se tabell 2.1.). Prøveresultatet ble avlest etter 24 timer.

Om bakteriegruppen er resistent mot et antibiotikum eller ikke er bestemt av den minste hemmende konsentrasjon. Det ble benyttet agar-lappediffusjonsteknikk - små antibiotikalapper (Sensi-Disc fra BD Puls) med bestemte antibiotika-konsentrasjoner tilpasset European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) standard. Avlesning av diameter på hemningssonen angir sensibilitet (S) eller resistens (R) for hvert antibiotikum og mot bestemte bakteriearter under standardiserte forhold.

Antibiotikatyper som ble testet er de som kan være aktuelle ved odontologiske infeksjoner. Ciprofloxacin (CIP) ble også inkludert fordi det er et av de mest bredspektede antibiotika som er tilgjengelig. Medikamentet er meget resistensdrivende, og var derfor av spesiell interesse å medta på listen.

<b>Medikament:</b>	<b>Merknader:</b>	<b>R (&lt;= mm)</b>	<b>I ( mm )</b>	<b>S(=&gt; mm)</b>
P2 (Penicillin) 2 IU	enterococcus	14		15
CC (Clindamycin) 2 µg		14	15-20	21
AMX (amoxcillin)10 µg		<13	14-17	>18
AMX (amoxcillin) 25 µg		<13	14-17	>18
CIP (Ciprofloxacin) 5 µg		15	16-20	21
Tetracycline 10 µg	Ingen grensesone	-	-	-

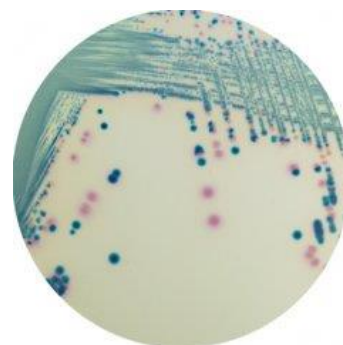
Tabell 2.1 Venstre kolonne viser hvilke antibiotika som ble brukt for testing av antibiotikaresistens. Høyre kolonne viser sonediameter i mm i følge EUCAST 2018.

### 2.2.1 Nedfrysning av bakterier

Agar-skålene med rendyrkede Gram-negative bakterier måtte også fryses ned slik at de kunne brukes videre i prosjektet for påvisning av antibiotikaresistente gener. Deler av agaren med bakteriekolonier med skåret ut og nedfrosset i et eppendorfrør med i Todd Hewitt buljong i -80 °C (Se kapitel 6).

## 2.3. CHROMagar påvisning av resistensgener hos Gram-negative bakterier

Biomerieux (CHROMagar) produserer kromogene næringsmedier som kan detektere resistensgener for extended spectrum beta-laktamase (ESBL) og carbapenemase resistente bakterier. Bakterierprøvene ble sådd ut på de kromogene kulturmediene og satt i varmeskap på 37°C i 48 timer. Genfamiliene som ble testet var OXA, CARB og ESBL. Vekst tyder på at bakterien har de resistensgener som den aktuelle Chromagar-skålen er selektert for. Dette vil si at alle bakteriene som vokser på ESBL skåler har en ESBL mekanisme.



Figur 6. Bilde av CHROMagar.

De ulike bakterietypene vokser med ulike farger slik at man lett kan se hvilke bakterier som har resistensfunksjon. Vekst og farge på koloniene på de forskjellige Chromagar-skålene ble registrert og notert ned i en tabell (se kapittel 3).

## 2.4 DNA-isolering

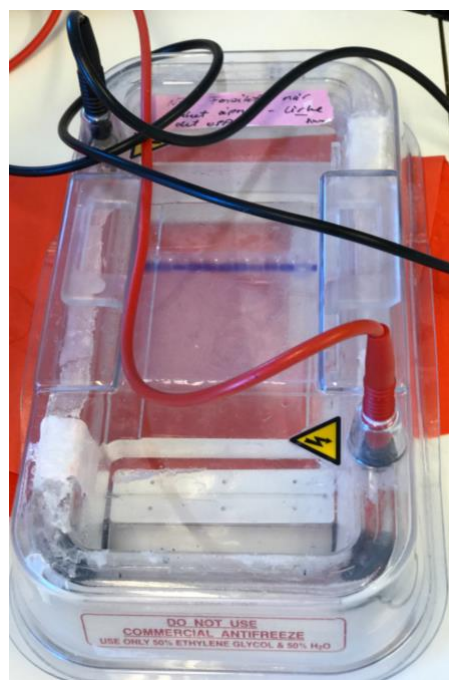
DNA-isolering er en metode for å skille arvestoffet (DNA) til en organisme fra resten av bakterien. For å isolere DNA må man ødelegge/løse opp lipidmembranen til bakterien. Deretter bruker man enzym (proteinase K) for å ødelegge proteinstrukturen i cellen. Det er viktig at valgt enzym ikke ødelegger DNAet som skal isoleres. Til slutt må man skille ut de andre bestanddelene i cellen, slik at man sitter igjen med arvestoffet. DNA kan sees som synlige pellets når isoleringen er ferdig. DNA brukes så videre til polymerase chain reaction (PCR)[34]

DNA-isoleringen ble gjennomført i henhold til protokoll fra produsent (Qiagen)( se kapitel 6). Der Vitek2 id gav et for lavt score for identifikasjon ble det gjennomført *16S rRNA* gensekvensering som supplerende identifikasjonsmetode.

### 2.4.1 Elektroforese-sjekk av kvalitet på DNA-isoleringen

Elektroforese er en teknikk som blant annet benyttes for å skille DNA- eller RNA fragmenter med ulik størrelse. Prinsippet er basert på at negativt ladede molekyler vandrer mot anoden (positiv pol) eller mot katoden (negativ pol) avhengig av ladning på molekylet. Ettersom DNA er negativt vil det vandre mot positiv pol.

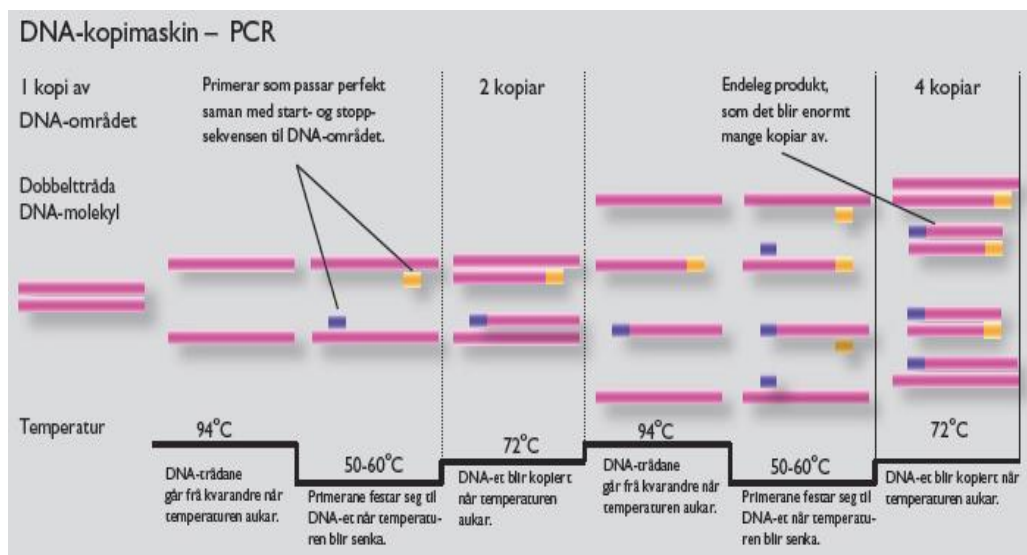
Første brønn i agarosegel (se kapitel 6) ble det tilsatt stige med fragmenter med kjent størrelse (1kb+, Invitrogen/Thermofisher). Deretter ble DNA-prøver tilsatt til hver sin brønn. Elektroforese ble her benyttet for å sjekke om DNA-isoleringen var vellykket. Etter elektroforesen ble det observert ett distinkt enkeltbånd som lå høyt i gelen, det vil si at DNAet var intakt.



Figur 7. Bildet ovenfor viser gelelektroforese koblet til strømkilde.

## 2.5 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR er en metode som benyttes for å isolere og amplifisere spesifikke deler av DNA genomet. Metoden er basert på tre repeterende prosesser med ulik temperatur. Temperaturen som er ønskelig kan stilles inn på PCR-maskinen. Første prosess er denaturering av DNA. PCR-maskinen varmer opp dobbeltrådet DNA til ca 96 °C, hvor det denatureres og enkeltrådene kan skille lag. Andre del av prosessen er annealingsfasen.



Figur 8: Skjematisk tegning av PCR-prinsippet [35]

Under annealingsfasen senkes temperaturen til 40-65 °C slik at enkeltrådene kan reagere og feste seg til den primeren som er komplementær til sekvensen man ønsker å amplifisere. Det er viktig at temperaturen er lav nok til at hybridiseringen mellom primer og DNA-tråd kan foregå, men høy nok til at hybridiseringen skal være spesifikk nok. Siste og tredje prosess kalles elongeringsfasen. Her heves temperaturen til 72 °C som er tilpasset DNA-polymerasen, slik at polymerasen da kan replikere DNA. Disse tre prosessene utgjør en syklus. PCR-maskinen kan stilles inn etter hvor mange sykluser man ønsker. Det nye DNAet som lages etter en syklus brukes videre som templat for nytt DNA. Dette vil gi en eksponentiell økning i DNA[36].

## 2.5.1 Primere

Primer er korte, syntetiske fragmenter (oligonukleotid) av DNA som brukes for å indusere syntese av DNA i PCR. Primer kan binde seg til bestemte sekvenser i DNA og muliggjør amplifisering av bestemte områder. Primeren er komplementær til de to trådene i DNA. Til hver PCR trengs det to primere. En som er komplementær til starten av genet (forward) og en til slutten (revers). På denne måten er det mulig å isolere ønskede områder av DNA som ellers ville vært utilgjengelig.

PCR ble kjørt med hensyn på spesifikke resistensgener som var relevante for de aktuelle bakterieartene som var blitt detektert. Relevante resistensgener for disse bakteriene var TEM, AmpC, NDM, OXA og KPC [37]. Dette er resistensgener som forekommer i Europa og er derfor spesielt interessante [38].

Primer	Gensekvens (5'-3')	Gen	Produktstørrelse (bp) <sup>b</sup>	Annealing	Referanse
OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	bla <sub>OXA</sub> -48	438	50	Poirel et al. 2011
OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	bla <sub>OXA</sub> -48			
KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	bla <sub>KPC</sub>	798	50	Poirel et al. 2011
KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	bla <sub>KPC</sub>			
NDM-F	GGTTGGCGATCTGGTTTTTC	bla <sub>NDM</sub>	621	55	Poirel et al. 2011
NDM-Rev	CGGAATGGCTCATCACGATC	bla <sub>NDM</sub>			
TEM-Forw	GCGGAACCCCTATTTG	bla <sub>TEM</sub>	963	50	Olesen et.al 2004
TEM-Rev	ACCAATGCTTAATCAGTGAG	bla <sub>TEM</sub>			
AMPC-Forw	CTACGGTCTGGCTGCTA	bla <sub>Ampc</sub>	168	47	Olesen 2004
AMPC-Rev	TGGAGCAAGAGGCGGTA	bla <sub>AMP</sub>			
OXA-forw (type2)	ATGAAAACACAATACATATCAACTTCGC	bla <sub>OXA</sub>	442	50	Olesen 2004
OXA- rev (type 2)	GTGTGTTTAGAATGGTGATCGCATT	bla <sub>OXA</sub>			

Tabell 9: Skjematisk fremstilling av primere som var relevant for påvisning av resistensgener [1, 39, 40]

Det ble kjørt gelelektroforese av alle PCR-reaksjonene for å detektere produkt av resistensgener (se kapitel 6).

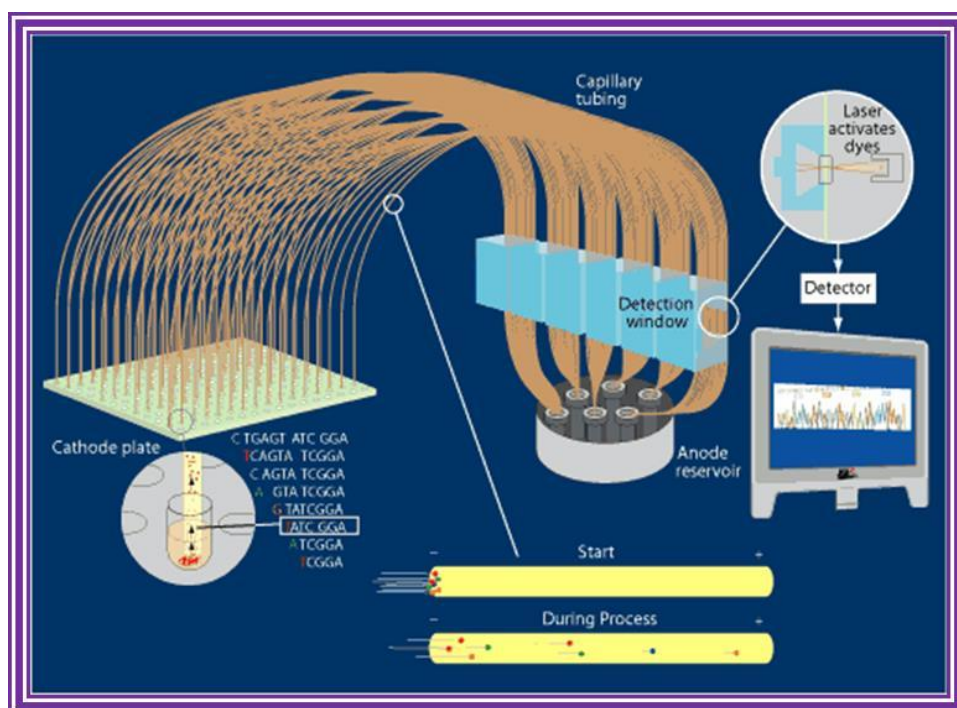
### **2.5.2 16S rRNA genet:**

*16S rRNA*-genet brukes som standard for klassifisering og identifisering av mikrober. Dette er fordi *16S rRNA* er tilstede hos de fleste mikroorganismene. Ribosomal ribonukleinsyre (rRNA) er RNA-komponenten i ribosomet, og er avgjørende for proteinsyntese i alle levende organismer. Den utgjør det overordnede materialet i ribosomet, som er 60 % rRNA og 40 % protein i vekt. I tillegg til at det finnes i alle mikroorganismer inneholder *16S rRNA*-genekvenser hypervariable regioner som kan gi artsspesifikke signatursekvenser for identifikasjon av bakterier. Etersom *16S rRNA* har signatursekvenser er det blitt en utbredt metode å bruke i medisinsk mikrobiologi som et raskt og billig alternativ til fenotypisk metoder for bakteriell identifikasjon. (24)

I dette prosjektet var det ønskelig å identifisere bakteriene gjennom å bruke *16S rRNA* genfragmenter videre til Sangersekvensering for å identifisere mikrobene. For å kunne få til dette, må man ha et rent PCR-produkt (se kapitel 6). Deretter må det rene PCR-produktet fortynnes og merkes med ddNTP, dvs sekvenseringsnukleotider vha en ny PCR med BigDye 1.1 sekvenseringskit. Til slutt ble sekvenseringsproduktet rensset gjennom Sephadex G50 kolonne, vakuu tørket og løst i formamid. Produktet kunne deretter sendes inn i sekvenseringsmaskinen.

## 2.6 Sangersekvensering

Sangersekvensering er den teknikken som er den mest brukt for sekvensering av enkelttrådet DNA. Hensikten med DNA-sekvenseringen er å lese av baseparrekkefølgen til et genfragment. Etter at 16S PCR-produktet var amplifisert kunne det brukes til automatisk Sanger-sekvensering. Hver base detekteres ved å ha en spesifikk fluorescens. Dette gir ulike farger avhengig av hvilket modifisert nukleotid (ddNTP) som terminerer DNA-syntesen. DNA-polymerasen, frie nukleotider deoksynukleotider (dNTP) og ddNTP tilsettes hybridert av DNA-fragment og syntetisk oligonukleotid primer. Primeren bestemmer hvor kopieringen skal begynne. DNA- polymerasen legger til DNA-baser i templatet, men stopper når det kommer ddNTP. ddNTP mangler OH-gruppe og har derfor ikke muligheten til å binde nye baser. Dette gjør at man får tråder med ulike lengder. DNA-syntesen kunne så starte. Automatisk sekvensering også kalt kapillærsekvensering gjør at man ikke trenger fire ulike rør med hver sin deoksynukleotid, men at alle fire deoksynukleotidene kan blandes i samme rør og skilles ut senere ved hjelp av fluorescensfarger. En laser sender ut lys som eksiterer den fluoriserende markøren på ddNTP. Fargen registreres i en sensor som sender signalet til en datamaskin. Slik kan sensoren registrere identitet og rekkefølge av produktene og dermed konstruere DNA-sekvensen. [41]



Figur 10: Illustrasjon av kapillærsekvensering.[42]



Sekvenseringsmaskinen lagrer sekvenseringsresultatene som kromatogramfiler og tekstfiler med sekvensene. Etersom programmet ikke er helt nøyaktig var det nødvendig med en manuell gjennomgang for å sjekke og eventuelt rette på de basene som manglet eller som var tolket feil i Sequencher 5.2. Deretter kunne man kopiere et visst antall baser (70-300 bp) inn NCBI Blast tools for å sjekke identifikasjon.

## 3. Resultater

### 3.1 Identifikasjon ved Mikrobiologisk Diagnostisk Service

Bakterier som vokser aerobt på et selektivt vekstmedium (Mac Conkey agar) er i stor grad Gram-negative enterobakterier. Det ble høstet inn 42 bakterieprøver fra Mac Conkey agar-skåler til dette prosjektet. De ble analysert og gitt identifikasjon ved Mikrobiologisk Diagnostisk Service ved Institutt for Oral Biologi. De ble phenotypisk identifisert ved hjelp av et Vitek2 instrument som analyserer hvilke metabolitter bakterien benytter i sin vekstfase. Alle 42 prøvene fikk excellent match (96-99 % identitet). Identitetsprosenten kan leses i tabellen på side 26. Det ble funnet 11 ulike bakteriearter fra de 42 prøvene som ble screenet. En av prøvene viste gram-positive bakterier og ble fjernet fra prosjektet.

<b>Bakterieart</b>	<b>Forekomst</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	7
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Hafnia Alveii</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	3
<i>Raoultella planticola</i>	2
<i>Rahnella aquatilis</i>	2

Tabell 11. Oversikt over fakultative gram bakteriearter som ble identifisert

### 3.2 Antibiotikasensitivitets testing (AST)

Antibiotikatesting ved hjelp av Sensi-Disc lapper (BD puls) ble gjennomført for alle de 42 bakterieprøvene. Antibiotikaresistens ble testet på antibiotikaene som står i tabell nedenfor.

Antibiotika	Forkortelse
Pencillin 2 IU	PEN
Clindamycin 2 µg	CLI
Amoxicillin 10 µg	AMO
Amoxicillin 20 µg	AMO2
Tetracyclin 10 µg	TETRA
Ciprofloksacin 5 µg	CIPRO

*Tabell 12. Oversikt over hvilke antibiotika som ble brukt i prosjektet*

Tabellen nedenfor viser forekomsten av antibiotikaresistens hos de ulike bakteriene. R står for resistens og S står for sensitiv. Ut fra tabellen kan man lese at alle bakteriene hadde resistens for en av antibiotikatyper. De fleste bakteriene var resistente mot fire av de sju antibiotikatyper. Penicillin, Clindamycin, Amoxicillin 10 µg og Amoxicillin 20 µg, men sensitiv for Ciprofloksacin.

Prøvenummer	Identifikasjon	Resistensprofil										Prosent identitet
		PEN	CLI	AMO	AMO	MTR	CIPRO	TETRA				
10740	Enterobacter cloacae; Pantoea spp	R	R	R	R	•	S					99 %
10734	Enterobacter cloacae	R	R	R	R	•	S					97 %
10744	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S					99 %
10742	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	•	S					96 %
10724	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	•	S				S	98 %
10723	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	•	S					96 %
10796	Enterobacter gergoviae	R	I	R	R	•	••					99 %
10757	G-staver	R	R	S	S	•	••					97 %
10802	Enterobacter cloacae	R	R	R	R	•	S			I		95 %
10799	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S			S		99 %
10793	Escherichia coli	R	R	S	S	•	S			S		99 %
10842	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	I	S					99 %
10838	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S					99 %
10854	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S					98 %
10834	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S					99 %
10851	Enterobacter cloacae	R	R	R	R	•	S					97 %
10824	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S					99 %
10819	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S					99 %
10847	Citrobacter freundii	R	R	R	R	•	S					97 %
10915	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S			S		99 %
10882	Ingen funn	S	S	S	S	•	••					
10893	Pseudomonas aeruginosa	R	R	R	R	•	S					99 %
10860	Enterobacter cloacae; klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	•	S					99 %
11153	(Hvit) Pantoea ssp: Citrobacter freundii	R	R	R	R	•	S			S		99 %
11153	(Rosa) Pantoea ssp: Citrobacter freundii	R	I	S	S	•	S					99 %
10912	Hafnia Alvei	R	R	R	R	•	S			S	R	93 %
10917	Stenotrophomonas maltophilia	R	R	R	R	•	I			I		99 %
10922	Stenotrophomonas maltophilia	R	R	R	R	•	S			I		99 %
10952	Serratia marcescens	R	R	R	R	•	S			S	R	99 %
10954	Raoultella planticola	R	R	R	R	•	S			S	I	95 %
10957	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S			S	R	97 %
10981	Enterobacter cloacae	R	R	R	R	•	I			R		99 %
10982	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	•	I			S		99 %
10978	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S			S		99 %
11034	Raoultella planticola	R	R	R	R	•	S			S	I	99 %
11030	Serratia marcescens											99 %
11056	Aaromonas spp; Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	R	R	R	R	•	S			S		98 %
11069	Serratia marcescens	R	R	R	S	•	S			S	R	99 %
11071	Escherichia coli	R	R	S	S	•	S			S		99 %
11140	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	R			S		99 %
11139	Klebsiella oxytoca	R	R	R	R	•	S			S	R	99 %
11292	Rahnella aquatilis	R	R	R	R	•	S			S		93 %
11286	Rahnella aquatilis	R	R	R	R	•	S			S		99 %

Figur 13. Oversikt over bakterienummer, identifikasjon og resistensprofil.

### 3.3 Påvisning av extended spectrum betalactamase (ESBL) i bakterier ved dyrkning på ESBL-CHROMagar-skåler

Bakterieveksten på ESBL-skåler med ulik farge gir informasjon om hvilke bakterier som har en ESBL- resistensmekanisme.

Tabellen viser hvilken farge veksten på mediet kan ha og hvilken bakteriestamme som knyttes opp mot den fargen.

Farge	Bakteriestamme
Lilla	<i>E.coli</i>
Blå	<i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter</i>
Grønn	<i>Pseudomonas CPE</i>
Hvit	<i>Acinetobacter</i>

Tabell 14. Oversikt over mulige resultat i CHROMagar



Figur 15. Vekst på CHROMagar

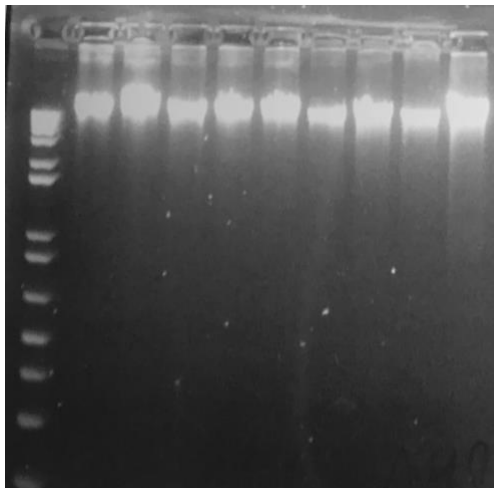
Det ble detektert ESBL resistensmekanisme hos 35 av 42 bakterieprøver. Se tabell nedenfor.

Prøvenummer	Identifikasjon	Resistensgen					
		OXA	Farge	CARB	Farge	ESBL	Farge
10740	Enterobacter cloacae; Pantoea spp	X	LILLA	-	-	-	-
10734	Enterobacter cloacae	X	LILLA	X	LILLA	X	GRØNN
10744	Klebsiella oxytoca	-	-	X	LILLA	-	-
10742	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	-	-	-	-	-	-
10724	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10723	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10796	Enterobacter gergoviae	-	-	-	-	-	-
10757	G-staver	X	HVIT	-	-	X	HVIT
10802	Enterobacter cloacae	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10799	Klebsiella oxytoca	-	-	-	-	-	-
10793	Escherichia coli	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10842	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	-	-	-	-	-	-
10838	Klebsiella oxytoca	-	-	X	LILLA	-	-
10854	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	-	-	X	GRØNN
10834	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10851	Enterobacter cloacae	X	LILLA	X	LILLA	X	GRØNN
10824	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10819	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10847	Citrobacter freundii	-	-	X	LILLA	-	-
10915	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10882	Ingen funn	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10893	Pseudomonas aeruginosa	-	-	X	HVIT	X	HVIT
10860	Enterobacter cloacae; klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	X	LILLA	X	LILLA	-	-
11153	(Hvit) Pantoea ssp: Citrobacter freundii	X	LILLA	X	LILLA	-	-
11153	(Rosa) Pantoea ssp: Citrobacter freundii	X	LILLA	X	LILLA	x	LILLA
10912	Hafnia Alveii	X	LILLA	X	LILLA	X	GRØNN
10917	Stenotrophomonas maltophilia	X	HVIT	X	GRØNN	X	GRØNN
10922	Stenotrophomonas maltophilia	-	-	X	GRØNN	X	GRØNN
10952	Serratia marcescens	-	-	-	-	X	GRØNN
10954	Raoultella planticola	X	LILLA	X	LILLA	-	-
10957	Klebsiella oxytoca	-	-	-	-	X	HVIT
10981	Enterobacter cloacae	-	-	X	LILLA	-	-
10982	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	-	-	-	-	-	-
10978	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	-	-	-	-
11034	Raoultella planticola	X	LILLA	X	LILLA	X	GRØNN
11030	Serratia marcescens	X	LILLA	X	LILLA	X	GRØNN
11056	Aaromonas spp; Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	X	LILLA	X	LILLA	-	-
11069	Serratia marcescens	X	LILLA	X	LILLA	X	LILLA
11071	Escherichia coli	X	LILLA	X	LILLA	-	-
11140	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	X	LILLA	-	-
11139	Klebsiella oxytoca	X	LILLA	X	LILLA	-	-
11292	Rahnella aquatilis	-	-	-	-	-	-
11286	Rahnella aquatilis	-	-	-	-	-	-

Tabell 16. Oversikt over hvilke bakterieprøver som fikk påvist på ESBL Chromagar-skål og hvilken farge som kom til uttrykk. (Kolonifargen kan identifisere bakteriegrupper, men ikke gener i seg selv)

### 3.4 DNA-isolering

For isolering av DNA ble det benyttet et kit fra Qiagen (DNeasy blood and Tissue kit). Etter ekstrahering ble kvaliteten på prøvene dobbeltsjekkert ved gelelektroferese. DNA-isoleringen var vellykket og inneholdt mye DNA.



*Figur 17. Gelbilde av totalt- DNA. En brønn utgjør DNA til en bakterieprøve.*

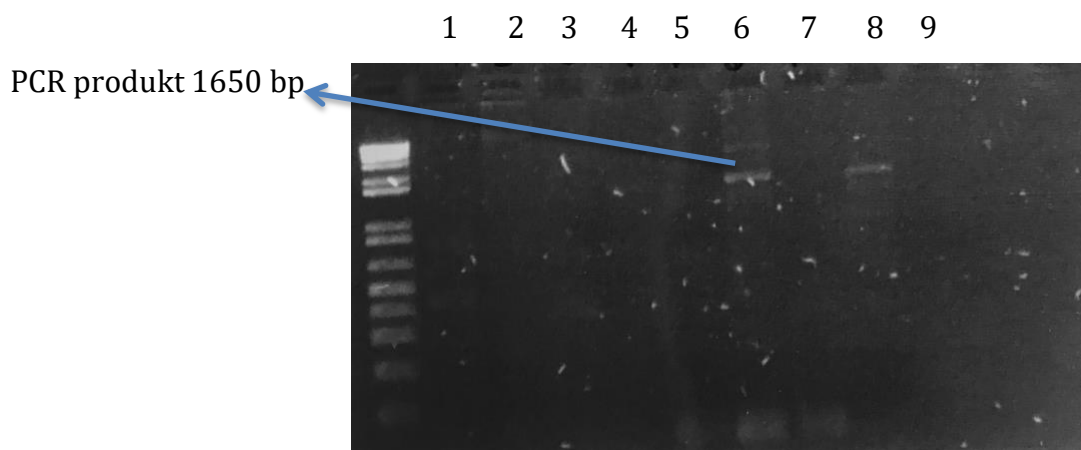
## 3.5 PCR-påvisning av resistensgener

Hensikten med denne delen av prosjektet var å studere forekomsten av resistensgener hos enterobakteriene som ble identifisert tidligere i prosjektet. Vi ønsket spesielt å teste prøvene på veldokumenterte antibiotikaresistensgener som forekommer i Europa. Slik som OXA, TEM, NDM, KPC og AmpC [40]. Ettersom vi ønsket et spesifikt genområde ble det benyttet spesifikke ”forward” og ”reverse” primere. Eksempelvis OXA-R og OXA-F, NDM-R og NDM-F, TEM-R og TEM-F.

### 3.5.1 PCR 1

Etter vellykket DNA-isolering kunne DNAet brukes videre for påvisning av resistensgener. For første primertest ble ni prøver valgt. Primerne som ble brukt var OXA, NDM og KPC (se kapittel 6) [1]. Det ble valgt en felles annealingstemperatur på 52 °C. Annealingstemperaturen ble valgt etter metodebeskrivelse fra Poirel 2011 [1]. PCR-kjøringen ble gjennomført med 2 µl templat.

De ni prøvene som var valgt var. 11139, 10922, 11153-R, 11140, 10824, 10851, 10912 og 10860, og ble i samme rekkefølge plassert i brønn 1-9.



Figur 18. Gelbilde av resistensbånd for OXA1-gen

På gelbildet over var det tydelige PCR produkt i brønn 6 og 8.

Det ble ikke detektert noen PCR produkt for KPC primere, men to av prøvene hadde PCR produkt for NDM primere. Hvilke prøver som hadde synlige PCR produkt er notert i tabell



24. Under første PCR-kjøring ble det ikke tatt hensyn til annealingstemperaturen for hver primer.

### 3.5.2 PCR 2

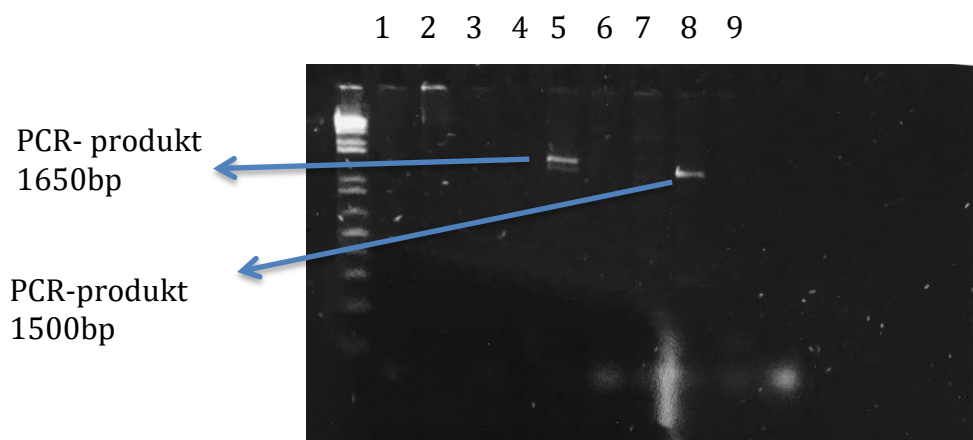
På grunn av få PCR produkt under PCR-kjøring 1 ble PCR-kjøring 2 gjennomført med 4 µl templat i stedet for 2 µl. De samme ni prøvene ble testet igjen. Prøvene ble nå testet for OXA, NDM, KPC, AMPC, TEM og OXA2 resistensgener.

	OXA+ Polymerase (18 µl)	NDM + polymerase (18 µl)	KPC + polymerase (18 µl)	AMPC + polymerase (18 µl)	TEM + polymerase (18 µl)	OXA2 + polymerase (18 µl)
4 µl Templat	1	2	3	4	5	6
A	11139	11139	11139	11139	11139	11139
B	10922	10922	10922	10922	10922	10922
C	11153-R	11153-R	11153-R	11153-R	11153-R	11153-R
D	11140	11140	11140	11140	11140	11140
E	10824	10824	10824	10824	10824	10824
F	10851	10851	10851	10851	10851	10851
G	10912	10912	10912	10912	10912	10912
H	10860	10860	10860	10860	10860	10860

7	8	9	10	11	12
Nullprøve OXA+ TE (4 µl)	Nullprøve NDM + TE (4 µl)	Nullprøve KPC + TE (4 µl)	Nullprøve AMPC + TE (4 µl)	Nullprøve TEM + TE (4 µl)	Nullprøve OXA 2 + TE (4 µl)

Tabell 19. Tabellen viser hvordan prøvene ble fordelt i PCR-brettet.

Ingen PCR produkt ble registret for TEM, KPC og AMPC primere.



Figur 20. Gelbilde av PCR produkt for OXA 2

Det ble registrert PCR produkt i brønn 5 og 8 for OXA2 primer. I tillegg ble det registrert PCR produkt for OXA og NDM primere. PCR produkt ble registrert for brønn 4, 9, 10, 11, 12, 13. En oversikt over hvilke prøver som fikk ulike PCR produkt vises i tabell 24.

### 3.5.3 PCR 3

I tredje PCR runde, ble alle prøvene testet for TEM, NDM, OXA2 og AmpC primere (se kapitel 6). Under denne gjennomkjøringen ble annealingstemperaturen bestemt etter smeltepunktstemperaturen til de ulike primerne og ikke etter referanse-artikkelen der primerne ble designet og brukt.

	1	2	3	4	5	6
A	11139	10915	10757	10838	10742	10978
B	10922	10847	10723	10796	11034	11286
C	11153-H	10744	11153-R	10834	10952	10917
D	11140	11071	11069	10819	10981	Nullprøve
E	10824	10893	10793	10854	10802	
F	10851	11056	10842	10802	11292	
G	10912	10729	10982	10734	11030	
H	10860	10799	10954	10740	10924	

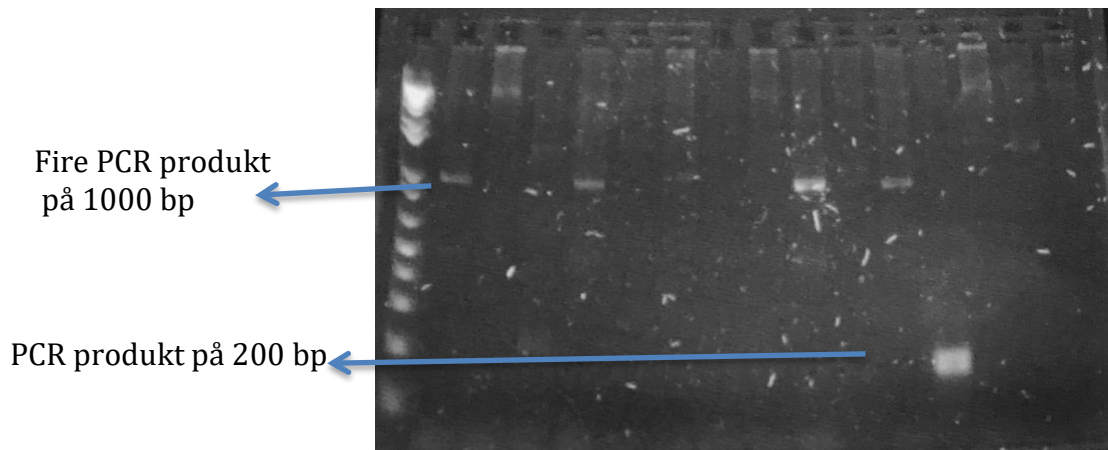
Tabell 21. Oversikt over prøvenummer i PCR-brønnbrett.

Nummer	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4
0	Stige	Stige	Stige	Stige
1	11139	10799	10802	10978
2	10922	11139	10734	11286
3	11153-H	10757	10740	10917
4	11140	10723	10742	Nullprøve
5	10824	11153-R	11034	
6	10851	11069	10952	
7	10912	10793	10981	
8	10860	10842	10802	
9	10915	10982	11292	
10	10847	10954	11030	
11	10744	10838	10924	
12	11071	10796		
13	10893	10834		
14	11056	10819		
15	10729	10854		

Tabell 22. Oversikt over prøvenummer i gel.

Etter gjennomført gelelektroferese for OXA, NDM og TEM primere, ble det ingen tydelige PCR produkter. Derimot ble det flere synlige PCR produkt når prøvene ble testet med AmpC-primere. Synlige bånd etter gel-elektroforesen av PCR-produktene bekreftet at denne primeren og annealingstemperaturen fungerte for påvisning av resistensgener.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Figur 23. Gelbilde av resistensbånd for AmpC. Gel 1.

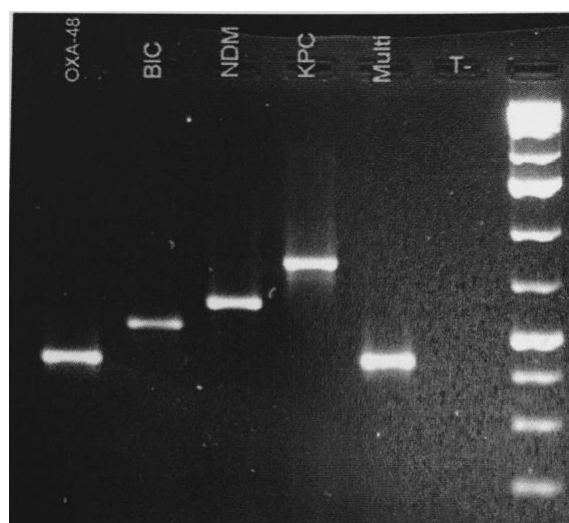
PCR produkt ble registrert for brønn 1, 4, 6, 9, 11 og 12. I gel 2 ble det registrert resistensbånd for AmpC i brønn 6, 10 og 13. Gel 3 ble det registrert PCR produkt i brønn 2 og 4. I gel 4 ble det registrert PCR produkt i brønn 1.

En samlet oversikt over de ulike PCR produktene og størrelsen på PCR-produktene er illustrert i tabell 24 nedenfor. Størrelsen på PCR-produktene ble målt ved å ta forholdet mellom vandrelengden på stigebåndene med kjent molekylstørrelse og PCR-produkt.

Prøvenummer	Identifikasjon	PCR-produktstørrelse bp			
		AMPC	OXA1	OXA2	NDM
10734	<i>Enterobacter cloacae</i>	2000			
10744	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1000			
10742	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>ssp pneumoniae</i>	200			
10834	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1200			
10851	<i>Enterobacter cloacae</i>	1000	2000/1650		
10915	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1000			
10912	<i>Hafnia Alveii</i>		1650	1650	1600
10922	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	2000			1600
10954	<i>Raoultella planticola</i>	200			
10978	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1000			
11056	<i>Aaromonas spp;</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>ssp pneumoniae</i>	1650			
11153R					350
11069	<i>Serratia marcescens</i>	1500/1200			
11071	<i>Escherichia coli</i>	200			
11140	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1000			
11139	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1000			

Tabell 24. Oversikt over hvilke prøvenummer som hadde hvilke resistensgener.

For AMPC var det forventet å finne resistensbånd på ca 798 bp. Noen av resistensbåndene som ble påvist hos i prosjektet lå noe høyt i forhold til hva det gjorde i Poirel sin artikkel [1]. OXA1 resistensbåndene skulle angivelig ligge rundt 438 bp. De resistensbåndene vi fikk lå rundt 1650 bp. NDM-resistensbåndene skulle ligge på rundt 621 bp. Det ble observert resistensbånd på 1600.



Figur 25. Oversikt over hvor de ulike resistensbåndene skal foreligge. [1]

### 3.6 Sangersekvensering

Sangersekvensering ble brukt som metode for å sekvensere PCR- produktet *16S rRNA genet*. Alle sekvensene ble redigert og kjørt opp mot NCBI-databasen, NCBI (National Center for Biotechnology Information). Der bruker man BLAST (Basic Local Alignment Search Tools). BLAST søket finner regioner av likhet mellom biologiske sekvenser. Programmet sammenligner nukleotid- eller proteinsekvenser med sekvensdatabaser og beregner den statistiske signifikansen. Ut fra dette kunne man dobbeltsjekke om identifikasjonen som ble funnet med Vitek2 var korrekt. Identifikasjonen ble dobbeltsjekket to ganger, en gang ved Forward sekvensering vha primer *16S rRNA 334F* og andre gang med revers sekvensering vha primer *16S rRNA for 939R*. Alle identifikasjonene som ble gjort med Vitek2 var excellent match, det vil si at prosentene var høye. Selv om alle prøvene fikk excellent match ble prøvene dobbeltsjekket opp mot *16S rRNA* gensekvensering.

Sekvenseringsresultat fra *16S rRNA* gensekvensering er vist i tabell 26 på neste side. I tabellen er det laget et fargekodesystem. Grønn farge indikerer at ID stemmer opp mot Vitek2. Rød farge har ID som avviker fra Vitek2. Blå farge indikerer at det ikke ble lik ID mellom for begge identifikasjonene, men at en av identifikasjonene stemmer.

Ved sangersekvensering fikk vi bekreftet 35 av 42 identifikasjoner gjort ved Vitek2. Mens en av prøvene ble fjernet fordi det viste gram positiv bakterie. De siste 6 prøvene fikk ikke en god nok lesbar DNA-sekvens, dermed ble Vitek2 resultatet fastholdt.

ID-nummer	334 Antall baser	prosent identitet	ID-nummer	939 antall baser	prosent identitet
10723	<i>Serratia marcescens</i> strain HAK_01_16S ribosomal RNA gene	187	100 %	10723	<i>Citrobacter sedisakii</i> strain D5_16S ribosomal RNA gene
10724	Ingen matchende ID	78		10724	<i>Klebsiella</i> sp. ZS1_16S ribosomal RNA gene,
10734	<i>Prev. igen</i>	151		10734	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain AFAM65_16S ribosomal R
10740	<i>Pantoea</i> sp. strain U7_16S ribosomal RNA gene	29	100 %	10740	Enterobacteriaceae bacterium INBio_4515B_16S ribo
10742		96		10742	<i>Klebsiella</i> sp. UJWRP0628_16S ribosomal RNA gene
10744	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain BSC5_16S ribosomal RNA gene	153	99 %	10744	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain Bhr1_16S ribosomal RNA ge
10757	Uncultured bacterium clone BCH_8F_cd1_16S ribosomal RN	107	95 %	10757	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain DHT3-1_16S ribosomal RN
10793	<i>Escherichia fergusonii</i> strain RPK61_16S ribosomal RNA gen	227	99 %	10793	<i>Escherichia fergusonii</i> strain
10796	MANGLER			10796	Enterobacter cloacae strain 06-GSL_16S ribosomal R
10799	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain PIB_16S ribosomal RNA gene	195	99 %	10799	<i>Mye forstyrelser</i>
10802	Enterobacter sp. A3E_16S ribosomal RNA gene,	176	99 %	10802	Enterobacter cloacae strain IHRC1A_16S ribosomal R
10819	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain ASB3_16S ribosomal RNA gene,	223	98 %	10819	<i>Serratia marcescens</i> strain PCB103_16S ribosomal R
10824	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain ASB3_16S ribosomal RNA gene	211	99 %	10824	<i>Klebsiella oxytoca</i> partial_16S rRNA gene
10834	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain AKU30_16S ribosomal RNA gene	219	98 %	10834	Enterobacter sp. 111b_16S ribosomal RNA gene
10838	<i>Klebsiella</i> sp. HPC870_16S ribosomal RNA gene	221	94 %	10838	<i>Brucella melitensis</i> strain QY1_chromosome II
10842	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain AR_0158, complete genome	184	94 %	10842	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16S ribosomal RNA gene
10847	<i>Citrobacter freundii</i> strain 18-1, complete genome	180	96 %	10847	Enterobacter sp. SP1_16S ribosomal RNA gene
10851	Enterobacter cloacae strain DKG6 genome assembly, chromosc	218	96 %	10851	Enterobacter cloacae strain RCB417_16S ribosomal R
10854		218		10854	Uncultured bacterium clone RPSD_1aaat2b05_16S ri
10860	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain PIB_16S ribosomal RNA gene,	175	96 %	10860	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MKAS_04_16S ribosomi
10893	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESlike4 sequence	205	97 %	10893	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain KD9KLRG3_16S ribo
10915	<i>Klebsiella</i> sp. strain ASB4_16S ribosomal RNA gene	220	95 %	10915	<i>Klebsiella</i> sp. IPRI17_16S ribosomal RNA gene
10917	<i>Mye forstyrelser</i>			10917	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Rb550_16S ribo
10921	<i>Hafnia alvei</i> strain 15_16S ribosomal RNA gene	210	98 %	10921	Uncultured bacterium clone AD1-2F9A_16S ribosoma
10922	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BCRbA3_16S ribosoma	227	95 %	10922	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain FS16-1_16S ribos
10924	<i>Enterococcus faecalis</i> strain UFVCC_0113_16S ribosomal RN	235	97 %	10924	<i>Mye forstyrelser</i>
10952	<i>Serratia marcescens</i> partial_16S rRNA gene, isolate 38T_1966	146	99 %	10952	<i>Mye forstyrelser</i>
10954	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain CHT2-2_16S ribosomal RNA	183	95 %	10954	<i>Mye forstyrelser</i>
10978	<i>Mye forstyrelser</i>			10978	<i>Mye forstyrelser</i>
10981	Enterobacter cloacae strain RCB963_16S ribosomal RNA gen	197	95 %	10981	<i>Escherichia coli</i> strain UT44_16S ribosomal RNA gen
10982	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain T2945D_16S ribosomal RNA ge	143	86 %	10982	Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone M7-4
11030	Ingen matchende ID	222		11030	<i>Serratia</i> sp. MC12 gene for 16S ribosomal RNA
11034	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain Ro24724	208	96 %	11034	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain PS_16S ribosomal RN
11056	[Enterobacter] aerogenes strain HC050612-1 clone 57_16S rib	196	93 %	11056	<i>Klebsiella</i> sp. RHIZO-3_16S ribosomal RNA gene
11069	<i>Serratia marcescens</i> SA.Ant17_16S ribosomal RNA gene,	195	96 %	11069	<i>Raoultella</i> sp. enrichment culture clone TB44_10_16S
11071	<i>Escherichia coli</i> strain WA2_16S ribosomal RNA gene	213	96 %	11071	<i>Escherichia albertii</i> strain SP20150183_16S ribosoma
11139	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain N9_16S ribosomal RNA gene	199	95 %	11139	<i>Klebsiella</i> sp. LA11E_16S ribosomal RNA gene
11140	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain ASB3_16S ribosomal RNA gene,	212	96 %	11140	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain Bhr1_16S ribosomal RNA ge
11153R	<i>Escherichia vulneris</i> strain HMX1_16S ribosomal RNA gene	166	94 %	11153-H	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain Ro24724
11153H	<i>Citrobacter freundii</i> strain geuD4_16S ribosomal RNA gene,	264	90 %	11153-R	<i>Klebsiella</i> sp. LTGP/AF-6F, complete genome
11286	<i>Mye forstyrelser</i>			11286	<i>Rahnella</i> sp. UJWRP0013_16S ribosomal RNA gene
11292	<i>Rahnella</i> sp. strain SYSU_P40_16S ribosomal RNA gene,	201	97 %	11292	<i>Serratia liquefaciens</i> strain Tv1_16S ribosomal RNA g

Tabell 26: Viser resultatet etter 16S rRNA gensekvensering

## 4. Diskusjon

Første del av prosjektet gikk ut på å identifisere de selekterte gramnegative bakterieartene som var samlet inn fra pasienter med periodontitt. De Gram-negative bakteriene vokste først opp på selektivt medium (MacConkey agar) og deretter sådd ut på blodagar-skål (Brucella) til identifisering via Vitek2 systemet. Alle bakteriene ble identifisert, og fikk excellent match. Vitek2 tar utgangspunkt i metabolitter og ikke DNA. For å dobbeltsjekke identiteten til bakteriene ble det gjennomført kapillærsekvensering som tar utgangspunkt i *16S rRNA* genet til den aktuelle art. Det samsvarte med id mellom Vitek2 og *16S rRNA* sekvensering for 85 % av bakteriekoloniene som ble testet.

Andre del av prosjektet var å kartlegge antibiotikaresistens hos de Gram-negative bakterieartene i tillegg til å påvise eventuelle antibiotikaresistensgener. Kartlegging av antibiotikaresistens ble gjennomført med Sensi-Disc lapper. De antibiotikatyperne som ble benyttet i analysen (se tabell 12) kan være relevante å forskrive for tannleger. Unntaket er ciprofloksacin som ble medtatt pga medikamentets resistensdrivende egenskaper. Sensi-Disc gir ingen informasjon om mekanismen for utviklet resistens hos den aktuelle bakterieart. Ved å benytte CHROMagar-skåler for screening av extended spektrum beta-laktamase (CARB og ESBL) produksjon, ble det observert at 35 av 42 bakterieprøver syntetiserte extended beta-laktamaser. Videre ble det gjennomført spesifikk PCR undersøkelser for kjente beta-laktamase gener i alle bakterieprøvene. Primere som ble benyttet var selektert for de genene som er sentrale for Europa og Skandinavia. Positivt resultat for CHROMagar viste at resistensgener var til stede, mens etter PCR-kjøring ble det bare påvist 20 resistensprodukt for de valgte primerne. Det vil si at de primerne som ble valgt for PCR-kjøring viste seg å ikke være spesifikke nok for de bakterieartene som ble analysert. Det er viktig å forstå at resistens er svært komplekst. For å få full forståelse av resistensen til en bakterie er man avhengig av å sekvensere hele bakteriegenomet. Et eksempel på dette er når man fikk 19 resistensgener ved sekvensering av hele genomet til en bestemt resistens hos en *K. pneumoniae* stamme [43]. Dette viser hvor komplekst og hvor omfattende det er å kartlegge alle resistensgener hos hver enkelt bakteriegruppe. I dette prosjektet var det viktig å få kartlagt at resistensgener forekommer også i orale prøver fra Norge. Hvor mange resistensgener og hvilke mekanismer hver enkelt bakterie har bør arbeides videre med.

En studie gjennomført i 2013-2014 testet flere tusen isolater med *E.coli* og *Klebsiella* for å kartlegge antibiotikaresistens. Det ble blant annet testet antibiotikaresistens mot Amoxillin og Ciprofloxacin som også ble benyttet i dette prosjektet. Etter PCR fant man resistensfamilier som KPC, NDM, OXA. Disse resistensfamiliene ble også brukt i denne oppgaven for å detektere resistensgener. Det ble observert at *E.coli* hadde den høyeste frekvensen av OXA, deretter NDM og så KPC. For *Klebsiella* var KPC mest fremtredende, deretter OXA og NDM. Undersøkelsen visste at Skandinavia har lavere forekomst av disse genene enn andre steder i Europa [40]. Etter gjennomført prosjekt er det helt tydelig at forekomsten av resistens er høy i bakterieprøvene fra pasienter med periodontitt. Alle prøvene viste resistens for antibiotika, men forekomsten av resistensgener er vanskelig å detektere.

Andre studier derimot, indikerer at resistensen øker fra år til år. En svensk undersøkelse ved Karolinska universitetssykehus viste at forekomsten av isolater med resistens mot cefalosporiner økte fra 4 % til 12 % på åtte år [44]. Økningen her gjaldt først og fremst *E.coli* og *Klebsiella*-arter. I tillegg viste undersøkelsen en økning i resistens mot Ciprofloxacin [44]. Selv om det ikke kan sies direkte om det er en økt forekomst av antibiotikaresistens etter dette prosjektet, er det internasjonal konsensus om at antibiotikaresistens hos Gram-negative stavbakterier er en stor samfunnstrussel (står øverst på listen i WHO)[45]. Dette kommer også frem nasjonalt av en rapport fra Norsk folkehelseinstitutt, hvor det sies at det er observert en økt forekomst av Gram-negative karbapenemresistente bakteriearter. Et av tiltaksområdene det skrives om er å bruke mikrobiologisk diagnostikk for å få en mer målrettet antibiotikabehandling, noe som også kan også være en del av konklusjonen av denne studien [46].

**Konklusjon:** Man kan ikke utfra dette prosjektet konkludere med at det er økt forekomst av antibiotikaresistens i Norge, men resultatene kan indikere at periodontal mikrobiota kan representere et reservoar for antibiotikaresistensgener. Det ble kartlagt noen resistensgener i de orale prøvene, men hvor mange og hvilke mekanismer hver enkelt bakterieart har, er et komplisert arbeid som bør videreføres. Funnene indikerer også at mikrobiologisk diagnostikk som inkluderer identifikasjon og resistenstesting kan være et viktig verktøy for klinikerne.



## 5. Ordliste

<b>Agarose</b>	Agarose er en av hovedkomponentene til agar og er en lineær polymer. Agarose brukes til gelfiltering og brukes også som bestanddel i bakteriedykningskåler.
<b>Alignment</b>	Engelsk uttrykk for sammenligning av korresponderende basesekvenser på en DNA-tråd.
<b>Aerob</b>	Tilstrekkelig tilførsel av oksygen. Organismene er avhengig av oksygen for å leve.
<b>Anaerob</b>	Utilstrekkelig tilførsel av oksygen. Organismer lever og vokser uten oksygen.
<b>Annealing</b>	Prosess der komplementært DNA-fragment binder seg til enkeltrådet DNA og danner dobbeltrådet DNA.
<b>Annealingsfase</b>	En fase under PCR-reaksjonen hvor primere kan binde seg til single DNA-tråder/templater.
<b>Apoptose</b>	Programmert celledød
<b>Antibiotikaresistens</b>	Evnen til bakterier til å motstå effekten av antibiotika.
<b>bp</b>	Basepar. Lengen av DNA angis vanligvis i dette.
<b>Betalaktamase</b>	Et enzym som nøytraliserer effekten av visse antibiotika.
<b>Beta-laktam</b>	Klasse av bredspektret antibiotika som inneholder en beta-laktam-ring i molekylstrukturen.
<b>Denaturering</b>	Doppeltrådet DNA løsner til enkeltrådet DNA.
<b>Deoksynukleotider</b>	dATP, dCTP, dGTP og dTTP, byggestener i DNA struktur.
<b>Dental biofilm</b>	Plakk. Organisert bakteriesamfunn som festet til hardvevet i munnhulen.
<b>DNA polymerase</b>	Enzym som katalyserer syntesen av en DNA-tråd (replikasjon).
<b>DNA</b>	Deoksyribonukleinsyre. Arvestoffet i kroppen som består av deoksyribose, en fosfatgruppe og ulike nitrogenbaser.

<b>ESBL</b>	Forkortelse for «extended spectrum betalactamase». Enzym som produseres av bakterier som gjør bakterien resistent for antibiotika.
<b>Elektroforese</b>	Buffersystem hvor man ved hjelp av et elektrisk felt kan separere mange organiske molekyler fra hverandre.
<b>Ervervet resistens</b>	Ervervet resistens oppstår når en bakterietype som i utgangspunktet er følsom mot et antibiotikum ikke lenger er det.
<b>FASTA-fil</b>	Tekstbasert format som representerer enten nukleotidsekvenser eller peptidsekvenser.
<b>Fakultativ bakterie</b>	Kan vokse med og uten oksygen tilstede.
<b>Gen</b>	Arveanlegg. Et spesifikt område på kromosomet.
<b>Gramfarging</b>	Mikrobiologisk fargeteknikk. Teknikken brukes for å skille Gram-negative og gram-positive bakterier.
<b>Gingival væske</b>	Klar væske som siver ut fra sulcus (område mellom tannoverflaten og det gingivale vevet).
<b>Habitat</b>	Foretrukket oppholdssted. Bakterier vokser der miljø og næringstilgang er tilstrekkelig.
<b>Hybridisering</b>	Sammenkobling av to komplementære enkeltrådede DNA-fragmenter.
<b>Hemin</b>	Oksidert hemoglobin. Næringskomponent for ulike bakterier.
<b>Inkubator</b>	Apparat for dyrkning av mikroorganismer ved egnet temperatur.
<b>Kromatogram</b>	En grafisk fremstilling av resultater basert på separasjon-og analysemetoder.
<b>Karbapenemase</b>	Enzym som spalter karbapenem. Gjør bakterien resistent for bestemte laktam.
<b>Kromosom</b>	Genmateriale i cellen hos organismer.
<b>Konjugasjon</b>	Genoverføring. Plasmid eller fragment kan overføres ved cellekontakt, aktiv samkoordinering av genoverføring.
<b>Lipopolysakkarider (LPS)</b>	Store molekyler som består av tre bindende subenheter.

	Finnes i yttermembranen på Gram-negative bakterier.
<b>MIC</b>	Minste inhibitoriske konsentrasjon av antibiotika som hindrer vekst av bakterier.
<b>Medium</b>	Næringssubstrat som brukes til dyrkning av mikroorganismer.
<b>Normalflora</b>	Betegnelse for de mikroorganismer som normalt finnes på menneskekroppen, men som vanligvis er uskadelig.
<b>Nukleotid</b>	Byggestein i RNA og DNA. Finnes fem ulike byggesteiner. Uracil, Guanin, Cytosin, Tymin og Adenin.
<b>Polymikrobiell</b>	Poly betyr mange. Mange mikrober.
<b>Primer</b>	Syntetisk oligonukleotid med en bestemt DNA-sekvens som brukes til genetisk analyse, for eksempel i PCR.
<b>Primerpar</b>	To primere (forward og reverse), som spesifiserer området i et genom eller DNA-fragment som skal amplifiseres.
<b>Primer dimer</b>	Et biprodukt som dannes ved PCR, hvor to primere har blitt bundet sammen ved at de inneholder baser som er komplementære med hverandre.
<b>Peptidoglykan</b>	Finnes i celleveggen hos Gram-negative bakterier.
<b>Prokaryot</b>	Organisme som ikke har cellekjerne. Bakterie.
<b>RNA</b>	Ribonukleinsyre
<b>rRNA</b>	Ribosomal ribonukleinsyre.
<b>Resistens</b>	Motstandsdyktighet.
<b>Sanger sekvensering</b>	Kapillær-DNA-sekvensering.
<b>Sekvensering</b>	Analyse av baserekkefølgen i et DNA-fragment eller rekkefølgen av aminosyrer i et peptid.
<b>Superinfeksjon</b>	En bakterie som overtar og dominerer i et habitat for normal flora.
<b>Supragingival</b>	Over tannkjøttet
<b>Subgingival</b>	Under tannkjøttet
<b>Translokasjon</b>	Utveksling av kromosomfragmenter mellom kromosomene.

<b>Templat</b>	Enkelttrådet DNA som fungerer som mal for syntesen av en ny komplementær DNA-tråd.
<b>Transkripsjon</b>	Syntese av RNA, med DNA som templat
<b>Vertikal genoverføring</b>	Overføring med genene fra foreldre til avkom ved tradisjonell arv.
<b>Økologiske nisje</b>	Uttrykk for hvilken plass en art kan gro og vokse i et økosystem.

## 6. Oppskrifter:

### Rendyrkning på agar-skål

Brucella blod agar med Hemin og Vitamin K1. Næringsrikt medium for isolering og dyrkning av strengt anaerobe organismer fra kliniske prøver.

- Merk bunnen av blodagar-skålen med prøvenummer og dato. Del skålen i to slik at det kan være to prøver i samme agar-skål.
- Ta en koloni fra prøven som skal testes med en sonde. Lag utstryk av bakterier på agar-skålen. Disse skal settes i inkubator med temperatur 37 °C i 1-3 dager.

### Mueller Hinton agar

- Ta et reagensglass og tilfører 2,5 ml av saltvann.
- Densimat måler bakterietettheten (i følge McFarland skala) som man skal ha i reagensglasset. Sett reagensglasset opp i apparatet.
- Bruk en steril bomullspinne og plukk opp litt av en bakteriekoloni fra den rendyrkede prøven. Dupp bomullspinnen ned i reagensglasset helt til det står at bakterietettheten er 0.5 McFarland. Husk å skrive prøvenummer, dato og klokkeslett.
- Plasser agar-skålen på ”spinneren”, deretter påfører du litt av ”væsken” med bakterier fra reagensglasset mens agar-skålen spinner rundt. Påfør middelet to ganger. Husk at bomulldotten ikke skal være for våt.
- Små sensidisc antibiotika (fra Biomerieux) som inneholder ulike typer antibiotika blir plassert på Mueller Hinton medium/agar. Dette gjøres ved hjelp av et ”stempel” (dispenser). Dersom bakterier er følsomme ovenfor antibiotikum vil det bli en klar ring eller sone av inhibering blir sett rundt skiven indikerer ingen vekst.
- Når antibiotikadiscene er plassert på agaren må prøven stå 15 min på benken før den settes i inkubatoren. Prøven skal inkuberes i 20-24 timer før resultatet kan leses av.

### Nedfrysing av bakterier

- Bakteriene som er rendyrket skal fryses ned i Todd Hewitt buljong.
- Skriv prøvenummeret ned på eppendorfrøret.
- Skjær ut en del av rendyrkede bakterien og legg den ned i et eppendorfrør. Husk å brenne av skjærekniven/spatel til neste agar.
- Tilsett buljong slik at det dekker bakterie-agaren.
- Settes først i -20 grader, så i -80 grader til langtidslagring.

**TE-buffer:**

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

**QIAcube protokoll: DNA isolering med DNeasy blood and Tissue kit (cat nr: 69504)**

- Still maskinen inn på riktig program. DNA-bacterial pellet.
- Finn frem bakterieprøvene som ligger i TE-buffer. Prøvene må være i rør som er egnet for maskinen-sample tube RB.
- Bufferne må plasseres riktig i kassetten.
- Merk 1.5 ml collection tubes med prøvenummeret.
- Finn frem Proteinase K.
- Plasser rotor adaptor i stativet, og fyll opp med spin kolonne og eluering/collection tube. Husk å notere plassen til hver enkelt prøve.
- Følg instruksjonene til maskinen. Prøvene skal ha samme plassering som tilhørende adaptor i sentrifugen. Husk derfor plasseringen.
- Når maskinen er i gang, noter tiden for når den skal være ferdig. Når maskinen er ferdig må man ta ut DNA prøvene og sette de i fryseren frem til de skal benyttes til PCR.

**Agarosegel 1, 5 %**

- 0,7 g Agarose GTG måles opp i en kolbe.
- Tilsette 50 ml 1xTBE (Tris-borat-EDTA, 0.089 M Tris-borat, 0.002 M EDTA) til agarosen.
- Løsningen varmes opp i mikroovnen ca 30 x 3 sekunder til man får en homogen masse.
- 3,7 µl fargestoff (GelRed) binder seg til DNA og virker fluoriserende under UV-lys tilsettes i en ny kolbe.
- 40 ml av gel-løsningen tilsettes i et formkar med to kammer for å dele gelen inn i brønn-rekker. Formkaret gir god kontroll på gelen. Sett en lokk over formkaret. Gelen må stå i 30 min før den stivner. Deretter kan den legges i et elektroforesekammer fylt med 1 x TBE-buffer.

### Gel-elektroferese:

- Løft bestemt av kammene, slik at man får 12 brønner per kam. Skjær så i bakkant av 2. brønnekam slik at man får to separerte gel-prøver med 12 brønner hver.
- Legg gelen ned i 1x TBE buffer, bufferen skal ned i brønnene i gelen, men ikke over gelen.
- Tilsett 1,5 µl stige(1 kb Plus DNA Ladder fra Invitrogen/Thermofisher) i første brønn i gelen. Dette er en markør for baseparstørrelsen på prøvene.
- Lag dråper på parafilm med loading 1,5 µl 6x loading buffer (30 % glyserol, 0,25 % bromophenol blue, 0,25 % xylene cyanol FF).
- Tilsett 5 eller 3 µl isolert DNA fra en bestemt prøve til en av dråpene med loading buffer. Bruk så pipette og få opp både loadingbuffer og det isolerte DNAet og før den inn i tilhørende brønn.
- På med lokk og strøm. Kjører mot katode. 1xTBE-buffer i gelen og bufferkaret leder strøm.
- La gelen med strøm stå i ca 40 min.
- Loading buffer inneholder glyserol som forhindrer at DNA flyter opp av brønnene, mens bromophenol blue og xylene cyanol FF er fargemarkører som viser vandrethastigheten under elektroforesen.

Fremkaller bildene med GeneSnap programmet inkludert kamera og skrives så ut et bilde med Thermoprinter.

### Primermiks

Primermiksen består av tre bestanddeler. Første bestanddel er primer+dH<sub>2</sub>O, andre bestanddel er DNA-polymerase/buffer og tredje bestanddel er templat DNA.

Primer for 30 prøver:

- **Bestanddel 1: Primer + ddH<sub>2</sub>O**
  - 7,5 µl 10 µM primer forw
  - 7,5 µl 10 µM primer rev
  - 240 µl dH<sub>2</sub>O

Nye mikrotuber tilsettes 84 µl av primerblandingen over.

- **Bestanddel 2 : DNA-polymerasen + buffer**

- Tilsetter 100 µl DNA polymerase OneTaq (New England Biolabs) til mikrotuber-rørene som inneholder 84 µl av bestanddel 1.

- **Bestanddel 3: Templat**

**Blanding i PCR-brett:**

- Tar ut 18 µl av blandingen som består av 84 µl primer + H<sub>2</sub>O + 100 µl DNA-polymerase OneTaq (New England Biolabs) og tilsetter dette i A-H.
- Deretter tilsettes det 1,5 µl templat (DNA-prøven) i tilhørende brønn der det allerede er tilsatt primer-polymerase-blanding.
- Eks: Tok ut 18 µl av primer/ OneTaq PCR mix. Tilsetter det i brønn A1-AH + nullprøve i A4. Deretter 1,5 µl av templat 11139 og tilsatte det i brønn A1.

**16 rRNA gen PCR:**

Primerblanding :

- 1) 10 prøver: (ganget med 5 for å få til 50 prøver)
  - 2 µl 10 µM 334F *16S rRNA* primer
  - 2 µl 10 µM 939R *16S rRNA* primer
  - 76 µl dH<sub>2</sub>O
  - 100 µl OneTaq x2 (New England Biolab)

Til hver brønn:

- 18 µl av blandingen over + 2 µl DNA.

PCR kjøres på 61 °C annealing

PCR betingelse:

96 °C – 2 min

96 °C- 30 sek

61 °C - 20 sek

72 °C- 30 sek

} 28 syklus

72 °C- 4 min

4 °C-



Prosedyre for sanger sekvensering:

- 2) Exosap-IT (Affymetrix)- fjern primere + ekstra primere.
  - Tilsett 2 µl Exosap-IT i nytt 96-brønns brett.
  - Tilsett 5 µl PCR produkt til de 2 µl exosap.
  - Spinn brønnebrettet og kjør PCR med eget program. 15 min 37 °C og 15 min 80 °C.

Hensikten er å få rent PCR produkt.

- 3) Fortynne det rensede PCR-produktet.
  - tilsett 100 µl ddH<sub>2</sub>O i hver brønn med rensed PCR-produkt.

#### 4) BigDye sekvensering

Sekvenseringsmikslages på følgende måte:

- Fortynn BigDye terminator 1:6 først, deretter bruk 8 ul av (1:6) fortynningen for hver prøve, dvs 80 ul (1:6 fort) BigDye 3.1 til 10 prøver
- Så 2 ul 5xsekvenseringsbuffer for hver prøve, dvs 20 ul til 10 prøver
- Så skal det være 3.2 pmol primer, dvs bruk 0.32 ul 10 uM primer for hver prøve, dvs 3,2 ul for 10 prøver.
- Så tilsett 2.7 ul H<sub>2</sub>O for hver prøve, dvs 27 ul for 10 prøver.
- Sluttvolumet for sekvenseringsmiksen er da 80+20+3+27= 130 ul, i teorien skal det tilsettes 13 ul til hvert rør, men jeg benytter 12.8 ul for at det skal holde til alle prøvene (eller lag mikslages for en ekstra)

Etter at sekvenseringsmiksen er tilsatt så mange rør som skal sekvenseres, så overfør 7 ul av fortynnet Exosap behandlet PCR produkt til sekvenseringsmikslages.

PCR betingelser:

1 min 96 °C Denaturering

10 sec 96 °C

5-7 sec 50-55 °C (annealing må justeres mht primer valg)

4 min 60 °C

25-27 sykluser

Etter PCR så må sekvenserings-PCR-produktet renses, gjennom en G50 sephadex kolonne.

#### 5) Rense PCR-produkt gjennom Sephadex-kolonne etter BigDye PCR:

- 2,6 gram Sephadex tilsettes 40 ml kokende vann. Dette må stå til det er avkjølt (1,5 time) eller stå over natten.

- Tilsett 400  $\mu$ l Sephadex til brønnene.
- Deretter må brønnene sentrifugeres med hastighet 2250 i 3 min. Dette fjerner vannet, slik at man sitter igjen med delvis Sephadex-kolonne i brønnen.
- Hele denne prosessen gjøres to ganger, slik at du sitter igjen med en Sephadex-kolonne i brønnen.
- Tilsetter PCR-produktet i hver brønn med Sephadex-kolonne.
- Under brønnene settes det et nytt brett som kan fange opp produktet som blir sentrifugert. Deretter settes sentrifugen på i nye 2 minutter.
- Produktet som er i det nye brønnbrettet skal brukes videre.
- Det nye brettet settes til vakuumsørking i 30 minutter.
- Tilsett 10  $\mu$ l formamid (deionisert).
- Ristes i 30 min for å blande det sammen med DNA-et i brønnen.

## Litteraturliste

1. Poirel, L., et al., *Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011. **70**(1): p. 119-23.
2. Armitage, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. *Ann Periodontol*, 1999. **4**(1): p. 1-6.
3. Bunæs, D.F. *Ny klassifisering av periodontal og peri-implantat sykdom. Nøkkelenringer*. . 2019 [cited 2019 4.april ]; 129:[Available from: <https://www.tannlegetidende.no/asset/2019/2.pdf>].
4. Baker, J.L., et al., *Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria*. *Trends Microbiol*, 2017. **25**(5): p. 362-374.
5. Aas, J.A. *Nye bakteriearter oppdaget*. 2006 [cited 2018 15.08].
6. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
7. Paster, B.J. *Bruce J. Paster, PhD*. 2014 [cited 2019 24.04.19]; Available from: <https://forsyth.org/person/scientist/bruce-paster>.
8. Lindhe, J., et al., *Clinical periodontology and implant dentistry*. Sixth edition. ed. 2015, Chichester, West Sussex ; Ames, Iowa: John Wiley and Sons, Inc. p.
9. Roberts, A.P. and P. Mullany, *Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010. **8**(12): p. 1441-50.
10. Dreamtime.com. *Gram-positive and Gram-negative bacteria*. 2015 [cited 2018].
11. Degré, M.H., B.; Rollag, H., *Medisinsk mikrobiologi*. 3 ed. 2008, Gyldendal: Gyldendal.
12. helseinformatikk, N. *E.coli tarminfeksjoner- EHEC, EIEC, EPEC, ETEC*. 2018 [cited 2019 10.02.19]; Available from: <https://nhi.no/sykdommer/barn/infeksjoner/e-coli-tarminfeksjon/>
13. Steinbakke, M.S., M.; Urdahl, A.M., *Antibiotikaresistens- kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak*. 2014, Divisjon for smittevern: Folkehelseinstituttet
14. Andersen, C.T.B., H. S.; Grave, K.; Lund, A., *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*, A.S. Lund, G.S., Editor. 2011 Mattilsynet, NORM.
15. Rams, T.E., J.E. Degener, and A.J. van Winkelhoff, *Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota*. *J Periodontol*, 2014. **85**(1): p. 160-9.
16. Rams, T.E., J.E. Degener, and A.J. van Winkelhoff, *Prevalence of beta-lactamase-producing bacteria in human periodontitis*. *J Periodontal Res*, 2013. **48**(4): p. 493-9.
17. Soraas, A., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria are not detected in supragingival plaque samples from human fecal carriers of ESBL-producing Enterobacteriaceae*. *J Oral Microbiol*, 2014. **6**.
18. Holmes, A.H., et al., *Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance*. *Lancet*, 2016. **387**(10014): p. 176-87.
19. Folkehelseinstitutt. *ESBL holdige gramnegative stavbakterier- veileder for helsepersonell*. 2018 [cited 2019 6.april]; Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>.
20. Andersson, D.I.H., D., *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* 2010, *Nature reviews Nature Reviews Microbiology*
21. Øye, I. *Penicillin*. 2018 [cited 2018].

22. Granlund, S., *Antibiotika og virkningsmekanismer*. St.Olavs hospital St.Olavs hospital
23. Hall, B.G. and M. Barlow, *Revised Ambler classification of {beta}-lactamases*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(6): p. 1050-1.
24. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 969-76.
25. Verma, P.U., Aditi.; Tiwari, Monalisa.; Tiwari, Vishvanath., *In-silico Approach Explains Evolution of Beta-lactamases from Penicillin Binding Proteins*. Journal of Proteomics & Bioinformatics 2016: p. 7.
26. Quale, J.S., D. . *Overview of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli*. 2018 [cited 2018].
27. Ljungquist, O. *Karbapenemresistent Escherichia coli finns nu i Sverige*. 2013 [cited 2019 20.01.19]; Available from: <http://lakartidningen.se/Klinik-och-vetenskap/Fallbeskrivning/2013/08/Karbapenemresistent-Escherichia-coli-finns-nu-i-Sverige/>.
28. Simonsen, G.S. *Antimikrobielle midler: karbapenemer*. 2016 20.01.19 [cited 2019; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/28912?expand=1>.
29. Iredell, J., J. Brown, and K. Tagg, *Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications*. BMJ, 2016. **352**: p. h6420.
30. Rossolini, G.M. and J.D. Docquier, *New beta-lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting*. Future Microbiol, 2006. **1**(3): p. 295-308.
31. Brøgger, A. *Rendyrkning*. 2015 [cited 2018].
32. GmbH, B.D. *BRUKSANVISNING – FERDIGLAGDE MEDIUMSKÅLER*.
33. Parker, T.M., A. , *Brucellosis Brucella*, <https://pixnio.com/science/microscopy-images/brucellosis-brucella/bacterial-colonies-on-a-medium-of-sheeps-blood-aga>, Editor. 2014: Pixnio.
34. Biomerieux. *Vitex2*. 2018 [cited 2018].
35. Bioteknologirådet, *DNA-kopimaskin-PCR*, <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/genteknologi-pa-naturfagrommet/>, Editor. 2010: Bioteknologirådet.
36. biovitenskap, I.f. *PCR*. 2011 [cited 2018].
37. Børresen- Dale, A.-L. *Primer*. 2017 [cited 2018].
38. Pfeifer, Y., *Interpretation of ESBL and carbapenemase phenotypes*. 2014, Robert Koch Institut: Robert Koch Institut.
39. Olesen, I., H. Hasman, and F.M. Aarestrup, *Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant Escherichia coli and Salmonella isolated from food animals in Denmark*. Microb Drug Resist, 2004. **10**(4): p. 334-40.
40. Grundmann, H., et al., *Occurrence of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(2): p. 153-163.
41. Ræder, H.R., M.; Njølstad, P.R., *Klinisk molekylærmedisin (3): DNA-sekvensering*. Pediatrisk institutt, Universitetet i Bergen, 2002.
42. Plantcellbiology, *Sequencing using capillary electrophoresis*, [http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Genetic\\_Engineering5A-DNA\\_Synthesis\\_And\\_Sequencing.htm](http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Genetic_Engineering5A-DNA_Synthesis_And_Sequencing.htm), Editor.
43. Liakopoulos, A., D. Mevius, and D. Ceccarelli, *A Review of SHV Extended-Spectrum beta-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1374.

44. Fröding, I.G., C.; Petropoulos, A., *Antibiotikaresistens i blododlingar*. 2016: Karolinska universitetssjukhuset.
45. WHO. *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis*. 2017 [cited 2019 28.04.19]; Available from: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf).
46. Steinbakk, M., et al. *Antibiotikaresistens- kunnskapshull, utfordringer og akutte tiltak*. 2014 [cited 2017; Available from: <https://www.fhi.no/publ/2014/antibiotikaresistens--kunnskapshull/>].