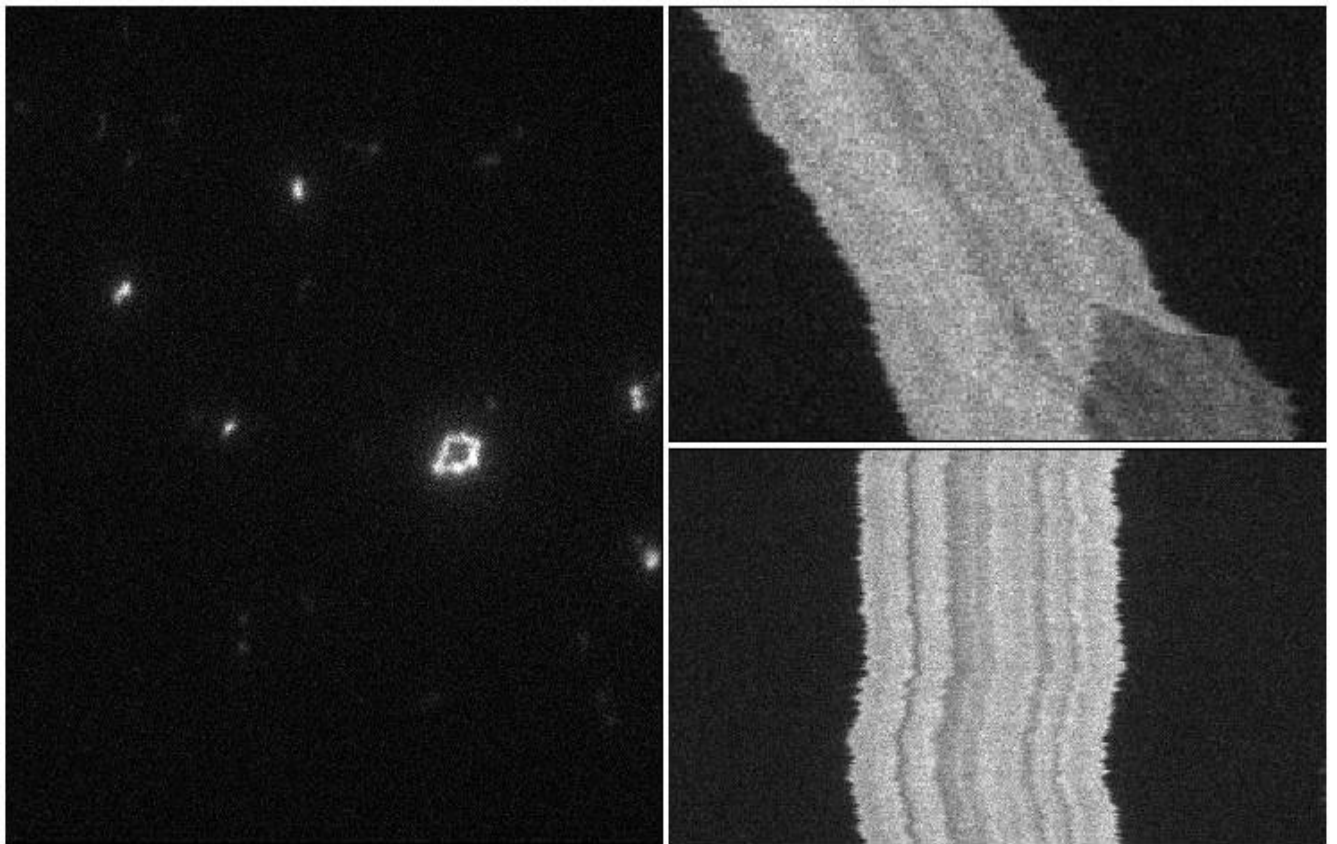




CHALMERS



Identifiering av plasmider som orsakade ett utbrott av antibiotikaresistens på Karolinska Universitetssjukhuset

Kandidatarbete inom Kemisk Biologi

JENIFER BJÖRKMAN
BEATRICE D'AUBIGNÉ
ELIN HARALDSSON
AMANDA LINDENMEYER ASADI
ISABEL RUNNEBERGER
MEDINA VELIC

Kandidatarbete inom Kemisk Biologi

Identifiering av plasmider som orsakade ett utbrott av antibiotikaresistens på Karolinska Universitetssjukhuset

JENIFER BJÖRKMAN
BEATRICE D'AUBIGNÉ
ELIN HARALDSSON
AMANDA LINDENMEYER ASADI
ISABEL RUNNEBERGER
MEDINA VELIC



CHALMERS

Institutionen för Biologi och Bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2016

Identifiering av plasmider som orsakade ett utbrott av antibiotikaresistens på Karolinska Universitetssjukhuset

JENIFER BJÖRKMAN, BEATRICE D'AUBIGNÉ, ELIN HARALDSSON,
AMANDA LINDENMEYER ASADI, ISABEL RUNNEBERGER & MEDINA VELIC

Göteborg 2016

© JENIFER BJÖRKMAN, BEATRICE D'AUBIGNÉ, ELIN HARALDSSON,
AMANDA LINDENMEYER ASADI, ISABEL RUNNEBERGER & MEDINA VELIC,
2016.

Handledare: Fredrik Westerlund & Vilhelm Müller
Institutionen för Biologi och Bioteknik
Avdelningen för Kemisk Biologi
Chalmers Tekniska Högskola
SE-412 96 Göteborg
Sverige
Telefon + 46 (0)31-772 1000

Omslag:

Plasmid så som den visualiseras i mikrokanal i fluorescensmikroskop (vänster). Cirkulär respektive linjär form av plasmid framtaget som kymografer (höger). Den cirkulära formen filmad i nanokanal och som efter tid öppnar sig och övergår till linjär form (överst, höger). Linjär form av plasmid (underst, höger).

Göteborg, Sverige 2016

Identification of Plasmids Causing an Outbreak of Antibiotic Resistance at Karolinska University Hospital

JENIFER BJÖRKMAN, BEATRICE D'AUBIGNÉ, ELIN HARALDSSON,
AMANDA LINDENMEYER ASADI, ISABEL RUNNEBERGER & MEDINA VELIC

Department of Biology and Biological Engineering
Chalmers University of Technology

Abstract

Antibiotic resistance is a growing, global issue that in a near future threatens to result in that common infections, caused by pathogenic bacteria, cannot be treated. Today, there are already outbreaks of resistant bacteria where the patients cannot be cured. This mainly occurs in hospital environments with patients susceptible to infections. To address this issue, faster methods to identify plasmids need to be developed and the use of antibiotics needs to decrease. The faster an outbreak is mapped, the faster a spread can be prevented. In environments containing a specific antibiotic, only bacteria with resistance to that antibiotic will survive. This ability can be inherited but also transferred between bacteria if the resistance gene is located on small, circular DNA molecules, so called plasmids.

In this project, samples from an outbreak of antibiotic resistance at Karolinska University Hospital have been studied. During this outbreak, 17 newborn babies at two neonatal intensive care units were infected with antibiotic resistant *E. coli* and/or *K. pneumoniae*. The resistance of the bacteria occurred because of a plasmid gene, encoding an enzyme belonging to a group of enzymes called ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamases). The aim of this project was to examine the spread of the plasmid carrying the resistance gene. The examination included both the spread between the different species of bacteria and between the patients. Furthermore, the study was made to decide whether the same plasmid caused the outbreak.

Several experiments with plasmid samples from three children were performed with a method called Optical DNA Mapping. The samples were marked with two molecules, and one of them was fluorescent. They were studied with fluorescence microscopy and a pattern with information about the approximate sequence of the plasmid was obtained. The analysis of the results showed that plasmids with almost the same size were found both in different patients and bacterial species. The pattern showed that the most common plasmid was found in two patients and in different bacterial species, verifying its transfer between both species and patients. The most common plasmid was not found in the third patient and therefore no final conclusions if this plasmid caused the entire outbreak could be drawn.

Optical DNA Mapping is a well working method but improvements need to be made in order to map the spread of plasmids faster and easier.

Keywords: Antibiotic resistance, Optical DNA Mapping, ESBL, *E. coli*, *K. pneumoniae*, plasmids

Identifiering av plasmider som orsakade ett utbrott av antibiotikaresistens på
Karolinska Universitetssjukhuset
JENIFER BJÖRKMAN, BEATRICE D'AUBIGNÉ, ELIN HARALDSSON,
AMANDA LINDENMEYER ASADI, ISABEL RUNNEBERGER & MEDINA VELIC
Institutionen för Biologi och Bioteknik
Chalmers Tekniska Högskola

Sammanfattning

Antibiotikaresistens är ett växande, globalt problem som inom en snar framtid hotar kunna leda till att vanliga infektioner orsakade av patogena bakterier inte längre går att bota. Redan idag sker utbrott av resistenta bakterier där patienterna inte kan botas, ofta på sjukhusavdelningar med infektionskänsliga patienter. För att hantera problemet måste snabbare metoder för att identifiera plasmider utvecklas och antibiotikaanvändandet minskas. Ju snabbare ett utbrott kartläggs desto snabbare kan åtgärder som hindrar spridning vidtas. I närvaro av ett specifikt antibiotikum kommer endast bakterier med motståndskraft mot detta antibiotikum att överleva. Denna förmåga kan ärvas men även överföras mellan vissa bakterier ifall resistensgenen är lokaliserad på små, cirkulära DNA-molekyler, så kallade plasmider.

I det här projektet har prover från ett antibiotikaresistensutbrott på Karolinska Universitetssjukhuset studerats. 17 nyfödda barn på två neonatalavdelningar var smittade med *E. coli* och/eller *K. pneumoniae* vars antibiotikaresistens var orsakad av att de bar på en plasmidgen kodande för ett enzym som tillhör en grupp enzymer som kallas ESBL (från engelskans Extended Spectrum Beta-Lactamase). Syftet med projektet var att undersöka spridningen av plasmiden bärande på resistensgenen. Både spridning mellan bakteriearter och patienter undersöktes. Fortsättningsvis genomfördes studien för att bestämma om huruvida samma plasmid orsakade utbrottet.

Flertalet laborationer med optisk DNA-kartläggning har gjorts på plasmidprover från bakterier i tre av barnen. Proverna märktes in med två molekyler, varav den ena fluorescerande. Proverna studerades i nanofluidchip med fluorescensmikroskopi och ett mönster som ger information om den ungefärliga sekvensen på plasmiden erhöles. Analys av resultatet visade att det fanns flera plasmider av liknande storlek i både olika patienter och hos olika bakteriearter. Det framtagna mönstret visade att den vanligast förekommande plasmiden fanns i två av patienterna och i olika bakteriearter, vilket verifierade dess överföring mellan både patienter och bakteriearter. Denna plasmid kunde inte hittas i den tredje patienten och därför kan inga definitiva slutsatser dras att just denna plasmid var orsaken till hela utbrottet.

Optisk DNA-kartläggning är en väl fungerande metod, men förbättringar behöver göras för att kartläggning av plasmidspridning ska kunna utföras både snabbare och enklare.

Nyckelord: Antibiotikaresistens, optisk DNA-kartläggning, ESBL, *E. coli*, *K. pneumoniae*, plasmider

Förord

Vi som genomfört kandidatarbetet skulle vilja rikta ett stort tack till våra handledare, Fredrik Westerlund och Vilhelm Müller, som med stort engagemang väglett och stöttat oss under projektets gång. Deras hjälp har varit ovärderlig och inspirerat till framtida studier. Tack även till Viveka Nordberg som varit vår kliniska kontakt på Karolinska Universitetssjukhuset och som alltid funnits till hands för att svara på våra frågor. Till Kabir Humaun Muhammed som förberett plasmidproverna och Joachim Fritzsche som tillverkat nanofluidchippen som använts och som på ett pedagogiskt sätt förklarat tillverkningen. Tack även till Linus Sandegren som satte antibiotikaresistens i ett helhetsperspektiv och skapade en djupare förståelse.

Innehållsförteckning

1. Inledning	1
2. Teoretisk bakgrund	3
2.1. Bakteriers uppbyggnad och struktur	3
2.2. DNA-molekylers uppbyggnad och egenskaper	3
2.2.1. Plasmiders uppbyggnad och överföringsmekanismer	4
2.2.2. Extrahering av plasmider ur celler	4
2.3. Antibiotikaresistens	5
2.3.1. Antibiotikaresistens hos ESBL-bildande bakterier	5
2.4. Traditionella metoder för karakterisering av plasmider	6
2.4.1. Pulsfältgelelektrofores	6
2.4.2. PCR-baserad replikontypning	6
2.4.3. DNA-sekvensering	7
2.5. Visualisering av DNA med mikroskopi	7
2.6. Optisk DNA-kartläggning	8
2.6.1. Analys av prover i nanofluidchip	8
2.7. DNA-klyvning med CRISPR-Cas9	10
3. Metod	11
3.1. Urvalsprocess	11
3.2. Tillverkning av nanofluidchip och deras uppbyggnad	12
3.3. Experiment	12
3.4. Dataanalys	14
4. Resultat	17
4.1. Plasmidstorlekar	17
4.2. Jämförelse mellan konsensusstreckkoder	18
4.3. Identifiering av ESBL-genen med CRISPR-Cas9	20
5. Diskussion	21
5.1. Utvärdering av resultat från storleksmätning	21
5.2. Utvärdering av resultat vid jämförelse av streckkoder	21
5.3. Utvärdering av optisk DNA-kartläggning	21
5.3.1. Metodjämförelser	22
5.3.2. Genidentifiering med CRISPR-Cas9	23
5.3.3. Felkällor	24
6. Slutsats	25
Referenser	26
Appendix A: Jämförelse av konsensusstreckkoder	I
Appendix B: Plasmidstorlekar	III
Appendix C: P-värden för samtliga jämförelser	IV
Appendix D: Intensitetsgrafer för gröna jämförelser	V
Appendix E: Intensitetsgrafer för gula jämförelser	VII
Appendix F: Ordlista	VIII

1. Inledning

Antibiotika har sedan 1950-talet använts som universalmedel för att bota infektioner. På grund av överdriven användning, som gynnat spridning av antibiotikaresistens mellan bakterier, har effektiviteten hos antibiotika minskat [1][2]. Inga nya klasser av antibiotika har upptäckts sedan 1980-talet vilket gör det väsentligt att bevara effektiviteten hos de redan existerande genom att minska spridning av resistens. Världshälsoorganisationen (WHO) rapporterar att antibiotikaresistens idag är ett av de största hoten mot mänsklig hälsa, där vanliga infektioner och mindre skador inom en snar framtid förutspås kunna leda till döden [1]. I sjukhusinrättningar kan spridning av resistent bakterier ske snabbt och ge upphov till allvarliga konsekvenser hos redan utsatta människor [3]. Förutom hälsoriskerna är antibiotikaresistens kostsamt [1][4]. Den globala kostnaden förväntas nå upp till 100 000 miljarder amerikanska dollar år 2050 om ingen förändring sker. Detta baserat på en rapport från expertorganisationen The Review on Antimicrobial Resistance som sammanställdes år 2014 [5].

Gener för antibiotikaresistens kan spridas mellan bakterier genom överföring av cirkulära DNA-molekyler, så kallade plasmider. Detta möjliggör förflyttning av gener mellan olika arter och stammar av bakterier [6], till exempel från en tarmbakterie till en annan [7]. En typ av resistens som spridit sig snabbt över världen är orsakad av en grupp enzymer som benämns ESBL (från engelskans Extended Spectrum Beta-Lactamase), vilket är en undergrupp till betalaktamaser. Betalaktamaser är ett samlingsnamn för enzymer som kan inaktivera någon form av betalaktamantibiotika, till exempel penicilliner och cefalosporiner [8], som är några av de mest frekvent använda antibiotikasorterna [9]. ESBL har ett bredare spektrum då de kan inaktivera flera, eller alla, av dessa antibiotikasorter [8]. Generna som kodar för ESBL-produktion är ofta lokaliserade på plasmider vilket leder till att bakteriers förmåga att producera de specifika enzymerna sprids snabbt. ESBL hittas bland annat hos enterobakterierna *Escherichia coli* (*E. coli*) och *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Dessa tillhör en familj av bakterier som är vanligt förekommande i mag-tarmkanalen. I nuläget existerar endast en grupp av betalaktamantibiotika, karbapenemer, som ESBL-producerande bakterier i de flesta fall fortfarande är känsliga för. För att denna egenskap inte ska gå förlorad används detta antibiotikum ytterst sällan inom sjukvården. Rapporter har dock påvisat att nya typer av ESBL även kan inaktivera karbapenemer [9].










Det finns ett tydligt samband mellan resistens orsakad av ESBL-producerande bakterier och hög användning av antibiotika. Den främsta spridningsvägen för dessa bakterier sker inom vården och är orsakad av bland annat bristfälliga hygienrutiner där varken händer, kläder eller utrustning är tillräckligt sterila [9]. Idag är bakteriestammar som bär på ESBL-producerande plasmider vanligare utomlands, exempelvis i Sydostasien [9][10]. Under de senaste åren har utbrott på sjukhus inträffat allt oftare även i Sverige. Bland annat på neonatal-, brännskade-, och urologavdelningar [9][11].

Under 2008 inträffade ett utbrott av ESBL-bärande bakterier på två neonatalavdelningar på Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm. Dessa bakterier, av arterna *E. coli* och *K. pneumoniae*, hade bildat kolonier i tarmarna hos 17 nyfödda barn. Tre av dessa patienter avled under sjukhusvistelsen, dock inte som en direkt följd av infektioner orsakade av de resistent bakterierna. Flera av barnen som var smittade hann skickas vidare till andra sjukhus innan utbrottet konstaterades genom provsvar [12].

Karolinska Universitetssjukhuset har genomfört en studie på hur lång tid efter utskrivning de nyfödda barnen fortfarande testats positivt för ESBL-producerande bakterier. De tre patienterna som avled innan utskrivning inkluderades således inte i studien. I *Tabell 1* presenteras de ESBL-producerande bakteriernas förekomst hos de 14 patienterna från studien. Prov 1 är det första ESBL-positiva provet som tagits från varje patient och provet 0-2 m motsvarar utskrivningsprovet. Efterföljande prov är tagna olika antal månader efter utskrivning. En av patienterna avled under studiens gång.

Tabell 1. Förekomst av olika ESBL-producerande bakterier hos 14 patienter som vårdats på två neonatalavdelningar på Karolinska Universitetssjukhuset mellan år 2008 och 2009. Prov 1 är första provet med positivt provsvar och m indikerar antal månader efter utskrivning.

Patient	Prov 1	0-2 m	3-4 m	5-6 m	7-8 m	9-10 m	11-12 m	13-14 m	15-16 m	17-18 m	19-20 m	21-22 m
1			e.u.					e.u.	e.u.		e.u.	
2		e.u.		e.u.		e.u.		e.u.	e.u.		e.u.	
3										e.u.		e.u.
4												
5			e.u.		e.u.							
6				e.u.								
7												
8												
9										e.u.	e.u.	
10			e.u.		e.u.							
11			e.u.					e.u.				
12			e.u.				e.u.					
13			e.u.						e.u.			e.u.
14									e.u.			

	<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli, K. pneumoniae</i>
	Avliden		Ingen växt		Ej utförd provtagning
	<i>C. freundii, E. coli</i>		<i>C. freundii, K. pneumoniae</i>		<i>C. freundii, E. coli, K. pneumoniae</i>

Liknande utbrott har även skett på flera andra sjukhus, såsom Drottning Silvias barnsjukhus i Göteborg [13], Akademiska sjukhuset i Uppsala [14] och Centrallasarettet i Västerås [15]. Dessa utbrott visar att det behövs mer effektiva metoder för att snabbt kunna säkerställa smittbärare och på så vis minska konsekvenserna av likartade utbrott.

För att klargöra spridningen av antibiotikaresistens på Karolinska Universitetssjukhusets neonatalavdelningar mellan år 2008 och 2009 har utbrottet studerats närmare i detta projekt. Huvudsyftet var att undersöka om en och samma ESBL-bärande plasmid kunde återfinnas i bakterierna, *K. pneumoniae* och *E. coli*, som orsakade utbrottet i olika patienter. I detta projekt eftersöktes plasmider innehållande ESBL-gener ur gruppen CTX-M-1. Undersökning av proverna genomfördes med en metod kallad optisk DNA-kartläggning (från engelskans Optical DNA Mapping). Med den information som genererats från undersökningen kommer slutsatser kunna dras om plasmiden förflyttats mellan både bakteriearter och patienter. Utöver detta var målet även att utvärdera metoden för att avgöra om den möjliggör snabbare kartläggning av plasmider och deras resistens än vad alternativa metoder gör. I samråd med Karolinska Universitetssjukhuset valdes prover från tre av de totalt 14 patienterna, se *Tabell 1*. De utvalda patienterna var patient 8, 11 och 13.

2. Teoretisk bakgrund

I detta avsnitt presenteras en teoretisk bakgrund för projektet. Inledningsvis beskrivs bakteriers struktur och beståndsdelar med särskilt fokus på bakteriers genetik, främst i form av plasmider. Därefter redogörs för plasmiders roll i spridning av antibiotikaresistens samt metoder för att kartlägga plasmider. Dessutom introduceras teorin bakom mikroskopi och metoden optisk DNA-kartläggning som använts i projektet. Slutligen förklaras bakgrunden kring CRISPR-Cas9, eftersom detta är en del i utvecklingen av metoden optisk DNA-kartläggning. En ordlista finns bifogad i *Appendix F*.

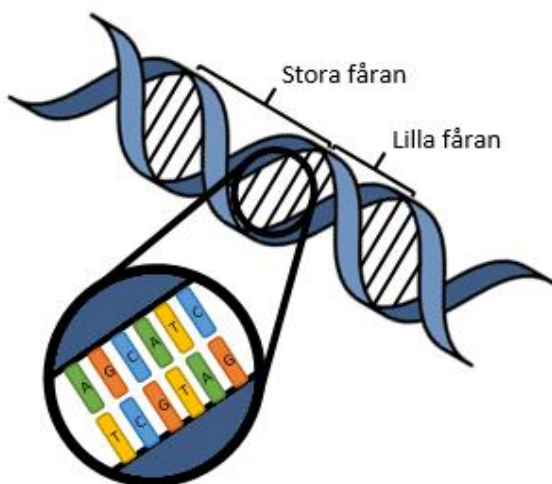
2.1. Bakteriers uppbyggnad och struktur

Bakterier är mikroskopiska, encelliga organismer [16]. Den intracellulära strukturen hos bakterier består främst av cytoplasma, ribosomer och DNA [17]. Till skillnad från eukaryota celler, som finns i till exempel människor, saknar bakterieceller en membranomsluten kärna vilket resulterar i att DNA finns fritt i cytoplasman [18]. Detta DNA utgörs av en cirkulär kromosom innehållande de flesta gener och plasmider som kan variera i antal. På kromosomen hittas de gener som styr bakteriens grundläggande funktioner. Liksom kromosomen är plasmider cirkulära men förhållandevis små [17] och viktiga för bakteriens evolution och anpassningsförmåga [19].

Det är vanligt att bakterieceller är försedda med utskott på sin yta som ger bakterien rörelse- och vidhäftningsförmåga. Rörelseförmågan ges av flageller vilka har en lång, vågformad struktur. Den vidhäftande förmågan utgörs av pili som är färre till antal och kortare jämfört med flageller. Dessa organeller underlättar konjugation; en DNA-överföringsmekanism som sker mellan bakterieceller [17] och som beskrivs mer ingående i *Avsnitt 2.2.1*.

2.2. DNA-molekylers uppbyggnad och egenskaper

DNA-molekyler bär på den genetiska informationen i allt känt liv och är uppbyggda av två strängar med nukleotider som tillsammans bildar en spiral, även kallad DNA-helix. En nukleotid består av sockret deoxiribos, en fosfatmolekyl och en kvävebas. I DNA finns fyra olika kvävebaser: adenin (A), guanin (G), cytosin (C), och tymin (T) [17], se *Figur 1*. De två nukleotidkedjorna i DNA hålls ihop av vätebindningar mellan kvävebaserna [20] och nukleotiderna på varje sträng binder kovalent till varandra [17]. Utsidan av DNA-strängen täcks av socker och fosfat, och fungerar som DNA-molekylens ryggrad. Fosfatjoner är negativt laddade och därmed kommer hela DNA-molekylen att vara negativt laddad [20].



Figur 1. Kvävebaserna adenin (A), tymin (T), guanin (G) och cytosin (C) binder till varandra. A binder till T med två vätebindningar och G till C med tre vätebindningar. DNA-spiralen har mer öppna områden som benämns stora fåran och trängre områden som kallas lilla fåran. De flesta molekyler som interagerar med DNA binder in till stora fåran då det är inom detta område det finns mest plats.

Kvävebaserna är komplementära till varandra. A binder till T med två vätebindningar och G binder till C med tre vätebindningar. Att G binder till C med fler vätebindningar medför att de binder starkare till varandra i jämförelse med A och T [20]. DNA-strängarna sveper sig om varandra och bildar den karakteristiska DNA-spiralen. Denna spiral har mer öppna områden av kvävebaser, stora fåran, och trängre områden, lilla fåran, vilket illustrerades i *Figur 1*. De flesta molekyler som interagerar med DNA binder in till stora fåran då det är inom detta område det finns mest plats. Små molekyler kan dock binda in till lilla fåran [17].

2.2.1. Plasmiders uppbyggnad och överföringsmekanismer

En plasmid är en ringformad DNA-molekyl som främst finns hos bakterier men även hos vissa eukaryoter, till exempel svampar [21]. Längden på en plasmid kan variera mellan så få som några tusen till flera hundra kilobaspar (kbp) [19], vilket kan jämföras med exempelvis kromosomen hos en *E. coli*-bakterie som är ungefär 4,5 megabaspar (Mbp) lång [22]. Plasmider kan ge bakterier fördelaktiga egenskaper i form av bland annat motståndskraft mot antibiotika [19].

Det finns flera olika sätt för en bakterie att föra över genetiskt material till en annan. De olika överföringsmekanismererna är transduktion, transformation och konjugation. Transduktion innefattar överföring av DNA med hjälp av virus från en bakteriecell till en annan [23]. Transformation innebär att extracellulärt DNA blir inkorporerat i mottagarcellens genom. Liksom vid transduktion kan transformation leda till en ändring av det kromosomala DNA:t [24]. Överföring av DNA kan även ske via konjugation där plasmider överförs mellan bakterier. Detta kräver att plasmiden har en uppsättning gener som kodar för enzymer och extracellulära organeller. En av organellerna är pili, vars vidhäftande förmåga kan skapa kontakt mellan givar- och mottagarbakterien. När kontakt har upprättats klyvs en av DNA-strängarna i plasmiden med hjälp av enzymer. En av enkelsträngarna kan därefter föras över från givarcellen till mottagarcellen, varpå en replikation kan starta i båda cellerna. Detta resulterar i att en kopia av plasmiden återfinns i båda cellerna och därmed bibehålls givarbakteriens egenskaper [25], men även mottagarbakterien erhåller dessa egenskaper och blir på så vis en givarbakterie [26].

2.2.2. Extrahering av plasmider ur celler

Plasmider kan extraheras från bakterier på olika sätt. Gemensamt för de olika metoderna är att cellväggen måste brytas ner, lyseras, för att de olika cellkomponenterna ska frigöras. Detta kan till exempel göras genom att bakterierna behandlas med det spjälkningskatalyserande enzymet lysozym, varefter de värms i kokande vattenbad. Det kan också göras med alkalisk lysering [27] där natriumdodecylsulfat, SDS (från engelskans Sodium Dodecyl Sulfate), används för att lösa upp cellmembranet. En alkalihydroxid, till exempel natriumhydroxid, tillsätts och vid upplösning blir lösningen basisk. Detta denaturerar de extraherade proteinerna och separerar DNA-strängarna hos kromosomen. Även plasmidernas DNA-strängar delas, men håller ihop eftersom de är sammanflätade i varandra. När en sur lösning innehållande till exempel kaliumacetat sedan tillsätts repareras plasmiderna genom hybridisering där de enkelsträngade DNA-ringarna åter sätts samman till sin ursprungliga, dubbelsträngade struktur. Kromosomalt DNA, RNA och proteiner fälls ut tillsammans med SDS. Slutligen centrifugeras lösningen och plasmiderna kan renas fram ur supernatanten, medan annat cellmaterial finns i pelleten [27][28].

2.3. Antibiotikaresistens

Antibiotika används för att behandla bakteriella infektioner och kan verka bland annat genom att bryta ned bakteriers cellväggar eller hämma proteinsyntesen. Bakteriers försvar mot antibiotika är att utveckla resistens, det vill säga motståndskraft mot antibiotika. Utvecklingen av resistens hos en individuell bakterie kan uppkomma genom de olika överföringsmekanismerna som beskrevs i *Avsnitt 2.2.1*, eller genom mutationer. Endast bakterier som erhållit genen för en viss typ av antibiotikaresistens överlever i miljöer innehållandes den typen av antibiotikum [29]. På så sätt kan bakterien leva vidare och de fördelaktiga egenskaperna sprids i populationen på grund av det naturliga urvalet [4][30].

Enligt Linus Sandegren, forskare vid institutionen för Medicinsk Biokemi och mikrobiolog på Uppsala Universitet, kan det vara en nackdel för bakterier att behålla plasmider som inte är gynnsamma för dem, då dessa i sådana fall är energikrävande. Därför kan en bakteriepopulation genom det naturliga urvalet bli av med plasmider över tid, ifall dessa inte har en nyttig funktion i cellen. Ett exempel är om plasmiderna bär på antibiotikaresistensgenerer men inte längre utsätts för miljöer med antibiotika. Däremot kan det även finnas gener på de resistensbärande plasmiderna som utgör andra nyttiga funktioner i bakteriecellen som gör att bakterien behåller dessa plasmider.

Ökad antibiotikaanvändning är ett globalt problem och ökningen kommer medföra att behandlingen av bakterieinfektioner försvåras. Detta gäller även för transplantationer och cancerbehandlingar som är beroende av antibiotika [4][30]. Användningen av antibiotika skulle kunna minska om patienter snabbt erhåller rätt diagnos så att de direkt kan förskrivas lämplig antibiotika för att behandla infektionen [31].

2.3.1. Antibiotikaresistens hos ESBL-bildande bakterier

Som tidigare nämnt är ESBL en grupp enzymer som orsakar antibiotikaresistens och bryter ned flera sorters betalaktamantibiotika [32]. Därmed ger antibiotikabehandling med betalaktamer inte önskad effekt om infektionen är orsakad av ESBL-bildande bakterier [4]. Både friska och sjuka individer kan vara bärare av dessa bakterier men det är först i samband med en sådan infektion som effekten av ESBL visar sig [32]. Dessa bakterier sprids lättare i sjukhusinrättningar då individer som vistas där ofta är känsligare för infektioner än övriga befolkningen [4]. Det mest effektiva sättet att bota infektioner som har orsakats av ESBL-producerande bakterier är med hjälp av karbapenemer men det förekommer även resistens mot denna form av antibiotika [1].

E. coli finns normalt i vår tarmflora där de producerar vitamin K₂ och förebygger möjligheten för koloniseringen av patogena bakteriearter [33], men de kan även orsaka infektioner i urinvägar och tarm samt ge blodförgiftning. Flera stammar av *E. coli* har, genom bland annat mutationer och överföring av plasmider, utvecklat resistens mot flertalet penicilliner och cefalosporiner. Även *K. pneumoniae* finns naturligt i tarmen och kan, precis som *E. coli*, orsaka infektion i bland annat urinvägar och blodbanor. Flertalet *K. pneumoniae*-stammar har utvecklat resistens mot antibiotika och en del varianter av resistens har spridits vidare till *E. coli*. Till skillnad från *E. coli* har *K. pneumoniae* en resistensgen som på naturlig väg gör penicilliner ineffektiva [1].

2.4. Traditionella metoder för karakterisering av plasmider

Det finns flera olika metoder för att karakterisera plasmider och jämföra dem med varandra. I detta avsnitt behandlas pulsfältgelelektrofores, PCR-baserad replikontypning samt DNA-sekvensering. Pulsfältgelelektrofores ger information om DNA-molekylers storlek medan den PCR-baserade metoden som presenteras kan ge information om plasmidens egenskaper, exempelvis antibiotikaresistens. DNA-sekvensering används för att ge den exakta nukleotidsekvensen.

2.4.1. Pulsfältgelelektrofores

I konventionell gelelektrofores separeras infärgat DNA i en gel med hjälp av ett elektriskt fält. Gelen kan vara gjord av exempelvis agaros eller polyakrylamid, vilka bildar ett nätverk som är svårgenomkomligt för större molekyler. Det elektriska fältet tvingar de naturligt negativt laddade DNA-molekylerna att förflytta sig i gelen mot den positiva elektroden och deras hastighet beror på molekylernas storlek. Detta resulterar i att molekylerna separeras efter storlek och ger upphov till ett mönster i gelen. Med detta mönster kan ungefärliga molekylstorlekar bestämmas. Dock kommer molekyler större än 20 kbp att röra sig genom gelen med samma hastighet och kan därför inte separeras med hjälp av denna metod [34].

För att separera molekyler med storlekar upp till 10 Mbp [35] kan pulsfältgelelektrofores, även kallat PFGE, användas. En mängd olika typer av denna metod har utvecklats [36] och precis som i konventionell gelelektrofores utsätts molekylerna för ett elektriskt fält. Detta gör att molekylerna sträcks ut och ställer in sig efter fältet. I PFGE appliceras dessutom ytterligare ett fält i en annan riktning medan det första fältet avlägsnas. DNA-molekylernas rörelser i gelen kommer då att påverkas och tiden det tar för dem att ställa in sig efter det nya fältet beror på molekylernas storlek [34].

PFGE:s reproducerbarhet tycks dock vara låg och metoden kräver mycket arbete och teknisk utrustning. PFGE genererar information om molekylstorlekar. För att erhålla ytterligare information om DNA kan PFGE kombineras med exempelvis sekvenseringsmetoder [37].

2.4.2. PCR-baserad replikontypning

Plasmider kan klassificeras efter kompatibilitet där två plasmider som inte kan förekomma i samma cell sägs vara inkompatibla. Baserat på detta delas plasmider in i så kallade inc-grupper där två inkompatibla plasmider sägs tillhöra samma inc-grupp. Denna klassificering är viktig för att kunna kartlägga spridning av plasmider [38]. Det har visat sig att det finns kopplingar mellan egenskaper och inc-grupp. Genom att identifiera plasmidens inc-grupp kan slutsatser därmed dras angående dess egenskaper, exempelvis resistens mot antibiotika. Bestämningen av inc-grupper baseras på särskilda sekvenser [39], så kallade replikon, vilka styr plasmidens replikation [40]. Värt att notera är att en och samma plasmid kan innehålla flera replikon. Dessa replikonsekvenser innehåller dock inte gener som är nödvändiga för cellens övriga funktioner. Inc-grupper har definierats för enterobakterier, exempelvis *E. coli* och *K. pneumoniae*, vilket möjliggör tillämpning av en metod som PCR-baserad replikontypning [41].

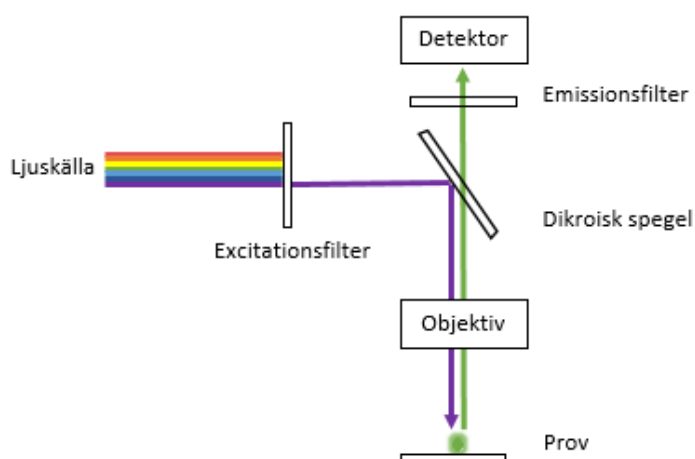
I PCR-baserad replikontypning detekteras plasmidernas replikon genom att använda en PCR-metod. PCR (från engelskans Polymerase Chain Reaction) används för att skapa många kopior av en specifik DNA-sekvens genom användning av mindre DNA-fragment, så kallade primers. I PCR-baserad replikontypning är dessa primers komplementära till redan kända replikon-sekvenser som misstänks finnas i provlösningen. Genom att addera dessa primers till provlösningen som undersöks samt genomföra en PCR erhålls miljontals kopior av de replikon som finns närvarande i provet. Slutligen jämförs dessa kopior med de redan kända replikon-sekvenserna och utifrån inc-grupperna erhålls information om egenskaper hos provets plasmider, vilket baseras på tidigare kunskap [38][42].

2.4.3. DNA-sekvensering

För att få ut exakt nukleotidsekvens hos en gen kan den studeras med hjälp av olika DNA-sekvenseringsmetoder. Som tidigare nämnt kan nukleotider förekomma i fyra olika typer beroende på vilken kvävebas de innehåller och sekvensering används för att bestämma ordningen på dessa nukleotider. Effektivare metoder, kallade nästa generationens sekvensering, har utvecklats. Gemensamt för dessa metoder är att DNA klyvs slumpmässigt och därefter sker sekvenseringen varje fragment för sig. Resultatet från sekvenseringen sätts sedan ihop för att få fram hela genomets sekvens. DNA-sekvensering är i och med hopsättningen en tidskrävande metod [42]. Nya metoder, tredje generationens sekvensering, som är under utveckling kan läsa längre sekvenser. Ett exempel är SMRT-sekvensering (från engelskans Single Molecule, Real Time) där genomsnittslängden för sekvenser som kan avläsas uppgår till 10 000 bp [43]. Detta kan jämföras med pyrosekvensering, en nästa generationens metod, där avläsning av sekvenser uppgår till 200-300 bp [42].

2.5. Visualisering av DNA med mikroskopi

Fluorescensmikroskopi är en mikroskopimetod som används för att studera objekt som är för små för att kunna ses med blotta ögat. När en molekyl absorberar ljus exciteras elektroner i atomerna till högre energitillstånd. När elektronerna sedan faller tillbaka till grundtillståndet emitteras fluorescens i form av fotoner [44]. Inte alla molekyler har förmåga att fluorescera men kan då märkas in med ett färgämne med fluorescerande egenskaper, en så kallad fluorofor. När prover studeras i praktiken används ett specifikt filter för att sända vidare ljus av en specifik våglängd som exciterar fluoroforen. Ljuset går vidare till en spegel som har förmåga att både reflektera ljus av viss våglängd och transmitta ljus av en annan, en så kallad dikroisk spegel, se *Figur 2*. Det reflekterade ljuset träffar provet som återsänder ljus av en längre våglängd. Detta ljus passerar spegeln en andra gång och via ett emissionsfilter leds ljuset till en detektor som mäter emissionsintensiteten [17].



Figur 2. Schematisk bild över hur ett fluorescensmikroskop är uppbyggt. En ljuskälla sänder ut ljus av olika våglängd som träffar ett excitationfilter. I filtret skickas endast ljus vidare av den våglängd som exciterar fluoroforen i provet. Det våglängdsspecifika ljuset träffar en dikroisk spegel som kan reflektera ljus av en viss våglängd och transmitta ljus av en annan. Det reflekterade ljuset träffar provet som sedan återsänder ljus av längre våglängd. Detta ljus träffar spegeln en andra gång och via ett emissionsfilter leds ljuset till en detektor som mäter emissionsintensiteten.

2.6. Optisk DNA-kartläggning

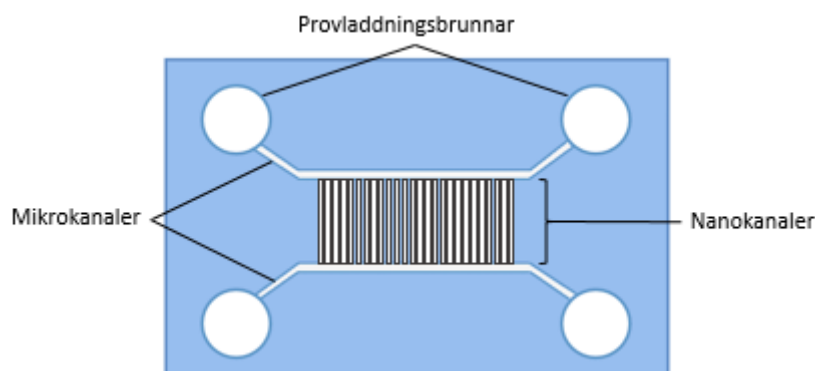
Utvecklingen av optisk DNA-kartläggning som en metod för plasmididentifiering har pågått sedan 1990-talet [45]. Vid ett tidigt skede av metodutvecklingen studerades utsträckta DNA-molekyler i agaros. Genom att låta lösningen stelna gjordes molekylerna immobila och därefter kunde de klyvas genom tillsats av restriktionsenzym. Fluorescensmikroskop användes för att observera händelseförloppet och längden på de fragment som bildades kunde bestämmas. Genom att studera dessa kortare fragment kunde deras ursprungliga position i DNA-molekylen bestämmas utifrån redan kända säten för restriktionsenzymen [46][47].

Vidare utveckling av metoden har introducerat nya sätt att sträcka ut molekylerna, exempelvis på en yta eller i nanokanaler [45]. Grundprincipen är dock densamma; DNA märks in med exempelvis en fluorescerande molekyl och DNA-molekylen sträcks sedan ut för att studeras. Tack vare inmärkningarna kan ett mönster, likt en streckkod, observeras och detta mönster används för att identifiera plasmider [48]. En fördel med denna metod är att DNA inte behöver klonas eller amplifieras utan istället studeras en enskild DNA-molekyl i taget [45].

DNA-molekylernas instabilitet ger ett behov av att kunna studera DNA-molekylerna innan de sönderfaller. Detta har möjliggjorts genom utvecklingen av nanofluidchip, vilket även ökat reproducerbarheten för metoden. Grundprincipen bygger på att enskilda DNA-molekyler sträcks ut spontant då de förs in i en nanokanal [49].

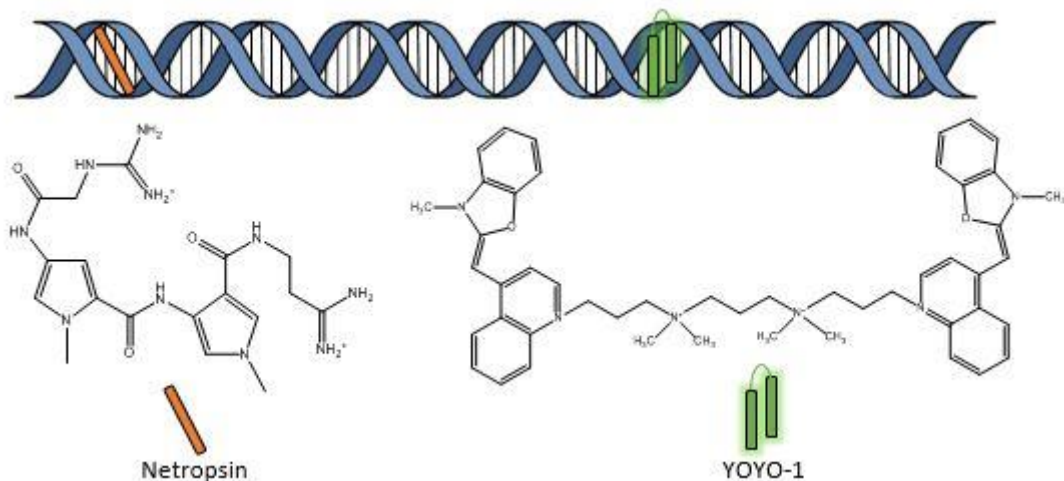
2.6.1. Analys av prover i nanofluidchip

Nanofluidchip kan vara utformade på olika sätt enligt Doktor Joachim Fritzsche, forskningsingenjör på institutionen för Fysik på Chalmers Tekniska Högskola. Ett exempel visas i *Figur 3* där chippet är uppbyggt av fyra provladdningsbrunnar förbundna med mikro- respektive nanokanaler. I en artikel av Sparreboom, van den Berg och Eijkel beskrivs det att DNA-molekyler kan dras in i nanokanaler från mikrokanalerna genom att en elektrisk spänning eller tryckskillnad appliceras mellan brunnarna [50]. På så sätt sträcks DNA-molekylerna ut och kan studeras med hjälp av fluorescensmikroskop [45].



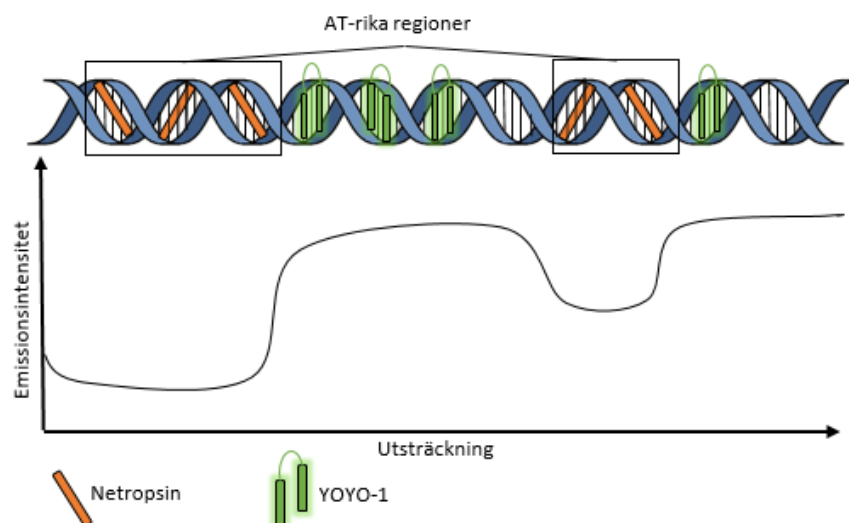
Figur 3. Schematisk bild över hur nanofluidchip kan vara konstruerat. De fyra provladdningsbrunnar är förbundna med mikro- respektive nanokanaler. Bilden är inte skalenlig.

För att kunna studera DNA-molekyler i fluorescensmikroskop kan de märkas in med en fluorofor, exempelvis YOYO-1. Molekylen emitterar ljus när den är bunden till dubbelsträngat DNA [51] men har låg fluorescensintensitet i lösning [52]. Det emitterade ljuset kan detekteras och på så sätt kan DNA-molekylers längd bestämmas [53]. En utveckling av metoden optisk DNA-kartläggning, som baseras på konkurrerande bindning, har gjorts av Fredrik Westerlunds grupp på avdelningen för Kemisk Biologi på Chalmers Tekniska Högskola. Eftersom YOYO-1 kan binda till alla regioner på DNA-molekyler [52] kan netropsin användas som steriskt hindrar YOYO-1 från att binda in till vissa regioner. På så sätt kan olika regioner på en DNA-molekyl identifieras. Netropsin är en liten molekyl som med hög affinitet binder till AT-rika regioner i lilla fåran på dubbelsträngat DNA [54][52]. I *Figur 4* illustreras inbindningen av YOYO-1 och netropsin till DNA-molekylen.



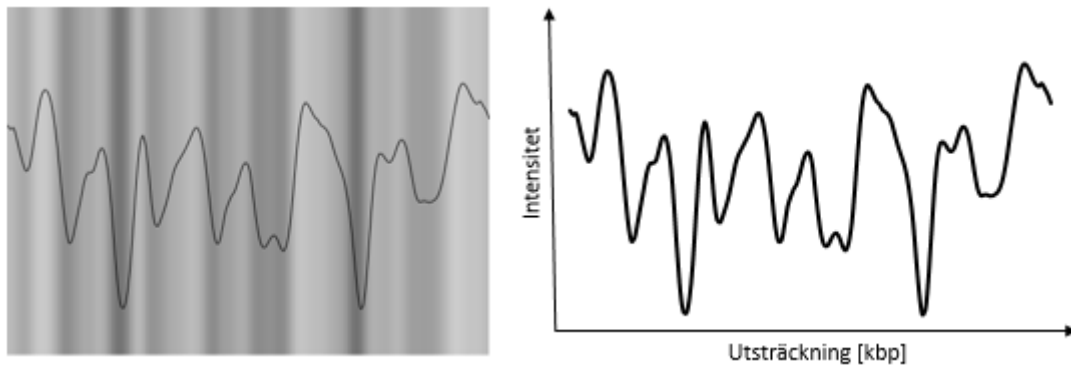
Figur 4. Till vänster visas netropsin, en liten molekyl som med hög affinitet binder till AT-rika områden i DNA. Genom att netropsin binder till dessa områden hindras fluoroforen YOYO-1, som illustreras till höger, från att binda in.

Genom att använda netropsin tillsammans med YOYO-1 kan en varierande ljusintensitet erhållas längs en DNA-molekyl, se *Figur 5*. Ljusa partier har ett högt GC-innehåll medan de mörkare partierna till största del består av AT-rika regioner med inbundet netropsin [55][54]. Ett överskott av netropsin behövs då molekylen har lägre bindingsaffinitet än YOYO-1 [55].



Figur 5. Netropsin binder till de AT-rika regionerna i DNA och hindrar YOYO-1 från att binda till dessa regioner. Därmed kommer YOYO-1 främst att binda till GC-rika regioner och en förhöjd emissionsintensitet erhålls i dessa områden.

Vid belysning av cirkulära plasmider med hjälp av fluorescens exciteras YOYO-1 vilket skapar reaktiva syreföreningar som ger upphov till DNA-brott [53] och linjäriserar molekylerna [55][56]. I en artikel av Müller, Karami, Nyberg, Pichler, Torsche Pedreschi, Quaderi et. al. beskrivs det att optisk DNA-kartläggning kan användas för att studera spridning av plasmider. Genom att detektera den varierande emissionsintensiteten längs den linjära DNA-molekylen kan ett mönster genereras, likt streckkoder, som är specifikt för en typ av plasmid [56], se *Figur 6*.



Figur 6. De genererade streckkoderna (till vänster) med mörka och ljusa partier motsvarar inbindning av YOYO-1 (ljusa partier) och netropsin (mörka partier) vilket genererar en graf med varierande emissionsintensitet längs plasmidens utsträckning (till höger).

2.7. DNA-klyvning med CRISPR-Cas9

Genom att belysa DNA-molekyler erhålls slumpvisa brott i sekvensen [53] men för att styra vart klyvningen sker kan CRISPR-Cas9 användas. CRISPR (från engelskans Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats) och Cas (från engelskans CRISPR-Associated Protein) bildar tillsammans ett immunsystem som många bakterier naturligt använder sig av för att skydda sig mot bland annat okända plasmider och virala genom [57][58]. Det finns olika Cas-proteiner [59], men i detta teoriavsnitt behandlas endast Cas9 eftersom det klyver dubbelsträngade DNA-molekyler [58]. Idag används systemet för att på konstgjord väg skapa mutationer, både raderingar och insättningar, i cellers genom. Det som är unikt med denna metod är möjligheten att styra var dubbelsträngade brott skall uppkomma, vilket underlättar genmodifieringar, men metoden kräver att den gen som skall muteras är känd sedan innan. I CRISPR-systemet används två RNA-molekyler, varav den ena har en sekvens som matchar det DNA som skall klyvas. De två RNA-sekvenserna kombineras till ett så kallat guide-RNA och bildar ett komplex tillsammans med Cas9-nukleas. När den matchande RNA-sekvensen hittar sitt mål i DNA-molekylen klyver Cas9 målsekvensen och skapar ett dubbelsträngat brott [57][58].

3. Metod

I detta avsnitt behandlas de metoder som använts under projektets gång. Avsnittet innefattar hur urvalsprocessen av patientisolat har gått till, laborationsdelen av projektet samt analyseringen av data.

3.1. Urvalsprocess

För att avgränsa projektet valdes patient 8, 11 och 13 av de totalt 14 patienterna som presenterades i *Tabell 1* under *Avsnitt 1*. Dessa valdes ut av Viveka Nordberg, specialist i pediatrik med livstjänstgöring inom neonatologi på Karolinska Universitetssjukhuset. Patient 8 valdes utifrån att provtagningarna visat alternerande infektion av *E. coli* respektive *K. pneumoniae*. Således var det intressant att undersöka om en specifik plasmid kunde identifieras i de två bakteriearterna. Patient 11 var intressant då isolaten endast innehöll plasmider från *K. pneumoniae* vilket möjliggjorde undersökning av plasmiderna över tid. Slutligen valdes patient 13 då ett av proverna innehöll en tredje bakterieart, *Citrobacter freundii* (*C. freundii*). Dessutom fanns en variation mellan de två andra bakteriearterna. En mer utförlig beskrivning av de olika isolaten hos de utvalda patienterna ses i *Tabell 2*.

Tabell 2. Tabell över isolaten från de tre utvalda patienterna. Här visas vilka datum proverna är tagna, vilken ålder patienten hade då samt vilken sorts ESBL-bärande mikroorganism som fanns i provet. Proverna som är grönmärkade har laborerats på under studiens gång. De isolat som främst studerades var 2, 6, 8, 9, 18, och 24. Isolat 1 och 8 är från utskrivningsprover.

Patient 8			Patient 11			Patient 13		
Mikroorganism	Isolat	Svarsdatum	Mikroorganism	Isolat	Svarsdatum	Mikroorganism	Isolat	Svarsdatum
<i>E. coli</i>	1	2009-04-07	<i>K. pneumoniae</i>	8	2008-12-22	<i>E. coli</i>	-	2009-07-02
<i>E. coli</i>	2	2009-07-14	<i>K. pneumoniae</i>	9	2009-06-30	<i>K. pneumoniae</i>	-	2009-07-02
<i>K. pneumoniae</i>	-	2009-07-14	<i>K. pneumoniae</i>	10	2009-09-01	<i>E. coli</i>	18	2009-09-04
<i>E. coli</i>	3	2009-09-08	<i>K. pneumoniae</i>	11	2009-11-09	<i>E. coli</i>	19	2009-11-12
<i>E. coli</i>	-	2009-11-19	<i>K. pneumoniae</i>	12	2010-01-14	<i>K. pneumoniae</i>	20	2009-11-12
<i>E. coli</i>	4	2010-01-19	<i>K. pneumoniae</i>	13	2010-03-29	<i>K. pneumoniae</i>	21	2010-09-01
<i>E. coli</i>	5	2010-03-26	<i>K. pneumoniae</i>	14	2010-06-04	<i>C. freundii</i>	22	2010-11-12
<i>K. pneumoniae</i>	6	2010-04-23	<i>K. pneumoniae</i>	15	2010-08-23	<i>E. coli</i>	23	2010-11-12
<i>E. coli</i>	7	2011-02-15	<i>K. pneumoniae</i>	16	2010-10-19	<i>K. pneumoniae</i>	24	2010-11-12
			<i>K. pneumoniae</i>	17	2011-02-21	<i>E. coli</i>	25	2014-09-02
						<i>E. coli</i>	-	2014-09-17
						<i>E. coli</i>	-	2014-10-02

Patient 8 föddes för tidigt och var 54 dagar gammal vid första positiva ESBL-odlingen. Patienten vårdades initialt i respirator och behandlades med antibiotika. Tolv månader efter utskrivningen avled patienten till följd av svår lungsjukdom samt hjärtsvikt. Patient 11 föddes för tidigt genom kejsarsnitt och testades positivt för ESBL vid fyra dagars ålder. Denna patient vårdades 20 dagar komplikationsfritt på sjukhus utan varken antibiotikabehandling eller andningsstöd. Patient 13 föddes efter fullgången graviditet och lades in på neonatalavdelningen på grund av matningssvårigheter. Vid 32 dagars ålder testades patienten positivt för ESBL och behandlades inte med antibiotika. Denna information är given via mailkorrespondens med Viveka Nordberg.

Från Karolinska Institutet erhöles totalt 25 olika isolat från de tre utvalda patienterna. Planen var att utifrån dessa isolat välja det första och sista tagna proverna från varje patient. Detta för att med så få isolat som möjligt försöka följa plasmidernas utveckling under tiden studien pågick. På detta vis skulle det bli möjligt att se ifall det var samma plasmid från början till slut eller om exempelvis en ny plasmid bärande på resistensgenen hittats hos patienten. De isolat som slutligen valdes utifrån att de var mest intressanta för projektet var isolat 2, 6, 9, 8, 18, och 24. Ytterligare några isolat studerades med motiveringen att även dessa var av intresse, exempelvis ett isolat med plasmider från *C. freundii* och ett annat isolat där provtagningen skedde fyra år efter utskrivningen. Dessa ytterligare isolat var 1, 7, 22, 23, och 25. Efter att alla laborationer var genomförda framkom det att ett missförstånd har skett vid kommunikation med Karolinska Universitetssjukhuset gällande svarsdatum för några isolat. Se mer i *Avsnitt 5*.

3.2. Tillverkning av nanofluidchip och deras uppbyggnad

Nanofluidchippet som användes i projektet tillverkades av Doktor Joachim Fritzsche, forskningsingenjör på institutionen för Fysik på Chalmers Tekniska Högskola. Chippen tillverkades från kiselplattor som fått ett 2 μm tjockt lager av kiseldioxid på båda sidorna genom en teknik som kallas termisk oxidation. För att göra nanokanalerna lades ett lager av krom över plattan. Kromlagret täckte hela plattan förutom där de 250 nanokanalerna skulle etsas fram. Etsningen skedde genom tillsättning av fluoridjoner som reagerade med kiseldioxiden, en metod som kallas reaktiv jonetsning (RIE, från engelskans Reactive-Ion Etching). De bildade nanokanalerna var 500 μm långa, 100 nm djupa och 150 nm breda. Mikrokanalerna gjordes sedan på liknande sätt och överlappade nanokanalerna med 5 μm på vardera änden, varefter nanokanalernas slutliga längd blev 490 μm . Brunnarna tillverkades med en metod kallad Bosch-process, en version av djup reaktiv jonetsning (DRIE). För att försluta chippen på kiselplattan användes pyrex-glas. Glaset sattes fast på ovansidan av kiselplattan med hjälp av fusionsbindning vilket innebar att ytorna först fastnade vid varandra genom reaktioner som kräver vatten. Därefter värmdes plattan för att öka bindingsstyrkan och delades sedan upp i individuella chip. I *Figur 3* under *Avsnitt 2.6.1* visualiseras chippens uppbyggnad sett uppifrån.

3.3. Experiment

Inför det här projektet har Kabir Humaun Muhammed, doktorand på avdelningen för klinisk mikrobiologi på Karolinska Institutet i Solna, extraherat plasmiderna från de odlade cellkulturerna, enligt protokollet *Plasmid DNA purification (NucleoBond Xtra Midi)* från Techtum [60]. Metoden bygger på alkalisk lysering, som beskrevs i *Avsnitt 2.2.2*.

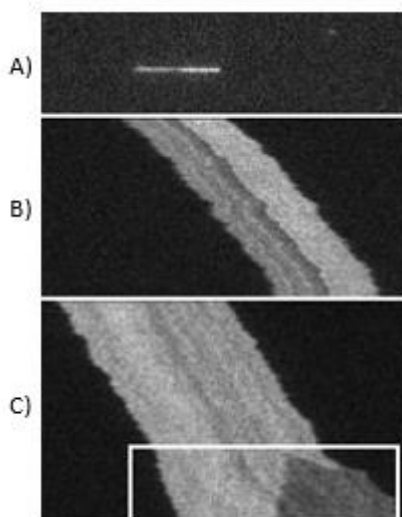
Plasmidprovernas koncentrationer mättes med Qubit-kit och låg mellan 8 μM och 230 μM . Proverna preparerades med YOYO-1, netropsin och λ -DNA i Tris-Borat-EDTA (TBE). λ -DNA användes som referensmolekyl då dess längd, 48 502 baspar [61], är känd och gör det möjligt att konvertera plasmidlängderna till antalet baspar från de erhållna pixlarna. TBE användes som buffert, bland annat eftersom EDTA binder till sig magnesiumjoner och på så sätt inaktiverar nukleaser [62]. Proverna preparerades till en koncentration av 10 μM plasmid-DNA, 10 μM λ -DNA, 4 μM YOYO-1 och 600 μM netropsin i 5x TBE till en volym av 10 μL . Ifall den ursprungliga plasmidkoncentrationen var under 10 μM blandades istället provet i 0,5x TBE. Proverna värmdes i 50 °C i 30 minuter och kunde därefter förvaras i 4 °C. Inför laboration späddes DNA-proverna med 970 μL MQ-vatten och 20 μL β -Mercaptoetanol (BME) om de blandats i 5x TBE, och med 88 μL MQ-vatten och 2 μL BME ifall de blandats i 0,5x TBE. BME är ett reduktionsmedel som behövdes för att minska mängden syreradikaler som uppkommer vid belysning av YOYO-1 [63]. Utan BME skulle DNA-molekylerna fragmenteras.

När plasmider belyses klyvs de slumpmässigt längs sekvensen. För att styra vid vilken sekvens klyvning sker genomfördes även experiment där CRISPR-Cas9 användes. Detta i syfte att identifiera plasmider som bär på ESBL-genen. Dessa prover bereddes något annorlunda än beskrivet i föregående stycke. Provberedningen liknade det tillvägagångssätt som beskrivs av McCaffrey, Sibert, Zhang, Zhang, Hu, Riethman et. al. [64]. Skillnaden var att det i den nämnda artikeln gjordes ett enkelsträngt brott där fluoroforer band in medan det i detta projekt gjordes ett dubbelsträngt brott. Det dubbelsträngade brottet gjordes i början av provberedningen på plasmider innehållande den eftersökta gengruppen, CTX-M-1, genom att guide-RNA:t var konstruerat till att vara komplementärt mot en del av genens sekvens. YOYO-1, netropsin, BME, λ -DNA, och TBE användes på samma sätt som vid fluorescensklyvning med skillnaden att koncentrationen av YOYO-1 var 10 μ M istället för 4 μ M. Anledningen till att koncentrationen ökades var för att YOYO-1 binder till det RNA [65] som tillsattes vid CRISPR-Cas9-beredningen.

De mikro- och nanokanaler som skulle användas spolades inför varje experiment med en lösning av 2 % BME och 98 % 0,05x TBE i en timma. Detta för att skölja igenom och fylla upp kanalerna med en vätska med samma saltkoncentration som plasmidprovet. Därefter tillsattes det aktuella provet till en av brunnarna och flödade in i mikrokanalen genom att ett kvävgasträck applicerades på den brunn där provet fanns. I mikrokanalen kunde cirkulära plasmider lokaliseras när de belystes med fluorescenslampan. När CRISPR-Cas9-beredning gjorts lokaliserades linjära plasmider, istället för cirkulära, eftersom dessa redan hade blivit klyvda under provberedningen. En lokaliserad plasmid spolades in i en nanokanal genom att kvävgasträck applicerades från båda hållen i mikrokanalen. Händelseförloppet studerades med ett Zeiss AxioObserver.ZI epi-fluorescensmikroskop som var utrustat med ett FITC-filter, en halogenlampa och en Mercury Short Arc HBO® lampa. Ibland fungerade inte inspolningen av plasmiderna och då togs provet upp ur brunnen igen och klorin tillsattes. Klorinet fick spola igenom kanalerna i 15 minuter varefter chippet spolades med 2 % BME och 98 % 0,05x TBE i 45-60 minuter. Provet laddades sedan i en brunn igen och studien av isolatet påbörjades på nytt.

När en plasmid nått nanokanalen sträcktes den ut och filmades med en Photometrics Evolve EMCCD-kamera (från engelskans Electron Multiplying Charge Coupled Device). För varje film togs 200 bilder med exponeringstiden 100 ms. Plasmiden filmades först i sin cirkulära form varefter den exponerades för ljus tills det uppkom ett dubbelsträngt brott. Plasmiden blev då linjär och filmades ytterligare en gång. Varje λ -DNA-molekyl filmades en gång. När CRISPR-Cas9-beredning gjorts filmades även dessa plasmider en gång, då de redan var linjära när de nådde nanokanalen. Filmer på plasmiderna i sin cirkulära form användes för längdbestämmning medan filmer på de linjäriserade plasmiderna användes för att få fram sekvensspecifika streckkoder.

I *Figur 7A* illustreras en λ -DNA-molekyl i en nanokanal. *Figur 7B* visar när 200 bilder av en molekyl staplats på varandra, bildande så kallade kymografer. Dessa beskrivs mer i *Avsnitt 3.4*. Då λ -DNA infärgat med YOYO-1 och netropsin är tydligt mörkt på ena halvan och ljust på andra var det möjligt att särskilja λ -DNA från exempelvis trasiga plasmider. Detta karakteristiska mönster syntes ännu tydligare under dataanalysen när kymografer bildats, se *Figur 7A-B*. *Figur 7C* visualiserar skedet då en cirkulär plasmid går sönder och börjar linjäriseras under slutet av filmningen, vilket syns inom den vita rutan.



Figur 7.

A) Bild av λ -DNA taget med EMCCD-kameran. Molekylen är 67 pixlar, vilket motsvarar 10,67 μm .

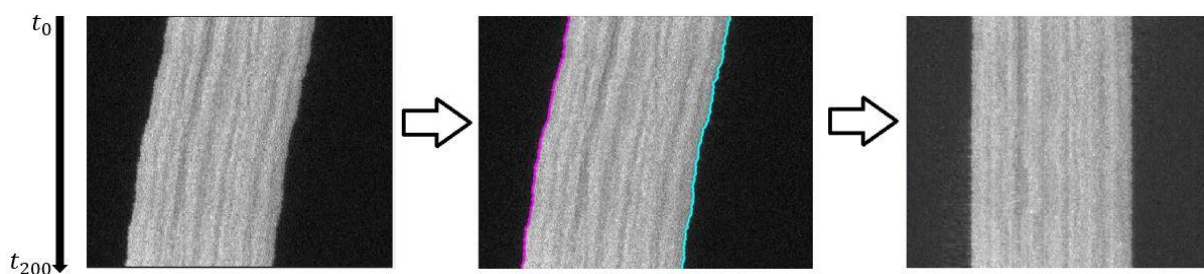
B) En kymograf av en λ -DNA-molekyl, mer om dessa beskrivs i *Avsnitt 3.4*.

C) Ytterligare en kymograf som visar att de cirkulära plasmiderna kan lysas sönder och veckla ut sig till den linjära formen av plasmiden. Innanför den vita rutan har plasmiden klyvts och börjat vecklas ut.

3.4. Dataanalys

Ett färdigskrivet program i MATLAB användes för att analysera de filmer som togs fram under laborationerna. Programmet är framtaget och specialskrivet för metoden, utvecklat av professor Tobias Ambjörnssons grupp vid Institutionen för Astronomi och Teoretisk Fysik vid Lunds Universitet. Analysen genomfördes i flera steg och på olika sätt beroende på om DNA-molekylerna är linjära plasmider, cirkulära plasmider eller λ -DNA. I slutskedet av analysen erhöles både längder för plasmiderna och streckkoder som möjliggör jämförelse av plasmiderna inom och mellan isolat.

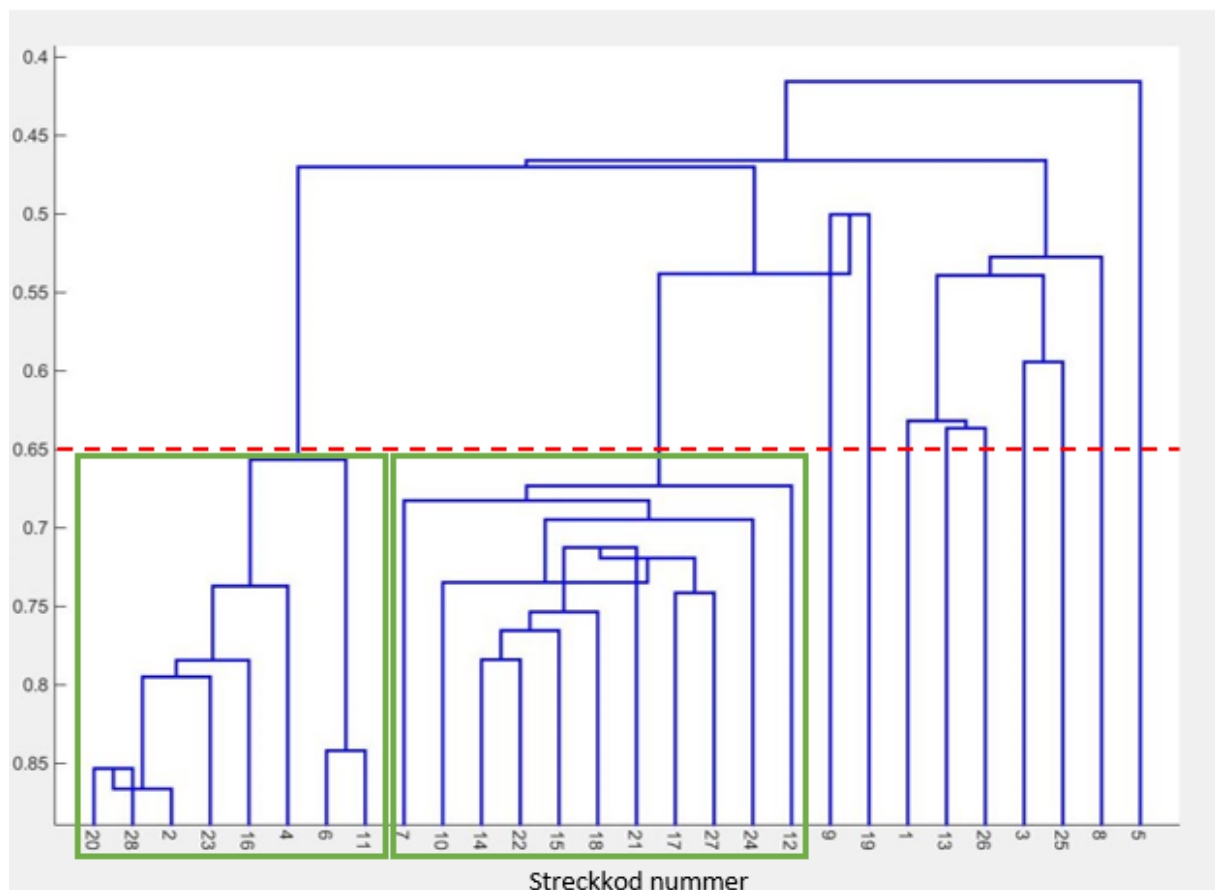
Det första steget innefattar att programmet detekterar var DNA-molekylen finns i varje film. Utifrån detektionen skapar programmet en kymograf genom att stapla de 200 bilderna ovanpå varandra, se *Figur 8*. Det andra steget utgörs av storleksbestämning för λ - och cirkulärt DNA. Anledningen till att plasmidstorlekar hämtas från de cirkulära DNA-molekylerna är att emissionen från de cirkulära är starkare och att de fluktuerar mindre i nanokanalerna än de linjära DNA-molekylerna. På så sätt erhålls mer exakt längddata då programmet lättare kan detektera molekylens kanter. Längderna för alla cirkulära plasmiderna och λ -DNA-molekyler sammanställs sedan och storleken hos de cirkulära plasmiderna konverteras från pixlar till kilobaspar med hjälp av λ -DNA som referens.



Figur 8. 200 bilder filmas med EMCCD-kameran och staplas ovanpå varandra vilket bildar en kymograf, där första bilden (t_0) placeras högst upp och sista bilden (t_{200}) längst ner (vänster). Ett färdigskrivet MATLAB-program detekterar sedan kanterna genom att leta efter ett visst antal ljusa pixlar i rad. Kanterna markeras med turkost och cerise (mitten). För de linjära DNA-molekylerna sker sedan även en justering där liknande partier läggs under varandra och kymografen rätas på så vis upp (höger).

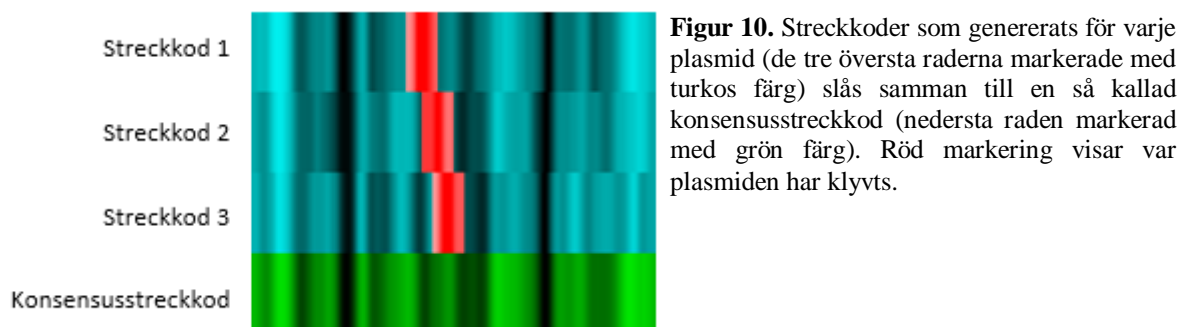
Efter att längderna bestämts och sammanställts skapas streckkoder utifrån linjärt DNA. Om molekylerna i kymograferna driver blir molekylernas kanter skeva och därför rätas kymograferna ut, vilket visualiserades i *Figur 8*. Målet är att alla ljusa respektive mörka partier ska placeras under varandra. Därefter genereras en streckkod för den filmade plasmiden genom att emissionsintensitet mäts längs molekylens utsträckning som tidigare visats i *Figur 6* i *Avsnitt 2.6.1*.

Varje streckkod representerar en linjäriserad plasmid och för att jämföra dem genereras så kallade dendrogram, se *Figur 9*. Dessa dendrogram, vars uppbyggnad liknar släkträd, bygger på korskorrelation vilket är ett mått på hur lika två plasmider är. Korskorrelationen gjordes eftersom plasmiderna kunde ha gått sönder var som helst i sekvensen och den bästa passningen mellan plasmiderna eftersöktes.



Figur 9. Dendrogrammet visar hur lika plasmidernas streckkoder är. I detta dendrogram jämförs plasmiderna i isolat 6. Likheten undersöks genom att jämföra plasmidernas individuella streckkoder med varandra. Ett högt värde (större än 0,65 som markerats med röd, streckad linje) på y-axeln indikerar att plasmiderna liknar varandra. Grupperingar bildas mellan de plasmider som är mest lika varandra; i bilden är två sådana grupperingar markerade med gröna rektanglar.

Med dendrogrammet som bas valdes de streckkoder som var tillräckligt lika för att klassas som samma sorts plasmid genom att titta på grupperingarna som bildats. En gräns bestämdes till 0,65 och ett värde över detta innebar att streckkoderna var tillräckligt lika. Denna gräns gav ett tillräckligt starkt statistiskt underlag. Undantag gjordes och en lägre gräns sattes för plasmider över 230 kbp. Till skillnad från kortare plasmider, är det låg sannolikhet för längre plasmider att överensstämmelsen är slumpmässig. Detta då längre plasmider innehåller fler kvävebaser som behöver överensstämma med varandra. De utvalda streckkoderna slogs sedan samman till en gemensam streckkod, en så kallad konsensusstreckkod, se *Figur 10*.



Figur 10. Streckkoder som genererats för varje plasmid (de tre översta raderna markerade med turkos färg) slås samman till en så kallad konsensusstreckkod (nedersta raden markerad med grön färg). Röd markering visar var plasmiden har klyvts.

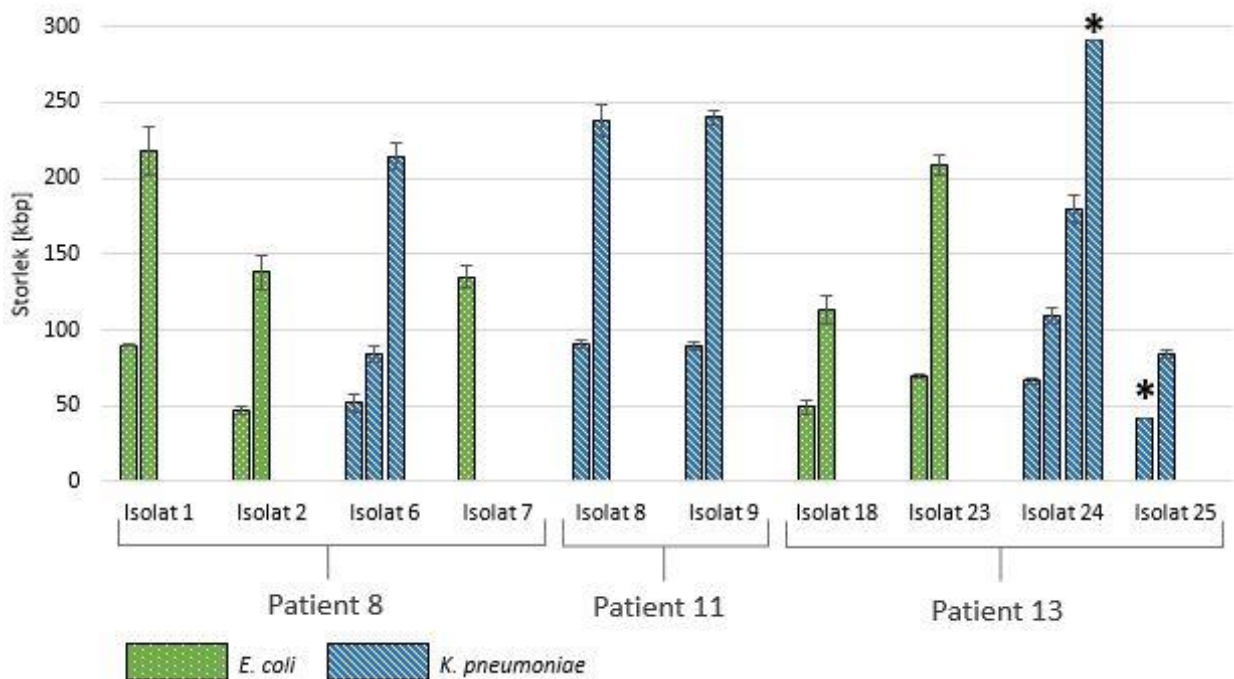
Det sista steget innefattade att jämföra konsensusstreckkoderna med varandra och involverade jämförelse mellan de olika isolaten, men även patienterna. Som tidigare beskrevs så kan bättre korskorrelation erhållas av slump ju kortare streckkod en plasmid har. Därför beräknades ett p-värde för att kunna fastställa om plasmiderna var lika eller inte. P-värdet tar hänsyn till plasmidernas längd och ett högt värde för korskorrelationen ger generellt ett lågt p-värde. I studien sattes gränsen för p-värdet till 0,01, vilket innebar att alla isolat som fått ett p-värde under 0,01 kunde anses vara lika förutsatt att genererade intensitetskurvor följde varandra. Initialt gjordes en jämförelse där streckkoderna sträcktes till en genomsnittlig längd av 100 kbp för att få en ungefärlig uppskattning av likheter. Jämförelsen resulterade i ett rutnät där de olika p-värdena visualiserades med olika färger, se *Figur 18* i *Appendix A*. De jämförelser som erhållit ett p-värde nära noll analyserades vidare. Analysen gick ut på att parvis jämföra streckkoder där de sträcktes till de två plasmidernas medellängd, förutsatt att längdskillnaden inte översteg 20 %, se *Tabell 3* i *Appendix A*. En avslutande parvis jämförelse gjordes där streckkoderna sattes till sin individuella längd för att undersöka om samma sekvens kunde identifieras trots olika plasmidlängder. Liksom tidigare resulterade jämförelsen i ett rutnät med olika p-värden. Om p-värdet var under 0,01 tydde detta på att plasmiden förlorat eller tagit upp DNA-sekvenser.

4. Resultat

Detta avsnitt inleds med att de identifierade plasmidstorlekarna presenteras. Därefter redogörs för den jämförande analysen av de linjära konsensusstreckkoderna i form av grafer för att illustrera likheter och skillnader mellan plasmiderna. Slutligen visas resultatet från försöken då optisk DNA-kartläggning använts med CRISPR-Cas9-provberedning för att identifiera ESBL-genen.

4.1. Plasmidstorlekar

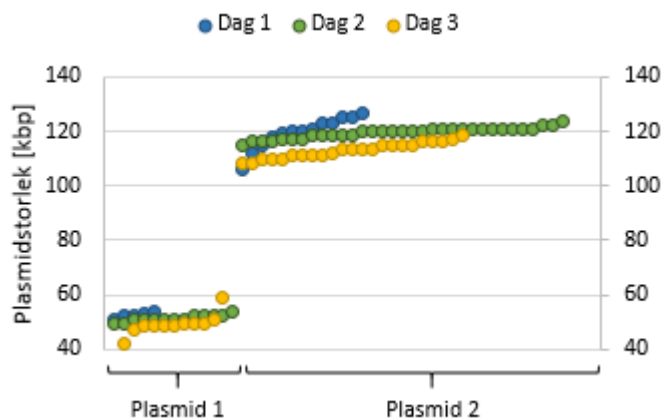
Totalt tio isolat från de tre utvalda patienterna undersöktes och i *Figur 11* presenteras plasmidstorlekarna i kilobaspar (kbp) med tillhörande standardavvikelse. * representerar plasmidstorlek baserad på färre än tre molekyler. Värden för storlekarna med tillhörande standardavvikelse presenteras i *Tabell 4* i *Appendix B*.



Figur 11. Histogram över de observerade plasmidstorlekarna med tillhörande standardavvikelse. * representerar plasmidstorlek baserad på mindre än tre molekyler.

Som kan urskiljas i histogrammet i *Figur 11* förekom liknande plasmidstorlekar. I isolat 2, 6, 18 och 25 förekom plasmider av storleksordning kring 50 kbp. En annan plasmid, av storleksordning kring 90 kbp återfanns i hälften av de studerade isolaten; isolat 1, 6, 8, 9 och 25. Det förekom även större plasmider med storlek över 200 kbp i isolat 1, 6, 8, 9, 23 och 24.

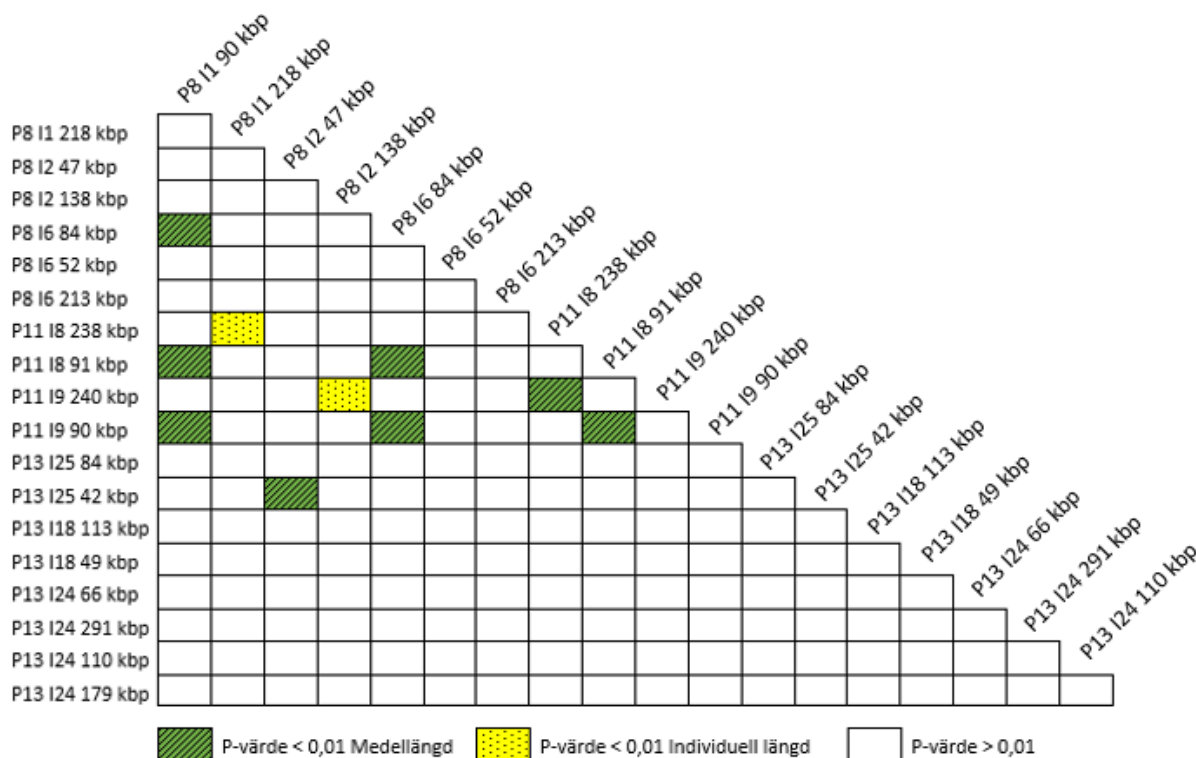
För att undersöka metodens reproducerbarhet analyserades plasmidstorlekarna i ett isolat vid tre skilda experimenttillfällen. Isolat 18 valdes för detta och resultatet visas i ett punktdiagram i *Figur 12*. Diagrammet visar tydligt att det för alla laborationstillfällen förekommer plasmider av samma storlekar. Data för plasmidstorlek 1 från dag 1 skiljer 5 % från det framtagna medelvärde för samtliga dagar, motsvarande siffror för dag 2 och 3 är 7 % respektive 1 %. För plasmidstorlek 2 blir istället avvikelserna 5 % för dag 1 och 2 samt 0 % för dag 3.



Figur 12. Plasmidstorlekar som uppmätts från tre skilda laborationsdagar vid undersökning av isolat 18 där varje punkt motsvarar en plasmid. Plasmiderna är längdsorterade. I diagrammet kan två skilda plasmidstorlekar urskiljas, en runt 50 kbp och en runt 120 kbp. Medelvärdet för värdena spridda kring isolatstorlekarna har sedan använts som slutgiltig storlek, 49 respektive 113 kbp.

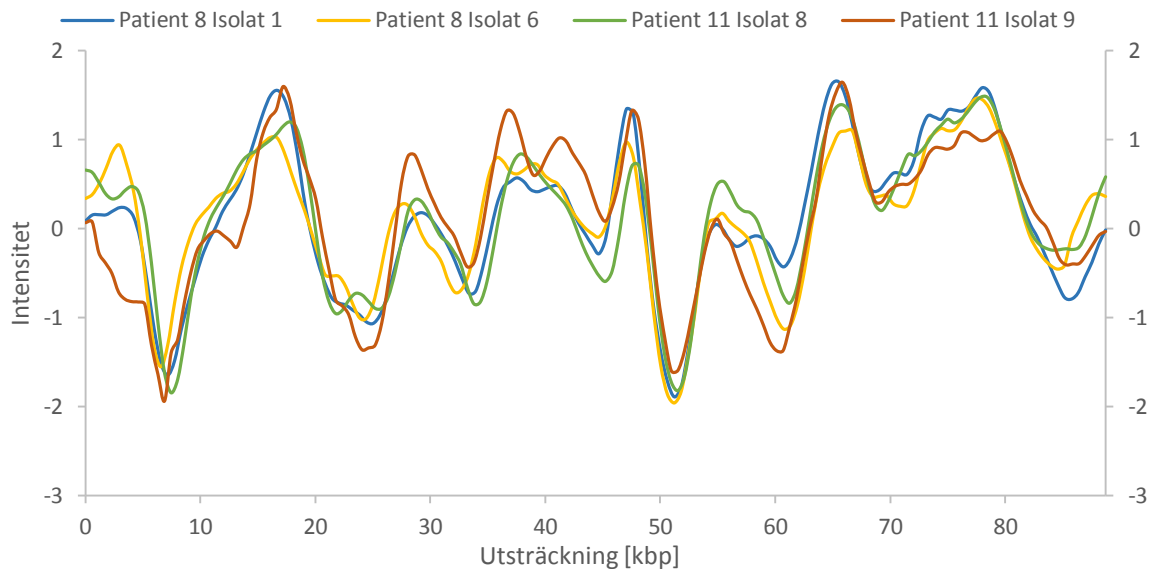
4.2. Jämförelse mellan konsensusstreckkoder

Jämförelser genomfördes enligt beskrivning i *Avsnitt 3.4*. Isolat 7 och 23 saknade tillräckligt med data för att generera linjära kymografer. Plasmider som vid första jämförelsen erhållit ett p-värde under 0,01 och som hade en maximal längdskillnad på 20 % vid parvis jämförelse markerades med en grön ruta, se *Figur 13*. Andra jämförelsen gjordes för att klargöra om streckkoderna hade överstämmande sekvenser, men olika plasmidlängder. Ytterligare plasmider erhöll då ett p-värde under 0,01 och markerades med en gul ruta. Övriga, som inte uppfyllt p-värdets gräns i något av de två testen, markerades med vit ruta. En utökad illustration av *Figur 13* med samtliga p-värden finns i *Appendix C, Figur 19* och *20*.



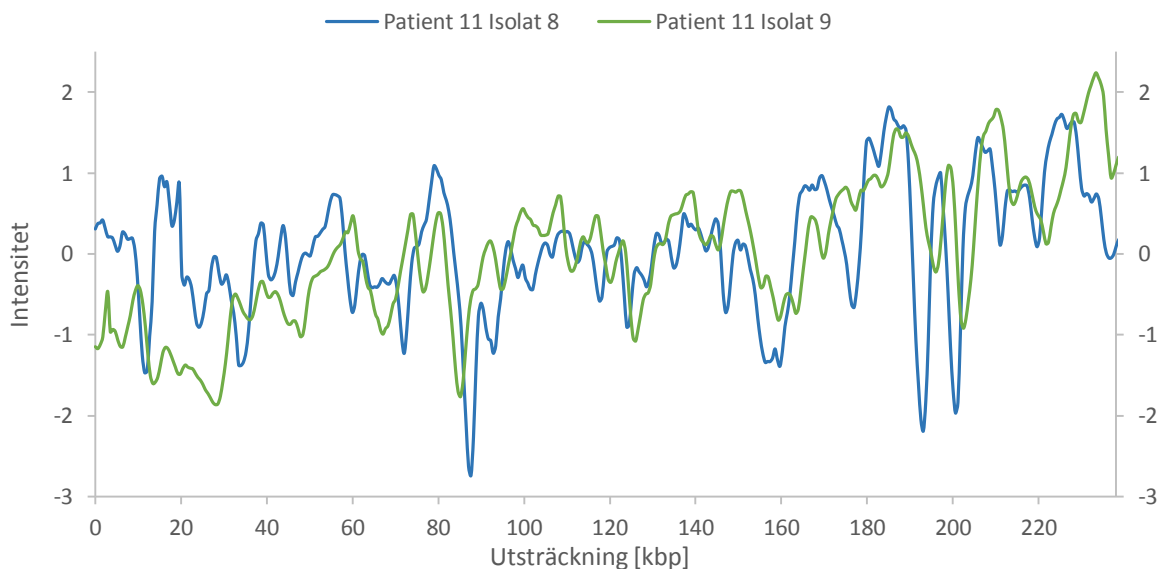
Figur 13. Jämförelse av konsensusstreckkoder från respektive isolat och plasmid. P kännetecknar patientnummer, och I isolatnummer, som åtföljs av den ungefärliga plasmidstorleken. Gröna rutor markerar parvis jämförelse av isolat som sträckts till de två plasmidernas medellängd och erhållit ett p-värde mindre än 0,01. Gula rutor markerar parvis jämförelse av isolat som sträckts till individuella plasmidstorlekar och erhållit ett p-värde mindre än 0,01. Vita rutor markerar övriga.

De isolat som uppfyllt kraven för ett p-värde under 0,01 plottades med emissionsintensitet på y-axeln och utsträckning på x-axeln. De plasmider som i isolat 1, 6, 8, och 9 överensstämmer väl storleksmässigt och erhållit en grön ruta vid jämförelse presenteras i *Figur 14*. Som kan ses i figuren åtföljs plasmidernas emissionsintensitet väl. De fyra plasmidernas parvisa jämförelse presenteras grafiskt i *Figur 21-26* i *Appendix D*.



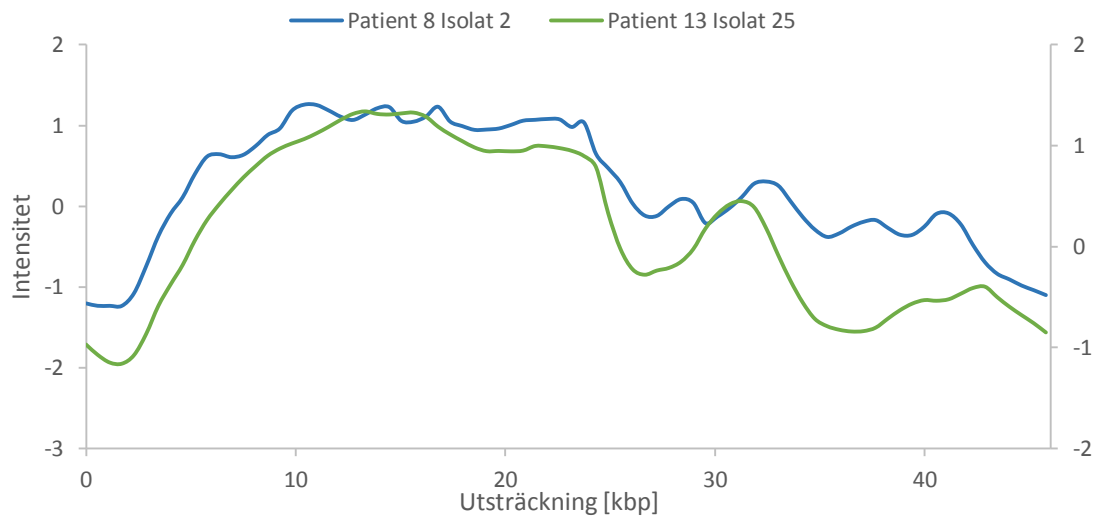
Figur 14. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 1 (90 kbp), 6 (84 kbp), 8 (91 kbp) och 9 (90 kbp) från patient 8 och 11. Samtliga erhöj ett p-värde under 0,01 vid parvis jämförelse och sträckning till medellängden (gröna jämförelser i *Figur 13*). Plasmiderna har sträckts till medellängden av de fyra isolaten (89 kbp).

Även de längre plasmiderna i isolat 8 (238 kbp) och 9 (240 kbp) uppnådde gränsen för p-värdet då de sträcktes till sin medellängd och de erhöj således en grön ruta. Dessa plottas i *Figur 15* där även plasmidernas likhet framgår genom grafernas åtföljande.



Figur 15. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 8 (238 kbp) och 9 (240 kbp) från patient 11. Plasmiderna erhöj ett p-värde under 0,01 vid jämförelse då de sträcktes till deras medellängd (239 kbp), det vill säga erhöj en grön ruta i *Figur 13*.

Den tredje medellängdsjämförelsen som erhållit en grön ruta i *Figur 13* var de minsta plasmiderna i isolat 2 (47 kbp) respektive isolat 25 (42 kbp). Intensitet mot plasmidstorlek för dessa visas i *Figur 16*. Här kan det ses att emissionsintensiteten på det stora hela är densamma för de båda plasmiderna.

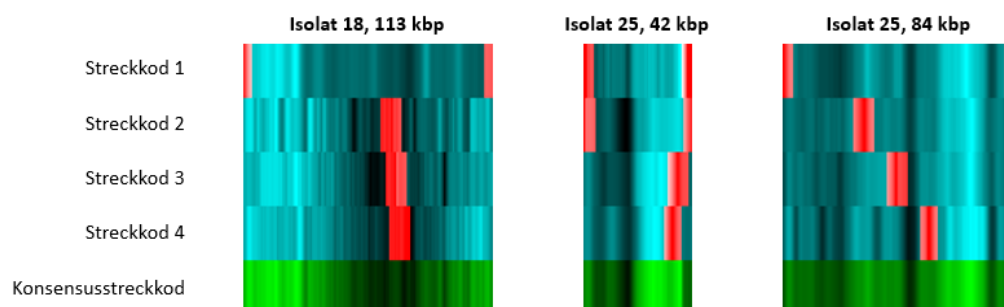


Figur 16. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 2 (47 kbp) och isolat 25 (42 kbp) från patient 8 respektive 13 som sträckts till medellängden för de två (44 kbp).

Grafer för de plasmider som vid parvis jämförelse markerades med gul ruta i *Figur 13*, det vill säga som tyder på överensstämmande sekvenser men olika plasmidlängder, presenteras i *Figur 27-28* i *Appendix E*.

4.3. Identifiering av ESBL-genen med CRISPR-Cas9

Optisk DNA-kartläggning med CRISPR-Cas9-provberedning testades på isolat 18, 24, och 25 för att se om det var möjligt att identifiera ESBL-gengruppen CTX-M-1 i någon plasmid. Isolat 24 gav inga analyserbara resultat då provet var för mörkt. De linjära plasmiderna i isolat 18 och 25 längdsorterades och där det fanns flertalet fragment av samma längd genererades en konsensusstreckkod. Det resulterade i en konsensusstreckkod för isolat 18 med en ungefärlig längd av 113 kbp och två längder för isolat 25 på ungefär 42 kbp respektive 84 kbp. Dessa konsensusstreckkoder visualiseras i *Figur 17*. De röda partierna visar var plasmiderna blev uppklippta under linjäriseringen, i dessa fall på olika ställen i sekvensen.



Figur 17. Generering av konsensusstreckkoder för isolat 18 (113 kbp) och isolat 25 (42 kbp och 84 kbp) behandlat med CRISPR-Cas9. De fyra övre raderna motsvarar streckkoder från filmade plasmider och den understa gröna raden visar konsensusstreckkoden. Markerat med rött är de områden där de filmade plasmiderna blev uppklippta när de linjäriserades.

5. Diskussion

Här diskuteras projektets resultat, både kopplat till huvudsyftet att undersöka antibiotika-resistensutbrottet på Karolinska Universitetssjukhuset men även till delsyftet att utvärdera metoden optisk DNA-kartläggning. De detekterade plasmidernas likhet diskuteras, både med avseende på storlek och streckkod. Optisk DNA-kartläggning utvärderas och jämförs med andra metoder för plasmididentifiering. Möjligheten att utveckla metoden genom att använda gendetektion med CRISPR-Cas9 diskuteras. Avslutningsvis tas projektets felkällor upp.

5.1. Utvärdering av resultat från storleksmätning

Resultatet från storleksmätningen av plasmiderna som redovisats i *Figur 11* visar liknande plasmidstorlekar i flera isolat. De liknande plasmiderna återfanns i flera fall i olika patienter och i både *E. coli* och *K. pneumoniae*, vilket indikerar att plasmidförflyttning har skett både mellan patienter och mellan arter. Ett exempel på en plasmidstorlek som förekommer i hälften av de studerade isolaten, 1, 6, 8, 9 och 25, är av ungefärliga storleken 88 kbp. Storleksmätningarna visar dock inte att någon specifik plasmidstorlek förekom i alla isolat. Information om plasmidstorlekar ger endast en svag indikation på vilka plasmider som är samma. Det liknar informationen som kan fås ur den tidigare nämnda metoden PFGE. En mer noggrann analys av plasmidernas likhet fås ur konsensusstreckkoderna, se *Avsnitt 5.2* nedan.

5.2. Utvärdering av resultat vid jämförelse av streckkoder

Efter analys av de genererade konsensusstreckkoderna kunde flera av de plasmider som i *Figur 11* visat på samma storleksordning anses vara olika. De gröna rutorna i *Figur 13* visade hur åtta parvisa jämförelser gav att de jämförda plasmiderna var samma, eftersom de var av liknande storlek och erhöll ett p-värde under den satta gränsen 0,01.

Streckkodsjämförelser mellan isolat 1, 6, 8, 9 och 25, som hade en plasmid med liknande storlek, visade att isolat 1, 6, 8 och 9 från patient 8 och 11 överensstämde. Detta stärktes av hur väl intensitetskurvorna åtföljdes i *Figur 14*. Jämförelser av isolat 25 med de andra gav inte p-värden under gränsen och plasmiden antogs således inte vara samma. Tre av de fyra överensstämmande plasmiderna härstammade från *K. pneumoniae* och en från *E. coli*. Det indikerade att den studerade plasmiden har förflyttats mellan bakteriearterna, men även mellan patienter.

Av plasmiderna med storlekar över 200 kbp visade plasmiderna i isolat 8 och 9 från patient 11 på tydliga likheter, se *Figur 15*. Även då likheterna var tydliga kunde det observeras att kurvornas toppar och dalar inte följde varandra lika väl som kurvorna i *Figur 14*. Variationerna i kurvorna skulle kunna relateras till att streckkoderna hade ett korskorrelationsvärde lägre än den godkända gränsen 0,65 i dendrogrammet när konsensusstreckkoder skapades för varje plasmid i respektive isolat. Anledning till att en lägre korskorrelationsgräns accepterades för de längre plasmiderna beskrevs i *Avsnitt 3.4*. Streckkodsjämförelser gav ändå ett p-värde under gränsen och det antogs att plasmiderna var samma. Dessa plasmider härstammade från samma bakterieart, *K. pneumoniae*, och isolaten skiljdes åt med sex månader.

Av de mindre plasmider med en storlek under 60 kbp som kunnat identifieras i patient 11 och 13 indikerade *Figur 13* att plasmiderna i isolat 2 och 25 var samma då de hade ett p-värde under gränsen. Vid närmare analys av *Figur 16* kunde en tydlig likhet urskiljas. Plasmiden härstammade från *E. coli* i patient 8 respektive *K. pneumoniae* i patient 13. Anmärkningsvärt var att plasmiden inte dök upp hos patient 13 förrän fem år efter utskrivning. Sannolikt innebär detta att plasmiden inte hade förts över mellan patienterna under sjukhusvistelsen utan erhållits från en annan källa.

De plasmider som vid parvis jämförelse erhöll en gul ruta i *Figur 13* fanns i isolat 1 och 8 respektive 2 och 9. Den gula rutan indikerade att plasmiderna var av olika storlek men hade överensstämmande sekvenser. Vid närmare analys av *Figur 28* i *Appendix E* kunde det urskiljas att plasmiderna i isolat 2 och 9 med stor sannolikhet inte var samma då kurvorna inte följdes åt. Dessutom är längdskillnaden stor, ca 100 kbp. Mer sannolikt var det att plasmiderna i isolat 1 och 8 härstammade från samma källa då deras kurvor åtföljdes väl i *Figur 27* i *Appendix E*. Även plasmidernas storlekar var mer överensstämmande och åtskildes med 20 kbp. Plasmiderna i isolat 1 och 8 kommer från olika patienter och olika bakteriearter vilket kan antyda att överföring mellan arter och patienter varit möjlig, men att plasmiderna tagit upp eller förlorat DNA-sekvenser längs vägen.

Med tidsskillnaden mellan provtagningarna i beaktning kan det observeras att plasmiden som återfanns i isolat 1 och 6 från patient 8 var samma trots att ett år skiljde mellan provtagningarna. Liknande observation kunde göras för isolat 8 och 9 från patient 11 där provtagningarna skiljdes åt med sex månader. Det påvisar att plasmiderna funnits kvar i patienterna över tid. Som tidigare nämnt behåller bakterier plasmider som är gynnsamma i en viss miljö över tid vilket innebär att plasmiderna som hittats i isolat 1, 6, 8 och 9 troligtvis har varit till bakteriens fördel på något sätt. Det behöver dock inte betyda att denna fördelaktiga egenskap är just antibiotikaresistens.

Att plasmiden på ungefär 88 kbp återfanns i både patient 8 och 11 antyder att detta skulle kunna vara den ESBL-genbärande plasmiden som orsakade utbrottet på Karolinska Universitetssjukhuset. Dock återfanns inte plasmiden i patient 13. Om det var den plasmiden som bar på ESBL-gener har plasmiden antingen inte kunnat detekteras under projektet i patient 13 eller så hade patienten smittats av en annan ESBL-genbärande plasmid. För att säkerställa plasmidens frånvaro i patient 13 krävs mer mätningar på isolat från denna patient.

5.3. Utvärdering av optisk DNA-kartläggning

I projektet användes optisk DNA-kartläggning för att undersöka spridning av plasmidburen antibiotikaresistens mellan patienter och bakteriearter. I föregående avsnitt påvisades det att spridning skett mellan åtminstone två patienter och olika bakteriearter. Detta innebär att metoden anses vara lämplig för plasmididentifiering. Metoden kan dock förbättras då en del experimentella svårigheter uppkom, vilka diskuteras i *Avsnitt 5.3.3*.

De resultat som erhöles vid optimala förhållanden, då plasmiderna kunde studeras obehindrat, ansågs vara pålitliga. Detta baserades på metodens reproducerbarhet vilken illustrerats i *Figur 12*. I figuren visades hur lika plasmidstorlekar från tre skilda laborationstillfällen var. De observerade storleksvariationerna ansågs vara försumbara då de maximalt var 7 %. Reproducerbarheten styrktes även av att streckkoder från de olika laborationstillfällena överensstämde väl.

5.3.1. Metodjämförelser

PFGE, PCR-baserad replikontypning och DNA-sekvensering kräver att en stor mängd DNA kopieras upp, vilket är tidskrävande [36][42]. En fördel med optisk DNA-kartläggning är att DNA-amplifiering inte behövs [45] och har därför stor potential att vara en tidseffektiv identifieringsmetod.

PFGE har länge ansetts vara en lämplig metod för molekylstorleksbestämning. Metodens nackdelar, exempelvis låg reproducerbarhet, medför dock att metoden anses vara opålitlig [37]. Eftersom metoden enbart ger information om plasmidstorlek kan den endast ge en svag indikation på plasmidens likhet. PFGE har använts som försteg till andra metoder för att möjliggöra effektivare sekvensering genom att selektera fram intressanta plasmider [37]. Optisk DNA-kartläggning är mer optimal än PFGE som försteg inför sekvensering eftersom det ger mer information än endast plasmidstorlekar och begränsar då ytterligare den mängd DNA som behöver sekvenseras.

Som tidigare nämnts är PCR-baserad replikontypning tidskrävande och utöver det krävs kunskaper om plasmiderna samt deras inc-grupper. Dessutom kan en plasmid innehålla flera replikon vilket medför en osäkerhet i kartläggningen av plasmider. Fördelen med metoden är att information om exempelvis egenskaper som antibiotikaresistens kan identifieras.

I DNA-sekvensering kan fragment av plasmider studeras. En fördel med optisk DNA-kartläggning är att plasmider kan studeras i sin helhet. Eftersom DNA-sekvensering är en dyr metod kan optisk DNA-kartläggning med fördel användas som försteg till sekvensering.

5.3.2. Genidentifiering med CRISPR-Cas9

Användning av CRISPR-Cas9 i kombination med optisk DNA-kartläggning ingår i ett pågående forskningsprojekt i Fredrik Westerlunds grupp på avdelningen för Kemisk Biologi vid Chalmers Tekniska Högskola. Metodutvecklingen syftar till att effektivare kunna identifiera resistensgenbärande plasmider. Eftersom provberedning med CRISPR-Cas9 ger upphov till ett dubbelsträngt brott vid en gen som kodar för ESBL ska plasmider med genen linjäriseras under optimala förhållanden. Således kan de urskiljas från övriga plasmider och det blir tydligare vilken plasmid som bär på antibiotikaresistensgenen. Efterföljande analys av streckkoderna ska sedan visa att alla linjära plasmider är uppklippta på exakt samma position. Det vill säga, de röda linjerna i *Figur 17* ska vara placerade precis i linje med varandra. En vanlig tolkning är att en liten avvikelse ifrån den lodräta linjen skulle visa på en klyvning vid den exakta sekvensen men då en sådan liten avvikelse kan motsvara flera hundra baspar är tolkningen inte korrekt. Det pågående forskningsprojektets resultat tyder på att genidentifiering med CRISPR-Cas9 i kombination med optisk DNA-kartläggning är en fungerande metod.

I det här projektets utförda försök med CRISPR-Cas9 på isolat 18, 24 och 25 identifierades linjära fragment. Dock kunde streckkoder för isolat 24 inte genereras eftersom kymograferna blev för mörka. Troligtvis orsakades detta av bristfällig inbindning av YOYO-1 under provberedningen. För isolat 18 genererades endast ett fåtal streckkoder eftersom plasmiderna inte var stilla i nanokanalerna under tillräckligt lång tid för att kunna filmas. Analys av de genererade streckkoderna för isolat 18 och 25 visade att det inte fanns någon enhetlighet i var plasmiderna blivit kluvna, se *Figur 17*. De ospecifika klyvningarna kunde bland annat bero på att en del plasmider alltid går sönder under preparationerna, speciellt då proverna pipetteras. En annan tänkbar anledning var att BME-koncentrationen var 2 %, precis som vid experimenten med ljusklyvning. Den relativt låga halten BME skulle kunna ha möjliggjort spontan klyvning vid belysning, även ifall delar av ljuset filtrerades bort. Resultaten av plasmidlinjäriseringarna med CRISPR-Cas9 baseras på data från totalt endast två experiment så fler försök behövs för att kunna dra definitiva slutsatser om metodens potential.

5.3.3. Felkällor

Under projektets senare del uppkom information som bland annat medförde att val av isolat att laborera på hade kunnat se annorlunda ut. Projektdeltagarnas uppfattning var att provtagningarna hade skett under tiden patienterna var inskrivna på sjukhus och att utskrivningsproven, som initialt inte var datummärkta, var tagna sist i undersökningen. Det framkom senare att undersökningen gjord av Karolinska Universitetssjukhuset var utförd efter utskrivning av patienterna. Därmed motsvarade isolat 1 och 8 från patient 8 respektive 11 de första provtagningarna, och inte de sista. Detta missförstånd reddes ut i samspråk med Viveka Nordberg efter att alla laborationer genomförts. Feluppfattning har dock inte påverkat huruvida projektets frågeställningar har kunnat besvaras.

Samtliga av de utvalda isolaten, med undantag för isolat 7, 22, 23 och 25, laborerades på mer än en gång, dels för att öka den statistiska säkerheten men också på grund av svårigheter i filmandet. Svårigheterna kunde bero på alltför stabila eller instabila prover, alternativt stopp i nanokanalerna. Ett instabilt prov innebar att plasmiderna föll sönder snabbt då de belystes och därför inte hann filmas. Ett för stabilt prov föll inte sönder inom rimlig tid vilket medförde att linjära plasmider inte kunde filmas. Stopp i nanokanalerna ledde till att ingenting kunde spolats in i dem eller att det som spolats in fastnade. Detta kunde uppkomma antingen då någonting var kvar i kanalerna från tillverkningen av chippen eller då plasmidprovet täppte till kanalerna. Chippen som användes i början av projektet kom alla från samma del av en kiselplatta och de här chippen hade ofta problem med nanokanalerna, ett fel som verkar ha uppstått vid etsningen under tillverkningen. Därför gick experimenten generellt bättre under den senare delen av projektet då nya chip utan defekter användes som tillverkats från en annan del av kiselplattan. Vissa prover hade dock en tendens att ofta fastna i kanalerna, oberoende av vilket chip som användes. Detta berodde troligtvis på att det vid plasmidextraktionen har blivit kvar exempelvis proteiner och polysackarider som enkelt fastnade i kanalerna och täppte igen. Problemet kunde ibland åtgärdas genom att klorin spolades genom kanalerna och därefter sköljdes bort grundligt med en lösning av 2 % BME och 98 % 0,05x TBE. På så sätt kunde samma chip användas igen och experimentet fortsätta. Ifall allt klorin inte lyckades tvättas bort efter sköljningen ledde detta till att plasmiderna inte sträcktes ut tillräckligt i nanokanalerna.

Nämnda problem ledde mestadels till tidsfördröjningar, då det aktuella provet behövde undersökas igen vid ett annat tillfälle. Problemen har dock inte påverkat de slutgiltiga resultaten på annat sätt än att det för vissa prover inte gick att generera någon streckkod på grund av för lite data. Vad som däremot påverkar resultaten och gör att två likadana plasmider inte får exakt likadan streckkod är inbindningen av YOYO-1 och netropsin. YOYO-1 binder över hela DNA-molekylen och kan således även finnas på AT-rika regioner vilket leder till att intensitetstoppar genereras vid dessa regioner som då bedöms vara GC-rika. Inbindningen av YOYO-1 och netropsin till de olika regionerna jämviktas kontinuerligt vilket leder till fluktuationer i intensitet. Under en filmning av plasmider kan mönstret således ändras och många fler bilder än 200 behöver tas för att ge det exakta mönstret. Ett annat exempel på vad som kan ha påverkat resultaten är begränsningar vid dataanalysen. Under dataanalysen måste gränser dras där enskilda plasmider inom samma isolat bedöms vara samma och tillåts generera en gemensam streckkod. Den här gränsen är inte definitiv vilket innebär att antalet inkluderande plasmider varierar och någorlunda olika streckkoder kan genereras.

6. Slutsats

Efter analys av plasmidernas längder fanns flertalet plasmidkandidater som kunde ha orsakat utbrottet. En analys av streckkoderna kunde bekräfta att flera plasmider var samma och därmed överförts både mellan bakteriearter och mellan patienter. En plasmid på ungefär 88 kbp återfanns i två av tre patienter och misstänks vara den plasmid som orsakade utbrottet på Karolinska Universitetssjukhus neonatalavdelning mellan 2008-2009. Att plasmiden inte hittades i den tredje patienten antyder dock att flera utbrott kan ha skett under samma tid. För att säkerställa dessa slutsatser behöver ytterligare experiment utföras.

Optisk DNA-kartläggning anses vara en fungerade och lämplig metod för identifiering av plasmider. Metodens styrka gentemot andra metoder ligger i att en stor mängd information om plasmiderna kan fås fram på kort tid. Metoden har en hög reproducerbarhet men skulle kunna förbättras experimentellt genom bland annat effektivare rengöringsmetoder av nanofluid-chippens kanaler. Förutom att använda optisk DNA-kartläggning till identifiering av plasmider kan den användas till att komplettera andra metoder, till exempel kan den vara ett försteg till DNA-sekvensering.

Genidentifiering med CRISPR-Cas9 som en utveckling av optisk DNA-kartläggning har under projektets gång inte gett förväntade resultat. Resultaten bygger på en mycket liten mängd data och fler experiment behöver utföras för att kunna dra tydliga slutsatser om CRISPR-Cas9 kan förbättra optisk DNA-kartläggning.

Avslutningsvis är det värt att påminnas om att antibiotikaresistens är ett globalt, växande problem som från allmänheten måste ses med största allvar. Förståelse för och informations-spridning av antibiotikaresistensens konsekvenser är avgörande för att problemet ska kunna lösas. Som ytterligare ett led i att bekämpa problemet behövs utveckling av nya samt förbättring av redan existerande identifieringsmetoder.

Referenser

1. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Genève: World Health Organization; 2014.
2. Sköld O. Antibiotics: The Greatest Triumph of Scientific Medicine. I: Sköld O. Antibiotics and Antibiotic Resistance. Hoboken: John Wiley & Sons; 2011. s. 1-2.
3. Laximinarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N et. al. Antibiotic Resistance - The Need for Global Solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013 12;13(12):1057-1098.
4. Antibiotika och antibiotikaresistens [Internet]. Stockholm: Folkhälsomyndigheten; 2016 [uppdaterad 4 mars 2016; citerad 31 mars 2016]. Tillgänglig från: <http://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/smittskydd-och-sjukdomar/antibiotika-och-antibiotikaresistens/>
5. The Review of Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. London: The Review of Antimicrobial Resistance; 2014.
6. Bennet PM. Plasmid Encoded Antibiotic Resistance: Acquisition and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *British Journal of Pharmacology* [Internet]. 2008 03 [citerad 31 mars 2016];153(1):e347-357. Tillgänglig från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268074/>
7. Carattoli A. Plasmids and the Spread of Resistance. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013 08;303(6-7):298-304.
8. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Betalaktamaser [citerad 13 maj 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/>
9. Sjukdomsinformation om bakterier med Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) [Internet]. Stockholm: Folkhälsomyndigheten; 2015 [uppdaterad 16 nov 2015, citerad 2 feb 2016]. Tillgänglig från: <http://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/smittskydd-och-sjukdomar/smittsamma-sjukdomar/extended-spectrum-beta-lactamase-esbl/>
10. Folkhälsomyndigheten. ESBL-producerande tarmbakterier [Internet]. Stockholm: Folkhälsomyndigheten; 2014 [citerad 15 maj 2016]. Tillgänglig från: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/17838/ESBL-producerande%20tarmbakterier.pdf>
11. Västra Götalandsregionen. ESBL-bildande bakterier [Internet]. Västra Götaland: Smittskyddsenheten; 2013 [citerad 5 feb 2016]. Tillgänglig från: <http://www.vgregion.se/upload/Smittskyddsenheten/Smittskyddsblad%20patient/ESBL%20-%20Patientinformation.pdf>
12. Karolinska kritiserar för ESBL-smitta bland nyfödda [Internet]. Stockholm: Dagens medicin; 2009 [citerad 2 feb 2016]. Tillgänglig från: <http://www.dagensmedicin.se/artiklar/2009/07/29/karolinska-kritiserar-for-esbl-smitta-bland-nyfodda/>
13. Karami N, Helldal L, Welinder-Olsson C, Åhrén C, Moore ER. Sub-Typing of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Isolates from a Nosocomial Outbreak: Application of a 10-Loci Generic *Escherichia coli* Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 12 [citerad 31 mars 2016];8(12):e1- e6. Tillgänglig från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3877011/>

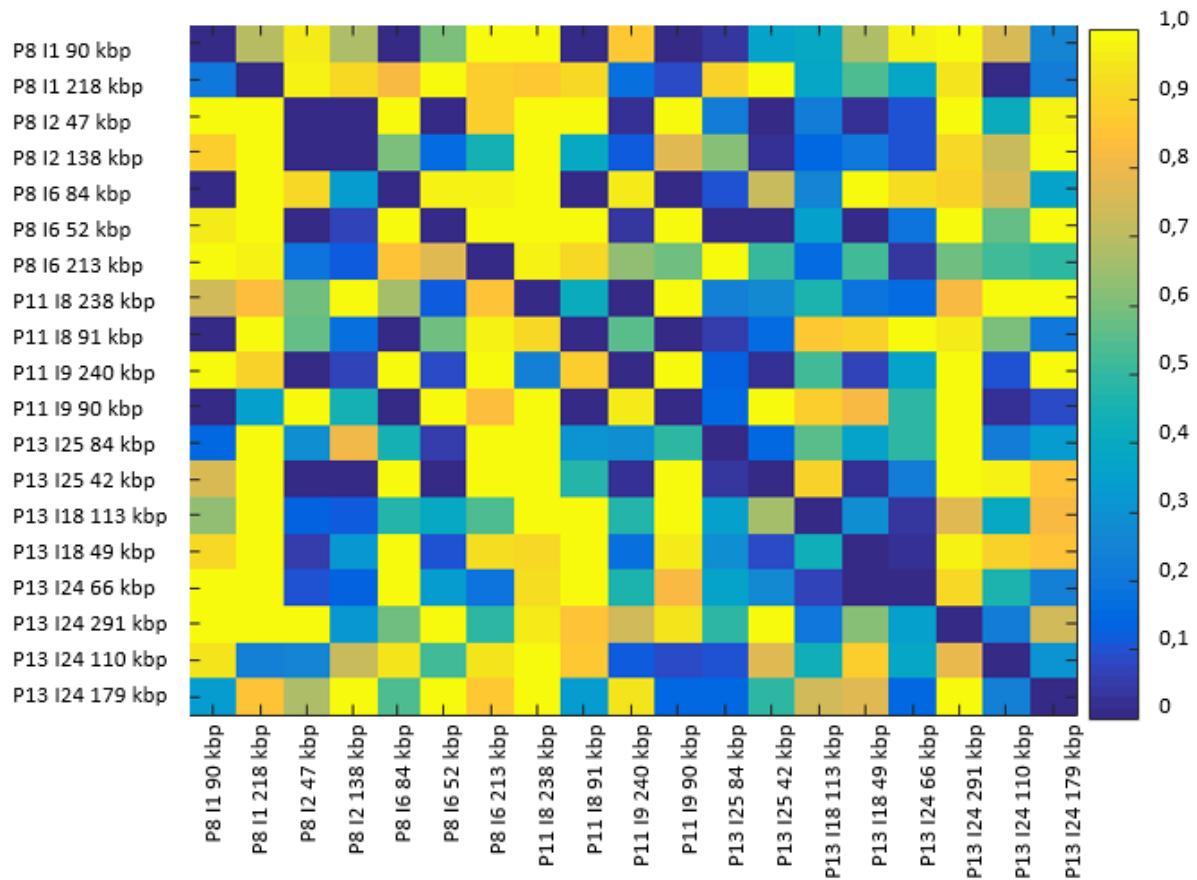
14. Resistenta bakterier sprids bland svårt sjuka nyfödda [Internet]. Stockholm: Dagens medicin; 2009 [citerad 2 feb 2016]. Tillgänglig från: <http://www.dagensmedicin.se/artiklar/2009/03/13/resistenta-bakterier-sprids-bland-svart-sjuka-nyfodda/>
15. Resistenta bakterier bland nyfödda oroar experterna [Internet]. Stockholm: Dagens medicin; 2009 [citerad 2 feb 2016]. Tillgänglig från: <http://www.dagensmedicin.se/artiklar/2009/09/02/resistenta-bakterier-bland-nyfodda-oroar-experterna/>
16. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Bakterier [citerad 23 mars 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/bakterier>
17. Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D, Espinoza D. Brock Biology of Microorganisms. 13 uppl. San Fransisco: Pearson Education Inc; 2012.
18. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Cell [citerad 23 mars 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/cell>
19. Snyder L, Peters, JE, Henkin TM, Champness W. Molecular Genetics of Bacteria. 4 uppl. Washington DC: ASM Press; 2013.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K et al. Molecular Biology of the Cell. 6 uppl. New York: Garland Science; 2015.
21. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Plasmider [citerad 27 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/plasmider>
22. Zubay G. Bacterial Genetics [Internet]. New York: McGraw-Hill Education; 2014 [citerad 26 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.accessscience.com/content/bacterial-genetics/068700>
23. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Transduktion [citerad 26 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/transduktion>
24. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Transformation [citerad 26 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/transformation>
25. Champoux JJ, Neidhardt FC, Drew WL, Plorde JJ, Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4 uppl. New York: The McGraw-Hill Companies Inc; 2004.
26. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Konjugation [citerad 24 mars 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/konjugation>
27. Lysis of Bacterial Cells for Plasmid Purification [Internet]. Hilden: QIAGEN; 2016 [citerad 15 apr 2016]. Tillgänglig från: <https://www.qiagen.com/se/resources/molecular-biology-methods/dna/#Lysis%20of%20bacterial%20cells%20for%20plasmid%20purification>
28. Extraction of Plasmid DNA [Internet]. Santa Rosa: NCBE; 2000 [citerad 15 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/ncbe/protocols/DNA/PDF/DNA07.pdf>
29. Bylund J, Ottoson J. Biocidanvändning och antibiotikaresistens [Internet]. Uppsala: Livsmedelsverket; 2013 [citerad 24 mars 2016]. Tillgänglig från: <http://www.livsmedelsverket.se/globalassets/rapporter/2015/rapport-13-biocid-omslag--inlaga.pdf>

30. Nationalencyklopedin [Internet]. Malmö: Nationalencyklopedin AB; 2016-. Resistensutveckling [citerad 25 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/resistensutveckling>
31. The Review of Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: An Overview of our Work. London: The Review of Antimicrobial Resistance; 2016.
32. ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) [Internet]. Stockholm: Vårdhandboken; 2015 [citerad 27 apr 2016]. Tillgänglig från: <http://www.vardhandboken.se/Texter/Personalinfektioner-inom-halso--och-sjukvard/ESBL-Extended-Spectrum-Beta-Lactamase/>
33. Suttie JW. Vitamin K. I: Zempleni J, Suttie JW, Gregory III JF, Stover PJ, redaktörer. Handbook of Vitamins. 5 uppl. New York: CRC Press; 2014. s. 96-96.
34. Birren B, Lai E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide. San Diego: Academic Press Inc.; 1993.
35. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Nature Protocols. 2007 03;2(3):677-84.
36. Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A. The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2016 01;10(1):1-3.
37. Kanamori H, Parobek CM, Weber DJ, van Duin D, Rutala WA, Juliano JJ. Next-Generation Sequencing and Comparative Analysis of Sequential Outbreaks Caused by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* at a Large Academic Burn Center. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016 03;60(3):1249-1257.
38. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of Plasmids by PCR-Based Replicon Typing. Journal of Microbiological Methods. 2005 12;63(3):219-228.
39. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C et. al. Plasmid Replicon Typing of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. Applied and Environmental Microbiology. 2007 03;73(6):1976-1983.
40. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and Classification of Bacterial Plasmids. Microbiological Reviews. 1988 09;52(3):375-395.
41. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint AT. Mobile Genetic Elements: the Agents of Open Source Evolution. Nature Reviews Microbiology. 2005 09;3(9):722-732.
42. Glick BR, Pasternack JJ, Patten CL. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 4 uppl. Washington DC: American Society for Microbiology; 2010.
43. Produce Exceptional Results with Long Reads [Internet]. Menlo Park: Pacific Biosciences of California; 2016 [citerad 16 maj 2016]. Tillgänglig från: <http://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/read-lengths/>
44. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3 uppl. Berlin: Springer; 2006.
45. Reisner W, Larsen NB, Silahatoglu A, Kristensen A, Tommerup N, Tegenfeld JO et. al. Single-Molecule Denaturation Mapping of DNA in Nanofluidic Channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010 07;107(30):13294-13299.

46. Schwartz DC, Li X, Hernandez LI, Ramnarain SP, Huff EJ, Wang YK. Ordered Restriction Maps of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosomes Constructed by Optical Mapping. *Science*. 1993 10; 262(5130):110-114.
47. Neely RK, Deen J, Hofkens J. Optical Mapping of DNA: Single-Molecule-Based Methods for Mapping Genomes. *Biopolymers*. 2011 05; 95(5):289-311.
48. Michaeli Y, Ebenstein Y. Channeling DNA for Optical Mapping. *Nature Biotechnology*. 2012 08;30(8):762-763.
49. Persson F, Tegenfeldt JO. DNA in Nanochannels: Directly Visualizing Genomic Information. *Chemical Society Reviews*. 2009 08:39(3);985-999.
50. Sparreboom W, van den Berg A, Eijkel JCT. Principles and Applications of Nanofluidic Transport. *Nature Nanotechnology*. 2009 11;4(11):713-720.
51. Reuter M, Dryden DT. The Kinetics of YOYO-1 Intercalation Into Single Molecules of Double-Stranded DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010 12;403(2):225-229.
52. Rye HS, Yue S, Wemmer DE, Quesada MA, Haugland RP, Mathies RA et. al. Stable Fluorescent Complexes of Double-Stranded DNA with Bis-Intercalating Asymmetric Cyanine Dyes: Properties and Applications. 1992 05:20(11);2803-2812.
53. Alizadehheidari M, Werner E, Noble C, Reiter-Schad M, Nyberg LK, Fritzsche J et. al. Nanoconfined Circular and Linear DNA: Equilibrium Conformations and Unfolding Kinetics. *Macromolecules*. 2015 01:48(3):871-878.
54. Nilsson AN, Emilsson G, Nyberg LK, Noble C, Svensson Stadler L, Fritzsche J et. al. Competitive Binding-Based Optical DNA Mapping for Fast Identification of Bacteria: Multi-Ligand Transfer Matrix Theory and Experimental Applications on *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2014 07 [citerad 10 maj 2016];42(15):e118-118. Tillgänglig från: http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/206765/local_206765.pdf
55. Nyberg LK, Persson F, Berg J, Bergström J, Fransson E, Olsson L et. al. A Single-Step Competitive Binding Assay for Mapping of Single DNA Molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 01:417(1);404-408.
56. Müller V, Karami N, Nyberg LK, Pichler C, Torche Pedreschi PC, Quaderi S, et. al. Rapid Tracing of Resistance Plasmids in a Nosocomial Outbreak Using Optical DNA Mapping. *ACS Infectious Diseases*. 2016 03;2(5):322-328. Tillgänglig från: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsinfecdis.6b00017>
57. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes. *Nature Biotechnology*. 2014 04:32(4);347-355.
58. Reis A. CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology [Internet]. Ipswich: New England BioLabs Inc; 2014. Tillgänglig från: https://www.neb.com/~media/NebUs/Files/Brochures/Expressions_IssueI_2014.pdf
59. Huo Y, Nam HK, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y et. al. Structures of CRISPR Cas3 Offer Mechanistic Insights into Cascade-Activated DNA Unwinding and Degradation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014 09;21(9):771-777.
60. High-/Low-Copy Plasmid DNA: NucleoBond® Xtra Midi/Midi Plus [Internet]. Düren: Macherey-Nagel; 2014 [citerad 9 maj 2016]. Tillgänglig från: <http://www.mn-net.com/tabid/1371/default.aspx>

61. DNA lambda [Internet]. St. Louis: Sigma-Aldrich; 2016 [citerad 27 apr 2016]. Tillgänglig från:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/10745782001?lang=en®ion=SE&clid=Cj0KEQjwl-e4BRCwqeWkv8TWqOoBEiQAMocbP2f_WVb8aBWzbgI7_98rHX4begfP8szMvBGKANuVdZlaAoSS8P8HAQ
62. Sanderson BA, Araki N, Lilley JL, Guerrero G, Lewis KL. Modification of Gel Architecture and TBE/TAE Buffer Composition to Minimize Heating During Agarose Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* [Internet]. 2014 06 [citerad 29 apr 2016];454(1):e44-54. Tillgänglig från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326971400092X>
63. 2-Mercaptoethanol [Internet]. Waltham: ThermoFisher Scientific; 2016 [citerad 27 apr 2016]. Tillgänglig från: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21985023>
64. McCaffrey J, Sibert J, Zhang B, Zhang Y, Hu W, Riethman H et. al. CRISPR-CAS9 D10A Nickase Target-Specific Fluorescent Labeling of Double Strand DNA for Whole Genome Mapping and Structural Variation Analysis. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2016 01 [citerad 10 maj 2016];44(2):e11-11. Tillgänglig från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481349>
65. Bleher R, Martin R. Ribosomes in the Squid Giant Axon. *Neuroscience*. 2001;107(3): 527-534.

Appendix A: Jämförelse av konsensusstreckkoder



Figur 18. Figuren illustrerar jämförelse mellan konsensusstreckkoderna efter att samtliga sträckts till en genomsnittlig längd motsvarande 100 kbp. I kanterna presenteras plasmidernas namn, där P kännetecknar patientnummer, och I isolatnummer, som åtföljs av den ungefärliga plasmidstorleken. Till höger visas en gradient som representerar olika p-värden. De rutor som markerats med p-värde nära noll (mörkblå färg) jämfördes parvis igen, med skillnaden att de sträcktes till de två jämförda plasmidernas medellängd förutsatt att längdskillnaden inte översteg 20 %. Resultatet för detta presenteras i *Tabell 3* på nästa sida.

Tabell 3. Tabellen visar de jämförelser som gjorts av konsensusstreckkoder med *Figur 18* som underlag. De rutor som i figuren markerats med mörkblå ruta, vilket indikerar ett p-värde nära noll, jämfördes då parvis och sträcktes till medellängden för de två. Om längdskillnaden för de två plasmiderna var större än 20 % jämfördes de inte. Om p-värdet var över 0,01 exkluderades de från resultatet.

Plasmid 1	Plasmid 2	Längdskillnad [%]	P-värde
P8 I1 90 kbp	P8 I6 84 kbp	6	0,0004
P8 I1 90 kbp	P11 I8 91 kbp	0,8	0,0003
P8 I1 90 kbp	P11 I9 90 kbp	0,2	0,0007
P8 I1 90 kbp	P13 I25 84 kbp	6	0,0876
P8 I1 218 kbp	P13 I24 110 kbp	50	
P8 I1 218 kbp	P8 I2 138 kbp	36	
P8 I2 47 kbp	P8 I6 52 kbp	10	0,0136
P8 I2 47 kbp	P11 I9 240 kbp	80	
P8 I2 47 kbp	P13 I25 42 kbp	11	0,0041
P8 I2 47 kbp	P13 I18 49 kbp	5	0,3576
P8 I2 138 kbp	P13 I25 42 kbp	70	
P8 I6 84 kbp	P11 I8 91 kbp	7	0,0002
P8 I6 84 kbp	P11 I9 90 kbp	6	0,0006
P8 I6 52 kbp	P11 I9 240 kbp	71	
P8 I6 52 kbp	P13 I25 84 kbp	63	
P8 I6 52 kbp	P13 I25 42 kbp	19,7	0,0876
P8 I6 52 kbp	P13 I18 49 kbp	5	0,3389
P8 I6 213 kbp	P13 I24 66 kbp	69	
P11 I8 238 kbp	P11 I9 240 kbp	1	0,0067
P11 I8 91 kbp	P11 I9 90 kbp	1	0,0014
P11 I9 240 kbp	P13 I25 42 kbp	83	
P11 I9 90 kbp	P13 I24 110 kbp	22	
P13 I25 42 kbp	P13 I25 84 kbp	51	
P13 I25 42 kbp	P13 I18 49 kbp	15	0,1839
P13 I18 113 kbp	P13 I24 66 kbp	70	
P13 I18 49 kbp	P13 I24 66 kbp	26	

 Under övre gräns  Ej under övre gräns

Appendix B: Plasmidstorlekar

Tabell 4. Plasmidstorlekarna från *Figur 11* uttryckta i kbp för respektive studerat isolat med tillhörande standardavvikelse inom parantes.

	Plasmid 1 Storlek [kbp]	Plasmid 2 Storlek [kbp]	Plasmid 3 Storlek [kbp]	Plasmid 4 Storlek [kbp]
Isolat 1	90,02 ($\pm 0,60$)	218,09 ($\pm 15,97$)		
Isolat 2	46,82 ($\pm 2,74$)	138,24 ($\pm 11,12$)		
Isolat 6	51,88 ($\pm 5,54$)	84,31 ($\pm 5,09$)	214,20 ($\pm 8,53$)	
Isolat 7	134,70 ($\pm 7,31$)			
Isolat 8	90,75 ($\pm 2,35$)	237,57 ($\pm 10,56$)		
Isolat 9	89,86 ($\pm 2,46$)	240,43 ($\pm 4,47$)		
Isolat 18	49,05 ($\pm 4,30$)	113,10 ($\pm 9,32$)		
Isolat 23	69,57 ($\pm 1,11$)	208,86 ($\pm 6,75$)		
Isolat 24	66,42 ($\pm 2,47$)	109,55 ($\pm 4,86$)	179,37 ($\pm 8,97$)	290,86 ($\pm 0,00$)
Isolat 25	41,67 ($\pm 0,00$)	84,33 ($\pm 2,99$)		

E. coli
 K. pneumoniae

Appendix C: P-värden för samtliga jämförelser

	P8 I1 90 kbp	P8 I1 218 kbp	P8 I2 47 kbp	P8 I2 138 kbp	P8 I6 84 kbp	P8 I6 52 kbp	P8 I6 213 kbp	P11 I8 238 kbp	P11 I8 91 kbp
P8 I1 218 kbp	0,9291								
P8 I2 47 kbp	0,1172	0,0352							
P8 I2 138 kbp	0,4142	0,2112	0,0371						
P8 I6 84 kbp	0,0004	0,7406	0,6128	0,6295					
P8 I6 52 kbp	0,2619	0,1502	0,0214	0,1459	0,9876				
P8 I6 213 kbp	0,6534	0,1109	0,8732	0,2578	0,9867	0,1972			
P11 I8 238 kbp	0,6865	0,0013	0,5657	0,9072	0,7553	0,9801	0,5423		
P11 I8 91 kbp	0,0003	0,8781	0,7723	0,7090	0,0002	0,7986	0,8974	0,6304	
P11 I9 240 kbp	0,9384	0,1546	0,1262	0,0087	0,8319	0,0294	0,4827	0,0067	0,919
P11 I9 90 kbp	0,0007	0,8856	0,1331	0,9847	0,0006	0,2922	0,4969	0,0849	0,0014
P13 I25 84 kbp	0,1891	0,7863	0,0536	0,1652	0,3880	0,0647	0,3164	0,7548	0,628
P13 I25 42 kbp	0,1711	0,1283	0,0041	0,0463	0,3865	0,0286	0,3279	0,8730	0,71
P13 I18 113 kbp	0,0865	0,0305	0,0236	0,6647	0,1103	0,2131	0,1455	0,8907	0,083
P13 I18 49 kbp	0,1602	0,9102	0,2125	0,3717	0,5797	0,3570	0,1456	1,0000	0,787
P13 I24 66 kbp	0,5707	0,8919	0,4463	0,8060	0,4156	0,3688	0,7424	0,3939	0,381
P13 I24 291 kbp	0,7920	0,3403	0,0988	0,3742	0,9999	0,0907	0,6298	0,2020	0,9900
P13 I24 110 kbp	0,1195	0,7516	0,5090	0,2322	0,1322	0,6751	0,6840	0,4421	0,0730
P13 I24 179 kbp	0,2937	0,7173	0,0126	0,5841	0,9797	0,0223	0,4056	0,4617	0,684

P-värde < 0,01 Medellängd
 P-värde < 0,01 Individuell längd
 P-värde > 0,01

Figur 19. Trappa del 1 med p-värden. Gröna rutor markerar konsensus som överensstämde då plasmiderna vid jämförelse parvis sträcktes till medellängden för de två jämförda och gav ett p-värde på mindre än 0,01. Gula rutor markerar konsensus som överensstämde då plasmiderna jämförts vid sin individuella längd och gav ett p-värde på mindre än 0,01. Vita rutor markerar övriga.

	P11 I9 240 kbp	P11 I9 90 kbp	P13 I25 84 kbp	P13 I25 42 kbp	P13 I18 113 kbp	P13 I18 49 kbp	P13 I24 66 kbp	P13 I24 291 kbp	P13 I24 110 kbp
P11 I9 90 kbp	0,1036								
P13 I25 84 kbp	0,0108	0,8251							
P13 I25 42 kbp	0,0482	0,1998	0,0382						
P13 I18 113 kbp	0,1386	0,4782	0,5447	0,5663					
P13 I18 49 kbp	0,2477	0,1727	0,0985	0,1839	0,2283				
P13 I24 66 kbp	0,7626	0,3925	0,7119	0,0354	0,3588	0,2676			
P13 I24 291 kbp	0,0510	0,4334	0,0156	0,3241	0,3552	0,0614	0,0558		
P13 I24 110 kbp	0,2574	0,1546	0,5880	0,4709	0,1735	0,4057	0,3998	0,5286	
P13 I24 179 kbp	0,5184	0,9061	0,0416	0,0400	0,2528	0,7917	0,2136	0,3692	0,3637

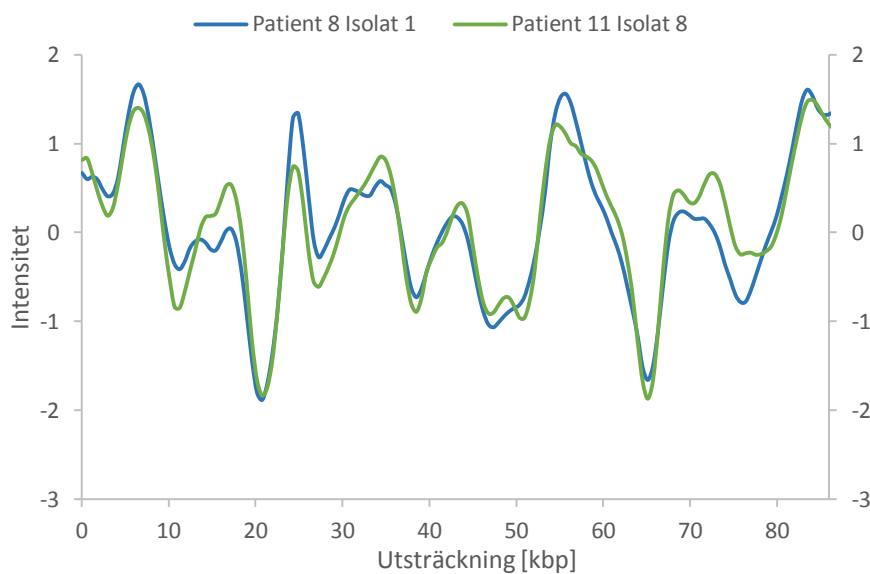
P-värde < 0,01 Medellängd
 P-värde < 0,01 Individuell längd
 P-värde > 0,01

Figur 20. Trappa del 2 med p-värden. Vita rutor markerar de konsensuskombinationer som inte gett ett p-värde på mindre än 0,01 då plasmiderna vid parvis jämförelse sträckts till medellängden för de två jämförda alternativt då plasmiderna jämförts vid sin individuella längd.

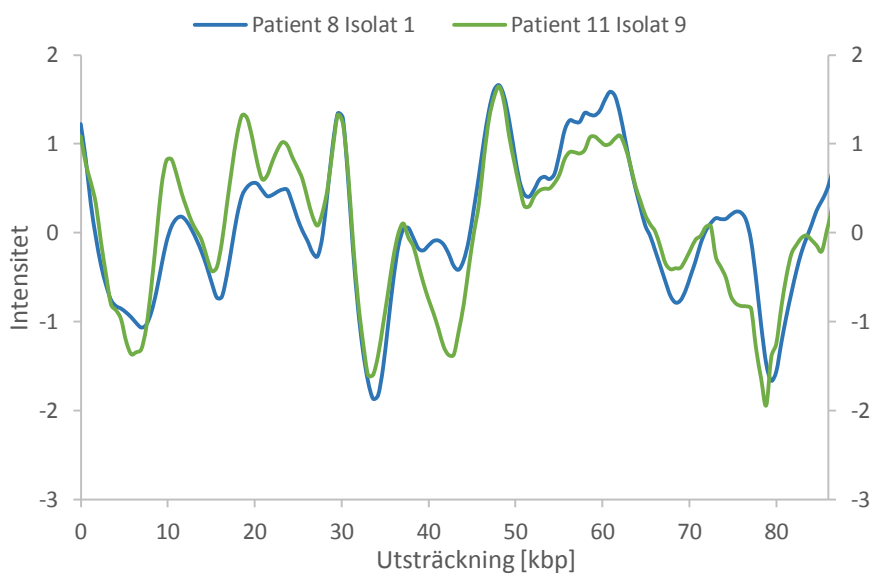
Appendix D: Intensitetsgrafer för gröna jämförelser



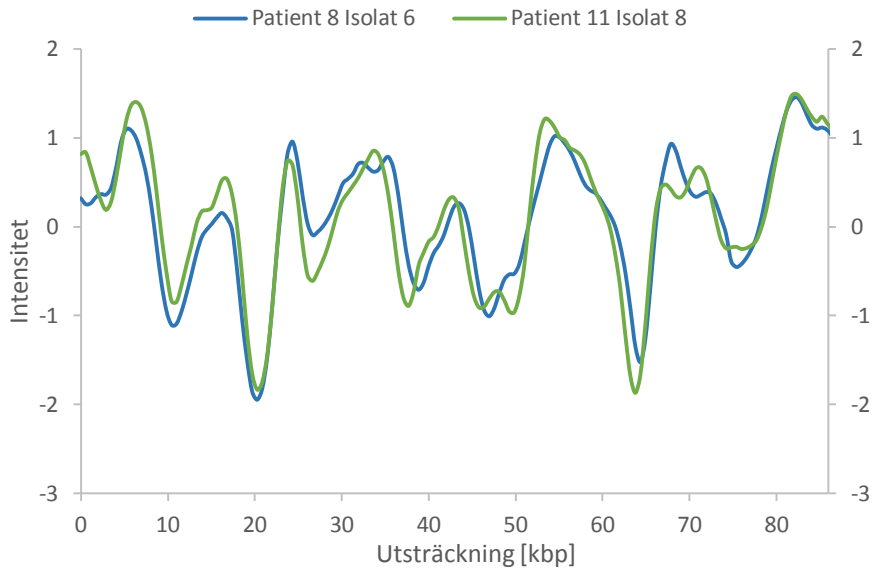
Figur 21. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 1 (90 kbp) och isolat 6 (84 kbp) från patient 8 som sträckts till medellängden för de två (87 kbp).



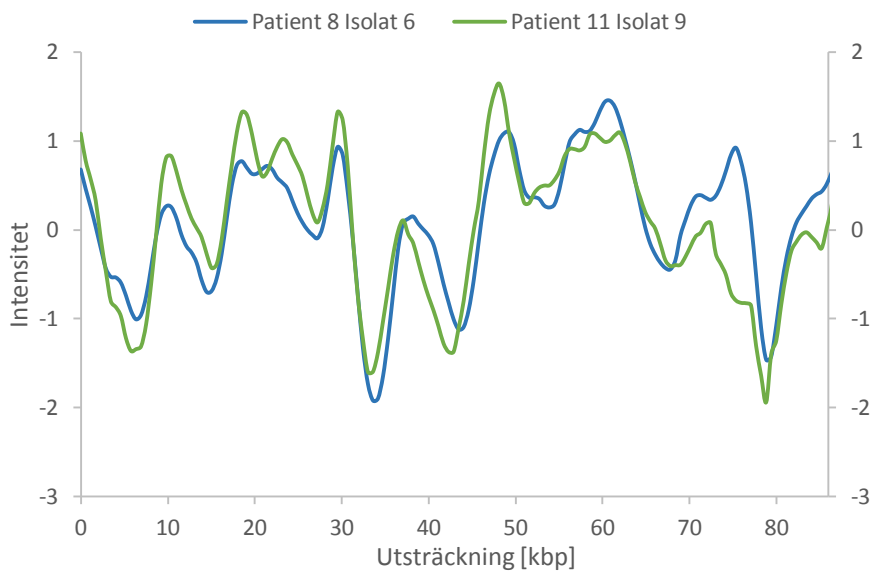
Figur 22. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 1 (90 kbp) och isolat 8 (91 kbp) från patient 8 respektive 11 som sträckts till medellängden för de två (90 kbp).



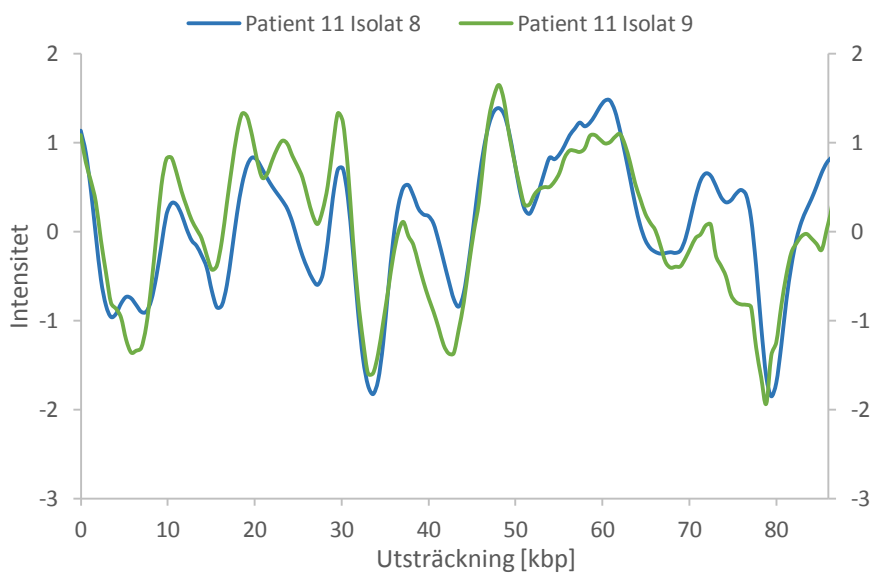
Figur 23. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 1 (90 kbp) och isolat 9 (90 kbp) från patient 8 respektive 11 som sträckts till medellängden för de två (90 kbp).



Figur 24. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 6 (84 kbp) och isolat 8 (91 kbp) från patient 8 respektive 11 som sträckts till medellängden för de två (88 kbp).

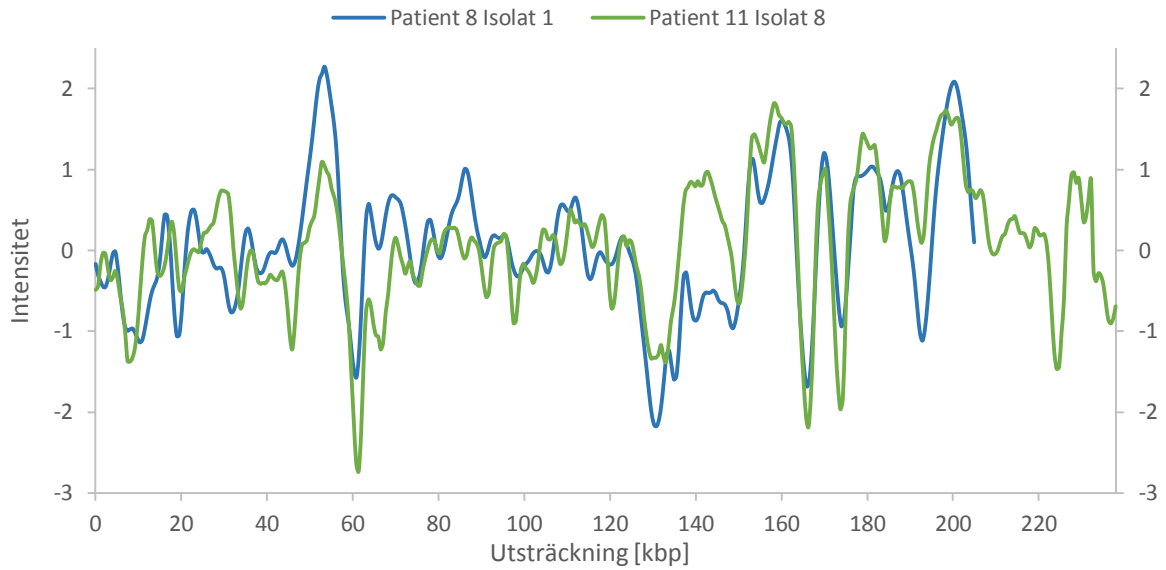


Figur 25. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 6 (84 kbp) och isolat 9 (90 kbp) från patient 8 respektive 11 som sträckts till medellängden för de två (87 kbp).

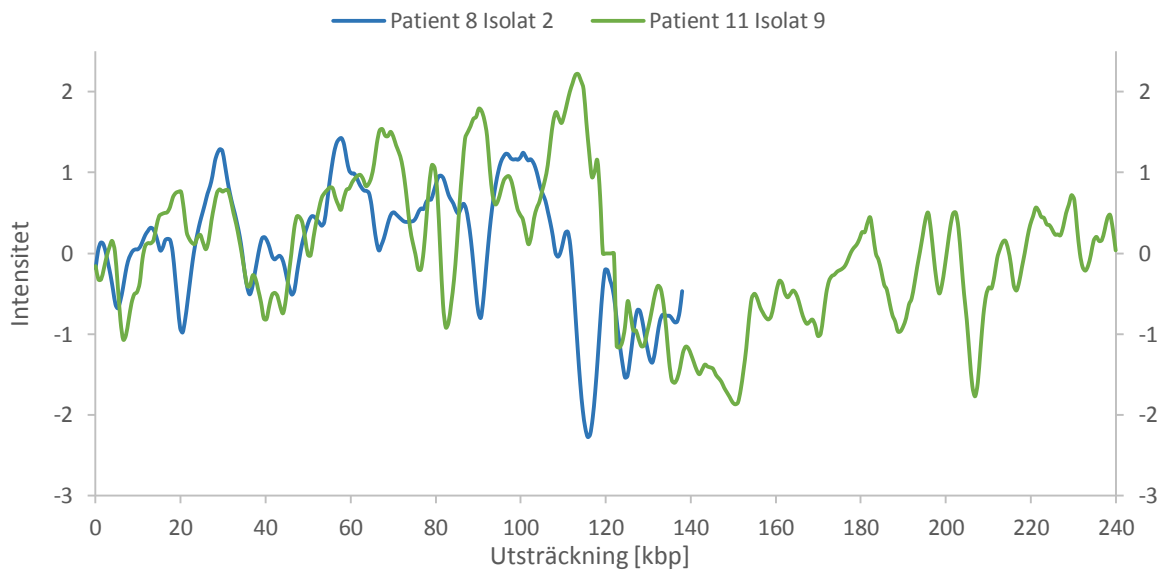


Figur 26. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 8 (91 kbp) och isolat 9 (90 kbp) från patient 11 som sträckts till medellängden för de två (90 kbp).

Appendix E: Intensitetsgrafer för gula jämförelser



Figur 27. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 1 (218 kbp) och 8 (238 kbp) från patient 8 respektive 11. Streckkoderna är plottade med vardera individuell plasmidlängd.



Figur 28. Jämförelse av konsensusstreckkoder mellan isolat 2 (138 kbp) och 9 (240 kbp) från patient 8 respektive 11. Streckkoderna är plottade med vardera individuell plasmidlängd.

Appendix F: Ordlista

β-Mercaptoetanol (BME)	Antioxiderande reduktionsmedel.
Betalaktamantibiotika	Antibiotikagrupp som hindrar bakteriers syntes av cellväggen.
Betalaktamas	Samlingsnamn på enzymer som inaktiverar betalaktamantibiotika.
Cas9-nukleas	Enzym som klipper upp bindningarna som håller ihop DNA.
Cefalosporin	En sorts betalaktamantibiotika.
CRISPR-Cas9	Bakteriellt immunsystem som används för DNA-klyvning.
CTX-M-1	Genundergrupp till ESBL.
Dendrogram	Trädliknande graf som visualiserar hur grupper är ordnade.
Enterobacteriae	Bakteriefamilj i klassen Gamma Proteobacteria.
ESBL	Betalaktamas som inaktiverar flera sorters betalaktamantibiotika.
Etsning	Metod där glas eller metall upplöses av frätande ämne.
FITC-filter	Excitations- och emissionsfilter till fluorescensmikroskopi.
Flagell	Organell som påverkar bakteriens rörelser.
Fluorofor	Fluorescerande molekyl.
Hybridisering	Komplementära DNA-strängar binder och skapar DNA-helix.
Inc-grupp	Grupp som utgörs av inkompatibla plasmider.
Isolat	Isolerad del av ett ursprungsprov.
Inkompabilitet	Egenskap hos plasmider som inte kan förekomma i samma cell.
Karbapenem	Betalaktamantibiotika.
Konjugation	DNA-överföringsmetod.
Korskorrelation	Statistisk term som fastställer hur två storheter samvarierar.
Lysering	Membranupplösning som leder till celldöd.
Lysozym	Enzym som katalyserar lysering.
Nanofluidchip	Chip innehållande mikro- och nanokanaler.
Neonatalavdelning	Avdelning för nyfödda sjuka och förtidigt födda barn.
Netropsin	Antibiotikum med hög affinitet. Binder till AT-rika regioner.
Nukleas	Enzym som bryter ned DNA-strängar.
Patogen	Sjukdomsframkallande organism.
PCR	Metod som gör ett stort antal kopior av en önskad sekvens.
Pili	Organell som påverkar bakteriens vidhäftning.
Plasmid	Litet, cirkulärt DNA. Vanligt hos bakterier.
Replikon	Specifik sekvens som styr replikationen.
Nukleotid	Byggsten i DNA och RNA.
Transduktion	Viruell DNA-överföringsmekanism.
Transformation	Överföringsmekanism som inkorporerar DNA:t i genomet.
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Buffert, vanlig tillsammans med DNA.
YOYO-1	En sorts fluorescerande molekyl.

Identifiering av plasmider som orsakade ett utbrott av antibiotikaresistens på Karolinska Universitetssjukhuset

JENIFER BJÖRKMAN, BEATRICE D'AUBIGNÉ, ELIN HARALDSSON,
AMANDA LINDENMEYER ASADI, ISABEL RUNNEBERGER & MEDINA VELIC



CHALMERS

Göteborg 2016