



Uit

NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET

Institutt for farmasi

## Reverserbarheten av antibiotikaresistens

*Evolusjonære prinsipper for antimikrobiell resistens og reverserbarhet  
– en oversikt basert på oppdatert tilgjengelig litteratur*

—  
**Åmund Hansen**

*Masteroppgave i farmasi – Mars 2014*





## **Forord**

Denne oppgaven ble muliggjort med stor støtte fra mange dyktige personer som arbeider i tilknytning UiT, deriblant annet flere utmerkede veiledere, mentorer og venner. Særs vil jeg rette min takknemlighet til professor Pål Jarle Johnsen for tålmodighet og entusiasme gjennom hele den tiden av det som skulle bli oppgavens første fase, som ga meg en introduksjon til en særs viktig problemstilling, og et spennende fagfelt i rask utvikling. Videre vil jeg takke dr. Irina Starikova for teoretisk og praktisk veiledning, og brobyggende mentorarbeid. Takknemlighet går ut til øvrige medlemmer av forskningsgruppen i Mikrobiologi og molekylær- og farmakoepidemiologi (MMPE) som gjør hverdagen inspirerende og trivelig, og ikke minst til alle medstudenter på IFA. Professor Kaare Magne Nielsen er jeg en stor takk skyldig for konsekvente bidrag i form alltid like hyggelige, effektive gjennomlesninger av oppgaven, med gode faglig konstruktive samtaler og korrespondanse gjennom siste halvdel av skriveprosessen. Maja Kirkerød vil jeg takke for bidragene til figurene brukt i oppgaven. Ellers stor takk til min fantastiske familie som omgir meg med uvurderlig støtte, hvert sekund, hele året.

Takk til Thrina Loennechen, Janne Erikke Mjelle og Andreas Robertsen, IFA, for administrering og koordinering av instituttets ressurser gjennom studietiden.

## Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste over forkortelser</b> .....	<b>7</b>
<b>Antibiotika: naturlige funksjoner – medisinsk nytte</b> .....	<b>10</b>
<b>Antibiotikaresistens – kostbart og dødelig</b> .....	<b>14</b>
Konsekvenser av resistens: rekvirentenes perspektiv .....	14
Pasientens perspektiv .....	14
Legemiddelindustrien .....	15
Helseforetak .....	15
Det globale samfunnsperspektivet .....	16
<b>Antimikrobiell resistens</b> .....	<b>17</b>
<b>Mikrobiologisk definisjon av resistens</b> .....	<b>17</b>
<b>Klinisk tredeling – sensitiv, intermediær eller resistent</b> .....	<b>17</b>
<b>Klinisk antimikrobiell terapi og infeksjonsbehandling</b> .....	<b>18</b>
Farmakodynamiske sider ved antibiotikabehandling .....	18
<b>Farmakodynamiske interaksjoner som selekterer mot resistens</b> .....	19
Variasjoner i behandlingens effektivitet .....	21
<b>De tre kategoriene av resistens</b> .....	<b>21</b>
Iboende resistens .....	21
Ervervet resistens .....	22
<b>Bakterien kan erverve resistens på to måter</b> .....	22
Resistens ervervet gjennom mutasjoner .....	22
<i>Mutasjonsrate</i> .....	23
<i>Endringer i mutasjonsrater</i> .....	24
<i>Reversering av kromosomale resistensmutasjoner</i> .....	25
<i>Forskjellige typer mutasjoner</i> .....	28
<b>Baseparforandringer</b> .....	28
<b>Duplikasjonsmutasjoner</b> .....	30
<b>Frameshift mutasjoner</b> .....	31
<b>Delesjonsmutasjoner</b> .....	31
<b>Inversjonsmutasjoner</b> .....	32
<i>Insertion mutasjoner</i> .....	32
<b>Suppresjon av mutasjon</b> .....	32
Horisontal genoverføring .....	33
<i>Transformasjon</i> .....	35
<i>Konjugering og transduksjon</i> .....	36
<i>Ivaretakelse av horisontalt overførte gener</i> .....	41
<b>Prevalens av antibiotikaresistente bakterier i humanpopulasjoner</b> .....	<b>44</b>
Eksperimentelle modeller for stabilitet av resistens i bakteriepopulasjoner .....	45
Retrospektive undersøkelser av stabilitet av resistens .....	46
Prospektive studiedesign for undersøkelse av reversering av resistens .....	47
<b>Økt reduksjon i resistensfrekvens uten endret seleksjon</b> .....	48
<b>Kryssresistens, genetisk sammenkobling og samseleksjon</b> .....	<b>48</b>
<b>Økoskygge</b> .....	<b>49</b>
Antibiotikaforurensning .....	50
Forurensning med resistensgen .....	52
<b>Ikke-arvelig resistens</b> .....	<b>52</b>
Adaptiv resistens .....	54

<b>Molekylære resistensmekanismer .....</b>	<b>55</b>
Endrede målstrukturer som minsker påvirkningen av antibiotika .....	55
Molekylær beskyttelse av målstruktur .....	58
Bypass av hindret metabolismevei .....	58
Enzymatisk nedbrytning av antibiotika .....	59
<b><i>β-laktamaser</i></b> .....	59
<b>Aminoglykosidmodifiserende enzym</b> .....	59
<b>Makrolid, linkosamid og streptogramin (MLS) inaktiverende enzym</b> .....	59
<b>Kloramfenikol</b> .....	60
<b>Tetrasyklin</b> .....	60
<b>Fluoroquinolon</b> .....	60
Redusert permeabilitet og mindre opptak av antibiotika .....	60
Efflukssystemer .....	62
<b>Mutasjoner i efflukssystemer som gir antibiotikaresistens</b> .....	63
<b>Variasjonen i reverserbarhet avhenger av resistensmekanisme.....</b>	<b>64</b>
<b>Spontan sensitivering</b> .....	<b>64</b>
<b>Direkte intervensjoner som øker reversering</b> .....	<b>65</b>
<b>Indusert fenotypisk reversering</b> .....	<b>66</b>
<b>Ulike virkemidler for å begrense nivået av antibiotikaresistens.....</b>	<b>67</b>
Mindre antibiotikabruk og intervensjoner på samfunnsplanet .....	67
Raske og presise diagnostiske verktøy for infeksjoner .....	69
<b>En rekke cellulære bakterielle strukturer er identifisert som mulige legemiddelmål. 70</b>	<b>70</b>
Bakterielle virulensmekanismer som målstruktur .....	70
Mål om å interferere med bakteriell quorum sensing .....	71
Biofilmer som målstruktur .....	71
Populasjonsendring ved infiltrering av en modifisert ”Trojansk” bakterie.....	72
Modifiserte oppsøkende ”pathogen-killers” .....	72
<b>Nye legemidler med antimikrobiell effekt.....</b>	<b>73</b>
Antimikrobielle peptider .....	73
tRNA syntetase hemmere .....	75
<b>Oppsummering .....</b>	<b>76</b>
<b>Kilder .....</b>	<b>79</b>



## Sammendrag

En urovekkende økning i resistensfrekvens, kombinert med færre lanseringer av nye antibiotika i senere tid, har gjort undersøkelser av reverseringsmuligheter for antibiotikaresistens mer aktuelt. Antibiotikaresistens kan forsvinne fra en resistent bakteriepopulasjon, og identifikasjonen av hvilke faktorer som påvirker hastigheten til denne prosessen er viktig for design av intervensjoner som framskynder økning i antibiotikafølsomhet. I denne oppgaven er reverserbarheten av antibiotikaresistens drøftet på bakgrunn av et utvalg tilgjengelig litteratur.

Ved å se på reverseringsmuligheter på flere nivå, fra molekylærgenetiske mekanismer og genetiske plattformer, til enkeltbakterier og bakteriepopulasjoner i forskjellige økotyper er en av målsetningene å gi en oppdatert oversikt over ulikheter i resistensmekanismer og reverserbarhet som kan danne en basis for videre studier. Komplementært til biologiske sykdomsmekanismer, er prinsipper for reversering på et samfunnsnivå og en skissering av muligheter for indirekte intervensjoner på samfunnsplanet tatt med. Farmakologiske intervensjoner som målrettet reduserer resistens og mulige nye terapistrategier basert på mer fininnstilte modifikasjoner av de intrikate samspillene mellom bakterier og mennesker er en noe av det man kan vente seg mer av fra legemiddelindustrien i tiden framover. Kvantitative beregninger er inkludert så langt det er praktisk gjennomførbart. Modeller som i økende grad tar høyde for kompleksiteten i interaksjonene mellom bakterielle samfunn og mennesker/samfunn er primært deskriptive, men kan bidra til å gi gode rammer for brukbare kvantitative modeller, som avhenger av identifisering av konfunderende faktorer og mulig bias. Kvantitative modeller kan gi svar på noen av de mest interessante sidene i et lengre folkehelseperspektiv. To typer system for resistensdynamikk er beskrevet, avhengig av hvor mye migrasjon mellom bakteriepopulasjoner man kan regne med. I et lukket system (med lite migrasjon) blir endringen av andelen resistente bakterier over tid avgjort av mengden antibiotikabruk og seleksjon (konkurransedyktighet med og uten antibiotikaeksponering.) Genetisk samseleksjon av ubeslektede resistensmekanismer kan gjøre at resistens forblir i en populasjon, selv uten et direkte seleksjonspress. Der man forventer saktevirkende endringer i lukkede system, kan åpne system endres mye raskere, siden endringene her påvirkes primært av resistensprofilen til de bakterier som tilføres populasjonen. Reverserbarhet av antibiotikaresistens kan slik sees fra ulike teoretiske ståsted, og gitt viktigheten av antibiotikaterapi i humanmedisin, forblir utfordringen å finne gode og pragmatiske løsninger for velferd og sikkerhet.

## Liste over forkortelser

3'CS	–	class 1 integrons 3' conserved region
A	–	adenin
ABC	–	ATP-binding cassette family
AHL	–	acyl homoserine lactone
AMP	–	antimikrobielle peptider
ATP	–	adenosine triphosphate
AUC	–	areal under kurve. integralet av konsentrasjon-tid funksjonen
bp	–	basepar
CFU	–	colony forming unit
DHA	–	drug-proton antiporters
DHPS	–	dihydropteroate synthase
dsDNA	–	double stranded DNA
Dtr	–	DNA transfer and replication
dTTP	–	thymidine triphosphate
DUS	–	DNA uptake sequence
<i>erm</i>	–	erythromycin resistens metylase / erythromycin ribosome metylering
EF-Tu	–	elongation factor Tu
EFG	–	elongation factor G
EPS	–	exopolysakkarider
G	–	guanin
GO	–	8-oxoG (7,8-dihydro-8-oxoguanine)
GGI	–	gonococcal genetic island
GØ	–	genetisk øy
HFDIR	–	homologifasilitert dobbelte ikke-homologe/illegitimete rekombinasjon
HFIR	–	homologifasilitert ikke-homolog/illegitimete rekombinasjon
HR	–	homolog rekombinasjon
IS	–	insertion sequence element
ICE	–	integrative konjugative element
MATE	–	the multidrug and toxic compound extrusion family
MBC	–	minimal bactericidal concentration
MDR	–	multidrug resistance
MFP	–	membrane fusion protein
MFS	–	the major facilitator superfamily
MGE	–	mobile genetiske element
MIC	–	minimal inhibitory concentration
MLS	–	makrolid, linkosamid og streptogramin
MLSK	–	makrolid, linkosamid, streptogramin og ketolid
MMR	–	mismatch-repair
Mpf	–	mating pair formation
MRSA	–	methicillin/ multiresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
PABA	–	para-amino benzoic acid
PAE	–	post antibiotisk effekt
PAI	–	patogenisitetøy
PaSH	–	Persists as Stuff Happens
PBP	–	penicillin bindende protein
PD	–	farmakodynamikk
PK	–	farmakokinetikk
PMF	–	proton motive force



PSK	–	post-segregational killing (plasmid addiction system)
QAC	–	kvarternære ammoniumforbindelser
QS	–	quorum sensing
R-M system	–	restriksjons-modifikasjons system
RF	–	release factors
REP	–	repeated extragenic palindromic element
RNAP	–	RNA polymerase
RND	–	the resistance-nodulation-cell division superfamily
SMR	–	small multidrug resistance family
SSB	–	single stranded binding proteins
ssDNA	–	single stranded DNA
sub-MIC	–	subinhibitorisk
T-A	–	toksin-antitoksin
THF	–	tetrahydrofolsyre
USS	–	uptake signal sequence



## Antibiotika: naturlige funksjoner – medisinsk nytte

Historisk sett har infeksjonskontroll utgjort et enormt bidrag til menneskehetens velferd. En følge av tilgjengeligheten av muligheter til å kurere infeksjoner er at forventet levealder har økt betraktelig [1, 2]. I tiden før det fantes antibiotika til behandling av sykdom, var sjansen for å dø en tidlig død, forårsaket av infeksjoner opp mot 40 % [3] og lidelsene knyttet til vansirende infeksjoner var store. Fram til i dag er fortsatt infeksjonssykdommer den største årsaken for barnedødelighet [4] og den nest største årsaken til død, globalt sett [5]. Disse tallene settes gjerne i sammenheng med fortsatt utilstrekkelig tilgjengelighet til brukbare antibiotika i mange deler av verden, men problemet vil bare forverres ytterlig dersom resistens medfører manglende effekt av de legemidlene som er i markedet i dag. Uten nye innovasjoner kan vi risikere å gå tom for behandlingsalternativer.

Vitenskapelige paradigmeendringer som en følge av nye muligheter å ”se” verden, er ikke uvanlig etter at teknologiske nyvinninger har gitt tilgang til skjulte data. Mikroorganismer ble først observert på 1600-tallet ved hjelp av bedre glasslinser, som satt sammen til et mikroskop ga Anton van Leeuwenhoek [6] nok forstørrelse til å titte inn til den ellers skjulte verdenen, bebodd av ”animalcules” ellers kjent i dag som mikroorganismer. Formuleringen av teorien om at celler er biologiske enheter virket som en dynamo for utviklingen av den gryende vitenskapen mikrobiologi. Paradigmeendringen som celleteorien<sup>1</sup> [6] medførte ble mer og mer akseptert i takt med den økte utbredelsen av bedre mikroskop. Kochs postulater gir kriterier for å utelukke tilfeldig tilstedeværelse [7] av en antatt sykdomsfremkallende, parasittisk organisme. Ikke alle infeksjonssykdommer kan fylle kriteriene i Kochs postulater, og flere revideringer er blitt gjort av blant annet Dr. Thomas Rivers og Dr. Robert J. Huebner [7], som i tillegg også vektlegger andre kilder til informasjon, blant annet epidemiologiske data og muligheter for tilpasse modeller for spesielle infeksjøsse agens. Årsakssammenhengene kan være vanskelig å påvise dersom eksponering og sykdom ligger langt fra hverandre i tid. I tillegg til infeksjoner med virus eller prioner som vanskelig kan isoleres og dyrkes i renkultur er det også faglige utfordringer med å kartlegge enkelte bakterielle infeksjoners roller i sykdom, eksempelvis borreliose som er debattert flittig i media.

Utover 1800 – tallet ble flere av grunnpilarene i medisinsk mikrobiologi støpt. Jacob Henle og Robert Koch utviklet tidlige konsept for å stadfeste hvorvidt det eksisterer kausale

---

<sup>1</sup> Ordet celle ble brukt som biologisk betegnelse først av Robert Hooke i ’Micrographia’ utgitt i løpet av siste halvdel av 1600-tallet.

sammenhenger mellom en antatt sykdomsfremkallende bakterie og den aktuelle sykdommen [8]. Andre pionerer fra 1800 – tallet inkluderer skikkelser som Louis Pasteur. Han gjorde banebrytende arbeid med de første kjente vaksinene, og etablerte metoder som øker lagringsmuligheter av ferskvarer ved varmebehandling, en prosess som fortsatt peker tilbake på innovatøren: 'pasteurisering'. Ferdinand Cohn var en av Pasteurs samtidige og karakteriserte varmeresistente endosporer og den cellulære utviklingen av disse samt videreførte konseptet med at bakterier er distinkte organismer med arvelige karakteristikk [9].

Empirisk infeksjonskontroll fikk en begynnelse i 1848 da Ignaz Semmelweis tok i bruk et klorholdig desinfeksjonsmiddel for vask av hender og kirurgiske instrument [10]. Resultatene var påfallende: dødeligheten blant mødre som nettopp hadde født på sykehus, falt fra mellom 13 – 18 % og ned til 1 % , noe som til og med var sikrere enn hjemmefødsler på den tiden [11]. Med den økte forståelsen av årsakssammenhenger som resulterer i 'The Germ Theory of Disease', har antiseptiske teknikker blitt videreutviklet av blant annet Joseph Lister, som i tillegg til bidrag i mikroskopteknologi, brukte fenol til desinfeksjon i operasjonssalen fra 1860 – tallet.

Selve konseptet med kjemoterapi (: tanken på "en magisk kule" som kun ville treffe infeksjose agens) kom et skritt nærmere virkeligheten ved introduksjonen av arsphenamin, et organoarsenisk stoff syntetisert av Paul Erlich i 1907 og neoarsphenamin i 1914 [12]. Selv om det hadde mange bivirkninger, hadde det også antimikrobielle egenskaper og var dertil noe som kunne ligne en helt ny remedie blant annet for behandling av syfilis [10]. Noen tiår senere ble en nobelpris i medisin tildelt Gerhard J. P. Domagk (i 1939) for de antibakterielle sulfonamidene [13], som i dag er den eldste gruppen antimikrobielle midler som er i fortsatt bruk. Suksesshistorien med sulfonamider ble avløst av en ny fantastisk og heldig implikasjon for antimikrobiell terapi. Sir Alexander Fleming oppdaget, på en plate med stafylokokker, det som viste seg å være en soppart kalt *Penicillium notatum*, med en antagonistisk vekst. Fleming oppdaget med dette i 1928 penicillin. Sammen med Sir Howard Florey og Ernst B. Chain mottok Fleming Nobels pris i medisin i 1945 [10, 13, 14]. Tall fra folkehelseinstituttet [15] viser at penicilliner utgjør ca 42 % av det totale forbruk av systemiske antibiotika i Norge i 2011 (målt som "definerte døgndoser (DDD)/1000 innbyggere/dag" (2011)), noe som samsvarer med det globale forbruket, der  $\beta$ -laktamantibiotika (i 2002) utgjorde om lag halvparten av det estimerte totale markedet på 25 milliarder US\$ [16].

Som substantiv ble ordet 'antibiotika' først brukt av Selman A. Waksman på begynnelsen av 1940-tallet som en betegnelse på substanser med opprinnelser i naturen og som har fenotypiske antimikrobielle egenskaper [17]. Med 'antimikrobielle egenskaper' menes en kjemisk aktivitet som hemmer eller dreper mikrober ved spesifikke interaksjoner med bakterielle målstrukturer [18] og som potensielt kan brukes til å behandle infeksjoner [19]. Omtrent samtidig med Waxsmans oppdagelse av streptomycin på 1940-tallet kom de første tetrasyklinene, cefalosporinene, samt kloramfenikol og flere aminoglykosider [20]. Denne epoken i medisinsk historie refereres ofte til som 'gullalderen' for antibiotika, men allerede mot slutten av 1940-årene var mange av infeksjonene på sykehus umulig å behandle med penicillin på grunn av resistensutvikling [21]. Om lag et tiår tidligere var det allerede da blitt vanskelig å behandle infeksjoner forårsaket av *Streptococcus pyogenes* med sulfonamider, spesielt i det militære personellet som mottok sulfonamider forebyggende [20]. Også hos tuberkulosepasienter som ble behandlet med streptomycin kom resistensproblemer urovekkende raskt [22, 23].

Den gjennomsnittlige tiden fra lanseringstidspunktet av et nytt antibiotika, til det første rapporterte tilfellet med klinisk resistens er beregnet til å være om lag åtte år [5]. Selv dette kan nok være et litt for optimistisk estimat: Gullalderen i 1950-60 årene kan ha bidratt til å øke gjennomsnittstiden for resistensutviklingen på grunn av det mangfoldet av nye antibiotika som ble lansert fortløpende over en kort tidsperiode [5].

Mot slutten av 1950 – årene ble opptreden av resistens mot flere ulike antibiotikagrupper (*multi-drug resistance* (MDR)) funnet på genetiske elementer som har potensiale til å flyttes horisontalt mellom bakterier av samme art og mellom bakteriearter [24]. Mye tyder på at vi i dag står ovenfor et voksende problem med at flere og flere antibiotika mister effekt. En retrospektiv studie av antibiotikaresistens i *Escherichia coli* i USA fra 1950 – 2002 finner en økning av multidrug resistens (>3 antibiotikagrupper) fra 7,2% i 50-årene til 63,6% i begynnelsen av 2000, og signifikant økning i resistens mot 11 av 15 antibiotika [25]. Uten en økning i innovasjoner som bedrer mulighetene til infeksjonskontroll vil resistensutviklingen kunne sette alvorlige begrensninger for mulighetene til å behandle og forebygge smittsomme sykdommer i mennesker og dyr [26].

Infeksjoner forårsaket av antibiotikaresistente bakterier har vist seg å doble sannsynligheten for en pasients død sammenlignet med pasienter som har infeksjoner uten resistens [27]. Også infeksjoner forårsaket av antibiotikaresistente *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) som i hovedsak er knyttet til animalske matvarer er knyttet til økt dødelighet [28]. Selv om det er mer sjeldent at *S. typhimurium* gir fatale

symptomer [29], understreker det likevel viktigheten av begrenset antibiotikabruk i dyreoppdrett [28]. Både gjennomsnittlig lengde og sannsynligheten for sykehusopphold kan øke til det dobbelte dersom infeksjonen skyldes resistente bakterier, sammenlignet med infeksjoner forårsaket av en tilsvarende sensitiv stamme [30].

I følge Verdens Helseorganisasjon [31] er det klare sammenhenger mellom antimikrobiell resistens og lengre sykdomsforløp med resulterende økt dødelighet. Lengre sykdomsforløp vil også gi større sannsynlighet for videreføring av smittsomme sykdommer til nye personer og geografiske områder, og slik sett vanskeliggjøre kontroll av sykdomsutbrudd på det samfunnsmessige plan, som påfører både familien og samfunnet tilleggskostnader i form av behov for bruk av nyere (og ofte dyrere) legemidler, økte kostnader for helsetjenester, og lengre og mer ressurskrevende sykehusopphold [31].

Følgene av antibiotikaresistens virker slik sett ganske innlysende og gir også grunn til bekymring. Likevel rekker ikke temaet helt opp i den politiske dagsordenen [32]. For spørsmålet er også av en politisk art, og hvilken rolle burde demokratiet ha for legemiddelinnovasjonen, burde noen lede an? Fra et aksjonærperspektiv i farmasøytisk industri er det foreløpig høy risiko knyttet til de høye kostnadene for utvikling, med begrensede inntjeningsperspektiv for nye antibiotika med potensiale for kryssresistens, men også helt nye antibiotikagrupper uten resistensproblematikk vil ha mindre blockbuster-effekt, enn for eksempel behandlinger for kroniske sykdommer. Tilrettelegging med økonomiske lettelser for legemiddelutvikling kan øke den samlede innsatsen for innovasjoner som bremser problemene knyttet til resistensutviklingen. Mikrobiologisk grunnforskning kan identifisere nye angrepspunkt og kanskje også helt nye løsninger for problemet med antibiotikaresistente patogener. Ny og allerede eksisterende teknologi som bremser spredning og omfang av resistente patogene bakterier har bare effekt dersom den er tilgjengelig. Sammen med styrket kapasitet til regulering av legemidler ved oppbygging av et fungerende helsevesen, kan trygge og kvalitetssikre legemiddeldistribusjonskanaler bidra til sikre legemidler og riktig bruk og slik bremse veksten av resistens [32].

Samarbeidet mellom nettverk av laboratorier som samler inn og deler resistensinformasjon kan gi bedre monitorering og kvantifisering av effekter fra strategiske intervensjoner [32], men samarbeidet fordrer standardisering og harmonisering av metoder som muliggjør sammenligning av resistensrater og type resistens, også på tvers av landegrensene [33].

## **Antibiotikaresistens – kostbart og dødelig**

For å kvantifisere påvirkningen antibiotikaresistente bakterier har på et samfunn, er en økonomisk målestokk anvendelig. Selv om dette på langt nær gir et helhetlig bilde (et mer sammensatt bilde burde nødvendigvis også inneha et så subjektivt bilde av sykdom, med muligheten for dødelig utgang, som et perspektiv.) Man kan likevel kvantifisere utfall med sammenlignbare størrelser som samtidig gir et viktig verktøy for evalueringen av tiltak og responser. For oversiktens skyld så kan en skille ut de forskjellige økonomiske aktørene og drøfte mulige synsvinkler i denne sammenhengen. En pragmatisk inndeling kan skille mellom de forskjellige økonomiske deltakerne i samspillet mellom mikrober og mennesker, og de mange sammenhengene som oppstår i spekteret mellom sykdom og helse.

### **Konsekvenser av resistens: rekvirentenes perspektiv**

Motivasjonen til en god lege består gjerne av profesjonalisme [34] (yrkesetikk- og samfunnskontraktfølelsen, der bruken av kommunikasjon, kunnskap, tekniske ferdigheter, kliniske vurderinger, følelser og verdier blir reflektert i den daglige praksisen og til slutt kommer publikum (pasientene) til gode [35].) Antimikrobiell resistens trenger ikke være særlig problematisk så lenge det finnes kurante behandlingsalternativer [34]. Den økonomiske følgen av antimikrobiell resistens kommer dersom resistens representerer ineffektiv behandling og en økning i dødelighet og sykkelighet inntreffer [34]. Eksistensen av et godt utvalg og et mangfold av antimikrobielle midler relateres til sannsynligheten for muligheten til å effektivt kurere en gitt infeksjon hos en gitt pasient [34].

For allmenleger og tannleger finnes det offentlige retningslinjer for hvilke antibiotika som kan forskrives ved ulike tilstander, og vesentlige avvik fra disse må kunne gis en faglig begrunnelse [36]. Rekvireringsmønster har ingen åpenbare direkte effekter på rekvirerende veterinærers, legers og tannlegers økonomi, men i mangel av raske diagnostiske og resistensbestemmende verktøy kan bredspektrede antibiotika representere en tilsynelatende god løsning, siden både kostnaden for behandlingen og sjansen for bivirkninger er lav [29]. Andre land kan ha andre økonomiske løsninger der rekvirenter tjener på forskrivning.

### **Pasientens perspektiv**

Pasientens motivasjon for å bli frisk fra en sykdom er forankret i ønsket om sin egen gode helse. Økonomisk sammenfaller det individuelle pasientperspektivet med legens, konsekvenser av resistente bakterier kommer av økt sykkelighet og risiko for død, og til dels også ekstra kostnader for dyrere antibiotika som det enda ikke er resistens mot [34].

Ekstrakostnadene for behandling av resistente infeksjoner er i Norge i stor grad dekket av folketrygdens refusjonsordning [37] og de private økonomiske tapene kompenseres også gjennom budsjettene til helseforetakene og andre samfunnsmessige velferdsgoder. Pasienten velger ikke hvilken antibiotikabehandling legen skal forskrive, men forventningene pasienten har kan påvirke legens avgjørelse [29]. Kampanjer som retter seg mot både pasienter og helsepersonell kan bidra til redusert forskrivning av unødig antibiotika [38].

## **Legemiddelindustrien**

Legemiddelindustriens perspektiv sammenfaller til en viss grad med helseforetakenes perspektiv [34]. Fokus rettes mot målgruppene som bestemmer bruken av legemidlene, komiteer for retningslinjer av antibiotikabruk, helseforetak og rekvirenter. Motivasjonen er finansiell avkastning for aksjonærene som nødvendiggjør både korte og langsiktige perspektiv [34]. Markedsstørrelsen til et nytt antibiotikum avhenger av hvor stort anvendelsesområde (bred effekt) antibiotikumet har (smalspektrede antibiotika vil naturligvis ha færre anvendelsesområder) [29]. Maksimumspris for et nytt antibiotika i patenttiden avhenger av konkurrentenes alternative antibiotika som finnes på markedet for samme infeksjonstype. En ny type antibiotika som kan konkurrere mot eksisterende siste-linje antibiotika kan prises høyere, og et nytt antibiotikum som virker mot infeksjoner som er resistent mot alle de andre antibiotikaene kan teoretisk sett prises veldig høyt [29]. Inntjeningen påvirkes av hvor mye det kan brukes i et kortsiktig perspektiv, og på lengre sikt av patentbeskyttelse og levetiden til det nye antibiotikumet. Levetiden avhenger av hvor raskt konkurrerende foretak kan lage et sammenlignbart produkt og på tiden til resistens blir et problem [29]. Tiden til resistens avhenger i stor grad av hvor mye det blir brukt [29], eller dersom det oppstår kryssresistens mot et annet produkt.

## **Helseforetak**

Den økonomiske siden av resistente mikroorganismer er for helseforetak primært påvirket av hvilke tiltak som må iverksettes for å ivareta effektiviteten av antimikrobielle midler [34]. Tiltak for å behandle infeksjoner som har resistensmekanismer for en eller flere klasser med antibiotika, kan omfatte ekstra smittevern, ekstra legemidler, ekstra kompetanse og opplæring, ekstra tidsbruk, ekstra rom, nytt utstyr og ekstra forbruksmateriell for håndtering av antimikrobiell resistens [34]. Målsetningen for helseforetak er redusert sykkelighet og dødelighet, oppnådd med fiskal effektivitet (med minst mulig utgifter av begrensede finansielle ressurser) for populasjonen som helseforetaket betjener [34].



## Det globale samfunnsperspektivet

Motivet for det globale folkehelseperspektivet er at felles samfunnsgoder spenner over hele populasjoner, tettsteder, byer, land og Jorden som helhet [34]. Målet er åpenbart å maksimere helsegevinster for hele den menneskelige populasjonen og tidsrammen er langsiktig inkludert kommende generasjoner [34]. Antimikrobielle midler muliggjør både forebygging og behandling av infeksjoner og betraktes derfor som en verdifull ressurs [34]. Resistens avkorter denne ressursen og en målsetning for samfunnet blir da å minimere resistens, minske resistensutviklingen og de kreftene som produserer resistens [34].

WHO har utarbeidet en liste over kritisk viktige antimikrobielle midler for å hjelpe myndigheter og rekvirenter med risikovurderinger og risikohandtering som begrenser antimikrobiell resistens [39]. Kritisk viktige antimikrobielle midler inkluderer midler som er den eneste, eller en av få muligheter for å behandle alvorlige sykdommer [39]. Alvorlige sykdommer har en høy dødelighet eller irreversibel sykelighet og som kan smitte fra andre kilder enn menneske, eller kan erverve resistens fra andre kilder utenom menneske [39].

Antimikrobielle midler blir i økonomiske termer å betrakte som knappe ressurser [34]. Forbruket i dag reduserer effektiviteten og dermed verdien av legemiddelet i framtiden [34]. Fra samfunnets perspektiv blir definisjonen av formålstjenlig bruk av antimikrobielle midler noe som fører til en akseptabel reduksjon av verdien av fremtidig antimikrobiell effektivitet [34]. På samme måte vil overforbruk eller feilbruk av antimikrobielle midler føre til u hensiktsmessige store reduksjoner i disse ressursene [34].

Ringvirkninger i overskuelig framtid er lettere å neglisjere, fordi konsekvensene på kort sikt er lett å måle, mens effekten av økende resistens på lang sikt i de fleste tilfeller ikke har blitt kvantifisert [34]. Derfor kan det være at rekvirenter velger en tilsynelatende trygg løsning (på kort sikt) ved å oftere forskrive et bredspektret antibiotikum [29]. Den reelle kostnaden bæres av samfunnet som helhet og prisen øker en økt andel bredspektrede antibiotika, i tillegg til all feilaktig bruk (bruk som ikke er nyttig for pasienten, for eksempel virusinfeksjoner eller bakterieinfeksjoner der spontan remisjon inntreer like raskt med eller uten behandling). Til sammen øker feilaktig bruk og overforbruk av de bredspektrede antibiotikaene, det totale seleksjonspresset for utviklingen og vedlikehold av resistens i bakterier [29]. Med ordene til den anerkjente mikrobiologen S. B. Levy: "Antibiotics are a global resource and the world has a responsibility to use this resource for the greatest good of humanity while protecting their effectiveness" [32].

## Antimikrobiell resistens

### ***Mikrobiologisk definisjon av resistens***

Alle bakterier som i utgangspunktet er følsomme for antibiotika og som mangler definerte mekanismer for resistens har potensiale for å utvikle resistens [19]. I mikrobiologisk definisjonssammenheng er alle bakterier som innehar enten en fenotypisk eller genotypisk resistensmekanisme klassifisert som resistent [19]. Resistens kan videre inndeles fra lavgradig til høygradig resistens [19].

### ***Klinisk tredeling – sensitiv, intermediær eller resistent***

Fra et klinisk behandlingsperspektiv er inndelingen sensitiv, intermediær og resistent (S-I-R) et system som blant annet sier noe om sannsynligheten for å oppnå terapeutisk effekt [33]:

- sensitiv / følsom – terapeutisk suksess er sannsynlig
- intermediær – terapeutisk effekt er usikker eller intermediær
- resistent – terapeutisk svikt er forventet

I en ideell situasjon så vil definering av antibiotikafølsomhet hos en bakterie involvere en observert respons på et standardisert terapiregime etter å ha forårsaket infeksjon, og ha en godt dokumentert sammenheng mellom målbare *in vitro* parametere og sannsynlighet for terapeutisk suksess *in vivo* [19]. Klinisk sensitive / følsomme bakterier kan også inneha en lavgradig resistensmekanisme og likevel respondere på standard terapiregime.

Intermediært sensitive/intermediært resistente bakterier tilhører en klasse som ligger mellom klinisk sensitiv og klinisk resistent. Infeksjoner forårsaket av slike stammer kan ofte elimineres hvis antibiotikumet oppkonsentreres ved infeksjonsstedet, eller hvis det er mulig å øke doseringen [19].

Klinisk resistente bakterier vil høyst sannsynlig ikke respondere selv på terapeutiske maksimumsdoser av et gitt antibiotikum. [19].

Bestemmelse av en infeksjonsforårsakende bakteriestammes kliniske resistensgrad for et gitt antibiotikum krever kjennskap til både *in vitro* parametere og bakterienes 'livsstil' *in vivo*, slik som grad av biofilm- og persistercelle- dannelse. De fysiologiske forholdene rundt en

infeksjon kan være vesentlig forskjellig fra de eksperimentelle laboratorieoppsettene ved beregninger resistensgrad [40] (se tabell 1).

**Tabell 1: Mulige forskjeller mellom *in vitro* og *in vivo* forhold med hensyn på beregning av MIC<sup>a</sup> og MBC<sup>b</sup> i klinisk terapi [40].**

<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
aerob	anaerob
pH 7.2	ofte syrlige miljø
proteinfritt	grad av proteinbinding
definert startkonsentrasjon	svingninger i plasmakonsentrasjonen
10 <sup>5</sup> CFU <sup>c</sup> /ml [41]	10 <sup>8-10</sup> CFU/g puss eller vev
eksponentiell vekst	ikke voksende persisterceller
jevn temperatur	mulige temperaturvariasjoner

<sup>a</sup> *minimum inhibitory concentration* (MIC), <sup>b</sup> *minimum bactericidal concentration* (MBC),

<sup>c</sup> *colony forming units* (CFU)

## **Klinisk antimikrobiell terapi og infeksjonsbehandling**

Selv om de fleste interaksjonene mellom mennesket og mikrobene er av en godartet natur som gagnar alle parter på flere vis, så finnes det også en del sykdomsfremkallende bakterier. Avhengig av infeksjonens art og individuelle variasjoner mellom pasienter slik som komorbiditet og legemiddelbruk, immunrespons og allmenntilstand, vil det kunne oppstå situasjoner som krever antibiotikabehandling. Behandlingens effekt avhenger av hvordan legemidlet oppfører seg i kroppen, hvordan bakteriene blir påvirket av legemidlet og responsen kroppens immunforsvar gir mot infeksjonen. Riktig antibiotikavalg med tanke på legemidlets egenskaper i forhold til infeksjonen er viktig, men i mangel av effektive diagnoseverktøy blir som regel forskrivning basert på den empirisk behandlingen som er i tråd med de offisielle retningslinjene for antibiotikabruk.

## **Farmakodynamiske sider ved antibiotikabehandling**

Antibiotika inndeles gjerne etter hvilke biologiske angrepspunkt de har på bakterier og om de har en baktericid eller bakteriostatisk effekt. For å kalle et antibiotikum for baktericid vil det gi en markant reduksjon i antall levedyktige bakterieceller (som i et standardisert forsøk vil tilsi en 99,9% reduksjon fra det opprinnelige antallet inokulert). For bactericide antibiotika er *minimal bactericidal concentration* (MBC) vanligvis tilnærmet lik og mindre enn fire ganger høyere enn *minimal inhibitory concentration* (MIC) [40].

Bakteriostatisk antibiotika har som regel MBC-verdier som er mange ganger høyere enn MIC [40].

Effekten av antibiotika avhenger også av funksjonsgraden til pasientens eget immunforsvar. Bakteriostatisk antibiotika som hindrer vekst av sensitive bakterier forutsetter et aktivt immunforsvar for fullstendig remisjon [40]. Ved utilstrekkelig immunrespons ved infeksjonsstedet vil baktericide antibiotika være nødvendig, siden infeksjonen kommer til å blusse opp igjen når behandlingen med bakteriostatisk antibiotika avsluttes, dersom ikke immunsystemet har klart å fjerne hele infeksjonen i løpet av behandlingstiden [40].

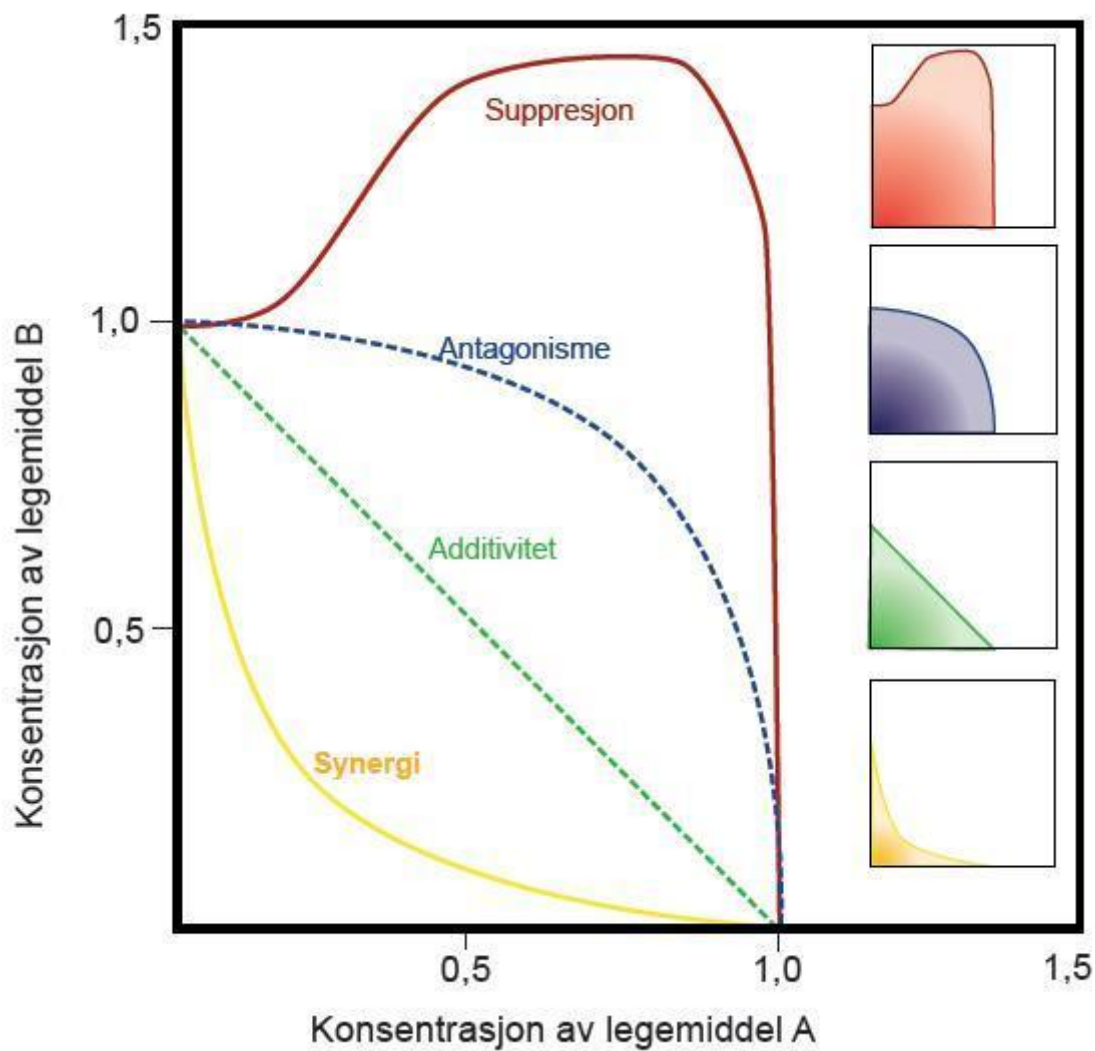
Antibiotika kan grupperes på bakgrunn av hvordan farmakodynamiske (PD) og farmakokinetiske (PK) egenskaper påvirker bakterieclearance fra vert. For antibiotika med en tidsavhengig (og saktevirkende) baktericidal effekt er clearance av bakterier avhengig av tiden som konsentrasjonen er over MIC [40]. Eksempler er  $\beta$ -laktamer og vankomycin, og doseringsintervallene må være hyppige nok til at konsentrasjonen holdes høyere enn MIC gjennom hele behandlingen. Noen antibiotika har en postantibiotisk effekt (PAE) som selv ved korttidseksposering til konsentrasjoner høyere enn MBC, gir vedvarende immunsystemuavhengig suppresjon av bakterievekst etter at antibiotikakonsentrasjonen er redusert til lavere enn MIC. For antibiotika som har en konsentrasjonsavhengig baktericidal effekt og lang postantibiotisk effekt (PAE) slik som aminoglykosidene, fluoroquinolonene, daptomycin og metronidazol avgjør maksimumskonsentrasjonen ( $C_{max}$ ) og eksponeringsgraden som reflektert i areal under kurve (AUC – integralet av konsentrasjon/tid-funksjonen) i forhold til MIC, i større grad enn doseringsintervallene av betydning for behandlingseffekten [40].

I en tredje klasse regnes de antibiotika som har en bakteriostatisk virkning og lang postantibiotisk effekt (PAE) der bakteriell clearance avhenger av AUC ved konsentrasjoner høyere enn MIC. I denne gruppen tilhører flere makrolider, tetrasykliner, linezolid, klindamycin og streptograminer [40].

### **Farmakodynamiske interaksjoner som selekterer mot resistens**

Kombinasjonsbehandling med flere antibiotika har fått økt oppmerksomhet på grunn av resistensutviklingen og mangelen på nye antibiotika [42]. Synergiske antibiotikakombinasjoner har en større effekt enn summen av de individuelle egenskapene skulle tilsi [42], og additiv hvis effekten er like stor [40, 42]. Antagonistiske kombinasjoner har mindre effekt enn summen av de individuelle legemidlene skulle tilsi, og

hyperantagonistiske / suppressive kombinasjoner gir mindre effekt enn effekten av et av legemidlene alene [42]. Hyperantagonistiske antibiotikakombinasjoner er av en slik natur at de kan selektere mot sitt eget resistensallel/fenotype. Bakterier med resistens for et av antibiotikaene i en slik kombinasjon, er mer sårbar for den antibiotiske effekten. Slik kan antibiotikafølsomhet selekteres for selv i en aktuell antibiotikabehandling [42]. I figur 1 illustreres mulige farmakodynamiske interaksjoner mellom to antibiotika som et isobologram med effektivitet av antibiotikakombinasjoner med variasjoner fra synergi til suppresjon.



Figur 1 – Representasjon av mulige interaksjoner mellom to ulike antibiotika

Illustrasjon av konsentrasjonsforholdet for synergistiske, additive, antagonistiske og suppressive legemiddelkombinasjoner som gir lik effekt (veksthemming). Linjene (isobolene) for additive kombinasjoner forventes å gi en lineær kurve (grønn) og en lavere kurve for synergisk (gul). Antagonistiske kombinasjoner (blå,) trenger høyere konsentrasjoner for lik effekt, og suppressive legemiddelpar har mindre effekt av behandling enn for et av legemidlene alene. Innfelt vises vekstrater i et tilsvarende koordinatsystem (mørkere farge tilsvarer raskere vekst).

Figuren er bearbeidet fra *Chait et al 2007* [42].

## Variasjoner i behandlingens effektivitet

Andre faktorer enn bakteriens *in vitro* bestemte grad av resistens kan ha betydning for terapeutisk effekt [19]. Mangelfull respons ved behandling kan også skyldes andre forhold enn resistens. Anatomiske barrierer ved infeksjonsstedet kan skyldes lav blodperfusjon til et vev (overflatearealet av kapillærsengen er liten i forhold til volumet av kroppsvevet) [40] som kan være aktuelt for pasienter med mikrovaskulær sykdom, eller barrierer i form av ekstracellulær fordeling av et antibiotikum ment å behandle en intracellulær infeksjoner [43]. Fordeling av antibiotika til cerebrospinalvæsken, CNS, øye og prostata er ofte lav og plasmakonsentrasjonen representerer ikke alltid et fullgodt mål på konsentrasjonen ved infeksjonsstedet. Ikke-arvelig resistens og persistere (se eget avsnitt) kan også føre til tilbakevendende infeksjoner forårsaket av bakterier som vanlig *in vitro* testing klassifiserer som sensitiv [44].

## De tre kategoriene av resistens

Resistent fenotype kan inndeles i tre kategorier:

- Iboende resistens (intrinsisk / naturlig resistens)
- Ervervet resistens
- Ikke-arvelig resistens (adaptiv / fysiologisk resistens)

## Iboende resistens

Iboende eller intrinsisk resistens er en naturlig egenskap som bestemmes av bakteriens kromosom og arves vertikalt [45], slik at alle individuelle stammer fra samme bakterieart deler den biokjemiske og fysiologiske sammensetning som gir resistens [46]. Iboende resistens er slik sett artsspesifikk og tilstedeværelsen av resistens i en stamme er uavhengig av individenes tidligere eksponering til antibiotika [46]. Iboende resistens er ikke avhengig av horisontal genoverføring (HGT) eller mutasjoner [26]. Mutasjonsbasert evolusjon av iboende resistens kan likevel skje ved en samtidig påvirkning av flere gen involvert i basale cellefysiologiske funksjoner [46], for eksempel gir endringer i cellens permeabilitet og efflukssystem [46]. Iboende resistens for et gitt antibiotikum kan skyldes manglende målstrukturer for antibiotikumet hos bakterien, som hos eksempelvis: *mycoplasma* spp. som er uten cellevegg og vil derfor ikke påvirkes av  $\beta$ -laktamantibiotika, glykopeptider eller andre antibiotika som hemmer celleveggsyntese. Mange Gram-negative arter responderer ikke på

makrolider eller glykopeptidantibiotika siden legemidlene ofte viser dårlig opptak inn i cellen på grunn av begrenset permeabilitet i de mer komplekse membranene hos Gram-negative arter [46].

Andre naturlig forekommende forsvarsmekanismer som kan være mer antibiotikaspesifikke, men som hele arten innehar, klassifiseres også som intrinsisk resistens. Det kan for eksempel være kromosomale gener for (antibiotika -) efflukspumper og betalaktamaser (eksempelvis *AmpC*) som også er vanlig hos mange Gram-negative arter inkludert *P. aeruginosa* og i mange arter tilhørende *Enterobacteriaceae* [45], eller cefalosporinresistens i enterococci som skyldes lav affinitet til penicillinbindende proteiner [26]. Anaerobe arter fra slekten *Bacteroides* mangler oksygen- eller nitrat- avhengig elektrontransportkjede og tar derfor ikke opp aminoglykosider [47].

## **Ervervet resistens**

Bakterier som i utgangspunktet er følsomme for et antibiotikum og som blir resistente ved en genetisk endring som en følge av spontane mutasjoner eller ved horisontal genoverføring (HGT) har ervervet resistens. Ervervet antibiotikaresistens er en arvelig økning i grensen for minimums inhibitoriske konsentrasjon (MIC) av en eller flere typer antibiotika.

### **Bakterien kan erverve resistens på to måter**

En tidligere antibiotikafølsom bakterie kan erverve resistens enten ved at genene som bakterien har på kromosom og plasmid muterer og fører til mindre antibiotikafølsomhet, eller gjennom horisontalt overførte "klar-til-bruk" resistensgener. Resistensfrekvens i en bakteriepopulasjon avhenger av seleksjonspress, mutasjonsrater og rater for HGT av resistensdeterminanter, samt populasjonens størrelse [48]. Følgende drøfting er basert på kapittel 3 i boken "The molecular genetics of bacteria" [49].

### ***Resistens ervervet gjennom mutasjoner***

En mutant defineres som en organisme som følger en direkte arvelinje (er avkom) fra den originale villtypen, men innehar en arvelig mutasjon i sitt arvestoff som endrer DNA-sekvensen til organismen. Endringen må kunne videreføres til påfølgende generasjoner for å kalles en mutasjon. Endringer i DNA-sekvensen kan påvises genotypisk eller fenotypisk hvis den gir en observerbar endring.

## Mutasjonsrate

Dersom bakteriens genetiske variasjon avhenger utelukkende av mutasjoner, vil adaptiv evolusjon og ervervelse av resistens kunne øke med økte mutasjonsrater [48]. Mutasjonsrate kan defineres som sjansen for at en villtype muterer til en gitt fenotyp, eller som frekvensen av arvelige mutasjoner per generasjon i hele genomet, ved spesifikke *locus* eller nukleotider [50]. Mutasjoner kan enten føre til fordeler for organismen (øke biologisk fitness), være fitnessnøytral, eller gi ulike former for biologiske kostnader. Endringer i biologisk fitness måles ofte som endringer i den relative reproduksjonsraten til en organisme. Mutasjonsraten kan reflektere sannsynligheten for dannelsen fra villtype til den aktuelle observerbare fenotype. Antall *loci* som kan gi resistensmutasjoner som kan skape den aktuelle fenotypen og mutasjonsratene i de aktuelle genetiske *loci* påvirker sannsynligheten for at en bestemt fenotype skal oppstå [50]. Mutasjonsraten fra antibiotikafølsom (villtype) til en bestemt type resistens (mutant) kan variere mellom ulike arter, for eksempel hvis det er ulike antall mulige kromosomale mutasjonssteder som gir resistens, eller hvis de involverte *loci* har forskjellige mutasjonsfrekvenser [50]. De generelle mutasjonsratene for en bakteriell populasjon avhenger av bakteriens genomstruktur, DNA reparasjonskapasitet og vekstforhold [50].

Mutasjonsrater blant forskjellige *loci* kan variere med en faktor på 10 000 [50]. Kodonsammensetningen og rekkefølgen av nukleotider er av betydning for mutasjonsraten, der lange sekvenser med repeterte baser oftere gir hyppige frameshift mutasjoner som følge av små *insertions* eller delesjoner [50]. Kromosomal plassering har også betydning, der gener som sitter lengst fra *origin of replication (oriC)* kan ha opptil dobbelt så høye mutasjonsrater i forhold til gener nært *origin of replication* [50].

Klinisk sensitive bakterier som fint lar seg behandle kan også inneha en lavgradig resistensmekanisme, som ved påfølgende kromosomale mutasjoner kan øke resistensnivået litt etter litt, til den når en høygradig og klinisk relevant resistens, også kjent som MIC – kryping (MIC-verdien ”kryper” gradvis oppover) [23]. En lav grad av resistens bidrar over tid til at en mer fremtreden grad av resistens vil oppstå, og kan også skyldes fysikalske forhold som biofilmstruktur, persistere eller ved høye konsentrasjoner av bakterieceller (kjent som *the inoculum* effekt) som gir utgangspunkt for en initial lav grad av resistens [50].

Uavhengige resistensmutasjoner gir additiv økning i sannsynligheten for økt resistens, siden de gir økning av resistens hver for seg, uavhengig av om andre mulige mutasjoner har inntruffet [50]. Sannsynligheten for utvikling av resistens kan summeres for hver av de uavhengige resistensmutasjonenes individuelle sannsynlighet [50]. Additiv sannsynlighet sees



der flere mulige loci bidrar til å øke resistens [50]. Dersom flere mutasjoner må oppstå samtidig for å gi resistens, blir sannsynligheten for resistens produktet av de individuelle sannsynlighetene og dermed mye lavere enn for uavhengige mutasjoner, og er også kjent som kooperative resistensmutasjoner [50].

Hvilken type interaksjon et bestemt gen har i bakterien kan også påvirke den generelle mutasjonsraten. En inndeling i kjernegener (*core / housekeeping genes*), som er de genene som er helt nødvendig for opprettholdelsen av bakterien, og som viser mindre variasjoner mellom de fleste bakterieartene [51] har til sammenligning lavere mutasjonsrater enn de mer midlertidige tilleggsgenene (*accessory/contingency/character genes*) som gir en bakteriestamme en del av sine karakteristikk og ofte også adaptive egenskaper som muliggjør kolonisering av bestemte nisjer [50]. Kjernegenene kan vanligvis utgjøre ~8% av en gjennomsnittlig bakteries DNA og regnes for å omfatte om lag 250 genfamilier som kan gjenfinnes i ~99% av alle bakteriearter [51].

Ikke alle mutasjoner trenger å gi noen selektive fordeler eller ulemper, men noen kan ofte være fitnessnøytrale og fluktuerer over tid ved genetisk drift [52]. Teoretisk sett er alle genetiske *loci* til en viss grad utsatt for *purifying selection* [53]. *Purifying selection* er kjent som "... seleksjon som hindrer at skadelige mutasjoner fikseres i en populasjon" [53]. *Purifying selection* vil trolig spille en noe større rolle for de lave mutasjonsratene som observeres for kjernegenene, siden disse genenes grad av evolusjonær konservering nok reflekterer en sterkere korrelasjon mellom fungeringsgrad og gjennomsnittlig generell fitness [53]. Mutasjoner i slike gen vil trolig i større grad gi ugunstige (*detrimentale*) effekter i forhold til villtypegenenes finjusterte optimaliserte funksjon gjennom (mange) generasjoner [54]. Slike mutasjoner selekteres derfor vekk raskere enn for eksempel mutasjoner i gen som sjeldnere kommer til nytte, eller der funksjonsgrad har mindre effekt på gjennomsnittlig fitness. Dette kan tenkes å gjelde for mange av tilleggsgenene, som oftere gir genprodukter involvert i spesifikke tilpasninger til lokale miljøforhold, og har generelt sett høyere genetisk variasjon enn kjernegenene [50].

### *Endringer i mutasjonsrater*

Bakterielle subpopulasjoner med økte mutasjonsrater (hypermutatorer) kan ha fordeler ved spesifikke selektive trykk [55]. Bakterier kan respondere på miljømessige stressfaktorer som immunrespons fra vertsceller, næringsmangel (*starvation*) eller antibiotikaeksponering [48] med en midlertidig økning av mutasjonsrater [50]. Ved aktivering av SOS respons og DNA polymeraser uten *editing* funksjon (*error prone* polymeraser) kan mutasjonsrater økes

midlertidig [50]. Gjentakende antibiotikaseleksjon kan selektere for og gi videre økning i frekvensen av en hypermutatorfenotype [48].

DNA duplikasjoner kan gi økte adaptive mutasjonsrater, ved å gi en reversibel økning i genprodukter som kan stabilisere genduplikasjonene som ellers er relativt ustabile og reverterer ganske hurtig [56]. Stabiliserte ekstra kopier av et gen kan øke mutasjonsraten ved at det gir en økning i antall mulige muterbare mål [48, 56].

Bakterier kan også ha permanente økninger i mutasjonsrater. Flere patogene bakterier har tilsynelatende reduserte antall gen i hver av klassene for DNA reparasjon (direkte reparasjon, *base excision repair*, *mismatch repair* (MMR) genene) [55]. Det er likevel mulig at noen av disse artene har identiske funksjoner kodet i andre ikke-homologe gener [55]. Gjenoppretting av DNA reparasjonsfunksjoner kan skje ved påfølgende HGT [55]. Infeksjonsforårsakende bakterier er nødt til å ha noen DNA reparasjonsmekanismer og det er mye som gjenstår i spørsmålet om hypermutatorenes generelle rolle i utviklingen av antibiotikaresistens [55].

### *Reversering av kromosomale resistensmutasjoner*

De overlevende bakteriene i en populasjon som har vært eksponert til høye antibiotikakonsentrasjoner vil ofte ha utviklet en form for arvelig resistens, siden de antibiotikafølsomme bakteriene dør som følge av behandlingen. Et unntak er overlevelse av persistere som har ikke-arvelige resistensmekanismer. Når det antibiotiske seleksjonspresset opphører vil de påfølgende generasjonene i stor grad arve resistensmutasjoner. Ikke sjelden vil kromosomale resistensmutasjoner medføre en biologisk kostnad i form av redusert relativ fitness (se tabell 2). Uten det antibiotiske seleksjonspresset vil relative fitnessforskjeller mellom resistent ( redusert fitness) og følsom (høy fitness) gi seleksjon av de med høyeste fitness, uavhengig av resistens. Resistensdeterminantene er i fravær av antibiotika blitt overflødige og blir noen ganger sammenlignet med ekstra bagasje som bakteriene ville vært best tjent med å bli kvitt.

**Tabell 2: Relativ fitness målt i konkurranseforsøk mellom isogene resistente vs. sensitive bakterier, fra tabell presentert i Starikovas PhD avhandling [57] (med kilder derfra).**

Bakterie	Resistens	Genetisk element	Relativ fitness	
				<b>M u t a s j o n s b a s e r t</b>
<i>Escherichia coli</i>	Rifampin	<i>rpoB</i>	0,83-1,04	
<i>Escherichia coli</i>	Norfloxacin	<i>gyrA</i>	0,56-0,99	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Fluoroquinolon	<i>parC</i> <i>parE</i> <i>gyrA</i>	0,9-1,05 0,55 0,9-1,0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rifampin	<i>rpoB</i>	0,6-0,98	
<i>Chlamydia psittaci</i>	Spectinomycin	16S rRNA	0,47-0,87	
				<b>V e d H G T</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin	VanA-plasmid	0,96	
<i>Escherichia coli</i>	Chloramphenicol, kanamycin, ampicillin, streptomycin, spectinomycin, sulfonamid	R1-plasmid	0,68	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin	<i>Tn1549</i>	0,78	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomycin	<i>Tn1549</i>	0,61	

Reverseringsraten av resistensmutasjoner vil i antibiotikafrie miljø være direkte knyttet til størrelsen av kostnadene for resistens, der større kostnader gir raskere reversering. Fitnessnøytrale resistensmutasjoner vil kunne opprettholdes i lengre tid og på samme måte kan fitnessøkende resistensmutasjoner øke i frekvens selv uten antibiotikaseleksjon [58]. Resistens har ofte en biologisk kostnad og fitnessøkende resistensmekanismer er trolig mindre vanlig [59]. Til tross for at det ofte kan observeres signifikante fitnessforskjeller mellom de isogene resistente og følsomme deler av en populasjon, er det ikke alltid reversering som blir den vanligste veien for å gjenopprette økt fitness. Fitnesskostnader kan også reduseres gjennom påfølgende mutasjoner i andre deler av kromosomet som øker fitness uten å endre resistensgraden (fitnesskompenserende mutasjoner). Kompensasjonsmutasjoner har ofte en større sannsynlighet for å inntreffe, siden det ofte finnes flere muligheter for mutasjoner i et genom som kan gi fitness kompensasjon enn de få loci som må muteres for genetisk reversering. Kompensasjonsmutasjoner gir ikke alltid like god fitness som sann revertering,

men hvis fitnesskompensasjoner blir dominerende i en populasjon kan reversjonsraten gå ned siden seleksjonen blir svakere når de relative forskjellene blir mindre [60].

Frekvensen av en bestemt type mutasjon i en populasjon bestående av villtypebakterier og mutanter, avhenger av mutasjonsraten i tillegg til relativ kostnad og tidspunkt for når mutasjonen oppstod. En mutasjon som oppstår på et tidlig tidspunkt i en ekspanderende bakteriepopulasjon vil øke i frekvens ved påfølgende celledelinger [50], omfanget avhenger av størrelsen på fitnessendringer som mutasjonen gir. Sannsynligheten blir da at andelen kompensasjonsmutasjoner øker siden de som regel oppstår før reverseringsmutasjoner. Andelen av revertanter, fitnesskompenserte mutanter og de ukompenserte resistente vil ved et gitt tidspunkt gjenspeiles i mutasjonsratene, tidspunktet for mutasjonen og de relative fitnessforskjellene.

I naturlige miljø kan bakteriepopulasjoner fra tid til annen møte evolusjonære flaskehals. Flaskehals oppstår der kun et lite og tilfeldig utvalg av en populasjon videreføres [60]. Patogener vil som en følge av sin "livsstil" regelmessig møte evolusjonære flaskehals, siden kun et fåtall videreføres ved spredning av infeksjoner mellom individer. Flaskehalsene som oppstår i vekselvirkningen mellom en midlertidig kolonisering og videre overføring til nye verter kan sammenlignes med in vitro serieoverføringer av bakteriekulturer i laboratoriet. Ved serieoverføringer velges et mindre antall av bakteriene i kulturen på en tilfeldig måte og overføres til ferskt vekstmedium. Når populasjonen utsettes for en flaskehals vil andelen av de ulike genotypene (resistent med fitnesskostnad, sensitiv, fitnesskompensert resistent) avgjøre sannsynligheten for at en bestemt genotype blir med i den heterogene bakteriepopulasjonen som gir grunnlag for senere generasjoner. I en humanpopulasjon forutsetter dette også at den patogene bakteriens virulensegenskaper for kolonisering og videreføring ikke er forskjellig mellom de ulike genotypene.

Størrelsen på utvalget (flaskehalsstørrelsen) og antall generasjoner til populasjonen møter neste flaskehals påvirker hvilke genotyper som blir dominerende [60]. Dersom mye av populasjonen videreføres, øker sannsynligheten for at også sjeldne revertanter blir med, og hvis disse får vokse lenge i fravær av antibiotika seleksjon vil revertanter øke raskere i andel siden fitnessforskjellen da blir mer avgjørende. Dersom flaskehalsen er liten (kun et fåtall bakterier velges ut) så blir sannsynligheten større for at ingen av de mer sjeldne, høyeste-fitness revertantene videreføres. Da øker i stedet andelen fitnesskompenserte mutanter, og effekten forsterkes ved påfølgende flaskehals. Dette fordi fitness fordelen ved en sann reversjon er relativt mindre for en kompensert mutant enn for en ukompensert mutant [60].

De fleste humanpatogene bakteriearter, elimineres fra verten etter en forbigående vekstperiode (infeksjon), og kun en liten andel overføres til en ny vert [60]. Også ved slike naturlige flaskehals er det sannsynlig at de resistente genotypene som oppstår først (fitnesskompenserte) vil komme til å dominere populasjonen ved flaskehalsutvelgelsen [60], og sannsynligheten for sann reversering av resistens blir tilsvarende lav. En forutsetning er at resistensmutasjoner og kompensasjonsmutasjoner ikke endrer overføringsevne eller evnen til å kolonisere en ny vert.

Kromosomale resistensmutasjoner har ofte en biologisk kostnad (tabell 2), men blir raskt nær fiksert i en bakteriepopulasjonen ved sterk antibiotikaseleksjon. Avhengig av fitnessforskjeller vil andelen med reversering til sensitiv øke i frekvens under fravær av antibiotikaseleksjon reproduksjonsraten (fitness) går opp. Andelen sensitive bakterier i en populasjon i fravær av antibiotika og ved et gitt tidspunkt gjenspeiles i de relative fitnessforskjellene og tiden fra reverseringen oppstod.

### *Forskjellige typer mutasjoner*

#### **Baseparforandringer**

Baseparforandringer kalles transisjonsmutasjoner eller transversjonsmutasjoner og er en type punktmutasjon som endrer en base eller et basepar. Dersom en purinbase byttes for den andre purinbasen ( $A \leftrightarrow G$ ) eller en pyrimidinbase byttes for den andre ( $C \leftrightarrow T$ ) kalles det transisjonsmutasjon. Transversjonsmutasjoner innebærer endring av purinbase (A eller G) til en pyrimidinbase (C eller T) eller vice versa og er mindre vanlig enn transisjonsmutasjoner.

Et relevant eksempel på en resistensgivende baseparforandring er dannelsen av streptomycinresistens etter mutasjoner i det 42. kodonet i *rpsL*. Da kan den korresponderende aminosyren lysin (AAA, AAG) endres til treonine ( $ACX^2$ ) eller asparagin (AAU, AAC) [61]. Baseparendringen i forsøkene til Schrag et al omhandlet lysine (AAA), asparagin (AAC) og treonine (ACA) [60, 62]. I begge tilfellene var resistensmutasjonen en type transversjonsmutasjon ( $A \rightarrow C$ ), men den fenotypiske effekten må trolig være den samme for alle genotyper som gir asparagin eller treonin i det samme stedet i aminosyrekjeden.

Transversjonsmutasjoner kan oppstå blant annet ved oksidering av guaninbasen (G) til 8-oxoG (GO) som kan baseparre med adenin (A). Høy temperatur og deaminerende forbindelser kan øke mutasjonsratene siden deaminering av adenin gir hypoxanthine som kan

---

<sup>2</sup> X står i denne sammenhengen for hvilken som helst av de fire DNA basene

baseparre med cytosin, som igjen kan deamineres og gi uracil som normalt ikke finnes i DNA, men som best gir basepar med adenin. Guanin kan deamineres til xanthine som best vil gi basepar med cytosin. Enolisering av tymin gir bedre basepardannelse med guanin.

Mutasjoner klassifiseres etter hvilken effekt de utøver på det genetiske produktet. I de tilfellene der en baseparforandring gir et endret genprodukt, som i tilfellet med streptomycinresistens der mutasjoner i *rpsL* endrer streptomycins affinitet for målstrukturen, kalles endringen en *missense* mutasjon siden en av aminosyrene er byttet ut med en annen.

Andre utfall av baseparforandringer kan være stille mutasjoner som er arvelige endringer i DNA, men som ikke endrer aminosyren det kodes for. Disse kan oppstå siden den genetiske koden i de aller fleste tilfeller har flere kodonvariasjoner for en og samme aminosyre (koden er redundant/degenerativ). Stille mutasjoner er en av mekanismene bak genetisk drift siden de ofte gir fitnessnøytrale endringer [52].

*Nonsense* mutasjoner gjør at et nonsensekodon opptrer på en unormal plass i aminosyresekvensen. Nonsensekodon i mRNA gjenkjennes av *release factors* (RF) som under translasjon av et normalt mRNA hjelper med å avslutte proteinsyntesen for frigjøre ribosomet fra mRNAet der koden for polypeptidkjeden slutter. Hvis nonsensemutasjoner oppstår tidlig i aminosyresekvensen kan de føre til avkortede og trunkerte polypeptid som det er mindre sannsynlighet for vil ha en normal funksjon. *Leakyness* er et begrep for å si noe om den muterte gensekvensen har et genprodukt som fungerer. Nonsensemutasjonene UAA (ochre), UAG (amber) og UGA (opal) har varierende grad av leakyness, og i *E. coli* er det nonsenskodonet UGA som er mest leaky, etterfulgt av UAG og UAA som er minst leaky. Nonsensemutasjoner er mye mindre *leaky* enn missense og stille mutasjoner. Nonsense suppressorer er tRNA som gjenkjenner nonsensekodon og setter inn aminosyrer der translasjonen normalt sett ville stanset.

Baseparmutasjoner kjennetegnes ved at reversjon som gjendanner den opprinnelige sekvensen er mulig. I tilfellene der *rpsL* mutasjoner ga streptomycinresistens [61, 62] er det en også en teoretisk mulighet for reversering tilbake til villtype (lysin i det 42. kodonet) dersom det ikke lengre er seleksjon for streptomycinresistens. Sannsynligheten for spontan resistensmutasjon i kodon 42 i *rpsL* er oppgitt til  $10^{-10}$  til  $10^{-11}$  per basepar per generasjon [63] og sannsynligheten for reversering vil teoretisk sett være en del lavere, siden det er flere muligheter for å endre lysin (AAA, AAG) til treonin (ACA, ACT, ACG, ACC) eller asparagin (AAU, AAC) enn omvendt. De bredspektrede  $\beta$ -laktamasene (CTX-M-type) er avledet gjennom punktmutasjoner fra TEM-type and SHV-type  $\beta$ -laktamaser [64].

## Duplikasjonsmutasjoner

Ved duplikasjonsmutasjoner kopieres et genetisk segment fra et sted i DNA molekylet til et annet. Ved tandemduplikasjon følger kopien rett etter det kopierte området og kan oppstå ved rekombinasjon mellom påfølgende repeterte sekvenser. Duplikasjoner som strekker seg over ett eller flere gen fører til at ingen av genene inaktiveres, men spleises sammen og kan gi segmenter fra to gen i nye kombinasjoner [56], og kan sette et gen under kontroll av et annet gens reguleringsmekanismer.

Tandemduplikasjoner er ustabile og har en høy frekvens for reversjon. Dersom duplikasjoner blir opprettholdt (ved seleksjon for flere kopier av et gen) øker sannsynligheten for å danne mer permanente fordelaktige mutasjoner i genet, siden det vil finnes kopier som opprettholder den opprinnelige funksjonen, men samtidig gjør adaptive endringer mulig og nye gener kan oppstå. Duplikasjoner kan stabiliseres ved å forsterke et gens bidrag til fenotypisk respons ved å gi en genetisk doseringsfunksjon (*gene dosage*) [56]. Dersom fenotypen som forårsakes av det dupliserte genet er under positiv seleksjon, kan dette igjen øke og stabilisere antallet duplikater [56]. Dette kan blant annet øke nivået av resistens til et gitt antibiotikum, for eksempel der mengden av produsert  $\beta$ -laktamase er proporsjonal til antallet kopier av  $\beta$ -laktamasegenet [48].

Det finnes flere foreslåtte mekanismer for genduplikasjoner som kan gi sine bidrag til genamplifikasjon avhengig av kromosomlokasjon, seleksjonspress og lengden av duplikasjonen [56]. Repeterte sekvenser i kromosomet, og spesielt repetisjoner som følger direkte etter hverandre, slik som *rrn* operonene i *E. coli* og *Salmonella typhimurium* (LT2,) kan gi RecA medierte duplikasjoner ved *nonequal recombination* i størrelsesordenen ~3% av en hurtigvoksende populasjon [56, 65]. En annen mekanisme involvert i genduplikasjoner er den RecA avhengige *rolling-circle*-type mekanismen, men RecA-uavhengige duplikasjoner kan også oppstå gjennom andre prosesser enten helt i fravær av repeterte sekvenser, eller der disse er veldig korte [56]. Spontane genduplikasjoner er rundt hundre ganger vanligere enn alle andre mutasjonstyper [66] og i *Salmonella* regner man med en duplikasjonsfrekvens i området  $10^{-2}$  til  $10^{-5}$  pr celle pr generasjon [56].

Siden genduplikasjoner skjer ved en relativt høy frekvens kan genduplikasjon gi en hurtigvirkende, stokastisk prøv-og-feil variasjon av et stort utvalg av gener [56]. Der det er seleksjon for et duplisert gen, kan duplikasjonen gi en midlertidig løsning ved doseringsfunksjon og/eller høyere rate for påfølgende stabile mutasjonelle adaptasjoner [56]. Genduplikasjon kan virke som et mellomstadie i utviklingen av stabile tilpasninger som følge av de (mer) sjeldne punktmutasjonene [56]. Genduplikasjon kan på denne måten øke den

tilsynelatende mutasjonsraten siden duplikasjoner gir flere områder med mulighet for en fenotypeendrende mutasjon [48]. Positiv seleksjon vil bidra til å stabilisere genduplikasjoner som umiddelbart gir økt *gene dosage* [67]. Genduplikasjoner muliggjør bevaring av proteinets opprinnelige funksjon og samtidig evolusjon av nye funksjoner [67].

Raten for delesjonsmutasjoner av dupliserte sekvenser er høy. I fravær av antibiotikaseleksjon kan de kopiene som gir resistens permanent derfor mistes fra genomet. Gen som finnes i flere kopier eller allel (med høy grad av homologi) gir også flere muligheter for *gene conversion* som kan føre til at loci med resistensmutasjoner erstattes av et antibiotikafølsomt villtypeallel [58, 59]. Både delesjonsmutasjoner og *gene conversion* kan gi en reversering av resistens.

Ved miljøfaktorer som skader bakteriens genom er det sannsynlig at duplikasjonsratene vil øke siden lesjoner i DNA gir økte rekombinasjonsrater [56]. Ved infeksjon av en vert møter patogener et miljø med potensial til å skade DNA og høyere rater for genduplikasjon kan bidra til økt overlevelse ved uttalte DNA skader [56].

### **Frameshift mutasjoner**

Mutasjoner som adderer eller subtraherer baser og gir en endring i leserammen (*reading frame*) for translasjonen av mRNA kalles *frameshift* mutasjoner. Disse utgjør en stor del av alle typene mutasjoner som normalt kan oppstå og de inaktiverer som regel proteinet som det kodes for. Reversering er ikke uvanlig, men en mekanisme som kan undertrykke effekten av mutasjonen er en ny *frameshift* mutasjon som legger til eller trekker fra et basepar i nærheten av de opprinnelige mutasjonen og gjenoppretter den proteinkodende leserammen. Noen patogener har hyppige *frameshift* mutasjoner som gir variasjoner i gen for strukturer i cellens overflate som kan gi en viss beskyttelse mot vertens immunsystem.

### **Delesjonsmutasjoner**

Tusenvis av basepar kan fjernes fra bakteriens genom ved delesjonsmutasjoner. Genetiske sekvenser i ulike loci med stor grad av homologi kan rekombinere og føre til at sekvensen i mellom ”loopes ut” (ektopisk rekombinasjon). Flere steder i bakteriens kromosom er det repeterte sekvenser både fra *insertion sequence (IS) elements*, ribosomale gen eller andre *repeated extragenic palindromic (REP)* sekvenser [56]. Delesjonsmutasjoner inaktiverer vanligvis genproduktet, og kan spleise sammen deler slik at et gen kan komme under et annet gens kontrollmekanismer. Ved å markere genets navn med en delta  $\Delta$  foran angis det hvilke(t) gen som er inaktivert.



## **Inversjonsmutasjoner**

Inversjonsmutasjoner snur den en sekvens slik at den peker motsatt vei og kan skje ved rekombinasjon, for eksempel der den repeterte sekvensen er på samme DNA, men motsatt vei. Inversjoner kan revertere, enten som en sann reversjon som gjenoppretter nøyaktig samme sekvens, eller ved en tilnærmet reversjon. Inversjonsmutasjoner annoteres med IN etterfulgt av geneene der inversjonen er koblet sammen.

## **Insertion mutasjoner**

De vanligste *insertion* mutasjonene stammer fra *insertion sequences* (IS) som er korte sekvenser (ned til 600-700 bp) og som koder for en transposase som kan flytte IS elementet fra et genetisk loci til et annet [68]. IS element bærer ingen fenotypiske markører, i motsetning til større mobile genetiske element (MGE) som transposon, integron og genkassetter, eller *genomic islands*. Dersom IS eller transposoner flyttes inn i et annet gen, vil genet som regel inaktiveres. Påfølgende gener nedstrøms som normalt ville blitt transkribert på samme mRNA blir også inaktivert siden mutasjonen medfører polaritet på grunn av sine transkripsjonsterminerende steder (*sites*). Dersom nøyaktig samme sekvens fjernes kan sann reversjon skje. Navngivning av *insertion* mutasjoner begynner med navnet på genet som har fått *insertion* etterfulgt av :: (to kolon) og navnet på den innsatte sekvensen. Konstruerte gener får på samme hvis navnet fra genet som *insertion* befinner seg i, men med  $\Omega$  (greske bokstaven omega,) etterfulgt av :: (to kolon) og navnet til den innsatte sekvensen.

Antibiotikaresistens kan også oppstå ved mutasjoner som inaktiverer gen som er involvert cellulære prosesser som styrer opptak av antibiotika over cellevegg (for eksempel poriner) eller der genproduktet er nødvendig for å gi effekt av antibiotika (for eksempel prodrug-aktivering). Inaktivering av genet *rdxA* gjør den mikroaerofile *Helicobacter pylori* resistent mot metronidazol. RdxA aktiverer den baktericide effekten av metronidazol, men i motsetning til sine homologe nitroreduktaser i anaerobe arter (pyruvat:ferredoxin oxidoreduktase system) så er ikke *rdxA* essensiell for *H. pylori* og resistens er ikke uvanlig [69].

## **Suppresjon av mutasjon**

Suppresjon av effekten av en mutasjon kan oppstå på forskjellige måter og ligner fenotypisk en reversering. En type suppresjonsmutasjon kan skje innad i den muterte gensekvensen som gjenoppretter funksjonen av genproduktet, for eksempel ved en ny *frameshift*-mutasjon som gjenoppretter leserammen eller en ny aminosyresubstitusjon som

gjenoppretter genproduktets funksjon. Andre suppressjonsmutasjoner kan oppstå i andre *loci* og gjenopprette en mutert funksjon. En viss toleranse for *nonsense* mutasjoner kan *nonsense suppressor* tRNAene gi. Disse er funksjonelle tRNA, men med komplementære bindinger til nonsense kodonene (UAA/UAG/UGA) og kan hindre terminering av proteintranslasjon som følge av et uriktig plassert nonsense kodon i en mutert sekvens. Kompensasjonsmutasjoner kan kanskje også kalles suppressjonsmutasjoner som demper den biologisk kostnaden som kan følge ved ervervelse av antibiotikaresistens.

### **Horisontal genoverføring**

Horisontal genoverføring (HGT) mellom bakterier muliggjør evolusjonære kvantesprang [70] der ”klar-til-bruk” resistensgener spiller en sentral rolle i utviklingen av klinisk resistente patogener. Bakterier trenger som kjent ikke å fusjonere flere celler med påfølgende genetisk rekombinasjon for videreføring av sin art [71]. Nye generasjoner kommer direkte fra binær celledeling, med replikering av hele det bakterielle kromosomet, og eventuelle tilstedeværende plasmid har i tillegg egne strategier for vertikal videreføring. Morcellen blir slik til to nye datterceller der begge har kopier av det opprinnelige arvematerialet. Forskjeller kan oppstå ved mutasjoner eller dersom plasmid mislykkes i å fordele seg til begge dattercellene. Plasmider kan overføres fra en donorcelle til en plasmidfri resipientcelle gjennom HGT. Dette gir grunnlag for rask bakteriell evolusjon som i forhold til mutasjoner kan introduserer en bakterie for nye gen over 10 000 ganger raskere [72]. Den horisontale arveligheten blant prokaryoter er derfor av spesiell betydning for adaptiv evolusjon [73] og den naturlige promiskuøsiteten bakteriell HGT tillater gjør at lokalt tilpassede (adaptive) gen har mulighet til å spre seg over store fylogenetiske avstander, både mellom arkebakterier, Gram-positive og Gram-negative, og i noen tilfeller mellom prokaryote og eukaryote celler [74]. En tilpasning av slektstreets struktur iberegnet HGT sammenkobler deler av grenene i ’livets spindel’ [75]. Ratene for HGT blant naturlige populasjoner er omdiskutert, men selv lave frekvenser for HGT øker den genetiske variasjonen i bakteriearter [73], kanskje som en følge av at skadelige mutasjoner i mindre grad videreføres via HGT enn adaptive mutasjoner [53] noe som igjen gir raskere akkumulering av funksjonell variasjon når de introduseres i nye genetiske bakgrunner. Gunstige mutasjoner som har oppstått i flere individuelle bakterier i kan slik samles gjennom HGT [73] og gen med naturlig funksjonell tilhørighet har tendenser til å samles i operon og genetiske øyer (GØ) [53].

HGT kan også bevare en del av det genetiske mangfoldet i situasjoner kjent som selektive sveip (*selective sweeps*) eller periodisk seleksjon, der en mutant eller en nyankommet stamme med høyere fitness tar over og erstatter en opprinnelig populasjon. Ved en høy grad av seksuell isolasjon vil klonal overtakning erstatte alle allelene i den opprinnelige populasjonen dersom ikke noe tas opp gjennom HGT av høy-fitness klonen [73]. Periodisk seleksjon eller selektive sveip der en antibiotikafølsom stamme erstatter en antibiotikaresistent populasjon kan gi en form for reversering av resistens i en populasjon. HGT kan forhindre tap av genetisk variasjon som en følge av selektive sveip, og kan slik videreføre adaptive gener inkludert resistensdeterminanter, dersom disse er lokalisert på mobile genetisk element (MGE) [76].

Ved å tilegne seg DNA fra naboceller kan bakterien få muligheter til å utvide sin økologiske nisje [73]. Nisjeekspansjon kan gjøre at bakteriene unngår direkte konkurranse om de samme ressursene [71]. Klinisk relevant nisjeekspansjon kan oppstå når normalt uskadelige bakterier blir patogener ved opptak av virulensgen [70, 71]. For tilfellet der HGT gir bakterien muligheter til å entre en patogen livsstil, vil den nye nisjen kunne stimulere til ervervelse av enda flere patogenisitetselement [71] og trolig også andre gen som kan øke overlevelsessevnen, for eksempel gen for antibiotikaresistens.

I forbindelse med antibiotikaresistens er det bekymringsverdig at resistensdeterminanter som eksisterer i normalfloraassosierte, kommensale organismer kan overføres til mer patogene stammer [73]. Høy grad av persistens for resistensmekanismer i normalfloraen [59] og et enormt mangfold av resistensmekanismer [77] bidrar til at potensielle patogener kan passere (også asymptomatisk) gjennom gastrointestinalesystemet relativt hurtig (i løpet av 24 – 48 timer) og erverve resistensmekanismer på veien [47]. Normalfloraen i gastrointestinalesystemet kan fungere som et reservoar av resistensgen [47] og er blitt sammenlignet med <<bakterienes svar på eBay<sup>3</sup>>> [47]. Gendelingen mellom bakteriene som oppholder seg i gastrointestinalesystemet er videre også omtalt som ”(...) *ad libitum*: it’s a bordello down there” [18]. Kompleksitetsgraden for sammenhengene i spekteret fra godartete interaksjoner mellom vert og normalflora til klinisk relevante patogener og mobilitet av antibiotikaresistens understreker viktigheten av grunnforskning som kan belyse hvilke muligheter som finnes for nye løsninger av terapeutisk verdi.

---

<sup>3</sup> eBay rommer et enormt utvalg av ”splitter nye 2ndhand” produkter

## Transformasjon

Naturlig transformasjon av bakterier forutsetter at bakterien har *competence*-egenskaper, som er mekanismer for opptak av fritt ekstracellulært DNA. Mer enn 70 stammer [78] eller om lag 1% av kjente prokaryotiske arter [68], er kjent for å ha naturlig *competence* og inkluderer også flere patogener [68, 78]. Opptak av ekstracellulært DNA medieres av 20 – 50 proteiner i slekt med type IV pili, type II eller type IV sekresjonssystemer [55] og kan ta opp (translokere) DNA over celleveggen. Flere arter har en form for sorteringsmekanisme for ekstracellulært DNA på bakgrunn av homologi og tar fortrinnsvis opp DNA kun fra beslektede kilder [78]. DNA kan gjenkjennes med signalsekvenser (*DNA uptake sequence* (DUS) eller *uptake signal sequence* (USS) [55, 68, 78]). Sekvensene består av repeterte motif mellom 9 – 11 bp lang [68] og finnes spredt rundt i hele kromosomet til arter som *Neisseria gonorrhoeae* og *Haemophilus influenzae* [55, 78] med 4 – 5 kb mellomrom [68] slik at sannsynligheten er stor for at signalsekvensen er tilstede i DNA fragmenter av en hvis størrelse [55].

For noen arter slik som *Streptococcus pneumoniae* er *competence* sekvensuavhengig, men tidsbegrenset [78] og koordinert av peptidbaserte feromon [79, 80] som reflekterer faktorer som vekstforhold, tilgang til næringsstoffer, og celletetthet som kan signaliseres av feromoner og quorum-sensing [68]. Andre arter som tar opp DNA på tvers av slektskap er blant annet *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter* spp. [78], *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri* [81].

Bakteriene har flere mulige nytteverdier av å ta opp ekstracellulært DNA [78]. To rådende ikke-ekskluderende modeller eksisterer: DNA som tas opp fra omgivelsene kan brukes som en kilde til mat eller til brukes som bakterienes ”sex”: reparasjon av skadete gener, ervervelse av nye gener, eller for å øke det genetiske mangfoldet [78]. Når aktivt opptak involverer en omdanning av *doublestranded* DNA (dsDNA) til *single-stranded* DNA (ssDNA) betyr det at halvparten blir igjen utenfor cellen, som i alle tilfeller reduserer nytteverdien av å ta opp DNA som mat [78]. I mange tilfeller beskyttes ssDNA mot nedbrytning ved binding til SSB og RecA [78] som også øker sannsynligheten for ivaretagelse og integrering i eksisterende genstrukturer [78].

Det kan være at DNA som tas opp brukes til forskjellige ting, avhengig av bakterie (art) og integriteten til DNA. Forutsetningene for aktivisering av *competence* kan variere mellom ulike arter og reflekterer ofte fysiologiske tilstander, for eksempel *Streptococcus pneumoniae* aktiverer *competence* ved høye nok konsentrasjoner av spesifikke feromoner. Arter innen slektene *Acinetobacter*, *Deinococcus* og *Neisseria* viser *competence* gjennom hele

logaritmiske vekstfase, mens *Bacillus subtilis* viser *competence* ved inngangen til stasjonærfase [78], med unntak av *Neisseria gonorrhoeae* og *N. meningitidis* som konstitutivt uttrykker *competence* gener [78]. Tilstedeværelse av ekstracellulært DNA synes ikke å ha noen direkte innvirkning på *competence* aktivering [78].

Nytteverdien av den genetiske informasjonen som tas opp kan hende varierer med integriteten av det ekstracellulære DNA. Man regner fragmentert og ødelagt DNA som en viktig næringskilde for bakterier [82], og det kan det være så mye som 14 500 tonn DNA som flyttes i sedimenter fra elvestrømmer hvert år [82]. Antagelig vil dette i stor grad stamme fra nedbrytning av døde celler. Noen arter, inkludert rundt 80% av gonokokker (som innehar den genetiske øyen *gonococcal genetic island* (GGI) [78]) donerer DNA ved aktiv sekresjon [68]. Andre kilder til DNA i omgivelsene er fra DNA inkorporert i ekstracellulære vesikler [83], og DNA som inngår i biofilmstrukturer [68].

Hastigheten for nedbrytning av nakent DNA i miljøet avhenger av hvordan de fysiologiske omgivelsene bidrar med reaktive kjemikalier, tungmetaller, UV stråling og nukleaser som kan bryte ned DNA [68, 72]. Adsorpsjon til kolloide partikler i leire og sand kan øke stabiliteten av nakent DNA [72], og DNA omsluttet av en proteinkappe har god stabilitet [72]. Nedbrytningshastigheten kan påvirkes av cellulære nukleaser i cytoplasma fra lyserte celler frigjort sammen med DNA [82]. Nukleaser i kroppsvæsker og blod kan også bryte ned DNA fra lyserte bakterieceller [68].

Til sammen bidrar de biokjemiske, kjemiske og fysikalske prosesser til at fritt DNA i miljøet for det meste er <100 bp [82]. Større DNA ( $\geq 10000$  bp) er kjent for å kunne gi transformasjon [82], men transformasjonspotensialet til veldig korte DNA fragment er likevel tilstede og kan skje ved RecA-uavhengig inkorporering i lagging-strand under DNA replikasjon [82]. Transformasjon forutsetter således ikke at donor og resipient må være til stede i samme tid og i samme rom [82].

### *Konjugering og transduksjon*

Til forskjell fra transformasjon som innebærer aktivt opptaks av fritt DNA hos resipienten, er overføring av DNA gjennom konjugeringssystem knyttet til egenskaper hos donorcellen. Ved konjugering overføres DNA fra donorcelle til resipient og medieres av en celle-til-celle kontakt og en porestruktur som DNA kan passere igjennom [68]. Den tredje måten for horisontal genoverføring (HGT) er gjennom transduksjon der feilpakking av bakteriofager med bakteriegener gjør at de overføres med viruspartikkelen til en ny bakterie (resipient) [72]. Konjugering er en spesielt effektiv overføringsmekanisme for relativt små

genetiske element [68] (1 kb – 100 kb). Plasmid og integrative konjugative element (ICE), også omtalt som konjugative transposon kan spleises ut av kromosomet og mobiliseres for konjugering [68]. Konjugasjon i Gram-negative bakterier avhenger av en sammensatt gruppe på om lag 15 - 20 proteiner som er bestemt av *tra* (transfer) gener som står for overføringen av DNA. For selv-mobiliserende konjugative element (enten plasmid eller integrative konjugative element (ICE) / konjugative transposon) må komponenter for både *mating-pair formation* (Mpf) og *DNA transfer and replication* (Dtr) være aktive, og disse kan også mobilisere plasmid som mangler Mpf, men som har Dtr komponenter (relaxaser) som gjenkjennes av koblingsproteinene til et sameksisterende selv-mobiliserende element [84].

Mpf systemet holder cellene samlet og kommuniserer via *coupling* proteiner til Dtr systemet om etablering av celle-til-celle kontakt. Mpf systemet består av pilus, poreformasjoner som DNA passer gjennom, og *coupling*-proteiner som gjenkjenner kompatible relaxaser basert på signalsekvenser i relaxasens aminosyrekjede. Pilusformasjon hos Gram-negative bakterier er nært beslektet med type IV sekresjon [68].

Dtr systemets relaxase kutter en av DNA trådene i et område (*nic*) og relaxasen sammen med resten av relaxosomet bruker helicaseaktivitet til å overføre en tråd *single stranded DNA* (ssDNA) til resipienten, mens den andre tråden blir igjen i donorcellen. Når relaxasen og den ene tråden (ssDNA) er overført, resykliseres i tilfellet med plasmid, DNAet og primasene i den nye verten, eventuelt overført fra donor, (eller på annet hvis) lager primere som kan initiere polymeriseringen tilbake til *double stranded DNA* (dsDNA).

Integrative konjugative element (ICE) som er lokalisert i bakteriens kromosom kan spleises ut fra en bakteries kromosom, uten å ta med seg kromosomale gener, overføre en kopi (ssDNA) via konjugering på samme hvis som selvmobiliserende plasmid, for siden å integreres inn i resipientbakteriens kromosom, gjennom en *site-specific* rekombinasjon. Noen ICE (konjugative transposon) er promiskuøse og kan inneha resistensdeterminanter.

Mobiliserbare plasmid koder for funksjoner som trengs for mobiliserbarhet utenom Mpf systemet som gjør at de ikke er selv-mobiliserbare, men trenger et annet selv-mobiliserbart konjugativt element tilstede, med koblingsproteiner som gjenkjenner relaxasen til det mobiliserbare plasmidet. Et *oriT* område som korresponderer til *tra* genene til selvmobiliserbare konjugative element, i tillegg til det mobiliserbare plasmidets eget Dtr system, gjør at mobiliserbare plasmid kan få ”haik” ved overføring av selv-mobiliserende konjugative element. Dtr systemet og *oriT* området til mobiliserbare plasmid kalles *mob* genene og *mob* området, men har tilsvarende funksjoner som for selv-mobiliserbare element.

Konjugeringsmekanismene for plasmid i Gram-positive bakterier baserer seg også på *cis*-aktive *oriT* sekvenser og et Mpf system (som ha en enklere oppbygging enn systemene for de Gram-negative på grunn av forskjellene i celleveggoppbygningen,) men finnes i flere variasjoner.

Hos enterokokkene er også noen av plasmidene promiskuøse [68], men mest kjent er feromoninduserte plasmidene. Dette systemet baseres på at plasmidfrie kompatible resipienter skiller ut spesifikke feromon som tiltrekker seg bakterier med bestemte plasmid. Donorceller som har et feromonindusert konjugativt plasmid starter konjugering som en respons på at plasmidfrie resipienter skiller ut et feromon som er spesifikt for det aktuelle plasmidet. Feromonproduksjonen for det aktuelle plasmidet opphører etter at resipienten har mottatt plasmidet. Peptidferomonene begrenser hvilke bakteriestammer som er potensielle resipienter [68]. Noen patogene arter slik som *Staphylococcus aureus* er kjent for å kunne erverve plasmidkodet resistens gjennom utskillelse av feromon for tiltrekning av enterokokkplasmid. Glykopeptidresistens (vankomycin) er en spesielt uheldig resistenstype som dersom den erverves av methicillin/ multiresistente *S. aureus* (MRSA,) kan gi infeksjoner som vanskelig lar seg behandle [68].

Plasmidene er ekstrakromosomale *replicons* (genetiske element som kan replikeres autonomt; i motsetning til ICE som må replikeres sammen med kromosomet). Plasmidene arves vertikalt og er mange er i tillegg horisontalt overførbare, og spiller dermed viktige roller i spredning og evolusjon av adaptive tilpasninger inkludert egenskaper som gir antibiotikaresistens.

Miljøet i en økotype og tilhørende supergenom kan være viktig for evolusjonen av bakterien, og fellesgenene (*common gene-pool*) kan være sterkt knyttet til miljøet i en økotype [72]. En økotype kan også defineres som rekkevidden for kloneovertakning og selektive sveip [76]. Under selektive sveip kan plasmid unngå utrydding ved å overføres til invaderende kloner [76], noe som kanskje vil bidra til at plasmidene forblir økotypespesifikke med variasjoner i felles genene i ulike økotyper. Konjugative plasmid kan pendle mellom bakterier med lokale tilpasninger for en spesifikk økotype og opprettholde flyt i supergenomet [72] (og forflytte mobiliserbare plasmid uten egne overføringsgener.) HGT kan derfor være en viktig forklaringsmodell for hvordan bakteriekromosomene er blitt så kompakte siden en fjerdedel av bakteriens genrepertoar godt kan finnes lokalisert på flere (~20) ekstrakromosomale element [72]. Når en bakterie mister et plasmid (*curing*) som har resistensdeterminanter kan det i praksis skje en revertering tilbake til sensitiv fenotype.

Kjennskap til mekanismene som bidrar til stabiliteten av plasmidene danner et grunnlag for forståelse av eksistensvilkårene for plasmidene [76]. Genetiske element som sprees utelukkende vertikalt sammen med vertsorganismen vil øke i frekvens dersom elementet samtidig øker vertsorganismens fitness [85]. På samme vis kan mer egoistiske / parasittiske plasmid som baserer seg hovedsakelig på HGT i større grad tolerere reduksjon i vertscellens fitness så lenge overføringsraten overstiger raten for tap av elementet som følge av segregering eller redusert vekstrate i vertscellen [85]. Dersom det genetiske elementet sprees uavhengig av vertscellens reproduksjon vil det øke i frekvens så lenge vertsorganismen er i stand til å spre elementet [85].

Resistensfrekvens i bakteriepopulasjoner der resistensdeterminantene er lokalisert på plasmid (omtalt heretter som R-plasmid) avhenger av hvor ofte R-plasmidet klarer å overføres horisontalt og vertikalt i bakteriepopulasjonene. Mekanismene plasmidene tar i bruk for vertikal videreføring varierer gjerne om plasmidet finnes i mange kopier i en celle (high copy number > 100 kopier), middels (10- 50 kopier) eller er stabilt med bare noen få kopier (low copy number 1 – 5 kopier) [86]. Plasmid som det bare finnes noen få kopier av må sikre seg fordeling til begge dattercellene med egne *partitioning* system, mens plasmid med mange kopier vil med høyere sannsynlighet havne ved tilfeldig fordeling i begge dattercellene. Konjugative plasmid har som regel egne *partition* mekanismer og eksisterer i relativt få kopier.

Plasmid med mange kopier er av spesiell betydning for resistensevolusjon. For i praksis vil flere kopier av et gen føre til høyere mutasjonsrater og større sannsynlighet for adaptiv evolusjon, på linje med genduplikasjoner i bakteriens kromosom [72]. Det finnes flere ulike mekanismer for regulering av antall plasmidkopier som dannes per bakteriecelle (replikasjonskontroll). Hurtig replikering til optimalt antall kopier kan medieres gjennom proteinbaserte reguleringsmekanismer som påvirker antall plasmid i en bakterie, siden disse i tiden rett etter at plasmidet entrer en ny vertscelle, vil gi deregulert replikasjon inntil konsentrasjonen av nydannede kontrollprotein igjen kan påvirke replikasjonen [72].

Dersom flere plasmid bruker samme mekanisme for replikasjonskontroll, vil summen av alle plasmidene bli den samme som et plasmid alene ville hatt. Da øker sannsynligheten for at det blir en ujevn fordeling og til sist vil noen av dattercellene miste et av plasmidene (*curing*). To plasmid sies å være i samme inkompatibilitetsgruppe dersom de ikke kan stabilt sameksistere i samme bakteriecelle. Også plasmid med samme type *partitioning* system vil tilhøre samme inkompatibilitetsgruppe og ujevn fordeling til dattercellene fører til *curing*. Likevel kan plasmid som er i samme inkompatibilitetsgruppe sameksistere for en tid dersom



det er sterk seleksjon for determinanter på begge plasmidene (for eksempel antibiotikaresistens). I tillegg er plasmid ofte utrustet med dedikerte rekombinasjoner som bidrar til plasmidstabilitet ved å kunne løse opp eventuelle *multimerformer* og *catenener* (kjededannelse) som kan oppstå under replikering.

Reguleringsmekanismer kan hindre mer enn en overføring av den samme typen plasmid til samme bakteriecelle. Forbigående høye konjugasjonsrater fra vertsceller som nylig har mottatt plasmidet fører til en hurtig spredning av plasmid gjennom en tidligere naiv populasjon. *Entry exclusion* mekanismer fra plasmid forhindrer cellen i å ta i mot flere kopier av plasmid med samme ekskluderingsmekanismer.

Biologiske kostnader for plasmid kan reduseres ved en co-evolusjon i vertscellen der andre deler av bakteriens genetiske bakgrunn gir kompensasjonsmutasjoner [76]. Initiale kostnader for gener ervervet gjennom HGT kan komme av de fysiologiske forstyrrelsene ved introduksjonen av flere nye biokjemiske synteseveier [58].

Plasmid i likhet med andre genetiske element som er overført ved konjugasjon og transformerte DNA, entrer resipientcellen i ssDNA-form. Økte intracellulære konsentrasjoner med ssDNA er også et fysiologisk tegn på DNA skader som kan oppstå ved problemer med DNA replikasjon. RecA er en rekombinase som trolig har bindingskapasitet for til sammen tre DNA-tråder, og danner initialt heliksformede filament med ssDNA som ”skanner” dsDNA for homologe områder, og fasiliterer homolog rekombinasjon [87]. Hovedfunksjonene til RecA er i reparasjon av skadet DNA der replikasjonsgaffelen har låst seg og stoppet opp [87]. Høyere konsentrasjoner av ssDNA tyder på massive, omfattende DNA skader og fører til aktivering av SOS respons, ved at ssDNA/RecA nukleofilament gir autoproteolyse av transkripsjonshemmeren LexA [87]. Dissosiering av LexA starter transkripsjon av SOS-respons genene. Funksjoner for å hindre aktivering av SOS-respons kan motvirke at plasmidet rekombinerer med kromosom eller andre replikon og øke plasmidets stabilitet, siden den økte rekombinasjonsraten etter aktivering av SOS-respons kan er en potensiell trussel for plasmidets autonome replikasjon, siden rekombinasjon med andre genetiske element kan føre til tap av replikasjonskontroll og integritet av plasmidstrukturen [72]. Plasmidkodete faktorer som hindrer aktivering av SOS respons gir økt stabilitet for plasmidet [72].

De viktige rollene plasmidene har i spredning av adaptasjoner til bestemte økotyper gjør plasmidene betinget fitnessøkende, og det vil også være miljø der det ikke er seleksjon for de adaptasjonene plasmidet gir og bakteriecellen vil klare seg best uten [58]. Plasmid kan betraktes som genetiske symbionter, som tidvis også medfører biologisk kostnad og parasitterer sine mikrobielle vertsceller [58]. Flere ”superegoistiske” løsninger kan endog

sørge for ivaretagelse av plasmidet. En av de mest iøynefallende mekanismene er *plasmid addiction systems/post-segregational killing* (PSK) der toksin-antitoksin (T-A) moduler på plasmidet sikrer at celler som har mistet plasmidet ikke overlever [44, 71]. Antitoksinet degraderes raskere enn toksinet, som vil gi ulemper for en *cured* bakterie når den eventuelt slipper opp for antitoksin [44]. Egoistiske / parasittiske plasmid kan vedvare dersom konjugeringsraten er høy nok til å veie opp for plasmidtap gjennom negativ seleksjon på vertscellene og plasmidtap ved segregering [58, 76]. Plasmidfrie individuelle celler kan i spesielle tilfeller dra fordeler av sine plasmidbærende naboceller uten selv å måtte bruke ressurser på plasmidet. Dersom gunstige effekter når ut til ekstracellulære rom, i form av en type fellesgoder [88], kan infeksjons spredning av plasmidet refordere eventuelle kostnader knyttet til produksjonen av for eksempel sekresjon av  $\beta$ -laktamaser [88].

Ekstra kostnader for selvstendig replikerende ekstrakromosomale elementer kan gjøre at plasmidkodete gen som opplever en stabil positiv seleksjon vil tjene på å flyttes inn i bakteriens kromosom. Miljøforandringer i en økotype eller selektive sveip av en invaderende høy-fitness kloner opprettholder HGT-funksjoner for MGE [76]. Det er antagelig omfattende intracellulær genutveksling mellom kromosom og plasmid [53] og i statiske miljø vil fitnessøkende plasmid miste sin semiautonome natur og de nyttige genene blir å flyttes inn i kromosomet som av og til gir opphav til genomiske øyer (GØ) [76, 88]. Klonal overtakning og selektive sveip bidrar til at plasmidenes mobilitet bevares [76].

### *Ivaretagelse av horisontalt overførte gener*

For alle DNA molekyler introdusert gjennom HGT vil det være enkelte likheter blant prosessene som avgjør hva som skjer videre med det mottatte DNA molekylet. En mulighet er at DNA molekylet brytes ned på en måte som gjør at informasjonen i basesekvensene går tapt [68]. I slike tilfeller vil introduserte resistensdeterminanter forsvinne. Vedlikehold og bevarelse av informasjonen i de overførte genene er avhengig av at det introduserte DNA-molekylet først unngår nedbrytning [74]. Bakterier har beskyttelsesmekanismer mot potensielt skadelig DNA for eksempel fra bakteriofager. Restriksjons – modifikasjons (R–M) systemene består av endonukleaser som gjenkjenner definerte sekvenser på mellom 5 og 8 basepar (bp) [74] og bryter kovalente bindinger i DNA-molekylets ryggrad og gir kortere DNA fragmenter som enklere kan degraderes videre av eksonukleaser [74]. R–M system har større betydning for dsDNA som mottas for eksempel gjennom transduksjon via bakteriofager, enn for ssDNA fra konjugasjon og transformasjon [68] som også kan

stabiliseres av *single-stranded binding proteins* (SSB) [74]. Mottatt ssDNA som gjendannes til dsDNA vil i større grad kunne påvirkes av R–M systemene [68]. Antirestriksjonsmekanismer kodet på introdusert DNA kan gi økt beskyttelse mot vertens R–M system [72].

For stabil videreføring må mottatte DNA kunne replikeres. Dersom det mottatte DNAet er fra et plasmid vil resirkularisering og resyntese av den andre DNA-tråden kunne gjenopprette autonom replikering.

Integrering ved homolog rekombinasjon er spesielt aktuelt for transformert DNA og kan skje mellom de nye genene og mottagerens genom dersom regioner på 25 – 200 bp viser høy grad av homologi (>75%) og utveksling av DNA strenger (*strand exchange*) stabiliseres av basepaddannelse [68]. Rekombinasjonsfrekvensen avtar med økende grad av divergens [68, 81] som en følge av at homolog rekombinasjon (HR) mellom to DNA-molekyl som regel er RecA mediert og begrenses av *mismatch-repair* (MMR) system som fører til avtagende (log-lineære) rekombinasjonsrater ved økte sekvensforskjeller [81]. Dersom det mottatte DNA-molekylet har områder med sekvenslikheter (homologi) på mer enn 200-300 (gjærne ~1000) nukleotider [81], men ellers er heterolog i forhold til resipientens DNA, kan homologifasilitert ikke-homolog/*illegitimate* rekombinasjon (HFIR) skje, men ~100 ganger sjeldnere enn for 'vanlig' homolog rekombinasjon (HR) [81]. HFIR kan introdusere heterologt DNA mer effektivt enn ikke-homolog (*illegitimate*) rekombinasjon (IR) som trolig ~100 ganger sjeldnere enn HFIR [81]. Homologifasilitert dobbelte ikke-homologe/*illegitimate* rekombinasjon (HFDIR) er også beskrevet [81], og fasiliteres av et homologt område med heterologe sider [81]. Ikke-homolog (*illegitimate*) rekombinasjon (IR) er av mindre praktisk betydning tatt i betraktning hvor sjeldent det inntreffer [68]. Dersom translokert DNA er flankert med sekvenslikheter på begge sider, skjer integrering oftere og kan involvere elementer på flere kb [68]. Additiv integrering er vanligst mellom to sirkulære DNA eller sirkulært DNA inn i bakteriens kromosom [68]. Rater for additiv rekombinasjon øker ved sekvenshomologi >25 bp og opp til et platå ved 200 bp [68] og det er mulig at additiv integrering av sirkulære genetiske element skjer relativt hyppig [68].

I en bakterie kan gener bevege seg mellom forskjellige *replicons*. De molekylære verktøyene for genmobilitet er rekombinaser som bidrar til homolog rekombinasjon, og resolvaser (som gir *resolution* av Holliday junctions), samt homologiavhengig *site* spesifikke rekombinaser / transposon, og integraser [72]. Genomdynamikken i en bakterie kan endre seg som følge av manglende DNA-reperasjonsfunksjoner [55], og de økte rekombinasjonsrater kan gi hypermutatorer tilgang til andre deler av fellesgen-bassenget [68]. Homologiavhengig *site* spesifikke rekombinaser (transposaser og integraser) [72] øker mutasjonsraten ved å

mobilisere transposable elementer [50]. Antibiotikaeksponering har vist seg å kunne mobilisere resistensgen. I et tilfelle er det beskrevet en samtidig stimulering av uttrykk og overføring av tetrasyklinresistens fra RteA-RteB systemet ved eksponering til tetrasyklin [47].

Ivaretagelse og persistens av horisontalt overførte gen avhenger i tillegg av at genproduktet er funksjonelt i resipientens genetiske bakgrunn [74], kanskje også fordi ubrukte gen ikke vil oppleve en positiv seleksjon og etter en tid vil bli fjernet [51, 71]. I følge kompleksitetsteorien vil den evolusjonære hastigheten for hvor raskt et gen vil forsvinne fra en populasjon, avhenge av hvor komplekse interaksjonene til genproduktet er [51]. Hastigheten av prosessene for integrering av ett enkelt gen inn i et regulatorisk interaksjonsnettverk styres av hvor mange partnere genproduktet har i nettverket [51] og vil mest sannsynlig innta en perifer plass [51]. Forskjellen i kompleksitetsgraden til genproduktene fra kjernegenene og tilleggs-genene samsvarer med fylogenetiske slutninger om HGT-ratene for kjernegen og tilleggs-gen (kjernegen overføres sjeldnere) [89]. Gener for produkter med få interaksjoner fjernes også lettere fra bakteriens genom [51]. Hurtig funksjonsoppnåelse, integrering og ivaretagelse muliggjøres dersom overført DNA inneholder komplette operoner [51]. Gen som har funksjoner som naturlig hører sammen kan samles i operoner (*selfish operon theory* [53]) på mobile genetiske element, noe som øker sjansen for vellykket integrering i en resipient [53]. *Genomic islands* – genomiske øyer (GØ) er mobile genetiske element på 10 – 100 kb som med sin størrelse og mobilitet muliggjør ”evolusjon i kvantesprang” ved å integrere potensielt radikalt adferdsendrende determinanter i bakterielle kromosom [70]. Avhengig av hva slags økotype bakterien befinner seg i, samt den genetiske sammensetningen til den aktuelle GØ og bakteriens genetiske kontekst (livsstil) vil funksjoner fra GØ kunne deles inn basert på mulige interaksjoner mellom bakterier og vert [70]. Symbiotiske GØ tjener begge parter, saprofyttiske GØ gagnar i hvert fall én og er ellers ganske nøytral, mens interaksjoner fra patogenitetsøyer (PAI) medfører kostnader for verten ved vekst av patogenet. For bakterier som eksisterer fritt i miljøet er det gjerne snakk om økologiske øyer [70]. Genomiske øyer (GØ) er eksempler på bakteriens fleksible genrepertoar som har en oppsamling av funksjonsrelaterte gen [53] og kan muliggjøre nisjeekspansjon for resipientbakterier [90].

Utviklingen av resistens som en følge av antibiotikaseleksjon er en form for retningsbestemt utvikling, som kan visualiseres som en evolusjonær forflytning gjennom bunnen av en dal, med lavere fitness og større biologiske kostnader knyttet til resistens. Den er retningsbestemt siden seleksjonspresset effektivt forhindrer videreføring av bakterier som forblir antibiotikafølsomme (unntaket kan være persistere), og er omtalt som et klassisk

eksempel for illustrasjon av Darwins evolusjonsteori ”tilpass eller forgå” [91]. (Konkurranseselementet som fremtones i ordlyden av dette sitatet som er kreditert Herbert Spencer: ”Survival of the fittest”, er i mange tilfeller tonet ned i moderne forståelser av evolusjonsteori, der nøytrale elementer er inkludert [52], og nisjeekspansjon heller enn konkurranse fører til et rikere mangfold og variasjon [71].) Den opprinnelige fitnessstoppen som den antibiotikafølsomme villtype var assosiert med kan være høyere enn andre fitnessstopper som ivaretar resistens. Likevel er sannsynligheten for retur tilbake til en høyere sensitiv fitnessstopp mindre for hver enkeltmutasjon som må revertere for å komme tilbake til utgangspunktet med sensitivitet. Sannsynligheten for reversjon minker også i takt med kompensasjonsmutasjoner som tilpasser organismen til resistensfenotype ved å gi organismen en høyere fitnessstopp som på samme tid kan ivareta resistensdeterminantene, men med mindre kostnader [60]. I de tilfellene der reversjon av enkeltmutasjoner medfører økte kostnader, så blir den initiale økte kostnaden for reversering en barriere for spontan reversjon av resistens [60]. Selv om reduksjon av fitness ville vært av en forbigående natur og på sikt redusert kostnadene og øke fitness ytterligere er det ingen tilsvarende retningsbestemmende seleksjon for reversering, slik som antibiotikaseleksjon innebærer for utvikling av resistens. Sannsynligheten for ”sann” reversering er derfor lavere. For elementer ervervet gjennom HGT kan det også skje kompensasjonsevolusjon som gjennom kromosomale tilpasninger øker fitness for bakterier med plasmid i forhold til tilsvarende plasmidfrie segretanter [92].

### ***Prevalens av antibiotikaresistente bakterier i humanpopulasjoner***

Man kan anta forskjellige mekanismer for reversering avhengig av om man ser på åpne system eller lukkede system. I åpne system kan resistente bakterier erstattes av antibiotikafølsomme ved at en høyere andel sensitive bakterier ”fortynner ut” de resistente bakteriene [58]. Blant åpne system regner man små epidemiologiske enheter som blant annet sykehus og sykehusavdelinger som så lenge det tilførende miljøet har lavere resistensfrekvens [93] vil føre til en netto strøm av antibiotikafølsomhet inn og resistens ut [58].

Resistens kan nødvendigvis bevege seg begge veier, også fra samfunnet og inn i sykehusene [27] og det høye antibiotikaforbruket kan gjøre at bakterier utvikler resistens mens pasienten er på sykehuset. Menneskets normalflora kan til en viss grad betraktes som et åpent system med en netto tilførsel av antibiotikafølsomme organismer fra miljøet, og der en del av normalfloraen tilbakeføres til miljøet [93]. Pasienter i en sykehusavdeling kan også motta resistente bakterier ved overføring fra andre pasienter eller via helsepersonell.

Epidemiologiske data fra sykehus har vist sammenfallende reduksjon av resistensfrekvenser etter innføring av retningslinjer for endret antibiotikabruk [27]. Tidsaspektet for reversering i åpne system kan være mye bedre (uker – måneder,) enn for lukkede system, der reversering avhenger utelukkende av biologisk kostnad og antagelig vil ta lengre tid (måneder – år) [59].

Miljøet og samfunnet utenfor sykehuset regnes som lukkede system siden migrasjon er begrenset [58] og man kan forvente mindre fortykningseffekt. Potensialet for reversering i et antibiotikafritt lukket system, avhenger av den biologisk kostnaden [58] og mutasjonsrater for reversering. I en slik modell vil reduksjonen i resistensfrekvens ofte være omvendt proporsjonal med kostnaden [93]. Fitnessøkende resistens, om enn sjelden, vil føre til økte resistensfrekvenser selv i fravær av antibiotikaseleksjon [59].

Matematisk modellering gjør det mulig å teste hypoteser for interaksjonene mellom komplekse og sammenhengende variabler [94] og er nødvendig for å kunne utvikle retningslinjer for antibiotikabruk på bakgrunn av kvantitative antagelser for utvikling og reduksjon av antibiotikaresistens [95]. Hvis det er forskjeller i seleksjonsprosessene mellom forskjellige enheter for antibiotikaresistens (gen, genetiske plattformer, kloner, klonale komplekser, arter) burde dette tas med i utviklingen av tiltak for infeksjonskontroll [96].

Matematisk modeller er blant annet presentert i Austin et al 1999 [97] som viser en sammenheng mellom antibiotikaforbruk i primærhelsetjenesten og utviklingen av resistente bakterier over tid. Funksjonen illustreres som en sigmoidformet kurve gitt der resistensfrekvens beregnes over en tid når det antimikrobielle seleksjonspresset holdes konstant og antibiotikabruken er høyere enn en minimumsverdi [97]. En dobling av antibiotikaforskrivning vil halvere tiden det tar til å nå en gitt frekvens av resistente bakterier. Antibiotikabehandling fører også til en reduksjon i andelen personer som innehar et antibiotikasensitivt mikrobiom [97]. Parametrene som illustrerer dimensjonene i bildet av stabiliteten av resistensdeterminanter i en populasjon kan kartlegges ved empiriske prospektive, retrospektive, og eksperimentelle studier i laboratoriet [98].

## **Eksperimentelle modeller for stabilitet av resistens i bakteriepopulasjoner**

I hvilken grad observasjoner i laboratorieforsøk kan overføres til naturlige økosystem, og hvor godt de reelle fitnessparametrene gjenspeiles, er knyttet til en del usikkerhet [48]. Dersom fitnessforskjeller kan observeres i laboratoriet vil det trolig også finnes situasjoner i bakteriens naturlige miljø der resistens påvirker fitness. Likevel så kan observert fitnessnøytralitet i laboratoriet ikke utelukke at det finnes situasjoner i andre miljø der

resistens har kostnader [48]. For å beregne biologisk kostnad eksperimentelt, kan det være nødvendig å modellere den aktuelle stammens naturlige adferd. Fitness er et mål på et mangfold av bakteriologiske egenskaper, så kombinasjoner av flere *in vitro* modeller bør brukes for å anslå kostnadene forbundet med ervervelse av resistens, avhengig av organismens naturlige livsstil og vekstmåte [99]. Bakteriens evner til overlevelse i miljøet og forhold som kan knyttes til bakteriens virulens og patogenisitet kan til en viss grad beregnes med metoder som kvantifiserer grad av biofilmvekst, overlevelse i vann, hvor godt de tåler tørke, og planktoniske vekstrater [99]. I parvise konkurranseforsøk der isogene resistente versus sensitive stammer konkurrerer om de samme ressursene kan fitness måles som reprodutiv suksess, og uttrykkes som den naturlige logaritmen av ratioen av celleantallet ved start og slutt [100].

Ved å bruke kunnskaper om bakteriens naturlige miljø og foretrukne interaksjoner i ulike økosystem kan man lage modeller som best mulig bidrar til å øke vår forståelse om hva som styrer persistens av resistens, og hva som trengs for at resistens skal kunne revertere.

## **Retrospektive undersøkelser av stabilitet av resistens**

Det er liten kontrovers angående sammenhengen mellom økt antibiotikabruk og økning i resistens, og understøttes av epidemiologiske studier som viser at økt antibiotikabruk i et geografisk område gir påfølgende regional økning i resistensfrekvens [101].

Dersom økt antibiotikabruk gir økt resistens, vil da lavere forbruk gi lavere resistens? Studier gjennomført med tanke på å undersøke dette spørsmålet er i stor grad unisone i sitt svar. For eksempel en studie av sulfonamidresistente *E. coli* etter flere år med tilnærmet forskrivningsstans av sulfamethoxazole i engelsk primærhelsetjeneste, viste det seg at det var omtrent uten effekt på sulfamethoxazolresistens i de kliniske isolatene undersøkt [102, 103]. Til tross for en tilnærmet total stans i forskrivningen av sulfamethoxazole økte frekvensen av sulfamethoxazole resistente *E. coli* (MIC  $\geq$  512 mg/L) med 6,2 % (fra 39,7%) i 1991 og til (46,0%) i 1999 [103]. Forklaringsmodeller la vekt på muligheter for en genetisk samseleksjon som en av flere sannsynlig mekanismer, siden sulfonamidresistens ofte fantes sammen med andre resistensfaktorer på konjugative plasmid og/ eller sammen med integron [103].

Kompensasjonsmutasjoner som minsker kostnader for resistens har trolig utviklet seg sammen med resistensmekanismene som har blitt selektert og disseminert over flere tiår, noe som kan gjøre reversering mer usannsynlig [103]. Hypotesen om at tidsperspektivet i studien var for kort, ble ganske greit avkreftet av en oppfølgingsstudie fem år senere [102].

Hvor sannsynlig det er at en spredning fra et reservoar med sulfonamidresistente bakterier som finnes i tilknytning med matdyrproduksjon og fiskeoppdrett kan ha påvirket resistensfrekvensen i kliniske *E. coli* isolat er uvisst. Seleksjonspresset er nok likevel blitt opprettholdt i en del bakterier assosiert med matdyr, siden det i 1998 ble omsatt 80 tonn trimetoprim/sulfonamid for bruk i matdyr [103], som kan være ~16 ganger mer enn det forskrivningene i 1991 utgjorde (~5,1 tonn, beregnet fra den anbefalte minimums behandlingstid og standarddosering for voksne og barn  $\geq 12$  år [104]). Det er flere bevis som gir støtte til antagelsen om en nær sammenheng mellom resistens hos menneskeassosierte bakterier og antibiotikabruk i produksjonsdyr [105].

Noen studier har derimot vist en reduksjon av resistensfrekvens etter mindre antibiotikaforbruk i deler av Finland og Island. Disse studiene er i ettertid knyttet til usikkerhet om hvorvidt de resistente bakteriepopulasjonene egentlig ikke reverterte til antibiotikafølsomhet, men heller ble erstattet av høy-fitness sensitiv kloner [59].

Tilfellet med sulfonamider i UK representerer en sjeldent gylden mulighet for å kunne studere effektene av at en hel antibiotikagruppe brått fjernes og vedvarer over lang tid. Et annet eksempel med en unik situasjon, er den som oppstod da en vekstfremmende substans, avoparcin ble forbudt i matdyrproduksjon i Norge, Danmark og resten av EU-landene i løpet av årene 1995-1997 [106]. Avoparcin fører til kryssresistens med glykopeptider (vancomycin), og til tross for en initial hurtig reduksjon av glykopeptidresistente enterokokker (GRE,) er det dokumentert resistente subpopulasjoner med fortsatt vedlikeholdt resistens etter åtte år [106].

## **Prospektive studiedesign for undersøkelse av reversering av resistens**

Det er ikke overveldende mange prospektive studier som belyser mulighetene til reversering av antibiotikaresistens. Det ligger helt klart etiske implikasjoner i bunnen og i praksis blir de etiske fordringene fortsatt det viktigste å ivareta. En studie som ble gjennomført i deler av det rurale Sverige, målte effekten av redusert trimetoprimforbruk i en toårsperiode [59]. Metoden basertes på frivillig forskrivningsstans av trimetoprimholdige antibiotika og mesteparten av primærhelsetjenester og utvalgte sykehus bidro til å redusere forbruket med 85% [107]. Studien ble vellykket gjennomført i to nabokommuner med sammenlignbar demografi, og basert på månedlig data for antibiotikaforskrivning og antibiotikaresistens i *E. coli* viste det ingen reduksjon av trimetoprimresistens [107].

En annen studie undersøkte persistens av makrolidresistente streptokokker i en dobbeltblindet, randomisert placebokontrollert studie i Belgia [27]. Makrolidresistens økte initialt og var fortsatt signifikant høyere etter 180 dager i gruppen som fikk en enkelt



behandling i forhold til placebo [27]. Andre prospektive studier har funnet makrolidresistente enterokokker 1-3 år etter en behandling [27], og makrolidresistente *Staphylococcus epidermis* i 4 år etter en enkelt behandling med klaritromycin og metronidazol [27].

### **Økt reduksjon i resistensfrekvens uten endret seleksjon**

Hittil virker det som en gjennomgående trend at persistens av resistensdeterminanter i en persons normalflora i stor grad blir beskrevet som hovedsaklig lukket system, der prevalens av resistens varierer mest som en følge av seleksjon (fitness, kompensasjon og antibiotikaeksponering). Dette bildet nyanseres ytterligere i en studie som måler endring av resistensdeterminanter i normalfloraen til en gruppe forsøkspersoner som inntar tilnærmet helt bakteriefri mat [108]. De finner at sterilisering av maten gir påfølgende reduksjon i resistensfrekvens [108]. I hvor stor grad man kan se på normalfloraen som et åpent system, der andelen av resistente bakterier som tilføres systemet er mest avgjørende for resistensnivå, er ikke fastlagt, men antibiotikaresistente bakterier kan gjenfinnes i både animalske og vegetariske produkter. Endring av forekomst av disse i ulike mat og førkilder er en hittil lite undersøkt tilnærming til å redusere resistens blant kommensale bakterier.

### **Kryssresistens, genetisk sammenkobling og samseleksjon**

Funksjonell økning i seleksjonspress og økt resistensutvikling følger kryssresistens og samseleksjon. Kryssresistens oppstår når ervervete resistensmekanismer (mutasjoner eller HGT) påvirker resistens mot flere antibiotika fra samme klasse slik som bredspektrede  $\beta$ -laktamaser (som gir kryssresistens mot flere typer  $\beta$ -laktamantibiotika) og mutasjoner i *parC* og/eller *gyrA* som gir resistens mot alle fluoroquinolonene [96]. I denne kategorien er også pleiotropisk resistens som kommer av genetiske hendelser (mutasjoner eller HGT) som gir opphav til resistens mot flere antibiotikagrupper [96]. Ervervelse av *cfr* genet gir pleiotropisk resistens ved å kode for en metylase som påvirker ribosomene i koagulasenegative stafylokokker og gir resistens til linezolid, kloramfenikol, linkosamid, streptogramin A og pleuromutilin [96]. Desinfeksjonsmidler som triklosan brukes i mange husholdningsprodukter som er bekymringsverdig med tanke på kryssresistens til klinisk viktige antibiotika, spesielt til tuberkulostatikumet isoniazid [109].

Samseleksjon er et fenomen som øker forekomsten av multidrug resistente (MDR) bakterier [96] og skyldes at flere resistensgen er kovalent sammenknyttet i samme genetiske element. Seleksjonen av et resistensgen med gir samtidig seleksjon av de andre genene på samme genetiske element, eller i samme bakterie. Det kan tenkes at samseleksjon i praksis

potensierer det samlede seleksjonstrykket fra anvendte eller miljøforurensende antibiotika, siden en type antibiotika i tillegg til å selektere for alle resistensmekanismer mot seg selv, også selekterer for alle resistensdeterminanter og andre gen i det samme elementet. I miljøer der bakteriepopulasjoner ofte blir utsatt for flere ulike antibakterielle seleksjonstrykk er sjansene større for at de bakteriene som allerede har resistensmekanismer vil bli selektert [96] som fremskynder utviklingen av MDR bakterier. Samseleksjon resulterer i en prosess som er omtalt som ”genetisk kapitalisme” ~ der de rike (resistente) har en tendens til å få mer (flere resistensmekanismer) [96]. Samseleksjon kan hindre effekt av tiltak for å bekjempe resistens med bruk av kombinasjoner eller syklisk bruk av antibiotika [96].

Resistensmekanismer mot flere vanlige antibakterielle desinfeksjonsmidler (hypoklorittsyre, hydrogenperoksid, kvarternære ammoniumforbindelser (QAC) og klorheksidin) kan gi både kryssresistens til antibiotika og samseleksjon med andre antibiotikaresistensdeterminanter [109, 110]. Samseleksjon er spesielt aktuelt for QAC resistens som sammen med sulfonamidresistens er en del av de konserverte segmentene i klasse 1 integron. Resistens mot QAC medieres av efflukspumper tilhørende *the major facilitator superfamily* (MFS) eller *the small multidrug resistance (SMR) family* [110] (også omtalt i molekylære resistensmekanismer – effluks).

Samseleksjon opphører ikke uten en fysisk modifikasjon av de genetiske elementene, som kan skje inaktiverende mutasjoner slik som delesjonsmutasjoner ved rekombinasjon, eller ved tap av plasmid (*curing*) ved plasmidmediert resistens.

## **Økoskygge**

Konsekvensene av antropogen antibiotikabruk avhenger av kombinasjonen av seleksjon i naturlige miljø som grenser til antropogene antibiotikakilder (antibiotikaforurensning), og spredning av resistente organismer og resistensdeterminanter (resistensgenforurensning) [105]. Grad av eksponering for en gitt bakteriepopulasjon er i stor grad avhengig av hvor nært den er til en kilde av antibiotika, som enten kan være fra en antibiotikaproduserende organisme eller nærhet til menneskeskapt forurensning [111]. Det antas at naturlig antibiotikaproduksjon fra andre organismer (mikroorganismer) er forholdsvis liten, sammenlignet med den industrielle produksjonen av antibiotika [18].

Det totale globale forbruket av antibiotika er det vanskelig å få nøyaktige estimater på, men man regnet med i år 2002 at det var et sted mellom 100 000 – 200 000 tonn per år [59]. Befolkningsveksten fra 2002-2014 er på rundt 1 milliard fra om lag 6 til 7 milliarder

mennesker. Det er nærliggende å tro at den globale antibiotikabruken har økt siden da og fortsatt er økende.

Beregninger for hvor mye antibiotika som brukes i veterinærmedisin varierer kraftig og er vanskelig å finne nøyaktige og pålitelige statistikker over [105]. I en rapport fra Chile hevdes det at veterinærmedisinsk bruk av quinoloner ligger på mellom 100-110 tonn, som er mye mer enn de 10-12 tonnene med quinoloner som brukes i Chile for humanmedisin [105]. Inntrykket man kan få er at veterinærmedisinsk forbruk av antibiotika er høyt, og kanskje stemmer det at det bare er halvparten av den totale kommersielle produksjonen av antibiotika som brukes innen humanmedisin [18].

Økoskyggen til et antibiotikum avhenger av hvor i hvor stor grad den medierer en effekt etter klinisk anvendelse. Faktorer som kjemisk stabilitet, grad av inaktivering som følge av human metabolisme eller inaktiverende enzym fra bakterier påvirker halveringstiden for inaktivering av antibiotikumet. Både humanmedisinsk bruk av antibiotika og bruk i veterinærmedisin gir tilførsel av uforandrete antibiotikamolekyler enten direkte i vann og jordsmonn, eller til installasjoner for håndtering av avløpsvann, der mellom  $\frac{1}{4}$  og  $\frac{3}{4}$  ekskreres uforandret fra dyr på bås [105]. Resistensmekanismer som ikke inaktiverer antibiotika, kombinert med kjemisk stabile molekyler som for eksempel tetrasyklinene [112], og syntetiske antibiotika som fluoroquinolonene [105] vil føre til at mer aktivt antibiotika når ut til miljøet.

Hydrologiske prosesser som sprer antibiotika til miljøet rundt forskjellige typer jordbruk og fiskeoppdrett har vist en sammenheng mellom antimikrobiell forurensning og høyere frekvenser av resistente mikroorganismer [113]. Disse prosessene kan også spre resistens til menneskeassosierte patogener [113]. Mulige transportveier som kan spre resistente bakterie mellom antropogene kilder og tilgrensende miljø er illustrert i figur 3 (fra Davies 2010 [18]).

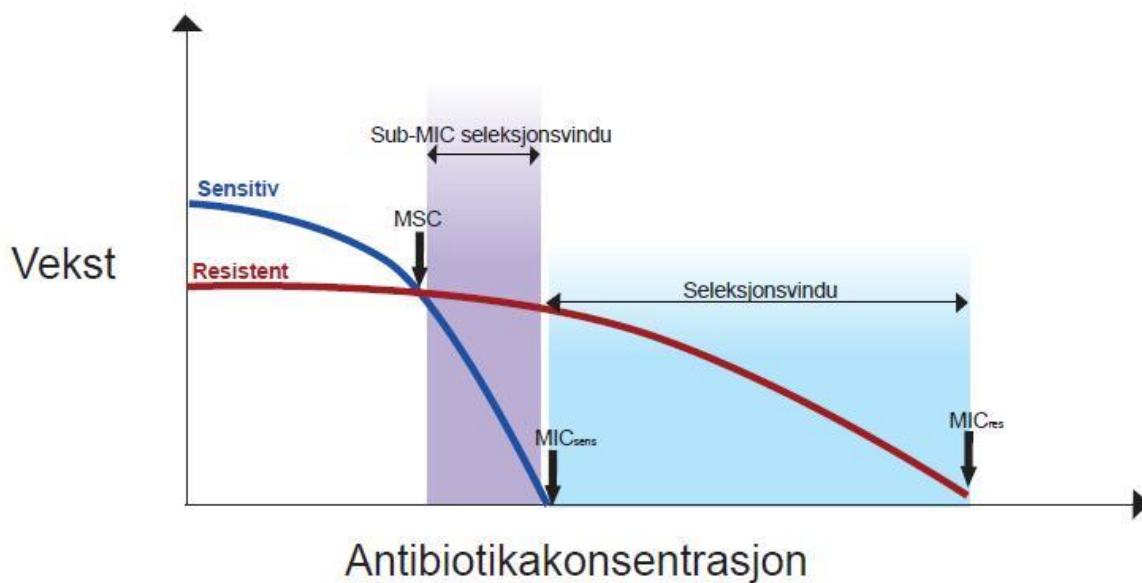
## **Antibiotikaforurensning**

Antibiotika i miljøet vil selektere for intrinsisk resistente organismer og HGT av resistensdeterminanter [59]. Graden av antibiotikaeksposering påvirker hastigheten for endringen av frekvensen av resistens i en bakteriepopulasjon. Andelen som har resistensegenskaper øker ved økende grad av seleksjon og seleksjonsgraden er konsentrasjonsavhengig.

I høye nok konsentrasjoner vil økningen være en direkte følge av at den sensitive subpopulasjonen har redusert konkurransevne på grunn av den selektive hemning av vekst eller cellelysis. Høye antibiotikakonsentrasjoner kan gjenfinnes i miljø nært i avløpsvann og i

jordbruksarealer der det brukes naturgjødning [105]. Høye antibiotikakonsentrasjoner kan påvirke sammensetning, mangfold og struktur av naturlige mikrobielle populasjoner og bakteriell fysiologi [105].

Ved veldig lave antibiotikakonsentrasjoner er det ikke alltid like åpenbart hvordan antibiotikaeksponering påvirker cellene (se figur 2, fra Andersson 2011 [58]), men veldig lave antibiotikakonsentrasjoner har mange andre egenskaper enn veksthemming, inkludert roller som globale regulatorer som kan påvirke hvilke gener som uttrykkes [114].



**Figur 2 – Sub-MIC seleksjonsvindu**

Illustrasjon av vekstrater for en sensitiv stamme (blå) og en resistent stamme (rød) under økende antibiotikakonsentrasjon. Sub-MIC seleksjonsvindu (lilla felt) er angitt (området fra minimums selektive konsentrasjon (MSC) der resistens vil øke i relativ frekvens, og til minimums inhibitoriske konsentrasjon for sensitiv stamme ( $MIC_{sens}$ ). Det tradisjonelle seleksjonsvinduet (lyseblått felt) er angitt (fra  $MIC_{sens}$  til minimums inhibitoriske konsentrasjon for resistent stamme ( $MIC_{res}$ )).

Figur er bearbeidet fra Andersson *et al* 2011 [58].

Funksjonen til naturlig forekommende antibiotika er derfor ikke nødvendigvis å hindre vekst av konkurrerende antibiotikafølsomme stammer. Resistensmekanismer kan derfor spille andre roller i cellen, slik som signalflyt og signalprosessering i kommunikasjons-sammenhenger, eller fysiologisk homeostase og roller som metabolske enzym. Subinhibitoriske konsentrasjoner (sub-MIC) vil derfor kunne endre den metabolske aktiviteten i bakterier [105].

Reduksjon av antibiotikaforurensning i økosystem som kontinuerlig mottar antibiotika (for eksempel fra gårdsdrift eller sykehus) kan skje ved å finne prosesser som øker hastigheten for nedbrytning av antibiotika [105], i tillegg til tidligere omtalt reduksjon i bruk.

## **Forurensning med resistensgen**

Resistensgenene replikeres i bakterier og er ikke nedbrytbar på samme måte som antibiotika [105]. Avløpsvann kan inneholde resistente bakterier og resistensgener kan selekteres ved antibiotikaeksponering [105]. For avløpsvann som renses gjennom bioremedieringsprosesser og biologisk behandling med høy bakteriell aktivitet kan også overførte resistensgener tilbakeføres til naturen [115]. Integrering av resistensgen på mobile genetiske element muliggjør effektiv disseminering av resistensdeterminanter til andre arter [105]. Ved å unngå utføring og sammenblanding av menneskeassosierte bakterier og bakterier i miljøet vil innvirkningen av resistensgen i naturlige miljø kunne reduseres [105].

## ***Ikke-arvelig resistens***

Persisterceller resulterer i en form for ikke-arvelig resistens også kalt adaptiv eller fysiologisk resistens. Ikke-arvelig resistens generelt kjennetegnes ved at den er en (temporær) forbigående økning i antibiotikatoleranse, men som ikke er grunnet i genetiske resistensdeterminanter. Ikke-arvelig resistens er i motsetning til intrinsisk og andre ervervete resistensmekanismer ikke stabil på den måten at den kan arves vertikalt til påfølgende generasjoner eller overføres horisontalt på mobile genetiske element [43, 116]. Ikke-arvelig resistens kan også unngå oppmerksomhet ved flere av de vanligste metodene for å avdekke resistensmekanismer som for eksempel ved MIC analyser [44].

I tillegg til infeksjoner som vanskelig nås med antibiotika på grunn av vertens egne anatomiske barrierer, kan bakterier som inngår i en sosial livsstil i sessile (fastsittende,) komplekse strukturer i en biofilm være beskyttet av en ekstracellulær matriks som består av blant annet exopolysakkarider (EPS). Slike ekstracellulære strukturer kan ha en intrinsisk lav permeabilitet for forskjellige molekyler, deriblant flere antibiotika [117], og samtidig gi en strukturell beskyttelse mot vertens immunsystem [44]. Biofilmdannelse skjer i mer enn halvparten av alle mikrobielle infeksjoner [118].

Selv om antibiotikamolekylene skulle klare å penetrere inn til kjernen i biofilmmatrisen og utøve sin antibakterielle effekt, så vil med høy sannsynlighet en andel av bakteriecellene være i en dormant, ikke-replikerende tilstand med senket metabolisme. Slike celler kalles persisterceller og de har en notorisk evne til å overleve antibiotikaeksponering.

I aktivt voksende bakterier virker baktericide antibiotika ved å påvirke vanlige cellulære prosesser slik at det fører til korrumperte produkt som skader cellen [44]. I persisterceller blokkeres disse prosessene, noe som igjen fører til en voldsom økning i toleransen til antibiotikaeksponering. Ingen av antibiotikaklassene har noen særlig effekt mot dormante persisterceller [44]. Periodisk antibiotikaeksponering gir økning i mutanter med forhøyete rater av persistercelledannelse (high persister (*hip*) mutanter) *in vitro* [119], og andelen *hip* mutanter er vist å øke i residiverende og kroniske infeksjoner ved gjentatte eksponeringer [44].

En modell for residiverende infeksjoner kan beskrives som at en andel av cellene overlever antibiotikabehandlingen siden de er dormante persistere. Samtidig er de lokalisert i restene av biofilmmatrisen og er dermed utilgjengelig for immunsystemet. Når så antibiotikakonsentrasjonen igjen faller, 'våkner' persisterne og kan starte en ny infeksjon [44].

T-A moduler kan også gjenfinnes i flere bakteriekromosom og er hypotetisert å ha sentrale roller i dannelsen av persisterceller [44]. For eksempel toksiner som MazEF og RelBE som finnes i *E. coli* K-12, kan aktiveres og vil da kløyve mRNA og blokkere translasjon til peptid [44].

En hypotese om persisterdannelse: "Persisters as Stuff Happens" (PaSH), forklarer persisterdannelse som en uunngåelig, heller enn en utviklet karakteristikk (på linje med mutasjoner,) som forårsakes av forbigående stans i replikering og metabolisme som følge av stressorer i miljøet inkludert antibiotika [119]. Persistere er utbredt også i eukaryote encellede organismer, samt somatiske kreftceller og trolig er mekanismene for dannelsen av persistere mangfoldige. I tillegg til stokastiske prosesser som medfører persisterdannelse, så er det flere aktuelle gen som kan være involvert i en deterministisk prosess som respons på eksternt miljø. Flere funn tyder på at persistercelledannelse også har en deterministisk komponent, mediert gjennom mange forskjellige genetiske nettverk [44].

Antibiotika kan oppregulere genuttrykk og indusere persistens [44, 119]. Fluoroquinoloner induserer SOS-stressrespons ved å gi DNA skader [120], og kan gi persisterdannelse, muligens (også) mediert gjennom det SOS-stressresponsaktiverte TisB-toksinet, som gir dormante celler [44]. Økning i TisB gir flere persisterceller, mens det ga en 10-100 ganger reduksjon i persisterdannelse for en  $\Delta$ *tisAB* mutant [44, 119]. Dette viser også at alle celler kan konverteres til persistere [44].

Persistere dannes trolig gjennom mange uavhengige, parallelle mekanismer, noe som kan ha sine adaptive fordeler dersom dette representerer en overlevelsesstrategi, ved at det vanskelig lar seg gjøre å finne måter å hindre persisterdannelse [44]. Det er hypotetisert at

persistere spiller en rolle for overlevelse, ikke bare ved antibiotikabruk, men også mer universelt, analogt til endosporer.

Flere av toksin-antitoksin modulene, som det kan finnes mange av i bakterielle kromosom, er små peptider med affinitet for membraner og kan indukere persistere ved å forstyrre energiomsetningen (proton motive force (pmf),) med påfølgende fall i ATP konsentrasjoner. Andre TA moduler, for eksempel *hipA*, påvirker toksinet proteinsyntesen ved å inaktivere EF-Tu ved fosforylering [44, 120]. Inaktivering av *hipA* gir færre persisterceller, mens tilførsel av eksogent *hipA* toksin øker persistercelledannelsen [44].

Den globale regulatoren PhoU er en negativ regulator for en mer generell cellulær metabolisme og inaktivering fører til en metabolsk hyperaktiv tilstand og en defekt i persisterdannelsen [121].

Muligheter for behandling av persistere kan bestå av nye antibiotikaformuleringer med mulighet for opptak før persisterdannelsen som et prodrug som aktiveres av bakterielle enzymer og slik har effekt i dormante celler. Persistere replikerer ikke DNA eller syntetiserer peptidoglykan i dormant tilstand, men cellulære mål av høy aktualitet kan være ødelegging av DNA og oksidering av membraner [44]. Ved å utnytte kunnskaper om mekanismene til baktericide antibiotika og kombinere dette med trekk hos persistere så er det mulig å eliminere persisterceller [120].

Omgivelsen, eller mer spesifikt det metabolske miljøet rundt bakterien er av viktighet for antibiotikabehandling. Persistere tar opp metabolitter selv i dormant tilstand, og dette kan brukes til å gjenopprette PMF som er forutsetningen for opptak av for eksempel aminoglykosider [122]. Induserbarhet av PMF med metabolitter er vist for både Gram positive og Gram negative persistere, men metabolitt transportere kan uttrykkes i ulik grad i forskjellige persistertyper [122]. I en overgangsfase fra aktiv til dormant og persister tilstand, er det et tidsvindu med muligheter for behandling med aminoglykosider siden det skjer det en viss grad av proteintranslasjon [123].

Bakteriofager kan gjennom spesifikke modifikasjoner målrettes for å redusere antall persistere [124].

## **Adaptiv resistens**

En adaptiv respons på antibiotikaeksponering kan gjennom regulering av uttrykk av poriner påvirke permeabilitet og opptak av antibiotika [116]. Porinuttrykk er regulert av koordinerte stressresponser [116]. I *E. coli* er OmpC og OmpF en del av et stressresponsnettverk, men responderer også på osmolariteten som omgir bakterien [116]. Fraksjonen av

OmpC (mindre porediameter) i forhold til OmpF (større porediameter) endrer seg under infeksjon [116], da en mindre porediameter er å foretrekke siden det ikke mangler på næringsstoffer (høy osmolaritet i ekstracellulære miljø), men samtidig filtreres mer av de toksiske forbindelsene bort (for eksempel  $\beta$ -laktamantibiotika) [116].

Oppregulering av antisense RNA (*micF*) er en mekanisme som brukes til å hemme translasjonen av OmpF som en respons på miljøfaktorer som høy temperatur, oksidativt stress eller eksponering til salisylsyre [116]. En annen reguleringsmekanisme medieres ved at økt transkribering av membranproteinet OmpX legger beslag på så mange av proteinfoldingschaperonene i bakterien, at porinproteinene ikke foldes riktig. Dette medfører et netto tap av poriner i membranen siden misfoldete porinproteiner istedenfor blir degradert av for eksempel DegP proteaser [116].

Antimikrobielle midler kan også indusere adaptiv resistens gjennom økt uttrykk av efflukssystemer. Biocider som klorheksidin, triklosan og kvarternære ammoniumforbindelser (QAC) er andre kjente eksempler som kan oppregulere efflukspumper [109, 110].

## ***Molekylære resistensmekanismer***

Resistensmekanismen påvirker også reverseringsraten [59] og en kombinasjon av økt molekylær kunnskap om antibiotikaresistens, i tillegg til epidemiologiske kunnskaper gir muligheter for kvantifisering av effektene av tiltak for infeksjonskontroll [94]. Som legemiddelgruppe rommer antibiotika en stor molekylær og mekanistisk variasjon. Mekanismene for antibiotikaresistens er ikke mindre varierte, og det virker sannsynlig at reverseringspotensialet avhenger også av den fenotypiske, molekylære basisen for resistens, i tillegg til bakterieart [59].

## **Endrede målstrukturer som minsker påvirkningen av antibiotika**

Mutasjoner som endrer antibiotikumets målstruktur og gir lavere affinitet for de molekylære interaksjonene som danner de(n) antimikrobielle virkningsmekanismen(e) vil øke cellens resistensnivå for det aktuelle antibiotikumet eller de antibiotika som deler den samme cellulærmolekylære målstrukturen. En slik økning i resistens kan observeres som en økning i antibiotikumets minimums inhibitoriske konsentrasjon (MIC,) eller økning i minimums baktericid konsentrasjon (MBC).

Antallet mulige mutasjoner som uavhengig gir økt resistens har en samlet sannsynlighet for resistensmutasjoner lik summen av de individuelle sannsynlighetene for mutasjon ved de aktuelle posisjonen i DNAet [50]. På samme måte er sannsynligheten for



resistens når to eller flere mutasjoner må oppstå samtidig mye mindre enn for hver av de individuelle sannsynlighetene. Samlet sannsynlighet blir da produktet av de individuelle sannsynlighetene som må opptre samtidig for utvikling av resistens [50].

Eksempelvis kan en substansiell økning av streptomycinresistens skje ved én enkelt basesubstitusjon i kodon 42 i genet for det tolvte ribosomale proteinet i ribosomets lille subenhet, *rpsL* (S12 - ribosomale protein small L) og sannsynligheten er relativt liten [50] og ligger på omtrent  $1 \times 10^{-10}$  til  $10^{-11}$  [63]. Det finnes minst to kjente endringer som gir økt resistens. Basesubstitusjonen kan skje i den 2. eller den tredje basen og erstatte lysine (AAA) til treonin (ACA) eller asparagin (AAC) [62]. Ribosomet blir i mindre grad hemmet av streptomycin, men en betydelig biologisk kostnad tilkommer initialt i form av en mindre effektiv proteinsyntese med lavere peptidforlengingsrate [61, 62].

Sannsynligheten for spontan reversjon i fravær av streptomycin må nødvendigvis være lavere enn sannsynligheten for dannelse av resistens. Dersom lysin er kodet av AAA er det 3 ulike mutasjoner som kan gi enten treonin (ACA) eller asparagin (AAT/U, AAC) og medhørende streptomycinresistens. Sann revertering skjer dersom treonin eller asparagin muterer og gjendanner lysin (AAA, AAG).

Fluoroquinolonresistens kan medieres gjennom kromosomale mutasjoner i *gyrA* subenheten til DNA gyrase (topoisomerase II) eller *parC* (*grlA*) subenheten til topoisomerase IV. Antallet mulige mutasjoner i disse subenhetene som gir økt resistens varierer mellom bakteriestammene, men resistensmutasjonene gir økt resistens uavhengig av hverandre og sannsynligheten for økt resistens korrelerer med antallet muligheter [50]. Denne variasjonen i antall mulige resistensmutasjoner i ulike subenheter er trolig det som bidrar til at Gram-positive stammer som regel først får resistensmutasjoner i topoisomerase IV [45] (*Streptococcus pneumoniae* har to posisjoner i *gyrA*, men 5 posisjoner i *parC*[50]), mens Gram-negative først får sine resistensmutasjoner først i DNA gyrase [45] (*E. coli* har minst 7 posisjoner i *gyrA* genet, men bare tre posisjoner i *parC* som gir fluoroquinolonresistens [50]). Flere punktmutasjoner kan gi en trinnvis økning av fluoroquinolonresistens [26] og resistensmutasjonene har additiv effekt – enkeltmutasjoner legger til økende resistens, og økte kostnader, selv om tilfeller er observert der den fjerde mutasjonen gir økt fitness i forhold til villtype [59].

Rifamyciner stopper transkripsjonen av alle typer RNA som dannes av RpoB,  $\beta$ -subenheten til bakteriell RNA polymerase (RNAP). RNA primere i syntesen av Okazaki fragment i lagging strand under replikering som lages av DnaG er et unntak [125], men bakterien kan ikke vokse uten aktiv RNAP. Resistens kan dannes gjennom punktmutasjoner i

genet som korrelerer til bindingssete for rifampin og skjer ved en frekvens på  $1 \times 10^{-8}$  og selv om tuberkulostatika alltid bør brukes i kombinasjoner for å unngå resistensutvikling så er rifamycinresistens utbredt [45].

De bakterielle ribosomene er den cellulære målstrukturen som både tetrasyklinene, makrolidene, linkosamider, streptograminene og aminoglykosidene interagerer med. Ribosomer er høyt konserverte strukturer bestående av to subenheter 30S (som dannes av 16S rRNA + 21 forskjellige ribosomale protein) og 50S (som dannes av 23S rRNA og 5S rRNA + 31 forskjellige ribosomale protein). Sammen danner subenhetene aktive 70S ribosom som oversetter mRNA til protein (translasjon).

Ribosomgenene (*rrn*) finnes ofte i flere kopier rundt i bakterienes genom. En resistensmutasjon i et av operonene kan maskeres dersom resistensmutasjonen ikke er funksjonelt dominant og kan dermed gi en fortsatt antibiotikafølsom fenotyp [45, 50]. I arter med få rRNA (23S rRNA) operoner, deriblant *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* og *Propionibacterium acnes* er det hyppigere resistensutvikling som følge av punktmutasjoner i ribosomale gen siden det er mer sannsynlig at det dannes dominante resistente gen [45, 50].

Revertering av resistens som er kodet i gen som finnes i flere kopier i bakteriens genom kan skje ved *gene conversion* initiert av homolog rekombinasjon med påfølgende mismatch repair som konverterer den muterte kopien til den samme som en av villtypekopiene. Denne mekanismen øker reversjonsraten og minsker stabiliteten av resistens fra gen som har sensitive kopier [58].

Elongation factor G (EFG) er fusidinsyrens målstruktur, og mutasjoner i *fusA* som koder for EFG og gir resistens mot fusidinsyre og kalles FusA type resistens har som regel en signifikant fitnesskostnad både *in vivo* og *in vitro* [59].

*De novo* linezolidresistens kan oppstå ved spontane punktmutasjoner i 23S rRNA, men skjer langsomt og relativt sjelden *in vitro* ( $1 \times 10^{-9}$  celler) også på grunn av at det er vanlig med flere genkopier av 23S rRNA (*S. aureus* har gjerne 5 eller 6 operon med 23S rRNA) [126]. Kromosomale resistensmutasjoner er vanligvis ikke horisontalt overførbar.

Av de eldste antibiotika er sulfonamidene. Ved å hindre den bakterielle folsyresyntesen, som hos bakterier må de novo syntetisere (bakterier kan ikke ta folsyre direkte opp fra ekstracellulære kilder), hindrer sulfonamider enzymet dihydropteroate synthase (DHPS) som står for omdannelsen av dihydropteroate diphosphate + p-aminobenzoic acid (PABA)  $\rightarrow$  dihydropteroic acid, en essensiell komponent i biosyntesen av tetrahydrofolsyre (THF). THF er essensiell i syntesen av nukleotidet thymidine trifosfat

(dTTP). Celler uten basen tymin kan ikke vokse, siden replikering av DNA og celledeling ikke er mulig.

Endringer i enzymet dihydropteroate synthase (DHPS) som fører til en lavere affinitet til sulfonamidet sulfamethoxazole relativt til det naturlige substratet PABA, enten ved mutasjoner i det kromosomale DHPS gen (*folP*) eller som i en av de 3 forskjellige variantene av DHPS på mobile genetiske element (*sul1*, *sul2* eller *sul3*) gir høy grad av resistens [103, 127].

Resistensdeterminanten *sul1* har en sterk assosiasjon med class 1 integron og er ofte en del av class 1 integrons 3' conserved region (3'CS). En undersøkelse av *sul1*-positive epidemiologisk ubeslektede *Salmonella* isolat viste at *sul1* determinanten var en del av class 1 integron i 98 % av tilfellene [128].

## Molekylær beskyttelse av målstruktur

Beskyttelse mot makrolid, linkosamid, streptogramin og ketolid (MSLK) antibiotika kan skje ved en enzymatisk metylering av 23S rRNA (i A2058) mediert av genprodukter spesifisert av *erm* (erythromycin resistens metylase, eller erythromycin ribosom metylering) som gir lavere bindingsaffinitet [45]. Mer enn 30 forskjellige *erm* gener finnes og kan uttrykkes konstitutivt eller være gjenstand for regulert transkripsjon [45].

Tetrasyklinresistens kan også medieres gjennom ribosombeskyttelse. Proteiner med sekvenslikheter til bakterielle EF-G og EF-Tu kan aktivt fjerne tetrasyklin bundet til ribosom [45]. Det finnes andre ribosombeskyttelsesproteiner slik som *TetO* og *TetW*, samt genetiske enheter som *tet(P)* som har dualistisk virkning – koder både for effluks og ribosombeskyttelse [45]. *tetQ* koder også for et cytoplasmisk protein som gjør at ribosomet ikke blokkeres [47].

Beskyttelse av elongation factor G (EFG) mot binding til fusidinsyre med proteiner som kodes av *fusB* eller *fusC* er knyttet til veldig lave fitnesskostnader [59].

## Bypass av hindret metabolismevei

Glykopeptider binder opp prekursorer for syntesen av bakteriens peptidoglykan og har en baktericid virkning. De genetiske determinantene for glykopeptidresistens er veldig komplekse og koder for flere alternative proteiner som syntetiserer en variasjon med modifisert peptidoglykan [45]. Den biologiske kostnaden for glykopeptidresistens kan minimeres ved regulert uttrykk av det alternative biosyntetiske maskineriet med forskjeller i vekstrateendringer fra 0,04-0,3 % uten induksjon, til 20-38% med induksjon av resistens [59].

For bypass av metabolismevei er en klinisk viktig mekanisme funnet i patogene stammer kodet av *mecA* som gir et alternativt penicillin bindende protein (PBP → PBP2a) som  $\beta$ -laktamantibiotika har lavere affinitet for. PBP2a fungerer selv i nærvær av de fleste  $\beta$ -laktamantibiotika og gir slik resistens mot tilnærmet alle antibiotika med denne virkningsmekanismen [129].

## Enzymatisk nedbrytning av antibiotika

Det er oppdaget flere ulike enzymfamilier som kan inaktivere forskjellige typer antibiotika. De kan virke enten ved å spalte opp og degradere antibiotikamolekylene eller uskadeliggjøring ved kjemiske transformasjoner som konjugerer forbindelser til antibiotikamolekylene. En av de første enzymgruppene som er beskrevet [130], og som til dag er den gruppen med mest variasjon og med størst tallrikhet, må være  $\beta$ -laktamasene. De hydrolyserer i ulik grad forskjellige  $\beta$ -laktamantibiotika. Systemer som inaktiverer aminoglykosider og kloramfenikol er ikke uvanlig, og det er også funnet mekanismer for enzymatisk inaktivering av gruppene fluoroquinolon, tetrasyklin, makrolid, linkosamid og streptogramin.

### ***$\beta$ -laktamaser***

Blant de variasjonene med  $\beta$ -laktamaser som finnes i dag, er de  $\beta$ -laktamasene som bruker aminosyren serin i det aktive området trolig av eldgammel avstamning (~2 mrd år) [16]. Klassifisering av  $\beta$ -laktamaser kan skje ut fra funksjon (Bush-Jacoby-Medeiros), men det er vanlig å klassifisere ut fra struktur (Ambler klassifisering) [131]. Med Amblerklassifisering grupperes  $\beta$ -laktamasene i fire grupper: De serine  $\beta$ -laktamasene i gruppe A, gruppe C og gruppe D, og metallo- $\beta$ -laktamasene i gruppe B [45]. Det er til i dag funnet over 1000 unike naturlig forekommende  $\beta$ -laktamaser [131].

### **Aminoglykosidmodifiserende enzym**

Aminoglykosider kan inaktiveres med acetyltransferaser som gir enzymatisk addisjon av N-acetyl til tobramycin, gentamicin, netilmicin og amikacin [45]. Phosphotransferaser fosforylerer amikacin, og nucleotidyltransferaser adenylterer tobramycin [45].

### **Makrolid, linkosamid og streptogramin (MLS) inaktiverende enzym**

Resistens mot makrolid, linkosamid og streptogramin (MLS) antibiotika er oftest mediert av efflukssystemer eller ribosommodifiserende enzym (for eksempel *erm*) [45], men inaktiverende proteiner er også en del av bildet. Det finnes esteraser som virker mot

makrolider med 14 eller 15 atomer i strukturskjellet (for eksempel erythromycin eller azitromycin), hydrolaser med spesifisitet for streptogramin B, acetyltransferaser mot streptogramin A, samt fosfotransferaser mot ketolider og nukleotidyltransferaser mot linkosamid [45].

### **Kloramfenikol**

Acetyltransferaser av type A eller type B (begge er homotrimers, men er ikke beslektet ut fra aminosyresekvensene) står for inaktivering av kloramfenikol [45]. Acetyltransferase type B kalles også xenobiotiske acetyltransferaser [45]. De deler en evolusjonær linje som inkluderer enkelte streptogramin inaktiverende enzym, funnet i enterokokker og stafylokokker [45]. Acetyltransferasene kan være konstitutivt uttrykt eller de kan være underlagt regulert uttrykk [45].

### **Tetrasyklin**

En flavin avhengig monooxygenase kodet av *tet(X)* er katalyserer regioselektiv hydroksylering som inaktiverer tetrasyklinantibiotika [45]. *tet(X)* er ikke veldig vanlig i klinisk relevante isolater, men et beslektet *tet(X)* -lignende gen er funnet i *P. aeruginosa* [45].

### **Fluoroquinolon**

Det finnes horisontalt overførbar acetyltransferase som er beslektet med aminoglykosid acetyltransferase, men som reduserer aktiviteten til fluoroquinolone [18, 26].

### **Redusert permeabilitet og mindre opptak av antibiotika**

Membransystemene som omgir de Gram-negative bakteriecellene er strukturelt komplekse og består av innermembran, glykopeptidlag, og yttermembran. Yttermembranen har fosfolipider vendt inn mot periplasma og lipopolysakkarider vendt utover og til sammen gir dette en ekstra barriere og seleksjon av substanser som når til cytoplasma [116]. Dette gir begrensninger for diffusjon av hydrofile molekyler og Gram-negative og mykobakterier må ta opp vannløselige næringsstoffer gjennom vannfylte porer (poriner) som strekker seg gjennom membranen [116]. Porinene fungerer som et filter eller en sikt som tillater passasje opp til en viss størrelse avhengig av diameteren på poreåpningen [116]. Poriner kan deles inn i substratspesifikke (for eksempel OMPene) og de som er mer generelle, og som er av viktighet for antibiotikaresistens. Antall og type poriner avgjør permeabilitet og påvirker slik også toleransenivået for vannløselige antibiotika [116].

Mange forskjellige typer mutasjoner kan resultere i færre poriner. For eksempel mutasjoner som fører til en mindre effektiv promoter for et porinsystem vil føre til færre poriner på grunn av en lavere transkripsjonsrate og mindre translasjon [116]. Samme effekt gir også mutasjoner som fører til lavere konsentrasjoner av transkripsjonsfaktorer som aktiverer porintranskripsjon eller økte konsentrasjoner av transkripsjonsfaktorer som hemmer transkripsjonen av poriner [116].

Inaktivering av bestemte porinssystem kan skje ved punktmutasjoner som gir tidlige nonsensekodon og fører til korte, trunkerte porinprotein eller tidlige *frameshift* mutasjoner som endrer alle de påfølgende aminosyrene. Delesjonsmutasjoner av hele eller deler av porinkodende gen eller *insertions* (av for eksempel *insertion elements* (IS)) kan føre til tap av aktuelle porin og inaktivering.

Funksjonsendring av poriner kan skje ved mutasjoner i genetiske loci som korresponderer til porinenes *constriction zone* som er et område som danner grunnlaget til seleksjon gjennom det elektrostatiske feltet [116]. Siktfunksjonen skjer på bakgrunn av størrelse og ladning til passerende molekyl [116]. Dersom den økte eksklusjonen innbefatter molekyler av samme størrelse som antibiotikumet, vil opptaket inn i cellen bli lavere [116]. Flere vannløselige antibiotika har i utgangspunktet molekulære størrelser som ligger nært opp mot grensene til seleksjonsgrensen til porinene [116].

En teoretisk mulighet for å øke opptak ved redusert permeabilitet er å bruke permeabiliserende legemidler [116]. Dessverre er effekten av permeabilisering størst for hydrofobe eller amfifile antibiotika, mens de vannløselige antibiotikaene er de som primært affiseres av permeabilitetsreduksjon [116]. Permeabiliserende forbindelser kan bestå av blant annet kelatorer, kationiske antimikrobielle peptider, gallesyrederivater eller squalaminderivater [116].

Kombinasjonen av redusert permeabilitet (endringer i antall eller funksjon av poriner) koblet med andre resistensmekanismer har en synergisk resistenseffekt [116].

Legemidler som permeabiliserer bakteriemembraner og øker opptak av antibiotika kan gi nytt liv til antibiotika der resistensproblematikken skyldes for dårlig opptak. Dessverre er effekten av permeabilisering størst for hydrofobe eller amfifile antibiotika, mens de vannløselige antibiotikaene er de som primært affiseres av permeabilitetsreduksjon [116]. Permeabiliserende forbindelser kan bestå av blant annet kelatorer, kationiske antimikrobielle peptider, gallesyrederivater eller squalaminderivater [116]. Flere annengenerasjons antihistaminer er trygge og sikre legemidler med kjente bivirkningsprofiler. Samtidig er de

amfipatiske detergenter som også har potensiale som adjuvans til antibiotikaterapi i form av permeabilitetsøkende resistensreverserer [132-134].

## Efflukssystemer

Alle bakterier trenger mekanismer for transport av mange ulike substanser ut av cellen [116]. Gjennom efflukssystemene kan cellene sende kjemiske beskjeder i form av signalmolekyler for quorum sensing (QS), sekreere biocider og toksiner, samt fjerne toksiske forbindelser dannet under metabolisme [116]. En viktig rolle for efflukssystemene er den beskyttelsen de gir mot giftige stoffer fra miljøet [116]. Effluks benyttes til å kvitte seg med toksiske forbindelser deriblant antibiotika [116]. Efflukssystemer med kapasitet til å fjerne antibiotika ut av cellen har en spesielt sterk synergi sammen med mekanismer for lavere opptak (permeabilitetsendring), men også med andre resistensmekanismer [116].

Efflukspumper kan være konstitusjonelt uttrykt eller regulert som en respons på miljømessige faktorer [26]. Efflukssystemer med bred substratspesifisitet som gir multidrugresistens (MDR) finnes oftere i kromosom enn de mer spesifikke transportere som kan være mobiliserbare [116].

Efflukssystemer finnes i både Gram-negative og Gram-positive bakterier, og efflukssystemenes oppbygning er avhengig av hvilken type cellevegg som omgir bakterien [116]. Hos Gram-positive består tilsynelatende efflukssystem alltid av ett enkelt polypeptid i cytoplasmamembranen, men hos Gram-negative arter er gjerne efflukssystemene sammensatt av tre deler med en komponent i innermembranen, en i yttermembranen og et fusjonsprotein (*membrane fusion protein* (MFP)) i periplasma [116].

Efflukssystemer bruker aktivt energi for å pumpe ut substrat [116]. Systemene kan deles inn i to klasser basert på hvilken type energikilde som brukes [116]. For ATP binding cassette (ABC) transportere forbrukes ATP, mens sekundære multidrug transportere benytter seg av protongradienter (proton motive force) [116]. De sekundære grupperes videre, basert på primær og sekundærstruktur, inn i fire superfamilier: *the major facilitator superfamily* (MFS), *the small multidrug resistance* (SMR) *family*, *the multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) *family*, og *the resistance-nodulation-cell division* (RND) *superfamily* [116].

**ABC** (ATP binding cassette) familien er involvert i opptak og effluks av et stort spekter av molekyler [116]. ABC effluksproteiner involvert i resistens mot makrolider er spesifisert av blant annet MacAB [116]. MsrA (makrolid-streptogramin resistens) i streptokokker er beslektet med de plasmidmedierte VgaA og VgaB i stafylokokker [45]. *E.*

*faecalis* har intrinsisk resistens til quinopristin-dalfopristin gjennom ABC transporteren *Isa* som gir effluks av streptograminer [45].

**SMR** (small multidrug resistance) familien omfatter korte proteiner med om lag 107 til 110 aminosyreresiduer [116]. De har fire transmembrane segmenter og danner som regel tetramerer i cytoplasmamembranen [116]. SMR står for relativt få av effluksmekanismene som gir antibiotikaresistens [116]. Eksempler er EmrE fra *E. coli* og AbeS fra *Acinetobacter baumannii*.

**MFS** (major facilitator superfamily) superfamilien er en gammel familie med mange medlemmer og har størst diversitet i gruppen av sekundære transportere [116]. Efflukspumper som gir resistens er alle protonkoblede antiportere (drug-proton antiporters (DHA)) som igjen kan deles inn i tre klasser [116]: DHA1 og DHA2 har flere forskjellige substrat og finnes også hos eukaryoter. DHA3 er antibiotikaspesifikk og finnes kun hos bakterier [116]. Eksempler for DHA 1 finnes Bmr fra *Bacillus subtilis*, for DHA 2 finnes QacA fra *Staphylococcus aureus*, og fra DHA 3 finnes MefA fra *Streptococcus pyogenes* [116].

**MATE** (the multidrug and toxic compound extrusion) familien har topologiske likhetstrekk med MFS proteinene, men er i en egen familie på grunn av større forskjeller i primærstruktur [116]. De har 12 transmembrane segmenter og nyttiggjør seg natriumgradienter for utpumpning av antibiotika [116]. Eksempler er NorM fra *Vibrio parahemolyticus*, og YdhE fra *E. coli* [116].

**RND** (resistance-nodulation-cell division) er en av de viktigste effluksmekanismene for klinisk relevant antibiotikaresistens [116]. Det er en stor variasjon for mulige substrat for RND effluksproteiner [116]. RND systemene er antiportere og omtrent alle typer RND kan pumpe ut flere typer antibiotika [116]. Det finnes mange eksempler på RND systemer som har en rolle i antibiotikaresistens, blant annet AcrAB-TolC of *E. coli* og MexAB-OprM of *P. aeruginosa* [116].

Effluks er ikke uvanlig for tetrasykliner som kan pumpes ut av minst 20 forskjellige protein [45]. Kloramfenikol og florfenikoler efflukssystemer finnes i flere klinisk viktige bakterier og klassifiseres i 8 forskjellige grupper [45].

### **Mutasjoner i efflukssystemer som gir antibiotikaresistens**

I tillegg til iboende resistens mediert av aktive multidrug efflukssystemer, kan resistens som skyldes efflukssystemer erverves gjennom mutasjoner [116]. Slike resistensmutasjoner kan deles inn mutasjoner som gir aminosyreendringer som øker pumpens



effektivitet, og de mutasjonene som øker uttrykk av pumper med antibiotika som substrat [116]. Økt uttrykk mediert av mutasjoner i reguleringsproteiner er den vanligste mekanismen [116]. Efflukssystemene er ofte nøye regulert av både globale og lokale reguleringsmekanismer [116]. Overuttrykk er ofte assosiert med høye biologiske kostnader, redusert fitness og virulens [116]. Resistens som er mediert gjennom overuttrykk av efflukspumpe kan til tross for høye kostnader selekteres for med antibiotika [116]. Genetisk duplikasjon og amplifikasjon kan også øke uttrykk av efflukspumper, og kan vedlikeholdes ved antibiotikaeksponering, til tross for at tandem duplikasjoner er ustabile og ofte reverterer spontant [45].

Efflukspumper er attraktive mål for nye legemidler, og *in vitro* forsøk har vist at inaktive effluksmekanismer både senker graden av iboende resistens, i tillegg til å redusere risikoen for seleksjon av resistensmutasjoner [116].

Polyklonale antistoffer mot efflukspumper eller antisense oligonukleotider er andre strategier med høye forventninger knyttet til seg [116]. Bedre kunnskaper om efflukspumper kan bidra til rasjonell legemiddeldesign både for pumpeinhibitorer eller antibiotika som ikke er gode substrater for efflukspumpene [116].

## **Variasjonen i reverserbarhet avhenger av resistensmekanisme**

Mulighetene til å gjenskape antibiotikafølsomme bakterier er avhengige av hvordan resistensmekanismer innvirker på bakterien under varierende grader av antibiotikaseleksjon og reflekteres i mål for relativ fitness. Tre hovedmekanismer kan øke prevalensen av antibiotikafølsomhet i en resistent bakteriepopulasjon: (i) spontan sensitivering i antibiotikafritt miljø, enten som følge av negativ seleksjon mot resistensmekanismer som gir biologisk kostnad, eller tap av resistens ved mer nøytral genetisk drift. (ii) direkte intervensjoner som øker andelen sensitive genotyper eller (iii) induert fenotypisk reversering.

### ***Spontan sensitivering***

Reverserbarhet uten antibakterielt seleksjonspress avhenger av de relative fitnessforskjellene mellom de isogene sensitive versus resistente stammene. I tillegg til klonal erstatning av varianter med lav fitness, vil reverseringshastighet påvirkes som følge av intracellulære genetiske prosesser der nettverks plassering er avgjørende for stabilitet. Gener med sentrale funksjoner har genprodukt med mange interaksjonspartnere og har lavere observerte mutasjonsrater. Disse resistensbestemmende kjernegenene vil trolig fjernes eller miste resistensfunksjoner saktere enn gener som utelukkende har dedikerte

resistensfunksjoner (for eksempel  $\beta$ -laktamaser,) siden slike tilleggsgen har en observert høyere mutasjonsrate med mindre *purifying selection* og kan lettere utvikle andre substratspesifisiteter gjennom videre evolusjon av proteinstrukturen som etter hvert mister resistensmekanismer.

Ellers vil sann genotypereversjon i de fleste tilfeller skje ved en veldig lav frekvens og den relative fitnessfordelen for antibiotikafølsomhet må være tilsvarende stor. Dette er igjen fordi baseparmutasjoner fordeles nokså tilfeldig i kromosomet med en i utgangspunktet lav frekvens som kan variere mellom arter og kromosomale loci. Ved antibiotikaseleksjon vil en resistensmutasjon kunne finnes i en stor andel av en eksponert populasjon. Sannsynligvis vil det også være en mulighet at en eller flere mutasjoner (kompensasjonsmutasjoner) i andre deler av bakteriens genom kan gjøre resistensmutasjonen mindre tung å bære. Om det så skulle oppstå en sann reversjonsmutant, så er det vist at den selektive fordelene til revertanten i de fleste tilfeller er liten, og i form av bedre fitness enn den opprinnelige resistente populasjonen, men kanskje bare litt bedre enn resistente mutanter som har utviklet en genetisk kontekst som kompenserer for fitnesskostnadene. Den selektive fordelene til revertantene i antibiotikafritt miljø er med andre ord veldig mye mindre enn fordelene til den resistente delen av populasjonen under antibiotikaseleksjon.

Tidsperspektivet for reversering, enten for kjernegener eller tilleggsgen, definert som tiden fra stanset antibiotikabruk, til når den høyeste fitness sensitive populasjonen har erstattet alle de sammenlignbare resistente bakteriene. Tidsaspektet vil nok i mange tilfeller være upraktisk langt, siden selv en liten resistent subpopulasjon vil blomstre opp igjen veldig raskt ved reeksponering til antibiotikumet. Uansett vil en slik kvalitativ antagelse om tidsaspekter være nødt til å fastsettes mer kvantitativt med matematiske modeller med empiriske bestemte parametere for å kunne brukes som et verktøy for rasjonell håndteringen av resistensproblematikk.

### ***Direkte intervensjoner som øker reversering***

Kromosomale resistensmutasjoner som har gitt den antimikrobielle målstrukturen mindre affinitet til antibiotika kan erstattes med sensitive allele ved lysogenisering av en temperat bakteriofag som integrerer et dominant sensitivt allel [135]. Fluoroquinolonresistens kan reverseres ved integrering av villtype *gyrA* og streptomycinresistens med villtype *rpsL* [135]. Gjennom modifiserte bakteriofager kan introduksjonen av gen som er viktige for effekt av antibiotika gi reversering av resistens [124].

En ny og spennende strategi for å reversere resistensnivået i en populasjon med opportunistiske eller obligate parasitter er smalspektrede vaksiner som gir en selektiv immunitet mot resistente bakterier og vil drive ned resistensnivået [136].

### ***Indusert fenotypisk reversering***

Antibiotikaadjuvans som øker effekten av konvensjonell antimikrobiell terapi ved en fenotypisk reversering inkluderer hemmere av antibiotikainaktiverende enzym slik som  $\beta$ -laktamasehemmerne, permeabilisering med ulike forbindelser, eller efflukspumpeinhibitorer. I et eksempel for fenotypisk reversjon av en type ikke arvelig resistens gjennom dannelse av persisterceller, benyttes muligheten til å stimulere til økt *proton-motive-force* (PMF) gjennom eksponering til visse næringsstoffer som øker opptak og gjenoppretter baktericid effekt [122]. På lignende vis kan resistensreversering i fremtiden kanskje oppnås ved å manipulere og fininnstille fysiologiske prosesser. Siden persisterer er en uensartet gruppering der mange forskjellige gen er involvert i å gi flere persisterspesifikke toleransemekanismer, så kan en mer generell tilnærming baseres på å utnytte felles mekanistiske aspekt ved baktericide antibiotika (virkningsmekanismer til antibiotika) [120].

SOS respons er viktig for bakteriell overlevelse etter eksponering til antibiotika av blant annet fluoroquinolontypen. Hemming av SOS respons kan oppnås ved økt uttrykk av *lexA* som koder for en SOS-repressor [124]. Lav permeabilitet kan potensielt reverseres ved introduksjon av poriner som øker opptaket av antibiotika [124]. Effekten av konvensjonelle antibiotika kan økes ved målrettet behandling med legemidler som virker inn på regulatorer for biofilmdannelse (for eksempel *csrA*) eller regulon involvert i beskyttelse mot oksidativt stress (*soxR*) for de antibiotikaene som er assosiert med økning i reaktive oksygenforbindelser [120]. Andre generelle mekanismer som kanskje kan fininnstilles for å bedre effekten av antibiotika inkluderer systemene som styrer peptidoglykansyntese og autolysinaktivitet eller styrker antibiotikaeffekter ved å fremme DNA replikasjon [120].

Antibiotikaseleksjon mot resistensfenotype er en teoretisk mulighet ved hyperantagonistiske legemiddelkombinasjoner [42], men hvilke bruksområder dette kan få i klinisk praksis er uvisst.

## ***Ulike virkemidler for å begrense nivået av antibiotikaresistens***

### **Mindre antibiotikabruk og intervensjoner på samfunnsplanet**

Politisk vilje til å prioritere resistenshandtering trenger ikke utelukkende være tiltak rettet mot økt legemiddelinnovasjon. Siden resistensfrekvens har en klar sammenheng med antibiotikabruk så vil redusert bruk bidra til at andelen antibiotikafølsomme bakterier øker og resistensnivået vil minke. En slik tilnærming til handtering av resistensproblematikken er tiltalende. Forvaltning av antibiotika som en form for ikke-fornybar ressurs, vil i mange tilfeller gi ulemper ved innføring av restriksjoner, og i noen tilfeller kan det være direkte uetisk å stanse bruken av ett eller flere antibiotika, spesielt dersom disse er kritisk viktige i terapeutisk humanmedisin. Stanset bruk av en eller noen få antibiotikaklasser vil heller ikke hankses multiresistente patogener siden det kan skje en samseleksjon med andre antibiotika fortsatt i bruk. Legemiddelprodusenter kan lide økonomiske tap som følge av innskrenket forbruk. Økt patenttid og eksklusive rettigheter er virkemidler som kan gjøre det mer attraktivt å utvikle nye antibiotika.

Hvis vi ser på hvor antibiotika brukes i dag, så er det flere områder som ligger i en etisk gråsoner siden prisen for antibiotikabruk har flere dimensjoner enn bare kostnadene knyttet til å lage et produkt. Verdien av antibiotikabruk må veies opp mot sannsynligheten for påfølgende begrensninger i muligheten til å kurere alvorlig sykdom. I dag brukes antibiotika i mange ulike sammenhenger. Viktigst vil kanskje mange si er behandling og forebygging av infeksjoner i mennesker og i en noen mindre grad i veterinærmedisin. Antibiotika brukes også til å behandle plantesykdommer og sykdommer i oppdrettsfisk [109]. Antibiotika i dyreoppdrett som brukes i behandlingssammenhenger utøver et høyt, men tidsbegrenset seleksjonspress for assosierte bakterier og de økosystemene som mottar effluenter. En del land tillater også antibiotikabruk som vekstfremmende midler i dyrefôr ved subinhibitoriske konsentrasjoner [109]. Ukontrollert bruk i veterinærmedisin fører til at store mengder antibiotika lekker ut i miljøet.

Redusert forbruk av antibiotika i humanmedisin kan komme som en direkte følge av bedret infeksjonskontroll som gjør at antallet bakterielle infeksjonssykdommer reduseres [137]. Riktig antibiotikabruk i behandling av en infeksjon vil per definisjon redusere transmisjonsraten og antall nye tilfeller [137]. Vaksiner øker befolkningens motstandskraft mot infeksjoner og minsker sykdomsprevalensen [137]. I tillegg til beskyttelse mot spesifikke patogener som eksemplifisert med de flervalente konjugerte pneumokokkvaksinene, så er et nytt felt som kan følge utviklingen av bredspektrede vaksiner til sykdomsforebygging, en type

smalspektrede vaksiner som rettes spesifikt mot resistente patogener [136]. De smalspektrede vaksinene kan tas i bruk før planlagt kirurgi og virker som en drivkraft for reversering av resistens til sensitivitet [136].

Andre tiltak som mer spesifikt begrenser spredning av resistens er screening av pasienter og helsepersonell i sykehus og iverksette tiltak i tilfeller der pasienter er bærere av resistente bakterier. Generelle tiltak for minimering av patogenspredning mellom pasienter og fra sykehusansatte hindrer også spredning av resistens som oppstår i løpet av behandling på sykehus. I samfunnet for øvrig vil økt allmennkunnskap og bevissthet om tiltak for smittereduksjon, slik som bruk av kondom, håndvask, eller munnbind, i tillegg til systemer av en mer strukturell art, men som gir trygg mat og rent vann gi ytterlige reduksjon i sykdomsprevalens og derfor også redusert antibiotikabruk [137].

Samfunnsmessige forhold kan påvirke resistensfrekvens. Dårlige sanitærforhold kombinert med feilbruk, liten kunnskap om eksisterende resistensmønstre og trange budsjetterammer som begrenser behandling med nye og effektive, men dyrere antibiotika kan tenkes å være årsaken til den særskilte økningen av resistens sett i en del utviklingsland [23]. Feilbruk av antibiotika er bruk som gir unødvendig økning i resistensfrekvens. Salg av antibiotika uten krav om resept fra lege øker risikoen for feilbruk. Riktig diagnose og antibiotikavalg kan likevel gi feilbruk dersom pasienten ikke tar medisinen som anvist, eller dersom legemiddelet ikke har riktig eller for lite eller for mye av angitt virkestoff som er en problemstilling i områder der distribusjonsskjeden ikke fanger opp falske og substandard legemidler.

For lav dosering gir ineffektiv behandling av sykdommen og større grad av sub-MIC seleksjon. Kostnadene til antibiotikabehandlingen må heller ikke være for store slik at varigheten blir for kort eller det brukes for lave doser. Unødvendig høy bruk setter et større seleksjonspress på alle eksponerte bakteriepopulasjoner og øker sannsynligheten for bivirkninger og påvirkning av normalflora. Unødvendig bruk som skyldes uriktig diagnose vil trolig øke ved reseptfritt salg av antibiotika dersom dette forhindrer konsultasjon. Legene må også ha tilgang til uavhengig legemiddelinformasjon [137].

I alle tilfeller må de lokale myndighetene være i stand til å håndheve bestemmelser om reseptpliktig salg av antibiotika og stimulere tilslutning og etterlevelse av utviklede terapianbefalinger [137]. En standardisert forskrivningspraksis følger retningslinjer for behandling og prioriteringer for bevaring av kritisk viktige [137]. En stabil tilgang til kvalitetssikrede legemidler er essensielt for kontinuitet i behandling [137].

WHO har utarbeidet en liste over kritisk viktige antibiotika som en referanse som myndigheter kan bruke for å prioritere over hvor risikohåndtering er mest nødvendig [39]. ”Rasjonell legemiddelbruk er kostnadseffektiv bruk som maksimerer klinisk terapeutisk effekt og samtidig minimerer legemiddelasosiert toksisitet og utviklingen av resistens” [137]. Risikohåndtering blir å begrense bruk av et kritisk viktig antibiotikum til de indikasjonene som trenger det mest [39]. WHO regner fluoroquinolonene, 3. og 4. generasjons kephalosporiner, makrolider og glykopeptider som de antibiotikaene med høyeste prioritet [39]. WHO anbefaler videre at nye antibiotika og de antibiotikaene som per i dag ikke har noen veterinærmedisinsk ekvivalent, ikke skal tas i bruk i landbruk (dyr og planter) eller akvakultur [39].

Tiltakene for håndtering av antimikrobiell resistens adressert interpatogene variasjoner (spredningsveier, syndromer) må nødvendigvis kontinuerlig guides gjennom overvåkning av resistensnivå, antibiotikabruk og hvor godt tiltakene er implementert [137]. Et minimumsnivå for målinger av antibiotikabruk og resistenstrender i regionalt prioriterte patogener kan lette påfølgende utvikling mot mer detaljerte system der samfunnsstruktur og økonomi muliggjør et møte med de metodologiske og logistiske utfordringer som håndteringen av antimikrobiell resistens innebærer [137].

Der hvor det ikke er praktisk mulig å minske antibiotikabruk så kan redusert spredning av antibiotika og resistensdeterminanter til miljøet dempe resistensfrekvens i åpne miljø som grenser til menneskeskapte kilder for antibiotikaresistens. Ved å unngå sammenblanding av menneskegenererte bakterier og naturlige økologiske systemer minimeres konsekvensene av antibiotikabruk [105]. Samtidig stanset frislipp av resistente bakterier fra mennesker og utslipp av antibiotika i avløp vil ikke bare hindre seleksjon og replikasjon av resistensen i nedstrøms økosystem [105], og i tillegg redusere spredning av humane opportunistiske og obligate patogener med eller uten resistens.

## **Raske og presise diagnostiske verktøy for infeksjoner**

Utvikling av diagnoseverktøy burde tas sikte på å være hurtige, nøyaktige og billige for å optimalisere terapeutisk bruk ved å (i) ekskludere virusinfeksjoner [23] (ii) tilpasse behandlingen etter resistensmønster og (iii) ta hensyn til mekanismer for ikke-arvelig resistens med hurtige tilbakemeldinger om oppnåelse av behandlingsmål, noe som er spesielt viktig i behandling av kroniske infeksjoner [138]. Nøyaktig og pålitelig identifikasjon av infeksjoner som krever antibiotikabehandling kan hindre ”fryktbasert” forskrivning av bredspektrede antibiotika [29]. En mulig teknologi som kan utvikles er artsuavhengige PCR-baserte analyser

med tidlige indikatorer for effekt ved spesifikt kvantifisere endringer i patogenmengde [138]. En slik test vil være med på å bestemme hvilken antibiotikagruppe som bør initieres og slik korte ned på både behandlingstid og feilbruk som følge av resistens, som gir unødige normalflorapåvirkninger og øker seleksjonspresset [138]. Kalibrering av metoden kan muliggjøre kvantifisering av effektmål for behandlingen [138].

Ved manglende diagnoseverktøy kan tilgang til epidemiologiske data være et forskrivningsverktøy for å tilpasse forskrivninger i forhold til resistensnivå og stanse bruk av antibiotika som har endemiske resistensnivå [23]. Seleksjonstrykket vil gå ned for disse typene resistens og vil påvirke reverseringshastigheten dersom resistens gir lavere fitness. Multiresistente (MDR) tilfeller vil trenge midlertidig stanset bruk av alle de antibiotikaene det er resistens mot, for å påvirke tilstedeværelsen av disse stammene grunnet samsелеksjon [23].

## ***En rekke cellulære bakterielle strukturer er identifisert som mulige legemiddelmål***

### **Bakterielle virulensmekanismer som målstruktur**

Virulensdempende legemidler som gjør infeksjonsforårsakende bakterier mindre patogene og reduserer antallet behandlingsskrevende infeksjoner vil kunne senke bruken av antibiotika. Virulenshemmere gir i forhold til konvensjonelle antibiotika svakere seleksjonspress utenfor vert og er mer patogenspesifikk med mindre bivirkninger, økoskygge og resistensutvikling [23, 139]. Smalere patogenspekter gir færre applikasjoner og mindre marked totalt sett [139]. Anvendelse av smalspektrede virulenshemmere krever også tilgang til rask og pålitelig diagnostisering [139].

Virulenshemmere kan virke mot forskjellige patogenisitetøkende mekanismer. Direkte hemming av bakterielle toksiner, slik som antistoffer mot toksinene difteri, botulinus og tetanus [139] er toksinspesifikke måter å hindre toksiners funksjon. Det gjøres også fremskritt for å hindre funksjoner av andre bakterielle toksiner slik som anthrax toksinet fra *Bacillus anthracis* [139]. Interferering med levering (*delivery*) av toksiner ved å hemme de store proteinkompleksene som danner type III sekresjonssystemene ved administrering av selektive inhibitormolekyler kan kanskje virke mot et større spekter patogener, siden type III sekresjonssystemene ofte er funnet blant patogener og kan ha en høy grad av konservering, men foreløpig er det ingen markedsførte preparater [139]. Cholestyramin hindrer toksin A og B fra *Clostridium difficile* i å nå epitelcellene i intestinalsysteemet og er i prinsippet også en måte å hindre toksinlevering (*delivery*) [139].

Adhesjon til vertsceller forutsetter som regel bakterielle pili eller fimbriae, og molekyler som hindrer fimbriae og pilisyntese (pilicider) er mulige legemiddelmål [139], som også er assosiert med biofilmdannelse [140].

## **Mål om å interferere med bakteriell quorum sensing**

*Quorum sensing* (QS) er knyttet til virulens i flere bakteriearter, deriblant *Pseudomonas aeruginosa*. Murine modellstudier med en LasR mutant (LasR er en LuxR homolog i *P. aeruginosa* som er en positiv transkripsjonsregulator som aktiveres av QS-signaler av typen *acyl homoserine lactone* (AHL) [141]) viste at LasR var nødvendig for virulens, men ikke kolonisering [142]. Mutanten viste ingen forskjell i *in vitro* vekstrate og kunne invadere og overleve i murine lungevev, men oppnådde ikke like høy celletetthet og forårsaket verken pneumoni, bakteriemi eller død [142].

Attenuering av virulens kan skje ved ulike stadier for uttrykk av virulensdeterminanter. Å ødelegge for kommunikasjonen mellom bakterier med kjemisk inaktivering av QS-molekyler (acylhomoserine lactonase) [139] eller ”quorum quenching” ved designer QS-reseptor antagonister [23], samt hindret syntese av QS-molekyler [139] er mulige angrepspunkt. Manipulering med transkripsjonsfaktorer som endrer uttrykk av virulensgen (adhesjon, toksinproduksjon og sekresjon) er også mulige strategier for å stanse virulente prosesser [139]. Signaler fra andre bakteriearter eller fra høyerestående organismer, men som ikke er ment som QS signaler [143] kan brukes av patogene arter som et signal for virulensaktivering. Den bakterielle adrenerge reseptoren QseC aktiverer uttrykk av virulensgen i *S. typhimurium* og *E. coli* [144, 145]. Molekyler som målrettet hemmer QseC –mediert genaktivering vil trolig også kunne dempe virulens [145].

## **Biofilmer som målstruktur**

Også biofilmdannelse koordineres gjennom QS i alle stadiene fra initial adhesjon, modning og polymersekresjon til *swarming* og frisetting til planktonisk spredning [90, 146]. Det er økende bevissthet omkring en høy prevalens av biofilmdannelse under infeksjon. Biofilm-assosierte infeksjoner kan være vanskelige å behandle siden selv biofilmer bestående av bare en art, ofte har en heterogen sammensetning, fysiologisk sett. Ulike persisterer med ulike mekanismer for antibiotikatoleranse [120], kombinert med lavere antibiotikapenetrering i en biofilmmatriks som også hindrer effektive immunsystemresponser, gjør biofilmassosierte infeksjoner vanskeligere å eliminere med konvensjonelle antibiotika. Legemidler som kan



hemme biofilmdannelse eller fremme oppløsning av biofilm er derfor viktige strategier for bedret infeksjonskontroll.

## **Populasjonsendring ved infiltrering av en modifisert "Trojansk" bakterie**

Nært slektskap blir ofte trukket inn som en forklarende årsak for mer altruistisk adferd, der et individ gir opp noen av sine mer egoistiske intensjoner til fordel for andre individer. I bakterielle samfunn kan sosiale interaksjoner i sessile biofilmer koordineres for å øke populasjonens totale fitness, noe som gir fordeler for de fleste individuelle cellene. En type koordinert fellesinteresse er sekresjonen av stoffer som gir fordeler, ikke bare for den produserende cellen, men for alle omkringliggende celler som har mulighet til å benytte denne fellesgoden. Private goder holdes intracellulært, men sekreerte fellesgoder (eksoprodukter) befinner seg ekstracellulært. Derfor er reguleringen av eksoprodukter quorum-sensing mediert, og tilpasset en celletetthet som maksimerer gevinster av fellesgoder [147], slik at ikke fellesgodene diffunderer av sted uten nytte.

En modifisert bakterie som kan høste av fellesgoder, men som ikke produserer eksoprodukter selv, vil ha en relativt høyere fitness og kan derfor infiltrere og kanskje til og med erstatte villtypepopulasjonen. Dette kan redusere det totale antallet bakterier som en følge av en samlet reduksjon i total fitness og systemets bærekapasitet, og direkte redusere patogenisitet ved å hemme sekresjon av patogenisitetsfremmende eksoprodukter [148]. Patogenisitetsfremmende eksoprodukter er for eksempel proteaser, toksiner, siderofor, phospholipaser, rhamnolipider, pyocyanin [141].

Den modifiserte bakterien har fått noen tilsynelatende gode egenskaper, men man kan også inkludere innebygde svakheter. Antibiotikasensitivitet og regulert biocinproduksjon (mot seg selv og mot villtypebakterier) kan inkluderes i modifikasjoner som en type Trojansk heststrategi [148]. Når den modifiserte bakteriepopulasjonen har infiltrert villtypepopulasjonen kan biocidproduksjon økes ved eksternt tilført signal eller ved celletetthetsavhengig QS-regulering [148].

## **Modifiserte oppsøkende "pathogen-killers"**

Reprogrammering av bakterier som kan søke opp og drepe mikrobielle patogener er en ny og spennende strategi. Ny forskning viser eksempler på at dette kan bli en klinisk mulighet ved å reprogrammere chemotaxis til å oppsøke patogener [149]. Her viser de eksempel på *E. coli* som svømmer mot økende konsentrasjoner av AHL som produseres av *P. aeruginosa*, ved å sette *cheZ* genet under kontroll av en LasR-AHL aktivator responsiv promotor pLasI

[149]. Denne *killer- E. coli* stammen er også utrustet med sekreerbart microcin S som er et antimikrobielt peptid (class II microcin) med god effekt mot Gram-negative, og sekresjon av DnaI som har vist effekt for oppløsning av biofilm med høyt innhold av ekstracellulære DNA-komponenter [149].

### **Nye legemidler med antimikrobiell effekt**

I klassisk bakteriofag terapi forårsakes bakteriell celledød direkte av bakteriofaginfeksjon. Ikke-lyserende, men fortsatt dødelige bakteriofager kan redusere faren for toksisk sjokk ved massiv bakteriell lysis [138]. Mulige ulemper ved systemisk anvendelse er sjansene for immunogene responser og antistoff-mediert nøytralisering av bakteriofag [138]. Klassisk bakteriofag terapi vil på grunn av et høyt seleksjonspress ganske sikkert møte hurtig resistensutvikling fra sine bakterielle vertsceller [138]. Gitt at bakteriofagene er selvstendig replikerende biologiske entiteter, kan også bakteriofagpopulasjonene co-evolvere i et "arms race".

### **Antimikrobielle peptider**

Ribosomsyntetiserte antimikrobielle peptider (AMP) produseres av et stort mangfold av organismer inkludert bakterier, planter, insekter, amfibier og dyr, og er en del av det medfødte (uspesifikke) immunforsvaret i mennesker [150, 151]. AMP kan deles inn i seks klasser basert på struktur [150] som bestemmes av sulfidbroer, motiver av  $\alpha$ -helikser,  $\beta$ -sheets, lineære eller sirkulære peptid, og antar ofte ulike konformasjoner i vandige eller lipofile miljøer [152].

Kjemiske fellestrekk blant mange av AMPene er en kombinasjon av lipofilisitet og hydrofilisitet gjennom positivt ladete aminosyreresiduer [153]. Den antimikrobielle effekten oppnås trolig gjennom permeabilisering av bakteriemembranen ved integritetsforstyrrelser, rupturer eller poredannelser i membranen som i seg selv kan gi cellelysis [151], eller tilrettelegge intracellulært opptak av AMP. Intracellulære strukturer som kan interagere med AMP er anioniske polymerer som DNA og RNA og noen AMP inducerer autolyse av bakterieceller [151].

Produksjonen av humane AMP varierer noe mellom ulike celletyper. Thrombocidinene er blodplatespesifikke [154], mens de histidinrike peptidene, histatinene, sekreseres i spytt, og det humane peptidet LL-37 som tilhører gruppen cathelicidin, inngår sammen med  $\alpha$ - og  $\beta$ - defensinene i flere av immunforsvarscellene, Paneth-celler og

epitelceller [152]. Granulene i nøytrofile celler inneholder modne  $\alpha$ -defensiner som kan ha autotoksiske egenskaper dersom de frisettes feil [150].

Kolesterol utgjør en viktig del av humane cellemembraner og gir også beskyttelse mot autotoksisitet fra endogene AMP [150]. En selektivitet mot bakterielle membraner oppnås også ved at kationiske AMP har større affinitet for de negativt ladete komponentene i bakteriemembraner slik som teikoisk syre, phospholipider og lipid A i lipopolysakkarider (LPS) [154] ved å fortrenge positivt ladete metallioner som  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  [155].

Forskjellige AMPer kan ha forskjellige virkemåter, avhengig av størrelse og struktur [151], for eksempel er det foreslått at lengden på en del antimikrobielle peptider fra Gram-positive bakterier omtalt som lantibiotika, er med på å gi en veldig effektiv og supersmalt baktericid spekter, fininnstilt mot konkurrenter med ”riktig” tykkelse på cellemembraner [156].

Selv om store AMP molekyl kan ha andre virkningsmekanismer enn kortere AMP, kan antibiotisk effekt være tilsvarende. Med utgangspunkt i den minimale farmakoformodellen for små kationiske AMP [157] har forskergruppen Svendsen og Strøm fra Universitetet i Tromsø (UiT,) Norges arktiske universitet, syntetisert nye forbindelser som trolig kan gi legemidler med perorale administreringsmuligheter, og med en relativt enkel syntesevei, samt mindre risiko for immunologiske responser enn lange peptider, virker som gode kandidater for denne nye antibiotikagruppen [158]! Ved å bruke unaturlige  $\beta$ -aminosyrer øker *in vivo* stabilitet ved at molekylene ikke er substrat for de vanligste proteasene og molekylene har vist aktivitet mot en biofilmmodell [159]. Det blir meget spennende å følge med på fortsettelsen av historien om en ny antibiotikagruppe fra peptidforskningsmiljøene i Tromsø!

Den kanskje eneste mulige ulempen forbundet med medisinsk anvendelse av syntetiske AMP er at det økte seleksjonspresset som et økt forbruk gir mot eksponerte bakterier, potensielt kan gi kryssresistens mot det menneskelige immunsystem. Resistens kan komme av AMP-inaktiverende proteaser, AMP som efflukspumpesubstrat, og nedsatt affinitet ved modifikasjoner som nøytraliserer negative ladninger på bakteriemembraner [154]. Mekanismene for membranendringene er hypotetisert å være assosiert med betydelig fitnessreduksjon, siden denne resistensmekanismen ikke er mer utbredt, tatt i betraktning den relativt hurtige evolusjonen av bakterier i forhold til mennesker [155, 160]. Det er funnet flere resistensmekanismer som modifierer negativt ladete molekyler som stikker ut av bakteriecellen, med adderinger av molekyler som kan gi frie positivt ladet aminogrupeer (esterifisering med D-alanine, addering av lysine til det normalt negativt ladete fosfolipidet

phosphatidylglycerol [154].) lipid A modifikasjoner med aminoarabinose og phosphoethanolamine [155], og membranstabiliserende inkorporering av ekstra fettsyrer til lipid A [154]. AMP-resistens er knyttet til økt virulens i dyremodeller [154, 155].

Reversering av AMP resistens vil kunne følge samme prinsipper som for reversering av annen antibiotikaresistens, primært styrt av kostnad for resistens, kompensasjoner for kostnad og seleksjonspress. Det antas at kostnadene for resistens gjennom membranendringer er grunnen til at denne resistensmekanismen ikke er mer vanlig [155]. Eksperimentell kvantifisering av fitnesskostnader for AMP resistens har vist eksempel på tilsynelatende kostnadsfrie effluksmekanismer [161], og at initielle kostnader kan elimineres ved påfølgende kompensasjonsmutasjoner [162], samt at AMP-resistens kan bevares stabilt i AMP-frie miljø [163]. Det er også vist et eksempel på kryssresistens mellom en syntetisk AMP-analog og humane AMP selv om de antimikrobielle virkningsmekanisme i utgangspunktet var ulik [162].

Av de tre nevnte resistensmekanismene er det effluksmekanismer og ladningsnøytralisering av bakteriemembraner som kan gi samseleksjon gjennom pleiotropisk resistens mot flere naturlige og syntetiske kationiske AMP. Seleksjonspresset fra syntetiske kationiske AMP er ikke nødvendigvis sammenlignbart med naturlige situasjoner der bakterier eksponeres for flere ulike AMP og koordinerte immunsystemresponser gjennom immunmodulerende kjemotaktiske effekter [160]. Viktige spørsmål om mulig økoskygge for de nye peptidantibiotikaene bør nok baseres på grundige undersøkelser, som kanskje burde inkludere en utredning av hvordan påvirkningen av mikrobielle kommensaler fra endogene AMP, skiller seg fra hvordan immunsystemet håndterer patogener, for det virker som at de humane endogene AMP medierer vilkårene for kommensale og symbiotiske bakterie – vert forhold.

## **tRNA syntetase hemmere**

Andre konserverte strukturer som har store forskjeller mellom prokarya og eukarya er tRNA syntetasene [164], og her er det allerede på vei en ny klasse boronbaserte aminomethylbenzoxaboroles som spesifikt hemmer bakteriell leucyl-tRNA syntetase og har effekt mot Gram-negative bakterier [165].

## Oppsummering

Hva fremtiden byr på av nye muligheter for å spesifikt hemme virulente bakterieinfeksjoner, vil nok henge sammen med den brede innsatsen som gjøres i dag, som igjen flytter kunnskapshorisonten og avdekker enda flere sider av evolusjonens naturlige og enorme kreativitet. Menneskeheten har jo historisk sett også brukt naturen som en kilde til inspirasjon, og det ser bare ut til at mulighetene til å lære bare blir flere med akkumulering av kunnskap og ved at ny teknologi tas i bruk.

Resistensproblematikken vi ser i dag bør ikke komme som noen overraskelse, tatt i betraktning den sterke seleksjonen konvensjonelle antibiotika utøver på mange bakteriepopulasjoner og arter. Mer spesifikke intervensjonsstrategier er derfor ønskelig for kommende nye antibiotika, der vi bør bevege oss bort fra de bredspektrede antimikrobielle ”atombombene” og heller omsette kunnskap i form av terapimuligheter som modulerer og kontrollerer bakteriell adferd, eller spesifikt hindrer patogener, uten store effekter på mekanismene som holder oss friske. Optimalisering av samspillet med gunstige bakterielle interaksjoner kan være realiserbart innen overskuelig framtid med mulige implikasjoner for behandlingen av en rekke sykdommer.

Inntil nye legemidler står klar for å supplere dagens konvensjonelle antibiotika, er det viktig å prøve å bevare effekten for de mest kritisk viktige antibiotikaene gjennom riktig bruk. I et medmenneskelig perspektiv er det derfor alltid rett å bruke antibiotika så klokt som mulig, men det er også klare ”egoistiske” fordeler ved å bruke antibiotika fornuftig. Økt grad av resistens i normalflora vil kunne gi seg utslag i problematiske infeksjoner ved at normalfloraen endrer karakter når immunforsvaret er under et normalt nivå eller har andre påkjenninger. Også når kommensale eller andre miljøbakterier havner på avveie, i nye og uvante deler av kroppen, kan sykdom som vil kunne kreve antibiotikabehandling oppstå, selv i helt friske mennesker. Resistensdeterminanter som eksisterer i normalfloraen kan i tillegg overføres til de mer alvorlige patogenene som passerer, ofte asymptomatisk, gjennom områder som normalt ikke koloniseres av disse patogenene. Hvordan og hvorfor resistensnivået utvikler seg i ulike bakteriepopulasjoner som gjenfinnes i kliniske isolat, i normalflora, i sykehus, i samfunnet, og andre miljø, er viktige spørsmål som bør besvares så utfyllende at rasjonelle intervensjonsstrategier kan muliggjøres. Det er vist flere mekanismer som kan påvirke persistens av resistens, men til tross for en intrinsisk høy kompleksitet i mulige interaksjoner, er det fullt mulig å lage relativt enkle matematiske modeller som kan gi kvantitative beregninger for hvor en bør sette inn virkemidler og initiativ.



## Vedlegg

Tabell 3: Liste over antimikrobielle midler med markedsføringstillatelse i Norge 2013 [73].

ATC	GENERISK BETEGNELSE
<b>J01</b>	<b>Antibakterielle midler til systemisk bruk</b>
J01A	Tetrasykliner (doksisyklin, lymesyklin, tetrasyklin, tigesyklin)
J01C	$\beta$ -laktamantibakterielle midler, penicilliner
	<i>Penicilliner med utvidet spekter:</i> ampicillin, amoksisillin, pivmecillinam, mecillinam <i><math>\beta</math>-laktamaseømfintlige penicilliner:</i> benzylpenicillin, fenoksymetylpenicillin dikloksacillin, kloksacillin <i>Kombinasjon av penicilliner, inkl. <math>\beta</math>-laktamasehemmere:</i> piperacillin + tazobactam
J01D	Andre $\beta$ -laktamantibakterielle midler
	<i>Cefalosporiner:</i> 1. gen: cefaleksin, cefalotin 2. gen: cefuroksim 3. gen: cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson <i>Monobaktamer:</i> aztreonam <i>Karbapenemer:</i> meropenem, ertapenem, doripenem, og imipenem + cilastatin (enzymhemmer) <i>Andre cefalosporiner og penemer:</i> ceftarolinfosamil
J01E	Sulfonamider og trimetoprim (sulfametoksazol, trimetoprim)
J01F	Makrolider (erytromycin, spiramycin, klaritromycin og azitromycin)
J01F	Linkosamider (klindamycin)
J01F	Streptograminer (ingen markedsført i Norge; uten MT: streptogramin A og B)
J01G	Aminoglykosider (tobramycin, gentamicin)
J01M	Quinoloner (Fluoroquinoloner eks ofloksacin , ciprofloksacin)
<b>J04</b>	<b>Antimykobakterielle midler</b>
J04A B02	rifampicin
J04A C01	isoniazid
J04A M05	pyrazinamid, rifampicin, isoniazid
J04B A02	dapson
<b>D06A</b>	<b>Antibiotika til utvortes bruk</b>
D06B A01	sølvulfadiazin
D06A A03	oksyttetrasyklin og polymyxin B
D06A X01	fusidinsyre
D06A X05	bacimycin og klorheksidin
D06A X13	retapamulin
<b>D08A</b>	<b>Antiseptika og desinfiserende midler</b>
D08A C01	dibrompropamidin
D08A C02	klorheksidin
D08A J03	cetylpyridin
<b>G01A</b>	<b>Antiinfektiver og antiseptika, ekskl. kombinasjoner med kortikosteroider</b>
G01A A10	klindamycin
G01A F01	metronidazol

## Kilder

1. Hancock, R.E. and D. Knowles, *Are we approaching the end of the antibiotic era.* Current Opinion in Microbiology, 1998. **1**: p. 493-494.
2. Kumazawa, J. and M. Yagisawa, *The history of antibiotics: The Japanese story.* Journal of Infection and Chemotherapy, 2002(8): p. 125-133.
3. WHO, *Infectious Disease Report.* 2000, WHO.
4. WHO. *Children: reducing mortality - Fact sheet N°178.* 2012 2013 May 09]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html>.
5. Schmieder, R. and R. Edwards, *Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches.* Future Microbiology, 2012. **7**(1): p. 73-89.
6. *Time-Line of Microscopes.* [cited 2013 04092013]; Available from: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/timeline/>.
7. Evans, A.S., *Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited.* The Yale Journal of Biology and Medicine, 1976. **49**: p. 175-195.
8. *Robert Koch, Nobel Prize in Physiology or Medicine 1905.* 1905 [cited 2013 04.09.2013]; nobelprize.org]. Available from: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1905/koch-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/koch-bio.html).
9. Drews, G., *The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century.* FEMS Microbiol Rev., 2000. **24**(3): p. 225-249.
10. Relman, D.A., et al., *Microbial Evolution and Co-Adaptation: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg.* 2009.
11. Best, M. and D. Neuhauser, *Ignaz Semmelweis and the birth of infection control.* Quality and Safety in Health Care (BMJ Quality and Safety), 2004(13): p. 233–234.
12. Rosich, F.B.L., *The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize.* Pharmacology, 2008. **82**: p. 171-179.
13. NobelPrize, T. *Gerhard Domagk.* 1939 17 oktober 2012]; Available from: [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org).
14. NobelPrize, T. and i.P.o.M. 1945. *Sir Alexander Fleming, Ernst Boris Chain, Sir Howard Walter Florey.* 1945 [cited 2012 15 november]; Available from: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/).
15. FHI, F., *Legemiddelforbruket i Norge 2007-2011.* 2012.
16. Hall, B.G. and M. Barlow, *Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future.* Drug Resistance Updates, 2004. **7**: p. 111-123.
17. Clardy, J., M. Fischbach, and C. Currie, *The natural history of antibiotics.* Current Biology, 2009.
18. Davies, J. and D. Davies, *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.* Microbiology and molecular biology reviews, 2010. **74**(3): p. 417-433.
19. Eucast, *EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.Def 1.2 - Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.* 2000.
20. Levy, S.B., *Microbial Resistance to Antibiotics: An Evolving and Persistent Problem.* The Lancet, 1982.
21. Barber, M., *Staphylococcal Infections Due to Penicillin-Resistant Strains.* British Medical Journal, 1947.
22. Crofton, J. and D.A. Mitchison, *Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis.* British Medical Journal, 1948.
23. Levy, S.B. and B. Marshall, *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.* Nature Medicine, 2004 **10**(12): p. 122-129.
24. Watanabe, T., *Infective Heredity of multiple drug resistance in bacteria.* Bacteriological Reviews, 1963. **27**(1): p. 87-115.



25. McDermott, P.F., et al., *Antimicrobial Drug Resistance in Escherichia coli from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002*. Emerging Infectious Diseases, 2012. **18**(5): p. 741-749.
26. Harbottle, H., et al., *Genetics of antimicrobial resistance*. Animal Biotechnology, 2006. **17**(2): p. 111-124.
27. Högberg, L.D., A. Heddini, and O. Cars, *The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances*. Trends in Pharmacological Sciences (Cell), 2010. **31**(11): p. 509-515.
28. Helms, M., et al., *Excess Mortality Associated with Antimicrobial Drug-Resistant Salmonella Typhimurium*. Emerging Infectious Diseases, 2002. **8**(5).
29. U.S. Congress, O.o.T.A., *Impacts of Antibiotic-Resistant Bacteria: OTA-H-629*. 1995.
30. Holmberg, S., S. Solomon, and P. Blake, *Health and economic impacts of antimicrobial resistance*. Rev Infect Dis, 1987. **9**(6): p. 1065-78.
31. WHO. *Antimicrobial resistance - Fact sheet N°194*. 2012 [cited 2013 May 10 2013 May 10]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html>.
32. Nugent, R. and E.B.A. Beith, *The Race Against Drug Resistance* Center for Global Development, 2010.
33. Kahlmeter, G., et al., *European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003. **52**(2): p. 145-148.
34. McGowan Jr., J.E., *Economic impact of antimicrobial resistance*. Emerging Infectious Diseases, 2001. **7**(2): p. 286-292.
35. Kirk, L.M.M., *Professionalism in medicine: definitions and considerations for teaching*. Emerging Infectious Diseases, 2001. **7**(2): p. 286-292.
36. helsebiblioteket. *forord retningslinjer antibiotikaforskrivning* Available from: <http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/antibiotika/forord>.
37. Arbeidsdepartementet, A. *Lov om folketrygd (folketrygdloven)*.  
Del IV. Ytelser ved sykdom m.m.  
§ 5-3. Utgiftstak for egenandeler  
§ 5-14. Viktige legemidler og spesielt medisinsk utstyr m.m.  
§ 5-15. Viktige legemidler som også brukes i sykehus LOV-1997-02-28-19 1997 SIST-ENDRET: LOV-2013-04-19-14 2013.05.02]; Available from: <http://www.lovdatabasen.no/all/nl-19970228-019.html>.
38. Sabuncu, E. and J.D.C.B.-B.S.P.M.L.P.-Y.B.L.W.D. Guillemot, *Significant Reduction of Antibiotic Use in the Community after a Nationwide Campaign in France, 2002–2007*. Public Library of Science (PLoS) Med, 2009. **6**(6).
39. WHO and A.G.o.I.S.o.A.R. (AGISAR), *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. 2011.
40. Levison, M.E., *Pharmacodynamics of antimicrobial drugs*. Infectious Disease Clinics of North America, 2004. **18**: p. 451–465.
41. Atkinson, V.L.B.A., *Determination of the Range of Antibacterial Activity by Use of Viable Counts*. Journal of clinical microbiology, 1982. **16**(1): p. 70-76.
42. Chait, R., A. Craney, and R. Kishony, *Antibiotic interactions that select against resistance*. Nature, 2007. **Vol 446**.
43. Hegge, A.B., *Formulering av antibiotika i behandling av motstandsdyktige bakterieinfeksjoner*. Norsk Farmaceutisk Tidsskrift, 2012. **10**: p. 25-29.
44. Lewis, K., *Persister Cells*. The Annual Review of Microbiology, 2010. **64**: p. 357–72.
45. Alekshun, M.N. and S.B. Levy, *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. Cell, 2007. **128**: p. 1037-1050.

46. Fajardo, A., et al., *The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens*. PLoS ONE, 2008. **3**(2).
47. Wexler, H.M., *Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty*. Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology (asm), 2007. **20**(4): p. 593-621.
48. Björkman, J. and D.I. Andersson, *The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective*. 2000.
49. Snyder, L. and W. Champness, *The Molecular Genetics of Bacteria*. 2007.
50. Baquero, J.L.M.F., *Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(7): p. 1771-1777.
51. Boto, L., *Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges*. Proceedings of the Royal Society B, 2010. **277**: p. 819-827.
52. Kimura, M., *Preponderance of synonymous changes as evidence for the theory of molecular evolution*. nature, 1977. **267**.
53. Gogarten, J.P. and J.P. Townsend, *Horizontal Gene Transfer, Genome Innovation and Evolution*. Nature reviews Microbiology, 2005. **3**: p. 679-687.
54. Johnsen, P., *personal communication - evolusjonært konserverte og optimaliserte gen i bakterier og fitnesskostnader for resistens*. 2009.
55. Ambur, O.H. and T.D.S.A.F.S.V.B.K.L.T.R.T. Tønjum, *Genome dynamics in major bacterial pathogens*. FEMS Microbiology Reviews, 2009. **33**: p. 453-470.
56. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria*. Annual Review of Genetics, 2009. **43**: p. 167-195.
57. Starikova, I., *The biological cost of mobile genetic elements encoding antimicrobial resistance in bacteria*, in *Department of pharmacy*. 2012, Universitet i Tromsø: Norges arktiske universitet: Tromsø.
58. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations*. FEMS Microbiology Reviews, 2011. **35**: p. 901-911.
59. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* Nature, 2010. **8**.
60. Walker, B.R.L.V.P.N., *Compensatory Mutations, Antibiotic Resistance and the Population Genetics of Adaptive Evolution in Bacteria*. Genetics, 1999. **154**: p. 985-997.
61. Schrag, S.J., V. Perrot, and B.R. Levin, *Adaptation to the Fitness Costs of Antibiotic Resistance in Escherichia coli*. PNAS: Biological Sciences, 1997. **264**(1386): p. 1287-1291.
62. Schrag, S.J. and V. Perrot, *Reducing Antibiotic Resistance*. Nature, 1996. **381**: p. 120-121.
63. Snyder, L. and W. Champness, *Bacterial Genetic Analysis: Forward and Reverse*, in *The molecular genetics of bacteria*. 2007. p. 150.
64. Shahid, M. and A.S.F.S.M.P.H.M.K.A.M.I. Shukla, *An overview of CTX-M  $\beta$ -lactamases*. Reviews in Medical Microbiology, 2011. **22**: p. 28-40.
65. Anderson, P. and J. Roth, *Spontaneous tandem genetic duplications in Salmonella typhimurium arise by unequal recombination between rRNA (rrn) cistrons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1981. **78**(5): p. 3113-3117.
66. Snyder, L. and W. Champness, *Bacterial Genetic Analysis: Forward and Reverse*, in *The molecular genetics of bacteria*. 2007. p. 192.
67. Soskine, M. and D.S. Tawfik, *Mutational effects and the evolution of new protein functions*. Nature reviews Genetics, 2010. **11**.

68. Nielsen, C.M.T.K.M., *Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria*. Nature reviews Microbiology, 2005. **3**: p. 711-722.
69. Sisson, G., J.-Y.J.A.G.L.B.N.R.S.L.-M.A.R.D.E. Berg, and P.S. Hoffman, *Metronidazole Activation Is Mutagenic and Causes DNA Fragmentation in Helicobacter pylori and in Escherichia coli Containing a Cloned H. pylori rdxAI (Nitroreductase) Gene*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(18): p. 5091-5096.
70. Hacker, J. and E. Carniel, *Ecological fitness, genomic islands and pathogenicity - A Darwinian view of the evolution of microbes*. EMBO reports, 2001. **2**(5): p. 376-381.
71. Gogarten, J.P., W.F. Doolittle, and J.G. Lawrence, *Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer*. 2002.
72. Norman, A., L.H. Hansen, and S.J. Sørensen, *Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool*. Philosophical Transactions of The Royal Society B, 2009. **364**: p. 2275-2289.
73. Cohan, F.M., *Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes*. TREE, 1994. **9**: p. 175-18.
74. Majewski, J., *Sexual isolation in bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **199**: p. 161-169.
75. Ge, F., L.-S. Wang, and J. Kim, *The Cobweb of Life Revealed by Genome-Scale Estimates of Horizontal Gene Transfer*. PLoS Biology, 2005. **3**(10): p. 1709-1718.
76. Bergstrom, C.T., M. Lipsitch, and B.R. Levin, *Natural Selection, Infectious Transfer and the Existence Conditions for Bacterial Plasmids*. 2000.
77. Sommer, M.O.A., G. Dantas, and G.M. Church, *Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora*. Science, 2009. **325**.
78. Johnsborg, O., V. Eldholm, and L.S. Håvarstein, *Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function*. Research in Microbiology 158 (2007) 767e778, 2007. **158**: p. 767-778.
79. Alloi and Claverys, *Development of competence in Streptococcus pneumoniae: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease*. Molecular Microbiology, 1998. **29**(1): p. 75-83.
80. Håvarstein, L.S., G. Coomarasamy, and D.A. Morrison, *An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1995. **92**: p. 11140-11144.
81. Hülter, N. and W. Wackernagel, *Double illegitimate recombination events integrate DNA segments through two different mechanisms during natural transformation of Acinetobacter baylyi*. Molecular Microbiology, 2008. **67**(5): p. 984-995.
82. Overballe-Petersen, S. and K.H.P.J.J.K.M.N.E. Willersleva, *Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA*. PNAS, 2013. **110**(49): p. 19860–19865.
83. Manning, A.J. and M.J. Kuehn, *Functional Advantages Conferred by Extracellular Prokaryotic Membrane Vesicles*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2013.
84. Snyder, L. and W. Champness, *Conjugation*, in *The Molecular Genetics of Bacteria*. 2007. p. 245-249.
85. Dawkins, R., *The selfish gene*. 2011, Grand Haven, Mich. : Brilliance Audio.
86. Snyder, L. and W. Champness, *Plasmids*, in *The molecular genetics of bacteria*. 2007. p. 207.
87. Cox, M.M., *Motoring along with the bacterial RecA protein*. Nature, 2007. **8**: p. 127-138.

88. Levin, B.R. and C.T. Bergstrom, *Bacteria are different: Observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes*. PNAS, 2000. **97**(13): p. 6981-6985.
89. Jain, R., M.C. Rivera, and J.A. Lake, *Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1999. **96**: p. 3801-3806.
90. Michiels, N.V.K.B.B.D.M.F.J.F.J.V.J., *Living on a surface: swarming and biofilm formation*. Trends in Microbiology, 2008. **16**(10): p. 496-506.
91. Sykes, S.R., *The 2009 Garrod Lecture: The evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009.
92. Bouma, J.E. and R.E. Lenski, *Evolution of a bacteria/plasmid association* Nature, 1988. **335**.
93. Stewart, B.R.L.M.L.V.P.S.S.R.A.L.S.N.M.W.F.M., *The Population Genetics of Antibiotic Resistance*. Clinical Infectious Diseases, 1997. **24**(Suppl 1): p. 9-16.
94. Bonten, M.J.M., D.J. Austin, and M. Lipsitch, *Understanding the Spread of Antibiotic Resistant Pathogens in Hospitals: Mathematical Models as Tools for Control*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **33**(HEALTHCARE EPIDEMIOLOGY): p. 1739-1746.
95. De Gelder, L., et al., *Combining Mathematical Models and Statistical Methods to Understand and Predict the Dynamics of Antibiotic-Sensitive Mutants in a Population of Resistant Bacteria During Experimental Evolution*. the Genetics Society of America, 2004. **168**: p. 1131-1144.
96. Cantón, R. and P. Ruiz-Garbajosa, *Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes*. Current Opinion in Pharmacology, 2011. **11**: p. 477-485.
97. Austin, D.J., K.G. Kristinsson, and R.M. Anderson, *The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1999. **96**: p. 1152-1156.
98. Levin, D.I.A.B.R., *The biological cost of antibiotic resistance*. Current Opinion in Microbiology, 1999. **2**(489-493).
99. Gillespie, C.F.P.T.D.M.S.H., *Methods to Determine Fitness in Bacteria*, in *Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology*. 2010, Springer Science+Business Media.
100. Forney, H.-J.A.H.-J.L.L.J., *System for Determining the Relative Fitness of Multiple Bacterial Populations without Using Selective Markers*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(11): p. 7383-7385.
101. Bergman, M., et al., *Effect of Macrolide Consumption on Erythromycin Resistance in Streptococcus pyogenes in Finland in 1997-2001*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **38**: p. 1251-1256.
102. Bean, D.C., et al., *Resistance among Escherichia coli to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **56**: p. 962-964.
103. Enne, V.I., et al., *Persistence of sulphonamide resistance in Escherichia coli in the UK despite national prescribing restriction*. The Lancet, 2001. **357**: p. 1325-1328.
104. Felleskatalogen. *Felleskatalogen*. 2013 [cited 2013 2013.11.15 / 2013.12.20 - Bactrim]; Available from: <http://felleskatalogen.no/medisin> + <http://felleskatalogen.no/medisin/bactrim-roche-546680>.
105. Martinez, J.L., *Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants*. Environmental Pollution, 2009. **157**: p. 2893-2902.
106. Johnsen, P.J., et al., *Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance*. The Lancet, 2009. **9** p. 357-364.

107. Sundqvist, M. and P.G.D.I.A.M.S.-K.A.R.H.C.K.A.-S.O.C.G. Kahlmeter, *Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. **65**: p. 350-360.
108. Corpet, D.E., *Antibiotic resistance from food*. New England Journal of Medicine, 1988. **318**(18): p. 1206–1207.
109. Levy, S.B., *Factors impacting on the problem of antibiotic resistance - The 2000 Garrod Lecture*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. **49**: p. 25 - 30.
110. Chapman, J.S., *Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. **51**: p. 271-276.
111. Allen, H.K., et al., *Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments*. Nature reviews Microbiology, 2010. **8**: p. 251-259.
112. Legemiddelhåndbok, N., *Legemiddelhandboka.no*. 2013.
113. Hoa, P.T.P. and S.M.N.N.H.T.D.H.A.P.H.V.P.T.H.S. Suzuki, *Abundance of Sulfonamide-resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Integrated Aquaculture-agriculture Ponds, North Vietnam*. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants, 2010. **TERRAPUB**: p. 15-22.
114. Davies, J., *Are antibiotics naturally antibiotics?* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006. **33**: p. 496-499.
115. Keen, P.L. and D.M. Patrick, *Tracking Change: A Look at the Ecological Footprint of Antibiotics and Antimicrobial Resistance*. Antibiotics, 2013. **2**: p. 191-205.
116. Fernández, L. and R.E.W. Hancock, *Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance*. Clinical Microbiology Reviews, 2012. **25**(4): p. 661-681.
117. Kirby, A.E. and K.G.B.R. Levin, *The Relative Contributions of Physical Structure and Cell Density to the Antibiotic Susceptibility of Bacteria in Biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. **56**(6): p. 2967-2975.
118. Tichaczek-Goska, D.W.D., *Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of Escherichia coli planktonic and biofilm forms isolated from human urine*. Brazilian Journal of Microbiology, 2013. **44**(1): p. 259-265.
119. Levin, P.J.T.J.B.R., *Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in Staphylococcus aureus*. PLOS Genetics, 2013. **Volume 9**(1): p. 1-13.
120. Allison, K.R., M.P. Brynildsen, and J.J. Collins, *Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them*. Current Opinion in Microbiology, 2011. **14**: p. 593-598.
121. Zhang, Y.L.Y., *PhoU Is a Persistence Switch Involved in Persister Formation and Tolerance to Multiple Antibiotics and Stresses in Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **51**(6): p. 2092–2099.
122. Allison, K.R., M.P. Brynildsen, and J.J. Collins, *Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides*. Nature, 2011. **473**: p. 216-220.
123. Balaban, O.G.C.G.M.M.G.E.N.Q., *Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2008. **105**(16): p. 6145-6149.
124. Lu, T.K. and J.J. Collins, *Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy*. 2009.
125. Snyder, L. and W. Champness, *The Bacterial Chromosome: DNA Structure, Replication, and Segregation*, in *The molecular genetics of bacteria*. 2007. p. 21.
126. Morales, G. and J.J.P.E.B.F.J.C.A.A.B.P.R.A.M.-Á.d.I.T.J.F.M. Sánchez-García, *Resistance to Linezolid Is Mediated by the cfr Gene in the First Report of an Outbreak*

- of Linezolid-Resistant Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases, 2010. **50**: p. 821-825.
127. Perreten, V. and P. Boerlin, *A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in Escherichia coli Is Widespread in the Pig Population of Switzerland*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003. **47**(3): p. 1169-1172.
  128. Peixe, P.A.J.M.J.C.S.L., *Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica Strains and Relation with Integrons*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(2): p. 836-839.
  129. Schmitz, C.L.C.W.A.C.F.S.B.J.V.F.J., *mecA Gene Is Widely Disseminated in Staphylococcus aureus Population*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2002. **40**(11): p. 3970–3975.
  130. Chain, E. and E.P. Abraham, *An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin*. Nature, 1940. **3713**.
  131. Bush, K. and J.F. Fisher, *Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria*. Annual Review Microbiology, 2011. **65**: p. 455-478.
  132. El-Nakeeb, M.A., et al., *Reversal of antibiotic resistance in Gram-positive bacteria by the antihistaminic azelastine*. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS), 2011. **120**: p. 215-220.
  133. El-Nakeeb, M.A., et al., *In vitro AB activity of some antihistaminics belonging to different groups against multi-drug resistant clinical isolates*. Brazilian Journal of Microbiology, 2011. **42**(980-991).
  134. El-Nakeeb, M.A. and H.M.A.-S.A.M.K.H.G.O.O.M. El-Halfawy, *Membrane permeability alteration of some bacterial clinical isolates by selected antihistaminics*. Brazilian Journal of Microbiology, 2011. **42**: p. 992-1000.
  135. Edgar, R., et al., *Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes*. Applied and Environmental Microbiology, 2012. **78**(3): p. 744-751.
  136. Townsend, Y.I.T.K.M.N.J.L.M.M.P.L.A.M.A.P.G.J.P., *Controlling Antimicrobial Resistance through Targeted, Vaccine-Induced Replacement of Strains*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. 1-9.
  137. Simonsen, G.S., et al., *The antimicrobial resistance containment and surveillance approach — a public health tool*. Bulletin of the World Health Organization, 2004. **82**(12).
  138. Rogers, G.B., M.P. Carroll, and K.D. Bruce, *Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behaviour?* British Journal of Pharmacology, 2011. **165**: p. 845–857.
  139. Clatworthy, A.E., E. Pierson, and D.T. Hung, *Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy*. Nature - chemical biology, 2007. **3**(7): p. 541-558.
  140. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*. Annual Reviews of Microbiology, 2000. **54**: p. 49-79.
  141. Williams, P., M.C.A.H.S.S.D.M.V.J.H.K.W.B.M.D.I. Pritchard, and B.W. Bycroft, *Quorum sensing and the population-dependent control of virulence*. Philosophical Transactions of The Royal Society B, 2000. **355**: p. 667-680.
  142. Parsek, M.R. and E.P. Greenberg, *Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms*. PNAS, 2000. **97**(16): p. 8789–8793.
  143. Diggle, S.P., A.G.S.A. West, and A.S. Griffin<sup>2</sup>, *Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal?* philosophical Transactions of The Royal Society B, 2007. **362**: p. 1241-1249.

144. Clarke, M.B., et al., *The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor*. PNAS, 2006. **103**(27): p. 10420-10425.
145. Devasahayam, G., W.M. Scheld, and P.S. Hoffman, *Newer Antibacterial Drugs for a New Century*. Expert Opin Investig Drugs, 2010.
146. Nadell, C.D., et al., *The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms*. PLoS Biology, 2008. **6**(1).
147. Diggle, S.E.D.S.A.W.K.W.S.P., *Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations*. PNAS Early Edition, 2012: p. 1-5.
148. Brown, S.P., S.A.W.S.P. Diggle, and A.S. Griffin, *Social evolution in micro-organisms and a Trojan horse approach to medical intervention strategies*. Philosophical Transactions of The Royal Society B, 2009. **364**: p. 3157–3168.
149. Hwang, I.Y., M.H.T.E.K.C.L.H.C.L. Poh, and M.W. Chang, *Reprogramming Microbes to Be Pathogen-Seeking Killers*. American Chemical Society Synthetic Biology, 2013.
150. Boman, H.G., *Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts*. Journal of Internal Medicine, 2003. **254**: p. 197-215.
151. Hancock, R.E.W. and D.S. Chapple, *Peptide Antibiotics*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. **43**(6): p. 1317–1323.
152. Smet, K.D. and R. Contreras, *Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins*. Biotechnology Letters, 2005. **27**: p. 1337-1347.
153. Frecer, V., B. Ho, and J.L. Ding, *De Novo Design of Potent Antimicrobial Peptides*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004. **48**(9): p. 3349–3357.
154. Peschel, A., *How do bacteria resist human antimicrobial peptides?* Trends in Microbiology, 2002. **10**(4): p. 179-186.
155. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**.
156. Bierbaum, G. and H.-G. Sahl, *Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009. **10**: p. 2-18.
157. Strøm, M.B., B.E.H.M.L.S.W.S.T. Stiberg, and J.S. Svendsen, *The Pharmacophore of Short Cationic Antibacterial Peptides*. Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(9).
158. Hansen, T., et al., *Antimicrobial Activity of Small  $\beta$ -Peptidomimetics Based on the Pharmacophore Model of Short Cationic Antimicrobial Peptides*. Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **53**: p. 595–606.
159. Ausbacher, D., A.F.J.K.A.M.J.P.M.B. Strøm, and P.M. Vuorela, *Staphylococcus aureus biofilm susceptibility to small and potent  $\beta$ 2,2-amino acid derivatives*. Biofouling, 2014. **30**(1): p. 81-93.
160. Gallo, R.L., et al., *Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides*. Journal allergy clinical immunology 2002. **110**(6).
161. Pränting, M. and A.N.M.R.D.I. Andersson, *Mechanism and Fitness Costs of PR-39 Resistance in Salmonella enterica Serovar Typhimurium LT2*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008. **52**(8): p. 2734–2741.
162. Habets, M.G.J.L. and M.A. Brockhurst, *Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity*. 2012.
163. Hein-Kristensen, L. and H.F.A.H.L. Gram, *Adaptive Evolution of Escherichia coli to an  $\alpha$ -Peptide/ $\beta$ -Peptoid Peptidomimetic Induces Stable Resistance*. PLoS One, 2013. **8**(9).
164. Breithaupt, H., *The new antibiotics*. Nature Biotechnology, 1999. **17**: p. 1165-1169.
165. Hernandez, V., ..., and J.J. Plattner, *Discovery of a Novel Class of Boron-Based Antibacterials with Activity against Gram-Negative Bacteria*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013. **57**(3): p. 1394-1403.

