



Examensarbete 15 hp  
Kandidatexamen i Biomedicinsk Laboratorievetenskap  
Vårtermin 2018

**Realtids-PCR för påvisande av  
plasmidburen ampicillinresistens –  
Kartläggning av förekomst i vattenisolat från  
Helge Å, Kristianstad**

Omar Arponen

## Populärvetenskaplig sammanfattning

### Antibiotikaresistens – största hotet mot mänskligheten i vår tid?

Antibiotika är inget nytt påfund av människan utan har förmodligen existerat sedan första bakterien uppkom på jorden, likaså är antibiotikaresistens minst lika gammal. Bakterier tillverkar antibiotika för att försvara sig mot andra bakterier, men även mot andra mikroorganismer som svampar.

Förmågan att försvara sig mot antibiotika kan ske på flera olika sätt. Bakterier kan tillverka enzymer som bryter ned eller deaktiverar antibiotika. Deaktivering av antibiotika kan bakterier även använda för att skydda sig mot egentillverkat antibiotika, vilket innebär att antibiotikan som tillverkas inuti bakterien inte är aktiverat förrän utanför bakterien, där kan antibiotikan aktiveras genom exempelvis binda in till bakterier som har matchande strukturer på sin yta. Bakterier kan även stänga av produktionen av strukturer som kan binda och föra in antibiotika i bakteriecellen. Likaså kan bakterien ändra sin kemiska struktur, vilket kan gör dem immuna mot antibiotika. Bakterier kan även börja tillverka proteiner som fungerar som flödeskanaler för antibiotika, vilket får följden att antibiotika som förs in i bakteriecellen snabbt pumpas ut och hinner aldrig samlas i tillräcklig mängd som behövs för att döda bakteriecellen.

Spridning av resistensmekanismer kan ske på flera olika sätt. Den mest intressanta är via plasmider. Plasmider är mindre DNA ringar inuti bakteriecellen som kan bära på olika typer av gener som ger bakterien en extra fördel. Kopior av gener från andra bakteriers kromosomer kan tas upp i plasmiden, t.ex. en gen för antibiotikaresistens som på så sätt ligger i plasmiden. Plasmider kan överföras mellan olika bakteriearter, vilket innebär en betydande risk för spridning av antibiotikaresistens, i synnerhet multiresistenta former.

Studien syftade till att hitta gener som kodar för en form av antibiotikaresistens som kallas för ampicillinresistens. Bakterieproverna kom från Helge Å, Kristianstad. Som detektionsmetod användes en molekylärgenetisk metod som kallas för realtids-PCR med analys av smältkurvor. PCR som metod kan beskrivas som en kopian där det som ska kopieras upp är de gener som man letar efter. För att kunna genomföra analys av smältkurvor, så tillsätts fluorescerande molekyler som binder in till uppkopierade gener. Den fluorescerande molekylen binder endast in till dubbelsträngat DNA, vilket innebär att signalen är som starkast innan avsmältningen. Vid smältning av dubbelsträngat DNA bildas enkelsträngat DNA vilket leder till att fluorescerande molekylen frisätts. När temperaturen höjs till den grad att hälften av signalen kvarstår uppnås den så kallade smälttemperaturen. Smälttemperaturen varierar efter kemisk struktur (sekvens) på genen som kopieras upp. Olikheter i smälttemperatur gör det möjligt att detektera flera gener samtidigt.

Samtliga kliniskt relevanta bakterieprover (79 stycken) uttryckte ampicillinresistens, men bara 27 av 79 kunde bestämmas till en specifik resistensgen (*bla<sub>FOX</sub>*). Av de 27 positiva för genen *bla<sub>FOX</sub>* bar 16 bakterieisolat också på ESBL-gener. Metoden kunde inte analysera flera gener samtidigt, anledningen till detta kan bero på att metoden som användes för att utvinna DNA:t ur bakterierna var för ospecifik så att även andra molekyler (ex proteiner) fanns med, vilket kan störa PCR-reaktionen på sådana sätt att förhållandena mellan de olika reagenserna förskjuts.

## Författare/Author

Omar Arponen

## Svensk Titel

Realtids-PCR för påvisande av plasmidburen ampicillinresistens – Kartläggning av förekomst i vattenisolat från Helge Å, Kristianstad

## Engelsk titel

Real-Time PCR for detection of plasmid-mediated ampicillinresistance – A survey of prevalence in water isolates from Helge river, Kristianstad

## Handledare/Supervisors

Ann-Sofi Rehnstam-Holm, leg. Biomedicinsk analytiker och professor i mikrobiologi vid Högskolan Kristianstad  
Lina Axelsson, leg. Biomedicinsk analytiker, universitetsadjunkt och doktorand Biomedicinska Analytikerprogrammet vid Högskolan Kristianstad

## Examinator

Bodil Hernroth, leg. Biomedicinsk Analytiker, professor i biomedicinsk laboratorievetenskap, Högskolan Kristianstad

## Sammanfattning

Inom antibiotikaklassen  $\beta$ -laktamer ingår antibiotika som penicilliner, cefalosporiner, karbapenemer och monobaktamer som verkar mot bakterier genom hämning av cellväggssyntesen. Bakterier har utvecklat flera mekanismer för att undgå effekten av  $\beta$ -laktamer. Att angripa antibiotika med enzymer är ett sätt, vilket bland annat kan leda till att antibiotikan inaktiveras via hydrolysis, uppkomst av strukturförändringar genom kovalenta modifieringar eller redox reaktion. Bakterien kan även nedreglera uttryck av proteiner som kan binda in till antibiotika. Likaså kan uppreglering av kanal- och pumpproteiner ske som ser till att antibiotika inte hinner ackumuleras inuti bakteriecellen i tillräcklig mängd.

Studien syftade till att undersöka förekomsten av tre plasmidburna gener (*bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub> och *bla*<sub>MOX</sub>) för plasmidburen ampicillinresistans (pAmpC) i bakterieisolat från Helge Å, Kristianstad. För detektion av nämnda gener användes realtids-PCR med SYBR™ Green kemi. Metoden visade sig inte vara tillräckligt robust för att användas som multiplex, endast resultat för singelplex *bla*<sub>FOX</sub> erhöles. 30 av de 96 isolaten var positiva för genen och av kliniskt relevanta arter var 27 av 79 positiva. Av de 27 isolaten var 16 även bärare av andra resistensgener (13 *bla*<sub>CTX-M</sub>, 2 *bla*<sub>OXA</sub>, 1 *bla*<sub>TEM</sub> och 1 *bla*<sub>SHV</sub>). Ett isolat bar på tre resistensgener (*bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> och *bla*<sub>TEM</sub>). Merparten av de positiva isolaten, 20 av 27, kom från vattenprover tagna vid pumpstationen. Fyndet antyder att Helge Å, före som efter reningsverket, fungerar som en reservoar för spridning av resistensgener.

**Ämnesord:** AmpC, *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, Helge Å, pAmpC, Realtids-PCR SYBR™ Green, bakterieisolat från vatten

## Abstract

The antibiotic class  $\beta$ -lactams include drugs such as penicillins, cephalosporines, carbapenems and monobactams which mechanism of action is to inhibit cell-wall synthesis. Bacteria have developed several mechanisms to counter  $\beta$ -lactams. Bacteria can defend themselves from antibiotics by releasing enzymes that attack the antibiotic compound itself by hydrolysis, target alteration or redox reactions. Presence of antibiotics can also trigger a downregulation of genes coding for antibiotic binding proteins, as well as upregulation of proteins that serves as channel and pump proteins that ensure no accumulation of antibiotics occurs in the cytosol.

The aim with the study was to investigate the presence of three plasmid-mediated genes (*bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub> and *bla*<sub>MOX</sub>) coding for ampicillin resistance (pAmpC) in water isolates sampled from Helge River, Kristianstad. The detection of genes was done according to a previous optimized protocol for Real-Time PCR with SYBR™ Green chemistry (duplex *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub>/*bla*<sub>MOX</sub> and singleplex *bla*<sub>FOX</sub>). The method proved not to be robust for multiplex PCR, only the singleplex for the gene *bla*<sub>FOX</sub> could produce valid results. 30 of 96 isolates were deemed as positive for the gene, whereas 27 of 79 were considered clinical relevant. Among the 27 isolates, 16 also harbored other genes for resistance (13 *bla*<sub>CTX-M</sub>, 2 *bla*<sub>OXA</sub>, 1 *bla*<sub>TEM</sub> and 1 *bla*<sub>SHV</sub>). One isolate carried on three resistance genes (*bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> och *bla*<sub>TEM</sub>). A majority of the positive isolates, 20 out of 27, were sampled near the pumpstation. The findings indicate that Helge river might be a reservoir for dissemination of antibiotic resistance genes.

**Keywords:** AmpC, *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, Helge river, pAmpC, Real-Time PCR SYBR™ Green, water isolates

# Innehåll

1. Inledning .....	6
1.1. $\beta$ -laktamantibiotika.....	6
1.1.1. Penicilliner.....	7
1.1.2. Cefalosporiner .....	8
1.2. Penicillinbindande proteiners roll för cellväggssyntes .....	8
1.3. Verkningsmekanismen för $\beta$ -laktamantibiotika .....	9
1.4. Antibiotikaresistens .....	11
1.4.1. Kromosomalt AmpC .....	11
1.4.2. Plasmidburen resistens .....	12
1.4.3. Spridning av antibiotikaresistens.....	13
1.4.4. Inaktivering av antibiotika.....	14
1.4.5. Nedreglering av permeabiliteten för antibiotika.....	16
1.4.6. Effluxpumpar.....	16
1.4.7. Förändring av målmolekyl .....	17
1.5. Realtids-PCR med SYBR <sup>TM</sup> Green kemi.....	17
1.6. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-ToF) .....	19
1.7. Syfte och frågeställning .....	19
2. Material och metod .....	19
2.1. Kontrollisolat .....	20
2.2. Bakterieisolat .....	20
2.3. DNA extraktion .....	22
2.4. Realtids-PCR med High Resolution Melting Analysis (HRM).....	22
2.5. Gel-elektrofores .....	23
2.6. Dataanalys .....	24
2.7. Säkerhet -och miljöaspekter .....	24

2.8. Etiska överväganden.....	25
3. Resultat .....	25
3.1. Realtids-PCR med HRM .....	25
3.2. Positiva fynd av <i>bla</i> <sub>FOX</sub> .....	27
3.3. Gel-elektrofores för duplex <i>bla</i> <sub>CIT(CMY-2)</sub> / <i>bla</i> <sub>MOX</sub> .....	28
4. Diskussion.....	29
4.1. Metoddiskussion.....	29
4.1.1. DNA extraktion .....	29
4.1.2. Metodprotokoll för realtids-PCR med HRM.....	30
4.2. Resultatdiskussion .....	33
4.2.1. Förekomst av <i>bla</i> <sub>FOX</sub> .....	33
5. Slutsats.....	34
Erkännanden .....	35
Referenser.....	36

# 1. Inledning

Antibiotikaresistens är ett naturligt förekommande fenomen hos bakterier som verkar som försvarsmekanismer mot yttre hot (Larsson 2014).

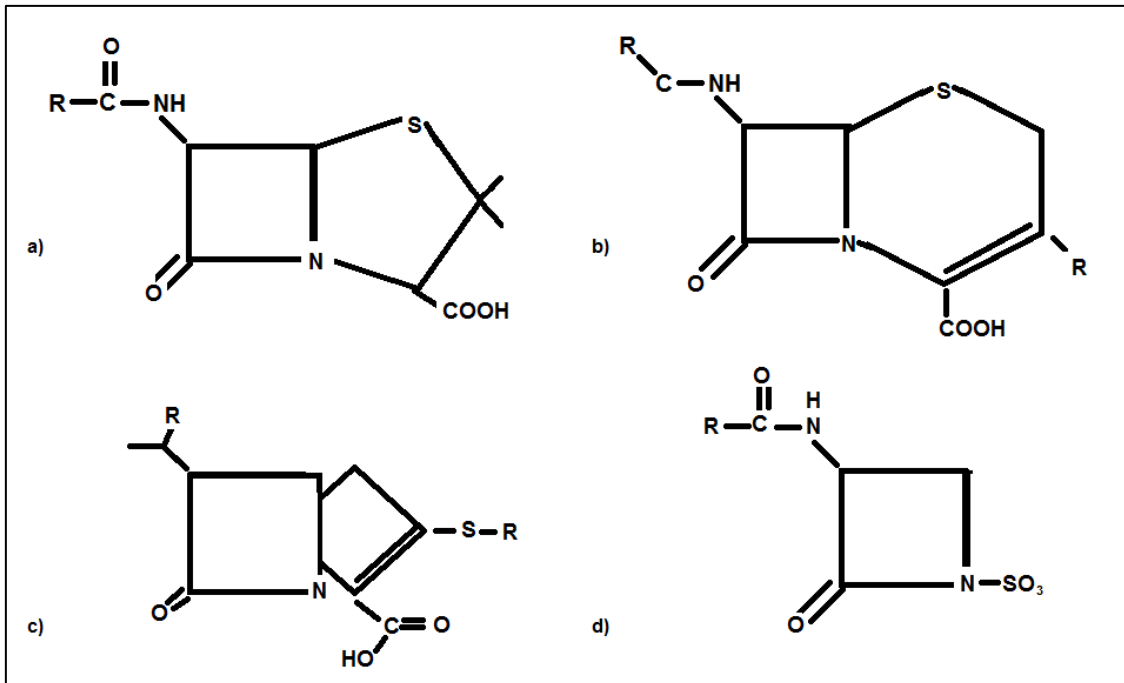
Den av människan inducerade resistensutvecklingen beror däremot på överanvändning av antibiotika inom och utanför hälso- och sjukvården samt utsläpp från tillverkningsindustrin (Folkhälsomyndigheten 2014a; Larsson 2014). I områden där produktion av antibiotika sker, har höga koncentrationer av den tillverkade antibiotikan påvisats i vattenreningsverkens utlopp, vilket utgör en betydande risk för resistensutveckling (Larsson, de Pedro & Paxeus 2007; Murray-Smith, Coombe, Haag Grönlund, Waern & Baird 2011).

Vattenreningsverk utgör en betydande reservoar för spridning av antibiotikaresistens, vilket är associerat med mänsklig konsumtion av antibiotika samt avsaknad av metoder för rening av antibiotika och dess metaboliter i avloppsvatten från hushåll (Ashbolt et al. 2013; Börjesson et al. 2009; Dolejska et al. 2011). Likaså är utsläpp av antibiotika från sjukhus en betydande faktor för resistensutveckling (Chagas et al. 2011).

Klassifikationen som råder för att bedöma en bakterie som mottaglig eller resistent mot specifikt antibiotikum delas in i tre kategorier. Känslig/mottaglig (eng. sensitive/susceptible, S), vilket innebär att behandling med rekommenderat antibiotikum i terapeutisk dos förväntas vara positiv. Resistent (eng. resistant, R), vilket innebär att ett specifikt antibiotikum inte kommer att ha effekt vid behandling. Intermediär (eng. intermediary, I), vilket innebär att högre koncentrationer av antibiotikumet krävs för behandling (EUCAST 2016).

## 1.1. $\beta$ -laktamantibiotika

Gemensamt för  $\beta$ -laktamantibiotika är den kemiska strukturen som kallas för  $\beta$ -laktamring samt dess verkningsmekanism mot bakteriens syntes av cellvägg (Holten & Onusko 2000). Inom klassen  $\beta$ -laktamer ingår antibiotika som penicilliner (Figur 1a), cefalosporiner (Figur 1b), karbapenemer (Figur 1c) och monobaktamer (Figur 1d).



**Figur 1a-d:** Kemiska strukturer för  $\beta$ -laktamer; a) penicilliner, b) cefalosporiner, c) karbapenemer och d) monobaktamer. Figur modifierad efter Todar (2008-2012).

### 1.1.1. Penicilliner

Gruppen penicilliner kan delas upp i naturligt förekommande penicilliner och syntetiska penicilliner (Holten & Onusko 2000).

Penicillin G (bensylpenicillin) och penicillin V (fenoxymetylpenicillin) används främst mot grampositiva bakterieinfektioner (smalt spektrum). Enligt Referensgruppen för antibiotikafrågor (RAF, 2014) bedöms penicillin V vara ett förstahandsval för antibakteriell behandling av hudskador som förorsakats av  $\beta$ -hemolytiska *Streptococcus* spp. Dock finns flertalet resistensmekanismer, varför det ofta är viktigt med resistensbestämning inför beslut om antibiotikabehandling (Holten & Onusko 2000; RAF 2014).

Ampicillin, är en variant av  $\beta$ -laktamantibiotika som tillhör gruppen aminopenicilliner. Dessa är verksamma mot flertalet gramnegativa bakterier som *Escherichia coli*, en vanlig patogen vid urinvägsinfektioner (Folkhälsomyndigheten 2014b; Holten & Onusko 2000).

### 1.1.2. Cefalosporiner

Cefalosporiner delas in i generationer baserat på när de först började användas. Första generationens cefalosporiner kännetecknas av att främst verka mot grampositiva bakterier och uppvisa begränsad verkan på arter inom Enterobacteriaceae. Första generationens cefalosporiner hämmas av bakterier som tillverkar ESBL enzymer (eng. Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase) och/eller AmpC (eng. Ampicillinase class C) (Buck & Price 1977; Holten & Onusko 2000).

Andra generationens cefalosporiner används främst mot gramnegativa bakterier och liksom första generationens cefalosporiner hämmas de av ESBL och AmpC enzymer, men också av metallo- $\beta$ -laktamaser (Holten & Onusko 2000; Leder & Stier Carson 1997).

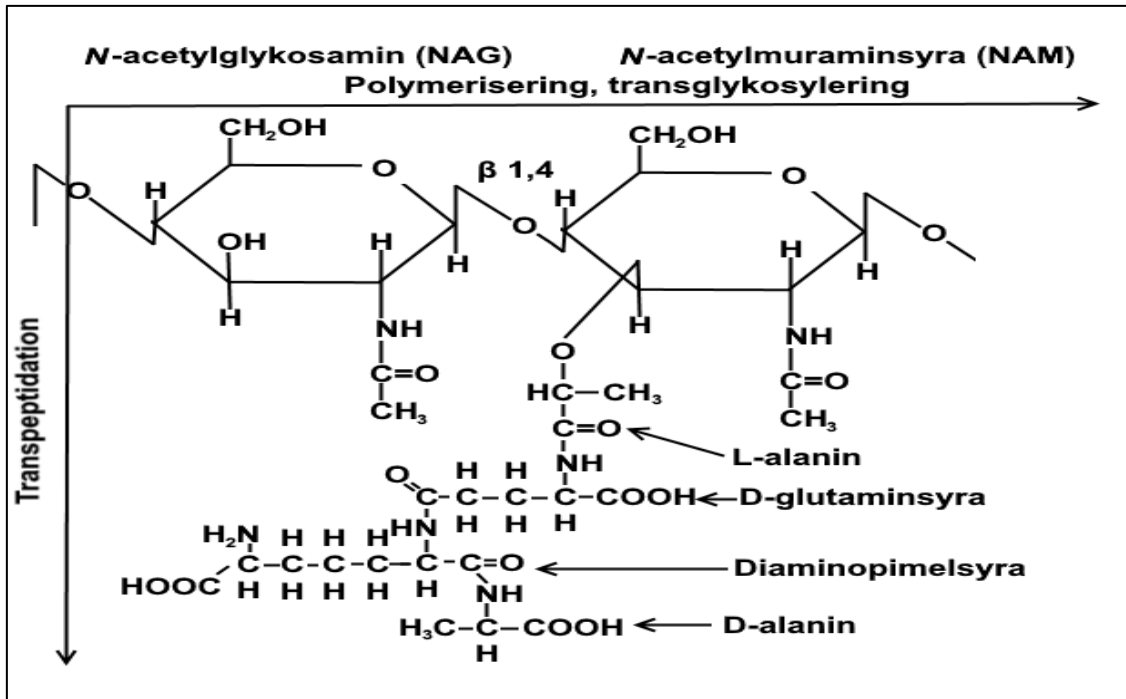
Cefalosporiner tillhörandes tredje och fjärde generationerna har potential att verka mot ett bredare spektrum av bakterier. Som för tidigare generationers hämmas de av ESBL och AmpC enzymer) (Dancer 2001; Jacoby 2009).

Femte generationens cefalosporiner har snarlik verkan mot gramnegativa bakterier som fjärde generationens cefepim, men fungerar också på grampositiva bakterier som t. ex. *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Chen, Hon & Hsu 2017).

## 1.2. Penicillinbindande proteiners roll för cellväggssyntes

Bakteriers cellvägg består av acetylerade glykaner, *N*-acetylglykosamin (NAG) och *N*-acetylmuraminsyra (NAM), som är polymeriserade genom  $\beta$  1,4 bindning (Figur 2). Polymeriseringen av NAG och NAM, transglykosyleringen, utförs enzymatiskt med penicillinbindande proteiner (PBP) (Sauvage et al. 2008). PBP fungerar även som karboxypeptidaser, vars syfte är att klyva aminosyran D-alanin från pentapeptidkedjan hos NAM, vilket resulterar i en tetrapeptidkedja med en D-alanin ände som kan med hjälp av enzymet transpeptidas (även detta ett PBP) korslänkas med parallella NAM molekyler (Figur 2) (Ghosh, Chowdhury & Nelson 2008; Sauvage et al. 2008).



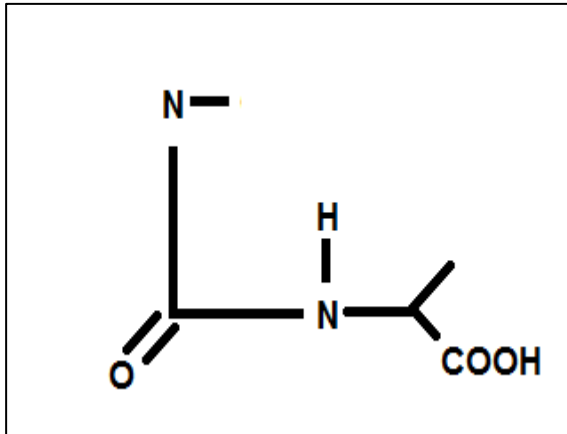


**Figur 2:** Uppbyggnad av cellvägg hos gramnegativa bakterier. Transglykosylering sker mellan NAG och NAM. Transpeptidation sker mellan parallella transglykosylerade glykaner (horisontellt led) efter att karboxypeptidas klyvt bindningen mellan D-alanin-D-alanin. Kvarvarande tetrapeptidsände med D-alanin binder in till diaminopimelsyra på parallell sidokedja hos NAM. Figur modifierad efter Kong et al. (2010).

Hos gramnegativa bakterier sker bindningen mellan diaminopelsyra (DAP) och D-alanin, medan hos grampositiva bakterier sker bindningen med pentaglycinbrygga mellan L-lysin och D-alanin (Kong, Schneper & Mathee 2010; Sauvage et al. 2008). Vid omstrukturering av cellväggen kan vissa PBP verka som hydrolytiska enzymer, endopeptidaser klyver korslänkande bindningar (endopeptidation, klyver bindningen mellan glykankedjorna NAM) (Ghosh et al. 2008; Sauvage et al. 2008).

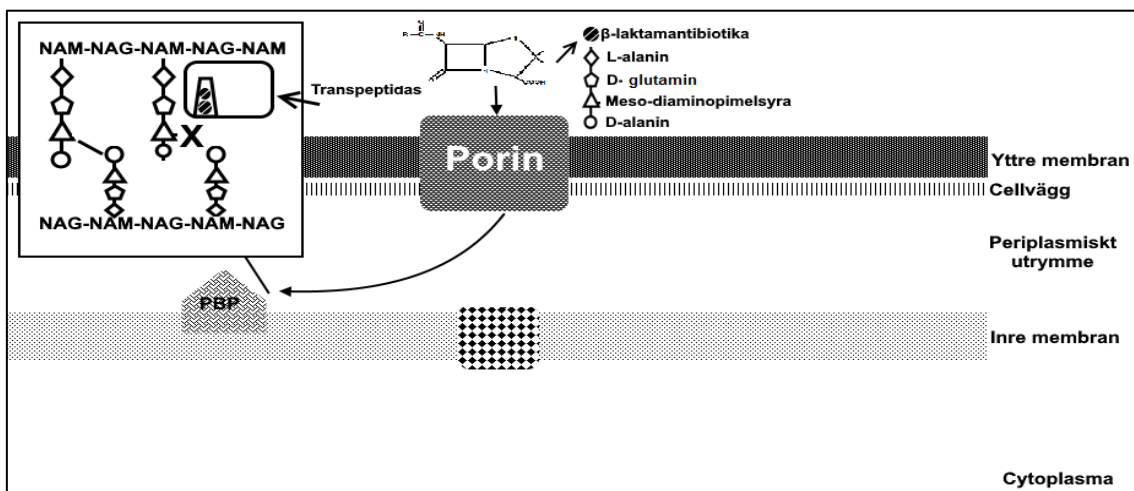
### 1.3. Verkningsmekanismen för $\beta$ -laktamantibiotika

$\beta$ -laktamantibiotika binder in till PBP i cellmembranet, vilket möjliggörs eftersom  $\beta$ -laktamringen påminner om glykanernas D-alanin ände (Figur 3) (Nikolaidis, Favini-Stabile & Dessen 2013).



**Figur 3:** Kemiska strukturen för peptidoglykaneras D-alanin ände. Figur modifierad efter Kong et al. (2010).

Verkningsmekanismen för  $\beta$ -laktamantibiotika skiljer sig beroende på om bakterien är gramnegativ eller grampositiv. Hos gramnegativa bakterier krävs poriner i det yttre membranet för att  $\beta$ -laktamer ska komma in i det periplasmiska utrymmet (Hawkey 1998). Strukturen hos  $\beta$ -laktamer påminner om den hos glykaners D-alanin ände, vilket gör det möjligt för antibiotikan att binda in till aktiva säten hos PBP (transpeptidas) och inaktivera enzymets funktion som kan orsaka baktericid effekt som följd (Figur 4) (Ghosh, Chowdhury & Nelson 2008). Följden blir en hämning av funktionen hos PBP som syftar till att verka som transpeptidas (Sauvage et al. 2008; Shaikh et al. 2014).  $\beta$ -laktamer kan även hämma PBP som syftar till att verka som karboxypeptidas, vilket innebär att pentapeptid kvarstår som sidokedja hos NAM, hämningen bedöms generellt inte som baktericid (Kong, Schneper & Mathee 2010).



**Figur 4:** Verkningsmekanismen för  $\beta$ -laktamer (exempelvis ampicillin) som inhibitor av PBP (transpeptidas) hos gramnegativ bakterie (Figur: Arponen, O. 2018).

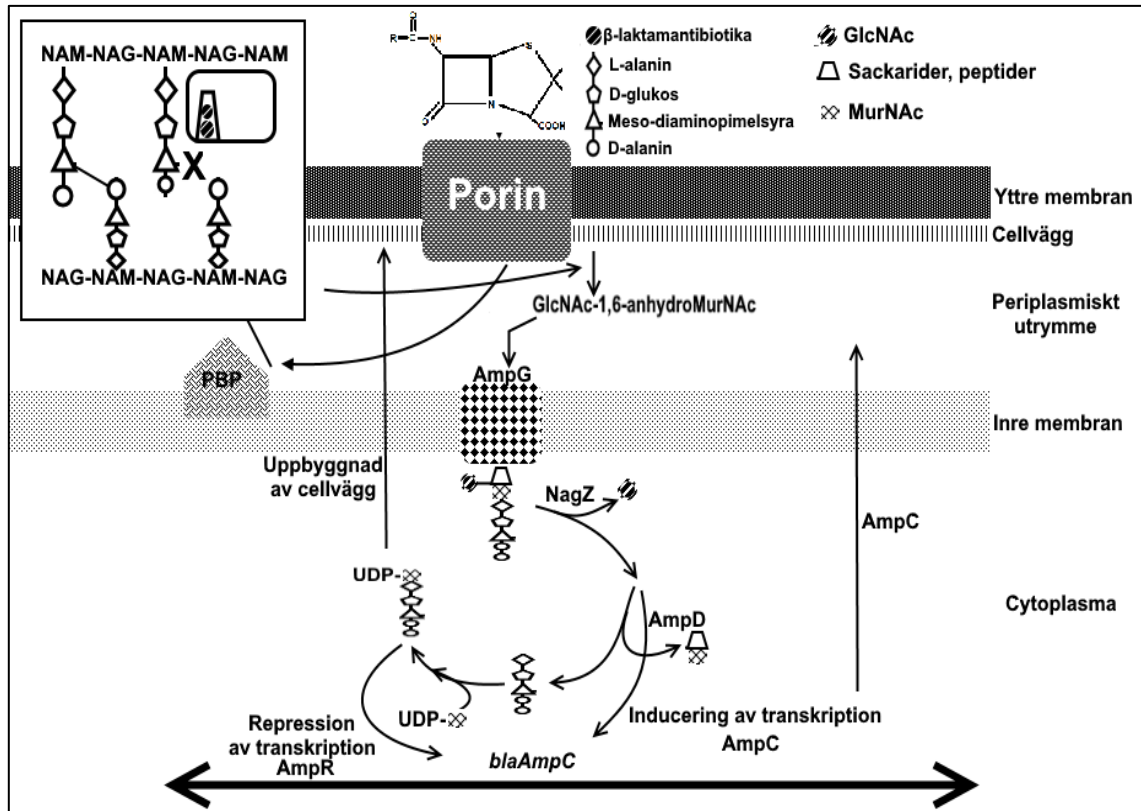
## 1.4. Antibiotikaresistens

Bakterier kan försvara sig från yttre angrepp genom att: a) tillverka enzymer som bryter ned antimikrobiella ämnen, b) nedreglera permeabiliteten över cellmembranet och-/eller cellväggen, c) öka transporten av antimikrobiella ämnen från cytoplasman och d) strukturellt förändra antibiotikans målmolekyl (Munita & Arias 2016).

### 1.4.1. Kromosomalt AmpC

Kromosomalt AmpC (cAmpC) finns hos ett flertal arter inom *Enterobacteriaceae*, men uttrycks ofta låggradigt, vilket innebär att fenotypiskt kan ingen eller låg resistens påvisas (Jacoby 2009). Uppreglering av uttryck kan ske vid närvaro (inducerbar uppreglering) av metaboliter som uppkommit till följd av störningar i syntesen av cellväggen (Vadlamani et al. 2015). Ampicillinaser (AmpC) delar strukturella likheter med resistensenzym av underklasserna A, C och D enligt Amblers molekylära klassifikation, det vill säga motverkar  $\beta$ -laktamantibiotika genom hydrolytisk aktivitet med aminosyran serin i enzymets aktiva säte (Giske et al. 2009; Jacoby 2009).

Uppreglering av AmpC-uttryck sker efter att ampicillin har bundit in till PBP på cellmembranet som får till följd att uppbyggnaden av cellvägg hämmas genom inhibition av PBP (transpeptidas) och korslänknningen för parallella polymerisade glykaner (*N*-acetylglukosamin (GlcNAc) och *N*-acetylmuraminsyra (MurNAc)) uteblir (Kong, Schneper & Mathee 2010; Vadlamani et al. 2015). Följden blir en ansamling av GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc i periplasmiska utrymmet. Enzymer i det periplasmiska utrymmet bearbetar ansamlade peptidoglykaner för transport in till cytoplasman via membranproteinet ampicillin G permeas. I cytosolen aktiveras enzymet  $\beta$ -*N*-Acetylglykosaminidas (NagZ) som klyver bindningen för GlcNAc vilket ger upphov till tri-, tetra- och pentapeptid metaboliterna av 1,6-anhydroMurNAc. Tri- och pentapeptiden av 1,6-anhydroMurNAc binder in till repressorn AmpR (ampicillin regulatorprotein) för transkription av *bla*<sub>AmpC</sub>, vilket får till följd att den repressiva funktionen uteblir (Figur 5) (Munita & Arias 2016; Vadlamani et al. 2015).



**Figur 5:**  $\beta$ -laktamasinducerad transkription av *bla*<sub>AmpC</sub> och dess reglering. Figur modifierad efter Ghosh et al. (2008).

Amidbindningen hos 1,6-anhydroMurNAc kan klyvas av amidaset ampicillin D (AmpD) som resulterar i monosackarider och peptider som bakteriecellen kan använda till uppbyggnad av cellvägg samt att AmpR återfår sin funktion som repressor för transkription av *bla*<sub>AmpC</sub> (Ghosh, Chowdhury & Nelson 2008; Vadlamani et al. 2015).

Mutationer i genen för AmpD som leder till ackumulering av tri- och pentapeptider av 1,6-anhydroMurNAc har enligt Vadlamani et al. (2015) påvisats orsaka fenotypisk ampicillinresistens.

#### 1.4.2. Plasmidburen resistens

Bakteriecellen kan härbärgera plasmider som bär på kodande gener för resistensuttryck, vilket kan innebära att många kopior av samma plasmid bär på samma gen, vilket ger ett starkt uttryck vid uppregering alternativt ett konstant resistensuttryck om plasmider även bär på starka promotorregioner framför resistensgenen (Kong, Schneper & Mathee 2010; Munita & Arias 2016). Plasmidburen resistens kan överföras mellan bakterieceller inom samma art och mellan olika stammar och arter, vilket kan ge upphov till multiresistenta

bakterier som bär på flera gener för antibiotikaresistens (Munita & Arias 2016). Plasmidburen AmpC (pAmpC) uppträder ofta i kombination med resistens mot andra antibiotika, vilket gör pAmpC ytterst relevant att spåra för att kunna vidta förebyggande åtgärder innan eventuellt massutbrott av multiresistenta stammar (Bradford 2001; Jacoby 2009; Woodford, Turton & Livermore 2011; Ye et al. 2017).

Inom pAmpC finns sex familjespecifika indelningar (Tabell 1) som åtskiljs av olikheter i uppsättningen av aminosyrasekvenserna i det aktiva sätet hos enzymerna (Philippon, Arlet & Jacoby 2002). Generna som kodar för AmpC benämns *bla* (beta-lactamase), enzymerna är namngivna efter resistens mot särskilda grupper av antibiotika, var enzymet upptäcktes första gången eller efter bakteriegenus eller art där enzymerna först påvisades (Philippon, Arlet & Jacoby 2002).

**Tabell 1:** pAmpC enzymer och deras gener.

Enzym	Gen
<b>Ambler class C (ACC)</b>	<i>bla</i> <sub>ACC</sub>
<b>Cephamycinase-2/<i>Citrobacter</i> spp. (CIT(CMY-2))</b>	<i>bla</i> <sub>CIT(CMY-2)</sub>
<b>Dhahran hospital in Saudi Arabia-1 (DHA-1)</b>	<i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>
<b><i>Enterobacter cloacae</i> (EBC)</b>	<i>bla</i> <sub>EBC</sub>
<b>Cefoxitinase (FOX)</b>	<i>bla</i> <sub>FOX</sub>
<b>Moxalactamase (MOX)</b>	<i>bla</i> <sub>MOX</sub>

#### 1.4.3. Spridning av antibiotikaresistens

Kodande gener för resistensmekanismerna kan vara naturligt förekommande hos bakteriearter och förvärvande av gener kan ske genom: a) konjugering med bakterier som har R-plasmider, b) transformation genom upptag av fritt DNA som kodar för resistensmekanism och c) transduktion av bakteriofager som bär på resistensgener (Munita & Arias 2016).

Konjugation mellan bakterier innebär en tät kontakt mellan bakteriecellerna som syftar till överföring av en kopia av plasmiderna direkt till mottagarbakterien. För att konjugation ska kunna ske krävs ett fertilitetspilus för den givande bakteriecellen (Arber 2014).

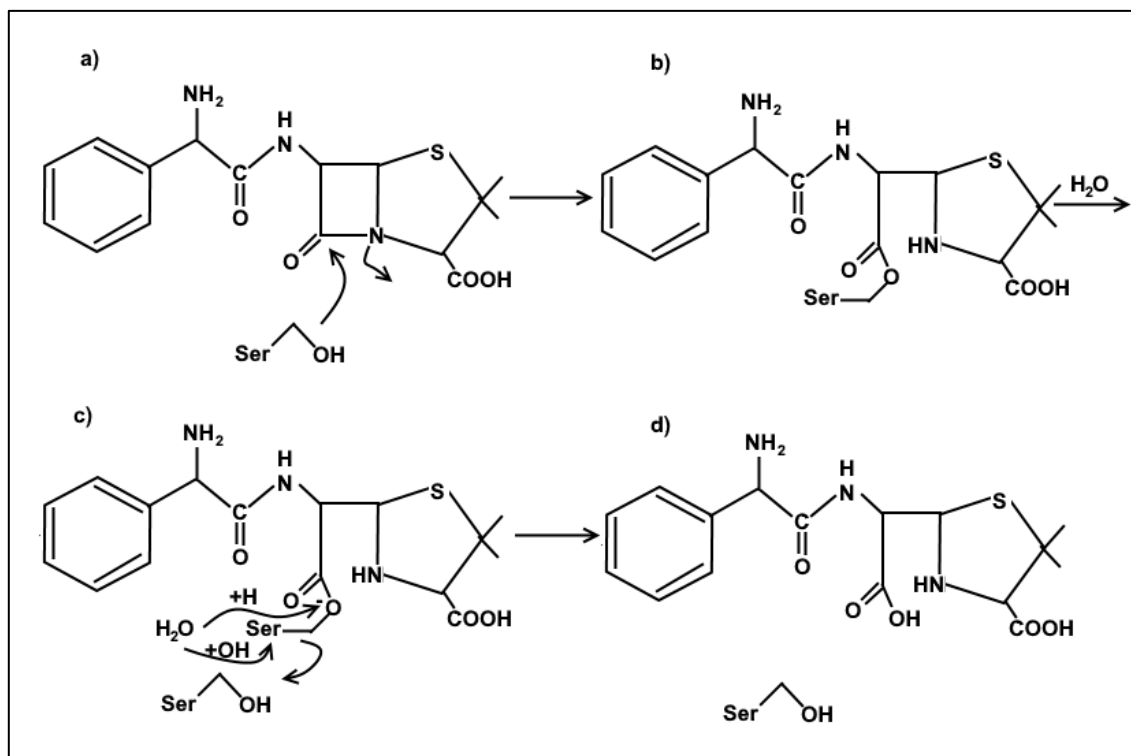
Transformation innebär att fritt DNA kan tas upp av vissa bakterier och om homologt förekommer kan detta DNA genomgå rekombination med bakteriens kromosom eller plasmid (Arber 2014; Panja, Saha, Jana & Basu 2006).

Transduktion innebär att bakteriecellen infekteras av en bakteriofag som av misstag fått med bakterie-DNA vid en tidigare infektion (Arber 2014). Bakteriofager kan troligen spela en betydande roll för spridning av antibiotikaresistensgener mellan kliniskt relevanta patogener och vanligt förekommande miljöbakterier eftersom hela eller segment av kodande sekvenser för diverse resistensgener har påträffats hos bakteriofager som kan infektera flera olika arter av bakterier (Balcazar 2014).

#### 1.4.4. Inaktivering av antibiotika

Inaktivering av antibiotika kan ske med hjälp av enzymer genom att antibiotikan: a) hydrolyseras, b) förändras i sin kemiska struktur, c) undergår redox-reaktion eller d) klyvs vid kol-kol, kol-kväve, kol-syre eller kol-svavelbindningar (Wright 2005).

Mottagliga bindningar för hydrolytiska enzymer är bland annat ester- och amidbindningar, vilket återfinns hos flertalet antibiotika, i synnerhet  $\beta$ -laktamer. Amidbindningen på  $\beta$ -laktamringen kan klyvas av hydrolytiska enzymer som kallas för amidaser. Amidasernas aktiva säte är uppbyggda av aminosyran serin och en hydroxylgrupp, där aminosyran serin verkar som nukleofil gentemot amidbindningen medan hydroxylgruppen fungerar som stabilisator för nukleofilattacken (genom att binda in till kvävet) (Figur 6a-d) (Wright 2005).



**Figur 6a-d:** Hydrolys av  $\beta$ -laktamantibiotikumet ampicillin med  $\beta$ -laktamas (amidas); a) amidasets aktiva säte initierar nukleofilattack på ampicillinets amidbindning. b) I närvaro av tillgänglig vattenmolekyl kommer hydrolysning av amidbindningen att ske vilket innebär att serin frigörs. c) Väteatom på vattenmolekylen inställer sig gentemot den negativt förskjutna laddningen på inbundet serin medan hydroxylgruppen binder in till serin. d) Enzymet återgår till ursprunglig kemisk struktur, ampicillinet har inaktiverats. Modifierad figur från Wright (2005).

Bakteriecellen kan som svar på närvaro av antibiotika i cytoplasman frisätta enzymer som orsakar kovalenta bindningar i antibiotikumets kemiska struktur, vilket leder till inaktivering. Avlägsnande av uppkomna kovalenta bindningar och återupprättande av ursprunglig kemisk struktur hos antibiotikumet kräver närvaro av enzym. Bakterier kan utnyttja samma princip för att leverera ut eget tillverkat antibiotikum från cytoplasma till den externa miljön, aktivering av antibiotikumet kan ske utanför cytoplasman, exempelvis inuti cytoplasman hos andra bakterier som innehar motsvarande enzym för de kovalenta bindningarna (Wright 2005).

Antibiotikumet kan också inaktiveras genom en enzym-assisterad redox-reaktion. Kritiska strukturer för inbindning hos antibiotikumet blockeras genom oxidation eller reduktion (Wright 2005). En uppsättning av flera olika molekyler kan verka som

elektrondonatorer eller elektronmottagare, vilket möjliggör resistensutveckling då redox-inducerad stress som uppkommer hos bakteriecellen påverkar dess förmåga att hantera genuttryck överlag, vilket även omfattar reparationssystemet för DNA (Dwyer et al. (2014).

Lyaser är icke-hydrolytiska enzymer som inte kräver närvaro av vatten för att klyva esterbindningar i antibiotika, produkten som uppkommer kan vara ringslutning av antibiotikumet eller dubbelbindning där reaktionen skett (Wright 2005).

#### 1.4.5. Nedreglering av permeabiliteten för antibiotika

Nödvändigtvis behöver bakterier ej producera enzymer som bryter ned antibiotika för att vara resistent. Tillväxten av bakterien kan fördröjas som svar på närvaro av antibiotikum genom att proteiner i bakteriens cellmembran som bundit in antibiotikum kan signalera en negativ feedback för syntes av cellvägg. Kodande gen för penicillinbindande proteiner minskar i uttryck, vilket reducerar effekten av antibiotikabehandlingen då antibiotikumets verkan är som störst vid tillväxt (Brauner, Shores, Fridman & Balaban 2017; Brolund et al. 2010; Shaikh et al. 2014). Hos gramnegativa bakterier kan permeabiliteten för antibiotika sänkas genom ett lägre uttryck och-/eller strukturella förändringar av poriner i yttermembranet, t.ex. kan hydrofila antibiotika som  $\beta$ -laktamaser endast transporteras in i gramnegativa bakteriens periplasmiska utrymme via poriner (Munita & Arias 2016; Nikaido & Pagès 2012).

#### 1.4.6. Effluxpumpar

I bakteriens cellmembran finns effluxpumpar som fungerar som aktiva transportproteiner eller underlättande transmembrana transportproteiner. Ett ökat uttryck av kodande gener för effluxpumpar kan leda till att antibiotikamolekyler transporteras ut snabbare ut än in, vilket leder till utebliven antibakteriell effekt av insatt antibiotika (Kapoor, Saigal & Elongavan 2017; Sun, Deng & Yan 2014).

Kombinationen av nedsatt permeabilitet för antibiotika och ökad efflux av antimikrobiella substanser (inklusive biocider som desinfektionsmedel och konserveringsmedel) är en viktig bakomliggande orsak till multiresistens (Nikaido & Pagès 2012; Romero et. al 2017).



#### 1.4.7. Förändring av målmolekyl

Subtila strukturella förändringar, som fortfarande fyller ursprunglig funktion hos bakterien, kan sänka affiniteten för antibiotika till den grad att effekten av antibiotika uteblir (Cag, Caskurlu, Fan, Cao & Vahaboglu 2016). Förändringen ha uppstått som ett enzymatiskt svar på närvaro av antibiotika, exempelvis genom metylering förebygga inbindning av antibiotikamolekyler (Lambert 2005; Munita & Arias 2016).

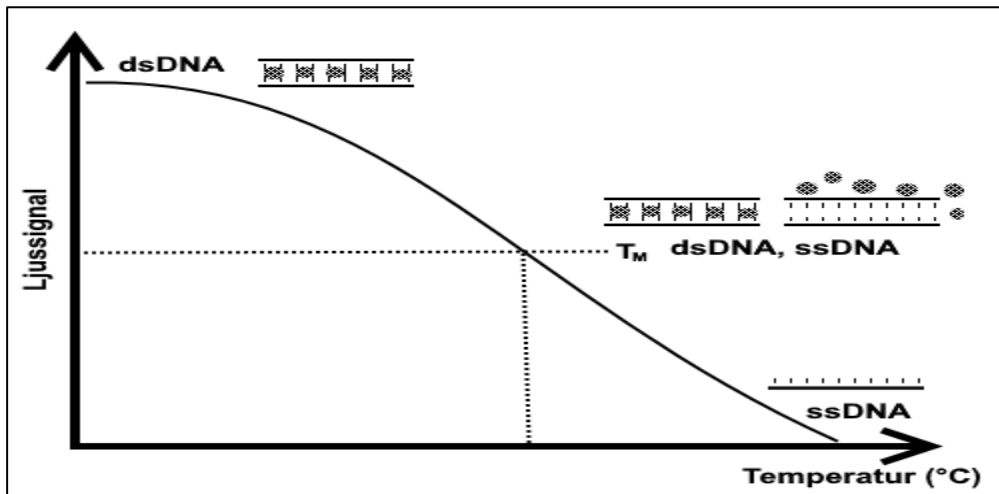
### 1.5. Realtids-PCR med SYBR™ Green kemi

Realtids-PCR omfattar samma steg som konventionell PCR med tilläggen att detektionen sker efter varje amplifiering (realtid) och att detektionssteg med gelelektrofores ersätts med amplifieringskurvor i realtid. Detta innebär att PCR-produkten inte behöver lämna reaktionsbrunnen på mikrobrunnsplattan, vilket minskar risken för kontamination samt frigör arbetstid (Heid, Stevens, Livak & Mickey Williams 1996). Realtids-PCR grundar sig på att fluorescerande molekyler avger ljussignal när de blir bestrålade av en laser. Ljussignalen som avges är proportionerlig med mängden amplifierat DNA (Heid et al. 1996).

Realtids-PCR med TaqMan® kemi grundar sig på användningen av prober med två olika inbundna molekyler i vardera änden på oligonukleotiden. En av molekylerna är en fluorescerande reportertermolekyl (avger ljussignal) och den andra är en quencher (hindrar ljussignal). När dessa två molekyler sitter på samma oligonukleotid släcks den fluorescerande signalen ut av quencher (Heid et al. 1996). TaqMan®-prober binder in till templat DNA vid en specifik målsekvens, när DNA-polymeraset elongerar primerarna klyvs TaqMan®-proben från templat-DNA, vilket innebär att avståndet mellan quencher och den fluorescerande molekylen ökar, vilket ger en ljussignal (Heid et al. 1996).

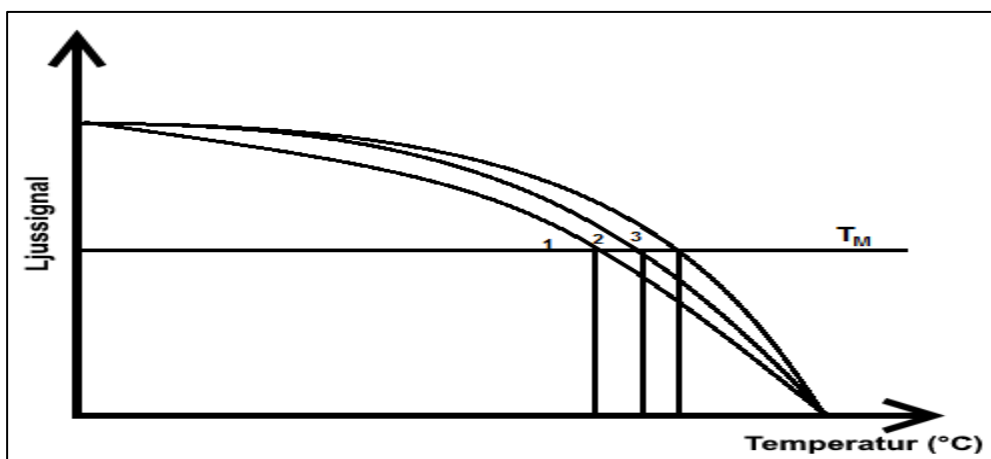
Principen för SYBR™ Green kemi grundas på att en fluorofor interkalerar med dubbelsträngat DNA (dsDNA). Eftersom fluoroforen binder in till allt dubbelsträngat DNA, finns det en påtaglig risk för falska signaler (Bio-Rad 2010; Tajadini, Panjehpour & Javanmard 2014). Därför kopplas oftast en SYBR Green reaktion till analys av smältkurvor (High Resolution Melting Curve Analysis, HRM). Temperaturen höjs så att dubbelsträngat DNA separeras till enkelsträngat, den inbundna fluorescerande molekyler frisätts och när hälften av amplifierad PCR-produkt övergått till enkelsträngat DNA

(ssDNA) fastställs den så kallade smältpunkten,  $T_M$  (Figur 7) (Bio-Rad 2010; Geyer & Hanson 2014).



**Figur 7:** dsDNA har interkalerade fluoroforer som avger ljus. När temperaturen höjs till den grad att hälften av ursprungliga ljussignalen kvarstår, det vill säga dsDNA har övergått till ssDNA, har smältpunkten ( $T_M$ ) nåtts. Smältpunkten är beroende på antalet GC-bindningar i designade primers (Figur: Arponen, O. 2018).

Ljussignalen vid  $T_M$  ger ett värde för den temperatur som krävs för att få dubbelsträngat DNA att separera (Figur 8), vilket innebär möjligheten att detektera flera gener under samma körning (multiplex) förutsatt designat skillnader i sammansättningen av nukleotider (guanin-cytosinbindningar, GC-bindningar) hos primers (Bio-Rad 2010; Geyer & Hanson 2014).



**Figur 8:** Multiplex HRM med 3 målsekvenser (triplex, 3 olika primerpar). Högre GC-sammansättning ger högre  $T_M$  (Figur: Arponen, O. 2018).

## 1.6. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-ToF)

Analysprincipen utgår från olikheter i ribosomala proteiner som ger artspecifika masspektrum. Utifrån ett artbibliotek med kända masspektra jämförs dessa med provets i instruments mjukvara (Bruker Daltonics 2014). Bakteriekolonier tillsätts till en metallskiva, därefter tillsätts en matrixlösning som består bland annat av organiskt lösningsmedel som syftar till att fragmentera cellstrukturer och reagens som underlättar jonisering när laser beskjuter provdisken (Bruker Daltonics 2014). Laddningen som uppkommer vid joniseringen av biomolekylerna står i direkt proportion med deras molekylära vikt, vilket innebär att ju tyngre och mer laddat, desto snabbare färdas det i detektionskolonnen (konstant spänningsskillnad). Varje prov får därmed ett specifikt fragmenteringsmönster som jämförs med fragmenteringsmönster i artbibliotek (Bruker Daltonics 2014).

## 1.7. Syfte och frågeställning

Syftet var att utifrån ett optimerat metodprotokoll för realtids-PCR med SYBR™Green kemi, utforma och genomföra en kvalitativ analys av bakterieisolat för att undersöka förekomsten av pAmpC gener hos bakterier isolerade från Helge Å, Kristianstad kommun.

## 2. Material och metod

Vattenprover från Helge Å, Kristianstad kommun (före och efter vattenreningsverket) samlades in under April 2014 till och med September 2016. Insamling och upparbetning av vattenprover utfördes vid ett tidigare skede. Isolering av bakterier genomfördes med pumpning av insamlade vattenprover genom ett storleksseparerande filter 0,2 µm (Pall Corporation, U.S.A.). Filtret placerades sedan på odlingsmediumet ChromID-ESBL (CHROMagar, Frankrike) vid 37 °C i 18-24 h (Persson 2014). Visade screeningen positivt utfall (färgförändring) för ESBL-producerande bakterie, plockades dessa bakteriekolonier upp och renodlades på Trypton Glukos Extrakt Agar (Oxoid Ltd, Storbritannien) och inkuberades vid 37 °C i 18-24 h (Persson 2014).

Dubbel diskdiffusionstest (MAST-test) hade tidigare utförts med ESBL+AmpC detection (Mast Group, Storbritannien) för att påvisa ESBL- och AmpC-producerande gramnegativa bakterier samt urskilja dem från varandra (EUCAST 2017).

Artbestämningen av isolaten utfördes med masspektrometrisk analysmetod MALDI-ToF. Relevanta isolat gick vidare till frysförvaring (-20 °C). Från uppodlingen plockades med platinös bakterier till ett 1,5 ml mikrotub innehållandes 1 ml Mueller-Hinton katjonjusterad buljong (Oxoid Ltd., Storbritannien) eller Brain Heart Infusion buljong (Oxoid Ltd., Storbritannien) med en tillsats av steril 15 % glycerol.

## 2.1. Kontrollisolat

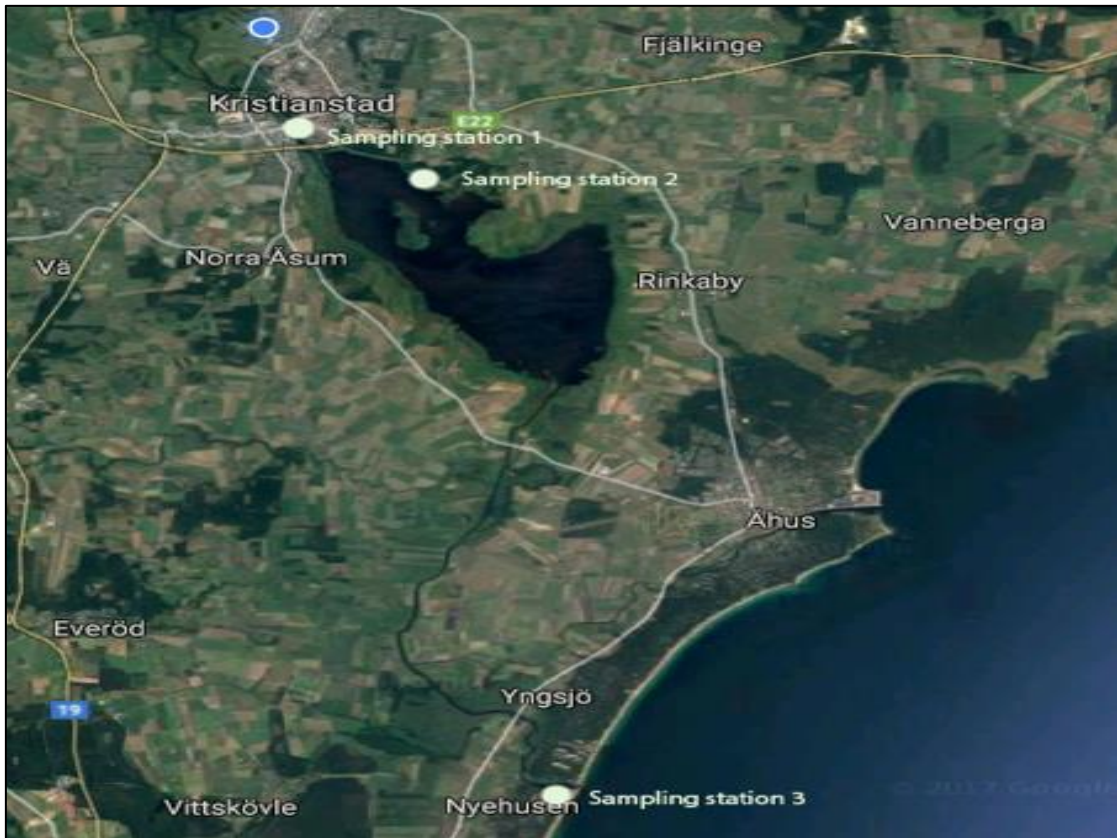
Tre positiva och ett negativt kontrollisolat från Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) användes i studien (Tabell 2) enligt upprättat metodprotokoll (Brolund et al. 2010; Persson 2014).

**Tabell 2:** Kontrollisolat från Culture Collection University of Gothenburg.

ID	Art	Genotyp	ESBL	Kontroller
<b>CCUG 58543</b>	<i>Escherichia coli</i>	CIT (CMY-2)	AmpC	+
<b>CCUG 59412</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	FOX	AmpC	+
<b>CCUG 58538</b>	<i>Escherichia coli</i>	MOX	AmpC	+
<b>CCUG 10785</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-

## 2.2. Bakterieisolat

I studien analyserades 96 bakterieisolat från vattenprover tagna från Helge Å, Kristianstad (före och efter reningsverket) under April 2014 till och med September 2016 (Figur 9). I Tabell 3 redovisas påvisade arter samt deras antal.



**Figur 9:** Provtagningsplatserna (sampling stations) före (1) och efter (2 och 3) reningsverket. Karta modifierad efter Google ©2017.

**Tabell 3:** Bakterierarter och antalet för varje detekterad art i de 96 vattenisolaten.

Art	Antal
<i>Acinetobacter</i> spp.	9
<i>Chrysobacterium gleum</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	2
<i>Enterobacter absuriae</i>	1
<i>E. cloacae</i>	18
<i>E. cobei</i>	2
<i>E. hormaechei</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Moraxella</i> sg <i>Moraxella osloensis</i>	1
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	15
<i>Serratia marcescens</i>	1
<b>Totalt</b>	<b>96</b>

### 2.3. DNA extraktion

Nedfrusna bakterieisolat tinades upp, vortexades och med platinös plockades 10 µl bakterier till förmärkta odlingsplattor innehållandes Mueller-Hintonagar (Oxoid Ltd., Storbritannien), Trypton Glukos Extrakt agar (Oxoid Ltd., Storbritannien) eller Brain Heart Infusion-agar (Oxoid Ltd., Storbritannien). Bakterieisolat som inte tillväxte eller uppvisade riklig blandflora odlades upp på ChromID-ESBL (CHROMagar, Frankrike) för att endast tillåta tillväxt av ESBL-producerande bakterier. Bakterieisolat som uppvisade svårigheter att tillväxa trots byte av odlingsmedium genomgick förbehandling inför dygnsinkubation. Från bakterieisolat pipetterades 200 µl till ett 1,5 ml eppendorfsrör innehållandes 400 µl Mueller-Hinton katjonjusterad buljong (Oxoid Ltd., Storbritannien), därefter placerades eppendorfrören på skakaren VWR<sup>®</sup> Mini Shaker (VWR, Frankrike) med inställningarna 500 rpm under inkubering i värmeskåp vid 37 °C i 90 minuter, efterföljande steg enligt tidigare redovisat förfarande.

Efterkommande dag artbestämdes uppodlade bakteriestammar med MALDI-ToF instrumentet Bruker LT Microflex (Bruker Daltonics, Tyskland) med tillhörande mjukvara Microflex version 4.1 (Bruker Daltonics, Tyskland) och artbiblioteket MBT Compass Library DB-5989 (Bruker Daltonics, Tyskland) enligt tillverkarens instruktioner. Förutsatt att artbestämningen blev godkänd, tillsattes en full 1 µl platinösögla av bakterier till 150 µl sterilt vatten i ett 1,5 ml mikrocentrifugrör, därefter vortexades suspensionen. Bakteriesuspensionen värmdes på värmeblock vid 95 °C i 10 minuter, därefter centrifugering vid 12000 rpm i 2 minuter med centrifugen mini-Spin plus (Eppendorf, Tyskland).

### 2.4. Realtids-PCR med High Resolution Melting Analysis (HRM)

Detektion av AmpC-generna *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>*, *bla<sub>FOX</sub>* och *bla<sub>MOX</sub>* genomfördes uppdelat på ett duplex *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* och ett singelplex *bla<sub>FOX</sub>*. Uppdelningen grundas på att målsekvensernas  $T_M$  bör ligga tillräckligt långt ifrån varandra för att ge tydliga positiva utfall. Sekvenserna för primerparen (Tabell 5) är hämtade från Pérez-Pérez & Hanson (2002) samt Brolund et al. (2010).

**Tabell 5:** Primers för AmpC-gener.

Gen	Primersekvens (5´-3´)	$T_M$ (°C) primer
-----	-----------------------	-------------------

<b>CIT(CMY-2)</b>	CMY-2-F: <i>TGGCCAGAACTGACAGGCAAA</i>	70,1
	CMY-2-R: <i>TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC</i>	70,7
<b>FOX</b>	FOX-F: <i>AACATGGGGTATCAGGGAGATG</i>	65,8
	FOX-R: <i>CAAAGCGCGTAACCGGATTGG</i>	72,1
<b>MOX</b>	MOX-F: <i>GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT</i>	68,0
	MOX-R: <i>CACATTGACATAGGTGTGGTGC</i>	65,2

Blandning av realtids-PCR reagensmix, tillsättning av mix-lösning och bakterieisolat utfördes på is för att reducera risken för icke specifik PCR-produkt (primer-dimer). Varje PCR-reaktions slutvolym var 20 µl (18 µl realtids-PCR reagensmix och 2 µl DNA). PCR-reaktionen bestod utav 10 µL SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Storbritannien), 0,6 µL 10 µM av primer (se Tabell 5) (Sigma<sup>®</sup> Life Science, U.S.A.) och resterande volym sterilt vatten CHROMASOLV<sup>®</sup> (Fluka<sup>®</sup> Analytical, Schweiz). Blandad realtids-PCR mix tillsattes till 96-mikrobrunnsplatta MicroAmp<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Singapore), därefter DNA från antingen positiv kontroll eller prov. Mikrobrunnsplattan centrifugerades med centrifugen Optima LE-80K (Beckman Coulter, U.S.A.) i 2 minuter vid 500 rpm innan den sattes i realtids-PCR instrumentet. PCR-programmet utfördes enligt följande på instrumentet 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Sverige) med mjukvaran 7500 Software version 2.0.6 (Applied Biosystems, Sverige): uppvärmning vid 50 °C i 2 minuter följt av denatureringssteget vid 95 °C i 10 minuter och amplifieringssteget utfördes i 40 cykler med 95 °C i 15 sekunder och 63 °C i 1 minut. HRM-steget utfördes enligt följande: 95 °C i 15 sekunder följt av temperaturökning om 0,2 °C per 30 sekunder med start på 60 °C och avslutande steg vid 95 °C under 15 sekunder (Brolund et al. 2010; Persson 2014).

## 2.5. Gel-elektrofores

Agarogeler tillverkades genom att tillsätta 60 ml 1X buffertlösning som bestod av 40 mM Tris-Bas, 20 mM ättiksyra och 1 mM etylendiamintetraättiksyra (TAE) (Thermo Scientific, Litauen) till 0,8 g NuSieve<sup>®</sup> 3:1 agarose agar (BioWhittaker Molecular Applications, U.S.A.). Lösningen kokades i mikrovågsugn vid 750W i 90 sekunder. Agarlösningen fick svalna till ~50 °C vid rumstemperatur, därefter tillsattes 1 µL

GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium, U.S.A.). Gellösningen fick svalna i geltråg, därefter tillsattes 1X TAE-buffert till markeringen på geltrågen.

Från amplifierad PCR-produkt pipetterades 10 µL och blandades med 3 µL laddningsbuffert ThermoScientific 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, U.S.A.), därefter tillsattes 10 µl av tillblandad produkt till gelbrunnar. 6 µl av DNA-stegen ThermoScientific GeneRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (Thermo Scientific, U.S.A.) tillsattes till två brunnar för att säkerställa korrekt amplifierad produkt (*bla*<sub>CTT(CMY-2)</sub> 462 baspar och *bla*<sub>MOX</sub> 520 baspar). Positiva och negativa kontroller var samma som för realtids-PCR.

PCR-reaktionen på 25 µL utgjordes av 2 µL DNA-templat, 12,5 µL *Taq* PCR Master Mix (Qiagen, Tyskland), 0,5 µL av varje primer (samma primerpar som för realtids-PCR) och resterande 8,5 µL analytiskt renat vatten (samma som för realtids-PCR). DNA-templat, primers och mastermix tillsattes till PCR-rör som centrifugerades med centrifugen Mini Star (VWR, Sydkorea) i 90 sekunder vid 6300 rpm inför PCR-körning. PCR-programmet utfördes på instrumentet Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, U.S.A.) enligt följande: denaturering vid 94 °C i 10 minuter, därefter amplifiering som genomfördes i 30 cykler (94 °C i 40 sekunder, 57 °C i 40 sekunder och 72 °C i 40 sekunder) därefter avslutande steg i 7 minuter vid 72 °C. Gelen kopplades till 100V strömkälla under 30 minuter. Avläsning av geler utfördes med Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio-Rad, U.S.A.).

## 2.6. Dataanalys

Tolkningen av smältkurvor utfördes med hjälp av mjukvaran 7500 Software version 2.0.6 (Applied Biosystems, U.S.A.). Granskningen av geler utfördes i mjukvaran Image Lab™ version 3.0 (Bio-Rad, U.S.A.). Bearbetning av rådata och sammanställning av resultat utfördes med Microsoft® Excel® 2016 (Microsoft, U.S.A.).

## 2.7. Säkerhet -och miljöaspekter

Bedömning av risker för smitta, smittspridning och miljöpåverkan vid hantering av biologiska agens utfördes enligt fastställda direktiv från Arbetsmiljöverket (AFS 2005:1).



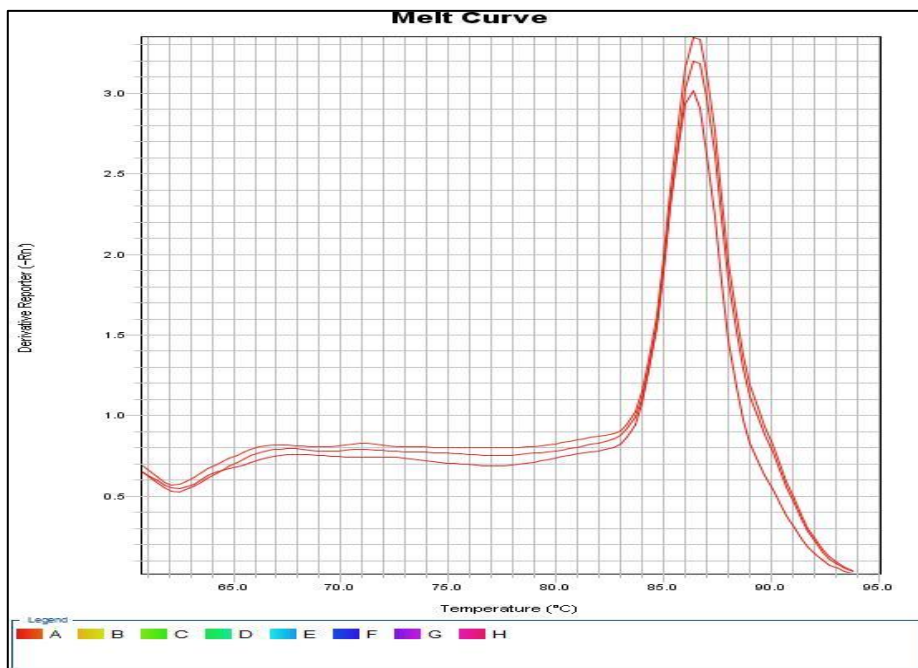
## 2.8. Etiska överväganden

Laborativa arbetet utfördes enligt Arbetsmiljöverkets (AFS 2005:1) direktiv vid hantering av mikrobiologiska agens. Etiskt tillstånd krävdes ej.

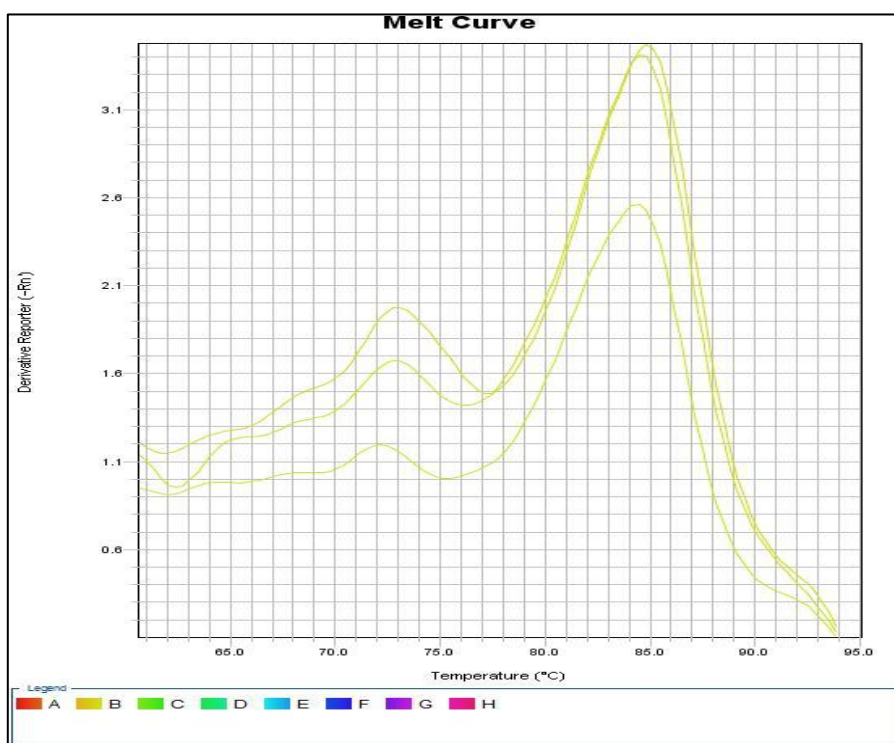
## 3. Resultat

### 3.1. Realtids-PCR med HRM

Vid körning av realtids-PCR kunde endast singelplex *bla<sub>FOX</sub>* bedömas (Figur 10), smältpunkten för positiva kontrollen varierade från 86,2 °C till 86,6 °C för nämnda gen. Enligt Brolund et. al (2010) fastställdes smältpunkten för PCR-produkten av *bla<sub>FOX</sub>* till 84,8 °C och i optimeringsstudien av Persson (2014) till 86,5 °C. Smältpunkterna för de positiva kontrollerna för duplex *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* varierade i följande temperaturintervall; 84,9-85,5 °C för *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>* och 74,0-84,5 °C för *bla<sub>MOX</sub>*. Smältpunkten för PCR-produkten av *bla<sub>MOX</sub>* avviker från fastställda smältpunkter från tidigare studie av Brolund et al. (2010) (87,3 °C) och optimeringsstudien av Persson (2014) (88,3 °C). Avvikelse från erhållna smältpunkter för genen *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>* påvisades likväl från tidigare studier av Brolund et al. (2010) (83,7 °C) och Persson (2014) (84,5 °C). PCR-produkterna överensstämde således inte med smältpunkterna, *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>* (462 baspar) och *bla<sub>MOX</sub>* (520 baspar) enligt tidigare studier (Brolund et al. 2010; Pérez-Pérez & Hanson 2002). Likaså förekom ospecifika signaltoppar för duplexparet i temperaturintervallet 71-73 °C, således redovisas inte resultat från duplex *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* (Figur 11). Samtliga isolat var enligt MAST positiva för AmpC.



Figur 10: Bakterieisolat som påvisades positiv för genen *bla<sub>FOX</sub>*.



Figur 11: Bakterieisolat som analyserades för generna *bla<sub>CIT</sub>* och *bla<sub>MOX</sub>*.

För singelplex *bla<sub>FOX</sub>* påvisades förekomst av genen hos 27 av de 79 relevanta isolaten. Hos *Escherichia coli*, den vanligaste förekommande arten bland isolaten, hade

en tredjedel genen (Tabell 6). Bland övriga vanligt förekommande arterna påvisades *bla*<sub>FOX</sub> i 5 av 22 *Enterobacter* spp. och 5 av 10 *Klebsiella pneumoniae* (Tabell 6).

**Tabell 6:** Förekomst av *bla*<sub>FOX</sub> i de kliniskt relevanta bakterieisolaten.

Art	Antal	<i>bla</i> <sub>FOX</sub>
<i>Acinetobacter</i> spp.	9	2
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1
<i>Enterobacter absuriae</i>	1	0
<i>E. cloacae</i>	18	3
<i>E. cobei</i>	2	2
<i>E. hormaechei</i>	1	0
<i>Escherichia coli</i>	35	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	5
<i>Serratia marcescens</i>	1	1
<b>Totalt</b>	79	27

### 3.2. Positiva fynd av *bla*<sub>FOX</sub>

I tabell 7 redovisas andra resistensgener funna hos de 27 kliniskt relevanta isolaten som bar på *bla*<sub>FOX</sub>. Av de 27 isolaten hade 20 isolerats från vatten tagits vid pumpstationen, 3 från Tivoliparken, 3 från Nyehusen och 1 från reningsverkets utlopp.

**Tabell 7:** Förekomst av andra resistensgener bland de 27 isolaten positiva för *bla*<sub>FOX</sub> enligt tidigare analyser. P indikerar positivt

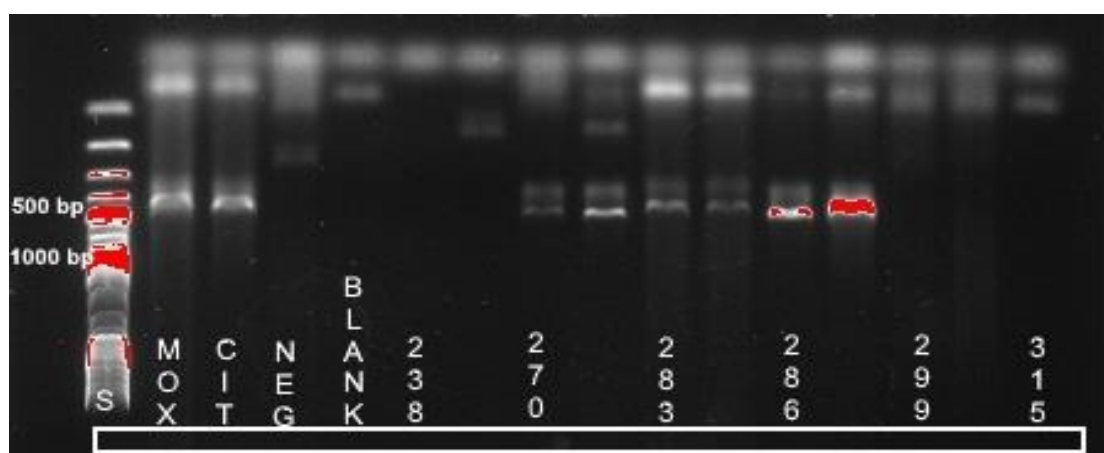
ID	Art	Provtag. datum	Provtag. plats	M A S T	F O X	S H V	T E M	O X A	C T X - M
270	<i>Enterobacter cloacae</i>	2014-04-29	Utg. renat vatten	AmpC	P				
336	<i>Escherichia coli</i>	2014-06-16	Pumpstation	AmpC	P				
344	<i>Escherichia coli</i>	2014-06-30	Tivoli	AmpC	P				
398	<i>Escherichia coli</i>	2014-07-14	Tivoli	AmpC + ESBL	P	P			
619	<i>Enterobacter cobei</i>	2014-09-22	Pumpstation	AmpC	P				
639	<i>Enterobacter cloacae</i>	2014-11-10	Tivoli	AmpC	P			P	
654	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2014-11-10	Pumpstation	AmpC + ESBL	P			P	
693	<i>Escherichia coli</i>	2014-12-22	Pumpstation	AmpC	P				P

694	<i>Citrobacter freundii</i>	2014-12-22	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
725	<i>Enterobacter cloacae</i>	2015-01-27	Pumpstation	AmpC	P				P
728	<i>Serratia marcescens</i>	2015-01-27	Pumpstation	AmpC	P				
731	<i>Acinetobacter</i> spp.	2015-01-27	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
732	<i>Acinetobacter</i> spp.	2015-01-27	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
735	<i>Escherichia coli</i>	2015-01-27	Pumpstation	AmpC + ESBL	P		P		P
739	<i>Enterobacter cobei</i>	2015-01-27	Pumpstation	AmpC	P				
744	<i>Escherichia coli</i>	2015-01-27	Nyehusen	AmpC + ESBL	P				
747	<i>Escherichia coli</i>	2015-01-27	Nyehusen	AmpC + ESBL	P				
748	<i>Escherichia coli</i>	2015-01-27	Nyehusen	AmpC	P				
775	<i>Escherichia coli</i>	2015-05-12	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
784	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2015-05-12	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				
786	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2015-05-12	Pumpstation	AmpC	P				
845	<i>Escherichia coli</i>	2015-06-23	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
853	<i>Escherichia coli</i>	2015-06-23	Pumpstation	AmpC	P				P
1091	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2016-08-10	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
1093	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2016-08-10	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
1101	<i>Escherichia coli</i>	2016-08-10	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P
1126	<i>Escherichia coli</i>	2016-09-19	Pumpstation	AmpC + ESBL	P				P

### 3.3. Gel-elektrofores för duplex *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub>/*bla*<sub>MOX</sub>

För duplexparet *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub>/*bla*<sub>MOX</sub> genomfördes även vanlig PCR amplifiering med efterföljande gel-elektrofores, i Figur 12 redovisas en av de tio gelerna. Förväntad storlek

på PCR-produkterna var *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub> 462 baspar och *bla*<sub>MOX</sub> 520 baspar. Längst till vänster ses banan för DNA-stegen (S) (500 respektive 1000 baspar är utmärkta). De två efterkommande banorna utgörs av de positiva kontrollerna för nämnda gener. Negativ kontroll utgörs av negativ kontrollstam (dvs inget uttryck för resistens), därefter blankkontroll (endast PCR-reagenser). Efterföljande banor utgörs av prover i duplikat Svårigheter med att tolka gelerna på grund av snarlik storlek (otydlig separation, se stegen) och överladdade banor innebar att inga resultat kunde erhållas från körning med gel-elektrofores.



Figur 12: Gel-elektrofores efter amplifiering av duplexparet *bla*<sub>CIT(CMY-2)</sub>/*bla*<sub>MOX</sub>.

## 4. Diskussion

Realtids-PCR med SYBR<sup>TM</sup>Green kemi anses tillräckligt selektiv, sensitiv och snabb. Enligt Brolund et al. (2010) kan analysmetoden genomföras på 2 timmar medan konventionell PCR med gel-elektrofores genomförs ~4 timmar, förutsatt att triplex kan genomföras (Volkman, Schwartz, Bischoff, Kirchen & Obst 2004).

### 4.1. Metoddiskussion

#### 4.1.1. DNA extraktion

Extraktion av DNA utfördes genom kokning och centrifugering vilket kan anses som en trubbig metod. I supernatanten återfinns såväl kromosomalt som plasmidburet DNA, men också andra cellrester som cellvägg och proteiner, vilket både kan störa PCR reaktionen och orsaka otydliga smältkurvor vid HRM. Det kan också orsaka svaga band

och-/eller oförväntade produkter (med eller utan förekomst av primer-dimers) vid gel-elektrofores som följd av korshybridisering mellan kromosomal och plasmidburna gener (Sesma, Sundin & Murillo 1998; Volkmann et al. 2004). Förekomst av cellkomponenter som proteiner och lipider påverkar renheten hos erhållen mängd DNA, vilket innebär att mängden DNA som genomgår PCR-reaktion, och koncentrationer av primers samt SYBR<sup>TM</sup>Green PCR Master Mix inte blir optimalt (Dashti, Jadaon, Abdulsamad & Dashti 2009; Queipo-Ortuño et al. 2008; von Wintzingerode, Göbel & Stackebrandt 1997).

Enligt Dashti et al. (2009) kan kokning och centrifugering av bakterier för att extrahera DNA anses ge tillräcklig mängd och godtagbar renhet för PCR-baserade analyser. Kompletterande mätning av mängden DNA och dess renhet inför PCR-körning kan ge indikationer om det förekommer inhibitorer för PCR-reaktion som följd av otillräcklig extraktion av DNA (förekomst av RNA och proteiner). Normalisering av mängd DNA för kontroller och prover kan vara aktuellt vilket kan genomföras med spädning. Både mängden DNA och dess renhetsgrad skulle kunna ha bestämts spektrofotometriskt, exempelvis med instrument som NanoDrop av tillverkaren Thermo Scientific (Brewster & Paoli 2013; Volkmann et al. 2004; von Wintzingerode et al. 1997).

#### 4.1.2. Metodprotokoll för realtids-PCR med HRM

Primerpar som designats för detektion av *bla*<sub>AmpC</sub> med multiplex PCR gel-elektrofores i en studie av Pérez-Pérez & Hanson (2002) användes i studien av Brolund et al. (2010) för att upprätta ett multiplex protokoll för realtids-PCR med HRM. Primerpar för generna *bla*<sub>CT(CMY-2)</sub>, *bla*<sub>MOX</sub> och *bla*<sub>FOX</sub> som tidigare använts vid optimering av metodprotokollet testkördes på realtids-PCR med kontrollisolat. Enligt Brolund et al. (2010) är fördelen med SYBR<sup>TM</sup>Green kemi möjligheten till HRM eftersom det resulterar i tydligare skillnad mellan genvarianter inom AmpC gruppen i jämförelse med konventionell PCR och gel-elektrofores. Där föreligger risk för korshybridisering mellan kromosomala och plasmidburna gener som kan orsaka diffusa band. Dessutom, PCR-produkters snarlika storlek kan göra det svårt att urskilja produkterna från varandra (Brolund et al. 2010).

Resultatet uppvisade oregelbundna utfall som visade på dysfunktionella primers som trolig felkälla (ospecifika produkter). För att undersöka om primerparen var problemet utfördes en vanlig PCR analys med efterföljande gel-elektrofores. Snarlika

produktstorlekar, överladdade banor, skuggband och primer-dimers innebar tekniskt underkända undersökningar med gel-elektrofores. Separeringen kunde ha blivit bättre om man använt 2 % agarosgeler istället för 1 %, dock utgjorde ospecifik selektivitet en stor orsak till underkännandet. Förmodligen på grund av frånvaron av otillräcklig extraktion för att få enhetlig renhet hos proverna samt säkerställa att antagna koncentrationer av PCR-reagenserna stämmer (Pérez-Pérez & Hanson 2002; von Wintzingerode et al. 1997).

Detektion av AmpC gener genomfördes uppdelat på ett duplex (*bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>*) och ett singelplex (*bla<sub>FOX</sub>*). Uppdelningen gjordes enligt resonemang av Persson (2014), men där smälttemperaturerna för primerpar inte överensstämde med erhållna temperaturer enligt Brolund et al. (2010). För undersökning vid klinisk verksamhet hade uppdelningen inneburit en betydande faktor inför beslut om att använda metodprotokollet eller inte, eftersom längre tid för analys med ökad kostnad som följd leder till sämre kostnadseffektivitet och på sikt kan utgöra ett hot mot patientsäkerheten på grund av längre analystid (Brolund et al. 2010; Geyer, Reisbig & Hanson 2012). Uppdelning till singelplex hade förmodligen inneburit en mer känslig och selektiv analys, dock hade det samtidigt inneburit en 33 % ökning av analystiden med följande ökade materialkostnader.

Övervägande av TaqMan<sup>®</sup> över SYBR<sup>™</sup> Green kemi kan vara aktuellt med prover som kräver hög selektivitet, då TaqMan<sup>®</sup> kemi dubblerar den specifika detektionen (primers och prober) (Geyer et al. 2012).

För att en metod ska bedömas som robust, bör utfallen bli tillräckligt lika oavsett vilket instrument som används (Roschanski, Fischer, Guerra & Roesler 2014). Metodprotokoll för multiplex PCR som anses tillräckligt pålitliga baserat på utfall vid användning av flera olika instrument kan anses vara lämpade som screeningmetod, om de kan verifieras med singelplex metod. Fördelen med multiplex PCR som screeningmetod i jämförelse med fenotypiska antibiotikatester är att orsaken till uppvisad resistens kan påvisas efter genotyp. Positiva utfall för resistens vid manuella tester kan orsakas av andra mekanismer än enzymer, falska negativa utfall kan ha sin orsak som följd av att bakteriecellen bär på flera resistensmekanismer vars uttryck blir svagare än för bakterieceller med endast en av dessa resistensmekanismer. Likaså kan närvaron av tillsatt antibiotika uppreglera uttryck för en eller några av resistensmekanismerna, medan övriga nedregleras (Japoni-Nejad, Ghaznavi-Rad & van Belkum 2014; Roschanski et al. 2014). Genotypiska metoder syftar

till detektion av målsekvens, oavsett om aktuell sekvens finns i viabel bakteriecell eller inte. Å andra sidan kan genotypisk metod inte påvisa om aktuell målsekvens uttrycks eller om den till exempelvis är inducerbart eller ständigt uttryckt.

Smälttemperaturen hos PCR-produkten för genen *bla<sub>MOX</sub>* hos positiva kontrollisolat varierade mellan 74,0-84,5 °C, vilket innebar ett tekniskt underkännande av analysen. Primer-dimer bildning vid körning av duplex *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* påvisades frekvent inom temperaturintervallet 71-73 °C, vilket även syntes på kontrollisolat för duplexparets positiva kontroller, vilket förmodligen påverkade positiva toppar för *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>* genom att tappa amplitud och få flackt utseende.

Enligt Persson (2014) uppkom toppar i intervallet 71-73 °C för duplexparet *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* som förmodligen orsakades av primer-dimer bildning, vilket innebar svårtolkade smältningskurvor. Följaktligen genomfördes gel-elektrofores för att verifiera utfallen vid körning av realtids-PCR. Gel-elektrofores av duplex *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* var svåra att tolka på grund av DNA-fragmentens snarlika storlek (*bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>* 462 baspar och *bla<sub>MOX</sub>* 520 baspar), dessutom kan varianter av nämnda gener ge upphov till ytterligare variation i storlek (Brolund et al. 2010; Pérez-Pérez & Hanson 2002). Otillräcklig rening av extraherat DNA kan ha gett upphov till otydliga band, skuggband och primer-dimers då antagna koncentrationer av primers och polymeras kan skilja sig avsevärt från prov till prov. Likaså frånvaron av normalisering av prover, koncentration av DNA och dess renhetsgrad, påverkar detektionen på liknande vis. Bestämning av mängd DNA och dess renhetsgrad bör ha utförts inför detektion med realtids-PCR.

Upprättande av standardmetod som screening är av yttersta vikt för undersökning av kliniska isolat, medan för miljöisolat kan explorativa metoder och tillämpningar användas. Resultat vid undersökning av miljöisolat kan skilja sig mycket ifrån kliniska isolat trots att samma sorts instrument, reagenser och extraktionsmetoder används (El-Hady & Adel 2015; Volkmann et al. 2004). Körning av duplex till *bla<sub>CIT(CMY-2)</sub>/bla<sub>MOX</sub>* på både realtids-PCR och gel-elektrofores uppvisade otydliga utfall, vilket gör att oavsett metod kan resultaten som erhöles i studien inte säkerställas.



## 4.2. Resultatdiskussion

### 4.2.1. Förekomst av *bla*<sub>FOX</sub>

Studien utfördes på 96 isolat varav 79 bedömdes som relevanta ur ett kliniskt perspektiv. Av dessa 79 isolat, bedömdes 34 % som positiva för *bla*<sub>FOX</sub>, varav 59 % av de positiva bar även ytterligare resistensgener (13 *bla*<sub>CTX-M</sub>, 2 *bla*<sub>OXA</sub>, 1 *bla*<sub>TEM</sub>, 1 *bla*<sub>SHV</sub>). Ett isolat bar på tre resistensgener (*bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> och *bla*<sub>TEM</sub>). 74 % av de positiva isolaten (20 av 27) för genen *bla*<sub>FOX</sub> kom från vattenprov tagna intill pumpstationen, inklusive isolaten som bar på tre resistensgener. Isolat positiva för genen *bla*<sub>FOX</sub> påvisades både före och efter reningsverket, vilket antyder att Helge Å fungerar som en reservoar för spridning av antibiotikaresistens. Troligtvis på grund av otillräckliga metoder hos reningsverken för att kunna förhindra utsläpp av resistensgener i utgående vattenflöde.

I en studie av Egervärn et al. (2017), som syftade till att kartlägga förekomsten av ESBL-producerande bakterier i ytvatten som används för dricksvatten, påvisades att samtliga isolat som screenats genotypiskt positiva för resistens mot cefalosporiner (27 av 98) bar på flera gener för antibiotikaresistens, varav 74 % av isolaten bar på 3 gener eller fler. Vidare nämner Egervärn et al. (2017) att multiresistenta bakterier överensstämmer med stammar påträffade i kliniska isolat, vilket kan innebära att avloppsvatten från sjukhus och hushåll för med sig multiresistenta bakterier genom reningsverket (Chagas et al. 2011). I en studie av Stange et al. (2015), som syftade till att kartlägga förekomsten av gener associerade med antibiotikaresistens och virulens hos 100 koliforma isolat provtagna från floden Rhen, påvisades genotypisk resistens för ampicillin hos 43 % av isolaten. Den fenotypiska resistensen för isolat som bedömdes genotypiskt positiva för AmpC-gen, kunde endast påvisas hos 9 isolat (20,9 %). Isolat med ESBL-gener uppvisade fenotypisk resistens mot ampicillin, vilket enligt Stange et al. (2015) kan innebära att plasmider bärandes på AmpC-gener kan även härbärgera ESBL-gener.

Flertalet bakteriestammar med pAmpC har isolerats från miljöprover samt från boskap och husdjur (Böckelmann et al. 2009; Börjesson et al. 2016). Spridningen till människan kan ske genom otillräcklig avfallshantering inom djurhållningen, exempelvis genom spridning av spillning och slaktavfall till närliggande färskvattenreservoar (Böckelmann et al. 2009).

Ansamling av bakterier bärandes på plasmidburna resistensgener kan därmed utgöra ett betydande hot för ökad spridning av antibiotikaresistens före, under och efter reningsverk vilket har påvisats i flertalet studier (Chagas et al. 2011; Dolejska et al. 2011).

## 5. Slutsats

Resultat kunde endast erhållas för singelplex med genen *bla<sub>FOX</sub>*, 34 % (27 av 79 isolat) av undersökta isolat bedömdes bära på resistensgenen. 59 % (16 av 27) av de isolat som var positiva för genen *bla<sub>FOX</sub>* bar på flera resistengener varav 1 isolat bar på 3 resistensgener. Fynden antyder att Helge Å kan verka som reservoar för spridning av resistensgener.

Metoden för detektion av plasmidburna AmpC-gener anses inte vara tillräckligt optimerad för multiplex analys, förmodligen behöver metodprotokollet grundligen revideras vilket inkluderar re-design av primers.

## Erkännanden

Jag känner stor tacksamhet till mina handledare Lina Axelsson och Ann-Sofi Rehnstam-Holm som fungerat som bollplank för studiens laborativa som skriftliga del. Min arbetsinsats har erkänts, vilket innebär en stor lättnad bland all stress som uppkommit under arbetets gång på grund av försenade leveranser av reagenser och kontrollstammar.

Vill även tacka övrig undervisande personal vid Högskolan Kristianstad som under de tre gångna åren berikat min kunskap inom biomedicinsk laborativvetenskap och gett adekvat stöd för att utvecklas i rollen som framtida biomedicinsk analytiker.

Ytterligare tack riktas åt vänner som visat stort förstående på frånvarande under gångna veckor samt agerat som stöttande pelare när jag känt behov att prata om arbetsbördan.

## Referenser

AFS 2005:1. *Mikrobiologiska arbetsmiljörisiker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet*. Stockholm: Arbetsmiljöverket.

Arber, W. (2014). Horizontal Gene Transfer among Bacteria and It's Role in Biological Evolution. *Life*, 4:2, ss. 217-224. DOI:10.3390/life4020217

Ashbolt et al. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121:9, ss. 993-1001. DOI:10.1289/ehp.1206316

Balcazar, J. L. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLOS Pathogens*, 10:7, ss. 1-4. DOI:10.1371/journal.ppat.1004219

Bio-Rad (2010). *A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping* [faktablad]. [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6004.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6004.pdf)

Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21<sup>st</sup> Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:4, ss. 933-951. DOI:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001

Brauner, A., Shores, N., Fridman, O. & Balaban, N. Q. (2017). An Experimental Framework for Quantifying Bacterial Tolerance. *Biophysical Journal*, 112:12, ss. 2664-2671. DOI:10.1016/j.bpj.2017.05.014

Brewster, J. D. & Paoli, G. C. (2013). DNA extraction protocol for rapid PCR detection of pathogenic bacteria. *Analytical Biochemistry*, 442:1, ss. 107-109. DOI:10.1016/j.ab.2013.07.013

Brolund, A., Tegmark Wisell, K., Edquist, P. J., Elfström, L., Walder, M. & Giske, C. G. (2010). Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Microbiological Methods*, 82:3, ss. 229-233. DOI:10.1016/j.mimet.2010.06.006

Bruker Daltonics (2014). *MALDI Biotyper Compass User Manual*. Bremen: Bruker Daltonics.

- Buck, R. E. & Price, K. E. (1977). Cefadroxil, a New Broad-Spectrum Cephalosporin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11:2, ss. 324-330. PMID:848939
- Böckelmann, U. et al. (2009). Quantitative PCR Monitoring of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Three European Artificial Groundwater Recharge Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1, ss. 154-163. DOI:10.1128/AEM.01649-08
- Börjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P-Å., Olsen, B., Matussek, A. & Lindgren, P-E. (2009). Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides,  $\beta$ -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *International Journal of Environmental Health Research*, 19:3, ss. 219-230. DOI:10.1080/09603120802449593
- Börjesson, S., Ny, S., Egervärn, M., Bergström, J., Rosengren, Å., Englund, S., Löfmark, S. & Byfors, S. (2016). Limited Dissemination of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and Plasmid-Encoded AmpC-Producing *Escherichia coli* from Food and Farm Animals, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, 22:4, ss. 634-640. DOI:10.3201/eid2204.151142
- Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B. & Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*, 4:17, ss. 1-8. DOI:10.21037/atm.2016.09.14
- Chagas, T. P. G., Seki, L. M., Cury, J. C., Oliveira, J. A. L., Dávila, A. M. R., Silva, D. M. & Asensi, M. D. (2011). Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 111:3, ss. 572-581. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x
- Chen, H. H., Hon, P. Y. & Hsu, L. Y. (2017). Ceftaroline – An Anti-MRSA Cephalosporin and It's Implications for Singapore. *Annals Academy of Medicine*, 43:3, ss. 177-186. PMID:24714713
- Dancer, S. J. (2001). The problem with cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:4, ss. 463-478. DOI:10.1093/jac/48.4.463
- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M. & Dashti, H. M. (2009). Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41:2, ss. 117-122.

Dolejska, M., Frolkova, P., Florek, M., Jamborova, I., Purgertova, M., Kutilova, I., Cizek, A., Guenther, S. & Literak, I. (2011). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:12, ss. 2784-2790. DOI:10.1093/jac/dkr363

Dwyer et al. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111:20, ss. 2100-2109. PMID:24803433

Egervärn, M., Englund, S., Ljunge, M., Wiberg, C., Finn, M., Lindblad, M. & Börjesson, S. (2017). Unexpected common occurrence of transferable extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in Swedish surface waters used for drinking water supply. *Science of the Total Environment*, 587:588 ss. 466-472. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.02.157

El-Hady, S. A. & Adel, L. A. (2015). Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates from patients at Ain Shams University Hospital. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 16:3, ss. 239-244. DOI:10.1016/j.ejmhg.2015.03.001

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2016). *Standard Operating Procedure – Setting breakpoints for new antimicrobial agents (version 1.2)*. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/EUCAST\\_SOPs/EUCAST\\_SOP\\_1.2\\_Setting\\_breakpoints\\_new\\_agents\\_20161121.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_SOP_1.2_Setting_breakpoints_new_agents_20161121.pdf)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2017). *Antimicrobial susceptibility testing – EUCAST disk diffusion method (version 6.0)*. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Version\\_5/Manual\\_v\\_6.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_final.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Manual_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf)

Folkhälsomyndigheten (2014a). *ESBL-producerande tarmbakterier – Kunskapsunderlag med förslag till handläggning för att begränsa spridningen av Enterobacteriaceae med ESBL*. 2. uppl., Stockholm: Folkhälsomyndigheten.

<https://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/f4df42e7e643414ba3499a9ee1801915/esbl-producerande-tarmbakterier.pdf>

Folkhälsomyndigheten (2014b). *Urinvägsinfektioner hos män – Expertmöte med redovisning av aktuellt kunskapsläge mot bakgrund av ökad antibiotikaresistens*. 2. uppl., Stockholm: Folkhälsomyndigheten.  
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/6ced727726804e1c9a5356106bf3007f/urinvagsinfektioner-hos-man.pdf>

Geyer, C. N. & Hanson, N. D. (2014). Multiplex High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 52:4, ss.1262-1265. DOI:10.1128/JCM.00214-14

Geyer, C. N., Reisbig, M. D. & Hanson, N. D. (2012). Development of a TaqMan Multiplex PCR Assay for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes. *Journals of Antimicrobial Chemotherapy*, 50:11, ss. 3722-3725. DOI:10.1128/JCM.02038-12

Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Cantón, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, ss. 1-4. DOI:10.1093/jac/dkn.444

Ghosh, A. S., Chowdhury, C. & Nelson, D. E. (2008). Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 16:7, ss. 309-317. DOI:10.1016/j.tim.2008.04.006

Hawkey, P. M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *British Medical Journal*, 317, ss. 657-660. DOI:10.1136/bmj.317.7159.657

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Mickey Williams, P. (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Methods*, 6:10, ss. 986-994. PMID:8908518

Holten, K. B. & Onusko, E. M. (2000). Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics. *American Family Physician*, 62:3, ss. 611-620. PMID:10950216

Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:1, ss. 161-182. DOI:10.1128/CMR.00036-08

- Japoni-Nejad, A., Ghaznavi-Rad, E. & van Belkum, A. (2014). Characterization of Plasmid-Mediated AmpC and Carbapenemases among Iranian Nosocomial Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Using Phenotyping and Genotyping Methods. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5:6, ss. 333-338. DOI:10.1016/j.phrp.2014.09.003
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33:3, ss. 300-305. PMID:29109626
- Kong, K-F., Schnepfer, L. & Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 118:1, ss. 1-36. DOI:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:10, ss. 1471-1485. DOI:10.1016/j.addr.2005.04.003
- Larsson, J. D. G., de Pedro, C. & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148:3, ss. 751-755. DOI:10.1016/j.jhazmat.2007.07.008
- Larsson, J. D. G. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119:2, ss. 108-112. DOI:10.3109/03009734.2014.896438
- Leder, R. D. & Stier Carson, D. (1997). Cefuroxime Axetil (Ceftin®): A Brief Review. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 5:3, ss. 211-214. DOI:10.1155/S1064744997000343
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4:2, ss. 1-37. DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Murray-Smith, R. J., Coombe, V. T., Haag Grönlund, M., Waern, F. & Baird, J. A. (2011). Managing Emissions of Active Pharmaceutical Ingredients from Manufacturing Facilities: An Environmental Quality Standard Approach. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8:2, ss. 320-330. DOI:10.1002/ieam.1268
- Nikaido, H. & Pagès, J-M. (2012). Broad Specificity Efflux pumps and Their Role in Multidrug Resistance of Gram Negative Bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 36:2, ss. 340-363. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x.



- Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S. & Dessen, A. (2013). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *The Protein Society*, 23:3, ss. 243-259. DOI:10.1002/pro.2414
- Panja, S., Saha, S., Jana, B. & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology*, 127:1, ss. 14-20. DOI:10.1016/j.jbiotec.2006.06.008
- Pérez-Pérez, F. J. & Hanson, N. D. (2002). Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:6, ss. 2153-2162. DOI:10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002
- Persson, T. (2014). *Optimering av RT-PCR SYBRGreen för detektion av ESBL-gener i omvärldsisolat*. Kandidatuppsats, Sektionen för Lärande och Miljö. Kristianstad: Högskolan Kristianstad.
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1, ss. 1-11. DOI:10.1128/AAC.46.1.1-11.2002
- Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J. & Morata P. (2008). Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15:2, ss. 293-296. DOI:10.1128/CVI.00270-07
- Referensgruppen för antibiotikafrågor (RAF) (2014). *Ampicillin/Amoxicillin*. Stockholm: RAF. [http://www.sls.se/globalassets/raf/lakemedel/penicilliner/ampi-amoxicillin\\_rev2014.pdf](http://www.sls.se/globalassets/raf/lakemedel/penicilliner/ampi-amoxicillin_rev2014.pdf)
- Romero, J. L., Grande Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A. & Lucas, R. (2017). Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8:1650, ss. 1-16. DOI:10.3389/fmicb.2017.01650
- Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B. & Roesler, U. (2014). Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-

M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PLOS One*, 9:7, ss. 1-9. DOI:10.1371/journal.pone.0100956

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:2, ss. 234-258. DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x

Sesma, A., Sundin, G. W. & Murillo, J. (1998). Closely Related Plasmids Replicons Coexisting in the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* Show a Mosaic Organization of the Replicon Region and Altered Incompatibility Behavior. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:10, ss. 3948-3953. PMID:9758824

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Danish Rizvi, S. M. & Kamal, M.A. (2014). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, ss. 90-101. DOI:10.1016/j.sjbs.2014.08.002

Stange, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A. & Toze, S. (2015). Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219:8, ss. 823-831. DOI:10.1016/j.ijheh.2016.07.015

Sun, J., Deng, Z. & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453:2, ss. 254-267. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.090

Tajadini, M., Panjehpour, M. & Javanmard, S. H. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research*, 3:85, ss. 1-5. DOI:10.4103/2777-9175.127998

Todar, K. (2008-2012). *Todar's Online Textbook of Bacteriology Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease*. [http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial_3.html) [7 Juni 2018].

Vadlamani, G., Thomas, M. D., Patel, T. R., Donald, L. J., Reeve, T. M., Stetefeld, J., Standing, K. G., Vocadlo, D. J. & Mark, B. L. (2015). The  $\beta$ -Lactamase Gene Regulator AmpR Is a Tetramer That Recognizes and Bind the D-Ala-D-Ala Motif of Its Repressor UDP-N-acetylmuramic Acid (MurNAc)-pentapeptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 290:5, ss. 2630-2643. DOI:10.1074/jbc.M114.618199

- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S. & Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56:2, ss. 277-286. PMID:14744456
- von Wintzingerode, F., Göbel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *Federation of European Microbiological Societies*, 21:3, ss. 213-229. PMID:9451814
- Woodford, N., Turton, J. F. & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *Federation of European Microbiological Societies*, 35:5, ss. 736-755. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:10, ss. 1451-1470. DOI:10.1016/j.addr.2005.04.002
- Ye, Q., Wu, Q., Zhang, S., Zhang, J., Yang, G., Wang, H., Huang, J., Chen, M., Xue, L. & Wang, J. (2017). Antibiotic-Resistant Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and Plasmid-Mediated AmpC-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Retail Food Products and the Pearl River in Guangzhou, China. *Frontiers in Microbiology*, 8:96, ss. 1-12. DOI:10.3389/fmicb.2017.00096

