



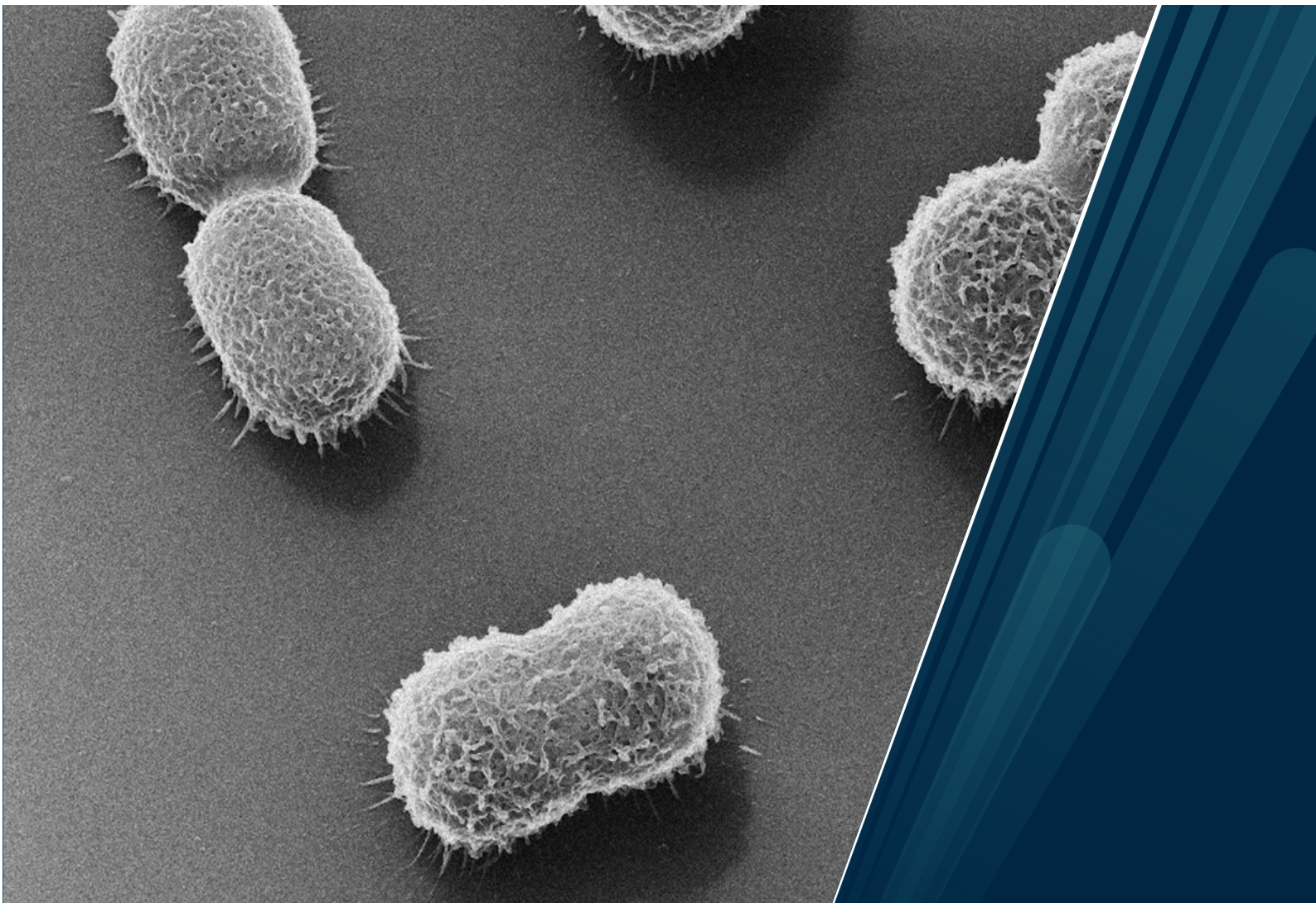
UiT Norges arktiske universitet, Det helsevitenskapelige fakultet, Institutt for farmasi

Innvirkning av syklisk-di-GMP signalisering på antimikrobiell resistens i *Acinetobacter baumannii*

Undersøkelser av relativ genekspressjon og fenotypiske effekter hos transposon insersjonsmutanter i putative c-di-GMP signaliseringsgener

Minh Chau Nguyen Phung

Masteroppgave i farmasi, mai 2020



Forsidebilde: "Acinetobacter baumannii" by Borys Kozielski is licensed under CC BY-NC 2.0 [1].

FORORD

Denne masteroppgaven på 50 studiepoeng ble utført i perioden august 2019 til mai 2020 ved Universitetet i Oslo, Farmasøytisk Institutt ved Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min hovedveileder professor Ole Andreas Løchen Økstad som har gitt meg muligheten til å gjennomføre en masteroppgave for BadBugs-forskningsgruppe. Takk for god oppfølging under hele forløpet med eksepsjonell hjelp til planlegging og innføring av prosjektet, faglige bidrag, tilgjengelighet for rådføring og retting av oppgaven og positive holdninger. En stor takk til stipendiat Claus Michael Goul Larsen som har vært en god støttespiller med en enorm interesse for prosjektet. Takk for verdifulle innspill under våre utallige møter med professor Økstad, tilgjengelighet og gode konstruktive tilbakemeldinger under opplæring og oppfølging på laboratoriet som har sikret et forsvarlig arbeid, men også hjelp til artikkelsøk og tolkning av resultater. I tillegg vil jeg takke overingeniør Beata Mohebi som alltid har vært behjelpelig med praktiske og teoretiske problemstillinger under utførelsen av RT-qPCR og mest av alt for støttende og oppmuntrende samtaler. Videre vil jeg takke resten i forskningsgruppen som har besvart både små- og store spørsmål og til alle våre sammenkomster med mat, kaker og bobler som har gitt glede under denne perioden.

Til slutt vil jeg takke min familie og mine nærmeste venner som har vært med meg gjennom mitt 2-årige masterstudium. Det har vært en svært utfordrende periode både i Tromsø og Oslo, men prosessen har samtidig vært veldig interessant og lærerik. Det har gitt meg mange personlige utfordringer, men også ny kompetanse, mange nye erfaringer, gode venner fra nord og en uforglemmelig tid. Takk for at dere har gitt meg ubeskrivelig støtte, vært oppmuntrende på flere plan og sist men ikke minst beholdt troen når jeg ikke har vært i stand til det selv. Jeg setter stor pris på hver og en av dere!

Oslo, mai 2020

Minh Chau Nguyen Phung

SAMMENDRAG

Antimikrobiell resistens (AMR) utgjør en av de tre viktigste helseproblemene i verden i dag, og kan medføre alvorlige konsekvenser ifølge Verdens helseorganisasjon (WHO).

Resistensutviklingen fører til terapivikt mot infeksjonssykdommer som tidligere lot seg behandle av antimikrobielle midler og flere millioner menneskeliv kan gå tapt, hvis ikke tiltak iverksettes for å redusere forekomsten av AMR. Utviklingen av resistens inkluderer en av de mest kritiske karbapenem-resistente bakterier, *Acinetobacter baumannii*. Evnen til å kunne erverve og uttrykke AMR, samt eksepsjonell overlevelse på både biotiske og abiotiske overflater, gjør at *A. baumannii* grupperes som en av de seks hyppigst forekomne multiresistente (MDR) bakteriene i verden i dag, også kjent som ESKAPE patogener.

Formålet med oppgaven var å undersøke om gener involvert i c-di-GMP signalering kunne være koblet til resistens mot selekterte antimikrobielle midler i *A. baumannii*. Dette skulle gjøres ved å screene ekspresjonen av målgener ved eksponering for sub-MIC nivåer av utvalgte antibiotika ved hjelp av RT-qPCR, samt ved screening for endring i resistensmønster hos et sett transposon insersjonsmutanter i c-di-GMP relaterte gener (*cdg*) i den multiresistente stammen *A. baumannii* AB5075-UW relativt til villtype, ved MIC-analyse. I første del av oppgaven ble det etablert MIC-screening oppsett for *A. baumannii* i laboratoriet, først ved å bruke den apatogene *A. baylyi* ADP-1, og så en ikke MDR-stamme, *A. baumannii* ATCC 17978. Av tekniske årsaker kunne ekspresjonsnivået av *cdg*-genene ikke bestemmes, og forsøket bør gjentas. MIC-screeningen viste at insersjonsmutant i genet ABUW_2255 var minimum fire ganger mer følsom mot amikacin, relativt til villtype. ABUW_2255 koder for et protein med PilZ-domene, et domene som klassisk er kjent å kunne binde c-di-GMP og fungere som effektorproteiner som responderer på endringer i c-di-GMP nivåer i cellen under intracellulær signalisering. Dette studiet utgjør et av de første som viser effekt av c-di-GMP relaterte gener på antimikrobiell resistens. Genet for det ortologe pilZ-domene proteinet er i *P. aeruginosa* identifisert som essensielt for type 4 pilus dannelse og twitching motilitet, dette antas også for pilZ-domene proteinet i *A. baumannii*. Ytterligere studier kreves for å forklare de molekylære mekanismene for hvordan ABUW_2255 påvirker resistens mot amikacin, og for å kartlegge funksjonen av proteinet.

FORKORTELSER

AAC	Acetyltransferase
AME	Aminoglykosidmodifiserende enzym («Aminoglycoside modifying enzyme»)
AMK	Amikacin
AMP	Ampicillin
AMR	Antimikrobiell resistens («Antimicrobial resistance»)
ANT	Nukleotidyltransferaser («Nucleotidyltransferase»)
APH	Fosfotransferase («Phosphotransferase»)
CAZ	Ceftazidim
CARB	«Carbenicillinase»
cDNA	komplementær DNA («Complementary DNA»)
c-di-GMP	Syklisk di-GMP («Bis-(3`-5`)-syklisk dimerisk guanosinmonofosfat»)
CHL	Kloramfenikol
CIP	Ciprofloksacin
CST	Kolistin
CTX-M	«Cefotaximase-Munich»
DEPC	Dietylpyrokarbonat («Diethyl pyrocarbonate»)
DGC	Diguanylat-syklase («diguanylate cyclase»)
DMSO	Dimetylsulfoksyd («Dimethyl sulfoxide»)
DNA	Deoksyribonukleinsyre («Deoxyribonucleic acid»)
dNTP	Deoksyribonukleosid-trifosfat («Deoxynucleoside triphosphate»)
dsDNA	Dobbeltrådet DNA («Double-stranded DNA»)
EDTA	Etylendiamintetraacetat («Ethylenediaminetetraacetic»)
EPS	Ekstracellulære polymerstoffer («Extracellular polymeric substances»)
ESBL	Betalaktamaser med utvidet spektrum («Extended-spectrum beta-lactamase»)
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> og <i>Enterobacter spp</i>
EtOH	Etanol
FC	Foldendring («Fold change»)
FOF	Fosfomycin
FW	Forover primer («Forward primer»)
gDNA	Genomisk DNA

GEN	Gentamicin
GMP	Guanosinmonofosfat («Guanosine monophosphat»)
GTP	Guanosintrifosfat («Guanosine triphosphate»)
HIV	Humant immunsviktvirus («Human Immunodeficiency Virus»)
IMP	“Imipenem beta-lactamase”
IS	Inserjonssekvens («Insertion sequence»)
LB	“Lysogeny broth”
LPS	Lipopolysakkarider («Lipopolysaccharides»)
MBL	Metallo-betalaktamase («Metallo-beta-lactamase»)
MEM	Meropenem
MDR	Multiresistent («Multidrug resistance»)
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minimum inhiberende konsentrasjon («Minimum inhibitory concentration»)
MIN	Minosyklin
MQ	MilliQ-renset vann
NaOH	Natriumhydroksid
NDM	«New Dehli metallo-beta-lactamase»
OD	Optisk tetthet («Optical density»)
OMP	Ytre membranprotein («Outer membrane protein»)
ONK	Overnattkultur
OXA	Oksacillinaser («Oxacillinase»)
PBP	Penicillin-bindende protein («Penicillin-binding protein»)
PCR	Polymerasekjedereaksjon («Polymerase chain reaction»)
PDE	Fosfodiesteraser («Phosphodiesterase»)
PDR	Panresistent («Pandrug-resistant»)
PEP	Fosfoenolpyruvat («Phosphoenolpyruvate»)
PIP	Piperacillin
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon («Quantitative polymerase chain reaction»)
RNA	Ribonukleinsyre («Ribonucleic acid»)
RPP	Ribosomalt beskyttelsesprotein («Ribosomal protection protein»)
RT	Revers transkriptase

RT-qPCR	Sanntids kvantitativ polymerasekjedereaksjon («Real Time Quantitative polymerase chain reaction»)
RW	Revers primer («Reverse primer»)
SHV	«Sulfhydryl variable»
SIM	«Seoul imipenemase»
ssDNA	Enkeltrådet DNA («Single-stranded DNA»)
TET	Tetrasyklin
TGC	Tigesyklin
TOB	Tobramycin
U/AB	Uten antibiotika
VEB	«Vietnam extended-spectrum beta-lactamase»
VIM	«Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase»
WHO	Verdens helseorganisasjon («World Health Organization»)
WT	Villtype (“Wild type”)

INNHALDSFORTEGNELSE

1	INNLEDNING.....	1
1.1	Antimikrobiell resistens.....	1
1.1.1	Antimikrobielle midler og resistens.....	3
1.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	5
1.2.1	Habitat.....	6
1.2.2	Overlevelse på overflater.....	7
1.2.3	Antibiotikaresistens hos <i>A. baumannii</i>	7
1.3	Syklisk-di-GMP.....	14
1.3.1	Syklisk-di-GMP og AMR.....	17
1.4	Mål med studiet.....	18
2	MATERIALER.....	19
2.1	Bakteriestammer.....	19
2.1.1	<i>A. baumannii</i> AB5075-UW transposon insersjons-mutanter.....	19
2.2	Reagenser og løsninger.....	19
2.3	Oligonukleotidprimere (Invitrogen™).....	21
2.4	Kommersielle kit.....	21
2.5	Løsninger forberedt i laboratoriet.....	22
2.6	Vekstmedier.....	24
2.7	Utstyr og apparatur.....	24
3	METODER.....	26
3.1	Bestemmelse av minimum inhiberende konsentrasjon.....	26
3.1.1	MIC-forsøk for <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 og ATCC 19606.....	29
3.2	Bakteriell vekstkurve i fravær og nærvær av antibiotika.....	30
3.3	Genomisk DNA isolering.....	32
3.4	RNA isolering.....	33
3.5	Agarose gelelektroforese av RNA.....	35

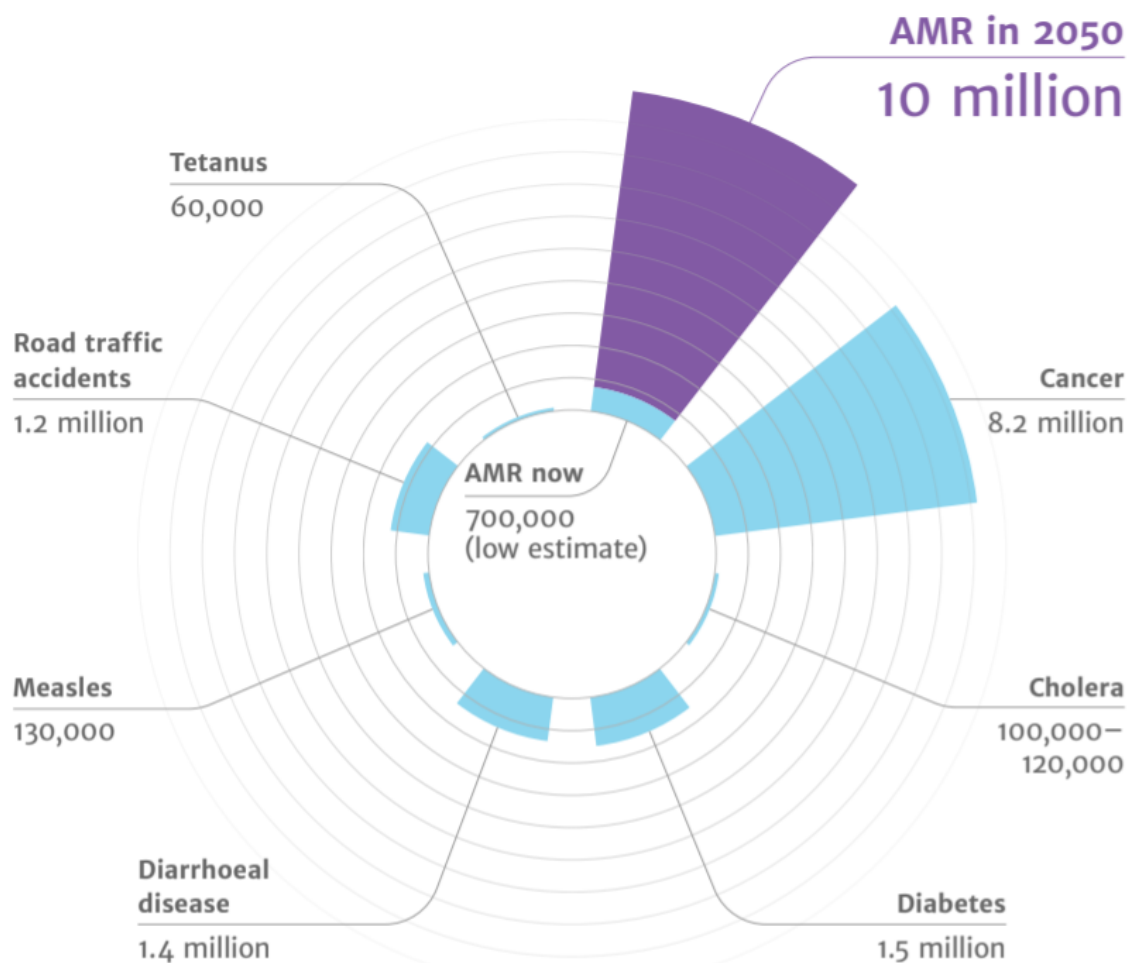
3.6	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR).....	36
3.6.1	cDNA syntese	38
3.6.2	Reaksjonsoppsett for qPCR	38
4	RESULTATER	41
4.1	Etablering av testoppsett for MIC-analyser	41
4.2	Optimalisering av testoppsett for MIC-analyser.....	43
4.2.1	Optimalisering av MIC-assay for <i>A. baumannii</i> ATCC 17978	44
4.3	Bestemmelse av vekstkurver for <i>A. baumannii</i> ATCC 17978.....	46
4.4	Analyse av induksjon av ekspresjon av ulike c-di-GMP-relaterte gener ved eksponering av utvalgte antibiotika	48
4.4.1	Analyse av transkripsjonell induksjon av c-di-GMP-relaterte gener etter eksponering av subinhibitoriske konsentrasjoner av utvalgte antibiotika	51
4.4.2	Kvalitetsanalyse av RNA-prøvene i qPCR.....	52
4.5	MIC-bestemmelse for antibiotika i multiresistent <i>A. baumannii</i> AB5075-UW villtypen	53
4.6	MIC-bestemmelse for <i>A. baumannii</i> AB5075-UW transposon insersjonsmutanter	57
5	DISKUSJON.....	69
5.1	Etablering av MIC assay og optimalisering av MIC-forsøksbetingelser	69
5.2	MIC-forsøksoppsett med <i>A. baumannii</i> AB5075-UW	71
5.2.1	Insersjonsmutantene i <i>A. baumannii</i> AB5075-UW	72
5.3	Ekspresjonsstudie av c-di-GMP relaterte gener i <i>A. baumannii</i>	74
6	KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID	76
	Litteraturliste	77
	Vedlegg 1.....	85
	Vedlegg 2.....	86
	Vedlegg 3.....	98

1 INNLEDNING

1.1 Antimikrobiell resistens

Antimikrobiell resistens (AMR) forekommer når en mikrobe som bakterier, virus, parasitter eller sopp blir motstandsdyktige mot antimikrobielle midler som mikroben vanligvis er mottakelige for [2]. AMR hos mennesker er identifisert av Verdens helseorganisasjon (WHO) som *en av de tre viktigste helseproblemerne i verden* [3, 4]. Dette er en konsekvens av misbruk og overforbruk av antimikrobielle midler som resulterer i ineffektiv behandling av infeksjøs sykdommer som fører til økt dødelighet, men også forlenget sykehusopphold og høyere medisinske kostnader. I tillegg er AMR en stor utfordring for sårbare pasienter som får antibiotikaprofylakse ved for eksempel kjemoterapi, operasjoner eller transplantasjon [5, 6]. Malaria, HIV og tuberkulose er noen av de alvorlige infeksjonene som påvirkes av AMR og regnes som tre av de ti viktigste bidragsyterne til sykkelighet og dødelighet på verdensbasis [5, 7]. Globalt økte forbruket av antimikrobielle midler nylig med 65 % i løpet av 15 år (2000-2015) der lett tilgang til antibiotika og manglende tilgang til god primærhelsetjeneste var noen av faktorene som spilte inn. Fattigdom spiller en stor rolle i utviklingen av antimikrobiell resistens, der begrenset tilgang til effektive antimikrobielle midler og dårlige sanitære forhold bidrar til hurtig spredning og overføring av resistente infeksjøs sykdommer [5]. Ifølge *SDG Progress Report 2017* lever 767 millioner mennesker globalt under absolutt fattigdom, der grunnleggende behov som mat, klær og husly ikke er tilstrekkelig [8]. I jordbruk og husdyrproduksjon benyttes også antimikrobielle midler ved subterapeutiske doser for å blant annet forebygge sykdom og derav dødelighet, men også fremme vekst. Dette vil bidra til en spredning av resistente patogener i både mennesker og husdyr da subterapeutiske doser har vist seleksjon til fordel for resistente bakterier [9]. Spredningen av resistente patogener forekommer ved blant annet direkte kontakt med dyrene, konsumering av rå eller forurenset mat og ved forurensning av miljøet. Antibiotikarester i matvarer bidrar også til økt forekomst av resistente bakterier i mennesker og kan føre til at individer blir mer mottakelige for infeksjoner ved lavdoseeksponering. Antibiotikaforbruket i jordbruk og husdyrproduksjon anslås å øke med 67 % innen 2030 [10-12].

Allerede i 2014 ble det estimert at ca. 700 000 mennesker vil miste livet årlig ved alminnelige infeksjoner, HIV, tuberkulose og malaria, på grunn av resistente bakteriestammer [13]. Dette antallet er mest sannsynlig feilestimert på grunn av upresis rapportering og overvåkning, spesielt fra utviklingsland. Innen 2050 er det estimert en årlig dødsrate på omtrent 10 millioner menneskeliv (*figur 1.1.1*) til en samlet verdi på 100 billioner USD på grunn av AMR, hvis ingen tiltak er blitt iverksatt for å redusere forekomsten av AMR. Intervensjoner presenteres i rapporten *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations* [13] og setter hovedsakelig fokus på å forbedre hygiene, redusere unødvendig bruk av antimikrobielle midler, fremme nye diagnostikkmetoder, fremme bruk og utvikling av vaksiner og forbedre overvåkning av forbruk og resistens hos både mennesker og dyr. I tillegg satses det på kartlegge hvilke yrker/mennesker som arbeider med infeksjonssykdommer for å kunne øke antallet og forbedre lønnsvilkårene [13].



Figur 1.1.1 Oversikt over estimert antall dødsfall per år innen 2050 fordelt på ulike dødsårsaker i verden [13].

1.1.1 Antimikrobielle midler og resistens

Antimikrobielle midler er legemidler som brukes i behandling av infeksjoner forårsaket av bakterier, protozoer og sopp hos mennesker. Disse legemidlene defineres som kjemiske substanser med egenskaper som enten dreper eller inhiberer veksten til mikroorganismer [14]. De kjemiske substansene er hovedsakelig naturlig forekomne og syntetiseres av levende mikroorganismer (antibiotika), men har med tiden blitt syntetisert på laboratoriet (andre antimikrobielle midler). Det finnes semisyntetiske og syntetiske antimikrobielle midler som henholdsvis syntetiseres fra naturlige produkter eller basert på strukturen til de naturlige produktene [15, 16]. Antimikrobielle midler ble først oppdaget i første halvdel av 1900-tallet, da infeksjøs sykdommer var en ledende dødsårsak, og dermed ble oppdagelsen revolusjonerende innen medisinen [17]. Oppdagelsen av mikroorganismenes evne til å utvikle resistens som et naturlig evolusjonsfenomen ble imidlertid raskt bemerket [2, 7]. Utviklingen av resistens ble etterhvert betydelig forsterket gjennom uhensiktsmessig forbruk både hos mennesker og i primærnæringen, samtidig som det oppstod en avtagende utvikling i oppdagelse av nye antimikrobielle midler i løpet av det siste tiåret. I tillegg er utviklingen av nye midler mot multiresistente (MDR) gram-negative bakterier svært begrenset. Klinikere er nødt til å gjenoppta bruk av eksisterende antimikrobielle midler mot gram-negative, da de fleste midlene som har kommet på markedet de siste årene kun er effektive mot gram-positive bakterier [3, 5].

Antimikrobielle midler deles inn i ulike undergrupper basert på mekanismen som gir den antimikrobielle effekten [7]. Virkningen av disse midlene er som nevnt, enten baktericid (bakteriedrepende): forstyrrer dannelsen av cellevegg eller innholdet i cellen, eller bakteriostatisk (veksthemmende): forstyrrer DNA-replikasjon, proteinsyntesen eller andre cellulære prosesser [14, 18]. Et antimikrobielt middel som virker på fundamentale metabolske funksjoner felles for mange ulike bakterier kalles *bredspektret antimikrobielt middel*. Andre antimikrobielle midler hemmer for eksempel spesifikke enzymer og virker dermed kun på et begrenset antall bakterier, og kalles derfor *smalspektrede antimikrobielle midler* [19]. Virkningsmekanismene kan inndeles grovt inn på følgende måte (eksempler på virkestoff innen hver hovedgruppe er angitt i parentes):

Inhibering av celleveggsyntese:

β -laktamer, som deles opp i mindre undergrupper; cefalosporiner (ceftazidim), karbapenemer (meropenem), penicilliner (piperacillin) og monobaktamer (aztreonam).

Inhibering av proteinsyntese:

Aminoglykosider (tobramycin, amikacin, gentamicin), glycylysykliner (tigesyklin) og tetrasykliner (tetrasyklin, minocyklin), makrolider (azitromycin) og kloramfenikol.

Inhibering av nukleinsyresyntese:

Fluorokinoloner (ciprofloksacin) og metronidazol.

Andre antibakterielle midler:

Polymyxiner (kolistin: ødelegger cellemembranen), fosfomycin som ødelegger cellemembranen, sulfonamider og trimetoprim som hemmer folinsyresyntese [7, 20-22].

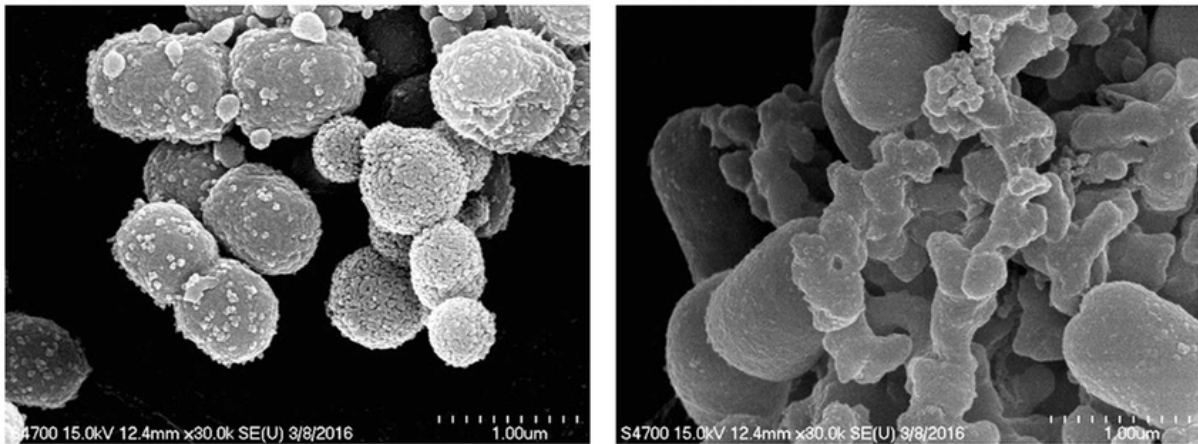
Antibiotikaresistens forekommer når en bakteries følsomhet endres ved eksponering for antibiotika, og som resulterer i at en infeksjon forårsaket av den gitte bakterien blir mer utfordrende (eller umulig) å behandle med gitt antibiotikum [6]. Dette har bidratt til utviklingen av både MDR og panresistente (PDR) patogener. MDR-patogener er definert som motstandsdyktige mot minimum ett middel i minst tre antimikrobielle kategorier, og PDR-patogener som motstandsdyktig mot alle midler i alle antimikrobielle kategorier [23]. Mekanismene for resistens er enten nedarvet (naturlig resistens) eller ervervet (ervert resistens) gjennom evolusjonen og diversiteten er enorm mellom de ulike bakteriene og bakteriestammene. Naturlig resistens er enten alltid uttrykt eller uttrykt ved eksponering av et antibiotikum. Ervert resistens kan oppnås gjennom ulike mekanismer som anskaffer genetisk materiale, blant annet gjennom horisontal genoverføring som inkluderer konjugasjon, transduksjon og naturlig transformasjon, men også gjennom transposoner og genetiske mutasjoner (substitusjoner, delesjoner etc.) [7, 24]. Dette gjør at utvalgte bakteriestammer og bakterier blir mer tilpasningsdyktige og gir dem muligheten til å vokse å spre seg ved å utkonkurrere andre bakterier [13]. Resistensmekanismer kan deles inn i fire hovedkategorier: (1) begrense opptak av legemiddel, (2) modifisering av bindingssete for legemiddel, (3) inaktivere legemiddelet og (4) efflukspumper» [7].

En gruppe bakterier kalt ESKAPE patogenene omfatter artene *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Enterobacter spp.*, og utgjør de hyppigst forekomne MDR-mikroorganismene

som har spilt en stor rolle i utviklingen av antibiotikaresistens spesielt i en nosokomial sammenheng [3]. Organismene kalles ESKAPE patogenene fordi de er i stand til å unnsnippe effekten av antibiotika med ulike resistensmekanismer som for eksempel overføring av resistensgener, modifisering av både legemiddel og bindingssete for legemiddelet og ved biofilmdannelse. Resistensprofilen varierer for de ulike patogenene, men den vanligste årsaken er konsistent eksponering av subterapeutiske konsentrasjoner av antibiotika [25-27]. Spredningen av MDR-bakteriene forekommer mellom pasienter, helsepersonell og besøkende ved direkte eller indirekte kontakt og gjennom forurensede gjenstander, og kan være livstruende for immunkompromitterte pasienter [25].

1.2 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (figur 1.2.1) er en aerob, non-motil, pleomorfisk, gram-negativ bakterie og er en opportunistisk patogen som hovedsakelig er assosiert med nosokomiale infeksjoner. Patogenet er en del av ESKAPE patogenene som nevnt over [4]. *A. baumannii* er en del av *Acinetobacter*-slekten som inkluderer den apatogene arten *Acinetobacter baylyi* [28]. *A. baylyi* har egenskaper som muliggjør endringer av gener og er naturlig kompetent, og derfor blir arten mye brukt som modell for genetiske, molekylære og metabolske studier [29]. *A. baumannii* betegnes også som en del av *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* (Acb) komplekset som omfatter tre andre arter; *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* og *A. pittii*, fordi de er vanskelig å differensiere ved hjelp av bare fenotype. Etterhvert har flere arter blitt foreslått inkludert i Acb-komplekset [30]. Komplekset omfatter aerobe, gram-negative kokkobasillære staver med et mangfoldig naturlig habitat, deriblant jord- og vannkilder. Bakteriene har en bemerkelsesverdig evne til å utvikle konstitutiv AMR eller som respons på tilstedeværelse av antimikrobielle midler, noe som gjør dem tilpasningsdyktige til å overleve i ulike omgivelser [31]. *A. baumannii* er ansett som den mest klinisk relevante arten og er godt karakterisert. Siden artene i Acb-komplekset er genetisk nært beslektet har det vist seg at artene ofte feilaktig identifiseres som *A. baumannii*, dermed vil karakteriseringen av *A. baumannii* bli benyttet for hele Acb-komplekset med mindre annet er spesifisert [32].



Figur 1.2.1 Mikroskopi av *A. baumannii* ATCC 17978. Venstre bilde viser ubehandlede celler med en grov overflate, mens høyre bilde viser celler ved eksponering for LysAB2 P3 som tyder på deformasjon av cellestrukturen [33].

1.2.1 Habitat

A. baumannii naturlige habitat og potensielle reservoarer er ikke godt karakterisert, men bakterien har blitt isolert både fra mennesker og dyr, men også fra lus, grønnsaker, jordbruk og akvakultur [34]. Hos mennesker er patogenet blitt isolert fra flere anatomiske regioner som hud og luftveier hos infiserte individer. Patogenet trives som andre bakterier godt i fuktige omgivelser og retter seg mot ikke-intakt hud [4]. Det er kun et begrenset antall stammer som har vist seg å være ansvarlige for nosokomiale infeksjoner i mange land. Tre kloner av *A. baumannii* («European clones I-III») har vært dominante ved sammenligning av stammer som har forårsaket nosokomiale infeksjoner i Europa, av til sammen åtte kloner som er blitt identifisert [35]. *A. baumannii* er godt utbredt blant skadde soldater i konfliktsoner og har fått navnet «Iraqibacter» på grunn av den høye forekomsten i Irak. Dette har ført til en økt utbredelse, spesielt i Storbritannia og USA, ettersom soldatene vender hjem for rekonvalesering og ved pasientoverføringer mellom sykehusene. Det antas at soldatene er smitekilden, da det ikke er blitt isolert fra jord- eller vannreservoarer i Irak [4]. Det har også vist seg at *A. baumannii* har vært isolert fra kroppslus fra hjemløse og anses som et potensielt reservoar for patogenet [4, 36]. I en studie fra Frankrike ble 40 *A. baumannii* stammer isolert fra kroppslus fra hele verden og det ble konkludert med at bakterien er en del av normalfloraen [37]. *A. baumannii* har ikke kun blitt isolert fra mennesker, men også fra animalsk opprinnelse og fra miljøet. Dyr anses som et mulig reservoar for bakterien der dyreisolater har vist et høyt genetisk mangfold med forskjellige sekvenstyper og

resistensmønstre enn det som er vist i mennesker [38]. Hos husdyr som gris og storfe forårsaker patogenet mastitt, sepsis og lungebetennelse, blant annet øye- og sårinfeksjoner hos hester, og samtidig blitt isolert fra blodomløp, sår og urinveisinfeksjoner hos katter og hunder [35]. I en studie fra 2017-2019 ble det isolert 200 *A. baumannii* isolater fra prøver med rått kjøtt av kylling og kalkun [39]. Flere studier indikerer at patogenet kan være en zoonotisk organisme og en mulig sykehuspatogen i veterinærinstitusjoner, og markerer derfor viktigheten av videre undersøkelser av *A. baumannii* i dyr. Isolater med opprinnelse fra dyr forbindes med kliniske isolater funnet hos mennesker [40, 41].

1.2.2 Overlevelse på overflater

A. baumannii er robust og kan overleve over lengre perioder på abiotiske og biotiske overflater, blant annet på sykehusoverflater, sykehusutstyr og ved tørke. Enkelte isolater er vist å være levedyktige i nesten 100 dager ved tørke [4, 32]. Immunkompromitterte pasienter med langvarig sykehusopphold (> 90 dager) har spesielt høy risiko for å utvikle infeksjon, men også pasienter som gjennomgår dialyse, antimikrobiell terapi og ved bruk av katetre, suturer og ventilatorer [4]. Sykehuservervede ventilatorassosierte luftveisinfeksjoner som lungebetennelse og venflonassosierte blodstrømsinfeksjoner er de vanligste. Hjernehinnebetennelse, hud- og bløtvevsinfeksjoner og kateterassosierte urinveisinfeksjoner er mindre vanlig. Dødeligheten er tilnærmet 40 % i intensivavdelingen [4, 32, 36]. Samfunnservervede infeksjoner forekommer også, men kun hos pasienter med underliggende sykdommer som diabetes, kreft og alkoholisme er blitt rapportert [32].

1.2.3 Antibiotikaresistens hos *A. baumannii*

På 1970-tallet var *A. baumannii* mottakelig for de fleste antibiotika, men har siden utviklet resistens mot de fleste førstelinje antibiotika (2012) [4]. Det har midlertidig vist seg at adaptasjon av resistensgener utenfra og oppregulering av naturlige resistensgener ved eksponering av antibiotika har hatt en avgjørende rolle i utviklingen av MDR-stammer, men også PDR-stammer. Dette er også avgjørende for overlevelsen av bakterien i sykehussammenheng da det ofte blir brukt bredspektrede antimikrobielle midler [4]. Det er blitt rapportert at tilnærmet 45 % av alle *A. baumannii* isolater er MDR, med nærmere 70 % i Midtøsten og Latin-Amerika [32]. *A. baumannii* viser et høyt nivå av eksogent DNA i genomet og nyere studier har vist at patogenet har en ekstraordinær evne til å inkorporere

fremmed DNA ved horisontal genoverføring [42]. Resistensmekanismer som er blitt identifisert hos patogenet inkluderer enzymatisk nedbrytning av legemidler, modifikasjoner av målmolekyl for legemiddelet, permeabilitetsdefekter og multiefflukspumper [42]. Disse mekanismene er ervervet hovedsakelig gjennom plasmid-mediert konjugasjon, integronmobilisering eller transposoner [43]. Ifølge EUCAST har *A. baumannii* naturlig (iboende) resistens mot ampicillin, amoksisicillin-klavulanat, cefazolin, cefalotin, cefaleksin, cefadroxil, cefotaxim, ceftriaxon, aztreonam, ertapenem, trimetoprim og fosfomycin [35]. Nedenfor presenteres hovedresistensmekanismene for de ulike antibiotikagruppene:

β -laktamer er den gruppen antimikrobielle midler som er mest brukt der alle virkestoffene inneholder en felles kjernestruktur: en β -laktam-ring. Resistens mot β -laktam antibiotika medieres av fire hovedmekanismer: (1) hydrolyse av β -laktamer, (2) endringer i penicillin-bindende proteiner (PBPs), (3) efflukspumper og (4) endringer i struktur og antall poriner [7]. Hovedresistensmekanismen identifisert i *A. baumannii* er (1) hydrolyse av β -laktamer og medieres av β -laktamaser som hydrolyserer β -laktamringen slik at legemidlet ikke kan interagere med PBPs. Enzymene inndeles i fire molekylgrupper basert på peptidsekvensen; A, B, C og D, der alle gruppene er blitt identifisert i *A. baumannii*. Klasse A, C og D omtales som serin- β -laktamase og benytter serin i sitt aktive sete, mens klasse B omtales som metallo- β -laktamase (MBL) og benytter divalente sinkioner (eller andre metallioner) i sitt aktive sete for hydrolyse av β -laktamringen [7, 42, 44-46].

Klasse A inkluderer både smal- og bredspektret β -laktamaser (ESBL) som gir resistens mot henholdsvis penicilliner og bredspektret cefalosporiner (eksempel. ceftazidim) [44-46]. Smalspektret β -laktamaser som inhiberes av klavulansyre er blant annet TEM-1, CARB-4, og SHV-1, og klavulanresistente OXA-21 og OXA-37 har blitt rapportert. ESBLs som har blitt identifisert i *A. baumannii* er blant annet PER-1, PER-7, VEB-1, CTX-M-2, SHV-18, TEM-150, der PER-7 viser resistens også mot monobaktamer. ESBL genene er koblet med en rekke andre resistensmekanismer, inkludert resistens mot aminoglykosider [42, 44-46].

Klasse B MBL er resistente mot alle β -laktam antibiotika, inkludert karbapenemer, men med unntak av aztreonam. En rekke MBLs er blitt rapportert og karbapenemasegruppene er integron-mediert IMP, SIM og VIM og transposon-mediert NDM [42, 45, 46].

Klasse C cefalosporinaser identifisert er iboende AmpC, den eneste klasse C β -laktamase som finnes i *A. baumannii*. Cefalosporinaser gir resistens mot penicilliner, smal- og bredspektret cefalosporiner (med unntak av cefepim). Resistens mot bredspektrede cefalosporiner forekommer kun ved en overekspresjon av AmpC. Kliniske isolater som inneholder et insersjonssekvens (IS) som ISAbal viser høy resistens mot ceftazidim, mens

kliniske isolater som ikke har ISAb₁ er mottakelig for ceftazidim [42, 45, 46].

Over 400 Klasse D oksacillinaser (OXA) er blitt identifisert hos *A. baumannii*. Enzymene hydrolyserer karbapenemer og forekommer enten som iboende (OXA-64, OXA-78, OXA-82 etc.) eller ervervet resistens gjennom horisontal genoverføring kromosomalt (OXA-24, OXA-25, OXA-40 etc.) eller plasmid-mediert (OXA-23 og OXA-58^a). OXA-23 er blitt rapportert i kliniske isolater i hele verden og OXA-58^a er blitt identifisert både som kromosomal og plasmid-mediert karbapenemase. Ved en kombinasjon med ISAb₁ eller ISAb₂ økes resistensen betydelig [42, 45, 46].

(2) Endringer i PBPs og (4) endringer i ytre membranproteiner (OMPs) er det derimot lite kjennskap til. Begrensningene ligger i at det er vanskelig å finne en metode for å registrere endringen av antall OMPs, og resistensprofilen til *A. baumannii* er lite studert når det gjelder endringer i PBPs. En redusert ekspresjon av CarO, Omp33-36, Omp43, Omp47 og flere poriner assosieres med karbapenemresistens, der CarO gir resistens mot imipenem og meropenem. I tillegg vil en reduksjon i ekspresjon av PBP-1 også resultere i karbapenemresistens [42, 45, 46].

AdeABC (3) efflukspumpe tilhørende «resistance-nodulation-division superfamily» har vist å spille en viktig rolle i resistens mot β -laktam og er godt karakterisert i *A. baumannii*. Det finnes også tre andre grupper efflukspumper relatert til antimikrobiell resistens i *A. baumannii*; «the multidrug and toxic compound extrusion family», «the major facilitator superfamily» og «the small multidrug resistance family transporters». En overekspressjon av AdeABC efflukspumpen og en kombinasjon av klasse D oksacillinaser gir resistens mot karbapenemer. AdeABC er en multipumpe som gir resistens mot flere grupper av antibiotika og uttrykket reguleres av AdeS (sensor) og AdeR (regulator), et to-trinns system. Punktmutasjon i et av genene resulterer i økt ekspresjon av AdeABC-pumpen [42, 45, 46].

Aminoglykosider. Resistens mot aminoglykosider medieres av ulike mekanismer, men hovedsakelig ved inaktivering via aminoglykosidmodifiserende enzymer (AMEs): nukleotidyltransferaser (ANTs), fosfotransferaser (APHs) eller acetyltransferaser (AACs). Enzymene reduserer legemidlets bindingsaffinitet til 30s ribosomalt subenhet [47, 48]. Bakterier har også vist resistens mot aminoglykosider gjennom aktive strømningspumper, ribosomal mutasjon og redusert opptak av legemidlene [7]. I *A. baumannii* er den viktigste resistensmekanismen mot aminoglykosider mediert via AMEs. Flere studier viser høy prevalens av enzymene når rapporter viser at kliniske MDR-isolater bærer enten én eller flere AMEs som aphA1, aacC1 og aadB. Isolater som har flere AMEs kan føre til resistens mot alle aminoglykosider. Viktige AMEs identifisert i *A. baumannii* er ACC(3')-I-modifiserende

gentamicin, APH(3')-VI-modifiserende amikacin og ACC(6')-Ib-modifiserende tobramycin og amikacin. AdeABC efflukspumpen er som nevnt en multipumpe og inkluderer også aminoglykosider. Andre pumper som EmrAB-TolC og A1S_1535 gir resistens mot henholdsvis tobramycin og gentamicin. En annen mekanisme som nylig har blitt kjent er modifikasjon av 30s ribosomal-subenhet mediert av 16s rDNA metyltransferase. ArmA-enzymet metylerer aminoacetyl-bindingssetet slik at aminoglykosider ikke kan binde og utøve sin effekt. Enzymreaksjonen har vist å være koblet til et koenzym OXA-karbapenemase som OXA-23 [42, 45, 46, 49].

Tetrasykliner og glysykliner. Resistensen kan bygges på enten en eller flere av følgende mekanismer: ribosomal beskyttelse, enzymatisk inaktivering eller gjennom efflukspumper [50]. Ribosomal beskyttelse og efflukspumper er identifisert i *A. baumannii*. Hovedmekanismen er gjennom efflukspumper og medieres av TetA og TetB (transposon-mediert). TetA påvirker konsentrasjonen av tetrasyklin, mens TetB påvirker konsentrasjonen av både tetrasyklin og minocyclin [42, 45, 46, 51]. TetM, et tetrasyklin ribosomalt beskyttelsesprotein (RPPs) er en GTPase involvert i ribosomal beskyttelse i *A. baumannii*. RPPs katalyserer GTP-avhengig frigjøring av tetrasyklin fra ribosomet [50]. Resistens mot tigesyklin tilskrives ikke de nevnte mekanismene, men er mediert av overekspressjon av blant annet AdeABC-efflukspumpen. Andre efflukspumper i samme gruppe som AdeFGH og AdeIJK er assosiert med synergisk tigesyklin resistens [42, 45, 46, 51].

Fluorokinoloner. Resistensen har artsavhengige effekter og kan forekomme enten via modifiserende enzymer, mutasjoner, økt produksjon av aktive strømningspumper, protein beskyttelse eller en kombinasjon av mekanismene som er nevnt [52]. Modifikasjoner i form av mutasjoner i DNA-gyrase og DNA-topoisomerase IV er hovedmekanismen for resistens mot fluorokinoloner i *A. baumannii* [46, 51, 53]. Enzymene katalyserer superkveilingen av DNA enten ved å danne brudd i den ene eller begge DNA-trådene og bakteriell replikasjon inhiberes når fluorokinoloner binder disse enzymene [52]. Mutasjonene forekommer på *gyrA* eller *parC* genene som henholdsvis koder for DNA-gyrase og DNA-topoisomerase IV og reduserer bindingsaffiniteten til fluorokinoloner. Ser-86-Leu substitusjon i *gyrA* og Ser-80-Leu substitusjon i *parC* øker minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) for ciprofloksacin. AdeABC, AdeFGH, AdeIJK og AbeM efflukspumper bidrar i tillegg til naturlig resistens ved å redusere legemiddelakkumulering [46, 51, 53].

Kloramfenikol binder bakteriell 50s ribosomal-subenhet og forhindrer forlengelse av proteinkjeden ved å inhibere peptidyltransferase [54]. Resistensmekanismene i *A. baumannii* medieres via en rekke efflukspumper (AdeABC, CmlA, CraA, AbeS, A1S_1535, ABAYE_0913), redusert ekspresjon av OmpA-poriner og *abrp*-genet som koder for peptidase [42, 45]

Fosfomycin. Ødeleggelse av cellemembranen kommer av at fosfomycin fungerer som en analog av fosfoenolpyruvat (PEP). PEP binder MurA og inaktiverer formeringen av peptidoglykan som er avgjørende for syntese av celleveggen [55]. AbaF-efflukspumpen ble nylig identifisert i *A. baumannii* og assosieres med fosfomycinresistens. En redusert reduksjon av *abrp*-genet vil også bidra til resistens [42, 56].

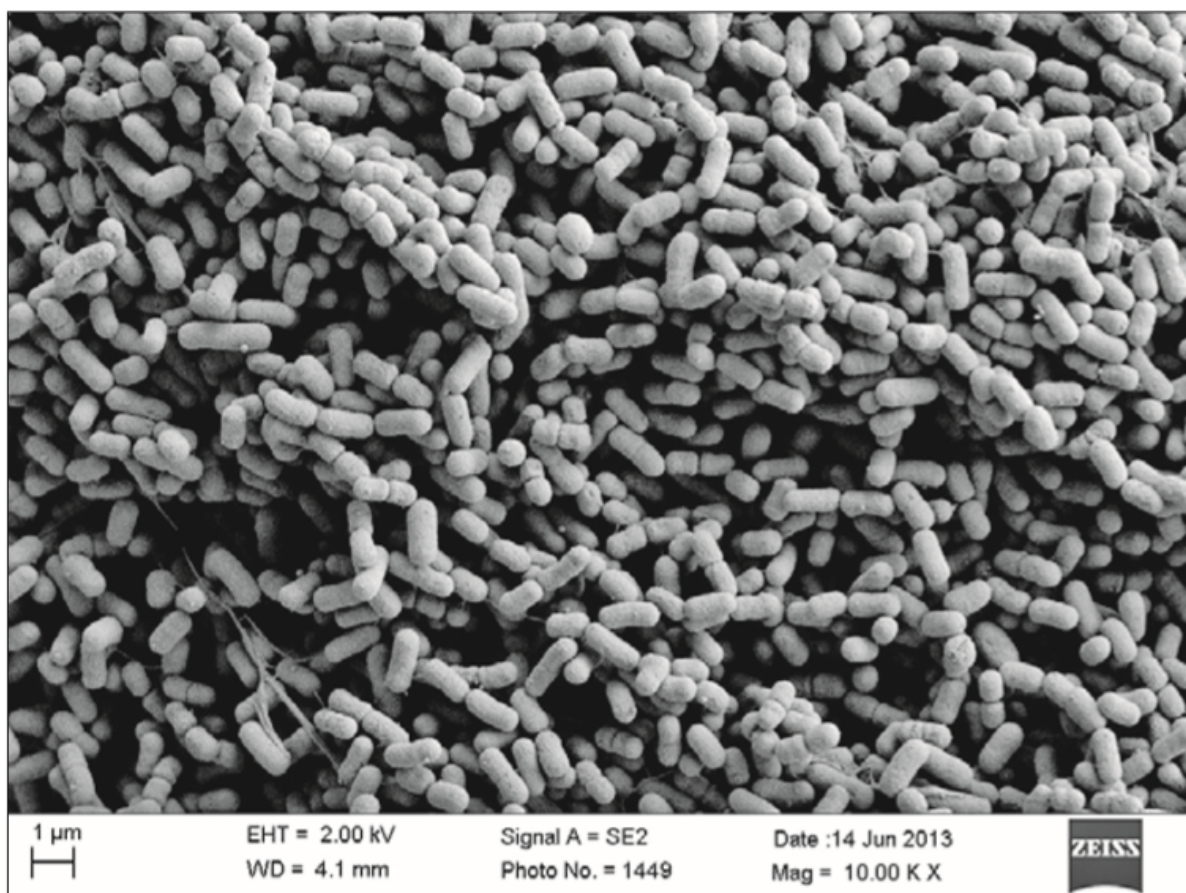
Kolistin er et polymyxin som binder lipid A delen av lipopolysakkarider (LPS) og fosfolipider på overflaten hos gram-negative bakterier. Dette fører til en forstyrrelse og gir økt permeabilitet i membranen. Resistens mot kolistin er iboende og medieres hovedsakelig ved adhesjon av fosfoetanolamin til lipid A, og sekundært ved modifikasjoner eller tap av LPS. Adhesjon av fosfoetanolamin fører til redusert negativ ladning på overflaten og gir redusert interaksjon mellom kolistin og LPS. Mutasjoner i *lpxA*, *lpxC* og *lpxD* fører til modifikasjoner ved lipid A-syntese og resulterer i tap av LPS, mens mutasjoner i PmrA/PmrB fører til adhesjon av fosfoetanolamin. Kolistin har vært en siste-linje antibiotikum for *A. baumannii* og mange andre MDR-bakterier, men rapporter viser økende grad av resistens mot dette antibiotikumet [42, 46, 57].

1.2.3.1 Biofilm

Noen bakterier er i stand til å produsere en matriks av ekstracellulære polymerstoffer (EPS) som hovedsakelig er polysakkarider, proteiner, lipider og nukleinsyrer som danner et tredimensjonalt nettverk rundt cellene i bakteriesamfunnet (*figur 1.2.3.1.1*) [58]. Denne matriksen medierer adhesjon til overflater og beskytter mikroorganismen mot blant annet uttørking, antibiotika og vertens immunforsvar, samtidig som EPS åpner for blant annet celle-celle-kommunikasjon (quorum sensing) og horisontal genoverføring [58].

Antibiotikaresistens i biofilm forårsakes av flere faktorer, og en viktig mekanisme er begrenset diffusjon av antibiotika gjennom matrisen [59]. I et slikt nettverk er det begrenset tilgang til næringsstoffer og oksygen, noe som påvirker veksthastighet og metabolsk aktivitet i bakteriene. Begrenset tilgang fører til at bakteriene går i en fase med lav veksthastighet som

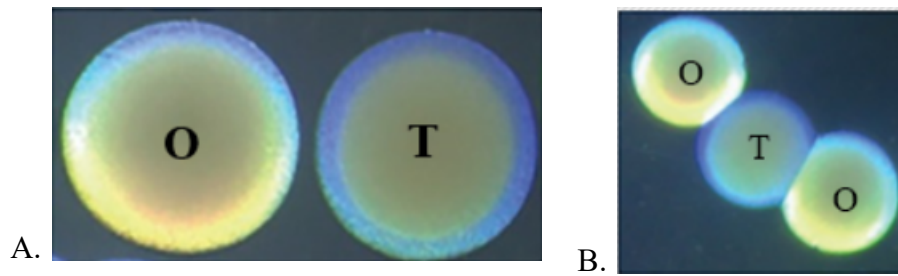
gjør de mindre mottakelige for antibiotika. Andre faktorer som bidrar til resistens i biofilm er blant annet enzymmediert resistens, oppregulering av efflukspumper og genetisk adaptasjon [59]. *A. baumannii* har evnen til å kolonisere på både biotiske og abiotiske overflater, og samtidig danne biofilm. Dette spiller en sentral rolle i bakteriens evne til å forårsake sykehuservervede- og utstyr-assosierte infeksjoner, da biofilm gir økt toleranse for ekstracellulære belastninger og bakteriene forblir levedyktige under ekstreme forhold [60]. Det har blitt rapportert at subterapeutiske doser av antibiotika ved lavdoseterapi stimulerer biofilmdannelse hos *A. baumannii* [42].



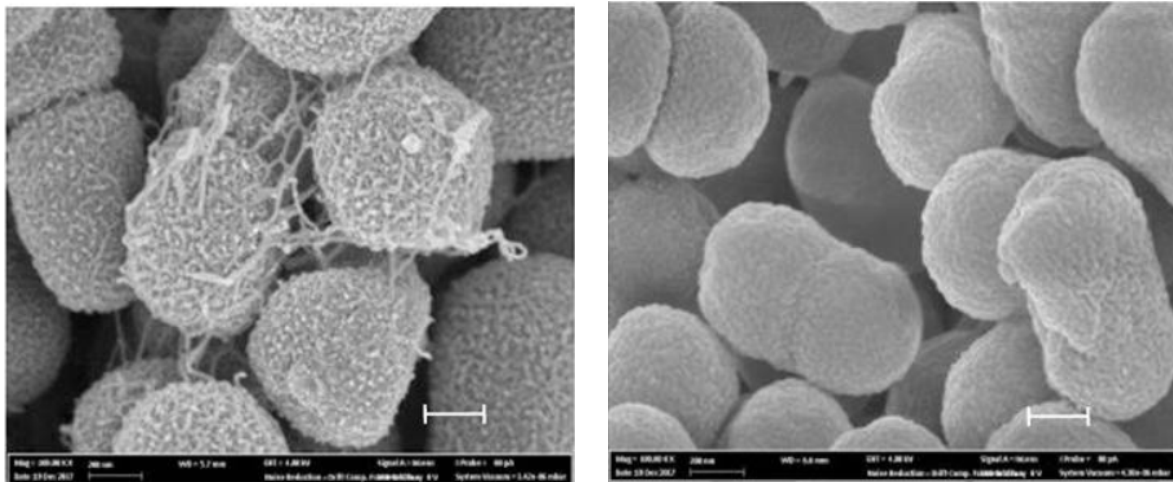
Figur 1.2.3.1.1 «Field-Emission Scanning Electron Microscopy» (FESEM) mikrogramfi av *A. baumannii* med biofilmdannelse på overflaten av et dekkglass [60].

1.2.3.2 Fasevariasjon

Noen bakterier har evnen til å gjennomgå en hyppig og reversibel endring i «contingency» gener som resulterer i en fenotypisk heterogenitet som også blir kalt antigenvariasjon [61, 62]. Disse genene reguleres av omgivelsene og utgjør et område i genomet med hyppig mutasjonsrate som gir et stort genetisk mangfold. Endringer kommer av at genene kan slå av og på og gir en diversitet av bakterielle proteiner og strukturer som uttrykkes på celleoverflaten til enhver tid, noe som gjør at bakterien i mindre grad induserer humoral og cellulær immunrespons. Dette er en nedadret adaptiv prosess som benyttes av tilpasningsdyktige bakterier ved stadige skiftende vertsmiljøer og er derfor avgjørende for overlevelse [61-63]. I en studie er det vist at *A. baumannii* AB5075-uw danner kolonier med ulik opasitet (gjennomskinnelighet). Koloniene har to fenotyper, kalt «translucent» (gjennomskinnelig) og «opaque» (ugjennomsiktig) (figur 1.2.3.2.1 og 1.2.3.2.2), og frekvensen av fasevariasjonen er avhengig av celletetthet i vekstmedium [64]. Celletettheten antas å være regulert ved akkumulering av en ekstracellulær faktor da frekvensen av fasevariasjonen øker betydelig med økende optisk tetthet. Endring av pH og næringsstoffer gir ingen signifikante forskjeller og utelukkes som påvirkende faktorer. «Quorum sensing» regulerer fysiologiske prosesser, inkludert prosesser ved høy celletetthet og medieres via sekresjon av ekstracellulære signaler. Det er antatt at den ekstracellulære faktoren som er med på å regulere celletetthet ved fasevariasjon er et quorum-sensing-signal [64]. Cellemorfologi, overflatemotilitet, biofilmdannelse og antibiotikaresistens viste seg også å være forskjellig mellom «translucent» og «opaque» og er stamme-spesifikke. Fenotypene interkonverterer ved høy frekvens der «translucent» viser bedre evne til å danne biofilm, men har redusert virulens og bevegelighet sammenlignet med «opaque». I tillegg er interkonverteringen fra «opaque» til «translucent» mest utbredt sammenlignet med interkonvertering fra «translucent» til «opaque» blant stammene [64, 65]. Forskjell i cellemorfologi for fenotypene er mest fremtredende i flytende vekstmedium og ved økt celletetthet for *A. baumannii* AB5075. Ved $OD_{600} = 1.1$ var celler fra en «translucent» koloni avlange med en grov overflate sammenlignet med celler fra en «opaque» koloni. De to fenotypene viser signifikant forskjell i MIC målt ved E-test (>fordobling av MIC) for gentamicin, amikacin og tobramycin, der «opaque» var mest resistent. Det ble ikke observert signifikant forskjell mellom fenotypene i resistens mot tetrasyklin, cefoxitin, kolistin og rifampicin [64].



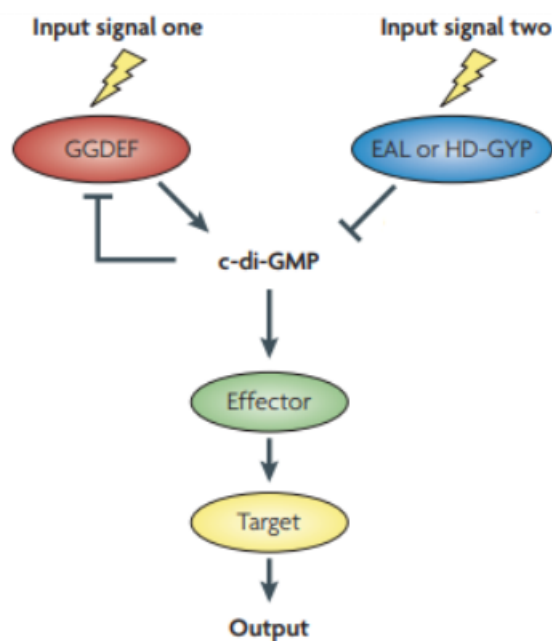
Figur 1.2.3.2.1 Fasekontrastmikroskopi av *A. baumannii* AB5075-uw kolonier som viser fenotypene «opaque» og «translucent» i fasevariasjon. A. Viser fra venstre: opaque og translucent. B. Viser translucent omringet av to opaque-kolonier [64].



Figur 1.2.3.2.2 Scanning elektronmikroskopi (SEM) av *A. baumannii* AB5075-UW som viser fenotypene «translucent» og «opaque» i fasevariasjon. Venstre bilde viser celler fra translucent koloni og høyre bilde celler fra opaque koloni [65].

1.3 Syklisk-di-GMP

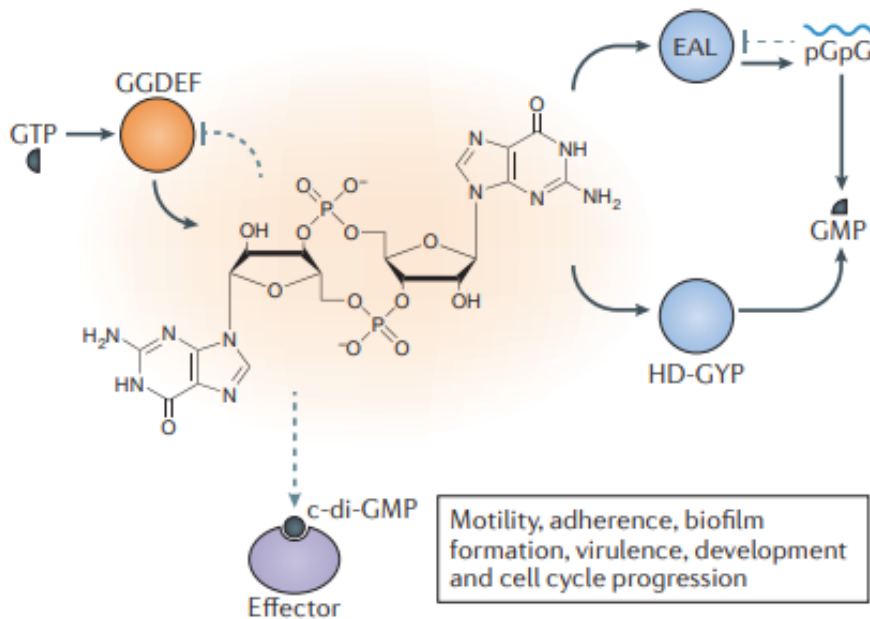
Bis-(3`-5`)-syklisk dimerisk guanosinmonofosfat, også kalt syklisk-di-GMP (c-di-GMP) betegnes som et universelt sekundært signalmolekyl involvert i et bredt spekter av cellulære prosesser i bakterier [66, 67]. Signalmolekylet har vært kjent siden 1980-tallet, men har i senere tid blitt oppdaget som en viktig brikke i ulike aspekter av bakterievekst, virulens, motilitet, biofilmdannelse og mikrobiell cellyklus. Disse cellulære prosessene reguleres av cellulære nivåer av c-di-GMP [66]. Reguleringen av nivået av sekundære signalmolekyler som c-di-GMP består vanligvis av fire komponenter: (1) To typer enzymer som syntetiserer eller degraderer signalmolekylet ved hjelp av stimulans, (2) et effektormolekyl som binder, (3) og er allosterisk regulert av signalmolekylet, og (4) målmolekyl som utøver sin effekt som respons på direkte kontakt med effectoren (*figur 1.3.1*) [67].



Figur 1.3.1 Generell syklisk-di-GMP (c-di-GMP) signaleringsmodul. Diguanylat-syklaser (DGCs) med GGDEF-domene syntetiserer signalmolekylet c-di-GMP, og c-di-GMP-spesifikke fosfodiesteraser (PDEs) med EAL- eller HD-GYP-domene degraderer signalmolekylet, ved stimulans. Effektormolekyl binder c-di-GMP og gir allosterisk regulering. Effektormolekyl binder målmolekyl og regulerer aktiviteten [67].

c-di-GMP signalering

Cellulære nivåer av c-di-GMP reguleres av diguanylat-syklaser (DGCs) og c-di-GMP-spesifikke fosfodiesteraser (PDEs) som stimuleres av blant annet oksygen, næringsstoffer, lys og metaller [66]. Syntese og nedbrytning av c-di-GMP er henholdsvis mediert av DGCs og PDEs med antagonistisk aktivitet. c-di-GMP syntetiseres fra to molekyler guanosintrifosfat (GTP) ved hjelp av DGCs som inneholder katalytiske GGDEF-domener (*figur 1.3.2*). Hydrolyse av c-di-GMP katalyseres av PDEs som inneholder katalytiske EAL-domener eller HD-GYP-domener [66, 68]. Lineær 5'-fosfoguanilyl(3'-5')-guanosin (pGpG) blir dannet i nærvær av Mg^{2+} eller Mn^{2+} katalysert av PDEs med EAL-domene (*figur 1.3.2*). PDEs med HD-GYP-domener hydrolyserer signalmolekylet til to guanodinmonofosfat (GMP) molekyler (*figur 1.3.1*). En ribonuklease, oligoribonuklease Orn degraderer pGpG til GMP. DGCs og PDEs kan også delta i nedstrøms signaleringskaskader og fungerer som «c-di-GMP sensorer»[66, 68].



Figur 1.3.2 Syklisk-di-GMP (c-di-GMP) signalering. *Syntese*: to guanosintrifosfat (GTP) fusjoneres sammen av diguanylat-syklaser (DGCs) av to katalytiske GGDEF-domener. *Degradering*: spesifikke fosfodiesteraser (PDEs) som inneholder EAL eller HD-GYP-domener hydrolyserer c-di-GMP til henholdsvis lineær 5'-fosfoguanlyl-(3'-5')-guanosin (pGpG) eller to guanosinmonofosfat (GMP) molekyler. Når c-di-GMP binder effektormolekyler reguleres motilitet, adhesjon, biofilmdannelse, virulens og celledyklusprogresjon [66].

c-di-GMP effektormolekyler og reseptorer

c-di-GMP binder effektormolekyler nedstrøms, noe som fører til aktivering av signaleringskaskader. Effektormolekyler inkluderer mRNA-riboswitcher, proteiner som inneholder PilZ-domener og degenererte GGDEF- og EAL-domener, og målmolekylene inkluderer transkripsjonelle regulatorer. Ved binding til disse molekylene, reguleres blant annet motilitet, biofilmdannelse og virulens [66, 67]. Et eksempel på effektoraktivitet er binding av c-di-GMP til det allosteriske setet (I-bindingssete) på overflaten av GGDEF-domene, som fører til inhibering av DGCs og dermed syntesen av c-di-GMP [69]. c-di-GMP regulerer også blant annet type IV pili hos *P. aeruginosa*. Disse piliene medierer overflatekontakt og bevegelse [66, 68].

1.3.1 Syklisk-di-GMP og AMR

En rekke studier rapporterer at c-di-GMP fremmer biofilmdannelse og er blitt demonstrert hos et høyt antall bakterier, blant annet *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* og *Salmonella enterica* [68, 70]. Syntese av EPS, ekstracellulært polymerstoff i biofilm, reguleres av c-di-GMP [67]. I tillegg regulerer signalmolekylet også andre matrikskomponenter som bidrar til å feste bakterier på overflater. En overekspresjon av GGDEF-domener i en rekke bakterier stimulerer syntesen av biofilmmatrikskomponenter og dannelsen av biofilm kontrolleres på transkripsjon-, posttranskripsjon- og posttranslasjonelle nivåer [66-68]. I *E. coli* stimulerer signalmolekylet produksjonen av de to viktigste matrikskomponentene cellulose og «curli fibres» [66, 68]. I *P. aeruginosa* er det vist at bakteriene kan være opptil 1000 ganger mer beskyttet mot antimikrobielle midler i en biofilm sammenlignet med planktoniske celler, og c-di-GMP mediert regulering av biofilm vil derfor indirekte påvirke AMR [70]. Ulike faktorer påvirker resistensen av cellene i biofilm og er tidligere beskrevet i *seksjon 1.2.3.1*. Nye c-di-GMP-relaterte mekanismer er imidlertid blitt identifisert til å bidra til AMR i *P. aeruginosa* uavhengig av biofilmdannelse. Høye cellulære nivåer av c-di-GMP ved en overekspresjon av DGC (PA5487) viste levedyktige bakterier med tilstedeværelse av imipenem sammenlignet med tilsvarende celler med en overekspresjon av en PDE (PvrR), som har lave cellulære nivåer av c-di-GMP [70]. *P. aeruginosa* responderer på subterapeutiske konsentrasjoner av aminoglykosider ved å indusere biofilmdannelse (PDE Arr) i form av biomasse, men uavhengig av polysakkaridproduksjon [70].

1.4 Mål med studiet

Målet med studiet var å undersøke om proteiner involvert i intracellulær c-di-GMP basert signalering kan være koblet til resistens mot spesifikke antimikrobielle midler i *A. baumannii*, med særlig fokus på naturlig/iboende resistens og med fokus på resistensmekanismer uavhengig av biofilmdannelse. For transportproteiner som er involvert i MDR har det tidligere blitt screenet transportgener for økt ekspresjon transmisjon ved eksponering for $\frac{1}{2}$ MIC av ulike antibiotika [71]. Det ble ønsket å ta en lignende tilnærming for c-di-GMP relaterte gener og ulike selekterte antibiotika for *Acinetobacter baumannii*. I tillegg var det ønsket å screene et sett transposon insersjonsmutanter som representerte alle identifiserte c-di-GMP relaterte gener i det kliniske MDR isolatet *A. baumannii* AB5075-UW for resistensmønster mot utvalgte antibiotika, relativt til en *A. baumannii* AB5075-UW villtype.

2 MATERIALER

2.1 Bakteriestammer

Bakteriestamme	Opprinnelse	Referanse
<i>A. baylyi</i> ADP1	Non-kapsulær mutant avledet fra ATCC 33304	[72-75]
<i>A. baumannii</i> AB5075-UW	Tibia/osteomyelitt	[76]
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	Fatal meningitt	[77-79]
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Urin	[80-84]

2.1.1 *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjons-mutanter

Locus tag (GenBank: CP008706)	Gen	Item #
ABUW_0506	<i>yfiN</i>	AB01348
ABUW_2824	<i>N/A</i>	AB07395
ABUW_3178	<i>ydaM_1</i>	AB08292
ABUW_0137	<i>yedT</i>	AB00389
ABUW_0188	<i>pleD_3</i>	AB00518
ABUW_1045	<i>ydaM</i>	AB02822
ABUW_1138	<i>N/A</i>	AB03095
ABUW_3354	<i>gmr_1</i>	AB08769
ABUW_1221	<i>cph2_1</i>	AB03312
ABUW_1764	<i>gmr_2</i>	AB04622
ABUW_2255	<i>pilZ</i>	AB05917

Item # fra Manoil Lab kolleksjon [85].

2.2 Reagenser og løsninger

Reagenser og løsninger	Leverandør
Absolutt alkohol prima (EtOH)	Antibac
Agarose	Sigma-Aldrich
Amikacin disulfate salt	Sigma-Aldrich
Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich

β -Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific
Boric acid	Sigma-Aldrich
Ceftazidime hydrate	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich
Colistin sulfate salt	Sigma-Aldrich
DEPC-Treated Water	Thermo Fisher Scientific
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase I Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Etanol 70 %	Kemetyl
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	VWR
Gel Loading Dye, Blue (6X)	Thermo Fisher Scientific
GelRed [®]	Biotium
Gentamicin sulfate	Sigma-Aldrich
HCl 1M	Tilberedt av labteknikker
Metanol	VWR
Meropenem	Sigma-Aldrich
MilliQ-vann	Millipore
Minocycline hydrochloride	Sigma-Aldrich
Mueller Hinton Broth 2	Sigma-Aldrich
NaOH 1M og 5M	Tilberedt av labteknikker
Phosphomycin disodium salt	Sigma-Aldrich
Piperacillin sodium salt	Sigma-Aldrich
RNase AWAY™ Surface Decontaminant (7000)	ThermoFisher Scientific
SYBR [®] Green	Sigma-Aldrich
Tetrasyklin	Sigma-Aldrich
Tigecycline hydrate	Sigma-Aldrich
Tobramycin sulfate salt	Sigma-Aldrich
Trizma base	Sigma-Aldrich

2.3 Oligonukleotidprimere (Invitrogen™)

Gen	Forward primer (F)	Revers primer (R)
<i>yfiN</i>	GCGAAAAGGTTACAAACGCG	ATGATCGGCATGCGTAATGG
<i>N/A</i>	ACAAAACCTCTCCGAGCACTTT	AAGCGCCATATTTCCGACAC
<i>ydaM_1</i>	ACAGACCTGTGTAACGACCA	AGTTCAAAGGCAGCCTCTCT
<i>yedT</i>	CCAAGCTTGGGCGCAAAA	GGCAGGGCTGATACTACCAA
<i>pleD_3</i>	CTAATGATAATCGGGCGCGG	AGGCGATGATATTCCGGAGT
<i>ydaM</i>	ACATCCTGAATTTGTTGCGCA	CAGAGTGGTTTTATCTGGTGCT
<i>N/A</i>	GCAGCTCAATACATCTTGGA	AGTAATATTGGAAGCTGCGGC
<i>gmr_11</i>	GATTACGCCGAAGTCCTCCT	GTGGTGTCCAAACGCATCAT
<i>cph2_1</i>	CGTCGCAACTTTACTTTGTGC	CAGCCCATTGAGTATGCTGTT
<i>gmr_2</i>	AACTCAACATTGCTCGCCAG	TCGTATGCCAGCGGAGTAAT
<i>pilZ</i>	AGTGAAGATGGGCCAGGAAA	TGCGGTTTAAATCCACTTTGCT
<i>16s</i>	TCGCTAGTAATCGCGGATCA	GACGGGCGGTGTGTACAAG

2.4 Kommersielle kit

DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN®)

MB Spin Column
 PowerBead Solution
 PowerBead Tube
 Solution CB
 Solution EB
 Solution IRS
 Solution SB
 Solution SL
 Oppsamlingsrør 2 ml

High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™)

20x Enzyme mix (MuLV og RNase inhibitor protein)
 2x RT buffer mix (inkludert dNTP, tilfældige oktamerer, og oligo dT-16)

RNase-free DNase Set (QIAGEN®)

RNase-free DNase I
RNase-free Buffer RDD
RNase-free water

RNeasy Mini Kit (QIAGEN®)

Buffer RPE
Buffer RLT (β -merkaptoetanol tilsatt før bruk)
Buffer RW1
RNeasy Mini Spin Columns
RNase-Free Water
Oppsamlingsrør 1.5 ml
Oppsamlingsrør 2 ml

TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen™)

TURBO DNase
10x TURBO DNase Buffer
DNase Inactivation Reagent
Nuclease-free Water

2.5 Løsninger forberedt i laboratoriet

Amikacin (14.07 mg/ml, 25.32 mg/ml og 25.87 mg/ml)

Amikacin (henholdsvis 18.78 mg, 33.81 mg og 34.54 mg) ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann og oppvarmet etter behov for å løse pulveret. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.

Ampicillin (20.5 mg/ml)

20.50 mg ampicillin ble løst i 1 ml MHB-medium og lagret ved -20°C.

Ceftazidim (28.11 mg/ml og 46.67 mg/ml)

Ceftazidim (henholdsvis 29.04 mg og 48.21 mg) ble løst i 1 ml 0.1 M NaOH. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.

Ciprofloxacin (9.26 mg/ml)

9.26 mg ciprofloxacin ble løst i 1 ml 0.1 M HCl. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.

DEPC-behandlet H₂O
2.5 ml DEPC (=0,1%) ble tilsatt en 25000 ml glassbeholder og destillert vann ble tilsatt til 25000 ml. Blandingen ble satt under avtrekksskap over natten med magnet og mild røring. Flasken ble deretter satt til autoklaving i 15 minutter ved 121 °C.
Fosfomycin (14.78 mg/ml og 11.33 mg/ml)
Fosfomycin (henholdsvis 19.79 mg og 15.18 mg) ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Gentamicin (12.94 mg/ml, 23.68 mg/ml, 41.38 mg/ml og 41.42 mg/ml)
Gentamicin (henholdsvis 15.60 mg, 28.56 mg, 49.91 mg og 49.96 mg) ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Kloramfenikol (44.64 mg/ml, 33.30 mg/ml og 46.06 mg/ml)
Kloramfenikol (henholdsvis 44.64 mg, 33.30 mg og 46.06 mg) ble løst i 1 ml EtOH. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Kolistin (18.22 mg/ml)
19.78 mg kolistin ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Meropenem (4.3 mg/ml, 13.66 mg/ml, 13.87 mg/ml, 14.58 mg/ml og 14.06 mg/ml)
Meropenem (henholdsvis 4.9 mg, 15.59 mg, 15.83 mg, 16.64 mg og 16.05 mg) ble løst i 1 ml DMSO i et avtrekksskap. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Minocyklin (9.07 mg/ml)
9.79 mg minocyklin ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann og oppvarmet etter behov for å løse pulveret. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Oligonukleotidprimere
Hver primer ble tilsatt DEPC-behandlet vann til en konsentrasjon på 100 mM. Primerne ble satt på vortex i 30 sekunder før løsningene ble lagret ved -20°C.
Piperacillin (29.52 mg/ml, 44.24 mg/ml og 43.90 mg/ml)
Piperacillin (henholdsvis 30.84 mg, 46.23 mg og 45.87 mg) ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
1x TBE-buffer
10.8 g Tris Base, 5.5 g Borsyre og 930 mg EDTA ble innveid i veieskip før overføring til en 1000 ml glassflaske. DEPC-behandlet vann ble tilsatt til 1000 ml. pH ble justert med 1M NaOH eller 1M HCl til pH = 8.
Tetrasyklin (80 µg/ml)
0.08 mg tetrasyklin ble løst i 1 ml EtOH og lagret ved -20°C.

Tigesyklin (1.13 mg/ml og 1.59 mg/ml)
Tigesyklin (henholdsvis 1.16 mg og 1.64 mg) ble løst i 1 ml DMSO i et avtrekkskap og oppvarmet etter behov for å løse pulveret. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.
Tobramycin (10.88 mg/ml og 8.95 mg/ml)
Tobramycin (henholdsvis 13.77 mg og 11.33 mg) ble løst i 1 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen ble alikvotert og lagret ved -20°C.

2.6 Vekstmedier

Lysogeny Broth (LB)
Tilberedt av labteknikker
Mueller Hinton Broth (MHB)
22 g Mueller Hinton Broth 2 ble oppveid i et veieskip før det ble overført i en 1000 ml glassflaske. Destillert vann ble tilsatt til 1000 ml og ristet til pulveret ble løst. Løsningen ble alikvotert i mindre glassflasker før det ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C.

2.7 Utstyr og apparatur

Utstyr/apparatur	Leverandør
Analysevekt	Sartorius
Arbeidslampe med forstørrelsesglass	Biltema
Elektroforseapparat	Owl Separation Systems
Eppendorfrør 1.5 ml	Eppendorf
Eppendorfrørstativ	Sigma-Aldrich
Falconrør 15 ml og 50 ml	Corning
Falconrørstativ	Sigma-Aldrich
Fryseholder eppendorfrør 1.5 ml	Sigma-Aldrich
GelDoc XR+	Bio-rad
GeneAmp® PCR System 2700	Thermo Fisher Scientific
Glassflasker (forskjellige størrelser)	Thermo Fisher Scientific
Inkubator MaxQ 6000	Thermo Fisher Scientific
Inokuleringsøser	Thermo Fisher Scientific
Kryobokser	Thermo Fisher Scientific
Kyvetter semi-micro	VWR

LAF-benk HeraSafe KS	Thermo Fisher Scientific
LightCycler® 480 Real-Time PCR	Roche
L-formet utstrykningspinne	Thermo Fisher Scientific
Mediumflaske 30 mL	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplate forseglingsfilm, semi-permeabel	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplate forseglingsfilm, non-permeabel	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplate med rund bunn, 96 brønner	Thermo Fisher Scientific
Mikrorørstativ	Sigma-Aldrich
Minilys	Bertin Technologies
Multi-kanal pipette	Rainin
NanoDrop Lite spektrofotometer	Thermo Fisher Scientific
Overskålsvekt	AE adam
Parafilm	Bemis
PCR lokk multiple 0.2 ml	SARSTEDT AG & Co.
PCR plate 96 brønner 0.1 ml	Thermo Fisher Scientific
PCR plate forseglingsfilm	Thermo Fisher Scientific
PCR rør multiple 0.2 ml	SARSTEDT AG & Co.
Petrisåler	Thermo Fisher Scientific
pH-meter 744	Metrohm
Pipette	Finnpipette Systems/Lite XLS Rainin
Pipettespiss med filter	TerraRack Rainin
Pipettespiss	VWR
Precellysrør	VWR
Sentrifuge BIOFUGE pico	Heraeus
Sentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen
Sentrifuge mikrorør	Thermo Fisher Scientific
Spektrofotometer model 7205	Jenway

3 METODER

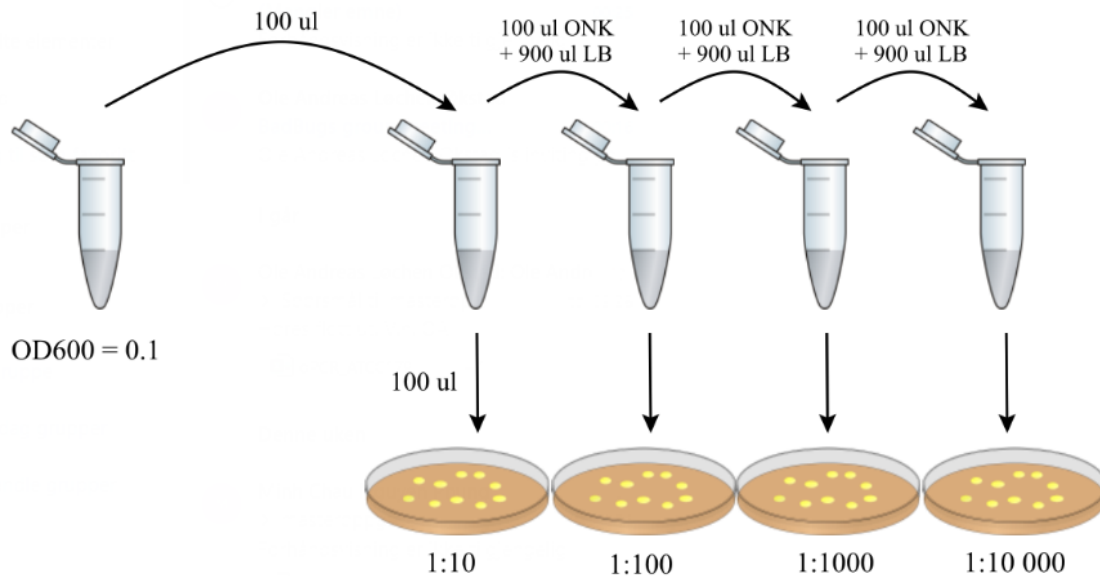
3.1 Bestemmelse av minimum inhiberende konsentrasjon

Minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) ble målt for å bestemme den laveste konsentrasjonen av et antimikrobielt middel som kreves for å inhibere synlig vekst av bakterien [86]. Resistens måles vanligvis som en funksjon av MIC av et gitt antibiotikum [7]. Tolv ulike antibiotikaløsninger ble laget som beskrevet i *seksjon 2.5* og fortynnet til ønsket konsentrasjon for å bestemme MIC-verdier for både *A. baylyi* (ADP1) og *A. baumannii* (ATCC 17978, ATCC 19606 og AB5075-UW). Protokollen for inokulering og klargjøring av 96-brønners mikrotiterplate ble utført likt for hver bakteriestamme i en LAF-benk ved aseptisk teknikk.

Bestemmelse av celletetthet (CFU/ml)

CFU/ml ble beregnet for å bestemme hvilke fortynninger som skulle benyttes ved inokulering av bakteriekulturene til MIC. En over natt-kultur (ONK) ble laget ved å inokulere én enkeltkoloni av ønsket bakteriestamme i 5 ml LB-medium i en 30-ml mediumflaske. Kulturen ble inkubert ved 37°C i 16-20 timer med rysting på 180 rpm.

Optisk tetthet (OD) ble deretter målt. For å måle OD₆₀₀ ble ONK fortynnet med forholdet 1:9 med MHB-medium for å sikre et lineært forhold mellom OD og antall bakterier. Lineariteten i spektrofotometeret er kun gjeldende i et begrenset område av celletetthet (0.1-1). ONK ble fortynnet med en 4-gangers seriefortynning fra OD₆₀₀ = 0.1 med LB-medium. 100 µl av hvert eppendorfrør i fortynningsrekken ble platet ut på LB agarplater og inkubert ved 37°C i 16-20 timer (*figur 3.1.1*). Koloniene ble telt og CFU/ml ble beregnet.



Figur 3.1.1 Illustrasjon av 4x-seriefortynning av overnattkultur med $OD_{600} = 0.1$ til ønsket bakteriestamme og tilhørende fortynningsfaktor ($1:10 = 10^{-1}$, $1:100 = 10^{-2}$, $1:1000 = 10^{-3}$, $1:10\ 000 = 10^{-4}$).

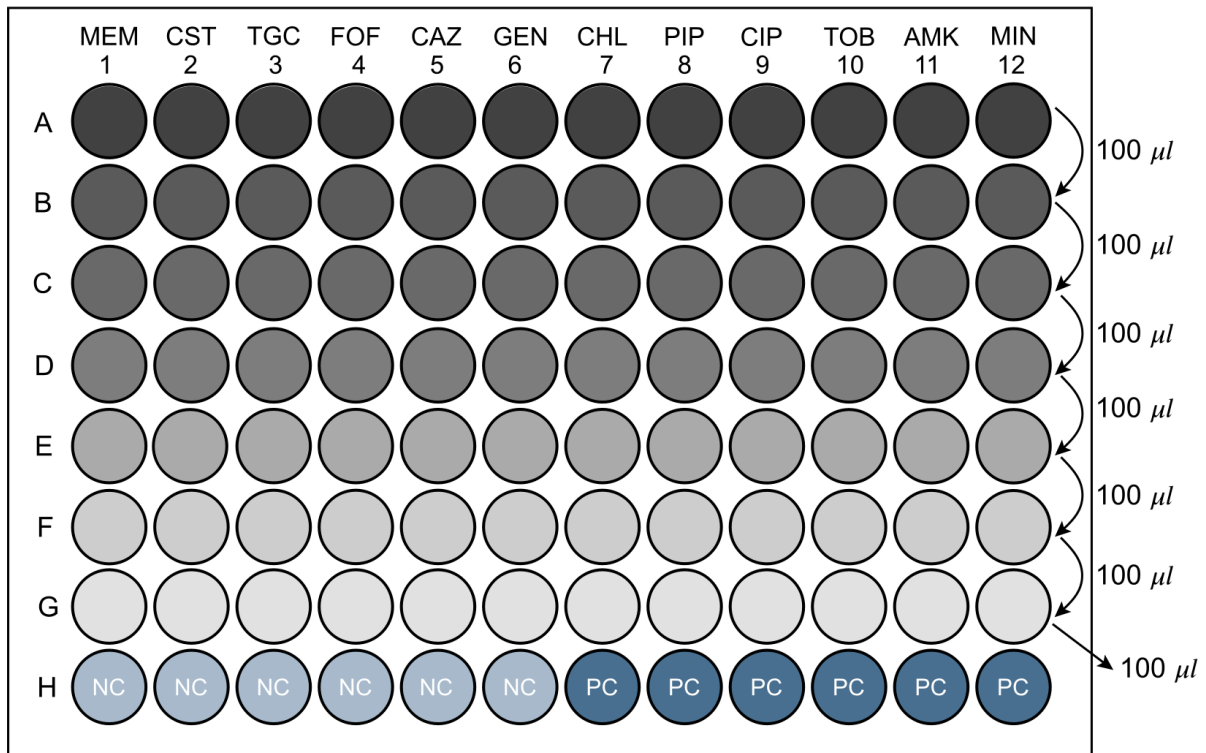
Tilberedning av inokulat

ONK ble laget ved å inokulere én enkeltkoloni av ønsket bakteriestamme i 5 ml MHB-medium i en 30-ml mediumflaske. Kulturen ble inkubert ved 37°C i 16-20 timer med risting på 180 rpm. OD ble deretter målt. Inokulatet til mikrotiterplaten ble forberedt ved å fortynne ONK til $OD_{600} = 0.1$ med MHB-medium.

Klargjøring av 96-brønners mikrotiterplate

Det ble i en 96-brønners mikroplate pipettert 100 µl MHB vekstmedium i rad A-G og rad H7-H12 (*fig. 3.1.2*), og 200 µl MHB i rad H1-H6. Rad H1-H6 representerte negativ kontroll (NC, uten bakterieinokulat) mens H7-H12 var for positiv kontroll (PC, bakterieinokulat uten antibiotikum). Deretter ble 80 µl MHB og 20 µl av hvert antibiotikum (meropenem (MEM), kolistin (CST), tigecyklin (TGC), fosfomycin (FOF), ceftazidim (CAZ), gentamicin (GEN), kloramfenikol (CHL), piperacillin (PIP), ciprofloksacin (CIP), tobramycin (TOB), amikacin (AMK), minocyclin (MIN)) blandet, og pipettert over i tilhørende brønn i rad A. Det ble så utført en 2-gangers seriefortynning av hvert antibiotikum ved å overføre 100 µl fra rad A til B ved hjelp av multikanal-pipette, blandet godt, og deretter på tilsvarende måte 100 µl fra rad B til rad C og igjen blandet godt. Dette ble gjentatt for hver rad inntil rad G, der til slutt 100 µl ble pipettert ut og kastet for å få samme volum som rad A-F (*figur 3.1.2*). 100 µl inokulum av ønsket bakteriestamme ble så tilsatt i hver brønn og blandet godt, i kolonne A-G og brønn H7-

H12. Lokket til mikrotiterplaten ble satt på og platen ble lagt i en lynlåspose, og inkubert ved 37 °C i 16-20 timer med rysting på 180 rpm.



Figur 3.1.2 Skjematiske fremstilling av oppsett av MIC forsøk i 96-brønners mikrotiterplate, ved 2x-seriefortynning av 12 utvalgte antibiotika (MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigeccyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin), NC og PC. Gråfargegraderingen viser til at antibiotikakonsentrasjonene avtar nedover i platen.

Visuell tolkning av resultater

Turbiditet i vekstmediet ble tolket som bakterievekst, mens ingen turbiditet i vekstmediet ble tolket som ingen bakterievekst. Brønner med lavest antibiotikakonsentrasjon hvor det ikke ble registrert turbiditet angir MIC-verdien til gitt antibiotikum. Tolkningen av resultatene for MIC følger dermed EUCAST standarder [87].

Utplating av bakterieinokulat

20 µl av utvalgte bakterieinokulat fra brønnene i mikrotiterplaten ble strøket ut på LB agarplater. Agarplaten ble inkubert ved 37°C i 16-20 timer. Dette ble gjort for å forsikre at den visuelle tolkningen av resultatene stemte.

3.1.1 MIC-forsøk for *A. baumannii* ATCC 17978 og ATCC 19606

Konsentrasjonsintervallene for ATCC 17978 og ATCC 19606 ble valgt ut fra MIC-verdier fra tidligere studier utført med enten MIC eller E-test (*tabell 3.1.1.1*). Konsentrasjon av antibiotikum tilsvarende den forventede MIC-verdi ble plassert i rad D, med unntak av kloramfenikol (CHL) som ble plassert i rad B (*tabell 3.1.1.2*).

Tabell 3.1.1.1 Oversikt over MIC-konsentrasjoner funnet i tidligere studier for *A. baumannii* ATCC 17978.

Antibiotikum	ATCC 17978 (ug/ml)	ATCC 19606(ug/ml)	Metode
MEM	0.5 (0.75)	Samme MIC-verdier ble benyttet for ATCC 19606, som for ATCC 17978	MIC [88] (E-test [89])
CST	2 (0.5-0.75)		MIC [88] (E-test [90, 91])
TGC	0.12 (0.09-1)		MIC [88] (E-test [90])
FOF*	64-256		E-test
CAZ	8 (2-12)		MIC [88] (E-test [89, 90])
GEN	0.35 ⁶ - 0.5		E-test [89]
CHL	> 256		E-test [90]
PIP (+tazobactam)	4 (2)		MIC [88] (E-test [89])
CIP	0.25 (0.25)		MIC [88] (E-test [90])
TOB	0.5		E-test [89]
AMK	3		E-test [89]
MIN	0.003		MIC [92]

* MIC-konsentrasjon fra stamme AB5075-UW

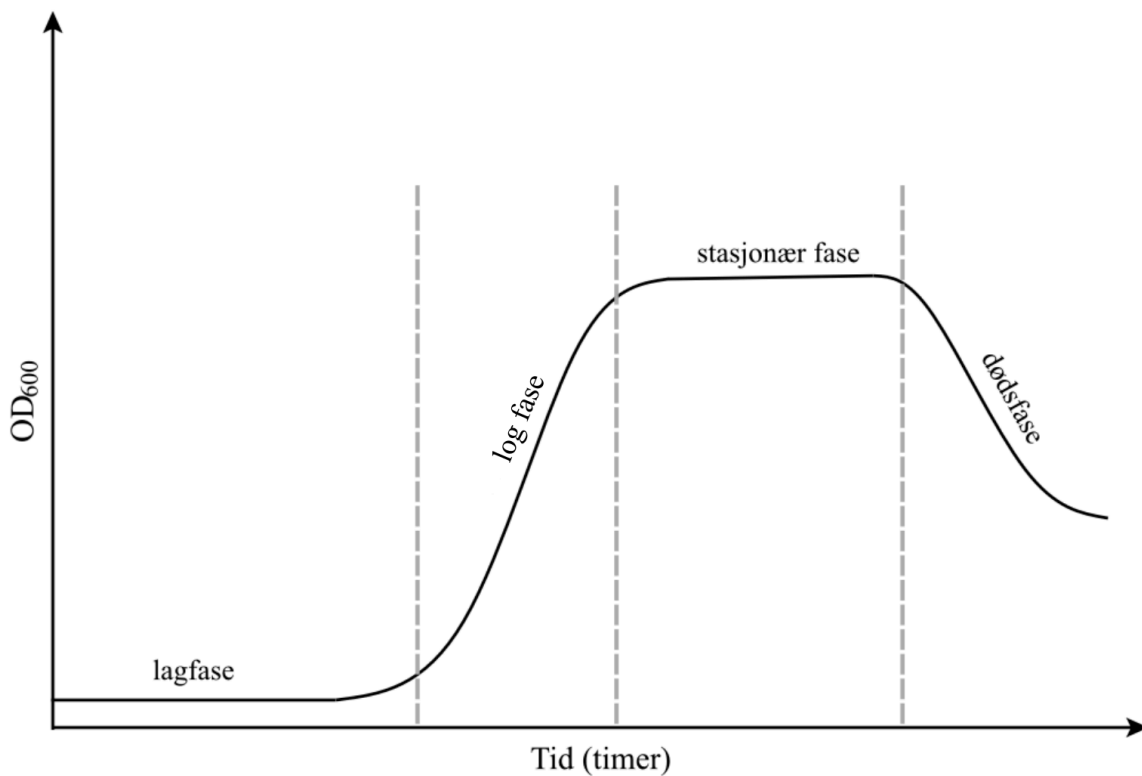
Tabell 3.1.1.2 Skjematisk 96-brønners mikrotiterplateoppsett for *A. baumannii* ATCC 17978 og ATCC 19906.

Grå rute indikerer forventet MIC-verdi for bakteriestammene hentet fra tidligere studier for de ulike antibiotikaene.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF	CAZ	GEN	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN
A	4	16	0.96	512	64	2.8	512	16	2	4	24	0.024
B	2	8	0.48	256	32	1.4	256	8	1	2	12	0.012
C	1	4	0.24	128	16	0.7	128	4	0.5	1	6	0.006
D	0.5	2	0.12	64	8	0.35	64	2	0.25	0.5	3	0.003
E	0.25	1	0.06	32	4	0.175	32	1	0.125	0.25	1.5	0.0015
F	0.125	0.5	0.03	16	2	0.0875	16	0.5	0.0625	0.125	0.75	0.00075
G	0.0625	0.25	0.015	8	1	0.0437	8	0.25	0.0313	0.0625	0.375	0.000375
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

3.2 Bakteriell vekstkurve i fravær og nærvær av antibiotika

En bakteriell vekstkurve er en grafisk fremstilling av antall bakterier i en kultur over en gitt periode. Vekstkurven består av fire faser: lag-fase, eksponentiell vekst eller log-fase, stasjonær fase og dødsfasen. I lag-fasen er bakteriene metabolsk aktive, men deler seg ikke. Delingen foregår ikke før i log-fasen, der veksten er eksponentiell. Kurven vil etter hvert flate ut og nå et platå der antall dødende celler tilsvarer antall aktivt voksende og delende celler. Til slutt går kurven inn i en dødsfase og beskrives som en eksponentiell nedgang i antall celler (*figur 3.2.1*). Vekstkurven kan påvirkes av mange faktorer (for eksempel temperatur, pH, tilgang til lys og oksygen) og er forskjellig for ulike bakterier [93].



Figur 3.2.1 Illustrasjon av vekstkurve for bakterier med lag fase, log fase, stasjonær fase og dødsfase.

Tilberedning av inokulat

Tilberedning av inokulat for *A. baumannii* ATCC 17978 ble utført som beskrevet i *seksjon 3.1*, men ONK ble fortynt til $OD_{600} = 0.05$ med MHB og fordelt i 6 ulike mediumflasker med 6 ml ONK i hver flaske. Fem flasker ble tilsatt 20 μ l antibiotikum (CAZ, CHL, CST, FOF og TOB) og den siste flasken ble brukt som kontroll uten antibiotikum tilsatt.

Antibiotikakonsentrasjonene som ble benyttet er listet opp i *tabell 3.2.1*. Mediumflaskene ble inkubert ved 37°C i 6 timer med rysting på 180 rpm.

Tabell 3.2.1 Oversikt over antibiotika for fremstilling av vekstkurver for *A. baumannii* ATCC 17978.

Antibiotikum	½ MIC (ug/ml)
CAZ	8
CHL	16
CST	0.5
FOF	128
TOB	0.25

Måling av OD_{600}

OD_{600} ble målt én gang hver time med ulike fortyninger av bakteriekulturen i MHB-medium (*tabell 3.2.1*).

Tabell 3.2.1 Oversikt over tidspunkt for OD_{600} -måling av bakteriekulturene og forholdet mellom mengde bakteriekultur og MHB-medium.

Tid (timer)	Mengde bakteriekultur (μ l)	Mengde MHB (μ l)
1	500	500
2	500	500
3	100	900
4	100	900
5	100	900
6	100	900

3.3 Genomisk DNA isolering

Isolering av genomisk DNA (gDNA) ble utført ved hjelp av DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN®). Cellene lyses for å degradere lipid- og proteinstrukturer som fører til frigjøring av celleinnholdet. gDNA som frigjøres binder seg til silisium-kolonnefilteret, etterfulgt av en affinitetsrensing. Deretter elueres gDNA fra filteret [94].

Tilberedning av inokulat

En ONK ble laget ved å inokulere én enkeltkoloni av ATCC 17978 i 5 ml MHB-medium i en 30-ml mediumflaske. Kulturen ble inkubert ved 37°C i 16-20 timer med rysting på 180 rpm. ONK ble fordelt på fem eppendorfrør med 1 ml i hver og sentrifugert i 10 minutter ved 13 000 x g før supernatanten ble fjernet og prøvene ble lagret ved -80°C.

Isolering av gDNA

To eppendorfrør med bakteriepellet ble tatt opp av fryseren og tint. Hver cellepellet ble resuspendert i 150 µl PowerBead løsning og blandet på vortex før innholdet ble samlet i et PowerBead rør. Det ble tilsatt 50 µl SL løsning, og parafilm ble satt på før røret ble satt på vortex i 10 minutter på maksimum hastighet for cellelysis. Røret ble deretter sentrifugert i 30 sekunder ved 10 000 x g, og supernatanten ble overført til et nytt 2-ml oppsamlingsrør. Det ble tilsatt 100 µl IRS løsning og røret ble satt på vortex i 5 sekunder før inkubering i 5 minutter. Røret ble sentrifugert i 1 minutt ved 10 000 x g. Det ble overført 450 µl supernatant i et nytt 2-ml oppsamlingsrør. Deretter ble det tilsatt 900 µl SB løsning og satt på vortex i 5 sekunder. En MB spin kolonne ble tilsatt 700 µl av supernatanten fra oppsamlingsrøret og sentrifugert i 30 sekunder ved 10 000 x g. Væsken som passerte kolonnen ble kastet og samme prosedyre ble gjentatt for resten av supernatanten. Deretter ble 300 µl CB løsning tilsatt kolonnen, og sentrifugert i 30 sekunder ved 10 000 x g. Væsken som passerte ble kastet, før kolonnen igjen ble sentrifugert i 1 minutt ved 10 000 x g. Kolonnen ble overført til en ny 2-ml oppsamlingsrør og 50 µl EB løsning ble tilsatt filtermembranen i kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert i 30 sekunder ved 10 000 x g for eluering av gDNA, som ble lagret ved -80°C.

Måling av DNA-konsentrasjon og renhet

Målingene ble gjort ved hjelp av et NanoDrop™ spektrofotometer (ThermoFisher®).

Konsentrasjonen av DNA ble beregnet ut fra A_{260} , mens renheten av prøvene ble vurdert ut

ifra A_{260}/A_{280} -ratio. Ratioen gir en grov indikasjon på renhet, og proteinkontaminering kan påvises ved en reduksjon av forholdet mellom A_{260}/A_{280} , mens en RNA-forurensning gir en økning. En A_{260}/A_{280} -ratio tilnærmet 1.8 tyder på en ren DNA-prøve [95, 96].

3.4 RNA isolering

Isolering av RNA ble utført ved hjelp av RNeasy Mini Kit (QIAGEN®). Cellene lyses og homogeniseres samtidig som RNAsen inaktiveres for å sikre intakt RNA. Fritt RNA binder en silikabasert-membran og kontaminasjon renses effektivt, til slutt elueres RNA fra membranen [97].

Tilberedning av inokulat

Tilberedning av inokulat for *A. baumannii* ATCC 17978 ble utført som beskrevet i *seksjon 3.1*, men ONK ble fortynnet til $OD_{600} = 0.05$ med MHB og fordelt i 6 ulike 30-ml mediumflasker med 10 ml ONK i hver flaske. Fem flasker ble tilsatt 50 μ l antibiotikum (CAZ, CHL, CST, FOF og TOB) med tilsvarende konsentrasjoner som oppført i *tabell 3.2.1* og en flaske ble benyttet som kontroll uten antibiotikum tilsatt. Mediumflaskene ble inkubert ved 37°C i ca. 3 timer med rysting på 180 rpm.

RNA ble isolert ved $OD = 1$. For hver behandlet eller ubehandlet prøve ble 3 ml bakteriekultur overført til et 15mL Falkon-rør med 3 ml iskald metanol for å stoppe cellenes transkripsjonsprosess, blandet godt, og fordelt på 6 eppendorfrør med 1 ml i hver. Eppendorfrørene ble sentrifugert ved romtemperatur i 10 minutter ved 13 000 x g. Supernatanten ble fjernet og prøvene ble fryst ved -80°C.

Lysering av celler

Prøvene med cellepellet ble tatt opp fra fryseren og tint. For hvert rør med behandlet eller ubehandlet prøve ble det tilsatt 950 μ l RLT buffer (med β -merkapttoetanol) som deretter ble overført til et precellysrør (totalt 6 precellysrør; 1 ubehandlet prøve og fem prøver behandlet med antibiotika). Rørene ble lysert på minilyseringsapparat i 40 sekunder x 2 ved 5000 rpm med 20 sekunders pause imellom. Deretter ble de sentrifugert ved romtemperatur i 1 minutt ved 13 000 x g, og 700 μ l supernatant ble overført til nytt eppendorfrør. Lik mengde etanol 70 % ble tilsatt og blandet.

Isolering av RNA

For hver prøve: 700 µl av blandingen av supernatant og etanol etter lysing ble overført til en RNeasy mini spinnskolonne med oppsamlingsrør, og sentrifugert i 20 sekunder. Væsken som passerte kolonnen ble kastet og samme prosedyre ble gjentatt for resten av blandingen. Det ble tilsatt 350 µl RW1 buffer og sentrifugert i 20 sekunder. Prøven ble deretter behandlet med 80 µl DNase I mix (70 µl RDD buffer + 10 µl DNase) og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Det ble tilsatt 350 µl RW1 buffer og inkubert i 5 minutter ved romtemperatur, før det ble sentrifugert i 20 sekunder. Kolonnen ble plassert i en ny 2-ml oppsamlingsrør og 500 µl RPE buffer ble tilsatt før sentrifugering i 20 sekunder. Væsken som passerte kolonnen ble kastet og 500 µl RPE buffer ble igjen tilsatt og sentrifugert i 20 sekunder. Væsken ble kastet og kolonnen ble sentrifugert i ytterligere 2 minutter. Kolonnen ble deretter plassert i et nytt 1.5-ml oppsamlingsrør og RNA ble eluert ved tilsetning av 30 µl DEPC-behandlet H₂O og sentrifugert i 20 sekunder. Væsken som passerte kolonnen ble pipettert opp igjen og tilsatt kolonnen på nytt for maksimal eluering av RNA. Kolonnen ble inkubert i 1 minutt ved romtemperatur og sentrifugert i 1 minutt. Kolonnen ble kastet og prøven ble satt på is.

Måling av RNA-konsentrasjon og renhet

Målingene ble gjort ved hjelp av et NanoDrop™ spektrofotometer (ThermoFisher®). Konsentrasjonen av RNA ble beregnet ut fra A₂₆₀, mens renheten av prøvene ble vurdert ut ifra A₂₆₀/A₂₈₀-ratio. Ratioen gir en grov indikasjon på renhet, og proteinkontaminering kan påvises ved en reduksjon av forholdet mellom A₂₆₀/A₂₈₀, mens en DNA-forurensning gir en økning. En A₂₆₀/A₂₈₀-ratio tilnærmet 2.1 tyder på en ren RNA-prøve [95].

Turbo DNase-behandling av RNA og påfølgende rensing

RNA ble behandlet med TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen™) ved blanding av komponentene med angitt mengde i *tabell 3.4.1* og inkubert ved 37°C i 30 minutter.

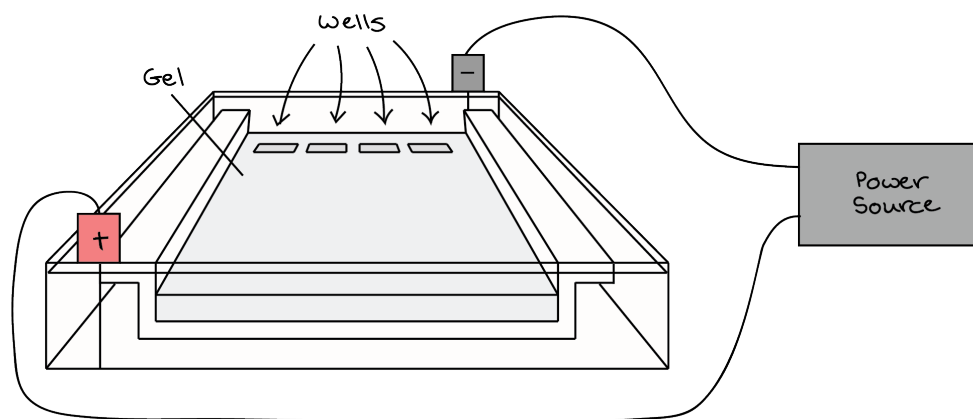
Tabell 3.4.1 Oversikt over komponentene som ble benyttet i Turbo DNase-behandlingen ved RNA-isolering.

Komponent	Mengde
RNA	20 µg
DEPC-behandlet H ₂ O	Totalvolum med RNA tilsvarende 86 µl
10x Turbo DNase buffer	10 µl
Turbo DNase (2 U/µl)	4 µl
Totalt	100 µl

Etter inkubasjonen ble 350 µl RLT buffer (med β-merkaptoetanol) tilsatt prøven. Deretter ble 250 µl Absolutt etanol tilsatt og blandet. Blandingen ble overført til en RNeasy minikolonne med oppsamlingsrør og sentrifugert i 20 sekunder. Det ble så tilsatt 500 µl RPE buffer, sentrifugert i 20 sekunder og væsken som passerte kolonnen ble kastet. Samme prosedyre ble gjentatt på nytt for hele volumet av prøven og avsluttet med sentrifugering i 2 minutter. DNase-behandlet RNA ble eluert med 30 µl DEPC-behandlet vann og sentrifugering i 20 sekunder. Væsken som passerte kolonnen ble så pipettert opp og tilsatt i kolonnen igjen og sentrifugert på nytt i 1 minutt. Kolonnen ble så kastet og prøvene ble satt på is. Ny måling av RNA-konsentrasjon og renhet ble utført, som over.

3.5 Agarose gelelektroforese av RNA

Agarose gelelektroforese er en teknikk som kan benyttes til å vurdere kvaliteten av RNA. Ved hjelp av et elektrisk felt separeres fragmenter av RNA basert på størrelse. RNA-fragmenter er negativt ladd og vil migrere fra den negative elektroden mot den positive elektroden (*figur 3.5.1*) [98]. Gelen består av agarose som er en matriks av porer. Korte RNA-fragmenter migrerer raskere gjennom porene enn lange RNA-fragmenter og danner bånd i gelen. GelRed[®] er et fluorescerende fargestoff som farger nukleinsyrer for avbildning i geldokumentasjonsapparat [98-100]. «Loading dye» tilsettes RNA-prøvene før elektroforese, for å øke tettheten og gi farge, noe som letter appliseringen i brønnene samtidig som det gir informasjon om hvordan RNA-molekylene beveger seg under gelseparasjonen [101, 102]. Apparatet ble vasket med Absolutt etanol og DEPC-behandlet H₂O. Utstyr for tilberedning av agarosegel ble på forhånd tørrsterilisert ved 180 °C i 3 timer for å minske risikoen for degradering av RNA-prøvene.



Figur 3.5.1 Illustrasjon av et gelelektroforese apparat med strømkilde og agarosegel med brønner for tilsetning av klargjorte RNA-prøver [98].

Tilberedning av 1% agarosegel

Det ble tilsatt 0.4 g agarosepulver til 40 ml 1xTBE-buffer i en 250-ml erlenmeyerkolbe. Agarosepulveret ble oppløst under oppvarming i en mikrobølgeovn før avkjøling til ca. 50°C. Blandingen ble tilsatt 4 µl GelRed® og blandet godt før det ble overført til gelformen og stivnet etter 30 minutter.

Klargjøring av RNA-prøver for elektroforese

RNA-prøver ble gjort klart på is med 1000 ng RNA-prøve og DEPC-behandlet vann. Farget «gel loading dye» med forholdet 1:6 ble benyttet og hver RNA-prøve skulle inneholde totalt 6 µl væske. RNA-prøvene ble deretter applisert i tilhørende brønn på agarosegelen. Elektroforesen ble utført med en spenning på 80 V i 60 minutter.

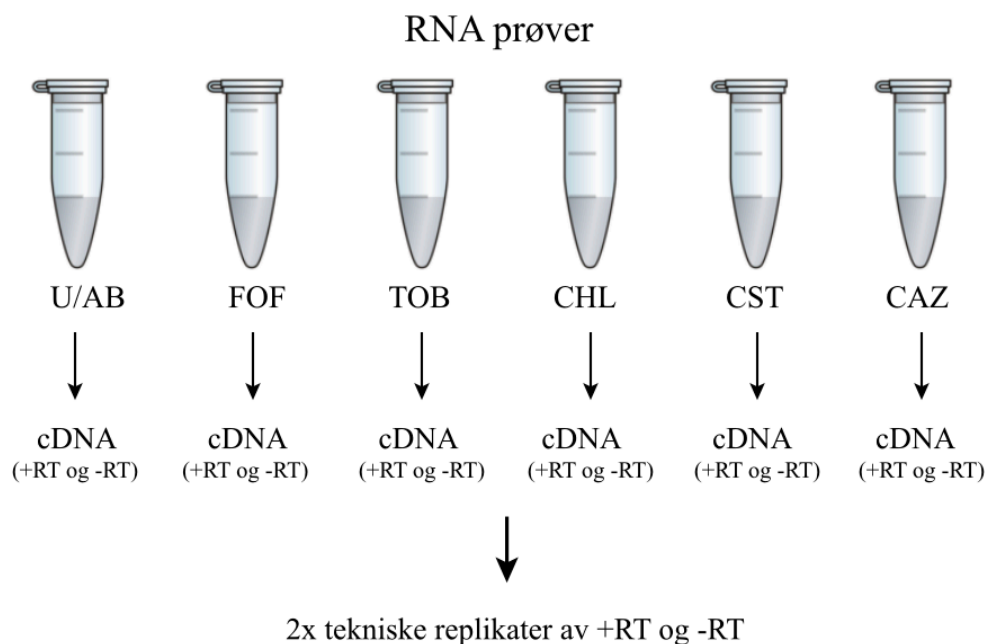
3.6 Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR), også kalt sanntids PCR («real-time reverse transcriptase PCR», RT-qPCR) er en metode som amplifiserer DNA, etter revers transkripsjon av RNA, og brukes til genekspressjonsanalyser [103, 104]. Metoden baseres på tradisjonell PCR med to nye elementer: et fluorescerende stoff og fluorometre. Fluorometeret detekterer fluorescens emittert fra prøvene som er proporsjonal med antall amplifisert DNA under hele reaksjonen, og gir nøyaktig kvantifisering etter hver termosyklus [105]. I dette studiet ble det benyttet to-trinns qPCR som består av to separate reaksjoner. RNA blir først konvertert til komplementær DNA (cDNA) av revers transkriptase (RT) en prosess som refereres til som «first-strand» cDNA syntese. Deretter blir «first-strand» cDNA benyttet som templat til syntese av dobbeltrådet cDNA i prosessen «second-strand» cDNA syntese der cDNA blir umiddelbart kvantifisert [106, 107]. En PCR-reaksjon består av termosykluser, hvor hver termosyklus består av tre trinn: denaturering, annealing og elongering.

Denaturering: temperaturen økes til smeltepunktet for dobbeltrådet DNA (dsDNA) som denatureres til enkelttrådet DNA (ssDNA) og avhenger av lengde og basepar i DNA-sekvensen. *Annealing:* temperaturen senkes slik at komplementære oligonukleotid primere (forover- og revers primer), korte enkelttrådede DNA-molekyler, kan binde seg spesifikt til ssDNA og fungere som et startpunkt for enzymet DNA Polymerase. *Elongering:* temperaturen økes igjen til et temperaturoptimum for DNA Polymerase, som kan forlenge DNA-tråden fra 3' ende av oligonukleotid primeren ved polymerisering med frie nukleotider

(adenin, tymin, cytosin og guanin) ved bruk av ssDNA som templat. Én termosyklus resulterer i to nye dsDNA-molekyler fra ett templatmolekyl, og for hver syklus doubles mengden dsDNA [106, 108]. dsDNA detekteres av fluorometeret ved hjelp av SYBR Green. Dette fargestoffet binder uspesifikt til basene i dsDNA og konformasjonsendringen medfører emisjon i form av fluorescens når komplekset bestråles med lys [109, 110].

For hver prøve ble det syntetisert cDNA med revers transkriptase (+RT) og en negativ kontroll uten revers transkriptase (-RT), med to tekniske replikater av hver (*figur 3.6.1*).



Figur 3.6.1 Skjematisk fremstilling av cDNA-syntese reaksjoner fra ett biologisk replikat med 6 RNA-prøver, behandlet med fem ulike antibiotika, samt ubehandlet kontroll (U/AB = uten antibiotika, FOF = fosfomycin, TOB = tobramycin, CHL = kloramfenikol, CST = kolistin og CAZ = ceftazidim) som gir enten cDNA med revers transkriptase, eller en negativ kontroll uten revers transkriptase tilstede. Det ble produsert 2 tekniske replikater fra hver cDNA-prøve.

3.6.1 cDNA syntese

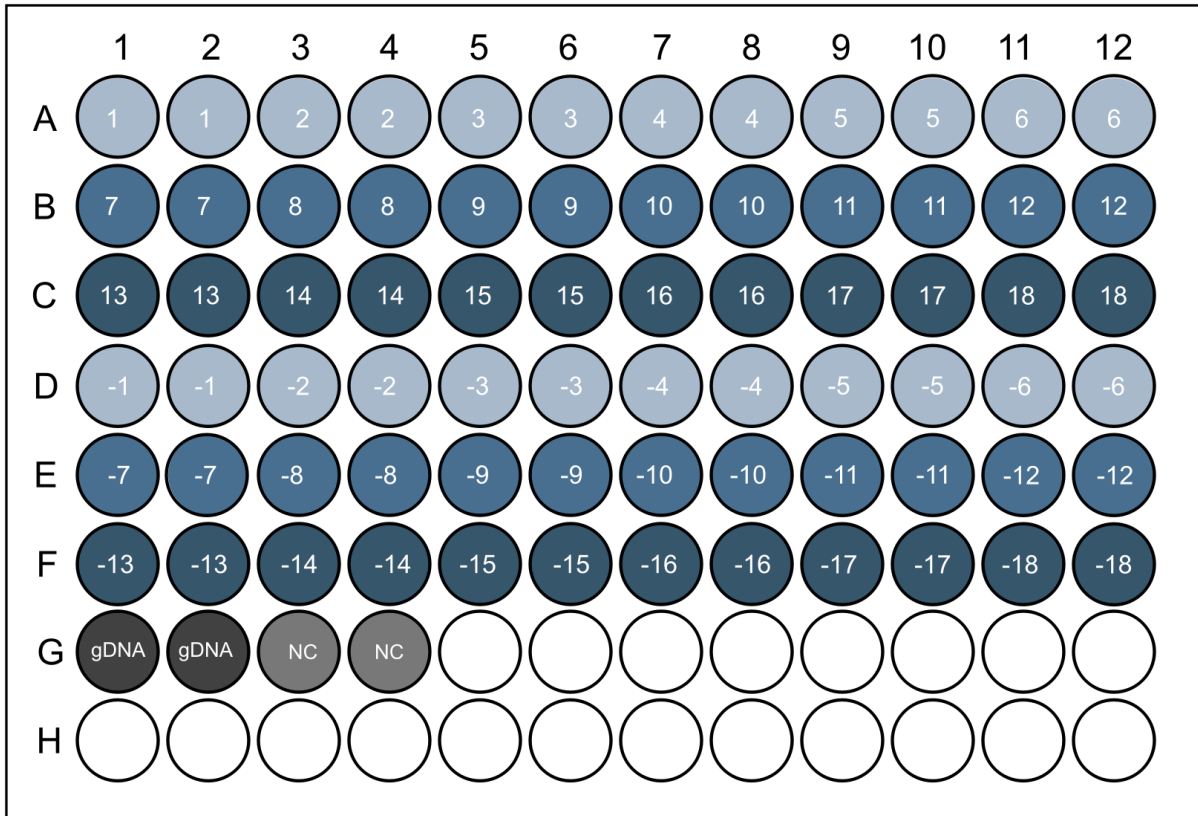
cDNA syntesen ble utført ved hjelp av et High Capacity RNA-to-cDNA-kit (Applied Biosystems™). Det ble laget reaksjoner med revers transkriptase (+RT) og uten (-RT) (fig. 3.6.1). DEPC-behandlet vann ble først tilsatt i PCR-rør strips. Deretter ble 10 µl RT buffer tilsatt, så RNA-prøve, og til slutt 1 µl enzym mix med revers transkriptase som angitt i tabell 3.6.1.1. Blandingene ble spunnet ned og stripsene inkubert ved 37°C i 60 minutter i PCR-maskin. Det ble deretter tilsatt DEPC-behandlet vann til prøvene til sluttvolum på 200 µl. cDNA-prøvene ble oppbevart ved -20°C.

Tabell 3.6.1.1 Oversikt over komponenter og tilhørende mengde per reaksjon med revers transkriptase (+RT) og uten (-RT) for cDNA-syntese.

Komponent	+ RT reaksjon (µl)	- RT kontroll (µl)
2x RT buffer	10.0	10.0
20x Enzym mix	1.0	-
RNA-prøve	Opptil 9	Opptil 9
DEPC-behandlet H ₂ O	Til 20.0	Til 20.0
Totalt per reaksjon	20.0	20.0

3.6.2 Reaksjonsoppsett for qPCR

Forsøket ble utført for 11 målgener og ett referansegen, totalt 12 gener og ett primersett for hvert gen. Ekspresjonsnivået for hvert gen ble kvantitert fra 3 biologiske replikater (RNA isolert i uavhengige eksperimenter) med 6 prøver i hvert replikat (fem antibiotika, samt behandlet kontroll). To cDNA reaksjoner (+RT/-RT) ble satt opp for hver prøve, hver med 2 tekniske replikater. I tillegg ble det gjort 2 tekniske replikater av gDNA (positiv kontroll) og negativ templat kontroll (NC) (figur 3.6.2.1). Det ble utført én 96-brønners mikrotiterplate for hvert av de 12 genene.



Biologisk replikat 1
 Biologisk replikat 2
 Biologisk replikat 3
 NC
 gDNA

Figur 3.6.2.1 Skjematisk fremstilling av reaksjonsoppsettet for en qPCR-plate satt opp for hver mutant (*seksjon 2.1.1*) som skulle kvantiteres for genuttrykk etter behandling med ulike antibiotika relativt til en ubehandlet kontrollprøve. Hver blåfarge indikerer i et biologisk replikat (biologisk replikat 1: nr. 1-6, biologisk replikat 2: nr. 7-12, biologisk replikat 3: nr. 13-18), mens de ulike gråfargene indikerer genomisk DNA (gDNA) eller negativ templat kontroll (NC). Brønnene er markert med tall for å vise til at hvert biologiske replikat ble analysert med to tekniske replikater, og tallene med negativt fortegn indikerer prøver uten revers transkriptase (-RT kontroll).

For hver reaksjon i rad A-F ble det pipettert SYBR Green, primermix og cDNA, mens cDNA ble erstattet med gDNA for G1 og G2, og erstattet med DEPC-behandlet vann for G3 og G4. Mengden for hver komponent er angitt i *tabell 3.6.2.1*. Platene ble deretter utført med PCR-program som angitt i *tabell 3.6.2.2*.

Tabell 3.6.2.1 Reagenser benyttet for hver reaksjon i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978.

Komponent	+ RT (µl)	- RT (µl)	gDNA (µl)	NC (µl)
SYBR Green*	5.0	5.0	5.0	5.0
Primermix (hver primer = 0.5 µM)	3.0	3.0	3.0	3.0
cDNA (1.5 µg)	2.0	2.0	-	-
gDNA (237.4 ng/µl)	-	-	2.0	-
DEPC-behandlet H ₂ O	-	-	-	2.0
Totalt per reaksjon	10.0	10.0	10.0	10.0

* SYBR Green inneholder: nukleotider, MgCl₂ og DNA-polymerase

Tabell 3.6.2.2 Reaksjonsprogram benyttet for qPCR av *A. baumannii* ATCC 17978 med 11 målgen og ett referansegen, LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche®).

PCR-program	
Temperaturprofil: SYBR Green	
Initial denaturering	95°C i 5 sekunder
45 syklers bestående av	
Denaturering	95°C i 10 sekunder
Annealing	60°C i 10 sekunder
Elongering	72°C i 10 sekunder

4 RESULTATER

4.1 Etablering av testoppsett for MIC-analyser

I forbindelse med etablering av testoppsett for MIC-analyser for *A. baumannii*, ble det utført flere biologiske replikater for å undersøke om MIC-verdier identifisert i tidligere publiserte studier var reproducerbare i vårt lokale analyseoppsett. I de initielle fasene av studiet ble *A. baylyi* ADP1 benyttet, da dette er en apatogen bakterie.

Bestemmelse av celletetthet (CFU/ml)

Etter utførelse som beskrevet i *seksjon 3.1* ble celletettheten for ONK bestemt for *A. baylyi* ADP1. Resultatene for kultur med $OD_{600} = 0.1$ presenteres kun for agarplaten som tillot telling av antall kolonier (*tabell 4.1.1*) og viste at ONK måtte fortynnes med forholdet 1:10 000 i vekstmedium for å oppnå omtrent $5 \cdot 10^5$ CFU/ml som er ønsket [87].

Tabell 4.1.1 Resultater for bestemmelse av celletetthet av levende bakterier (CFU/ml) for *A. baylyi* ADP1 ved $OD_{600} = 0.1$.

<i>A. baumannii</i>	Antall kolonier	Fortynningsfaktor	Tetthet (CFU/ml)
ADP 1	152	10^{-4}	$1.5 \cdot 10^7$ ($OD_{600} = 0.1$)

Etablering av MIC testoppsett for *A. baylyi*

A. baylyi ADP1 er en apatogen bakterieart egnet til opparbeidelse av teknikk for pipettering, aseptisk arbeid i LAF-benk og etablering av MIC-protokoll for *Acinetobacter*. Forsøket ble utført som beskrevet i *seksjon 3.1*, og det ble utført tre biologiske replikater med tetrasyklin (TET), kloramfenikol (CHL) og ampisillin (AMP). Resultatene er vist i *tabell 4.1.2*, *4.1.3* og *4.1.4*, hvor MIC-konsentrasjoner hentet fra tidligere publisert studie er markert i grått [111]. MIC-verdi for biologisk replikat 1 og 2 (*tabell 4.1.2* og *4.1.3*) for CHL stemte godt overens med verdier hentet fra andre publiserte studier, selv om biologisk replikat 3 (*tabell 4.1.4*) varierte med en faktor 2. For TET varierte MIC med 2-4 ganger endring sammenlignet med publiserte studier (*tabell 4.1.2*, *4.1.3* og *4.1.4*). For AMP biologisk replikat 1 (*tabell 4.1.2*) kolonne 5 var det vekst i G og ikke H, noe som kan tyde på kontaminasjon i F. Det har i de to første replikatene (*tabell 4.1.2* og *4.1.3*) ikke vært bestemt noe MIC for AMP da det ikke var noe vekst i hele konsentrasjonsintervallet og varierte minimum med en faktor 16 sammenlignet med MIC fra publiserte studier. For biologisk replikat 3 (*tabell 4.1.4*) ble AMP

konsentrasjonsintervallet utvidet for å kunne bestemme MIC-verdi. Det var en forskjell på faktor 16 mellom MIC og verdien fra publiserte studier. Generelt er alle MIC-verdiene i biologisk replikat 3 (tabell 4.1.4) høyere enn for biologisk replikat 1 og 2 (tabell 4.1.2 og 4.1.3), men MIC-verdiene varierer ikke mer enn en faktor 2. For biologisk replikat 1 (tabell 4.1.2) ble alle brønnene med MIC-konsentrasjonen, en konsentrasjon under og en konsentrasjon over platet ut som beskrevet i seksjon 3.1. Det var vekst i alle brønnene. For biologisk replikat 2 (tabell 4.1.3) ble det platet ut for MIC-konsentrasjonen og to konsentrasjoner over som også viste vekst. Det siste replikatet (tabell 4.1.4) viste vekst i alle brønnene som ble platet ut fra MIC-konsentrasjonen og to konsentrasjoner over for TET, MIC og tre konsentrasjoner over for CHL og hele kolonne 5 og 6 for AMP.

Tabell 4.1.2 Resultat av MIC-bestemmelse for 3 ulike antibiotika (TET = tetrasyklin, CHL = kloramfenikol og AMP = ampicillin) for *A. baylyi* ADP1, biologisk replikat 1, utført i to tekniske replikater. Kolonne 7-9 var tomme. Ingen vekst ble observert i hele konsentrasjonsintervallet for AMP teknisk replikat 2. Resultater for NC og PC var som forventet (vekst i positiv kontroll, ikke i negativ kontroll).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TET	TET	CHL	CHL	AMP	AMP						
A	4	4	64	64	1024	1024	-	-	-	PC	PC	NC
B	2	2	32	32	512	512	-	-	-	PC	PC	NC
C	1	1	16	16	256	256	-	-	-	PC	PC	NC
D	0.5	0.5	8	8	128	128	-	-	-	PC	PC	NC
E	0.25	0.25	4	4	64	64	-	-	-	PC	PC	NC
F	0.125	0.125	2	2	32	32	-	-	-	PC	PC	NC
G	0.0625	0.0625	1	1	16	16	-	-	-	PC	PC	NC
H	0.03125	0.03125	0.5	0.5	8	8	-	-	-	PC	PC	NC

■ = Observert MIC

■ = MIC fra andre publiserte studier

Tabell 4.1.3 Resultat av MIC-bestemmelse for 3 ulike antibiotika (TET = tetrasyklin, CHL = kloramfenikol og AMP = ampicillin) for *A. baylyi* ADP1, biologisk replikat 2, utført i to tekniske replikater. Kolonne 7-9 var tomme. Ingen vekst ble observert i hele konsentrasjonsintervallet for AMP teknisk replikat 1 og 2. Resultater for NC og PC var som forventet (vekst i positiv kontroll, ikke i negativ kontroll).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TET	TET	CHL	CHL	AMP	AMP						
A	4	4	64	64	1024	1024	-	-	-	PC	PC	NC
B	2	2	32	32	512	512	-	-	-	PC	PC	NC
C	1	1	16	16	256	256	-	-	-	PC	PC	NC
D	0.5	0.5	8	8	128	128	-	-	-	PC	PC	NC
E	0.25	0.25	4	4	64	64	-	-	-	PC	PC	NC
F	0.125	0.125	2	2	32	32	-	-	-	PC	PC	NC
G	0.0625	0.0625	1	1	16	16	-	-	-	PC	PC	NC
H	0.03125	0.03125	0.5	0.5	8	8	-	-	-	PC	PC	NC

■ = Observert MIC

■ = MIC fra andre publiserte studier

Tabell 4.1.4 Resultat av MIC-bestemmelse for 3 ulike antibiotika (TET = tetrasyklin, CHL = kloramfenikol og AMP = ampicillin) for *A. baylyi* ADP1, biologisk replikat 3, utført i to tekniske replikater. Kolonne 7-9 var tomme. Resultater for NC og PC var som forventet (vekst i positiv kontroll, ikke i negativ kontroll).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TET	TET	CHL	CHL	AMP	AMP	AMP	AMP				
A	4	4	64	64	1024	1024	4	4	-	PC	PC	NC
B	2	2	32	32	512	512	2	2	-	PC	PC	NC
C	1	1	16	16	256	256	1	1	-	PC	PC	NC
D	0.5	0.5	8	8	128	128	0.5	0.5	-	PC	PC	NC
E	0.25	0.25	4	4	64	64	0.25	0.25	-	PC	PC	NC
F	0.125	0.125	2	2	32	32	0.125	0.125	-	PC	PC	NC
G	0.0625	0.0625	1	1	16	16	0.0625	0.0625	-	PC	PC	NC
H	0.03125	0.03125	0.5	0.5	8	8	0.0313	0.0313	-	PC	PC	NC

= Observert MIC

= MIC fra andre publiserte studier

4.2 Optimalisering av testoppsett for MIC-analyser

Testoppsettet for MIC-analysen fra *seksjon 4.1* ble utvidet til 12 antibiotika, med *A. baumannii* ATCC 17978 og ATCC 19606 som teststammer. Disse stammene er kliniske isolater, men ikke multiresistente. Forsøket ble utført som beskrevet i *seksjon 3.1*. ATCC-stammene ble benyttet for å optimalisere testoppsettet for senere MIC-analyser med den multiresistente stammen *A. baumannii* AB5075-UW og samtidig bestemme ½ MIC-konsentrasjon for dyrking og RNA-isolering for *A. baumannii* ATCC 17978. Bestemmelse av celledetthet (CFU/ml) var tidligere utført for disse *A. baumannii* stammene av stipendiat Claus Michael Goul Larsen.

Det ble utført to biologiske replikater for MIC-analyser for *A. baumannii* ATCC 17978 og ATCC 19606. Eksperimentene med ATCC 19606 ga ikke tilstrekkelig reproducerbare resultater (det var mer enn en 2 ganger endring i MIC for ulike antibiotika mellom de biologiske replikatene) og ble dermed ikke inkludert i videre analyser, mens ATCC 17978 ga mer stabile og reproducerbare resultater (*tabell 4.2.1* og *tabell 4.2.2*) hvor både GEN, CHL, TOB og AMK viste MIC-verdier som stemte godt overens med MIC-verdier hentet fra tidligere studier [89, 90]. MEM, CST, FOF, CAZ og CIP verdiene funnet varierte med en faktor på 2-4 i forhold til tidligere publiserte studier. TGC varierte med en faktor på 8 sammenlignet med MIC oppgitt i tidligere studier, mens det ikke kunne bestemmes MIC-verdier for PIP eller MIN på grunn av full vekst i hele konsentrasjonsintervallet. Mellom de biologiske replikatene varierte MIC-verdiene kun med en faktor på 2 (*tabell 4.2.1* og *4.2.2*).

Tabell 4.2.1 Resultat av MIC-bestemmelse for 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* ATCC 17978 (biologisk replikat 1). Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet ble observert for PIP og MIN, og resultater fra kontrollene NC og PC var som forventet (vekst i PC, ingen vekst i NC).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF	CAZ	GEN	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN
A	4	16	0.96	512	64	2.8	512	16	2	4	24	0.024
B	2	8	0.48	256	32	1.4	256	8	1	2	12	0.012
C	1	4	0.24	128	16	0.7	128	4	0.5	1	6	0.006
D	0.5	2	0.12	64	8	0.35	64	2	0.25	0.5	3	0.003
E	0.25	1	0.06	32	4	0.175	32	1	0.125	0.25	1.5	0.0015
F	0.125	0.5	0.03	16	2	0.0875	16	0.5	0.0625	0.125	0.75	0.00075
G	0.0625	0.25	0.015	8	1	0.0437	8	0.25	0.0313	0.0625	0.375	0.000375
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC



= Observert MIC



= MIC fra andre publiserte studier

Tabell 4.2.2 Resultat av MIC-bestemmelse for 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* ATCC 17978 (biologisk replikat 2). Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet ble observert for PIP og MIN, og resultater fra kontrollene NC og PC var som forventet (vekst i PC, ingen vekst i NC).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF	CAZ	GEN	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN
A	4	16	0.96	512	64	2.8	512	16	2	4	24	0.024
B	2	8	0.48	256	32	1.4	256	8	1	2	12	0.012
C	1	4	0.24	128	16	0.7	128	4	0.5	1	6	0.006
D	0.5	2	0.12	64	8	0.35	64	2	0.25	0.5	3	0.003
E	0.25	1	0.06	32	4	0.175	32	1	0.125	0.25	1.5	0.0015
F	0.125	0.5	0.03	16	2	0.0875	16	0.5	0.0625	0.125	0.75	0.00075
G	0.0625	0.25	0.015	8	1	0.0437	8	0.25	0.0313	0.0625	0.375	0.000375
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC



= Observert MIC



= MIC fra andre publiserte studier

4.2.1 Optimalisering av MIC-assay for *A. baumannii* ATCC 17978

DMSO, NaOH eller HCl ble benyttet som løsningsmiddel for å løse MEM, TGC, CAZ og CIP som beskrevet i seksjon 2.5. Testoppsettet ble derfor videre optimalisert med et biologisk replikat 3 (i tillegg til de to i seksjons 4.2 over) for å undersøke toksisiteten av disse løsningsmidlene, og samtidig ble konsentrasjonsintervallene for TGC, PIP og MIN oppjustert for å kunne bestemme MIC for disse antibiotikaene i *A. baumannii* ATCC 17978 (tabell 4.2.1.1). Konsentrasjonen av hhv. DMSO, NaOH og HCl som ble brukt i disse analysene var den samme som sluttkonsentrasjonen av hvert kjemikalium i brønnene hvor disse ble brukt som løsningsmiddel for antibiotika. Deretter ble to identiske mikrotiterplater utført parallelt for å bestemme hvilken type film (non-permeabel gjennomsiktig eller semipermeabel ugjennomsiktig) som kunne benyttes for forsegling av brønnene til senere

forsøk med *A. baumannii* AB5075-UW (multiresistent stamme). Forseglingen forhindrer fordamping av væske og mulighet for uheldig spredning av mikroorganismer fra brønnene. Resultat presenteres kun for oppsettet med semipermeabel ugjennomsiktig film (tabell 4.2.1.2), da ingen resultater kunne tolkes ved bruk av non-permeabel gjennomsiktig film.

Det var full vekst i brønnene med DMSO, HCl og NaOH for biologisk replikat 3 (tabell 4.2.1.1). Dette bekreftet at løsningsmidlene i seg selv ikke har toksisk effekt på bakteriene. Ved oppjusteringen av konsentrasjon for TGC, PIP og MIN ble det mulig å angi MIC-verdier for disse (tabell 4.2.1.1 og 4.2.1.2, selv om dette ble basert på kun ett biologisk replikat). TGC verdiene funnet varierte med en faktor 4-8, PIP med en faktor 64 og MIN med en faktor 32 sammenlignet med MIC oppgitt i tidligere studier. MEM, CST, FOF, CAZ, GEN, CHL og CIP verdiene funnet varierer med en faktor 0-8 (tabell 4.2.1.1 og 4.2.1.2). Som for biologisk replikat 1 og 2 (tabell 4.2.1 og 4.2.2) stemte MIC-verdier for TOB og AMK overens med MIC hentet fra tidligere studier for biologisk replikat 3 og 4 (tabell 4.2.1.1 og 4.2.1.2). Ingen MIC-verdi kunne bestemmes for FOF i biologisk replikat 3 (tabell 4.2.1.1), til forskjell fra i replikat 1 og 2 (tabell 4.2.1 og 4.2.2). Ved sammenligning av de biologiske replikatene for de fleste antibiotika varierte ikke avlest MIC for platene med (tabell 4.2.1.2) eller uten film (tabell 4.2.1.1), samtidig som filmen tillot avlesning. CST, PIP, TOB, AMK og MIN var reproduserbare, MEM, TGC, GEN, CHL og CIP varierte MIC med en faktor 2, mens FOF og CAZ med mer enn 2. Semipermeabel ugjennomsiktig film ble vurdert til å kunne brukes i analyser for den multiresistente stammen *A. baumannii* AB5075-UW.

Tabell 4.2.1.1 Resultat av MIC-bestemmelse for 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* ATCC 17978 (biologisk replikat 3) og toksisitet av DMSO, HCl og NaOH. Ingen toksisk effekt av DMSO, HCl og NaOH, NC og PC var som forventet (vekst i PC, ingen vekst i NC). *Konsentrasjonsintervallet var i dette replikatet oppjustert for angitt antibiotikum.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC*	FOF	CAZ	GEN	CHL	PIP*	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	4	16	7.68	512	64	2.8	512	512	2	4	24	0.768
B	2	8	3.84	256	32	1.4	256	256	1	2	12	0.384
C	1	4	1.92	128	16	0.7	128	128	0.5	1	6	0.192
D	0.5	2	0.96	64	8	0.35	64	64	0.25	0.5	3	0.096
E	0.25	1	0.48	32	4	0.175	32	32	0.125	0.25	1.5	0.048
F	0.125	0.5	0.24	16	2	0.0875	16	16	0.0625	0.125	0.75	0.024
G	0.0625	0.25	0.12	8	1	0.0437	8	8	0.0313	0.0625	0.375	0.012
H	DMSO	DMSO	HCl	HCl	NaOH	NaOH	PC	PC	PC	NC	NC	NC

- = Observert MIC
- = Løsningsmiddel
- = MIC fra andre publiserte studier

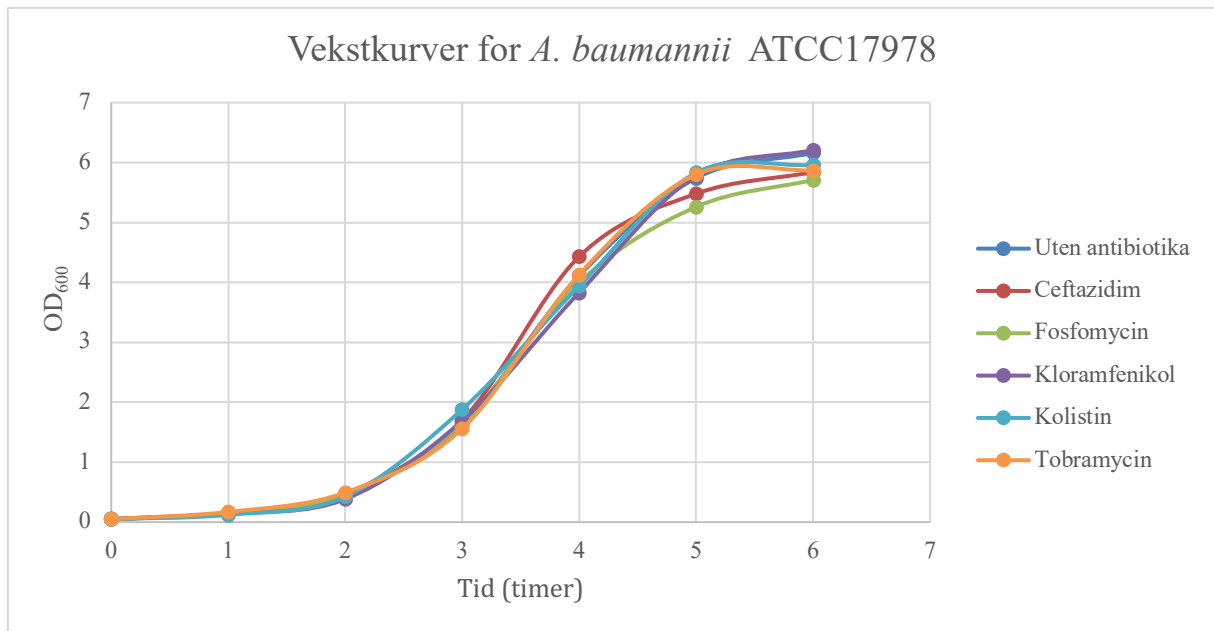
Tabell 4.2.1.2 Resultat av MIC-bestemmelse for 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* ATCC 17978 med semipermeabel ugjennomsiktig film (biologisk replikat 4). Resultater for NC og PC var som forventet (vekst i PC, ingen vekst i NC).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC*	FOF	CAZ	GEN	CHL	PIP*	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	4	16	7.68	512	64	2.8	512	512	2	4	24	0.768
B	2	8	3.84	256	32	1.4	256	256	1	2	12	0.384
C	1	4	1.92	128	16	0.7	128	128	0.5	1	6	0.192
D	0.5	2	0.96	64	8	0.35	64	64	0.25	0.5	3	0.096
E	0.25	1	0.48	32	4	0.175	32	32	0.125	0.25	1.5	0.048
F	0.125	0.5	0.24	16	2	0.0875	16	16	0.0625	0.125	0.75	0.024
G	0.0625	0.25	0.12	8	1	0.0437	8	8	0.0313	0.0625	0.375	0.012
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

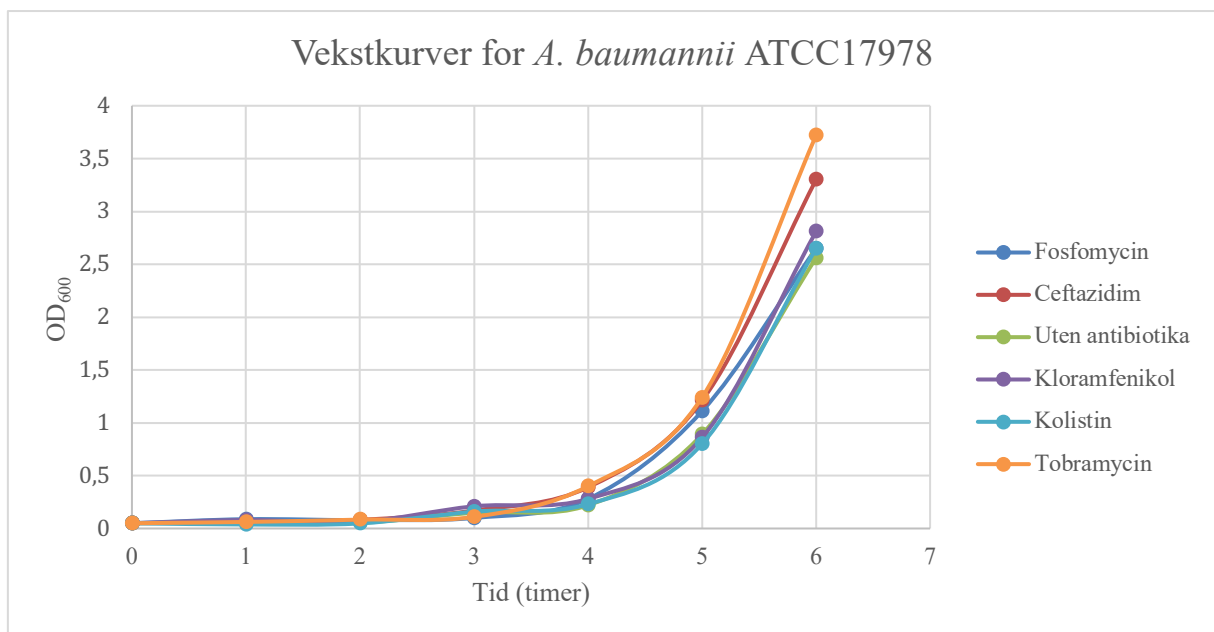
= Observert MIC
 = MIC fra andre publiserte studier

4.3 Bestemmelse av vekstkurver for *A. baumannii* ATCC 17978

Det var ønskelig å studere om ekspresjonsnivået av gener putativt involvert i c-di-GMP metabolisme ble påvirket ved vekst under subinhibitoriske nivåer av antibiotika. Det ble utført vekstkurver for *A. baumannii* ATCC 17978 for å kontrollere at veksthastigheten ikke var vesentlig påvirket ved subinhibitoriske konsentrasjoner av antibiotika, relativt til i fravær av antibiotikum. Det ble laget seks vekstkurver der bakteriene var dyrket i nærvær av ½ MIC av fem utvalgte antibiotika ut fra resultatene fra *seksjon 4.2* og en vekstkurve som kontroll. CAZ, FOF, CHL, CST og TOB ble valgt på bakgrunn av at de tilhørte forskjellige antibiotika-grupper med ulike virkningsmekanismer (*seksjon 1.1.1*). Vekstkurvene ble utført i to biologiske replikater, og biologisk replikat 2 hadde 2 timer lenger lagfase enn biologisk replikat 1 (*figur 4.3.1* og *figur 4.3.2*). Vekstkurvene for de to forsøkene viste imidlertid at det ikke var noen markant forskjell i veksthastighet for *A. baumannii* ATCC 17978 ved ½ MIC konsentrasjon av de fem undersøkte antibiotika relativt til ved fravær av antibiotika i kulturen. Eksakte verdier for OD₆₀₀-målingene ved tid x er lagt ved som *vedlegg 1*.



Figur 4.3.1 Grafisk fremstilling av vekstkurver for *A. baumannii* ATCC 17978 med enten ceftazidim, fosfomycin, kloramfenikol, kolistin, tobramycin tilsatt kulturen (konsentrasjon tilsvarende $\frac{1}{2}$ MIC), eller i kultur uten tilsatt antibiotika (biologisk replikat 1).



Figur 4.3.2 Grafisk fremstilling av vekstkurver for *A. baumannii* ATCC 17978 med enten ceftazidim, fosfomycin, kloramfenikol, kolistin, tobramycin tilsatt kulturen (konsentrasjon tilsvarende $\frac{1}{2}$ MIC), eller i kultur uten tilsatt antibiotika (biologisk replikat 2).

4.4 Analyse av induksjon av ekspresjon av ulike c-di-GMP-relaterte gener ved eksponering av utvalgte antibiotika

A. baumannii ATCC 17978 ble stimulert enkeltvis med fem ulike utvalgte antibiotika ved konsentrasjon tilsvarende $\frac{1}{2}$ MIC (seksjon 4.2), før isolering av RNA for å undersøke om utvalgte gener koblet til c-di-GMP-signaler ble induisert eller inhibert av antibiotika-eksponering. *Cdg*-genene i *A. baumannii* ATCC 17978 og AB5075-UW er 97-100% identiske på DNA- og proteinnivå, og alle *cdg*-relaterte gener i AB5075-UW er konserverv i *A. baumannii* ATCC 17978, slik at resultatene fra ATCC 17978 ble antatt å også reflektere AB5075-UW stammen (Ole Andreas Løchen Økstad, personlig kommunikasjon).

Isolering av gDNA

gDNA ble isolert som beskrevet i seksjon 3.3 og ble benyttet som templat for positiv kontroll i qPCR. Konsentrasjonen av gDNA ble målt til 237.4 ng/ μ l og $A_{260}/A_{280} = 1.83$ ved hjelp av NanoDrop spektrofotometer. gDNA-prøven inneholdt derfor ingen detekterte mengder av proteinkontaminasjon ettersom A_{260}/A_{280} var tilnærmet 1.8 (seksjon 3.3).

Isolering av RNA og syntese av cDNA

RNA ble isolert som beskrevet i seksjon 3.4 fra kulturer ved $OD_{600} = 1$, som tilsvarer eksponentiell vekstfase (seksjon 4.3). Det ble isolert RNA fra tre biologiske replikater, hver med seks prøver for hvert replikat; fem fra kulturer dyrket i nærvær av antibiotika, samt en kontrollkultur uten antibiotikum (tabell 4.4.1).

Tabell 4.4.1 Oversikt over RNA-prøver fra 3 biologiske replikater og hvilket antibiotikum den enkelte prøven ble behandlet med (TOB = tobramycin, CAZ = ceftazidim, FOF = fosfomycin, CST = colistin, CHL = kloramfenikol og U/AB = uten antibiotika) ved isolering. Konsentrasjonene oppgitt tilsvarer $\frac{1}{2}$ MIC ut fra resultatene fra seksjon 4.2 for *A. baumannii* ATCC 17978.

Biologisk replikat 1		Biologisk replikat 2		Biologisk replikat 3	
1.	TOB (0.25 μ g/ml)	7.	FOF (128 μ g/ml)	13.	CHL (16 μ g/ml)
2.	CAZ (8 μ g/ml)	8.	TOB (0.25 μ g/ml)	14.	CST (0.5 μ g/ml)
3.	FOF (128 μ g/ml)	9.	U/AB	15.	CAZ (8 μ g/ml)
4.	U/AB	10.	CHL (16 μ g/ml)	16.	TOB (0.25 μ g/ml)
5.	CST (0.5 μ g/ml)	11.	CST (0.5 μ g/ml)	17.	FOF (128 μ g/ml)
6.	CHL (16 μ g/ml)	12.	CAZ (8 μ g/ml)	18.	U/AB

Spektrofotometri-målinger av absorbanse (A_{260} og A_{280}) ble utført for hver av RNA-prøvene (tabell 4.4.2 og 4.4.3) før behandling med TURBO DNase, etterfulgt av nok en spektrofotometri-måling etter TURBO DNase behandling (tabell 4.4.4 og 4.4.5). Det ble vurdert at prøvene hadde høy nok konsentrasjon (tabell 4.4.4) og god nok renhet (tabell 4.4.5) for qPCR, da A_{260}/A_{280} -målinger for RNA-prøvene var tilnærmet 2.1 (tabell 4.4.5) som indikerte rene prøver.

Prøvene ble deretter brukt i syntese av cDNA som beskrevet i seksjon 3.6.1 og qPCR som beskrevet i seksjon 3.6.2. Mengden RNA som ble brukt som utgangspunkt for cDNA syntese i alle prøver var 1.5 µg. Noen av prøvene inneholdt ikke høy nok konsentrasjon av RNA, derfor ble maksimalt mulig volum av RNA-prøvene benyttet. Dette gjaldt prøve nr. 10, 16 og 18 (hhv. RNA fra kultur behandlet med CHL, TOB og uten antibiotika) og prøvene ble brukt i syntese av cDNA (seksjon 3.6.1) med 40 µl som angitt i tabell 4.4.6. Prøve nr. 10 ble utført uten -RT kontroll i qPCR fordi alt av RNA-prøven ble benyttet i syntese av cDNA.

Tabell 4.4.2 Resultat av RNA-konsentrasjonen i hver prøve for biologisk replikat 1, 2 og 3 oppgitt i ng/µl, etter isolering av RNA.

Biologisk replikat 1 (ng/µl)		Biologisk replikat 2 (ng/µl)		Biologisk replikat 3 (ng/µl)	
1.	909.4	7.	1644.7	13.	1305.1
2.	956.6	8.	1152.6	14.	1238.0
3.	1595.3	9.	744.7	15.	882.2
4.	857.2	10.	241.4	16.	1575.8
5.	1472.1	11.	885.1	17.	1575.7
6.	1497.9	12.	898.7	18.	1644.9

Tabell 4.4.3 Resultat av A_{260}/A_{280} -ratio for RNA-prøvene etter RNA-isolering.

Biologisk replikat 1 (A_{260}/A_{280})		Biologisk replikat 2 (A_{260}/A_{280})		Biologisk replikat 3 (A_{260}/A_{280})	
1.	2.13	7.	2.18	13.	2.16
2.	2.12	8.	2.14	14.	2.16
3.	2.17	9.	2.06	15.	2.13
4.	2.12	10.	2.07	16.	2.17
5.	2.17	11.	2.12	17.	2.17
6.	2.17	12.	2.11	18.	2.17

Tabell 4.4.4 Resultat av RNA-konsentrasjonen i hver prøve for biologisk replikat 1, 2 og 3 oppgitt i ng/ μ l, etter TURBO DNase behandling.

Biologisk replikat 1 (ng/ μ l)		Biologisk replikat 2 (ng/ μ l)		Biologisk replikat 3 (ng/ μ l)	
1.	559.6	7.	288.7	13.	559.5
2.	578.7	8.	414.0	14.	675.8
3.	526.4	9.	254.4	15.	325.7
4.	531.6	10.	81.0	16.	130.9
5.	533.3	11.	516.3	17.	268.2
6.	519.7	12.	412.7	18.	137.2

Tabell 4.4.5 Resultat av A_{260}/A_{280} -ratio for RNA-prøvene etter TURBO DNase behandling.

Biologisk replikat 1 (A_{260}/A_{280})		Biologisk replikat 2 (A_{260}/A_{280})		Biologisk replikat 3 (A_{260}/A_{280})	
1.	2.11	7.	2.10	13.	2.12
2.	2.12	8.	2.11	14.	2.13
3.	2.11	9.	2.09	15.	2.05
4.	2.12	10.	2.04	16.	2.04
5.	2.11	11.	2.11	17.	2.09
6.	2.10	12.	2.10	18.	2.10

Tabell 4.4.6 Oversikt over komponenter og tilhørende mengde per reaksjon for +RT og -RT for RNA-prøvene som inneholdt for lav konsentrasjon til å lage en 20 μ l reaksjon.

Komponent	+ RT reaksjon (μ l)	- RT kontroll (μ l)
2x RT buffer	20.0	20.0
20x Enzym mix	2.0	-
RNA-prøve	Opptil 18	Opptil 18
DEPC-behandlet H ₂ O	Til 40.0	Til 40.0
Totalt per reaksjon	40.0	40.0

4.4.1 Analyse av transkripsjonell induksjon av c-di-GMP-relaterte gener etter eksponering av subinhibitoriske konsentrasjoner av utvalgte antibiotika

Resultatene fra qPCR ble omregnet til fold change (FC) verdier. FC-verdier sier noe om den relative endringen av genuttrykk, og beregnes ved å sammenlikne C_T -verdier for behandlet prøve (her: antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet), også kalt komparativ C_T -metode [112, 113]. C_T -verdiene (rådata for eksperimentene) er lagt ved som *vedlegg 2*.

gDNA-prøven og RNA-prøvene viste tilfredsstillende absorbans-målinger og det var ingen tegn til kontaminasjoner (*seksjon 4.4*). qPCR forsøket ble utført for 11 målgener og et referansegene (*seksjon 2.1.1*) som beskrevet i *seksjon 3.6.2*. Én 96-brønners mikrotiterplate ble benyttet til analyse av hvert gen, derav totalt 12 mikrotiterplater med 76 reaksjoner i hver plate (+RT, -RT, gDNA og NC). Det ble gjort en sammenligning av +RT og korresponderende -RT reaksjon fra samme biologiske replikat for hvert gen. Referansegene, 16S rRNA ble observert å ha en differanse i C_T -verdi mellom +RT og -RT på 13 til 23 syklere, og viser dermed tilstrekkelig høyt nok signal fra RNA, i forhold til eventuell kontaminerende gDNA (*tabell V.2.1, vedlegg 2*). Det var imidlertid ikke tilfellet for mange av målgenene som skulle undersøkes, som også måtte forventes å være tilstede i lavere antall kopier i cellen i forhold til ribosomalt RNA. Det ble satt en «cut-off» ved differanse på 4 syklere mellom +RT og -RT reaksjonene, dvs. at $<6.25\%$ av signalet var fra gDNA ift. mRNA, noe som ble ansett som akseptabelt. Kun 24% (48/198) av alle reaksjonene hadde imidlertid en differanse > 4 syklere mellom +RT og korresponderende -RT for alle målgenene (*markert i grønt i vedleggstabellene V.2.2, V.2.4, V.2.6, V.2.8, V.2.10, V.2.12, V.2.14, V.2.16, V.2.18, V.2.20, V.2.22*). Det var kun ett biologisk replikat (replikant 1) som for 6 av målgenene hadde > 4 syklere forskjell mellom +RT og korresponderende -RT for kontrollprøven og samtidig for enkelte antibiotikum (*markert i grønt i vedleggstabellene V.2.3, V.2.5, V.2.7, V.2.9, V.2.15 og V.2.19*), og som dermed kunne benyttes til utregninger. Siden det kun var for enkelte antibiotikum og for ett biologisk replikat var mulig å benytte +RT reaksjonenes C_T -verdier, var det beklageligvis samlet sett umulig å benytte qPCR resultatene i noen form for kvantitering.

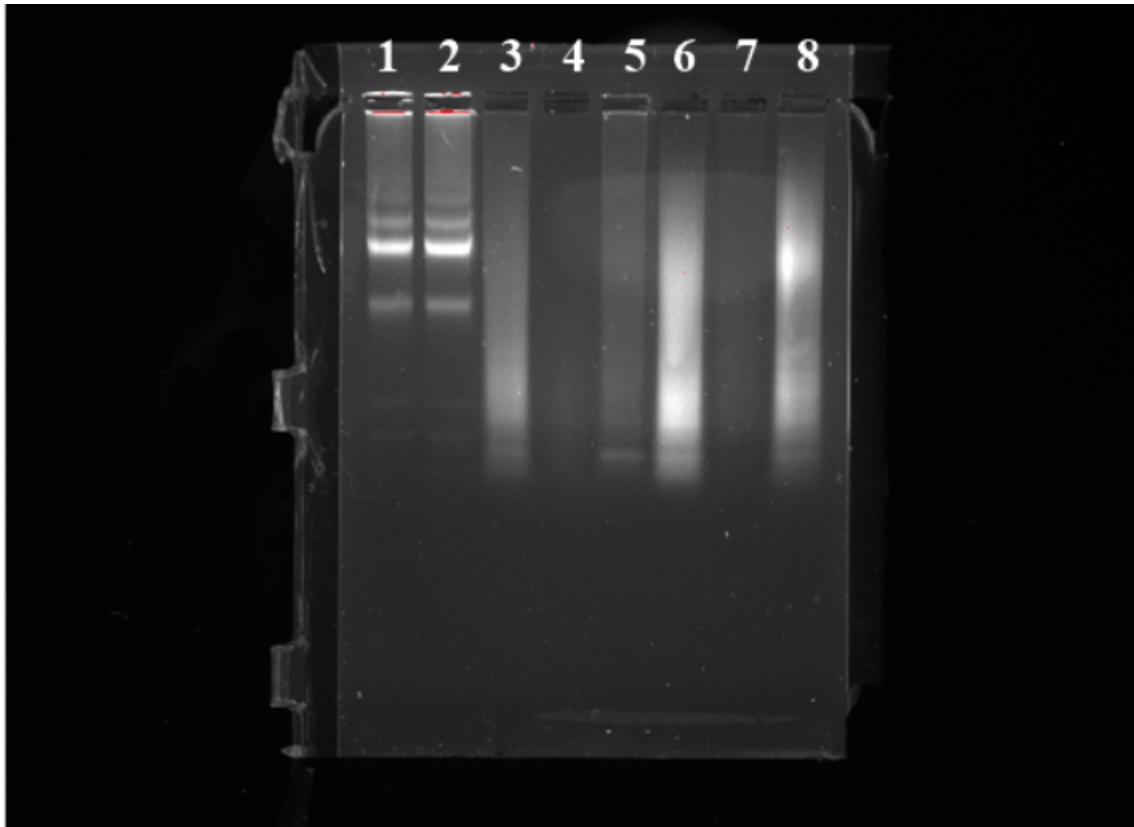
4.4.2 Kvalitetsanalyse av RNA-prøvene i qPCR

En kvalitetsanalyse av RNA-prøvene ved syntese av cDNA ble utført etter qPCR for å undersøke om integriteten på RNA som var brukt i analysene var intakt. Agarose gelelektroforese ble utført som beskrevet i *seksjon 3.5* med en seleksjon av seks RNA-prøver (tre RNA-prøver uten antibiotika og tre RNA-prøver med antibiotika, to prøver fra hvert biologiske replikat) fra *A. baumannii* på en gel, og hvor i tillegg to RNA-prøver isolert fra laks (og tidligere brukt i qPCR) ble brukt som kontroll (gave fra forsker Elia Ciani) (*tabell 4.4.2.1*).

Tabell 4.4.2.1 Oversikt over komponenter og mengder for RNA-prøver ved utførelse av agarose gelelektroforese av *A. baumannii* ATCC 17978 på ½ MIC konsentrasjon av ulike antibiotika. U/AB = uten antibiotika, TOB = tobramycin, FOF = fosfomycin, CHL = kloramfenikol. RNA-prøve fra laks er gave fra forsker Elia Ciani som ble brukt som kontroll.

Brønn	RNA-prøve	Mengde RNA (ng)	DEPC-behandlet H ₂ O (µl)	Loading dye (µl)
1	Laks	744.6	3	1
2	Laks	1116.9	2	1
3	U/AB	1063.2	3	1
4	U/AB	763.2	2	1
5	U/AB	548.8	1	1
6	TOB	1678.8	2	1
7	FOF	866.1	2	1
8	CHL	1678.5	2	1

Resultatet er vist i *Fig. 4.4.2.1* og kunne antyde at RNA-prøvene som hadde vært brukt i qPCR (brønn nr. 3-8) hadde dårlig integritet og kunne være degradert, da det ble observert kraftig «smearing» av RNA og lite konkrete bånd i gelen, eller ikke synlig RNA fra prøven. Intakt RNA fra prokaryote celler gir to synlige bånd, for 16S og 23S ribosomalt RNA (rRNA), noe som ikke ble observert for RNA-prøvene i *Fig. 4.4.2.1*. De to første brønnene (nr. 1 og 2) som inneholder RNA fra fisk var imidlertid intakte og ga tydelige bånd, tilsvarende eukaryot 18S og 28S rRNA, noe som bekreftet at det ikke var noe teknisk feil med utførelsen av elektroforese, og at eukaryot RNA ikke var blitt degradert underveis i forsøket.



Figur 4.4.2.1 Agarose gelelektroforese av utvalgte RNA-prøver isolert etter dyrking av *A. baumannii* 5075-UW ved $\frac{1}{2}$ MIC konsentrasjon av diverse antibiotika.. Fra venstre i brønn nr. 1 og 2: RNA fra laks, (gave fra forsker Elia Ciani), nr. 3: RNA fra kultur uten tilsatt antibiotika biologisk replikat 1, nr. 4: RNA fra kultur uten tilsatt antibiotika biologisk replikat 2, nr. 5: RNA fra kultur uten tilsatt antibiotika biologisk replikat 3, nr. 6: RNA fra kultur behandlet med tobramycin biologisk replikat 1, nr. 7: RNA fra kultur behandlet med fosfomycin biologisk replikat 2, og nr. 8: RNA fra kultur behandlet med kloramfenikol biologisk replikat 3.

4.5 MIC-bestemmelse for antibiotika i multiresistent

A. baumannii AB5075-UW villtypen

Det ble gjort en MIC-screening i den multiresistente *A. baumannii* AB5075-UW villtypen der det foreligger transposonmutanter for hvert gen [85]. MIC-screeningen ble utført for 12 antibiotika med et optimalisert testoppsett som beskrevet i seksjon 4.2. Konsentrasjonsintervallene for de ulike antibiotikaene ble igjen valgt ut fra MIC-verdier publisert i tidligere studier (tabell 4.5.1) og konsentrasjon av antibiotikum tilsvarende tidligere publisert MIC ble plassert i rad D (markert i grått) i oppsettet (tabell 4.5.2). CST og TGC er de to antibiotika som var oppgitt å ha klinisk effekt på stammen («susceptible») [114, 115]. De ti resterende antibiotikaene er stammen klinisk resistent mot. MIC-verdier oppgitt i litteraturen for FOF,

GEN og MIN er hentet fra andre MDR-stammer, da disse ikke var bestemt for *A. baumannii* AB5074-UW [116-118]. Det ble laget nye stock-løsninger av MEM, TGC, FOF, CAZ, GEN, CHL og TOB, mens stock-løsninger av CST, PIP, CIP, AMK OG MIN var de samme som ble brukt ved MIC-bestemmelse av *A. baumannii* ATCC 17978 (seksjon 3.1.1). For hvert antibiotikum ble vekstmediet visuelt scoret etter tre kategorier; ingen vekst, partiell vekst og full vekst. «Ingen vekst» antydte ingen synlig turbiditet i vekstmediet (MIC-verdi), mens «full vekst» antydte høy turbiditet. «Partiell vekst» antydte noen grad av turbiditet, og ble sammenlignet med «ingen vekst» for å kunne skille de to kategoriene fra hverandre. For hvert antibiotikum ble brønnen med lavest konsentrasjon som tydet på enten «partiell vekst» eller «ingen vekst» merket tilhørende farge i tabellen, resterende konsentrasjoner ble ikke merket. Antibiotikum uten markering med farge viste «ingen vekst» for konsentrasjonsintervallet som er oppført. Dette scoringsystemet ble brukt videre for MIC-bestemmelse for *A. baumannii* AB5075-UW. For biologisk replikat 1 stemte MIC-verdier av MEM og CHL godt overens med verdier fra tidligere publiserte studier. Det var full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for CAZ, GEN, PIP og AMK, og partiell vekst i brønnene med høyest konsentrasjon for CST og TGC. For MIN var det ingen vekst i noen av brønnene (tabell 4.5.2).

Tabell 4.5.1 Oversikt over MIC-konsentrasjoner for angitte antibiotika spesifisert med metode for MIC-bestemmelse, hentet fra tidligere publiserte studier av *A. baumannii* AB5075-UW. Verdiene ble søkt opp i litteraturen av stipendiat Claus Michael Goul Larsen.

Antibiotikum	AB5075-UW (µg/ml)	Metode
MEM	64	MIC [114]
CST	<0.125	MIC [114]
TGC	<0.5	- [115]
FOF*	64-256	E-test [116]
CAZ	>256	MIC [114]
GEN*	128	E-test [117]
CHL	128	E-test [119]
PIP (+ tazobactam)	64	MIC [120]
CIP	12.5	MIC [114]
TOB	48-64	E-test [121]
AMK	32	MIC [114]
MIN*	16-32	MIC [118]

*Data fra andre MDR-stammer

Tabell 4.5.2 Resultat av MIC-bestemmelse for 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* AB5075-UW villtype biologisk replikat 1. Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for MEM, CAZ, GEN, PIP og AMK. Ingen vekst i hele konsentrasjonsintervallet for MIN. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	1	4	512	2048	1024	1024	512	100	384	256	128
B	256	0.5	2	256	1024	512	512	256	50	192	128	64
C	128	0.25	1	128	512	256	256	128	25	96	64	32
D	64	0.125	0.5	64	256	128	128	64	12.5	48	32	16
E	32	0.06125	0.125	32	128	64	64	32	6.25	24	16	8
F	16	0.03125	0.06125	16	64	32	32	16	3.125	12	8	4
G	8	0.01562	0.03125	8	32	16	16	8	1.563	6	4	2
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = MIC fra andre publiserte studier

Optimalisering av MIC-bestemmelser for antibiotika i multiresistente *A. baumannii* AB5075-UW

MIC-screeningen for *A. baumannii* AB5075-UW villtypen viste ingen MIC-verdi for CAZ, GEN, PIP, AMK eller MIN, samtidig var ikke MIC sikkert bestemt for CST og TGC, som hadde partiell vekst i brønnen med høyest konsentrasjon. Det var heller ingen vekst i hele konsentrasjonsintervallet for MIN (tabell 4.5.2). Testoppsettet ble derfor endret for å optimalisere analysen. Konsentrasjonsintervallene for CST, TGC, CAZ, GEN, PIP og AMK ble oppjustert, mens MIN ble nedjustert for å kunne bestemme MIC (tabell 4.5.3). Det ble laget nye stock-løsninger av MEM, GEN, PIP, AMK og CHL, mens TGC, FOF, CAZ og TOB stock-løsningene var fra seksjon 4.5 over og CST, CIP og MIN var de samme som ble brukt ved MIC-bestemmelse av *A. baumannii* ATCC 17978 (seksjon 3.1.1). I likhet med biologisk replikat 1 (tabell 4.5.2) stemte MEM og CHL overens med MIC-verdier hentet fra tidligere publiserte studier også for biologisk replikat 2 (tabell 4.5.3). MIC-verdi for CST, TGC, CIP varierte med en faktor på henholdsvis 16, 32 og 8 sammenlignet med verdier fra publiserte studier, mens MIN viste en MIC-verdi som var 32 ganger lavere enn verdien oppgitt i publisert studie. MIC-verdi for CAZ, GEN, PIP og AMK kunne ikke bestemmes. Mellom biologisk replikat 1 (tabell 4.5.2) og 2 (tabell 4.5.3) varierte CIP varierte med en faktor 2, mens CST, TGC, FOF og TOB varierte med mer enn en faktor 2. Det ble her også inkludert en plate med non-permeabel gjennomsiktig film, men i likhet med tidligere forsøk (seksjon 4.2.1) ga det høy variasjon i biologiske replikater. Det var blant annet ingen vekst i tre av brønnene for positiv kontroll, samtidig som det ikke var vekst i brønner med lavere

konsentrasjoner for enkelte antibiotika, men vekst i brønner med høyere konsentrasjoner. Dette kan tyde på problemer med oksygentilførsel som påvirket vekst av bakterien med denne membranen. Det ble derfor bestemt å bruke semipermeabel ugjennomsiktig film videre i studiet.

Tabell 4.5.3 Resultat av MIC-bestemmelse for 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* AB5075-UW villtype biologisk replikat 2 med semipermeabel ugjennomsiktig film. Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for CAZ, GEN, PIP og AMK. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = MIC fra andre publiserte studier

MIC-verdier kunne ikke bestemmes for GEN, PIP og AMK (som nevnt over) og MIC-verdiene antas dermed å være høyere enn de hentet fra publiserte studier. Det ble derfor ønsket å kvalitetskontrollere stock-løsningene for disse antibiotikaene ved å teste


A. baumannii ATCC 17978 og AB5075-UW. Oppsettet vises i tabell 4.5.4. Konsentrasjonsintervallene for ATCC 17978 er hentet fra tabell 3.1.1.1, og for AB5075-UW den samme som er oppgitt i tabell 4.5.1. Det var full vekst i alle brønnene for AB5075-UW og partiell vekst ved den høyeste konsentrasjonen for ATCC 17978 (tabell 4.5.4). Dette kan potensielt tyde på at kvaliteten på stock-løsningene for GEN, PIP og AMK som ble brukt for MIC-bestemmelse i *A. baumannii* AB5075-UW villtype biologisk replikat 1 (tabell 4.5.2) og biologisk replikat 2 (tabell 4.5.3) har blitt redusert under lagring. Bruk av en annen stock-løsning for GEN og AMK i MIC-bestemmelse av *A. baumannii* ATCC 17978 tidligere har vist MIC-verdier som samsvarer med publiserte studier (tabell 4.2.1, 4.2.2, 4.2.1.1 og 4.2.1.2), mens det tidligere har blitt bestemt MIC = 128 µg/ml for PIP (tabell 4.2.1.1 og 4.2.1.2).

Tabell 4.5.4 Resultat av MIC-bestemmelse biologisk replikat 3 for GEN, PIP og AMK i *A. baumannii* AB5075-UW og ATCC 17978 med semipermeabel ugjennomsiktig film. Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for *A. baumannii* AB5075-UW for GEN, PIP og AMK. Resultater for NC og PC var som forventet.

*Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.

	AB5075-UW			ATCC 17978			7	8	9	10	11	12
	1	2	3	4	5	6						
	GEN*	PIP	AMK	GEN	PIP	AMK						
A	2048	2048	1024	2.8	512	24	-	-	-	-	-	-
B	1024	1024	512	1.4	256	12	-	-	-	-	-	-
C	512	512	256	0.7	128	6	-	-	-	-	-	-
D	256	256	128	0.35	64	3	-	-	-	-	-	-
E	128	128	64	0.175	32	1.5	-	-	-	-	-	-
F	64	64	32	0.0875	16	0.75	-	-	-	-	-	-
G	32	32	16	0.04375	8	0.375	-	-	-	-	-	-
H	NC	NC	PCAB5075	PCAB5075	PCATCC17978	PCATCC17978	-	-	-	-	-	-

 = Partiell vekst

 = MIC fra andre publiserte studier

4.6 MIC-bestemmelse for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutanter

For hvert c-di-GMP relatert gen i *A. baumannii* AB5075-UW finnes det flere mutanter per gen, men av hensyn til prosessivitet ble det tilfeldig valgt ut én mutant for hvert gen (*seksjon 2.1.1*). Det ble totalt utvalgt 11 *cdg*-mutanter for MIC-screening. Her ble det undersøkt om inaktiverende mutasjoner i hvert enkelt *cdg*-gen har en direkte påvirkning på resistens mot ulike antibiotika sammenlignet med *A. baumannii* AB5075-UW villtype. Etter optimalisering av testoppsettet for villtypen fra *seksjon 4.5* (*tabell 4.5.3*) ble dette testoppsettet også benyttet for mutantene. Stock-løsningen av antibiotika som ble benyttet her er de samme som ble benyttet for *A. baumannii* AB5075-UW villtypen (*seksjon 4.5*), utenom GEN, PIP og AMK som det ble laget nye stock-løsninger for. Én 96-brønners mikrotiterplate ble benyttet til analyse av hver mutant, derav totalt 11 mikrotiterplater. På grunn av vanskeligheter med tolkning av resultater for tidligere MIC-analyser ble prosedyren endret. Resultatene ble tidligere tolket ved direkte observasjon under LAF-benk der brytningen av lyskilden påvirket resultatene, samtidig som det var vanskelig å se uten å vippe mikrotiterplaten for mye. Prosedyren ble endret slik at mikrotiterplaten ble tatt ut av LAF-benken på en glassplate. Glassplaten ble eksponert for en lyskilde som var bred nok til å dekke hele mikrotiterplaten og et kamera ble brukt under glassplaten for å dokumentere resultatene (*figur 4.6.1-4.6.11, vedlegg 3*). Resultatene ble deretter scoret visuelt fra hvert bilde som ble tatt og overført til

tabeller som illustrerer resultatene (tabell 4.6.1-4.6.11).

I mange av brønnene ble det observert et bunnfall med høyere turbiditet enn resten av vekstmediet og kan potensielt vise biofilmdannelse. Vekstmedia med bunnfall, men som ikke viste turbiditet, ble derfor tolket som «partiell vekst». Fig. 4.6.1 – fig. 4.6.11 viser bilder av resultatene fra MIC-screening av de 11 cdg-mutantene (vedlegg 3), og tabell 4.6.1 – tabell 4.6.11 (resultatene for *A. baumannii* AB5075-UW WT (tabell 4.5.3) er inkorporert) viser tolkning av disse forsøkene med konsentrasjonsintervallene for hvert antibiotikum, basert på bildene som ble tatt.

Resultatene for *A. baumannii* AB5075-UW villtypen (tabell 4.5.3) ble sammenlignet med resultatene for mutantene (tabell 4.6.1 – tabell 4.6.11):

MEM: villtypen viste MIC = 64 µg/ml, mens mutantene varierte med MIC = 64-128 µg/ml.

CST: villtypen viste MIC = 2 µg/ml, mens mutantene varierte med MIC = 2-4 µg/ml, der mutanter med locus tag ABUW_1138 (tabell 4.6.1), ABUW_3178 (tabell 4.6.2), ABUW_0137 (tabell 4.6.9) og ABUW_2824 (tabell 4.6.11) viste partiell vekst ved 4 µg/ml.

TGC: villtypen viste MIC = 16 µg/ml, mens mutantene viste full vekst med minimum MIC = 32 µg/ml for alle mutantene, utenom mutanter med locus tag ABUW_0506 (tabell 4.6.4), ABUW_1764 (tabell 4.6.7) og ABUW_2255 (tabell 4.6.8) med partiell vekst ved 16 µg/ml.

FOF: villtypen viste partiell vekst = 512 µg/ml, mens mutantene varierte med MIC og partiell vekst ved 512 µg/ml.

CAZ: villtypen og mutantene viste full vekst i hele konsentrasjonsintervallet der minimum MIC = 4096 µg/ml.

GEN: villtypen og mutantene viste full vekst i hele konsentrasjonsintervallet der minimum MIC = 4096 µg/ml.

CHL: villtypen viste MIC = 128 µg/ml, mens mutantene varierte med MIC = 128-256 µg/ml.

PIP: villtypen og mutantene viste full vekst i hele konsentrasjonsintervallet der minimum MIC = 4096 µg/ml.

CIP: villtypen viste MIC = 100 µg/ml, mens mutantene viste partiell vekst = 100 µg/ml, utenom tabell 4.6.11 som hadde full vekst i hele konsentrasjonsintervallet der minimum MIC = 200 µg/ml.

TOB: villtypen viste partiell vekst = 384 µg/ml, mens mutantene viste full vekst med minimum MIC = 768 µg/ml, utenom MIC = 384 µg/ml for ABUW_1138 (tabell 4.6.1)

og partiell vekst = 384 µg/ml for ABUW_0188 (*tabell 4.6.3*) og ABUW_0506 (*tabell 4.6.4*).

AMK: villtypen viste full vekst i hele konsentrasjonsintervallet der minimum MIC = 2048 µg/ml, mens mutantene viste MIC/partiell vekst = 1024 µg/ml, og full vekst med minimum MIC = 2048 µg/ml for ABUW_1138 (*tabell 4.6.1*), ABUW_0506 (*tabell 4.6.4*) og ABUW_1764 (*tabell 4.6.7*) og MIC = 512 µg/ml for ABUW_2255 (*tabell 4.6.8*).

MIN: villtypen viste MIC = 0.5 µg/ml, mens mutantene varierte med MIC = 0.25-0.5 µg/ml. En oversikt over sammenligningen av MIC-resultatene for *A. baumannii* AB5075-WT og mutantene er presentert i *tabell 4.6.12*.

For MEM, CHL og MIN viste mutantene kun en maksimalt 2-ganger endring i MIC relativt til villtype *A. baumannii* 5075-UW. MIC ble ikke bestemt for FOF og TOB som scoret med «partiell vekst» i brønnen med høyest konsentrasjon for villtypen (*tabell 4.5.3*), og kunne derfor ikke sammenlignes med mutantene. For CST, TGC og CIP ble det bestemt MIC-verdi for villtypen (*tabell 4.5.3*), men var ikke mulig å sammenligne med mutantene som ikke viste MIC-verdier, men kun score på «partiell vekst» i brønnen med høyest konsentrasjon. Ut ifra slik score er det ikke mulig å angi MIC-endring med sikkerhet. For CST ga også noen mutanter en MIC-endring på maksimum en faktor 2. Det ble ikke bestemt MIC-verdi for villtypen (*tabell 4.5.3*) eller for noen av mutantene (*tabell 4.6.1 – tabell 4.6.11*) for CAZ, GEN og PIP da det viste full vekst i hele konsentrasjonsintervallet. For enkelte antibiotika som CAZ, GEN, PIP og AMK ble det umulig å øke konsentrasjonsintervallet grunnet begrensning i løselighet.

Det var full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for AMK for villtypen (*tabell 4.5.2, 4.5.3 og 4.5.4*), noe som betød at MIC-verdi for villtypen var minimum 2048 µg/ml. Transposon insersjonsmutanten i ABUW_2255 (*tabell 4.6.8*) er et pilZ protein (*seksjon 2.1.1*) som viste mer enn 4-ganger endring i MIC-verdi relativt til villtypen for AMK, med henholdsvis 512 µg/ml og 2048 µg/ml. Dette var det eneste tilfellet av antibiotikum og mutant som ga minst 4 ganger endring i MIC i forhold til tilsvarende antibiotikum for villtypen. Dette funnet betyr at ABUW_2255 mutanten er minimum fire ganger mer følsom mot AMK sammenlignet med villtypen.

Tabell 4.6.1 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_1138 (basert på figur 4.6.1, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.2 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_3178 (basert på figur 4.6.2, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.3 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_0188 (basert på figur 4.6.3, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.4 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_0506 (basert på figur 4.6.4, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.5 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_1045 (basert på figur 4.6.5, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.6 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_1221 (basert på figur 4.6.6, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.7 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_1764 (basert på figur 4.6.7, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.8 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_2255 (basert på figur 4.6.8, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.9 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_0137 (basert på figur 4.6.9, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.10 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_3354 (basert på figur 4.6.10, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.11 MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_2824 (basert på figur 4.6.11, vedlegg 3). *Konsentrasjonsintervallet bestemt ut fra tidligere resultater fra annen *A. baumannii* MDR-stamme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MEM	CST	TGC	FOF*	CAZ	GEN*	CHL	PIP	CIP	TOB	AMK	MIN*
A	512	4	16	512	2048	2048	1024	2048	100	384	1024	2
B	256	2	8	256	1024	1024	512	1024	50	192	512	1
C	128	1	4	128	512	512	256	512	25	96	256	0.5
D	64	0.5	2	64	256	256	128	256	12.5	48	128	0.25
E	32	0.25	1	32	128	128	64	128	6.25	24	64	0.125
F	16	0.125	0.5	16	64	64	32	64	3.125	12	32	0.061
G	8	0.0613	0.125	8	32	32	16	32	1.563	6	16	0.031
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC
- = Observert MIC fra AB5075-WT

Tabell 4.6.12 Oversikt over MIC resultatene for *A. baumannii* AB5075-UW mutantene relativt til *A. baumannii* AB5075-UW WT for ulike antibiotika.

	<i>A. baumannii</i> AB5075-WT (µg/ml)			<i>A. baumannii</i> AB5075-UW transposon insersjonsmutanter (µg/ml)		
	Partiell vekst	MIC	Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet	Partiell vekst	MIC	Full vekst i hele konsentrasjonsintervallet
MEM		64			64-128	
CST		2		4	2-4	
TGC		16		16		>16
FOF	512			512	512	
CAZ			>2048			>2048
GEN			>2048			>2048
CHL		128			128-256	
PIP			>2048			>2048
CIP		100		100		>100
TOB	384			384	384	>384
AMK			>1024	1024	512-1024	>1024
MIN		0.5			0.25-0.5	

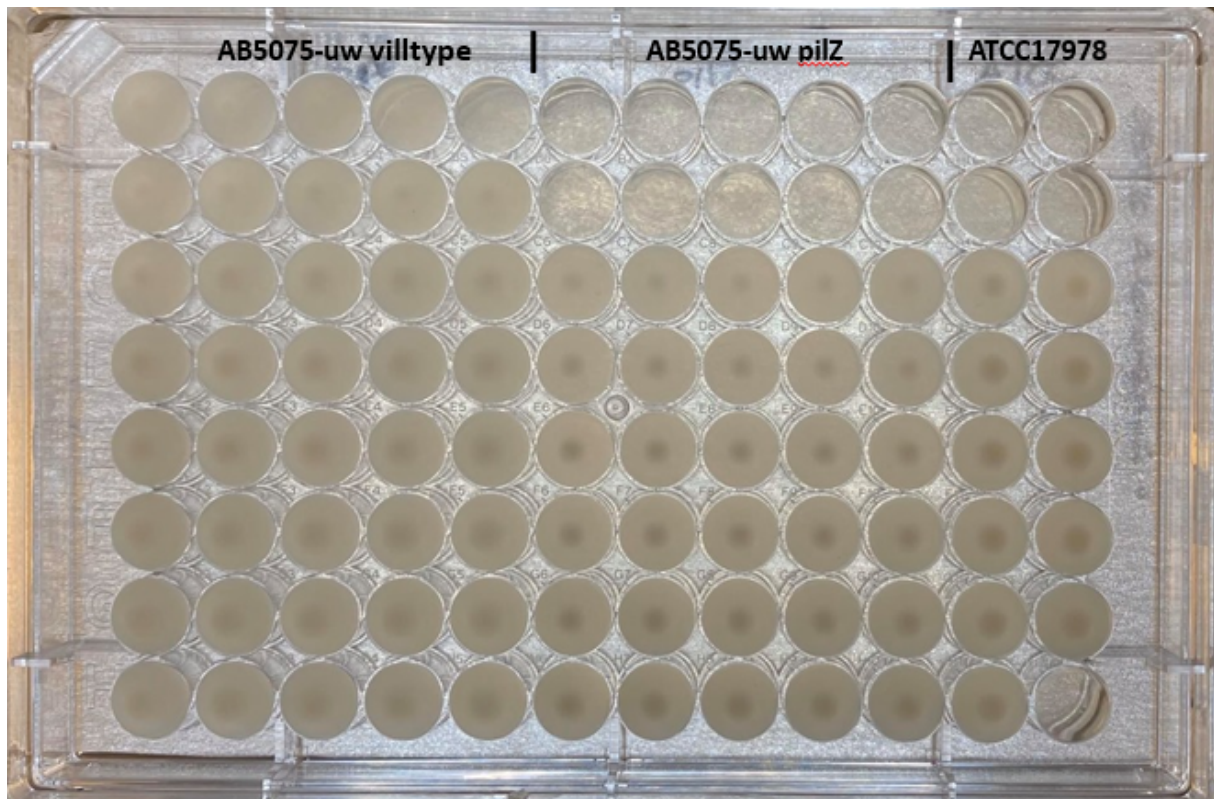
MIC = ingen vekst.

MIC-bestemmelse for amikacin i transposon insersjonsmutanten

A. baumannii AB5075-UW Δ -ABUW_2255

Forsøket for transposon insersjonsmutanten *A. baumannii* AB5075-UW Δ -ABUW_2255 sammenlignet med AB5075-UW villtypen (tabell 4.6.8) ble gjentatt for å bekrefte resultatene fra screeningen. *A. baumannii* ATCC 17978 ble også undersøkt på samme mikrotiterplate for å bekrefte at AMK-stock-løsningen som ble brukt ved utførelse av MIC for mutantene (tabell 4.6.1-4.6.11) og som også ble brukt i dette forsøket var intakt. Det ble plukket fem enkeltkolonier av *A. baumannii* AB5075-UW villtype, fem enkeltkolonier av transposon insersjonsmutanten *A. baumannii* AB5075-UW Δ -ABUW_2255 og to kolonier av ATCC 17978. Alle koloniene som ble plukket var av typen «opaque» som har vist å være den som er mest resistent [65]. Tillaging av inokulat (for hver koloni) og klargjøring av mikrotiterplaten ble utført som beskrevet i seksjon 3.1, men kun med AMK.

Konsentrasjonsintervallet som ble benyttet for *A. baumannii* ATCC 17978 var 0.375-24 $\mu\text{g/ml}$ (tabell 3.1.1.1) og for AB5075-UW villtypen og Δ -ABUW_2255 mutanten var 16-1024 $\mu\text{g/ml}$ (tabell 4.5.1). MIC-verdien for ATCC 17978 (figur 4.6.12 og tabell 4.6.13) var fire ganger høyere sammenlignet med resultater fra tidligere MIC-analyser med samme konsentrasjonsintervall og antibiotikum (tabell 4.2.1, 4.2.2, 4.2.1.1 og 4.2.1.2). For både AB5075-UW villtypen og transposon insersjonsmutanten Δ -ABUW_2255 (figur 4.6.12 og tabell 4.6.13) var MIC-verdiene reproduserbare ift. screeningsforsøket (tabell 4.6.8). Det ble observert full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for alle fem replikater av villtypen slik at MIC var minimum 2048 $\mu\text{g/ml}$, noe som betyr at det ble observert en minst fire ganger forskjell mellom villtypen og Δ -ABUW_2255 mutanten, noe som var reprodusert i to separate eksperimenter og med 6 ulike enkeltkolonier som utgangspunkt (for hver av stammene). Dette kan antyde at Δ -ABUW_2255 -mutanten har fenotypiske effekter som gjør at mutanten er mer sensitiv for amikacin enn villtype *A. baumannii* 5075-UW.



Figur 4.6.12 Bilde av MIC resultater for hhv. *A. baumannii* AB5075-UW villtype, transposon insersjonsmutant i genet ABUW_2255 og ATCC 17978, for amikacin (AMK). Konsentrasjonsintervall for villtypen og Δ -ABUW_2255 var 16-1024 $\mu\text{g/ml}$, og for ATCC 17978 0.375-24 $\mu\text{g/ml}$.

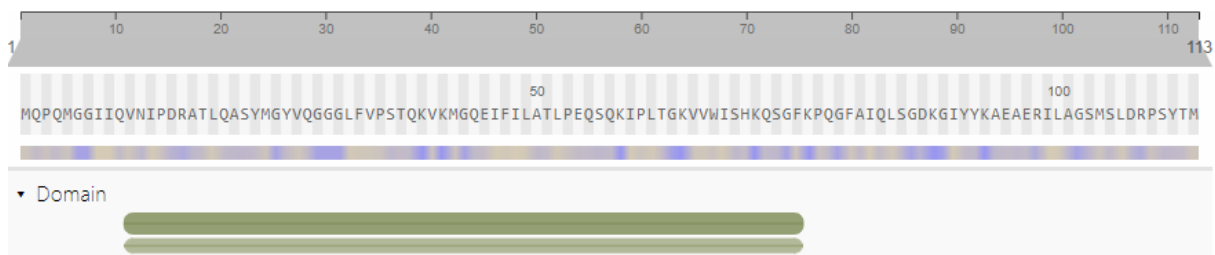
Tabell 4.6.13 MIC resultater av *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet med locus tag ABUW_2824, AB5075-UW villtypen og ATCC 17978 for amikacin (AMK) (basert på figur 4.6.12).

	AB5075-UW villtype					AB5075-UW pilZ					ATCC17978	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK
A	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	24	24
B	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	12	12
C	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	6	6
D	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	3	3
E	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	1.5	1.5
F	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	0.75	0.75
G	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	0.375	0.375
H	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	NC

- = Partiell vekst
- = Observert MIC

Bioinformatisk analyse av ABUW_2255 (GenBank: AKA31983)

Mutanten Δ -ABUW_2255 har en delesjon i et pilZ-domene protein (IPR011752), som er annotert som et type 4 pilus protein [122]. Proteinsekvensen består av 113 aminosyrer og har et putativt c-di-GMP bindende domene i C-terminalen (*figur 4.6.13*) [123, 124]. For proteiner som har pilZ-domene(r) er det ikke direkte mulig å predikere hvilke biologiske prosesser som reguleres gjennom c-di-GMP binding, men lignende proteiner er vist å være involvert i hhv. syntese av cellulose og flagellaktivitet [125].



Figur 4.6.13 Domenestruktur for proteinet ABUW_2255, hvorav det grønne domenet er et pilZ-domene.

Proteinsekvens: MQPQMGGIIQVNIIPDRATLQASYMGYVQGGGLFVPSTQKVKMGQEIFILATLPEQSQKIPLTGKVVWISHKQSGFKPQGFQAIQLSGDKGIYYKAEERILAGSMSLDRPSYTM [123].

5 DISKUSJON

5.1 Etablering av MIC assay og optimalisering av MIC-forsøksbetingelser

Før det ble utført forsøk for å undersøke effekt av 12 ulike antibiotika i *A. baumannii* (ATCC 17978, ATCC 19606, AB5075-UW villtype, AB5075-UW transposon insersjonsmutanter) og samtidig bestemme $\frac{1}{2}$ MIC-konsentrasjon for dyrking og RNA isolering, ble den apatogene *A. baylyi* ADP1 benyttet til å etablere MIC-testoppsettet. Det ble testet for tre antibiotika og reproduserbarheten av disse sammenlignet med tidligere publiserte studier [111]. MIC-verdiene for antibiotikaene var teknisk sett like for hver biologiske replikat (*tabell 4.1.2, 4.1.3 og 4.1.4*), men resultatene for ampicillin var ikke reproduserbare sammenlignet med publiserte studier [111]. I biologisk replikat 3 (*tabell 4.1.4*) måtte konsentrasjonsintervallet for ampicillin utvides for å kunne bestemme MIC og dette replikater viste generelt høyere MIC-verdier for alle antibiotikaene sammenlignet med de to første replikatene (*tabell 4.1.2 og 4.1.3*). Avvikene i biologisk replikat 3 (*tabell 4.1.4*) kan tenkes å ha vært inokulum-effekter som kan gi kunstig høye MIC-verdier. Utplating fra utvalgte brønner for å se om den visuelle tolkningen av MIC stemte, viste full vekst i alle agarskålene. Dette var som forventet fordi tetrasyklin, kloramfenikol og ampicillin er bakteriostatiske og har mest sannsynlig kun blitt inhibert ved tolkning av resultatene i mikrotiterplaten. MIC-verdier ble bekreftet i et separat forsøk utført av stipendiat Claus Michael Goul Larsen og det ble funnet god overenstemmelse med mine resultater, noe som tyder på at assayet viste god reproduserbarhet mellom ulike dager og personell. Testoppsettet ble deretter utvidet til 12 antibiotika med *A. baumannii* ATCC 17978 og ATCC 19606 (*seksjon 4.2*). På bakgrunn av forsøkene med begge ATCC stammene ble det bestemt å gå videre med ATCC 17978 på grunn av variable og ikke-reproduserbare resultater for ATCC 19606. MIC-konsentrasjonsintervallene for ATCC 17978 ble også brukt for ATCC 19606 og kan ha påvirket resultatene siden de ikke var spesifikke for stammen. Replikater 1 og 2 (*tabell 4.2.1 og 4.2.2*) for ATCC 17978 viste god reproduserbarhet av MIC-verdier, med noe varians mellom MIC-verdier bestemt her og MIC-verdier fra andre publiserte studier [88-92], men for mange av testede antibiotika innenfor en faktor på 2. For kloramfenikol er MIC-verdien fra andre publiserte studier vesentlig høyere enn det som ble funnet her. Denne MIC-verdien er imidlertid hentet fra E-test og ikke MIC «broth microdilution» [90]. Forsøksoppsettet ble så

optimalisert for ATCC 17978, og to nye replikater (*tabell 4.2.1.1* og *4.2.1.2*) ble utført med en oppjustering av konsentrasjonsintervallet for tigezyklin, minocyklin og piperacillin, noe som muliggjorde å bestemme MIC for disse tre antibiotikaene. Den eksperimentelt bestemte MIC for piperacillin er vesentlig høyere enn det som er oppgitt fra litteraturen, noe som kan være relatert til at piperacillin alltid behandles i en kombinasjon med tazobactam i klinisk sammenheng, mens piperacillin som monoterapi ikke har god effekt [88, 89]. De fire biologisk replikatene utført for MIC-bestemmelse med *A. baumannii* ATCC 17978 (*tabell 4.2.1, 4.2.2, 4.2.1.1* og *4.2.1.2*) viste MIC-verdier som varierte mellom replikatene, men også med tidligere publiserte studier [88-92]. Variasjonen kan ha vært noe påvirket av at MIC-forsøk generelt tolkes rent visuelt, i dette tilfelle ved direkte observasjon under LAF-benk med brytning av lyskilden i benken. MIC-bestemmelse i dette studiet kunne tenkes å ha blitt forbedret ved å følge enkelte elementer i den validerte protokollen for *Acinetobacter spp.* inkludert *A. baumannii* mer presist [126]. Eksempelvis er alikvoterte stock-løsninger av antibiotika anbefalt å tines opp og bli brukt samme dag som utførelse av MIC før de forkastes, dette ble ikke gjort i våre MIC-bestemmelser [126]. Utover dette ble MIC-bestemmelsene optimalisert ved å bruke 2x-seriefortynning med MHB-medium med standardisert inokulumkonsentrasjon (5×10^5 CFU/ml) som er anbefalt i den verifiserte protokollen og følger EUCAST standarder [87, 126]. Det er også viktig å nevne at det ikke finnes en universell protokoll for MIC-bestemmelse, og små endringer i metodikken, faktorer som inkubasjonstid, inokulumkonsentrasjoner og ulike teknikker mellom laboratorier kan resultere i variasjoner i MIC-analyser, noe som gjør det vanskelig å reprodusere MIC-verdier fra andre publiserte studier med god nøyaktighet [127]. Det ser derimot ut til at variasjonen mellom de biologiske replikatene generelt ikke var mer enn en faktor 2. Dette regnes som ikke signifikant forskjell og er innenfor naturlig variasjon, spesielt for enkeltreplikater.

5.2 MIC-forsøksoppsett med *A. baumannii* AB5075-UW

På bakgrunn av disse forsøkene ble det etablerte assayet med 12 ulike antibiotika overført til den multiresistente stammen *A. baumannii* AB5075-UW (seksjon 4.5). Det første biologiske replikatet for villtypen (tabell 4.5.2) måtte optimaliseres med tanke på justering av konsentrasjonsintervaller for CST, TGC, CAZ, GEN, PIP, AMK og MIN for å kunne bestemme MIC-verdier. Etter optimaliseringen ble det mulig å finne MIC-verdier for CST, TGC, CIP og MIN. Det var fortsatt full vekst i hele konsentrasjonsintervallet for FOF, CAZ, GEN, PIP, TOB og AMK. I likhet med det første biologiske replikatet (tabell 4.5.2) stemte MIC-verdier for MEM og CHL også for replikat 2 (tabell 4.5.3) overens med tidligere publiserte studier, mens for de ti andre antibiotikaene var det variasjon utover en faktor på 2 [114-121]. Som nevnt over behandles piperacillin alltid i kombinasjon med tazobactam [88, 89]. For de resterende antibiotikaene var tidligere verdier for FOF, GEN og TOB hentet fra E-test studier [116, 117, 121]. Det er tidligere blitt vist at MIC-verdier fra E-test ikke stemmer 100% overens med MIC-verdier fra broth microdilution [128-130].

Test av kvalitet på antibiotika-stock-løsninger

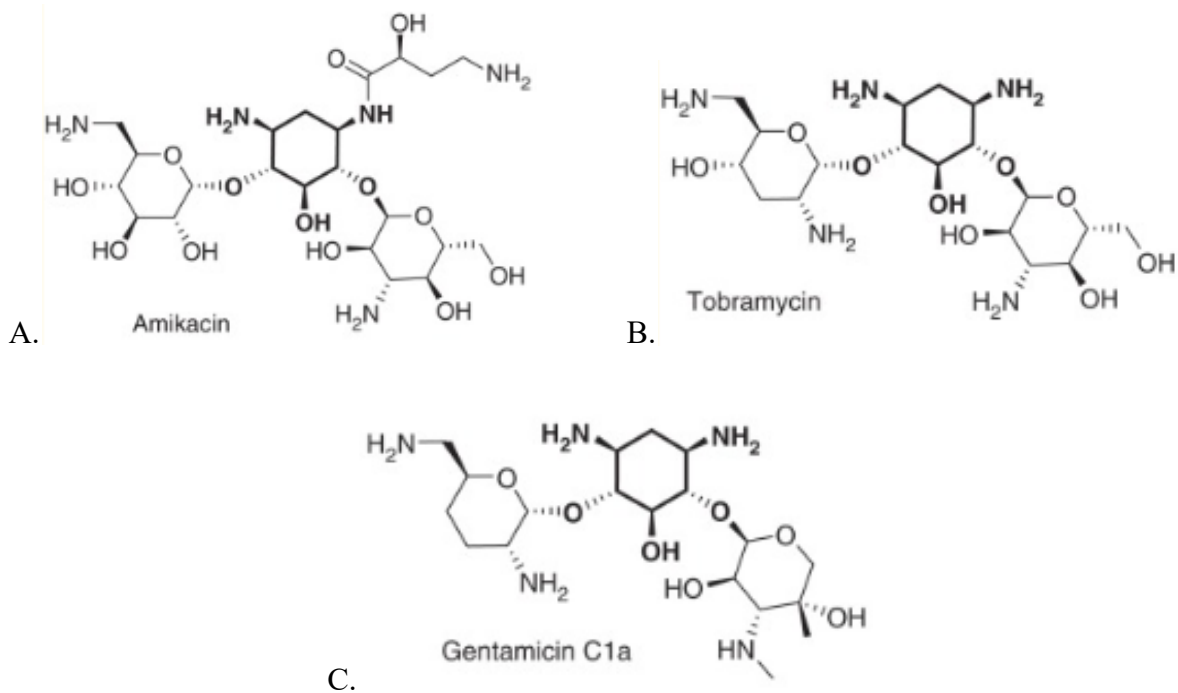
Stock-løsninger for GEN, PIP og AMK ble testet for *A. baumannii* AB5075-UW villtypen og for ATCC 17978 for å undersøke om løsningene var intakte, da det var de eneste antibiotikaene som ikke ga MIC-verdi ved analyse av AB6075-UW villtypen etter oppjustering av konsentrasjonsintervallene (seksjon 4.5), men som har gitt MIC-verdier for ATCC 17978 tidligere (seksjon 4.2). For ATCC 17978 viste det seg imidlertid at MIC-verdiene var høyere enn tidligere, med en faktor 4 (tabell 4.5.4). Stock-løsningen som ble benyttet her er tilberedt på samme måte og med samme pulver som resten av MIC-bestemmelsene og det bør derfor ikke være en forskjell på faktor 4, i tillegg ble det benyttet ferske stock-løsninger av GEN, PIP og AMK for villtypen og dermed utelukkes delvis degradering av antibiotika. Stock-løsningene var ikke intakte og kan ha påvirket resultatene for biologisk replikat 2 i *A. baumannii* AB5075-UW villtypen (tabell 4.5.3). For *A. baumannii* ATCC 17978 (seksjon 4.2) ble det brukt andre stock-løsninger og har dermed ikke innvirkning på disse resultatene, men det ble bestemt å lage nye stock-løsninger for GEN, PIP og AMK ved testing av mutantene (seksjon 4.6). Protokollen som ble benyttet avvek fra den standardiserte protokollen for MIC for *Acinetobacter*, som nevnt over, der alikvotene av antibiotika (bruksløsningen) ikke ble kastet etter bruk. Alikvoterte stock-løsninger vil implementeres i fremtiden, i videre forsøk.

5.2.1 Inersjonsmutantene i *A. baumannii* AB5075-UW

Inersjonsmutantene for ulike identifiserte c-di-GMP relaterte gener i *A. baumannii* AB5075-UW ble sammenlignet med villtypen for å undersøke om inaktiverende mutasjoner i enkeltgener påvirket resistensmønster mot utvalgte antibiotika (seksjon 4.6). For de fleste antibiotika viste resultatene kun en maksimalt 2-ganger endring i MIC relativt til villtypen. Det ble derimot identifisert en mer enn 4-ganger nedsatt MIC-verdi for amikacin i mutanten for genet ABUW_2255 relativt til villtype (henholdsvis 512 µg/ml og minimum 2048 µg/ml) (tabell 4.6.8). Denne endringen betyr at inersjonsmutanten *A. baumannii* AB5075-UW Δ ABUW_2255 er minimum fire ganger mer følsom enn villtypen for amikacin. *A. baumannii* er resistent mot amikacin ved verdier over 8 µg/ml ifølge EUCAST [131]. For å verifisere resultatet for delesjonsmutanten *A. baumannii* AB5075-UW Δ ABUW_2255 ble det utført et bekreftende MIC-forsøk for denne mutanten og AB5075 villtype (figur 4.6.12 og tabell 4.6.13). Den økte følsomheten for AMK i Δ ABUW_2255 mutanten var konsistent over flere biologiske replikater og fenotypen var reproducerbar.

Hovedresistensmekanismen mot amikacin i *A. baumannii* medieres gjennom aminoglykosidmodifiserende enzymer (AMEs) og spesifikt acetyltransferase (AAC) og fosfotransferase (APH) for amikacin [45, 46]. AAC(6') katalyserer acetylering av -NH₂-gruppen i 4,6-disubstituert deoksystreptamin ringen (figur 5.2.1.1), mens APH(3') katalyserer fosforylering av molekylet [48]. Det er ikke kjent om AMEs kan være knyttet til c-di-GMP-signalering. Tre aminoglykosider (gentamicin, tobramycin og amikacin) ble testet for *A. baumannii* AB5075-UW villtypen og mutantene (seksjon 4.6). For gentamicin var det umulig å si noe om effekten da det ikke var mulig å bestemme MIC-verdi for verken villtypen eller noen av mutantene. For tobramycin ble det ikke bestemt MIC-verdi for villtypen, men noen av mutantene viste MIC på 384 µg/ml, som vil si at det er en endring på minimum faktor 2. Amikacin, gentamicin og tobramycin tilhører den 4. underklassen av aminoglykosider, med en felles kjernestruktur; 4,6-disubstituert deoksystreptamin ring (figur 5.2.1.1) [132]. De tre aminoglykosidene er forskjellige på grunn av forskjellige substitusjoner til kjernestrukturen som direkte påvirker virkningsmekanismen og mottakeligheten for AMEs [132]. Amikacin er mindre mottakelig for plasmidmedierte enzymer (AMEs) sammenlignet med tobramycin og gentamicin, på grunn av karbonyl-sidekjeden (figur 5.2.1.1) [133, 134]. Opptaket av aminoglykosider i cellene består av tre stadier: (1) binding av kationiske aminoglykosid til negativt ladde lipopolysakkarider og fosfolipider på overflaten av bakterien. Etter binding forskyves magnesiumioner som fører til forstyrrelse av lipidkomponentene i cellemembranen

og gir dermed økt permeabilitet. (2) den økte permeabiliteten gjør at aminoglykosidene tas opp gjennom en elektron-transport-mediert prosess. (3) etter at aminoglykosidene når cytoplasma og utøver sin effekt, resulterer det i enda mer skade på membranen og til hurtigere opptak av aminoglykosider, i tillegg til hemming av proteinsyntesen [132, 135].



Figur 5.2.1.1 Oversikt over strukturer av selekterte aminoglykosider benyttet i MIC-screening av *A. baumannii* AB5075-UW WT og insersjonsmutantene. A. amikacin, B. tobramycin og C. gentamicin der alle figurene viser felles kjernestruktur med 4,6-disubstituert deoksystreptamin ring.

Sekvenssøk med proteinsekvensen til ABUW_2255 (GenPept) viste at proteinet inneholder et PilZ-domene, som er konservert i proteiner fra andre Gram-negative bakterier som f.eks. *K. pneumoniae* (99.12 % likhet) og *P. aeruginosa* (98.00% likhet) (BLAST-søk). Proteinets er annotert som et type 4 pilus biogenese protein og pilZ-domenet utgjør kun 57 % av proteinsekvensen på 113 aminosyrer [122, 125], mens det ikke er noen identifiserbare domener i andre deler av proteinsekvensen. I *K. pneumoniae* er det identifisert at pilZ-domene som er relatert til type III fimbri er involvert i dannelsen av biofilm [136]. pilZ-domene proteient i *P. aeruginosa*, type IV pili, fremmer adhesjon til eukaryote celler og er essensiell med «twitching» motilitet [137-139]. Under visse forhold fører twitching motilitet til indirekte effekt på biofilmdannelse ved å tillate dannelse av mikrokoloni [70, 140]. Dette er også beskrevet for *A. baumannii* [141, 142]. pilZ-domener er vist å være c-di-GMP-bindende domener i proteiner i blant annet *P. aeruginosa*, *E.coli* og *V. cholerae*, men den cellulære

funksjonen for flere proteiner med PilZ domene er fortsatt ukjent [143]. Funksjoner for pilZ-proteiner relatert til resistens mot amikacin er heller ikke kjent. I genomet til *A. baumannii* AB5075-UW er genet for pilZ-domene proteinet ABUW_2255 lokalisert nedstrøms for *holB* genet, som koder for DNA polymerase III delta-subenhet [144]. Disse genene er orientert i samme retning og det er kun 12 basepar mellom pilZ og holB [144]. Genet for det ortologe pilZ-domene proteinet har i *P. aeruginosa* vært identifisert å være knyttet til et *holB*-gen oppstrøms [139]. Dette er i tråd med annoteringen og genorganiseringen i *A. baumannii*. Genorganiseringen og operonstrukturen kartlagt i *P. aeruginosa* er konservert i *A. baumannii* og ABUW_2255 er mest sannsynlig et protein som er essensielt for type 4 pilus dannelse og twitching motilitet, som beskrevet for *P. aeruginosa* [137-139]. Videre arbeid bør være å studere funksjonen på ABUW_2255 i motilitet for å få dette bekreftet.

Nylig er det blitt utført en studie som viser at c-di-GMP-relaterte gener i *A. baumannii* ATCC 17978 regulerer biofilmdannelse og overflateassosiert motilitet [145]. Elleve gener kodet for GGDEF/EAL-domeneproteiner i *A. baumannii* ATC 17978 ble undersøkt, der to diguanylat-syklaser fremmet biofilmdannelse og undertrykket overflatemotilitet, mens en fosfodiesterase fremmet overflatemotilitet [145]. Man bør merke seg at forfatterne av denne studien testet ti av de samme genene som var inkludert i inneværende studie, men ikke ABUW_2255, i tillegg til ett gen som vi ikke har inkludert i inneværende studium (BLAST-søk). I det studiet undersøkte forfatterne blant annet biofilm- og motilitet, men ikke påvirkning av AMR.

5.3 Ekspresjonsstudie av c-di-GMP relaterte gener i

A. baumannii

Vekstkurvene (seksjon 4.3) hadde en 2 timers forskjell i lagfase og dette kan skyldes mindre inokulat for vekstkurven med sen lagfase. Tilgangen av oksygen kan også ha vært forskjellig, da korken på mediumflasken ikke blir skrudd igjen likt hver gang før inkubering. Dette påvirker ikke isoleringen av RNA (seksjon 4.4) da vi var ute etter å se om det var noe forskjell i veksthastighet for *A. baumannii* ATCC 17978 ved ½ MIC konsentrasjon av de fem antibiotika relativt til ved fravær av antibiotika i kulturen. RNA-isoleringen av *A. baumannii* ATCC 17978 ga RNA-prøver med tilfredsstillende konsentrasjoner og renhet og prøvene ble derfor brukt i qPCR. Resultatene fra analysen for å undersøke om utvalgte gener koblet til c-

di-GMP signalering ble induisert av stimulering ved $\frac{1}{2}$ MIC (seksjon 4.4.1) viste mer enn fire syklere i forskjell for 16s mellom +RT og -RT-prøvene. Det var derimot ikke slik for de målgenene. Ingen av de tre biologiske replikatene viste > 4 syklere mellom +RT og -RT for kontrollprøven og for alle antibiotikaene. Det er to parametere som kan tenkes å påvirke dette: (1) degradert RNA eller (2) veldig lavt uttrykt RNA på tidspunktet hvor RNA ble isolert. Begge parametere fører til veldig lite RNA-signal. Det kan også tenkes at det er veldig mye DNA-kontaminering, men siden samme isoleringsmetode (Kit, DNase enzym, TURBO DNase-behandling) er benyttet, kan det tenkes at det er lite sannsynlig at det er grunnen, siden det er tilfredsstillende resultater for 16S rRNA. En tidligere studie som undersøkte ekspresjon av *cdg*-gener gjennom vekstfasen for den Gram-positive bakterien *Bacillus cereus* ved qPCR, antydte at det ikke var noe definert tidspunkt hvor disse genene uttrykkes mer enn andre faser av vekst [71]. Kvaliteten av RNA-prøvene ble deretter analysert ved å utføre en agarose gelelektroforese (seksjon 4.4.2). RNA-prøvene ble sammenlignet med «gullstandard» (RNA-prøvene fra laks ble brukt som kontroll for å sikre at det ikke var noe teknisk feil i utførelsen av forsøket, samtidig som det forsikrer om at RNA ikke ble degradert under forsøket) og viste degradert RNA før utførelsen av gelelektroforese og kan forklare transkripsjonsraten i qPCR. Noen av brønnene i gelen viser ikke tegn til nukleinsyre i det hele tatt, mens smearing lenger oppe i gelen kan være tegn på protein forurensning eller fragmentert gDNA (selv om A_{260}/A_{280} ikke antydte proteinforurensning). Samtidig ble RNA-prøvene fryst og tint flere ganger (opptil 3 ganger) og siden RNA er så sensitivt, kan det ha blitt degradert før cDNA syntese og qPCR.

For dette forsøket ville det vært gunstig å analysere RNA-prøvene på agarosegel eller Agilent Bioanalyser for å undersøke integritet på RNA molekylene før qPCR, og ikke kun basere dette på absorbans-målinger som ikke sier noe om integriteten. Analyse på Agilent Bioanalyser har ikke tidligere vært rutinemessig gjort i laboratoriet utenom for svært kostbare analyser som RNA-sekvensering (som også kunne vært en annen metode for å undersøke ekspresjon av *cdg*-genene, men denne metoden er også avhengig av høykvalitets RNA og er også mer kostbar). I forbindelse med dette kan det vurderes å studere om ulike RNA-isoleringsprotokoller gir bedre kvalitet av RNA enn andre. Det qPCR-baserte kvantiteringsforsøket skulle ha blitt gjentatt etter ny isolering av RNA, men dette lot seg ikke gjøre på grunn av corona lockdown og stengte laboratorier.

6 KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

I denne studien ble det identifisert en effekt på amikacin-resistens ved en inaktiverende mutasjon i genet ABUW_2255 i den multiresistente stammen *A. baumannii* AB5075-UW, og er så langt et av de første studiene som har vist en effekt av c-di-GMP relaterte gener på antimikrobiell resistens [70]. Ytterligere studier må likevel til for å kunne forklare de molekylære mekanismer bak resistensen. I tillegg ville det vært interessant å utføre MIC-bestemmelse for de to andre insersjonsmutantene som finnes for det samme genet, for å se om resultatene for amikacin er reproducerbare. ABUW_2255 er et putativt c-di-GMP bindende protein (et effektorprotein) og nedstrøms target er ukjent, dette bør definitivt identifiseres ved videre forsøk, samtidig som ytterligere funksjonelle studier som overflateassosiert motilitet assay og eventuelt biofilm assay bør utføres for å kartlegge funksjonen av proteinet. I et bredere perspektiv kan funnet i denne studien kunne bidra til videre kartlegging av mekanismer koblet til aminoglykosidresistens, muligens mediert av et universelt sekundært signalmolekyl som er involvert i et bredt spekter av cellulære prosesser.

Videre arbeid bør inkludere å undersøke de to andre insersjonsmutantene for å se om påvirkningen av amikacinresistens er reproducerbar, kartlegge funksjoner for ABUW_2255 ved motilitets- og biofilmassay, og gjenta qPCR-basert kvantitering av genekspressjon etter dyrking ved subinibitoriske MIC-konsentrasjoner av antibiotika.

Litteraturliste

1. Kozielski, B. *Acinetobacter baumannii*. 2019 [cited 2020 28.05]; Available from: <https://ccsearch.creativecommons.org/photos/0d16f78c-8af8-47b1-96de-63dc1ea21231>.
2. WHO. *Antimicrobial resistance*. 2018 [cited 2020 08.01]; Available from: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/antimicrobial-resistance>.
3. Bassetti, M., F. Ginocchio, and M. Mikulska, *New treatment options against gram-negative organisms*. Crit Care, 2011. **15**(2): p. 215.
4. Howard, A., et al., *Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen*. Virulence, 2012. **3**(3): p. 243-50.
5. (WHO), W.H.O. *Antimicrobial resistance and primary health care*. 2018 [cited 2020 08.01]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/328084/WHO-HIS-SDS-2018.57-eng.pdf>.
6. WHO. *Antibiotic resistance*. 2018 [cited 2020 14.01]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
7. Reygaert, W.C., *An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria*. AIMS microbiology, 2018. **4**(3): p. 482-501.
8. FN-sambandet. *Fattigdom*. 2018 [cited 2020 14.01]; Available from: <https://www.fn.no/Tema/Fattigdom/Fattigdom>.
9. Ghosh, S. and T.M. LaPara, *The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria*. The ISME Journal, 2007. **1**(3): p. 191-203.
10. Van Boeckel, T.P., et al., *Global trends in antimicrobial use in food animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. 5649-54.
11. Health, O.F. *Antibiotics in Agriculture*. 2018 [cited 2020 08.01]; Available from: <https://www.farmhealthonline.com/veterinary-questions/antibiotics-in-agriculture/>.
12. Chen, J., G.G. Ying, and W.J. Deng, *Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns*. J Agric Food Chem, 2019. **67**(27): p. 7569-7586.
13. O'Neill, J. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*. 2016 [cited 2020 10.01]; Available from: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf.
14. Zimdahl, R.L., *Chapter 9 - Antibiotics*, in *Six Chemicals That Changed Agriculture*, R.L. Zimdahl, Editor. 2015, Academic Press: San Diego. p. 165-182.
15. Demain, A.L., *Antibiotics: natural products essential to human health*. Med Res Rev, 2009. **29**(6): p. 821-42.
16. Institutt for biovitenskap, U. *Antibiotika*. 2011 30.03.2020 [cited 2020 18.03]; Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/antibiot.html>.
17. Rajeev, L. *Antibiotic Discovery*. 2018 20.01.12 [cited 2020 13.01]; Available from: <https://www.labome.com/method/Antibiotic-Discovery.html>.
18. Pankey, G.A. and L.D. Sabath, *Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **38**(6): p. 864-870.
19. UiO, I.f.b. *Antibiotika*. 2011 30.03.2020 [cited 2020 18.04]; Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/antibiot.html>.

20. legemiddelhåndbok, N. *L1.2.16.3 Kolistin*. 2016 24.05.2017 [cited 2020 11.01]; Available from: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.16.3/Kolistin>.
21. legemiddelhåndbok, N. *L1.2.15.3 Fosfomycin*. 2017 13.08.2018 [cited 2020 11.01]; Available from: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.15.3/Fosfomycin>.
22. Legemiddelhåndbok, N. *Antibakterielle midler*. 2016 [cited 2020 19.04]; Available from: https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2/Antibakterielle_midler.
23. Magiorakos, A.-P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012. **18**(3): p. 268-281.
24. Neu, H.C., *The Crisis in Antibiotic Resistance*. *Science*, 1992. **257**(5073): p. 1064.
25. Santajit, S. and N. Indrawattana, *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *BioMed research international*, 2016. **2016**: p. 2475067-2475067.
26. Mulani, M.S., et al., *Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review*. *Frontiers in microbiology*, 2019. **10**: p. 539-539.
27. Pendleton, J.N., S.P. Gorman, and B.F. Gilmore, *Clinical relevance of the ESKAPE pathogens*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013. **11**(3): p. 297-308.
28. Touchon, M., et al., *The Genomic Diversification of the Whole Acinetobacter Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences*. *Genome Biology and Evolution*, 2014. **6**(10): p. 2866-2882.
29. Brzoska, A.J., et al., *Single-step selection of drug resistant Acinetobacter baylyi ADPI mutants reveals a functional redundancy in the recruitment of multidrug efflux systems*. *PloS one*, 2013. **8**(2): p. e56090-e56090.
30. Villalón, P., et al., *Dynamics of a Sporadic Nosocomial Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii Complex Population*. *Frontiers in Microbiology*, 2019. **10**(593).
31. Blossom, D.B. and A. Srinivasan, *Drug-Resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex: An Emerging Nosocomial Pathogen With Few Treatment Options*. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 2008. **16**(1): p. 1-3.
32. Harding, C.M., S.W. Hennon, and M.F. Feldman, *Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence*. *Nat Rev Microbiol*, 2018. **16**(2): p. 91-102.
33. Peng, S.-Y., et al., *Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the Acinetobacter baumannii phage endolysin LysAB2*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 11477.
34. Antunes, L.C.S., P. Visca, and K.J. Towner, *Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen*. *Pathogens and Disease*, 2014. **71**(3): p. 292-301.
35. Wareth, G., H. Neubauer, and L.D. Sprague, *Acinetobacter baumannii - a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany*. *Vet Res Commun*, 2019. **43**(1): p. 1-6.
36. Alsan, M. and M. Klompas, *Acinetobacter baumannii: An Emerging and Important Pathogen*. *J Clin Outcomes Manag*, 2010. **17**(8): p. 363-369.
37. La Scola, B. and D. Raoult, *Acinetobacter baumannii in human body louse*. *Emerg Infect Dis*, 2004. **10**(9): p. 1671-3.
38. van der Kolk, J.H., et al., *Acinetobacter in veterinary medicine, with an emphasis on Acinetobacter baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019. **16**: p. 59-71.
39. Ghaffoori Kanaan, M.H., et al., *Drug resistance and virulence traits of Acinetobacter baumannii from Turkey and chicken raw meat*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2020. **70**: p. 101451.
40. Wilharm, G., et al., *Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen Acinetobacter baumannii to lineages spread in hospitals worldwide*. *Environ Microbiol*, 2017. **19**(10): p. 4349-4364.

41. Müller, S., T. Janssen, and L.H. Wieler, *Multidrug resistant Acinetobacter baumannii in veterinary medicine--emergence of an underestimated pathogen?* Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2014. **127**(11-12): p. 435-46.
42. Lee, C.-R., et al., *Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017. **7**(55).
43. Lin, M.-F. and C.-Y. Lan, *Antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii: From bench to bedside*. World journal of clinical cases, 2014. **2**(12): p. 787-814.
44. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 969-76.
45. Perez, F., et al., *Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(10): p. 3471-84.
46. Bonnin, R., P. Nordmann, and L. Poirel, *Screening and deciphering antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii: A state of the art*. Expert review of anti-infective therapy, 2013. **11**: p. 571-83.
47. Kapoor, G., S. Saigal, and A. Elongavan, *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology, 2017. **33**(3): p. 300-305.
48. Ramirez, M.S. and M.E. Tolmasky, *Aminoglycoside modifying enzymes*. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 2010. **13**(6): p. 151-171.
49. Liroy, V.S., et al., *Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host*. RNA (New York, N.Y.), 2014. **20**(3): p. 382-391.
50. Grossman, T.H., *Tetracycline Antibiotics and Resistance*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2016. **6**(4): p. a025387-a025387.
51. Peleg, A.Y., H. Seifert, and D.L. Paterson, *Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(3): p. 538-82.
52. Redgrave, L.S., et al., *Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success*. Trends Microbiol, 2014. **22**(8): p. 438-45.
53. Potron, A., L. Poirel, and P. Nordmann, *Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Mechanisms and epidemiology*. Int J Antimicrob Agents, 2015. **45**(6): p. 568-85.
54. Tereshchenkov, A.G., et al., *Binding and Action of Amino Acid Analogs of Chloramphenicol upon the Bacterial Ribosome*. J Mol Biol, 2018. **430**(6): p. 842-852.
55. Dijkmans, A.C., et al., *Fosfomycin: Pharmacological, Clinical and Future Perspectives*. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2017. **6**(4): p. 24.
56. Sharma, A., et al., *Fosfomycin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **72**(1): p. 68-74.
57. Moffatt, J.H., M. Harper, and J.D. Boyce, *Mechanisms of Polymyxin Resistance*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1145**: p. 55-71.
58. Flemming, H.-C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(9): p. 623-633.
59. Singh, S., et al., *Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents*. The open microbiology journal, 2017. **11**: p. 53-62.
60. Longo, F., C. Vuotto, and G. Donelli, *Biofilm formation in Acinetobacter baumannii*. New Microbiol, 2014. **37**(2): p. 119-27.

61. Ahmad, S., et al., *An overview on phase variation, mechanisms and roles in bacterial adaptation*. JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association, 2017. **67**(2): p. 285-291.
62. van der Woude, M.W. and A.J. Bäumlér, *Phase and antigenic variation in bacteria*. Clinical microbiology reviews, 2004. **17**(3): p. 581-611.
63. Hallet, B., *Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria*. Current opinion in microbiology, 2001. **4**(5): p. 570-581.
64. Tipton, K.A., D. Dimitrova, and P.N. Rather, *Phase-Variable Control of Multiple Phenotypes in Acinetobacter baumannii Strain AB5075*. Journal of bacteriology, 2015. **197**(15): p. 2593-2599.
65. Ahmad, I., et al., *Analysis of colony phase variation switch in Acinetobacter baumannii clinical isolates*. PloS one, 2019. **14**(1): p. e0210082-e0210082.
66. Jenal, U., A. Reinders, and C. Lori, *Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire*. Nature Reviews Microbiology, 2017. **15**(5): p. 271-284.
67. Hengge, R., *Principles of c-di-GMP signalling in bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(4): p. 263-273.
68. Römling, U., M.Y. Galperin, and M. Gomelsky, *Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2013. **77**(1): p. 1-52.
69. Christen, B., et al., *Allosteric control of cyclic di-GMP signaling*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 32015-24.
70. Valentini, M. and A. Filloux, *Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria*. The Journal of biological chemistry, 2016. **291**(24): p. 12547-12555.
71. Hassan, K.A., et al., *The putative drug efflux systems of the Bacillus cereus group*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0176188.
72. Juni, E. and A. Janik, *Transformation of Acinetobacter calco-aceticus (Bacterium anitratum)*. J Bacteriol, 1969. **98**(1): p. 281-8.
73. Sawula, R.V. and I.P. Crawford, *Mapping of the tryptophan genes of Acinetobacter calcoaceticus by transformation*. J Bacteriol, 1972. **112**(2): p. 797-805.
74. Reiser, S. and C. Somerville, *Isolation of mutants of Acinetobacter calcoaceticus deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase*. J Bacteriol, 1997. **179**(9): p. 2969-75.
75. ATCC. *Acinetobacter baylyi (ATCC® 33305™)*. [cited 2020 14.05]; Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/33305.aspx#history>.
76. Jacobs, A.C., et al., *AB5075, a Highly Virulent Isolate of Acinetobacter baumannii, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments*. mBio, 2014. **5**(3): p. e01076-14.
77. Piechaud D, e.a., *Etude de 26 souches de Moraxella lwoffii*. Ann. Inst. Pasteur, 1951. **80**: p. 97-99.
78. Baumann, P., M. Doudoroff, and R.Y. Stanier, *A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter)*. J Bacteriol, 1968. **95**(5): p. 1520-41.
79. ATCC. *Acinetobacter baumannii Bouvet and Grimont (ATCC® 17978™)*. [cited 2020 14.05]; Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/17978.aspx#history>.
80. Hugh, R. and R. Reese, *Designation of the type strain for Bacterium anitratum Schaub and Hauber 1948*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1967. **17**(3): p. 245-254.

81. Schaub, I.G. and F.D. Hauber, *A Biochemical and Serological Study of a Group of Identical Unidentifiable Gram-negative Bacilli from Human Sources*. Journal of bacteriology, 1948. **56**(4): p. 379-385.
82. Hugh, R. and R. Reese, *A comparison of 120 strains of Bacterium anitratum Schaub and Hauber with the type strain of this species*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1968. **18**(3): p. 207-229.
83. Bouvet, P.J.M. and P.A.D. Grimont, *Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1986. **36**(2): p. 228-240.
84. ATCC. *Acinetobacter baumannii Bouvet and Grimont (ATCC®19606™)*. [cited 2020 14.05]; Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/19606.aspx#history>.
85. Manoillab. *Acinetobacter baumannii Mutant Library*. [cited 2020 15.05]; Available from: <https://www.gs.washington.edu/labs/manoil/baumannii.htm>.
86. Andrews, J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl 1**: p. 5-16.
87. EUCAST. *EUCAST reading guide for broth microdilution*. 2020 [cited 2020 19.04]; Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Reading_guide_BMD_v_2.0_2020.pdf.
88. Fernando, D.M., et al., *Triclosan can select for an AdeIJK-overexpressing mutant of Acinetobacter baumannii ATCC 17978 that displays reduced susceptibility to multiple antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(11): p. 6424-31.
89. Rumbo, C., et al., *Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011. **55**(7): p. 3084-3090.
90. Smani, Y., et al., *Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of Acinetobacter Baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014. **58**(3): p. 1806.
91. Adams, M.D., et al., *Resistance to Colistin in <i>Acinetobacter baumannii</i> Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(9): p. 3628.
92. Chopra, S., et al., *Repurposing FDA-approved drugs to combat drug-resistant Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(12): p. 2598-601.
93. Bailey, R. *Phases of bacterial growth curve*. 2018 [cited 2020 25.03]; Available from: <https://www.thoughtco.com/bacterial-growth-curve-phases-4172692>.
94. QIAGEN. *DNeasy® UltraClean® Microbial Kit Handbook 2020* [cited 2020 14.05]; Available from: <https://www.qiagen.com/lu/resources/resourcedetail?id=a733f3a9-5a8b-4003-b28e-55bb050bad1e&lang=en>.
95. Giron Koetsier, E.C. *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity With Microvolume Spectrophotometers*. 2019 [cited 2020 28.03]; Available from: https://international.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?la=en&rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc.
96. Matlock, B. *Assessment of Nucleic Acid Purity*. [cited 2020 16.05]; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.

97. QIAGEN. *RNeasy® Mini Handbook*. 2019 [cited 2020 14.05]; Available from: <https://www.qiagen.com/lu/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>.
98. Academy, K. *Gel electrophoresis*. [cited 2020 24.03]; Available from: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>.
99. Scitable. *Gel electrophoresis*. [cited 2020 24.03]; Available from: <https://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286/>.
100. Biotium. *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain*. [cited 2020 25.03]; Available from: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>.
101. Dowd, D.M. *What is the function of tracking dye in gel electrophoresis?* 2019 [cited 2020 25.03]; Available from: <https://sciencing.com/what-is-the-function-of-tracking-dye-in-gel-electrophoresis-12299095.html>.
102. Chauhan, D.T. *DNA gel loading dye*. 2018 [cited 2020 25.03]; Available from: <https://geneticeducation.co.in/dna-gel-loading-dye/>.
103. Scientific, T. *Basic Principles of RT-qPCR*. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>.
104. Fossum, S. and E. Dissen. *Polymerasekjedereaksjon. I Store medisinske leksikon*. 2020, 17. mars [cited 2020 31.03]; Available from: <https://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>.
105. Scientific), A.A.T. *What is qPCR?* 2020 [cited 2020 31.03]; Available from: <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-qpcr/>.
106. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. *The Journal of investigative dermatology*, 2013. **133**(3): p. 1-4.
107. Scientific, T. *Reverse Transcription-Six Most Common Applications*. [cited 2020 31.03]; Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html#RTPCR>.
108. Raby, B.A. *Tools for genetics and genomics: Polymerase chain reaction*. 2020 [cited 2020 31.03]; Available from: https://www.uptodate.com/contents/tools-for-genetics-and-genomics-gene-expression-profiling?search=cDNA&source=search_result&selectedTitle=1~54&usage_type=default&display_rank=1.
109. Rodriguez-Lazaro, D. and M. Hernandez, *Real-time PCR in Food Science: Introduction*. *Curr Issues Mol Biol*, 2013. **15**: p. 25-38.
110. MERCK. *SYBR® Green Based qPCR*. [cited 2020 31.03]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/sybr-green-based-qpcr.html>.
111. Gomez, M.J. and A.A. Neyfakh, *Genes Involved in Intrinsic Antibiotic Resistance of Acinetobacter Baylyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. **50**(11): p. 3562.
112. ThermoFisher. *Absolute vs. Relative Quantification for qPCR*. [cited 2020 07.04]; Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html>.
113. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 1101-8.

114. Elhosseiny, N.M., N.B. Elhezawy, and A.S. Attia, *Comparative proteomics analyses of Acinetobacter baumannii strains ATCC 17978 and AB5075 reveal the differential role of type II secretion system secretomes in lung colonization and ciprofloxacin resistance*. Microbial pathogenesis, 2019. **128**: p. 20-27.
115. Cheng, Y.-S., et al., *Repurposing Screen Identifies Unconventional Drugs With Activity Against Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2019. **8**: p. 1-10.
116. Leelasupasri, S., W. Santimaleeworagun, and T. Jitwasinkul, *Antimicrobial Susceptibility among Colistin, Sulbactam, and Fosfomycin and a Synergism Study of Colistin in Combination with Sulbactam or Fosfomycin against Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii*. Journal of pathogens, 2018. **2018**: p. 1-5.
117. Kwon, H.I., et al., *Outer membrane protein A contributes to antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii through the OmpA-like domain*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017. **72**(11): p. 3012-3015.
118. Nafplioti, K., et al., *Dissemination of International Clone II Acinetobacter baumannii Strains Coproducing OXA-23 Carbapenemase and 16S rRNA Methylase ArmA in Athens, Greece*. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 2019: p. 1-5.
119. Karalewitz, A.P.A. and S.I. Miller, *Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Chloramphenicol Resistance Requires an Inner Membrane Permease*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2018. **62**(8): p. 1-13.
120. Sakoulas, G., et al., *Classical β -Lactamase Inhibitors Potentiate the Activity of Daptomycin against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Colistin against Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2017. **61**(2): p. 1-9.
121. Anderson, S.E., et al., *Aminoglycoside Heteroresistance in Acinetobacter baumannii AB5075*. mSphere, 2018. **3**(4): p. 1-12.
122. GenBANK. *type 4 fimbrial biogenesis protein [Acinetobacter baumannii]*. 2015 [cited 2020 22.05]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/787861028>.
123. EMBL-EBI. *Sekvens: delesjonsmutanten A. baumannii AB5075-UW delta-ABUW_2255*. [cited 2020 23.05]; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/iprscan5-R20200523-015613-0445-52601078-p2m/>.
124. Lu, S., et al., *CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D265-d268.
125. EMBL-EBI. *PilZ domain (IPR009875)*. [cited 2020 23.05]; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR009875/>.
126. Veeraraghavan, B., et al., *Chapter 3: Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Acinetobacter spp.* 2019. p. 23-37.
127. Nickson, D.C. *Minimum Inhibitory Concentration*. 2019 [cited 2020 26.05]; Available from: <https://litfl.com/minimum-inhibitory-concentration/>.
128. Nedret Koç, A., S. Gökahmetođlu, and M. Öđuzkaya, *Comparison of Etest with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals*. Mycoses, 2000. **43**(7-8): p. 293-297.
129. Akin, F.E.O., A. Bayram, and I. Balci, *[Comparison of disc diffusion, E-test, and broth microdilution methods for the determination of resistance to colistin, polymyxin B, and tigecycline in multi-resistant Acinetobacter baumannii isolates]*. Mikrobiyoloji bulteni, 2010. **44**(2): p. 203-210.

130. Amsler, K., et al., *Comparison of Broth Microdilution, Agar Dilution, and Etest for Susceptibility Testing of Doripenem against Gram-Negative and Gram-Positive Pathogens*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(9): p. 3353.
131. EUCAST. *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. 2020 [cited 2020 27.05]; Available from: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=228>.
132. Krause, K.M., et al., *Aminoglycosides: An Overview*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2016. **6**(6): p. a027029.
133. Scholar, E., *Amikacin*, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna and D.B. Bylund, Editors. 2007, Elsevier: New York. p. 1-5.
134. Dougherty, T.J. and M.J. Pucci, *Antibiotic Discovery and Development*. 2011: Springer US.
135. Taber, H.W., et al., *Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics*. Microbiological reviews, 1987. **51**(4): p. 439-457.
136. Schumacher, M.A. and W. Zeng, *Structures of the activator of K. pneumonia biofilm formation, MrkH, indicates PilZ domains involved in c-di-GMP and DNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(36): p. 10067-72.
137. Jain, R., et al., *Type IV pilus assembly in Pseudomonas aeruginosa over a broad range of cyclic di-GMP concentrations*. Journal of bacteriology, 2012. **194**(16): p. 4285-4294.
138. Persat, A., et al., *Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(24): p. 7563-7568.
139. Alm, R.A., et al., *Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1996. **178**(1): p. 46-53.
140. Stanley, N.R. and B.A. Lazazzera, *Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation*. Mol Microbiol, 2004. **52**(4): p. 917-24.
141. Roca, I., et al., *The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace*. Frontiers in microbiology, 2012. **3**: p. 148-148.
142. Boluki, E., et al., *The effect of antimicrobial photodynamic therapy against virulence genes expression in colistin-resistance Acinetobacter baumannii*. Laser therapy, 2019. **28**(1): p. 27-33.
143. Cheang, Q.W., et al., *Large-scale sequence similarity analysis reveals the scope of sequence and function divergence in PilZ domain proteins*. bioRxiv, 2020: p. 2020.02.11.943704.
144. Browser, T.M.L. *A. baumannii AB5075-UW chromosome*. [cited 2020 31.05]; Available from: http://tools.uwgenomics.org/tn_mutants/browse.php?pgat=pgat_acinetobacter&elem=AB5075UW&gene=ABUW_2255&fbclid=IwAR18n69CJKJ6GVh-Q0Ct9ZiT38aX1ud3ITx_QV4iNgt90FVu0rg_0w7CX_s.
145. Ahmad, I., et al., *A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of Acinetobacter baumannii 17978*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1991-1991.

Vedlegg 1

Tabell V.1.1 Oversikt over OD₆₀₀-målinger ved tid x for *A. baumannii* ATCC 17978 biologisk replikat 1 for inokulat behandlet med enten ceftazidim (CAZ), fosfomycin (FOF), kloramfenikol (CHL), kolistin (CST), tobramycin (TOB) eller kontrollprøve uten antibiotikum (U/AB).

Tid	Antibiotikum (OD ₆₀₀)					
	U/AB	CAZ	FOF	CHL	CST	TOB
0	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
1	0.136	0.158	0.150	0.140	0.122	0.170
2	0.448	0.478	0.446	0.384	0.426	0.492
3	1.640	1.700	1.650	1.690	1.880	1.560
4	4.110	4.430	4.000	3.830	3.940	4.130
5	5.740	5.480	5.260	5.780	5.830	5.800
6	6.160	5.840	5.710	6.210	5.960	5.870

Tabell V.1.2 Oversikt over OD₆₀₀-målinger ved tid x for *A. baumannii* ATCC 17978 biologisk replikat 2 for inokulat behandlet med enten ceftazidim (CAZ), fosfomycin (FOF), kloramfenikol (CHL), kolistin (CST), tobramycin (TOB) eller kontrollprøve uten antibiotikum (U/AB).

Tid	Antibiotikum (OD ₆₀₀)					
	U/AB	CAZ	FOF	CHL	CST	TOB
0	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
1	0.056	0.056	0.088	0.080	0.038	0.062
2	0.054	0.082	0.080	0.064	0.048	0.084
3	0.150	0.170	0.100	0.210	0.160	0.110
4	0.220	0.390	0.280	0.280	0.230	0.400
5	0.890	1.210	1.110	0.860	0.800	1.240
6	2.560	3.300	2.650	2.810	2.650	3.720

Vedlegg 2

Tabell V.2.1 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for 16S rRNA. Ruter markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og + RT reaksjoner.

Referansegen (16S rRNA)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	25.81	25.93	25.87	19.03
U/AB 2	-	6.73	6.73	23.91	24.05	23.98	17.25
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	20.67	20.84	20.76	12.67
CEF 1	6.80	6.76	6.78	24.06	24.46	24.26	17.48
CEF 2	6.81	-	6.81	25.87	25.88	25.88	19.07
CEF 3	8.46	8.46	8.46	23.57	23.62	23.60	15.14
FOS 1	6.63	7.12	6.88	24.93	24.92	24.93	18.05
FOS 2	6.85	6.75	6.80	19.74	19.91	19.83	13.03
FOS 3	7.22	7.64	7.43	23.03	23.13	23.08	15.65
KLO 1	6.65	6.47	6.56	29.29	29.32	29.31	22.75
KLO 2	8.12	8.18	8.15	30.13	29.83	29.98	21.83
KLO 3	6.60	7.40	7.00	24.48	24.57	24.53	17.53
KOL 1	7.06	7.16	7.11	24.46	24.67	24.57	17.46
KOL 2	5.00	7.07	6.04	29.02	29.18	29.10	23.07
KOL 3	6.54	6.70	6.62	21.74	21.87	21.81	15.19
TOB 1	6.65	6.80	6.73	29.73	29.65	29.69	22.97
TOB 2	6.55	6.00	6.28	22.18	22.15	22.17	15.89
TOB 3	6.92	6.92	6.92	21.84	21.98	21.91	14.99

Tabell V.2.2 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *yedT*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og + RT reaksjoner.

<i>yedT</i> (ABUW_0137)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	25.09	25.56	25.33	29.99	30.54	30.27	4.94
U/AB 2	25.72	25.59	25.66	27.27	27.68	27.48	1.82
U/AB 3	24.51	24.12	24.32	24.44	24.83	24.64	0.32
CEF 1	25.51	25.58	25.55	27.90	28.00	27.95	2.41
CEF 2	25.07	25.45	25.26	29.87	30.85	30.36	5.10
CEF 3	26.44	26.57	26.51	27.30	27.25	27.28	0.77
FOS 1	26.07	-	26.07	28.66	29.01	28.84	2.77
FOS 2	23.53	25.00	24.27	23.64	23.78	23.71	-0.56
FOS 3	25.15	25.33	25.24	26.85	26.57	26.71	1.47
KLO 1	26.43	26.44	26.44	34.58	34.08	34.33	7.90
KLO 2	26.57	26.77	26.67	-	-	-	-
KLO 3	24.67	24.69	24.68	28.32	28.21	28.27	3.59
KOL 1	25.55	25.61	25.58	28.85	28.42	28.64	3.06
KOL 2	24.85	24.92	24.89	35.13	35.95	35.54	10.66
KOL 3	24.54	24.25	24.40	25.17	25.10	25.14	0.74
TOB 1	25.30	24.88	25.09	36.72	38.02	37.37	12.28
TOB 2	24.94	25.35	25.15	26.07	25.94	26.01	0.86
TOB 3	24.89	24.66	24.78	25.75	25.83	25.79	1.02

Tabell V.2.3 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *yedT*. Rader markert i grønt viser kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.2).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>yedT</i> (ABUW_0137)			ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	25.09	25.56	25.33	18.48	0	1.00		1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	25.72	25.59	25.66	18.93	0	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	24.51	24.12	24.32	16.23	0	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	25.51	25.58	25.55	18.77	0.29	0.82	-1.22	-1.22
CEF 2	6.81	-	6.81	25.07	25.45	25.26	18.45	-0.48	1.39		1.39
CEF 3	8.46	8.46	8.46	26.44	26.57	26.51	18.05	1.82	0.28	-3.52	-3.52
FOS 1	6.63	7.12	6.88	26.07		26.07	19.20	0.72	0.61	-1.64	-1.64
FOS 2	6.85	6.75	6.80	23.53	25.00	24.27	17.47	-1.46	2.75		2.75
FOS 3	7.22	7.64	7.43	25.15	25.33	25.24	17.81	1.58	0.33	-2.99	-2.99
KLO 1	6.65	6.47	6.56	26.43	26.44	26.44	19.88	1.40	0.38	-2.63	-2.63
KLO 2	8.12	8.18	8.15	26.57	26.77	26.67	18.52	-0.40	1.32		1.32
KLO 3	6.60	7.40	7.00	24.67	24.69	24.68	17.68	1.45	0.37	-2.73	-2.73
KOL 1	7.06	7.16	7.11	25.55	25.61	25.58	18.47	-0.01	1.01		1.01
KOL 2	5.00	7.07	6.04	24.85	24.92	24.89	18.85	-0.07	1.05		1.05
KOL 3	6.54	6.70	6.62	24.54	24.25	24.40	17.78	1.55	0.34	-2.92	-2.92
TOB 1	6.65	6.80	6.73	25.30	24.88	25.09	18.37	-0.11	1.08		1.08
TOB 2	6.55	6.00	6.28	24.94	25.35	25.15	18.87	-0.05	1.04		1.04
TOB 3	6.92	6.92	6.92	24.89	24.66	24.78	17.86	1.63	0.32	-3.08	-3.08

Tabell V.2.4 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *ydaM*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og + RT reaksjoner.

<i>ydaM</i> (ABUW_1045)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	24.90	24.80	24.85	29.85	30.02	29.94	5.09
U/AB 2	24.82	24.88	24.85	27.08	27.17	27.13	2.28
U/AB 3	24.16	24.59	24.38	24.01	24.19	24.10	-0.27
CEF 1	25.42	24.49	24.96	27.31	27.70	27.51	2.55
CEF 2	25.54	26.15	25.85	29.89	29.83	29.86	4.02
CEF 3	26.26	26.48	26.37	26.98	26.97	26.98	0.61
FOS 1	27.01	26.74	26.88	28.69	28.47	28.58	1.71
FOS 2	23.33	23.43	23.38	23.84	23.47	23.66	0.28
FOS 3	24.57	25.30	24.94	26.20	26.45	26.33	1.39
KLO 1	27.15	25.75	26.45	34.70	33.47	34.09	7.64
KLO 2	26.60	27.22	26.91	-	-	-	-
KLO 3	24.11	24.03	24.07	28.05	28.03	28.04	3.97
KOL 1	30.50	25.45	27.98	28.20	28.62	28.41	0.43
KOL 2	24.55	25.65	25.10	36.51	33.87	35.19	10.09
KOL 3	22.72	23.61	23.17	25.04	25.02	25.03	1.87
TOB 1	24.35	24.04	24.20	35.47	37.66	36.57	12.37
TOB 2	25.90	24.61	25.26	25.72	25.62	25.67	0.42
TOB 3	24.47	24.75	24.61	25.33	25.45	25.39	0.78

Tabell V.2.5 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *ydaM*. Rader markert i grønt viser kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.4).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>ydaM</i> (ABUW_1045)			Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$-1/2^{-\Delta\Delta$ Ct}	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	24.90	24.80	24.85	18.01	0.00	1.00		1.00
U/AB 2		6.73	6.73	24.82	24.88	24.85	18.12	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	24.16	24.59	24.38	16.29	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	25.42	24.49	24.96	18.18	0.17	0.89	-1.13	-1.13
CEF 2	6.81		6.81	25.54	26.15	25.85	19.04	0.91	0.53	-1.89	-1.89
CEF 3	8.46	8.46	8.46	26.26	26.48	26.37	17.91	1.62	0.33	-3.07	-3.07
FOS 1	6.63	7.12	6.88	27.01	26.74	26.88	20.00	2.00	0.25	-3.99	-3.99
FOS 2	6.85	6.75	6.80	23.33	23.43	23.38	16.58	-1.54	2.91		2.91
FOS 3	7.22	7.64	7.43	24.57	25.30	24.94	17.51	1.22	0.43	-2.32	-2.32
KLO 1	6.65	6.47	6.56	27.15	25.75	26.45	19.89	1.89	0.27	-3.69	-3.69
KLO 2	8.12	8.18	8.15	26.60	27.22	26.91	18.76	0.64	0.64	-1.56	-1.56
KLO 3	6.60	7.40	7.00	24.11	24.03	24.07	17.07	0.78	0.58	-1.72	-1.72
KOL 1	7.06	7.16	7.11	30.50	25.45	27.98	20.87	2.86	0.14	-7.26	-7.26
KOL 2	5.00	7.07	6.04	24.55	25.65	25.10	19.07	0.95	0.52	-1.93	-1.93
KOL 3	6.54	6.70	6.62	22.72	23.61	23.17	16.55	0.25	0.84	-1.19	-1.19
TOB 1	6.65	6.80	6.73	24.35	24.04	24.20	17.47	-0.54	1.45		1.45
TOB 2	6.55	6.00	6.28	25.90	24.61	25.26	18.98	0.86	0.55	-1.82	-1.82
TOB 3	6.92	6.92	6.92	24.47	24.75	24.61	17.69	1.40	0.38	-2.64	-2.64

Tabell V.2.6 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *pleD_3*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner.

<i>pleD_3</i> (ABUW_0188)								Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT		
U/AB 1	24.49	24.47	24.48	28.78	28.69	28.74	4.26	
U/AB 2	25.06	26.90	25.98	26.02	26.16	26.09	0.11	
U/AB 3	22.68	23.31	23.00	23.25	23.30	23.28	0.28	
CEF 1	24.59	24.74	24.67	26.65	26.68	26.67	2.00	
CEF 2	23.69	23.80	23.75	28.90	28.74	28.82	5.08	
CEF 3	25.69	26.03	25.86	26.26	26.05	26.16	0.30	
FOS 1	25.12	25.04	25.08	27.31	27.58	27.45	2.37	
FOS 2	22.20	22.36	22.28	22.51	22.57	22.54	0.26	
FOS 3	24.00	24.18	24.09	25.61	25.62	25.62	1.53	
KLO 1	24.73	25.19	24.96	33.15	32.58	32.87	7.90	
KLO 2	25.31	25.31	25.31	-	-	-	-	
KLO 3	23.44	23.92	23.68	26.78	27.05	26.92	3.24	
KOL 1	24.46	23.26	23.86	27.30	27.09	27.20	3.34	
KOL 2	25.09	24.00	24.55	34.24	34.17	34.21	9.66	
KOL 3	23.49	23.04	23.27	24.03	23.98	24.01	0.74	
TOB 1	24.62	24.49	24.56	35.89	35.63	35.76	11.21	
TOB 2	23.83	24.19	24.01	24.69	25.43	25.06	1.05	
TOB 3	23.17	23.58	23.38	24.20	24.53	24.37	0.99	

Tabell V.2.7 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *pleD_3*. Rader markert i grønt viser kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.6).

Prøve	Referansegen (16s)		<i>pleD_3</i> (ABUW_0188)		Δ Ct	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	-1/2 ^{-ΔΔCt}	FC-verdi	
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1						+RT2
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	24.49	24.47	24.48	17.64	0.00	1.00	1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	25.06	26.90	25.98	19.25	0.00	1.00	1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	22.68	23.31	23.00	14.91	0.00	1.00	1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	24.59	24.74	24.67	17.89	0.25	0.84	-1.19
CEF 2	6.81	-	6.81	23.69	23.80	23.75	16.94	-2.31	4.98	4.98
CEF 3	8.46	8.46	8.46	25.69	26.03	25.86	17.40	2.49	0.18	-5.62
FOS 1	6.63	7.12	6.88	25.12	25.04	25.08	18.21	0.57	0.67	-1.48
FOS 2	6.85	6.75	6.80	22.20	22.36	22.28	15.48	-3.77	13.64	13.64
FOS 3	7.22	7.64	7.43	24.00	24.18	24.09	16.66	1.75	0.30	-3.36
KLO 1	6.65	6.47	6.56	24.73	25.19	24.96	18.40	0.77	0.59	-1.70
KLO 2	8.12	8.18	8.15	25.31	25.31	25.31	17.16	-2.09	4.26	4.26
KLO 3	6.60	7.40	7.00	23.44	23.92	23.68	16.68	1.77	0.29	-3.41
KOL 1	7.06	7.16	7.11	24.46	23.26	23.86	16.75	-0.88	1.85	1.85
KOL 2	5.00	7.07	6.04	25.09	24.00	24.55	18.51	-0.74	1.67	1.67
KOL 3	6.54	6.70	6.62	23.49	23.04	23.27	16.65	1.74	0.30	-3.33
TOB 1	6.65	6.80	6.73	24.62	24.49	24.56	17.83	0.20	0.87	-1.14
TOB 2	6.55	6.00	6.28	23.83	24.19	24.01	17.74	-1.52	2.86	2.86
TOB 3	6.92	6.92	6.92	23.17	23.58	23.38	16.46	1.55	0.34	-2.92

Tabell V.2.8 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *pilZ*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og + RT reaksjoner.

<i>pilZ</i> (ABUW_2255)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	27.62	27.60	27.61	31.70	32.21	31.96	4.35
U/AB 2	27.87	27.46	27.67	29.14	29.34	29.24	1.58
U/AB 3	25.36	26.88	26.12	26.81	26.81	26.81	0.69
CEF 1	26.72	27.70	27.21	29.85	29.93	29.89	2.68
CEF 2	26.52	26.83	26.68	32.08	32.51	32.30	5.62
CEF 3	26.58	26.81	26.70	28.97	29.46	29.22	2.52
FOS 1	29.52	28.99	29.26	30.33	30.66	30.50	1.24
FOS 2	32.61	25.91	29.26	26.88	25.93	26.41	-2.86
FOS 3	25.23	25.71	25.47	28.55	28.81	28.68	3.21
KLO 1	27.69	30.99	29.34	35.94	36.55	36.25	6.91
KLO 2	28.19	27.98	28.09	-	-	-	-
KLO 3	25.25	25.15	25.20	29.97	31.31	30.64	5.44
KOL 1	40.00	31.20	35.60	30.62	31.14	30.88	-4.72
KOL 2	26.75	27.04	26.90	36.63	36.76	36.70	9.80
KOL 3	25.00	24.54	24.77	26.50	27.10	26.80	2.03
TOB 1	31.54	29.30	30.42	40.00	38.89	39.45	9.03
TOB 2	26.81	26.81	26.81	27.62	27.63	27.63	0.82
TOB 3	26.22	25.94	26.08	28.57	28.07	28.32	2.24

Tabell V.2.9 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *pilZ*. Rader markert i grønt viser kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.8).

Prøve	Referanseggen (16s)			<i>pilZ</i> (ABUW_2255)			Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$-1/2^{-\Delta\Delta$ Ct}	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	27.62	27.60	27.61	20.77	0.00	1.00		1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	27.87	27.46	27.67	20.94	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	25.36	26.88	26.12	18.04	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	26.72	27.70	27.21	20.43	-0.34	1.26		1.26
CEF 2	6.81	-	6.81	26.52	26.83	26.68	19.87	-1.07	2.10		2.10
CEF 3	8.46	8.46	8.46	26.58	26.81	26.70	18.24	0.20	0.87	-1.15	-1.15
FOS 1	6.63	7.12	6.88	29.52	28.99	29.26	22.38	1.62	0.33	-3.06	-3.06
FOS 2	6.85	6.75	6.80	32.61	25.91	29.26	22.46	1.53	0.35	-2.88	-2.88
FOS 3	7.22	7.64	7.43	25.23	25.71	25.47	18.04	0.01	1.00		1.00
KLO 1	6.65	6.47	6.56	27.69	30.99	29.34	22.78	2.02	0.25	-4.04	-4.04
KLO 2	8.12	8.18	8.15	28.19	27.98	28.09	19.94	-1.00	2.00		2.00
KLO 3	6.60	7.40	7.00	25.25	25.15	25.20	18.20	0.17	0.89	-1.12	-1.12
KOL 1	7.06	7.16	7.11	40.00	31.20	35.60	28.49	7.73	0.00	-211.57	-211.57
KOL 2	5.00	7.07	6.04	26.75	27.04	26.90	20.86	-0.07	1.05		1.05
KOL 3	6.54	6.70	6.62	25.00	24.54	24.77	18.15	0.12	0.92	-1.08	-1.08
TOB 1	6.65	6.80	6.73	31.54	29.30	30.42	23.70	2.93	0.13	-7.62	-7.62
TOB 2	6.55	6.00	6.28	26.81	26.81	26.81	20.54	-0.40	1.32		1.32
TOB 3	6.92	6.92	6.92	26.22	25.94	26.08	19.16	1.13	0.46	-2.18	-2.18

Tabell V.2.10 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *yfiN*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner.

<i>yfiN</i> (ABUW_0506)							
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
U/AB 1	24.31	23.80	24.06	28.05	27.95	28.00	3.95
U/AB 2	25.01	25.20	25.11	25.67	25.87	25.77	0.67
U/AB 3	22.35	22.80	22.58	22.88	22.86	22.87	0.29
CEF 1	23.76	23.66	23.71	25.88	26.06	25.97	2.26
CEF 2	23.71	23.93	23.82	28.12	28.53	28.33	4.51
CEF 3	25.01	24.67	24.84	25.85	25.89	25.87	1.03
FOS 1	24.81	24.12	24.47	26.69	26.51	26.60	2.14
FOS 2	21.76	21.68	21.72	21.82	21.86	21.84	0.12
FOS 3	22.82	22.74	22.78	24.95	25.24	25.10	2.32
KLO 1	25.04	24.61	24.83	32.29	31.62	31.96	7.13
KLO 2	24.33	24.23	24.28	-	-	-	-
KLO 3	22.64	22.92	22.78	26.70	26.84	26.77	3.99
KOL 1	27.04	23.77	25.41	26.05	25.86	25.96	0.55
KOL 2	23.83	23.87	23.85	33.89	32.98	33.44	9.59
KOL 3	22.58	22.92	22.75	23.85	23.78	23.82	1.07
TOB 1	23.65	23.67	23.66	-	34.63	34.63	10.97
TOB 2	23.08	23.18	23.13	23.94	23.97	23.96	0.82
TOB 3	22.57	22.68	22.63	23.77	23.95	23.86	1.24

Tabell V.2.11 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *yfiN*.

Ingen kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.10).

Prøve	Referansegen (16s)		<i>yfiN</i> (ABUW_0506)						$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$			
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	24.31	23.80	24.06	17.21	0.00	1.00	1.00	
U/AB 2		6.73	6.73	25.01	25.20	25.11	18.38	0.00	1.00	1.00	
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	22.35	22.80	22.58	14.49	0.00	1.00	1.00	
CEF 1	6.80	6.76	6.78	23.76	23.66	23.71	16.93	-0.28	1.21	1.21	
CEF 2	6.81		6.81	23.71	23.93	23.82	17.01	-1.37	2.58	2.58	
CEF 3	8.46	8.46	8.46	25.01	24.67	24.84	16.38	1.89	0.27	-3.71	
FOS 1	6.63	7.12	6.88	24.81	24.12	24.47	17.59	0.38	0.77	-1.30	
FOS 2	6.85	6.75	6.80	21.76	21.68	21.72	14.92	-3.46	10.97	10.97	
FOS 3	7.22	7.64	7.43	22.82	22.74	22.78	15.35	0.86	0.55	-1.82	
KLO 1	6.65	6.47	6.56	25.04	24.61	24.83	18.27	1.06	0.48	-2.08	
KLO 2	8.12	8.18	8.15	24.33	24.23	24.28	16.13	-2.25	4.74	4.74	
KLO 3	6.60	7.40	7.00	22.64	22.92	22.78	15.78	1.29	0.41	-2.45	
KOL 1	7.06	7.16	7.11	27.04	23.77	25.41	18.30	1.09	0.47	-2.12	
KOL 2	5.00	7.07	6.04	23.83	23.87	23.85	17.82	-0.56	1.47	1.47	
KOL 3	6.54	6.70	6.62	22.58	22.92	22.75	16.13	1.64	0.32	-3.12	
TOB 1	6.65	6.80	6.73	23.65	23.67	23.66	16.94	-0.27	1.21	1.21	
TOB 2	6.55	6.00	6.28	23.08	23.18	23.13	16.86	-1.52	2.87	2.87	
TOB 3	6.92	6.92	6.92	22.57	22.68	22.63	15.71	1.22	0.43	-2.32	

Tabell V.2.12 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *gmr_1*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og + RT reaksjoner.

<i>gmr_1</i> (ABUW_3354)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	25.43	24.86	25.15	28.92	29.18	29.05	3.91
U/AB 2	25.90	25.74	25.82	26.42	26.32	26.37	0.55
U/AB 3	23.18	23.48	23.33	23.34	23.65	23.50	0.16
CEF 1	24.90	24.72	24.81	26.74	26.93	26.84	2.03
CEF 2	24.34	24.74	24.54	28.88	29.49	29.19	4.65
CEF 3	25.93	25.84	25.89	26.48	26.42	26.45	0.57
FOS 1	29.43	25.64	27.54	27.54	28.08	27.81	0.27
FOS 2	22.65	22.73	22.69	23.31	22.77	23.04	0.35
FOS 3	23.79	23.91	23.85	25.75	25.74	25.75	1.90
KLO 1	26.98	26.87	26.93	32.92	33.19	33.06	6.13
KLO 2	25.42	25.70	25.56	-	-	-	-
KLO 3	23.91	23.88	23.90	27.64	27.22	27.43	3.54
KOL 1	35.21	25.98	30.60	27.14	27.2	27.17	-3.43
KOL 2	24.86	24.90	24.88	35.22	34.48	34.85	9.97
KOL 3	23.63	23.52	23.58	24.64	24.49	24.57	0.99
TOB 1	25.79	24.59	25.19	35.53	38.41	36.97	11.78
TOB 2	24.05	24.26	24.16	25.01	25.06	25.04	0.88
TOB 3	24.27	23.14	23.71	24.65	24.78	24.72	1.01

Tabell V.2.13 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *gmr_1*. Ingen kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.12).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>gmr_1</i> (ABUW_3354)			Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$-1/2^{-\Delta\Delta$ Ct}	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	25.43	24.86	25.15	18.30	0.00	1.00		1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	25.90	25.74	25.82	19.09	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	23.18	23.48	23.33	15.25	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	24.90	24.72	24.81	18.03	-0.27	1.21		1.21
CEF 2	6.81	-	6.81	24.34	24.74	24.54	17.73	-1.36	2.57		2.57
CEF 3	8.46	8.46	8.46	25.93	25.84	25.89	17.43	2.18	0.22	-4.53	-4.53
FOS 1	6.63	7.12	6.88	29.43	25.64	27.54	20.66	2.36	0.19	-5.13	-5.13
FOS 2	6.85	6.75	6.80	22.65	22.73	22.69	15.89	-3.20	9.19		9.19
FOS 3	7.22	7.64	7.43	23.79	23.91	23.85	16.42	1.18	0.44	-2.26	-2.26
KLO 1	6.65	6.47	6.56	26.98	26.87	26.93	20.37	2.07	0.24	-4.18	-4.18
KLO 2	8.12	8.18	8.15	25.42	25.70	25.56	17.41	-1.68	3.20		3.20
KLO 3	6.60	7.40	7.00	23.91	23.88	23.90	16.90	1.65	0.32	-3.14	-3.14
KOL 1	7.06	7.16	7.11	35.21	25.98	30.60	23.49	5.19	0.03	-36.38	-36.38
KOL 2	5.00	7.07	6.04	24.86	24.90	24.88	18.85	-0.25	1.19		1.19
KOL 3	6.54	6.70	6.62	23.63	23.52	23.58	16.96	1.71	0.31	-3.27	-3.27
TOB 1	6.65	6.80	6.73	25.79	24.59	25.19	18.47	0.16	0.89	-1.12	-1.12
TOB 2	6.55	6.00	6.28	24.05	24.26	24.16	17.88	-1.21	2.31		2.31
TOB 3	6.92	6.92	6.92	24.27	23.14	23.71	16.79	1.54	0.34	-2.91	-2.91

Tabell V.2.14 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *gmr_2*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner.

<i>gmr_2</i> (ABUW_1764)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	24.02	24.21	24.12	29.18	29.55	29.37	5.25
U/AB 2	26.07	26.06	26.07	26.44	26.70	26.57	0.51
U/AB 3	23.01	23.19	23.10	23.55	23.68	23.62	0.52
CEF 1	24.09	24.27	24.18	26.83	27.02	26.93	2.75
CEF 2	24.64	24.79	24.72	29.08	29.34	29.21	4.50
CEF 3	25.91	26.35	26.13	26.31	26.52	26.42	0.28
FOS 1	25.49	24.61	25.05	27.73	27.85	27.79	2.74
FOS 2	22.33	22.46	22.40	22.81	22.81	22.81	0.41
FOS 3	24.20	24.25	24.23	25.90	25.86	25.88	1.66
KLO 1	25.03	24.96	25.00	33.22	32.60	32.91	7.92
KLO 2	25.72	25.57	25.65	-	-	-	-
KLO 3	23.93	24.15	24.04	27.54	27.47	27.51	3.47
KOL 1	26.52	24.57	25.55	27.30	27.53	27.42	1.87
KOL 2	24.01	25.20	24.61	35.32	33.89	34.61	10.00
KOL 3	23.06	23.31	23.19	24.52	24.76	24.64	1.46
TOB 1	24.20	24.06	24.13	-	-	-	-
TOB 2	23.87	23.84	23.86	24.78	25.03	24.91	1.05
TOB 3	23.66	23.67	23.67	24.72	24.79	24.76	1.09

Tabell V.2.15 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *gmr_2*. Rader markert i grønt viser kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.14).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>gmr_2</i> (ABUW_1764)							
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$	FC-verdi
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	24.02	24.21	24.12	17.27	0.00	1.00		1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	26.07	26.06	26.07	19.34	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	23.01	23.19	23.10	15.02	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	24.09	24.27	24.18	17.40	0.13	0.91	-1.09	-1.09
CEF 2	6.81	-	6.81	24.64	24.79	24.72	17.91	-1.43	2.69		2.69
CEF 3	8.46	8.46	8.46	25.91	26.35	26.13	17.67	2.66	0.16	-6.30	-6.30
FOS 1	6.63	7.12	6.88	25.49	24.61	25.05	18.18	0.90	0.53	-1.87	-1.87
FOS 2	6.85	6.75	6.80	22.33	22.46	22.40	15.60	-3.74	13.36		13.36
FOS 3	7.22	7.64	7.43	24.20	24.25	24.23	16.80	1.78	0.29	-3.43	-3.43
KLO 1	6.65	6.47	6.56	25.03	24.96	25.00	18.44	1.17	0.45	-2.24	-2.24
KLO 2	8.12	8.18	8.15	25.72	25.57	25.65	17.50	-1.84	3.58		3.58
KLO 3	6.60	7.40	7.00	23.93	24.15	24.04	17.04	2.03	0.25	-4.07	-4.07
KOL 1	7.06	7.16	7.11	26.52	24.57	25.55	18.44	1.17	0.45	-2.24	-2.24
KOL 2	5.00	7.07	6.04	24.01	25.20	24.61	18.57	-0.76	1.70		1.70
KOL 3	6.54	6.70	6.62	23.06	23.31	23.19	16.57	1.55	0.34	-2.93	-2.93
TOB 1	6.65	6.80	6.73	24.20	24.06	24.13	17.41	0.13	0.91	-1.10	-1.10
TOB 2	6.55	6.00	6.28	23.87	23.84	23.86	17.58	-1.76	3.38		3.38
TOB 3	6.92	6.92	6.92	23.66	23.67	23.67	16.75	1.73	0.30	-3.32	-3.32

Tabell V.2.16 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *cph2_1*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner.

<i>cph2_1</i> (ABUW_1221)								Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT		
U/AB 1	26.05	28.59	27.32	30.67	31.65	31.16	3.84	
U/AB 2	28.02	26.10	27.06	28.14	28.71	28.43	1.37	
U/AB 3	25.29	28.20	26.75	25.63	25.48	25.56	-1.19	
CEF 1	26.84	28.19	27.52	28.60	29.23	28.92	1.40	
CEF 2	25.64	26.54	26.09	31.10	31.62	31.36	5.27	
CEF 3	27.80	27.20	27.50	28.06	28.62	28.34	0.84	
FOS 1	30.80	29.10	29.95	29.89	30.18	30.04	0.08	
FOS 2	25.87	26.02	25.95	27.48	25.24	26.36	0.41	
FOS 3	25.68	25.92	25.80	27.91	27.96	27.94	2.14	
KLO 1	30.10	30.99	30.55	34.34	34.60	34.47	3.93	
KLO 2	27.43	28.00	27.72	-	-	-	-	
KLO 3	27.68	26.87	27.28	30.12	29.59	29.86	2.58	
KOL 1	37.72	26.97	32.35	30.66	30.06	30.36	-1.99	
KOL 2	26.19	26.98	26.59	36.40	35.82	36.11	9.53	
KOL 3	24.60	25.16	24.88	26.20	26.77	26.49	1.61	
TOB 1	29.48	27.73	28.61	40.00		40.00	11.40	
TOB 2	26.80	27.07	26.94	26.63	26.61	26.62	-0.32	
TOB 3	25.79	26.45	26.12	26.52	27.09	26.81	0.69	

Tabell V.2.17 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *cph2_1*. Ingen kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.16).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>cph2_1</i> (ABUW_1221)			Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$-1/2^{-\Delta\Delta$ Ct}	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	26.05	28.59	27.32	20.48	0.00	1.00		1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	28.02	26.10	27.06	20.33	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	25.29	28.20	26.75	18.66	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	26.84	28.19	27.52	20.74	0.26	0.84	-1.20	-1.20
CEF 2	6.81	-	6.81	25.64	26.54	26.09	19.28	-1.05	2.07		2.07
CEF 3	8.46	8.46	8.46	27.80	27.20	27.50	19.04	0.38	0.77	-1.30	-1.30
FOS 1	6.63	7.12	6.88	30.80	29.10	29.95	23.08	2.60	0.16	-6.06	-6.06
FOS 2	6.85	6.75	6.80	25.87	26.02	25.95	19.15	-1.19	2.27		2.27
FOS 3	7.22	7.64	7.43	25.68	25.92	25.80	18.37	-0.29	1.22		1.22
KLO 1	6.65	6.47	6.56	30.10	30.99	30.55	23.99	3.51	0.09	-11.39	-11.39
KLO 2	8.12	8.18	8.15	27.43	28.00	27.72	19.57	-0.77	1.70		1.70
KLO 3	6.60	7.40	7.00	27.68	26.87	27.28	20.28	1.62	0.33	-3.06	-3.06
KOL 1	7.06	7.16	7.11	37.72	26.97	32.35	25.24	4.76	0.04	-27.10	-27.10
KOL 2	5.00	7.07	6.04	26.19	26.98	26.59	20.55	0.22	0.86	-1.16	-1.16
KOL 3	6.54	6.70	6.62	24.60	25.16	24.88	18.26	-0.40	1.32		1.32
TOB 1	6.65	6.80	6.73	29.48	27.73	28.61	21.88	1.41	0.38	-2.65	-2.65
TOB 2	6.55	6.00	6.28	26.80	27.07	26.94	20.66	0.33	0.80	-1.26	-1.26
TOB 3	6.92	6.92	6.92	25.79	26.45	26.12	19.20	0.54	0.69	-1.45	-1.45

Tabell V.2.18 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *N/A*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner.

<i>N/A</i> (ABUW_1138)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	24.69	25.43	25.06	29.21	29.71	29.46	4.40
U/AB 2	26.73	26.79	26.76	26.75	26.94	26.85	0.09
U/AB 3	23.51	23.68	23.60	23.89	23.92	23.91	0.31
CEF 1	24.83	25.12	24.98	27.10	27.42	27.26	2.29
CEF 2	25.63	25.96	25.80	29.47	29.76	29.62	3.82
CEF 3	26.09	26.69	26.39	26.83	26.94	26.89	0.49
FOS 1	24.97	25.08	25.03	28.23	28.06	28.15	3.12
FOS 2	23.08	23.28	23.18	23.13	22.92	23.03	-0.16
FOS 3	24.33	24.52	24.43	26.29	26.51	26.40	1.98
KLO 1	25.33	25.92	25.63	33.45	34.29	33.87	8.25
KLO 2	26.29	26.65	26.47	-	-	-	-
KLO 3	24.62	24.68	24.65	28.49	27.74	28.12	3.47
KOL 1	25.07	24.56	24.82	26.96	28.09	27.53	2.71
KOL 2	25.85	26.68	26.27	35.27	35.81	35.54	9.28
KOL 3	23.59	23.68	23.64	24.47	24.86	24.67	1.03
TOB 1	24.86	24.90	24.88	37.94	40.00	38.97	14.09
TOB 2	24.46	24.49	24.48	25.06	25.20	25.13	0.65
TOB 3	24.04	24.05	24.05	24.87	25.04	24.96	0.91

Tabell V.2.19 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *N/A*. Rader markert i grønt viser kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.18).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>N/A</i> (ABUW_1138)				ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct						
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	24.69	25.43	25.06	18.22	0.00	1.00			1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	26.73	26.79	26.76	20.03	0.00	1.00			1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	23.51	23.68	23.60	15.51	0.00	1.00			1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	24.83	25.12	24.98	18.20	-0.02	1.01			1.01
CEF 2	6.81	-	6.81	25.63	25.96	25.80	18.99	-1.04	2.06			2.06
CEF 3	8.46	8.46	8.46	26.09	26.69	26.39	17.93	2.42	0.19	-5.35		-5.35
FOS 1	6.63	7.12	6.88	24.97	25.08	25.03	18.15	-0.07	1.05			1.05
FOS 2	6.85	6.75	6.80	23.08	23.28	23.18	16.38	-3.65	12.55			12.55
FOS 3	7.22	7.64	7.43	24.33	24.52	24.43	17.00	1.49	0.36	-2.80		-2.80
KLO 1	6.65	6.47	6.56	25.33	25.92	25.63	19.07	0.85	0.55	-1.80		-1.80
KLO 2	8.12	8.18	8.15	26.29	26.65	26.47	18.32	-1.71	3.27			3.27
KLO 3	6.60	7.40	7.00	24.62	24.68	24.65	17.65	2.14	0.23	-4.41		-4.41
KOL 1	7.06	7.16	7.11	25.07	24.56	24.82	17.71	-0.51	1.42			1.42
KOL 2	5.00	7.07	6.04	25.85	26.68	26.27	20.23	0.20	0.87	-1.15		-1.15
KOL 3	6.54	6.70	6.62	23.59	23.68	23.64	17.02	1.51	0.35	-2.84		-2.84
TOB 1	6.65	6.80	6.73	24.86	24.90	24.88	18.16	-0.06	1.04			1.04
TOB 2	6.55	6.00	6.28	24.46	24.49	24.48	18.20	-1.83	3.56			3.56
TOB 3	6.92	6.92	6.92	24.04	24.05	24.05	17.13	1.62	0.33	-3.06		-3.06

Tabell V.2.20 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *ydaM_1*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner.

<i>ydaM_1</i> (ABUW_3178)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	25.86	25.42	25.64	28.92	29.74	29.33	3.69
U/AB 2	26.84	26.84	26.84	26.57	26.77	26.67	-0.17
U/AB 3	24.55	23.94	24.25	23.70	24.69	24.20	-0.05
CEF 1	27.83	26.77	27.30	26.88	27.15	27.02	-0.28
CEF 2	25.54	27.81	26.68	29.66	29.56	29.61	2.94
CEF 3	26.97	26.83	26.90	26.71	26.75	26.73	-0.17
FOS 1	27.28	26.86	27.07	27.63	28.00	27.82	0.74
FOS 2	23.11	23.21	23.16	23.61	23.20	23.41	0.25
FOS 3	25.08	25.73	25.41	26.03	26.44	26.24	0.83
KLO 1	27.86	27.42	27.64	33.22	33.22	33.22	5.58
KLO 2	26.91	26.49	26.70	-	-	-	-
KLO 3	24.76	25.14	24.95	27.66	27.93	27.80	2.85
KOL 1	25.61	25.68	25.65	27.51	27.53	27.52	1.88
KOL 2	26.21	26.23	26.22	34.08	34.07	34.08	7.86
KOL 3	23.30	23.96	23.63	24.72	24.77	24.75	1.11
TOB 1	25.01	25.43	25.22	37.19	40.00	38.60	13.38
TOB 2	24.77	24.84	24.81	25.77	25.46	25.62	0.81
TOB 3	24.27	24.69	24.48	24.95	25.10	25.03	0.54

Tabell V.2.21 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *ydaM_1*. Ingen kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.20).

Prøve	Referansegen (16s)			<i>ydaM_1</i> (ABUW_3178)			Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$-1/2^{-\Delta\Delta$ Ct}	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	25.86	25.42	25.64	18.80	0.00	1.00		1.00
U/AB 2	-	6.73	6.73	26.84	26.84	26.84	20.11	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	24.55	23.94	24.25	16.16	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	27.83	26.77	27.30	20.52	1.72	0.30	-3.31	-3.31
CEF 2	6.81	-	6.81	25.54	27.81	26.68	19.87	-0.25	1.19		1.19
CEF 3	8.46	8.46	8.46	26.97	26.83	26.90	18.44	2.28	0.21	-4.86	-4.86
FOS 1	6.63	7.12	6.88	27.28	26.86	27.07	20.20	1.40	0.38	-2.64	-2.64
FOS 2	6.85	6.75	6.80	23.11	23.21	23.16	16.36	-3.75	13.45		13.45
FOS 3	7.22	7.64	7.43	25.08	25.73	25.41	17.98	1.82	0.28	-3.52	-3.52
KLO 1	6.65	6.47	6.56	27.86	27.42	27.64	21.08	2.29	0.21	-4.87	-4.87
KLO 2	8.12	8.18	8.15	26.91	26.49	26.70	18.55	-1.56	2.95		2.95
KLO 3	6.60	7.40	7.00	24.76	25.14	24.95	17.95	1.79	0.29	-3.46	-3.46
KOL 1	7.06	7.16	7.11	25.61	25.68	25.65	18.54	-0.26	1.20		1.20
KOL 2	5.00	7.07	6.04	26.21	26.23	26.22	20.19	0.07	0.95	-1.05	-1.05
KOL 3	6.54	6.70	6.62	23.30	23.96	23.63	17.01	0.85	0.55	-1.80	-1.80
TOB 1	6.65	6.80	6.73	25.01	25.43	25.22	18.50	-0.30	1.23		1.23
TOB 2	6.55	6.00	6.28	24.77	24.84	24.81	18.53	-1.58	2.99		2.99
TOB 3	6.92	6.92	6.92	24.27	24.69	24.48	17.56	1.40	0.38	-2.64	-2.64

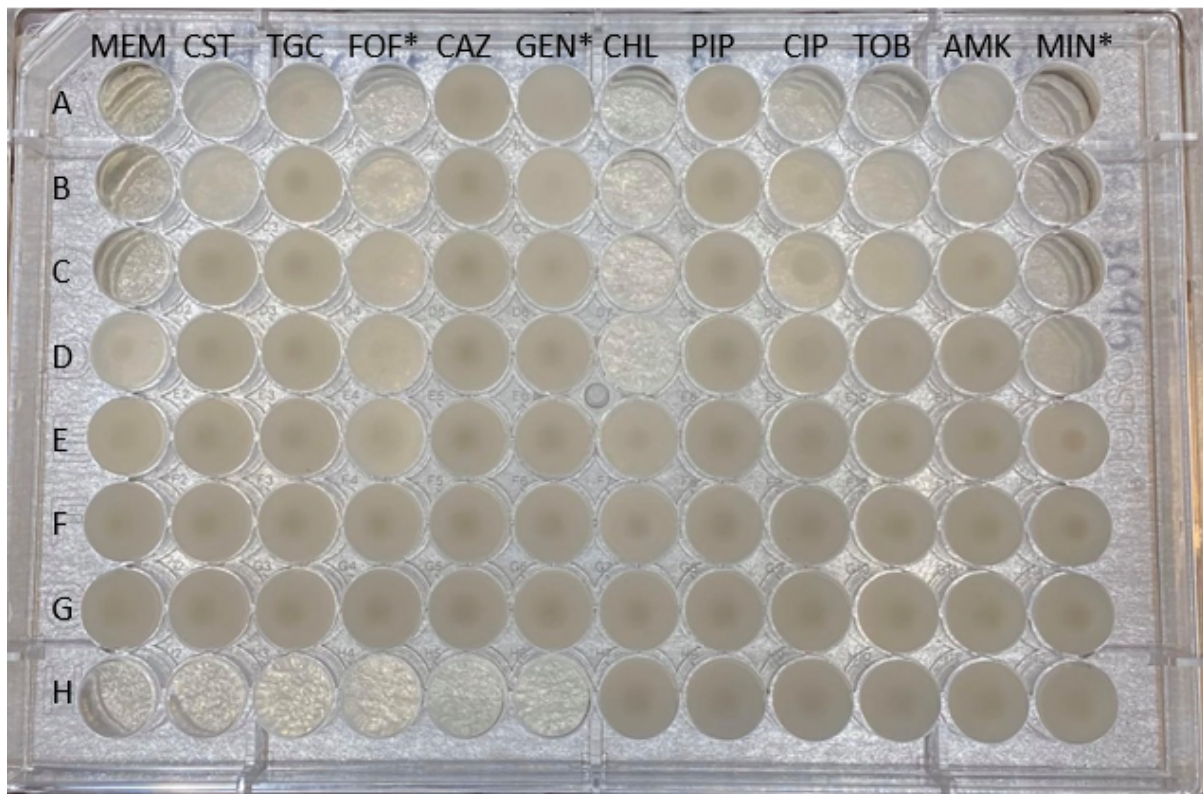
Tabell V.2.22 Beregning av antall sykler forskjell mellom -RT og +RT reaksjoner i qPCR for *A. baumannii* ATCC 17978 med rådata (Ct-verdier) for målgenet *N/A*. Rader markert i grønt viser hvilken prøve og biologiske replikat (1 = biologisk replikat 1 etc.) som har > 4 sykler i forskjell mellom -RT og + RT reaksjoner.

<i>N/A</i> (ABUW_2824)							Antall sykler forskjell (mellom -RT og +RT reaksjoner)
Prøve	+RT1	+RT2	gj.snitt +RT	-RT1	-RT2	gj.snitt -RT	
U/AB 1	24.51	26.81	25.66	29.10	29.17	29.14	3.48
U/AB 2	26.54	26.02	26.28	26.63	26.64	26.64	0.35
U/AB 3	23.27	23.49	23.38	23.59	23.79	23.69	0.31
CEF 1	25.06	25.00	25.03	27.05	27.25	27.15	2.12
CEF 2	24.09	24.24	24.17	29.48	29.85	29.67	5.50
CEF 3	25.98	26.34	26.16	26.61	26.86	26.74	0.57
FOS 1	28.01	-	28.01	27.92	28.05	27.99	-0.03
FOS 2	22.68	22.63	22.66	23.23	22.82	23.03	0.37
FOS 3	23.82	24.86	24.34	26.01	26.05	26.03	1.69
KLO 1	28.20	28.10	28.15	32.83	33.56	33.20	5.05
KLO 2	24.64	24.47	24.56	-	-	-	-
KLO 3	24.33	24.49	24.41	27.72	27.66	27.69	3.28
KOL 1	28.78	25.94	27.36	26.91	27.68	27.30	-0.06
KOL 2	24.91	23.96	24.44	33.67	36.39	35.03	10.60
KOL 3	23.09	23.33	23.21	24.26	24.14	24.20	0.99
TOB 1	25.06	24.75	24.91	36.75	35.00	35.88	10.97
TOB 2	24.07	24.07	24.07	25.00	25.14	25.07	1.00
TOB 3	24.54	23.88	24.21	24.77	24.91	24.84	0.63

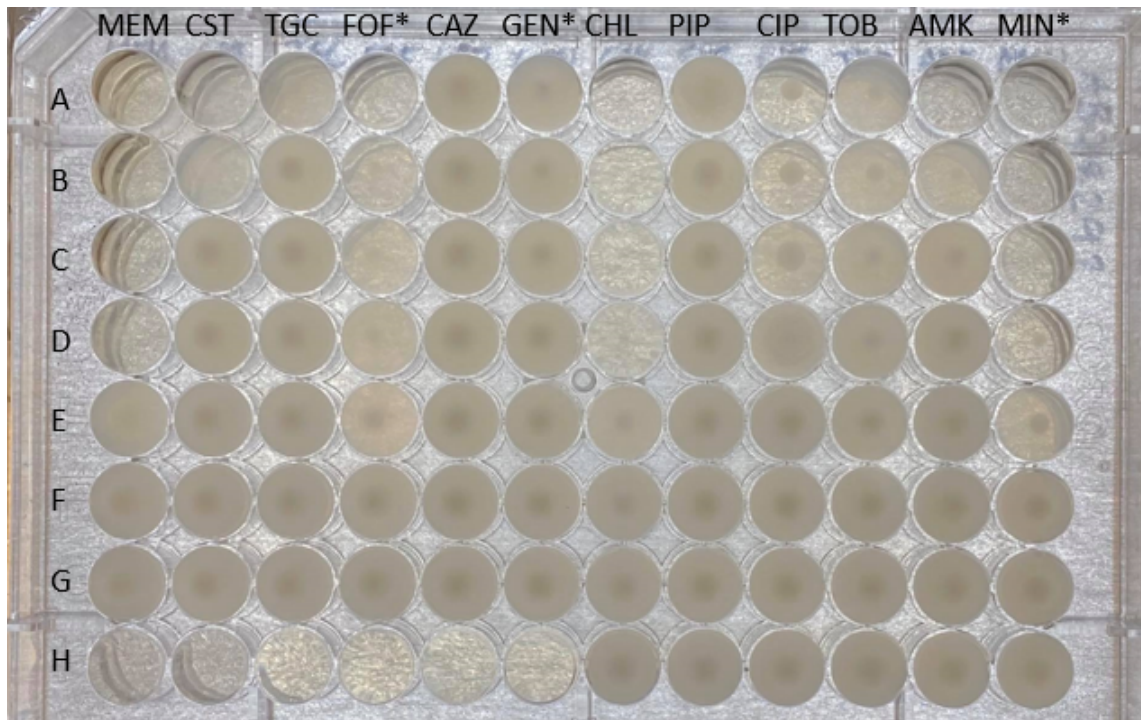
Tabell V.2.23 Beregning av fold change (FC) verdier ved å sammenlikne Ct-verdier (rådata) for behandlet prøve (antibiotika-eksponering) med kontrollprøve (ubehandlet) for *A. baumannii* ATCC 17978 for målgenet *N/A*. Ingen kontrollprøve og behandlede prøver fra samme biologiske replikat med FC-verdier der antall sykler mellom +RT og -RT reaksjoner > 4 sykler (basert på tabell V.2.22).

Prøve	Referanseggen (16s)			<i>N/A</i> (ABUW_2824)			Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$-1/2^{-\Delta\Delta$ Ct}	FC-verdi
	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct	+RT1	+RT2	gj.snitt Ct					
U/AB 1	7.17	6.52	6.85	24.51	26.81	25.66	18.82	0.00	1.00		1.00
U/AB 2		6.73	6.73	26.54	26.02	26.28	19.55	0.00	1.00		1.00
U/AB 3	8.04	8.13	8.09	23.27	23.49	23.38	15.30	0.00	1.00		1.00
CEF 1	6.80	6.76	6.78	25.06	25.00	25.03	18.25	-0.57	1.48		1.48
CEF 2	6.81		6.81	24.09	24.24	24.17	17.36	-2.20	4.58		4.58
CEF 3	8.46	8.46	8.46	25.98	26.34	26.16	17.70	2.41	0.19	-5.30	-5.30
FOS 1	6.63	7.12	6.88	28.01		28.01	21.14	2.32	0.20	-4.99	-4.99
FOS 2	6.85	6.75	6.80	22.68	22.63	22.66	15.86	-3.70	12.95		12.95
FOS 3	7.22	7.64	7.43	23.82	24.86	24.34	16.91	1.62	0.33	-3.06	-3.06
KLO 1	6.65	6.47	6.56	28.20	28.10	28.15	21.59	2.78	0.15	-6.84	-6.84
KLO 2	8.12	8.18	8.15	24.64	24.47	24.56	16.41	-3.15	8.85		8.85
KLO 3	6.60	7.40	7.00	24.33	24.49	24.41	17.41	2.12	0.23	-4.33	-4.33
KOL 1	7.06	7.16	7.11	28.78	25.94	27.36	20.25	1.44	0.37	-2.70	-2.70
KOL 2	5.00	7.07	6.04	24.91	23.96	24.44	18.40	-1.15	2.22		2.22
KOL 3	6.54	6.70	6.62	23.09	23.33	23.21	16.59	1.30	0.41	-2.45	-2.45
TOB 1	6.65	6.80	6.73	25.06	24.75	24.91	18.18	-0.64	1.55		1.55
TOB 2	6.55	6.00	6.28	24.07	24.07	24.07	17.80	-1.76	3.38		3.38
TOB 3	6.92	6.92	6.92	24.54	23.88	24.21	17.29	2.00	0.25	-3.99	-3.99

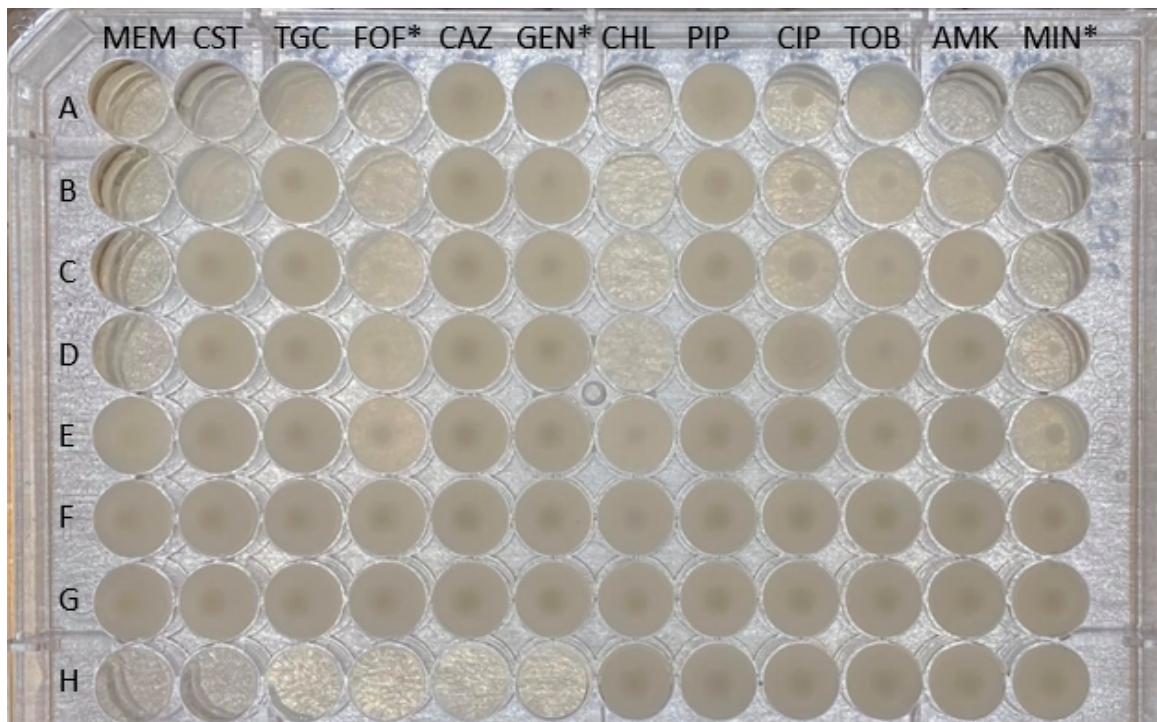
Vedlegg 3



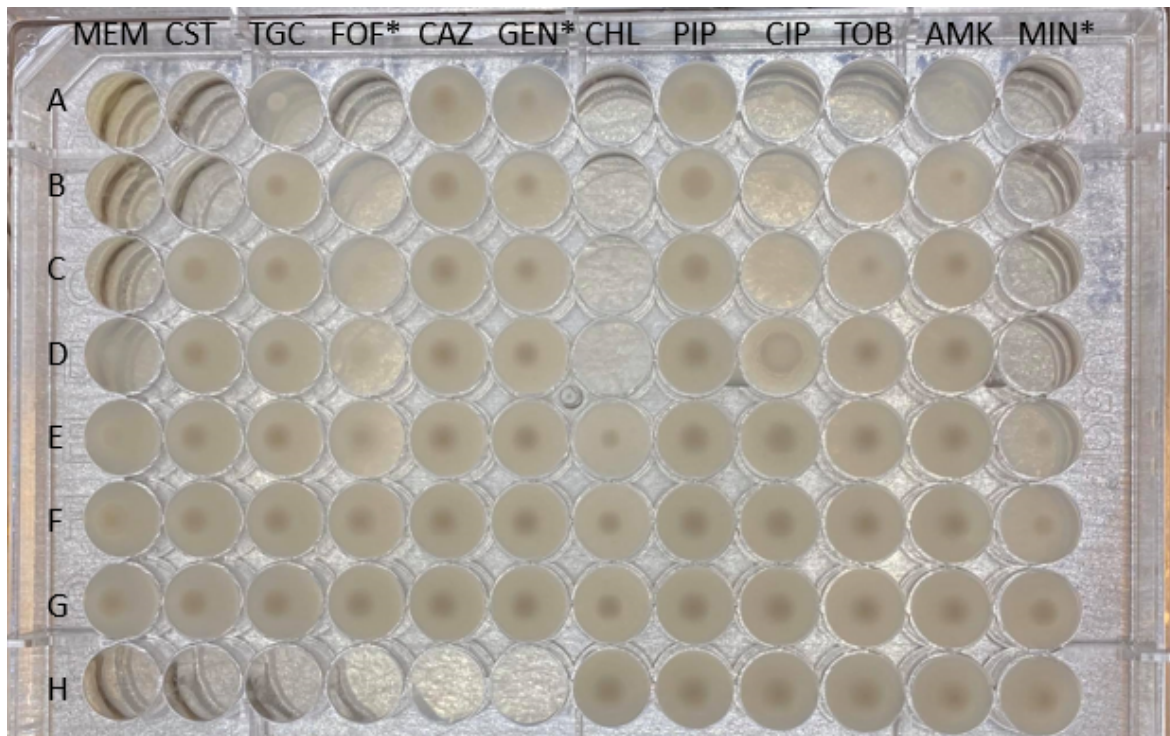
Figur 4.6.1 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet ABUW_1138. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyklin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



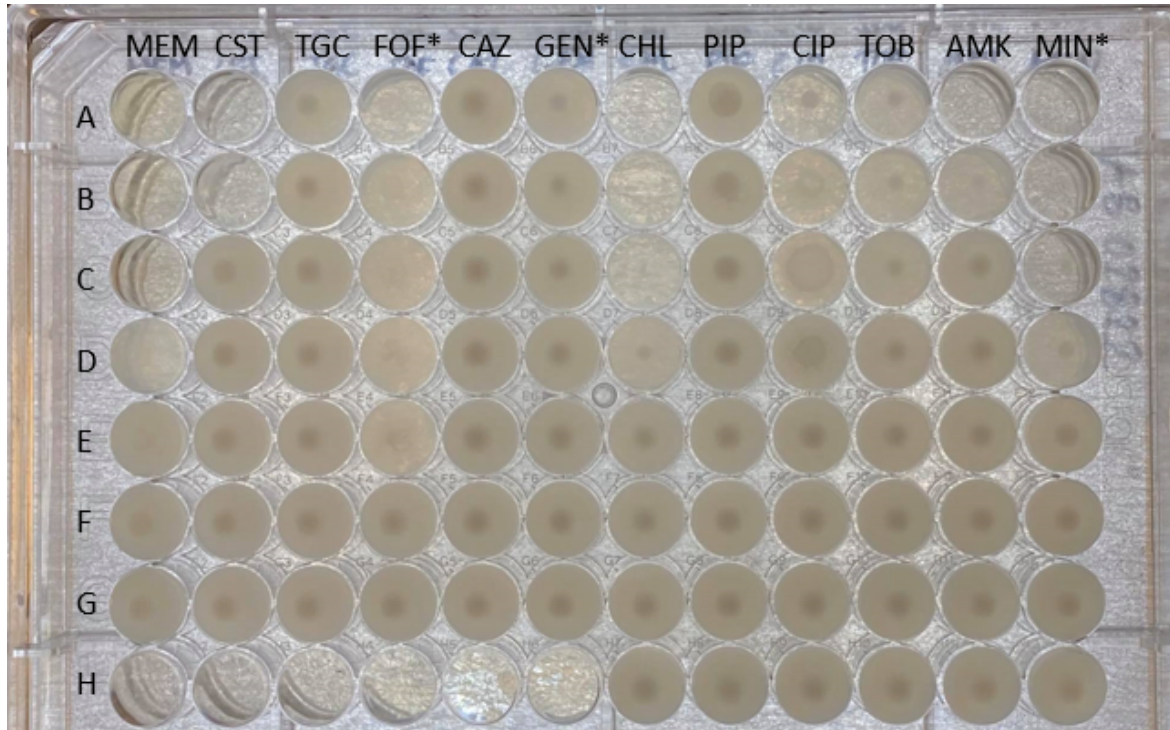
Figur 4.6.2 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i gen ABUW_3178. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



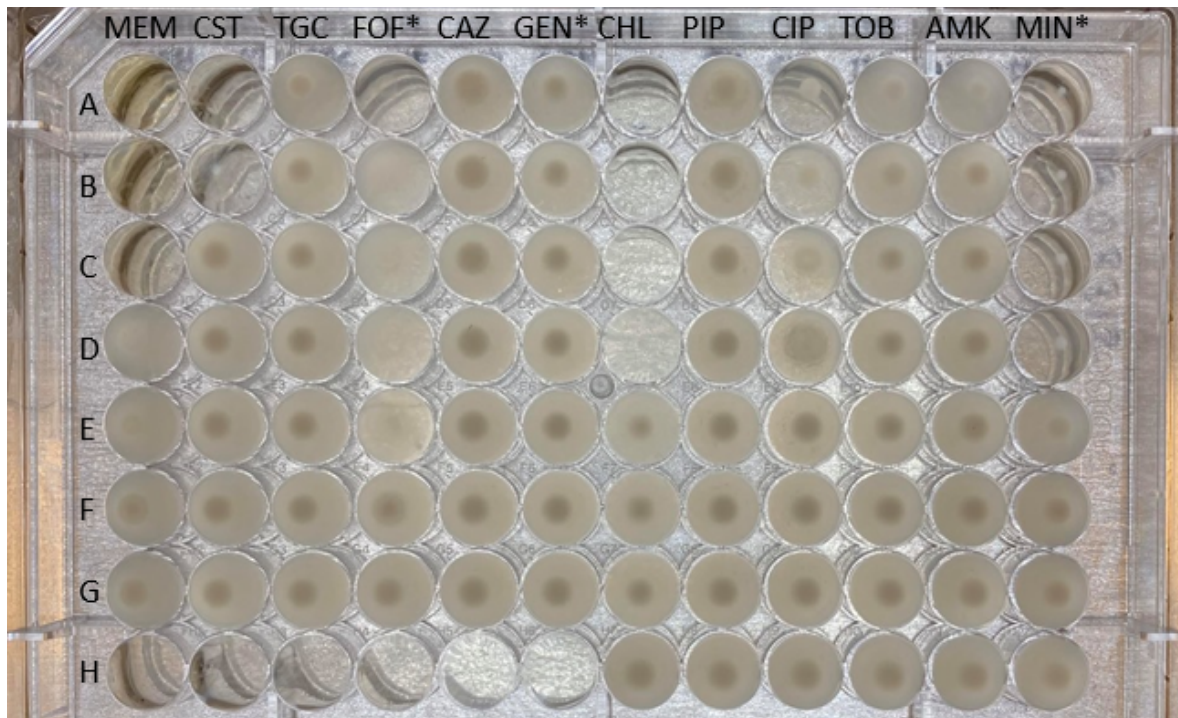
Figur 4.6.3 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i gen ABUW_0188. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



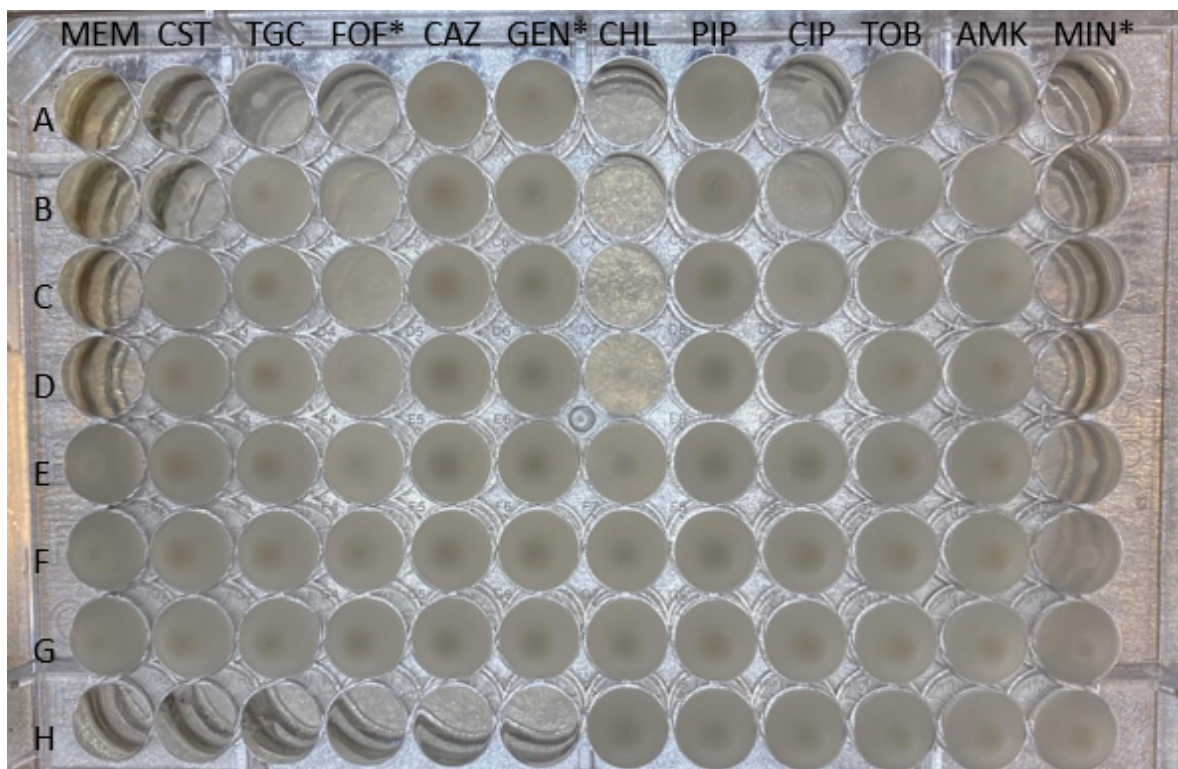
Figur 4.6.4 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insertjonsmutant i gen ABUW_0506. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



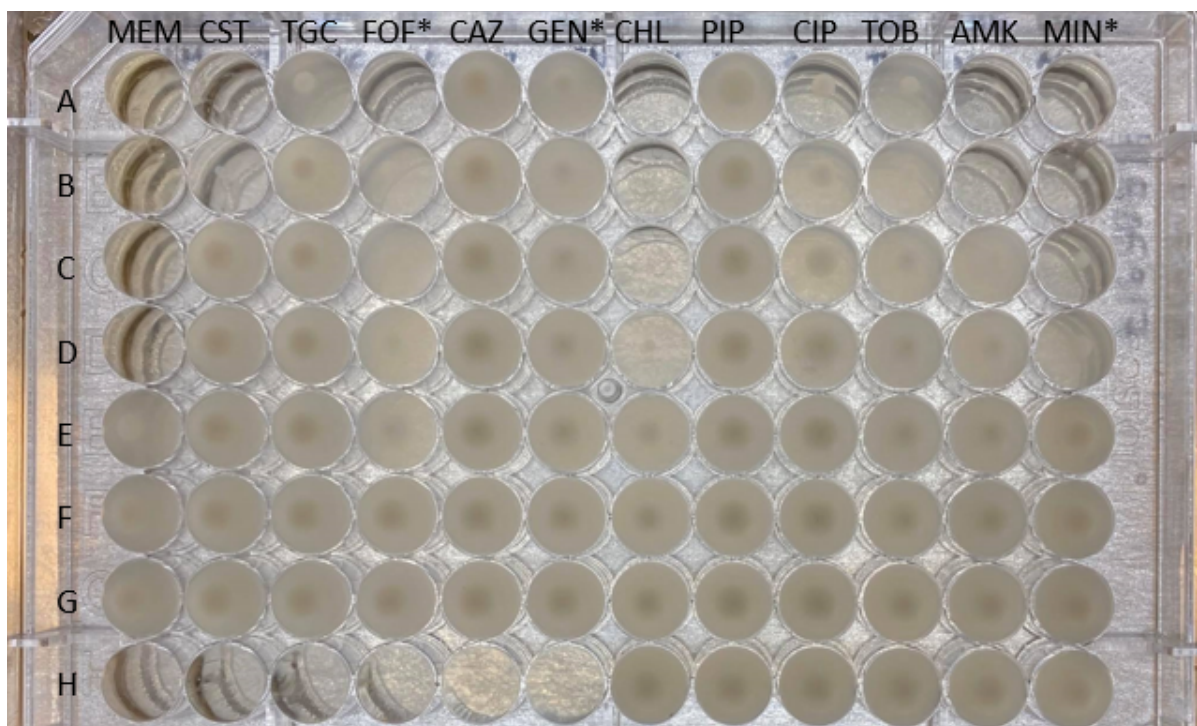
Figur 4.6.5 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insertjonsmutant i gen ABUW_1045. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



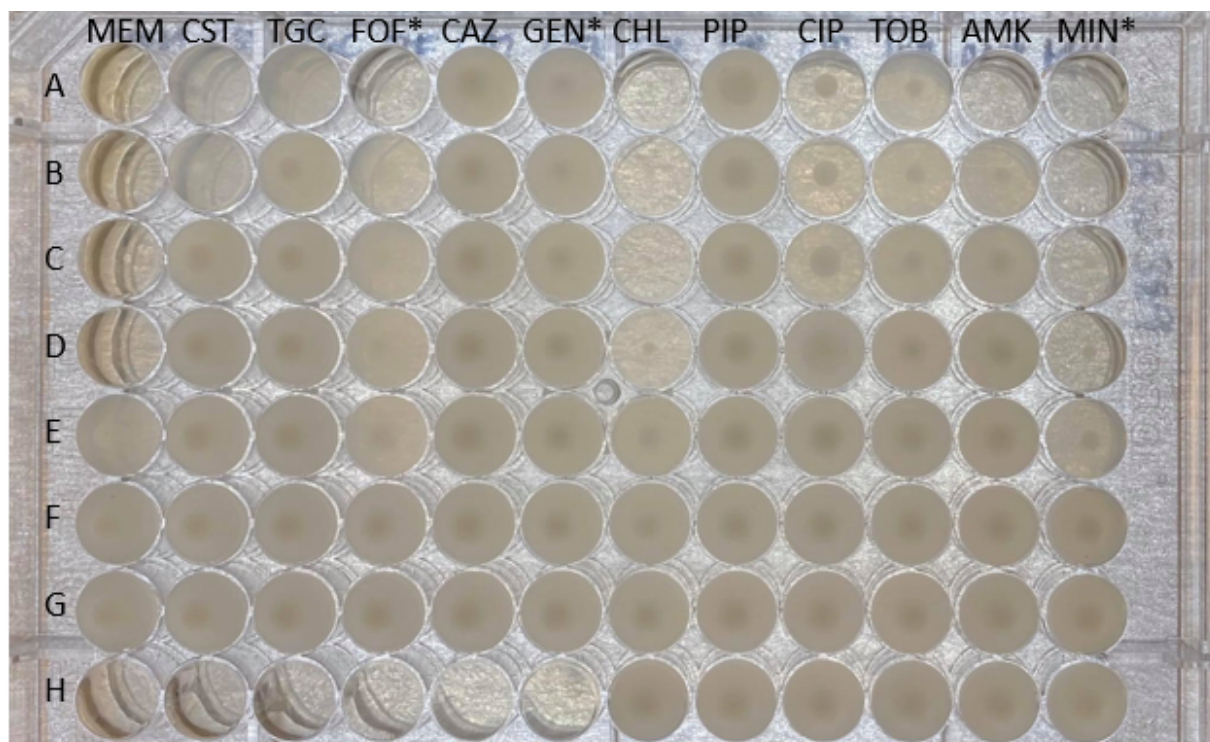
Figur 4.6.6 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i gen ABUW_1221. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyklin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



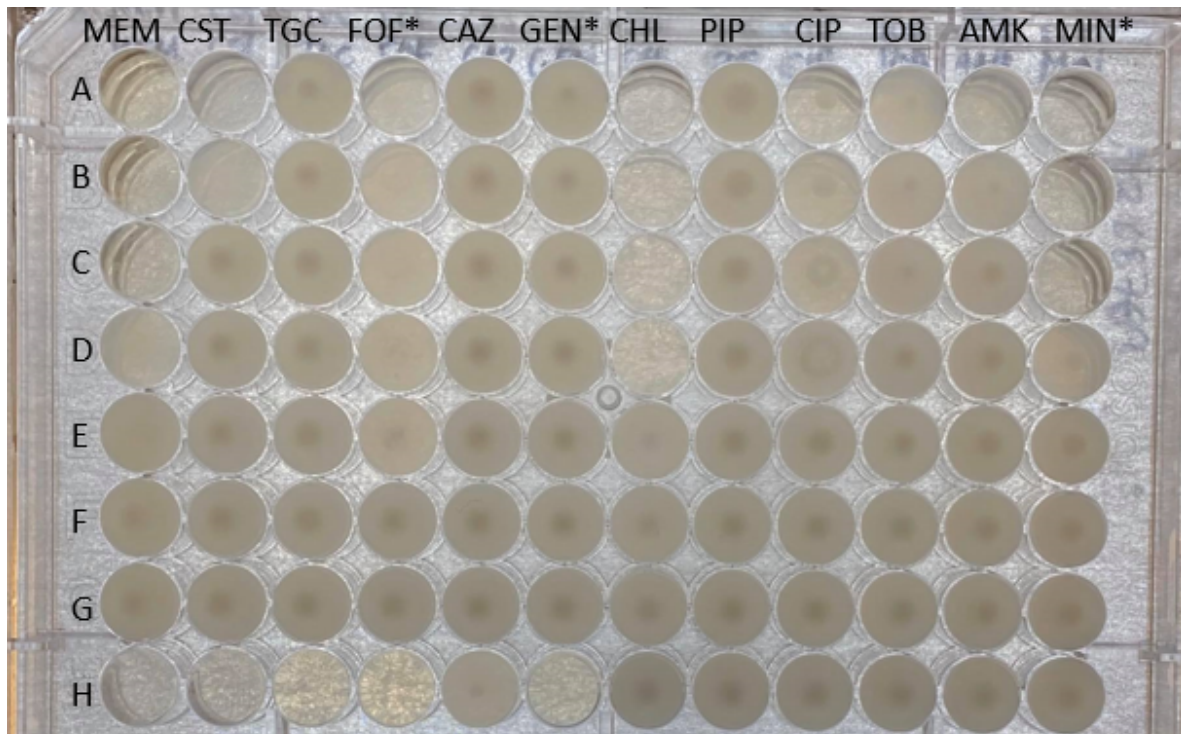
Figur 4.6.7 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i gen ABUW_1764. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyklin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



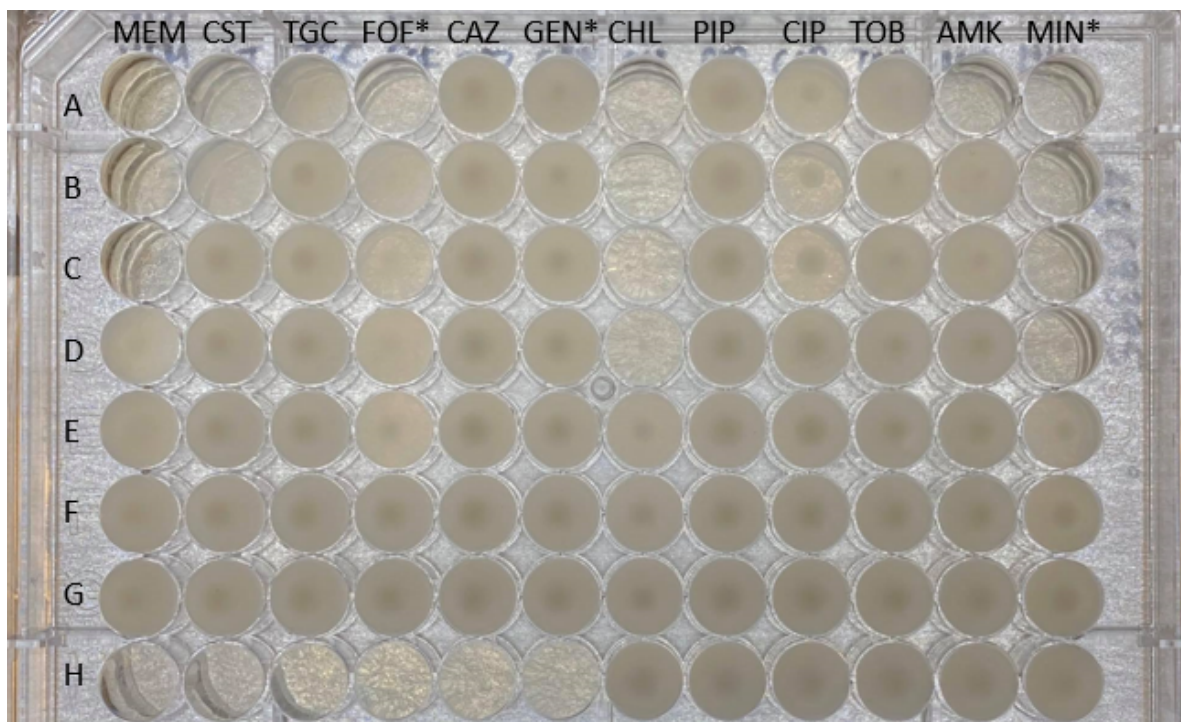
Figur 4.6.8 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genen ABUW_2255. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyklin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



Figur 4.6.9 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genen ABUW_0137. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyklin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



Figur 4.6.10 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet ABUW_3354. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.



Figur 4.6.11 Bilde av MIC resultater for *A. baumannii* AB5075-UW transposon insersjonsmutant i genet ABUW_2824. MEM = meropenem, CST = kolistin, TGC = tigecyklin, FOF = fosfomycin, CAZ = ceftazidim, GEN = gentamicin, CHL = kloramfenikol, PIP = piperacillin, CIP = ciprofloksacin, TOB = tobramycin, AMK = amikacin, MIN = minocyclin. *Konsentrasjonsintervallet er hentet fra annen MDR-stamme for gitt antibiotikum.

