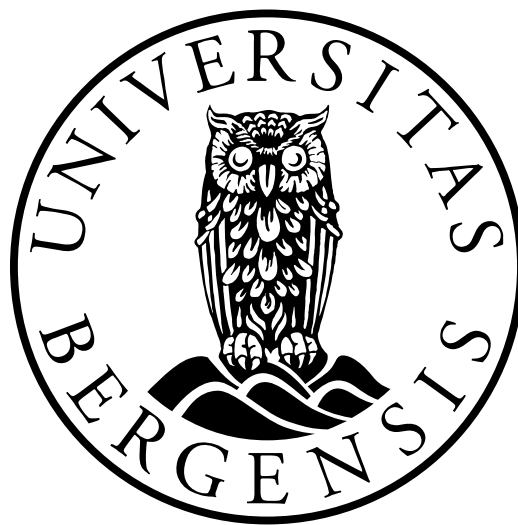


# **Påvising av aminoglykosidresistens ved hjelp av massespektrometri**

Utvikling av metode for deteksjon, stabilitet av aminoglykosid  
og molekylær karakterisering av teststammer

Mastergradsoppgåve i farmasi

Torunn Kvarekvål



Senter for farmasi og Klinisk institutt 2

Universitetet i Bergen

Mai 2014



# Forord

Arbeidet med denne oppgåva vart utført ved Klinisk institutt 2 ved Universitetet i Bergen i perioden august 2013 til mai 2014. Rettleiarane for oppgåva var P. Christoffer Lindemann, Harald G. Wiker og Haima Mylvaganam, som gav svært god rettleiing og hjelp både i arbeidet på laboratoriet og i skriveprosessen. Eg vil retta ein stor takk til Christoffer, Harald og Haima for at dei alltid var tilgjengelege og gav gode svar, konstruktiv kritikk, og råd i løpet av arbeidet med oppgåva.

Eg vil takka Eirik Nybakken frå Mikrobiologisk avdeling ved Haukeland Universitetssjukehus for at han tok seg tid til å hjelpa meg med analysar på MALDI-TOF og var så tilgjengeleg for spørsmål i løpet av året.

Veronika Kucharova var involvert i opplæring i ulike metodar på laboratoriet, og eg vil takka henne for at ho tok seg tid til dette og alltid gav gode forklaringar og delte av kunnskapen sin.

Takk til Steinar Hustad, Ersilia Bifulco og Kai Triebner, for hjelp med kromatografiske analysar, og for at dei var opne for spørsmål og diskusjon for å koma fram til gode løysingar.

Takk til Olav Mjaavatten for tilgang til programvare og tilrettelegging for arbeidet med oppgåva.

Eg vil takka kull 09 for ei minnerik studietid, og vil spesielt nemna medstudentane mine i 5. etasje; Linda, Jan Fredrik, Jack, Oddgeir, Christina og Mari. Takk for mange gode diskusjonar og mykje latter gjennom året. Arbeidet med oppgåva hadde ikkje vore det same utan dykk!

Til slutt vil eg takka mamma, pappa, Eivind og Oddbjørn for støtte gjennom arbeidet med masteroppgåva og i studietida generelt, og for at dei alltid har trua på meg.

Bergen, mai 2014

Torunn Kvarekvål

# Innholdsliste

Forord .....	1
1. Samandrag .....	5
2. Introduksjon .....	7
2.1 Aminoglykosid .....	7
2.1.1 Generelt om aminoglykosid .....	7
2.1.2 Biverknadar og toksisitet .....	8
2.1.3 Kjemisk struktur .....	8
2.1.4 Verknadsmekanisme .....	9
2.1.5 Molekylær verknadsmekanisme .....	10
2.2 Aminoglykosidresistens .....	11
2.2.1 Endringar i bindesetet .....	11
2.2.2 Endra opptak og effluks .....	12
2.2.3 Aminoglykosidmodifiserande enzym .....	13
2.2.3.1 Aminoglykosid N-acetyltransferasar (AAC) .....	14
2.2.3.2 Aminoglykosid O-nukleotidyltransferasar (ANT) .....	15
2.2.3.3 Aminoglykosid O-fosfottransferasar (APH) .....	16
2.3 Bruk av aminoglykosid i Noreg .....	18
2.4 Massespektrometri .....	20
2.4.1 Matriks assistert laser desorpsjon/ionisering .....	20
2.4.2 Time of flight masseanalysator .....	21
2.4.3 MALDI-TOF massespektrometri til identifisering av mikrobar .....	22
2.4.4 MALDI-TOF massespektrometri til resistensbestemming .....	23
2.5 Målet med oppgåva .....	25
3. Materiale og metode .....	26
3.1 Resistensprofil på stammene .....	26
3.2 Buljong mikroforytning .....	26
3.3 MALDI-TOF-plate .....	28

3.3.1	Oppsett av plata.....	29
3.3.2	Kalibrering .....	29
3.3.3	Endringer i oppsettet .....	29
3.4	Kromatografisk testing.....	31
3.5	Multi locus sequence typing (MLST) .....	32
3.5.1	Frigiving av DNA frå bakteriane .....	33
3.5.2	Polymerasekjedereaksjon 1, amplifisering frå genomisk DNA .....	33
3.5.3	Agarose gelelektroforese.....	34
3.5.4	Reinsing av PCR-produkt.....	34
3.5.5	Polymerasekjedereaksjon 2, amplifisering for sekvensering.....	35
3.6	Prøveopparbeiding for proteomikk .....	35
3.6.1	Dyrking av bakteriar.....	37
3.6.2	Hausting av celler.....	37
3.6.3	Mekanisk lysing av bakteriecellene .....	37
3.6.4	Filter Aided Sample Preparation (FASP)-metode.....	38
4.	Resultat.....	40
4.1	Karakterisering av stammene .....	40
4.1.1	MLST .....	40
4.1.2	Proteomikk .....	42
4.2	Stabilitetstesting av antibiotika .....	44
4.2.1	Buljong mikroforytning.....	44
4.2.2	Kromatografisk testing.....	46
4.2.3	Aminoglykosid på MALDI-ToF .....	51
4.3	Påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-ToF.....	54
4.3.1	Konsentrasjon.....	54
4.3.2	Müller Hinton-buljong .....	56
4.3.3	Inkubering .....	58
4.3.4	Lysing.....	60
4.3.5	Propionyl CoA.....	61

4.3.6 Auka mengd bakteriar .....	63
4.3.7 2,5-DHB matriks (med propionyl CoA) .....	65
4.3.8 Laserintensitet .....	67
4.3.9 Meir bakteriar og propionyl CoA ved ulike laserintensitetar .....	68
5. Diskusjon.....	71
5.1 Karakterisering av stammene .....	71
5.1.1 MLST .....	71
5.1.2 Proteomikk .....	71
5.2 Stabilitetstesting av antibiotika .....	73
5.2.1 Buljong mikrofortynning.....	73
5.2.2 Kromatografisk testing .....	74
5.3 Påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-TOF .....	76
5.4 Avgrensingar ved metoden.....	79
5.5 Vidare arbeid .....	79
6. Konklusjon .....	80
7. Referanseliste .....	81

# 1. Samandrag

Aminoglykosid er potente antibiotika som vert brukt til behandling av alvorlege infeksjonar med aerobe bakteriar. Dei er baktericide og verkar ved å binda til ribosoma i bakteriane og på denne måten forstyrra den normale peptidsyntesen. Aminoglykosida er verdifulle medikament, men som for mange andre antibiotika er resistens mot desse midla eit aukande problem. Den viktigaste resistensmekanismen er aminoglykosidmodifiserande enzym (AME). Desse enzymba inaktiverer aminoglykosida ved at dei modifiserer hydroksyl- eller aminogrupeer på aminoglykosida ved å tilføra acetyl-, AMP- eller fosfatgrupper til molekyla. Modifiserte aminoglykosid bind dårleg til ribosoma og den antibakterielle verknaden går tapt. Tradisjonelle metodar for å resistensbestemma bakteriar er tidkrevjande, og ved alvorlege infeksjonar er det viktig å få sett i gang riktig behandling så fort som mogleg. Målet med denne oppgåva var difor å finna ein metode for å påvisa aminoglykosidresistens forårsaka av AME med MALDI-TOF massespektrometri, som dei siste åra har vorte brukt til rask og påliteleg identifisering av mikrobar.

Tre kliniske isolat av *Escherichia coli* som tidlegare hadde fått påvist gen for to ulike AME (eitt AME-gen i kvar stamme) og ei aminoglykosidsensitiv stamme vart brukt i arbeidet. Dei resistente stammene skulle karakteriserast ved typing og proteomiske analysar. Typinga vart gjort ved multi locus sequence typing (MLST) av sju hushaldningsgen. Dei identifiserte sekvenstypane har ikkje vore omtala i samanheng med multiresistente stammer eller utbrot.

Proteomikkanalysar på to av dei kliniske isolata vart utført med prøveopparbeiding med filter aided sample preparation (FASP)-metoden og analysering med LC-MS/MS. Resultata viste at det eine isolatet riktig uttrykte kun eit AME-protein. Det andre isolatet viste i tillegg til det kjente AME-proteinet å uttykkja to andre AME.

Aminoglykosida som vart analysert var amikacin, gentamicin og tobramycin. Stabilitetstesting av aminoglykosidløysingar på 1 mg/mL vart utført med buljong mikrofortynning og kromatografisk analysering av løysingane. Stabilitetstestinga viste at aminoglykosida er relativt stabile ved lang tids lagring i frys, men at oppbevaring i romtemperatur og gjentatt frysing og tining gir ein tydeleg reduksjon av konsentrasjon, sjølv om dette vil gi minimale utslag ved fenotypisk resistensbestemming.

Ein etablert metode for påvising av  $\beta$ -laktamasar med bruk av MALDI-TOF massespektrometri vart brukt som basis for arbeidet med denne oppgåva. Ulike faktorar vart variert for å koma

fram til ein metode som kunne fungera. Tre ulike oppsett gav lovande resultat; bruk av 0,3 mg/mL tobramycin, bruk av 2,5-DHB som matriks og tilsetjing av større bakteriemengd og propionyl coenzym A. Resultata viste seg vanskelege å reprodusera, så vidareutvikling av metoden er nødvendig før den kan eigna seg til rutinebruk.



## 2. Introduksjon

### 2.1 Aminoglykosid

#### 2.1.1 Generelt om aminoglykosid

Aminoglykosid er mellom dei mest effektive antibiotika mot infeksjonar forårsaka av aerobe bakteriar(1). Streptomycin var det første aminoglykosidet som vart identifisert av Scatz et al. i 1944(2). Det vart isolert frå bakterien *Streptomyces griseus*, vanleg funne i jord. Dei fleste aminoglykosida førekjem naturleg og vert produsert og isolert av aktinobakteriar av genus *Streptomyces* eller *Micromonospora*. Derivat frå desse bakteriane har også vore utgangspunkt for semisyntetiske aminoglykosid(3).

Aminoglykosida er basiske, sterkt polare kation(4). Den positive ladninga gjer at dei i liten grad vert absorbert frå gastrointestinaltrakta ved oral administrasjon. På grunn av dette vert aminoglykosida administrert parenteralt, enten ved intramuskulær eller intavenøs injeksjon ved behandling av systemiske infeksjonar(5). Dei ulike aminoglykosida varierer i grad av proteinbinding i serum, men generelt for gruppa er bindinga låg. Aminoglykosida vert ikkje metabolisert i kroppen, men vert eliminert uendra i hovudsak via nyrene ved glomerulær filtrasjon.

Aminoglykosida har baktericid verknad som vil seia at dei drep bakteriane, ikkje berre hemmar tilvekst av nye. Dei er svært effektive mot infeksjonar forårsaka av mange ulike Gram-negative, aerobe bakteriar, som til dømes *Escherichia coli* (6). Dei vert også brukt i behandlinga av nokre Gram-positive bakteriar, til dømes stafylokokkar, men når brukt mot Gram-positive bakteriar, vert aminoglykosida gjerne gitt i kombinasjon med celleveggs-antibiotika som  $\beta$ -laktamar for å gi ein synergistisk effekt(5). Denne synergistiske effekten kjem truleg på grunn av auka opptak av aminoglykosida, som er nærare forklart under verknadsmekanisme.

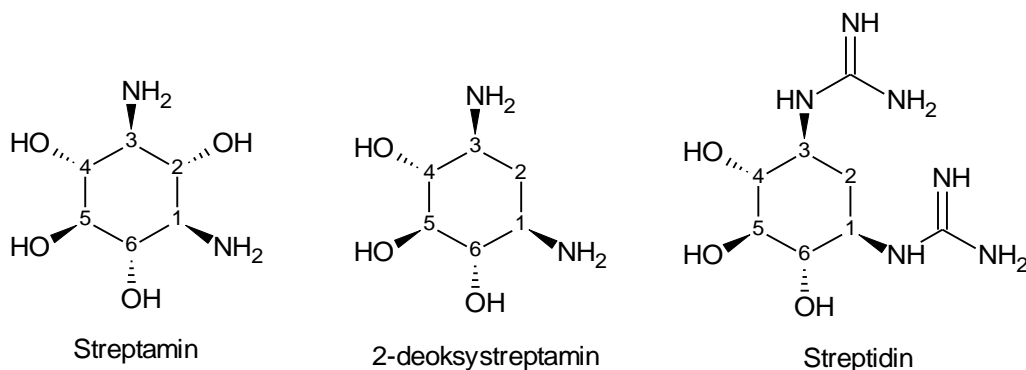
Den baktericide effekten av aminoglykosida er konsentrasjonsavhengig, slik at auka dosering gir auka behandlingseffekt. Til forskjell frå  $\beta$ -laktamar, avhenger den baktericide aktiviteten meir av konsentrasjon enn av tidsrommet bakteriane er eksponert for antibiotika(6). I tillegg har aminoglykosida uttalt postantibiotisk effekt, slik at dei framleis har antibakteriell verknad lenge etter at konsentrasjonen har sunke under minste hemmande konsentrasjon(1). At aminoglykosida viser både konsentrasjonsavhengig og postantibiotisk baktericid effekt er nyttig ved administrering fordi dei kan doserast sjeldan, enten ei eller tre gonger dagleg(1). Sjeldan dosering kan truleg minka sjansen for toksiske biverknadar(7).

### 2.1.2 Biverknadar og toksisitet

Bruk av aminoglykosid utgjer ein risiko for toksiske effektar, som er den viktigaste avgrensinga for bruk av desse midla. Aminoglykosida akkumulerer i det indre øyret og i renale cortex i nyrene, noko som gir opphav til oto- og nefrotoksiske effektar(1). Aminoglykosida har eit relativt smalt terapeutisk vindauge for at nyre- og høyrselsskade oppstår, som betyr at forskjellen mellom ein effektiv dose og ein toksisk dose er liten(4). Nefrotoksisitet førekjem ofte, men er som regel reversibel. Nyrefunksjon og serumkonsentrasjon av aminoglykosid bør monitorerast under behandling, slik at dose og doseringsintervall kan justerast. Ototoksisiteten kjem truleg av at aminoglykosida kan kelatera metall og danna redoksaktive kompleks som induserer skade på cellene i øyret(5). Høyrselsskaden er sjeldnare enn nyreskade, men er som regel irreversibel.

### 2.1.3 Kjemisk struktur

Strukturmessig er aminoglykosida ei samansett gruppe, men vert kjenneteikna av ein aminocyclitolring bunde til aminosukkereiningar gjennom glykosidbindingar(5). Ein aminocyclitolring er bygd opp av seks karbonatom med amino- og hydroksylgrupper bunde til ringatoma. Aminoglykosida kan klassifiserast ut frå kva type aminocyclitolring dei inneheld, enten streptamin, 2-deoksystreptamin eller streptidin, som vist i figur 1.

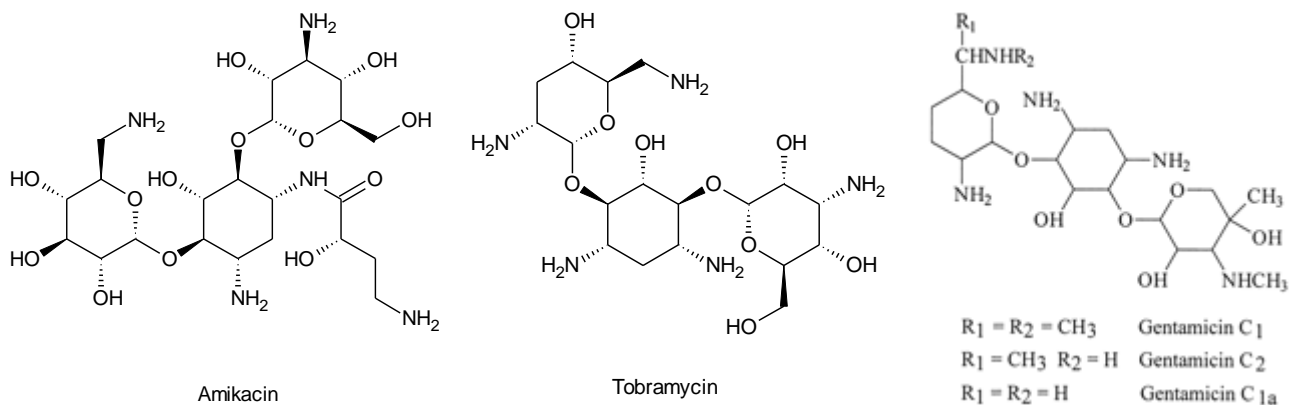


**Figur 1:** Viser strukturane for dei tre aminocyclitolringane streptamin, 2-deoksystreptamin og streptidin.

Aminoglykosida som byggjer på ei kjerne av 2-deoksystreptamin vert delt i to grupper etter substitusjonsmønsteret til glykosidbindingane på aminocyclitolringen. 4,6-disubstituert 2-deoksystreptamin har glykosidbindingar på posisjon 4 og 6 på ringen, og denne gruppa omfattar dei fleste klinisk relevante aminoglykosida, mellom anna gentamicin, tobramycin, amikacin og netilmicin(4). Neomycin og paramomycin høyrer til 4,5-disubstituert 2-deoksystreptamin, som har glykosidbindingar til posisjon 4 og 5.

Streptomycin er det einaste av aminoglykosida som er bygd på ein streptidinring(4). Spectinomycin vert også rekna som eit aminoglykosid trass i at strukturen ikkje inneheld aminosukkereinigar.

I arbeidet med denne oppgåva vart aminoglykosida amikacin, tobramycin og gentamicin brukt. Desse tre er som nemnd 4,6-disubstituerte 2-deoksystreptamin, og strukturformlane er vist i figur 2. Amikacin og tobramycin har molekylvektar på høvesvis 585,6 og 467,5 g/mol. Gentamicin inneheld tre ulike former med litt ulik struktur på to av sidekjedene; gentamicin C1a, C2 og C1, med høvesvis molekylvektene 449,5, 463,6 og 477,6 g/mol.



**Figur 2:** Viser strukturformlane av amikacin, tobramycin og gentamicin(8).

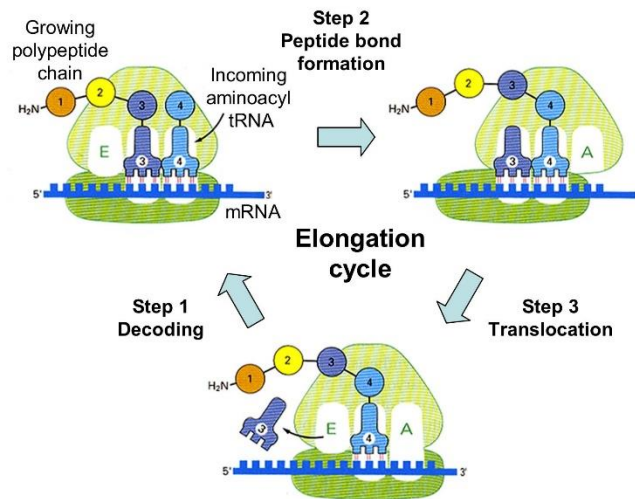
#### 2.1.4 Verknadsmekanisme

Ved fysiologisk pH vil aminoglykosida vera protonert, og dermed positivt ladde. Den positive ladninga medierer bindinga til bakterieceller, fordi dei positivt ladde aminoglykosida har affinitet for binding til negativt ladde einingar, som lipopolysakkarid, fosfolipid og membranprotein, på utsida av celleveggen til Gram-negative bakteriar. Denne elektrostatiske bindinga er ein passiv, altså ikkje energikrevjande prosess(4). Etter bindinga til celleveggen diffunderer aminoglykosida gjennom kanalar i den ytre membranen inn til det periplasmiske rom. Det neste steget i transporten inn i bakteriecella er over den indre, cytoplasmiske membranen, noko som krev oksidativ energi frå elektrontransportkjeda. Denne prosessen vert difor kalla energikrevjande fase 1, og er i tillegg det hastigheitsbestemmande trinnet for transport. På grunn av den oksidative energien som er nødvendig for transporten over den cytoplasmiske membranen, er anaerobe bakteriar ibuande resistente mot aminoglykosid. Av same grunn er fakultative anaerobe bakteriar, til dømes enterokokkar og streptokokkar, resistente mot låge konsentrasjonar av aminoglykosid(6). Ei relativt lita mengd molekyl vert transportert inn til cytoplasma ved energikrevjande fase 1, og aminoglykosida vil her binda til

30S subeininga på ribosoma. Binding av aminoglykosid på ribosomet hindrar ikkje danninga av initieringskomplekset for peptidsyntese, men interfererer med bakterien si evne til å korrekturlesa peptida, noko som fører til at avvikande protein vert danna. Når avvikande membranprotein vert sett inn i den cytoplasmiske membranen, vil heilskapen til membranen verta forstyrra, og energikrevjande fase 2 vert igangsett(5). Denne fasen er ein autokatalytisk prosess som går ut på at den skadde membranen vert meir permeabel for vidare transport av aminoglykosid, som fører til meir påverknad av proteinsyntesen og difor vidare forstyrring av membranen og andre nødvendige funksjonar for overleving i bakteriecella. Prosessen fortset heilt til bakteriecella er så øydelagd at den dør.

### **2.1.5 Molekylær verknadsmekanisme**

Dei bakterielle ribosoma er sett saman av ei lita (30S) og ei stor (50S) subeining. Den vesle subeininga er bygd opp av 16S ribosomalt RNA (rRNA) og 20-21 ulike protein, medan den store subeininga er bygd opp av to rRNA-molekyl; 5S og 23S, i tillegg til 33 protein(6). Ribosoma forflyttar seg langs mRNA og utfører translasjon til peptidkjeder ved at dei bind til seg tRNA. tRNA er transportmolekyl som kjenner att og bind til kodon på mRNA på eit sete kalla antikodon, og ber med seg den tilhøyrande aminosyra for kodonet på eit anna sete. Ribosoma inneheld eit bindesete for mRNA og 3 bindesete for tRNA; A-, P- og E-setet(9). tRNA bind til ribosomet i A-setet, ribosomet forflyttar seg og tRNA havnar i P-setet der peptidkjeda vert forlenga, før ei ny forflytting til E-setet, der tRNA vert frigjort frå ribosomkomplekset (sjå figur 3). A-setet har svært god evne til å kjenna att og binda til riktig tRNA gjennom kodon-antikodonbindinga, slik at det i normale celler sjeldan vert sett inn feil aminosyre i peptidkjeda(6). Når riktig kodon til antikodon-binding skjer i A-setet, førekjem det ei konformasjonsendring av 16S rRNA kalla lukka konformasjon av A-setet. Den lukka konformasjonen stabiliserer bindinga mellom kodon og antikodon og vil ikkje skje dersom feil tRNA bind til A-setet. Dei ulike formene av aminoglykosid bind til ulike stadar på 16S rRNA på 30S subeininga, men den generelle effekten av bindinga er at A-setet på ribosomet vert endra til eit som liknar lukka konformasjon. Denne endringa forstyrrar ribosomet si evne til å binda riktig tRNA i forhold til kodon på mRNA til A-setet, noko som gjer at feil aminosyre vert sett inn i peptidkjeda og avvikande protein vert syntetisert(5).



**Figur 3:** Viser proteintranslasjon der tRNA som ber med seg ei aminosyre bind i A-setet, og peptidkjeda vert forlenga før ribosomet forflyttar seg til ein ny posisjon(10).

## 2.2 Aminoglykosidresistens

Aminoglykosidresistens kan skje ved fleire ulike mekanismar, som modifisering av bindesetet, reduksjon av intracellulær konsentrasjon av aminoglykosid ved efflukspumper, minka transport av aminoglykosid over cellemembranar, eller enzymatisk inaktivering av aminoglykosida. Fleire av desse resistensmekanismane kan vera til stades i same celle til same tid(5).

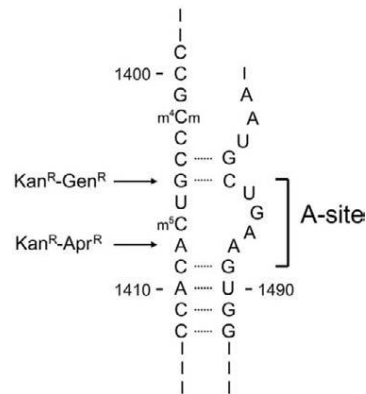
### 2.2.1 Endringar i bindesetet

Endringar i bindesetet for aminoglykosida på ribosomet fører til at tett binding mellom aminoglykosid og ribosom vert hindra, og den antibakterielle verknaden går tapt. Modifisering kan skje enten ved mutasjonsbaserte endringar på ribosomale protein eller 16S rRNA, eller ved enzymatisk metylering av 16S rRNA(6).

Modifisering i bindesetet kan føra til resistens. Endringar på 16S rRNA er berre klinisk relevant for streptomycin i *Mycobacterium tuberculosis*, som kun har eitt gen som kodar for 16S rRNA(4). Mutasjonar på dette genet påverkar to regionar som er bindesete for streptomycin og fører til senka affinitet for binding av aminoglykosidet. Streptomycin har også ein interaksjon med det ribosomale proteinet S12 under binding, og mutasjonsbaserte endringar i dette proteinet gir resistens. *M. tuberculosis* kan ha endringar i bindesetet både i 16S rRNA og på protein S12, noko som resulterer i høg grad av resistens(11).

Dei fleste aminoglykosida vert som tidlegare nemnt produsert av bakteriar. Desse bakteriane har utvikla ein forsvarsmekanisme for å beskytta seg sjølv mot aminoglykosida dei produserer.

Bakteriane inneheld 16S rRNA metyltransferase (16S-RMTase) som kan modifisera spesifikke nukleotidar på aminoglykosidbindeseta på 16S rRNA, som vist i figur 4. Dette gjer at bindeseta er metylert og ikkje tilgjengelege for binding av aminoglykosida, og bakteriane er ibuande resistente mot sine eigne metabolittar(12).



**Figur 4:** Viser posisjonane der 16S-RMTasane metylerer 16S rRNA(12).

I 2003 vart det identifisert kliniske isolat av *Klebsiella pneumoniae* og *Pseudomonas aeruginosa* som viste aminoglykosidresistens gjennom produksjon av 16S-RMTasar(12, 13). Seinare har det vorte funne at fleire ulike patogene, Gram-negative bakteriar som til dømes *E. coli* har tileigna seg desse enzyma, og er resistente mot alle klinisk relevante aminoglykosid. Gena som kodar for 16S-RMT-asane er ofte plassert på plasmid, slik at dei lett kan overførast til andre bakteriespecies(12).

### 2.2.2 Endra opptak og effluks

Endringar i dei bakterielle membranane kan føra til redusert opptak av aminoglykosid inn i bakteriecellene. For å koma over den ytre membranen i Gram-negative bakteriar, bind aminoglykosida til negativt ladde einingar på overflata av bakteriecella. Nokre resistente stammer kan endra lipopolysakkarida på yttermembranen, som resulterer i at denne får ei redusert negativ ladning. Ein mogleg grunn for auka resistens er difor mindre elektrostatiske binding mellom aminoglykosid og celleveggen i den første fasen av opptaket(11).

Transport av aminoglykosid over den cytoplasmiske membranen krev eit elektrisk potensiale over membranen frå elektrontransportkjeda. Viss transmembranpotensialet er fråverande eller under ein viss terskel, vil mikroben vera resistent mot aminoglykosid, slik som er tilfelle hjå anaerobe bakteriar. Det er vist at det i vanlegvis sensitive mikrobar kan oppstå mutasjonar som fører til redusert transmembranpotensiale og dermed aminoglykosidresistens(6).

Intracellulær konsentrasjon av aminoglykosid kan reduserast ved at ATP-krevjande effluks-pumper transporterer antibiotikamolekyla ut av cella før dei når bindesetet på ribosomet(4). Desse pumpene har ofte brei spesifisitet, noko som vil seia at dei kan pumpa ulike substrat, til dømes ulike typar antibiotika. Bakteriar som uttrykkjer desse pumpene har ibuande, breispektra resistens mot låge konsentrasjonar av antibiotika, men mutasjonar eller induksjon ved eksponering for antibiotika kan gi overuttrykking av efflukspumper og høgare grad av resistens. Aminoglykosid er substrat for fleire ulike multisubstrat-efflukspumper, der pumpene av familien «resistance nodulation division» (RND) som hovudsakleg finst i Gram-negative bakteriar er dei viktigaste(4, 11).

### 2.2.3 Aminoglykosidmodifiserande enzym

Den viktigaste resistensmekanismen mot aminoglykosid i kliniske isolat frå både Gram-positive og Gram-negative mikrobar er inaktivering ved aminoglykosidmodifiserande enzym (AME). Enzyrna modifiserer amino- eller hydroksylgruppene på aminoglykosida, noko som resulterer i at desse bind dårleg til ribosomet og energikrevjande fase 2 ikkje vert sett i gang. På denne måten kan bakteriane overleva sjølv om det er aminoglykosid tilstade(5, 6).

Aminoglykosidmodifiserande enzym er delt inn i tre familiar ut frå kva type endring dei gjer på aminoglykosidmolekylet; aminoglykosid N-acetyltransferasar (AAC), aminoglykosid O-nukleotidyltransferasar (ANT) og aminoglykosid O-fosfotransferasar (APH). Som gitt av namna, modifiserer ANT og APH hydroksylgrupper på aminoglykosida, medan AAC modifiserer aminogrupper. Vidare kan AME delast inn i klassar etter kvar på molekylet dei gjer endringar. Dette vert gitt med å setja posisjonen i parentes, til dømes AAC(6'). Dei ulike klassane av enzym vert så delt inn i enzymtypar ut frå kva resistensfenotype dei gir, og dette vert namngitt med romartal, til dømes AAC(6')-I. For å skilja enzym som er frå same klasse og type og difor gir same resistensprofil hjå bakterien, men som vert koda for av ulike gen, vert enzyrna til slutt individuelt namngitt med ein bokstav, til dømes AAC(6')-Ib. (6)

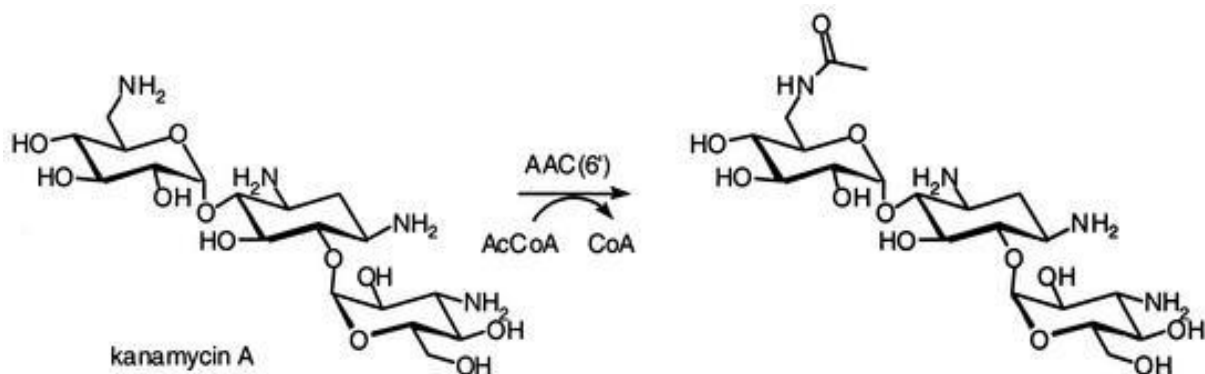
Det finst også eit anna nomenklatursystem for å identifisera AME, der gena som kodar for dei ulike enzyrna vert namngitt. Ei 3-bokstavsforkorting deler gena inn i dei tre familiarne; aminoglykosid N-acetyltransferasar (*aac*), aminoglykosid O-nukleotidyltransferasar (*aad*) og aminoglykosid O-fosfotransferasar (*aph*). Posisjonen for modifisering på molekylet vert så gitt med ein stor bokstav, før eit nummer som identifiserer dei individuelle gena, til dømes *aacC1*(5). Dei to nomenklatursystema har kvar sine fordelar og ulemper, men bruken av begge

to kan skapa forvirring. Vidare i denne oppgåva vil berre det førstnemnde systemet, som namngir dei enkelte enzymb, verta brukt.

Graden av resistens dei ulike enzymb gir, er avhengig av fleire faktorar. Resistensen kan variera mellom ulike mikrobar, og også mellom ulike stammer. Mengda av AME produsert, kor effektivt dei katalyserer modifiseringa og kva aminoglykosid mikroben vert utsett for spelar inn på graden av resistens. Mange av enzymb kan gi klinisk relevant resistens, men det er som hovudregel berre APH som gir høg grad av resistens(6). Mange av gena som kodar for AME er plassert på mobile element som plasmid, transposon, genkassetar eller integron. Dette gjer at denne resistensmekanismen lett kan spreia seg og nå eit stort utval ulike bakteriar(11).

### 2.2.3.1 Aminoglykosid N-acetyltransferasar (AAC)

Aminoglykosid N-acetyltransferasar (AAC) katalyserer acetyleringa av aminogruppene på aminoglykosida ved å bruka acetyl coenzym A som donorsubstrat for acetylgruppa, som vist i figur 5 (5). AAC modifiserer aminoglykosida regionspesifikt og vert difor delt inn i fire hovudklassar ut frå kva aminogruppe på aminoglykosidet dei acetylerer; AAC(1), AAC(3), AAC(2') og AAC(6'), som modifiserer aminogruppene i høvesvis posisjon 1, 3, 2' og 6'(5). AAC er den største familien av AME, og utbreinga av AAC mellom ulike bakteriespecies er omfattande(3).



**Figur 5:** Viser korleis AAC(6') brukar acetyl coenzym A som donorsubstrat for å acetylera kanamycin A(6).

AAC(6') er dei mest vanlege av AAC-enzymb, og er uttrykt både i Gram-negative og Gram-positive bakteriar. Aminogruppa i 6'-posisjon på aminoglykosida er viktig for binding til rRNA, og acetylering av denne gruppa fører til resistens mot dei fleste klinisk relevante aminoglykosida(11). AAC(6') er delt inn i to underklassar; AAC(6')-I og AAC(6')-II, som karakteriserer enzymb etter substratspesifisitet(3). AAC(6')-I viser høg aktivitet mot amikacin og gentamicin C1a og C2, men låg aktivitet mot gentamicin C1. AAC(6')-II modifiserer alle



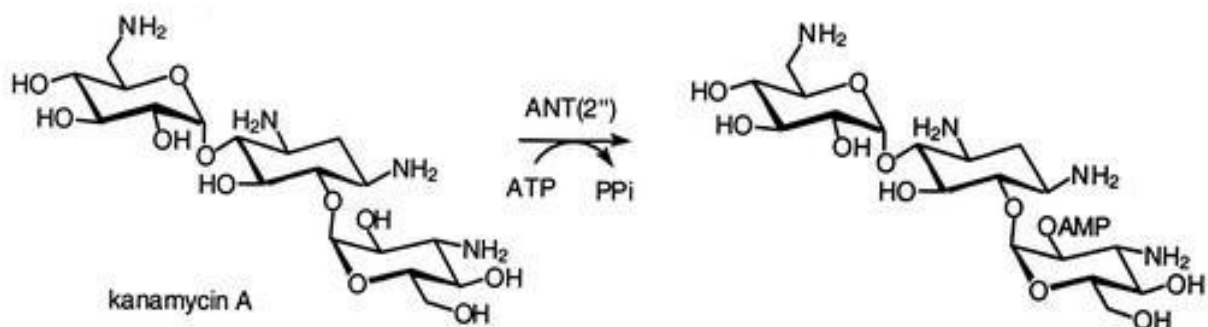
tre formene av gentamicin, men er ikkje aktivt mot amikacin(5). I tillegg til desse to underklassane, er det identifisert ein AAC som også kan modifisera fluorokinolon. Denne kan sjåast på som ein ny underklasse av AAC på grunn av forskjellen i substrat den modifiserer, men har fått namnet AAC(6')-Ib-cr, truleg grunna likskapen i aminosyresekvensen til AAC(6')-Ib(5). AAC(6')-Ib er sannsynlegvis det mest klinisk relevante av alle AAC, og enzymet er tilstades i over 70 % av AAC(6')-I-produserande kliniske isolat av Gram-negative bakteriar(14).

AAC(3) enzyma omfattar 9 underklassar, I-X, som alle er funne i Gram-negative bakteriar. AAC(3)-V vart fjerna som underklasse, då det vart funne at enzymet i denne klassen var identisk med AAC(3)-II. AAC(3)-I inkluderer fem ulike enzym som gir eit relativt smalt spekter av resistens, mot gentamicin, sisomicin og fortimicin(6). Enzym frå denne underklassen er identifisert i eit stort utval av *Enterobacteriaceae* og andre Gram-negative mikrobar(5). AAC(3)-II omfattar tre ulike enzym som gir resistens mot mellom anna gentamicin, tobramycin, sisomicin og netilmicin, og er vanleg funne i isolat frå fleire ulike Gram-negative bakteriar.

AAC(2') enzyma har berre ein underklasse, AAC(2')-I, og desse enzyma modifiserer fleire aminoglykosid, mellom anna gentamicin og tobramycin. Enzym i denne klassen er koda for av kromosomale gen, og er vist å alltid vera tilstades i bakteriespecies som innehar gena, noko som er unikt for AAC(2')(6). Enzym i klassen AAC(1) er funne i *E. coli*, *Campylobacter* spp og ein aktinobakterie. Det er berre funne eitt tilfelle av AAC(1) i kliniske isolat, og modifiseringa desse enzyma gjer, fører ikkje til signifikant tap av antibakteriell aktivitet(5).

### **2.2.3.2 Aminoglykosid O-nukleotidyltransferasar (ANT)**

Aminoglykosid O-nukleotidyltransferasar (ANT) katalyserer overføringa av ei adenosin-monofosfat(AMP)-gruppe til hydroksylgrupper på aminoglykosida ved å bruka adenosin-trifosfat (ATP) som donorsubstrat, som vist i figur 6. ANT er delt inn i fem hovudklassar etter kva hydroksylgruppe på aminoglykosidet dei adenylerer; ANT(6), ANT(9), ANT(4'), ANT(2'') og ANT(3'')(5).



**Figur 6:** Viser korleis ANT(2'') brukar ATP som donorsubstrat for å adenylera kanamycin A(6).

ANT er den minste familien av aminoglykosidmodifiserande enzym, og til no er 10 ulike ANT identifisert(4). ANT(6) gir resistens mot streptomycin og er hyppig funne i kliniske isolat av enterokokkar og stafylokokkar i Europa(6).

ANT(9) gir berre resistens mot spectinomycin, og er avgrensa til *Staphylococcus aureus*, noko som gjer at dette enzymet har avgrensa klinisk relevans(6).

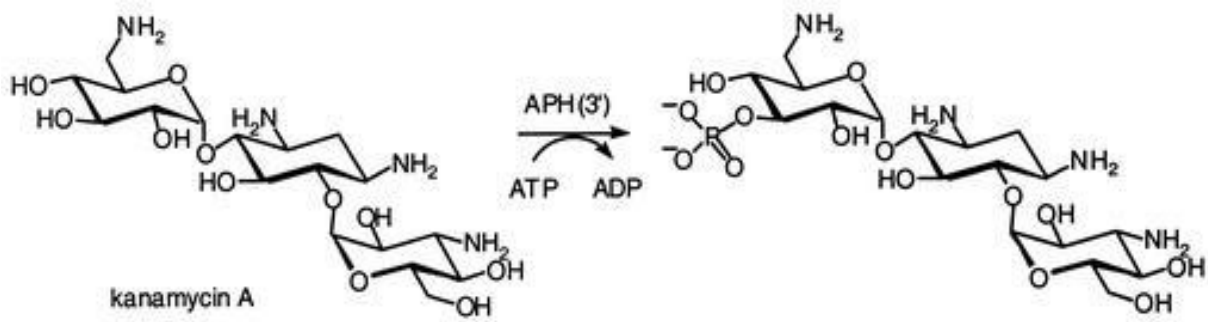
ANT(4') har to underklassar, ANT(4')-I og -II, som begge gir resistens mot tobramycin, amikacin og isepamicin. I tillegg gir underklasse -I resistens mot dibekacin. ANT(4')-I er funne i plasmid i Gram-positive bakteriar som stafylokokkar, enterokokkar og *Bacillus* spp, i motsetnad til ANT(4')-II som berre er funne i Gram-negative bakteriar(5, 6).

ANT(2'') omfattar berre eitt enzym, ANT(2'')-Ia, som gir resistens mot gentamicin, tobramycin, sisomicin, dibekacin og kanamycin. Genet for dette enzymet er spreidd til alle Gram-negative bakteriar, men kor ofte det vert identifisert varierer mykje frå land til land(6).

ANT(3'') gir resistens mot streptomycin ved å modifisera hydroksylgruppa i 3''-posisjon og spectinomycin ved å modifisera hydroksylgruppa i 9-posisjon. ANT(3'') er funne i kliniske isolat frå mange ulike Gram-negative bakteriar(6).

### 2.2.3.3 Aminoglykosid O-fosfotransferasar (APH)

Aminoglykosid O-fosfotransferasar (APH) modifiserer aminoglykosid ved å katalysera overføringa av ei fosfatgruppe til hydroksylgrupper på aminoglykosidet ved å bruka ATP som donorsubstrat, som vist i figur 7. APH er delt inn i sju hovudklassar ut frå kva hydroksylgruppe på aminoglykosidet dei fosforylerer; APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(4), APH(7'') og APH(9)(6).



**Figur 7:** Viser korleis APH(3') brukar ATP som donorsubstrat for å fosforylera kanamycin A(6).

APH tilhøyrer ein superfamilie av kinasar, og modifierer dei fleste klassane av aminoglykosid. Til no er det identifisert over 20 ulike APH, og substratspesifisiteten mellom desse enzyma varierer mykje(3). APH er mest relevante i klinisk resistens mot Gram-positive bakteriar(4).

Den største hovudklassen av APH er APH(3'), som er delt inn i sju underklassar; APH(3')-I-VII. APH(3')-IIIa er det mest studerte av desse enzyma, og finst hovudsakleg i Gram-positive kokkar som til dømes stafylokokkar, men også i Gram-negative bakteriar. APH(3')-IIIa gir resistens mot eit breitt spekter av aminoglykosid, men ikkje mot gentamicin og tobramycin, sidan desse ikkje inneheld hydroksylgruppa i 3'-posisjon.

APH(2'') speler ei viktig rolle for resistens mot gentamicin i Gram-positive bakteriar. I tillegg kan desse enzyma også opptre i bifunksjonelle enzym saman med AAC. Slike bifunksjonelle enzym viser både acetyl- og fosforyltransferaseaktivitet, slik at aminoglykosida kan verta modifisert på fleire stadar(4). Bifunksjonelle enzym er funne i enterokokkar, stafylokokkar og streptokokkar, og gjer at bakteriane viser høg grad av resistens mot dei fleste klinisk relevante aminoglykosida(6).

APH(6) og APH(3'') gir begge resistens mot streptomycin. APH(4) og APH(7'') gir resistens mot hygromycin, medan APH(9) gir resistens mot spectinomycin, og desse tre enzymklassane er difor ikkje klinisk relevante(6).

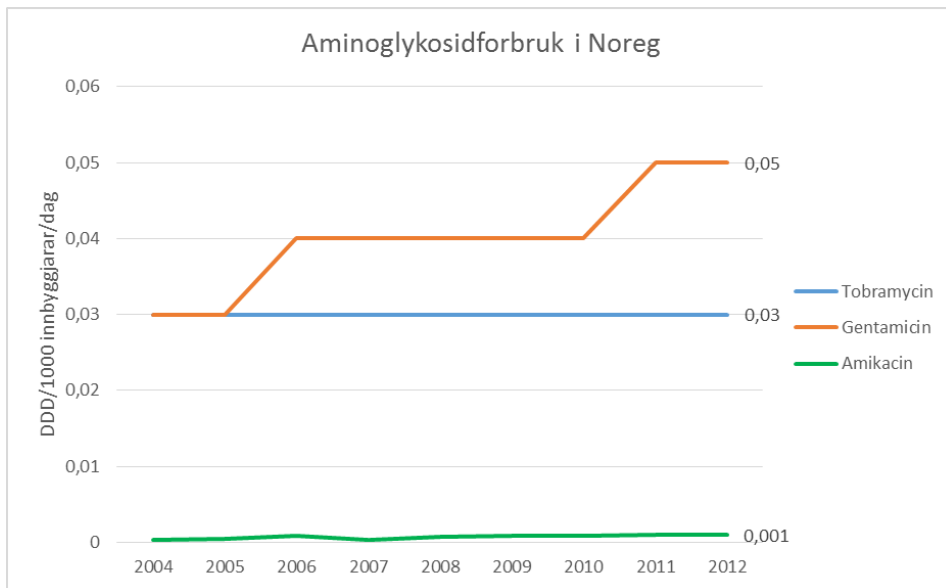
### 2.3 Bruk av aminoglykosid i Noreg

I Noreg er det berre tobramycin og gentamicin av aminoglykosida som er marknadsført for systemisk bruk(1). Begge er indisert mot alvorlege infeksjonar forårsaka av aminoglykosid-sensitive mikrobar, til dømes sepsis, endokarditt, øvre urinvegsinfeksjon og behandling av febril nøyotropeni(15). Amikacin vert også brukt i nokre høve, i hovudsak ved spesielle tilfelle av tuberkulose og mykobakterieinfeksjonar der mikroben er resistent mot dei vanlege midla, sidan amikacin har betre effekt mot mykobakteriar enn andre aminoglykosid(16).

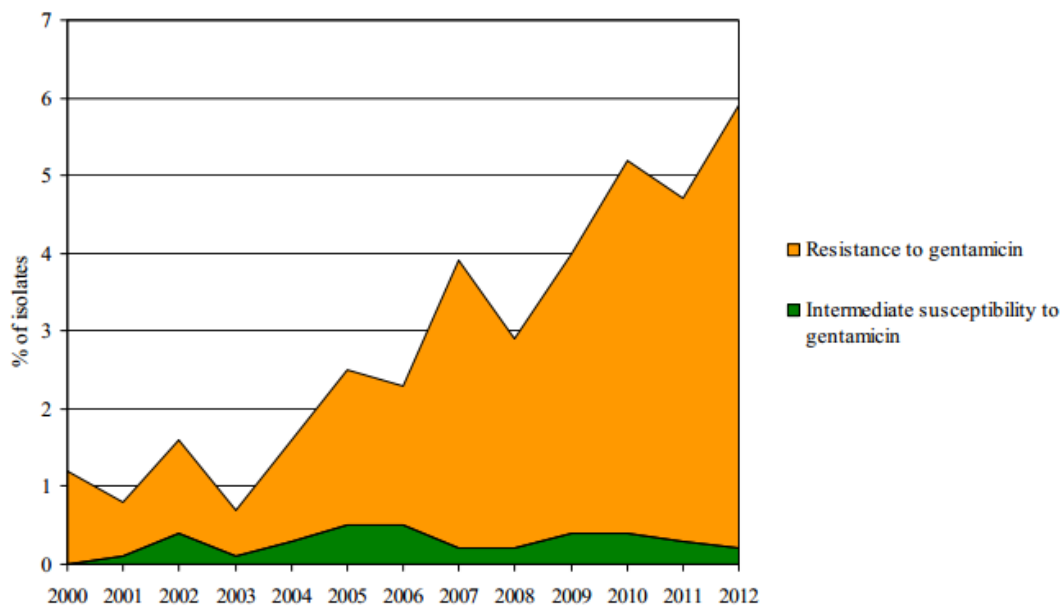
Gentamicin inngår i standardregimet for empirisk behandling av sepsis, i kombinasjon med penicillin G. Empirisk behandling vil seia å starta pasienten på antibiotika før det er kjent kva mikrobe som forårsakar infeksjonen. Sepsis er ein tilstand der pasienten vert allment påverka og får ein systemisk reaksjon på infeksjon. Sepsis er ein alvorleg og potensielt dødeleg tilstand, der rask og målretta behandling er viktig. Ved sepsis skal antibiotika administrerast så raskt som mogleg og helst innan ein time etter innlegging, sidan kvar time som går før oppstart av effektiv behandling har vist å auka mortalitet med ca. 7 %(17). Ved å kombinera eit aminoglykosid med eit celleveggsantibiotikum sikrar ein breispektra baktericid behandling som dekkjer både Gram-positive og Gram-negative bakteriar(15).

Av 12604 isolat frå blodkultur som vart registrert i Noreg i 2012 var 3006 forårsaka av *E. coli*, som difor er den klart vanlegaste mikroben og står for 31,4 % av blodkulturisolata, mot *S. aureus* som er den nest vanlegaste med 15,0 %(18).

Forbruket av aminoglykosid i Noreg dei siste 10 åra har halde seg stabilt og lågt, som vist av figur 8. Av dei tre aminoglykosida undersøkt i arbeidet med denne oppgåva, er gentamicin mest brukt med 0,05 DDD/1000 innbyggjarar per år i 2012, før tobramycin og amikacin med høvesvis 0,03 og 0,001 DDD/1000 innbyggjarar per år. Sjølv om forbruket har vore jamt lågt, er det vist ein auke i resistens mot gentamicin i blodkulturisolata av *E. coli*, som vist i figur 9. I år 2000 var ca. 1 % av isolata registrert i Noreg gentamicinresistente, og fram til år 2012 har resistensen auka til 5,7 %(18). Den auka resistensen er i hovudsak grunna dei to aminoglykosidmodifiserande enzymba AAC(3)-II og AAC(6')-Ib(19). Trenden som viser auka gentamicinresistens i blodkulturisolat er urovekkjande, og kan svekkja grunnlaget for å bruka gentamicin i empirisk behandling av sepsis i framtida(20).



**Figur 8:** Viser forbruket i DDD/1000 innbyggjarar/dag av aminoglykosida amikacin, gentamicin og tobramycin i Noreg i perioden 2004-2012. Tal henta frå NORM/NORM-VET rapporten 2012(18).



**Figur 9:** Viser prevalens av intermediær sensitivitet og resistens mot gentamicin i blodkulturisolat av *E. coli* i perioden 2000-2012(18).

Vanlegvis er det ein samanheng mellom auka forbruk av ein type antibiotika og auka resistens mot denne, men det er ikkje tilfelle med gentamicin. Det er føreslått at auka bruk av tredjegerasjons cefalosporin og ciprofloksacin dei siste åra har medverka til resistensutviklinga mot gentamicin. Auka eksponering for desse antibiotika kan vera med å selektera isolat som inneheld genkassetar med ko-resistens mot cefalosporin og ciprofloksacin i tillegg til aminoglykosid(20).

## 2.4 Massespektrometri

Massespektrometri er ein metode som vert brukt til å analysera massen og mengdeforholdet av atom, molekyl og fragment av molekyl i ein prøve. Prøvematerialet vert ionisert, separert og detektert ut frå deira  $m/z$ -ratio, der  $m$  er massen og  $z$  er ladninga til ionet. Eit massespektrometer er bygd opp av tre hovudkomponentar som opererer i vakuum; ei ionekjelde, ein masseanalysator og ein detektor. Ionekjelda ioniserer prøvematerialet, som kan vera gass, væske eller fast stoff. Iona vert så akselerert inn i masseanalysatoren ved å tilføra eit elektrisk eller magnetisk felt. Dei akselererte iona vandrar gjennom analysatoren og vert her separert etter  $m/z$ -ratio. Til slutt treff iona detektoren som registrerer den relative mengda av kvart ion ved dei ulike  $m/z$ -verdiane(21). Systemet er kopla til eit datasystem som gir eit massespekter for analysen. Massespekteret er ei todimensjonal framstilling av signalintensiteten til kvart av iona på  $y$ -aksen, mot  $m/z$ -verdiane til iona på  $x$ -aksen. Intensiteten av toppane i massespektera vert gitt som relative verdier i forhold til den høgaste toppen, basetoppen, i spekteret(22).

Det finst mange ulike former for massespektrometri som nyttar ulike teknikkar for ionisering og separasjon, og ein må velja den forma som er best eigna i forhold til kva prøvemateriale ein jobbar med.

### 2.4.1 Matriks-assistert laser desorpsjon/ionisering

Matriks-assistert laser desorpsjon/ionisering, eller MALDI, er ein mild ioniseringsmetode. Det vil seia at den kan brukast til å ionisera store biomolekyl som protein, som er for skjøre og vert fragmentert i for stor grad ved bruk av andre ioniseringsmetodar(23). Matriksar i MALDI er krystallinske, faste stoff, som har som oppgåve å isolera prøvemolekyla og fungera som ein mediator for energiabsorpsjon(21). Matriksen vert løyst i ein organisk solvent og lagt over prøvematerialet. Dette får tørka, og ved fordamping av solventen kokrystalliserer matriksen med prøven. På denne måten fortynnar matriksen prøven og isolerer prøvemolekyla frå kvarandre ved å fanga dei i ein krystallstruktur(24). I tillegg til dette, fungerer matriksen som ein mediator for energiabsorpsjon ved at matriksmolekyla inneheld ein kromofor, vanlegvis ein aromatisk ringstruktur, som gjer at dei kan absorbera bølglengder i det ultrafiolette området (UV-lys). Når prøven dekt med matriks vert bestrålt av ein fokusert UV-laser, vil matriksmolekyla absorbera strålinga, sublimerast og overføra prøvematerialet innebygd i krystallstrukturen til gassfase. Dette formar ei sky av ion og molekyl, og etter mange kollisjonar mellom desse vert det danna ion av prøvematerialet, som vert akselerert inn i masseanalysatoren(23). Det er også viktig at matriksen har lågt damptrykk, slik at den ikkje

fordampar i vakuomet som er i ionekjelda(24). Døme på to vanlege matriksar brukt i MALDI er 2,5-dihydroksy-benzosyre (2,5-DHB) for analyse av oligosakkarid og  $\alpha$ -cyano-4-hydroksykanelsyre (HCCA) for peptid og små protein. Val av riktig matriks har stor innverknad på kvaliteten av massespektra frå MALDI. Dette må ofte finnast ut ved prøving og feiling, men som ein hovudregel fungerer sterkt polare analyttar best med polare matriksar og ikkje-polare analyttar med ikkje-polare matriksar(24).

Ved ionisering med MALDI er vanleg danna ion protonerte molekylion  $[M+H]^+$  og produkt av kationisering av molekyliona  $[M+\text{alkali}]^+$  (til dømes med tillegg av natrium eller kalium) frå ionisering ved hjelp av matriksen. Direkte fotoionisering i UV-laseren kan også oppstå, og produkta av dette er radikalion  $M^+$ (24). I ioniseringa kan det dannast ion med enkel eller fleire ladningar. Ion som har enkel ladning vil koma på  $m/z$ -verdiar i massespektra som er tilsvarande molekylvekta til ionet. Viss iona har dobbel ladning, vil  $m/z$ -verdien vera ca. halvparten av molekylvekta til ionet sidan  $m/z$  er eit ratio av masse over ladning. Ved MALDI er det mogleg at ion med fleire ladningar vert danna, men ion med enkel ladning er det absolutt vanlegaste(25).

#### **2.4.2 Time of flight masseanalysator**

Time of flight eller TOF er ein type masseanalysator som separerer iona basert på tida dei brukar på å bevega seg gjennom eit driftrøyr, som vanlegvis er 1-2 meter langt(23). Metoden er bygd på prinsippet om at ion som har same kinetiske energi, men ulike masse vil ha ulike hastigheit. Iona vert akselerert ved hjelp av eit elektrisk felt, slik at alle iona får same kinetiske energi. Dei vandrar så gjennom eit driftrøyr med kjent lengde. Når ion med ulike masse vandrar mot detektoren i enden av driftrøyrret, vil dei lettare iona ha høgare hastigheit enn dei tyngre iona, og difor treffa detektoren først. For at dette skal fungera, må iona vera danna samtidig, eller innanfor eit tilstrekkeleg kort tidsintervall, slik at dei startar vandringa mot detektoren samtidig(21). Ionisering med MALDI oppfyller dette kravet, fordi iona vert danna frå korte laserpulsar, og MALDI-TOF massespektrometri har blitt ein etablert metode(22). I tillegg treng TOF-masseanalysatorar svært rask elektronikk for å måla flygetid, sidan denne ofte er få mikrosekund(23).

TOF-masseanalysatorar kan enten vera lineære eller innehalda ein reflektor. Lineær TOF er som forklart over; iona vert danna, akselerert og separert etter masse i vandringa gjennom driftrøyrret før dei treff detektoren. Lineær TOF er den enklaste versjonen av TOF-masseanalysator, men kan ha for låg oppløysing på massespektra til å skilja ion med  $m/z$

verdiar som ligg nær kvarandre. Dette skuldast at ikkje alle iona har heilt lik kinetisk energi eller vert danna nøyaktig samtidig før dei går inn i driftregionen, og difor kan ion som har same  $m/z$  og difor burde ha lik flygetid, treffa detektoren på ulik tid. Reflektor-TOF har løyst problemet med låg oppløysing på massespektera. Dette oppsettet inneheld ein reflektor, som er eit elektrisk felt, bak driftregionen. Iona treff reflektoren og vert bremsa til dei har null kinetisk energi, før dei vert sendt ut i ein ny bane mot ein detektor. Ion som treff reflektoren med høgare energi vil bruka lenger tid i reflektoren enn ion med lågare energi med same  $m/z$ -ratio, slik at dei vert sendt ut av reflektoren samtidig. På denne måten kan reflektoren kompensera for at ion med same  $m/z$  har ulik kinetisk energi, og difor auka oppløysinga på massespektera(21, 22).

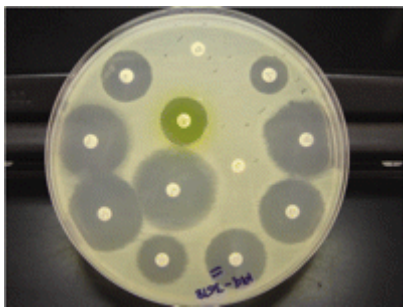
### **2.4.3 MALDI-TOF massespektrometri til identifisering av mikrobar**

Lenge har identifisering av mikrobar i kliniske mikrobiologiske laboratorium vore avhengig av biokjemiske og fenotypiske analysar som gramfarging og karakteristikk av bakteriekultur og vekst. Nokre av desse analysane har vorte automatiserte, men mange er avhengige av dyrking av mikrobane, og krev difor timar til dagar før identifiseringa av bakteriane er klar(26, 27). I tillegg inneber nokre av desse metodane subjektive vurderingar av prøveresultata. Påvising av species-spesifikke genområde ved hjelp av polymerase kjedereaksjon (PCR) eller DNA-sekvensering kan også brukast til påliteleg identifisering, men desse metodane er dyre og krev treningspersonale, og er difor ikkje tilgjengeleg i alle laboratorium(28). MALDI-TOF massespektrometri har difor vorte introdusert som ein metode for rask, enkel og billeg identifisering av mikrobar i mange laboratorium dei siste fem åra. Metoden baserer seg på dyrking og analysing av bakteriane ved søk mot ein database med massespekter av proteinprofilen som er karakteristisk for kvar bakterie(27). Identifisering av mikrobar ved bruk av MALDI-TOF massespektrometri sparar tid, både ved at ein slepp tidkrevjande analysar og langvarig dyrking, og i fleire tilfelle kan analysen på MALDI-TOF gjerast direkte frå biologisk prøvemateriale, som urin og positive blodkulturar eller etter kort tids dyrking av mikrobane i flytande medium(29). I tillegg har fleire studiar vist at MALDI-TOF er minst like påliteleg til identifisering av mikrobar som dei tradisjonelle metodane(27, 30). Mikrobiologisk avdeling ved Haukeland Universitetssjukehus tok i bruk MALDI-TOF massespektrometri som rutinemetode for identifisering av mikrobar i 2012.

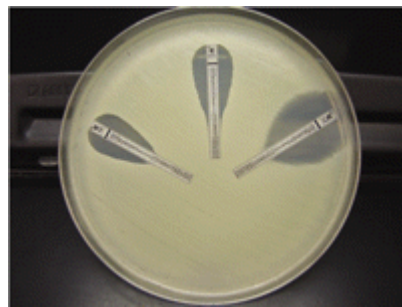


#### 2.4.4 MALDI-TOF massespektrometri til resistensbestemming

Vanlege metodar brukt rutinemessig til resistensbestemming av mikrobar er lappediffusjonstest og agar gradientdiffusjonstest. Desse metodane inneber som hovudregel at bakteriane først vert reindyrka på eit eigna vekstmedium over natt. I nokre tilfelle, som Gram-negative stavar, kan resistensbestemminga setjast opp direkte frå blodkultur, og reindyrking er ikkje nødvendig. Bakteriane vert så inokulert på nye agarskåler med eit tilsett antibiotikadepot. Lappediffusjonstest brukar papirlappar innsett med ein gitt antibiotikakonsentrasjon, som vert lagt på den inokulerte agarskåla, sjå figur 10 A. Antibiotika vil då diffundera ut i agaren rundt lappen. Skåla vert inkubert over natt og sona utan bakterievekst rundt lappen vert målt til næraste millimeter. Frå storleiken på hemmingssona kan det bestemmast om bakterien er sensitiv, intermediær sensitiv eller resistent mot gitt antibiotika. Agar gradientdiffusjonstest nyttar tynne plast- eller papirstrimlar som er innsett med antibiotika i ein tofalds konsentrasjonsgradient. Strimmelen vert lagt på ei inokulert agarskål og antibiotika vil diffundera ut i agaren i ein kontinuerleg gradient, sjå figur 10 B. Etter inkubering over natt kan minste inhibitoriske konsentrasjon (MIC) bestemmast ved å lesa av kvar hemmingssona kryssar strimmelen(31, 32). Begge desse metodane er relativt tidkrevjande, og gir ikkje svar på resistensbestemminga før etter eitt til to døgn. Det har difor vorte undersøkt i fleire arbeid om MALDI-TOF massespektrometri også kan brukast til resistensbestemming av mikrobar i tillegg til identifisering. Det er to ulike måtar å sjå etter antibiotikaresistens ved bruk av MALDI-TOF massespektrometri; direkte påvising av resistente isolat eller påvising av enzymatisk aktivitet(29).



A: Lappediffusjonstest



B: Gradientdiffusjonstest

**Figur 10:** Viser lappediffusjonstest (A) og agar gradientdiffusjonstest (B) for resistensbestemming av bakteriar(31).

Ved direkte påvising ser ein etter karakteristiske forskjellar i spektra frå resistente og sensitive stammer. Proteinmønsteret kan sjåast på som ein gjenspegling av gensekvensane som kodar for mangfaldet av dei karakteristiske proteintoppene i spektera, så dette vert også kalla den

genotypiske metoden. Dette er den mest ettertrakta metoden for å finna resistens ved MALDI-TOF massespektrometri, for viss dette fungerer, kan ein bestemma resistensmønsteret til mikroben frå same massespekter som vert brukt til identifisering, og ein sparar difor mykje tid(29). Arbeidet med å undersøkje om det er mogleg å skilja meticillinresistente *S. aureus* (MRSA) frå meticillinsensitive *S. aureus* (MSSA) ved direkte påvising med MALDI-TOF massespektrometri starta i år 2000, og det er gjort mange studiar av dette(33). Siste studie gjort i 2013 viste lovande resultat med karakteristiske spekter som kan visa forskjellar mellom MRSA og MSSA, men framleis er ikkje ein rutinemetode etablert(34). Eit anna døme på forsøk på direkte påvising av resistente isolat er vankomycinresistente enterokokkar (VRE). Ein studie i New Zealand viste at MALDI-TOF massespektrometri kunne skilja VRE frå vankomycinsensitive enterokokkar med høg spesifisitet og sensitivitet på høvesvis 98,1 og 96,7 %(35). Forsøket er ikkje reproduisert i andre studiar endå, og difor veit ein ikkje om dei gode resultatane kan skuldast ein gunstig epidemiologisk situasjon i området, og kor overførbar metoden er til andre laboratorium(29).

Påvising av enzymatisk aktivitet med MALDI-TOF massespektrometri leitar ikkje etter eit karakteristisk resistensspekter for bakteriane, men ser på ulike effektar av antibiotika på sensitive og resistente bakteriar. Eit mykje undersøkt område er påvising av  $\beta$ -laktamaseaktivitet med MALDI-TOF massespektrometri.  $\beta$ -laktamantibiotika vert inaktivert av enzymbet  $\beta$ -laktamasar ved hydrolysering av den sentrale  $\beta$ -laktamringen i denne typen antibiotika. Denne typen enzymatisk kløyving gir eit tillegg av vatn til antibiotikamolekylet, og molekylvekta aukar med 18 Da. Ved analysar med MALDI-TOF massespektrometri kan ein lett identifisera resistente stammer ved å sjå på masseskiftet på +18 Da for antibiotikatoppen. Stammer som er negative for  $\beta$ -laktamasar vil ikkje påverka molekylvekta til antibiotika, og toppen vil difor koma ved den opprinnelege molekylvekta for gitt antibiotika(29). Fleire ulike antibiotika har vorte undersøkt med denne metoden, mellom anna ampicillin, piperacillin, cefotaxim, ceftazidime, ertapenem, imipenem og meropenem(36). Resultatane av påvising av  $\beta$ -laktamasar med MALDI-TOF er langt raskare enn andre metodar. Dette kjem av at metoden er basert på enzymatisk aktivitet og ikkje dyrking av bakteriar, som krev lenger inkubering. For dei fleste  $\beta$ -laktamasar kan aktiviteten observerast etter berre 1-2 timar(29). Vanleg tidsbruk for heile analysen er rundt fire timar ved bruk av over-natt kulturar av bakteriar(37). Resistensbestemmingane kan difor vera klar same dagen som analysen vert sett opp, i motsetnad til dei tradisjonelle metodane som krev ytterlegare over-natt inkubering(36). MALDI-TOF masse-

spektrometri har difor vorte ein etablert og relativt påliteleg metode for påvising av  $\beta$ -laktamasar.

Den viktigaste resistensmekanismen mot aminoglykosid er som tidlegare nemnd aminoglykosidmodifiserande enzym (AME). AME overfører acetyl-, ATP-, eller fosforgrupper til aminoglykosida. Dette er meir komplekse transferasereaksjonar enn hydrolyseringa av  $\beta$ -laktam, fordi ulike kofaktorar er nødvendige for at enzyma skal ha tilstrekkeleg aktivitet. Modifiseringa av aminoglykosida kan skje på hydroksyl- eller aminogrupear av molekyla, og fleire ulike modifiseringar av same molekyl kan førekomma dersom fleire enzym er tilstades. Teoretisk sett skulle det gå an å påvisa enzymatisk aktivitet av AME med MALDI-TOF massespektrometri på tilsvarande måte som  $\beta$ -laktamasar. Dette har vorte forsøkt for tobramycin, kanamycin og neomycin med Gram-negative stavar som hadde påvist *aac(6')*-I med PCR(38). Studien viste at enzymatisk aktivitet kunne observerast, men resultatane var ikkje reproducerbare, og vidareutvikling av metoden er nødvendig for nøyaktig påvising av AME med MALDI-TOF massespektrometri.

## 2.5 Målet med oppgåva

Hovudmålet med denne oppgåva var å opparbeida ein metode som kunne gjera det mogleg med rutinemessig påvising av aminoglykosidresistens forårsaka av aminoglykosidmodifiserande enzym i *E. coli* med MALDI-TOF massespektrometri. Arbeidet tok utgangspunkt i metoden for påvising av  $\beta$ -laktamasar med MALDI-TOF massespektrometri utvikla av Bruker Daltonik GmbH. Tre kliniske *E. coli*-isolat som viste fenotypisk aminoglykosidresistens og hadde påvist gen for spesifikke AME vart analysert.

Vidare skulle *E. coli*-stammene typast med MLST for å undersøkje om dei høyrde til same eller relaterte sekvenstypar, som kunne vera meir mottakelege for mobile genetiske element eller særleg virulente. I tillegg skulle stammene analyserast med proteomikkexperiment. Målet med dette var å påvisa uttrykking av AME som var kjente for stammene og for å undersøkje om dei også uttrykte andre AME. Effekten av aminoglykosideksponering på dei kliniske isolata skulle også undersøkjast ved proteomikk. Målet med dette var å sjå på eventuelle forskjellar i uttrykking av AME før og etter at bakteriane var eksponert for aminoglykosid.

Oppgåva omfatta også forsøk som omhandla stabilitetstesting av aminoglykosidløysingar. Dette skulle utførast med buljong mikroforytning og kromatografisk testing av løysingane.

### 3. Materiale og metode

#### 3.1 Resistensprofil på stammene

Resistensprofilen til *E. coli*-stammene U15, BK15 og BK21 har vorte karakterisert i tidlegare arbeid, og er presentert i tabell 1 (20). Stammene er kliniske isolat frå Mikrobiologisk avdeling, Haukeland Universitetssjukehus. U15 er isolert frå urinkultur, medan BK15 og BK21 er isolert frå blodkulturar. Det vart gjort MIC-testar for stammene mot aminoglykosida gentamicin, kanamycin, streptomycin, amikacin, netilmicin og tobramycin. Gen for AME vart påvist ved hjelp av PCR, og frå dette vart det funne at U15 har genet *aac(6')-Ib-cr*, og BK15 og BK21 har genet *aac(3)-II*. AAC(6')-I som enzymklasse fører til resistens mot kanamycin, amikacin, netilmicin og tobramycin, men ikkje gentamicin(6). Dette stemmer overeins med MIC-målingane for U15 i tabell 1, som har særleg høge verdiar for kanamycin og tobramycin, og låg verdi for gentamicin. AAC(3)-II som enzymgruppe gir resistens mot tobramycin, gentamicin og netilmicin med fleire(6). MIC-målingane for BK15 og BK21 viser høge verdiar for gentamicin, netilmicin og tobramycin, noko som samsvarar med litteraturen.

**Tabell 1:** Viser detaljar for dei tre *E. coli*-stammene U15, BK15 og BK21. MIC-verdiane er for ulike aminoglykosid (G = gentamicin, K = kanamycin, S = streptomycin, A = amikacin, N = netilmicin og T = tobramycin).

ID	Navn	Isolat	MIC [mg/L]					AME-gen		
			G	K	S	A	N	T	<i>aac(3)-II</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
U15	<i>E. coli</i>	Urin	0,75	48	12	4	8	24	-	+
BK15	<i>E. coli</i>	Blodkultur	96	6	16	2	32	12	+	-
BK21	<i>E. coli</i>	Blodkultur	96	8	12	2	6	6	+	-

#### 3.2 Buljong mikrofortynning

Buljong mikrofortynning er ein standard metode for resistensbestemming av bakteriar. Metoden brukar tofalds fortynningsrekkejer av antibiotika i flytande vekstmedium, i 96-brønns mikrotiterplater. Det vert tilsett standardiserte mengder bakteriar til kvar brønn, dette vert inkubert over natt og brønnane vert undersøkt for synleg bakterievekst(31). Den lågaste antibiotikakonsentrasjonen som hindrar vekst gir MIC-verdien (minimal inhibitory concentration) for stamma. I dette arbeidet vart ikkje buljong mikrofortynning brukt til å resistensbestemma ukjente bakteriar, men til å testa stabiliteten av aminoglykosida ved å testa dei mot dei kjente, aminoglykosidsensitive bakteriestammene *E. coli* ATCC 25922 og *S. aureus* ATCC 29213.

## Materiale:

- Tobramycin sulfatsalt, produktnummer T1783 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Gentamicin sulfatsalt, produktnummer G1264 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amikacin sulfat, produktnummer A0365900 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Müller Hinton buljong (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- Sterilt fysiologisk saltvatn (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- *E. coli* ATCC 25922
- *S. aureus* ATCC 29213
- Mikrotiterplate: 96-brønns steril polystyren-mikrotiterplate, u-forma, produktnummer 650161 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Tyskland)

## Metode:

I tabell 2 er det vist forventede MIC-verdier for de sensitive bakteriestammene for de ulike aminoglykosida. For dette oppsettet vart det brukt to tofalds fortyningstrinn høgare og lågare enn dei forventede MIC-verdiane. Konsentrasjonane i fortyningsrekkjene var difor 16-0,125 mg/L for amikacin og 4-0,031 mg/L for gentamicin og tobramycin.

Ei utgangsløysing på 1 mg/mL av kvar av aminoglykosida vart laga ved å vega opp 5 mg av aminoglykosidsalta og løysa i 5 mL vatn. Desse løysingane vart fortynta i Müller Hinton-buljong til riktig konsentrasjon for forsøket. Konsentrasjonane vart justert i forhold til at det seinare skulle tilsetjast 5 µL bakterieoppslemming. Amikacin vart fortynta til 33,6 mg/L (168 µL av utgangsløysinga på 1 mg/mL i 4832 µL Müller Hinton buljong), slik at slutt-konsentrasjonen i den første brønnen vart 16 mg/L. Gentamicin og tobramycin vart fortynta til 8,4 mg/L (42 µL av utgangsløysinga på 1 mg/mL i 4958 µL Müller Hinton buljong), slik at slutt-konsentrasjonen i den første brønnen vart 4 mg/L.

**Tabell 2:** Viser dei forventede konsentrasjonsområda av MIC-verdier for *E. coli* ATCC 25922 og *S. aureus* ATCC 29213. Verdier henta frå Eucast routine quality control (39).

Aminoglykosid	MIC <i>S. aureus</i> ATCC 29213 [mg/L]	MIC <i>E. coli</i> ATCC 25922 [mg/L]
Amikacin	1-4	0,5-4
Gentamicin	0,12-1	0,25-1
Tobramycin	0,12-1	0,25-1

Oppsettet vart gjort i 96-brønns mikrotitrerplater med 8 rekkjer med 12 brønner. 100 µL Müller Hinton buljong vart tilsett til brønn 1-10 i alle rekkjene. Så vart 100 µL antibiotikaløysing i Müller Hinton buljong tilsett til brønn 2 og blanda godt ved pipettering. 100 µL frå brønn 2 vart pipettert vidare til brønn 3 og blanda godt. Dette vart gjentatt til og med brønn 9, der 100 µL vart tatt ut og kasta etter blanding. Brønn 1 var steril kontroll og inneheldt verken antibiotika eller bakteriar (berre Müller Hinton buljong). Brønn 10 var positiv kontroll og inneheldt ikkje antibiotika (berre Müller Hinton buljong og bakteriar).

Bakteriar vart sådd ut på blodagarskåler og inkubert ved 37 °C over natt. Neste dag vart bakteriemasse overført til 3 mL fysiologisk saltvatn og justert til 0,5 McFarland. Denne oppslemminga skal brukast innan 30 min. 5 µL av bakterieoppslemminga vart pipettert til alle brønnane, utanom den sterile kontrollen i rad 1. Det vart laga duplikat for kvar ulik bakteriestamme.

Den ferdige plata vart dekkja med lok for å hindra fordamping og kontaminasjon, og vart sett til inkubasjon ved 37 °C i  $18 \pm 2$  timar, før resultatane kunne lesast av neste dag.

### 3.3 MALDI-TOF-plate

Materiale:

- Tobramycin, gentamicin og amikacin sulfatsalt, (sjå mikro buljongfortynning) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 20 mM Tris-HCl-buffer med 20 mM NaCl, pH 7,0 (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- Matriks: HCCA matrix, portioned, produktnummer #255344 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland) Innhaldet i eitt røyr (1 porsjon) vart løyst i 250 µL OS.
- Alternativ matriks: 2,5 dihydroxy benzoic acid (2,5-DHB), produktnummer #8201346 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland)
- Organisk solvent (OS): 50 % acetonitril, 47,5 % vatn og 2,5 % trifluoreddiksyre
- Peptid-kalibreringsstandard: Peptide calibration standard 2 for mass spectrometry, som dekkjer masseområdet ca 700-3200 Da. (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland)
- N-Propionyl coenzym A litiumsalt, produktnummer P5397 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Müller Hinton buljong (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)

### **3.3.1 Oppsett av plata**

Ei utgangsløysing på 1 mg/mL av kvar av aminoglykosida løyst i vatn vart tillaga. Desse løysingane vart fordelt i 1 mL-porsjonar i eppendorfrøyr og lagra i frys (-20 °C). Frå utgangskonsentrasjonen på 1 mg/mL vart løysingane fortynna i Tris-HCl-buffer til ønska konsentrasjon for forsøket.

Frå den ferdig bufra aminoglykosidløysinga, vart 30 µL overført til eit eppendorfrøyr. Til dette vart det tilsett den mengda bakteriar som fyller ei 1 µL-ause (tilsvarar  $3-6 \times 10^8$  celler, eller 1 mL av McFarland 1-2). Ferske bakteriekulturar grodd på blodagarplater over natt vart brukt til forsøka.

Bakteriesuspensjonen i antibiotika vart inkubert på agitasjon ved 37 °C. Etter dette vart suspensjonen sentrifugert ved 13 000 rpm i 2 minutt ved romtemperatur.

1 µL av supernatanten vart pipettert til ein spot på MALDI-TOF-plata av stål og fekk lufttørka. Kvar prøve vart lagt i triplikat på plata. Etter tørking vart det lagt 1 µL HCCA-matriks over kvar spot. Denne fekk også lufttørka før prøvane vart analysert på MALDI-TOF Microflex™ (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland).

### **3.3.2 Kalibrering**

Rundt ei gong i veka skulle apparatet kalibrerast ved å analysa ein peptid-kalibreringsstandard. 1 µL av standarden vart lagt på plata, fekk lufttørka og vart dekkja med 1 µL matriks, som forklart over. Kalibreringsstandardene inneheld peptid med kjent molekylvekt, og fungerer som ein kontroll på at instrumentet detekterer riktig masse. Viss det er forskjell mellom den faktiske og den målte massen ved analysing av standarden, vert dette justert slik at instrumentet les den målte verdien som den kjente massen av standarden. Slik vert variasjonen mellom teoretisk og målt masse tatt høgd for, og dei vidare målingane vert korrigert til riktig verdi.

### **3.3.3 Endringar i oppsettet**

Metoden forklart over er basismetoden for forsøket, og er henta frå β-laktamase assay frå Bruker Daltonik. I løpet av arbeidet med oppgåva, vart vilkåra variert for å koma fram til ein metode som kunne fungera. Ved opparbeidinga av metoden vart det valt å berre bruka tobramycin. Endringane er forklart under.

**Konsentrasjon:**

Tobramycinkonsentrasjonar mellom 0,01-1 mg/mL fortynna i Tris-HCl buffer vart brukt.

**Laserintensitet:**

Ved dei jamlege kalibreringane vart laserintensiteten for apparatet justert for å gi best moglege spekter. Analysane fram til neste kalibrering vart automatisk gjort med denne intensiteten. Det vart også prøvd å justera intensiteten manuelt. For eit av forsøka vart like prøvar analysert med ulik laserintensitet mellom 29-34 %, for å sjå om dette gav innverknad på resultatata.

**Müller Hinton-buljong:**

Eit forsøk vart sett opp med Müller Hinton-buljong i staden for Tris-HCl buffer. Tobramycin-løysinga vart difor fortynna i Müller Hinton-buljong til riktig konsentrasjon, og resten av forsøket vart gjort som i basismetoden.

**Inkuberingstid:**

Det vart forsøkt å inkubera bakteriesuspensjonen med tobramycin i 1, 2 og 3 timar.

**Lysering:**

Eit forsøk vart sett opp der bakteriecellene vart lysert mekanisk før tilsetjing av tobramycin. Ein bakteriesuspensjon på 2 McFarland i TrisHCl-buffer vart laga. 800 µL av denne vart overført til 2 mL FastPrep®Lysing matrix A røyr, og røyrret vart køyrd i FastPrep®-24 ribolyser i 45 sekund ved 6,5 m/s. Løysinga vart sentrifugert ved 14000 rpm i 4 minutt. Supernatanten vart så tilsett til eit røyr med 30 µL 0,5 mg/mL tobramycin. Det vart forsøkt tilsetjing av både 10 og 20 µL av supernatanten. Resten av forsøket vart gjort som i basismetoden.

**Propionyl coenzym A:**

Det vart forsøkt å tilsetja propionyl CoA til prøvane før inkubering. 5 mg propionyl CoA vart løyst i 1 mL vatn og tilsett 1:1 i mol/mL i forhold til tobramycin i løysingane.

**Mengd bakteriar:**

Det vart forsøkt å auka mengda bakteriar ved å tilsetja ei overfylt 1 µL ause med bakteriemasse.

**Alternativ matriks:**

Eit forsøk vart gjort der det vart brukt 2,5-DHB i staden for HCCA som matriks. Oppsettet elles var likt som i basismetoden.



### 3.4 Kromatografisk testing

Materiale:

- Ferske 1 mg/mL-løysingar av amikacin, gentamicin og tobramycin i vatn. (Sjå buljong mikrofortynning. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1 mg/mL-løysingar av amikacin, gentamicin og tobramycin i vatn, som hadde vore fryst og ting 10 gonger, så sett tilbake i frys (fryst i 6 månadar)
- 1 mg/mL løysingar av amikacin, gentamicin og tobramycin i vatn, som hadde stått 2 veker i romtemperatur, så sett tilbake i frys (fryst i 6 månadar)
- 1 mg/mL løysingar av amikacin, gentamicin og tobramycin i vatn, som hadde vore fryst i 6 månadar
- 1 mg/mL-løysing av tobramycin i vatn, som hadde vore lagra i frys i 3 månadar.
- Sisomicin sulfatsalt, produktnummer S7796 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dei ulike aminoglykosidprøvane vart tint og fortynna 1:100 i vatn. Prøvane vart pipettert tre gonger frå originalrøyra, og kvar pipettering vart analysert i triplikat.

Sisomicin vart brukt som internstandard for amikacin og tobramycin. Sidan sisomicin har ein masse som berre er to Da lågare enn gentamicin C1a (høvesvis 447,5 og 449,5 Da), og difor interfererer med målinga av denne på grunn av førekomst av C13-isotopar, vart amikacin brukt som internstandard for gentamicin.

10 µL prøvemateriale vart injisert på eit Waters Acquity UPLC-system utan kolonne. Mobilfasen var isokratisk og inneheldt 0,2 % maursyre i vatn : metanol (70:30, v:v). Aminoglykosida vart detektert i eit Waters Xevo TQ-S tandem massespektrometer i positiv ESI modus ved multiple reaction monitoring (MRM). Transisjonane som vart brukt var 586,19-163,09 for amikacin, 468,23-163,08 for tobramycin, 478,30-157,20 for gentamicin C1, 464,30-322,30 for gentamicin C2, 450,30-322,30 for gentamicin C1a og 448,24-160,10 for sisomicin.

### 3.5 Multi locus sequence typing (MLST)

Multilocus sequence typing (MLST) er ein metode som vert brukt til å karakterisera og klassifisera bakteriestammer ved å sjå på endringar i hushaldningsgen. Hushaldningsgen er gen som er nødvendige for å oppretthalda grunnleggjande funksjonar i cella, og er tilstades i alle celler ved normale forhold. MLST brukar PCR for å amplifisera fleire hushaldningsgen, i dette tilfellet 7. Fragment på rundt 450-500 basepar vert brukt, og desse vert rekna å gi eit representativt utval av mangfaldet i genomet. Etter amplifisering frå genomisk DNA, vert gena amplifisert med forward og reverse primer i fråskilte reaksjonar. Gena vert så analysert med sanger-sekvensering, og ein får kromatogram for kvart av hushaldningsgena. Kromatogramma frå forward og reverse reaksjon vert samanlikna og gir nukleotidsekvensen for hushaldningsgenet. Ulike nukleotidsekvensar representerer ulike allel for gitt lokus, og desse vert namngitt med allelnummer. Allelprofilen for dei sju hushaldningsgena sett samla gir sekvenstypen for bakteriestamma(40, 41).

Materiale:

- H<sub>2</sub>O: Nuclease-free water, 50 mL (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- Primerar: spesialbestilt, custom DNA and RNA oligos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Agarose for routine use, produktnummer A9539 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-acetat-EDTA (TAE)-buffer: 40 mM Tris-HCl, 20 mM eddiksyre, 1 mM EDTA, pH 8,5 (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- GelRed Nucleic Acid Stain, 10000 x in water, produktnummer 41003 (Biotium, Hayward, CA, USA)
- Molekylvektsmarkør: EZLoad™ 100 bp molecular ruler, 50 µg/mL (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems® for Life Technology Corporation, Carlsbad, CA, USA)
- Sekvenseringsbuffer: BigDye® Sequencing buffer (Applied Biosystems® for Life Technology Corporation, Carlsbad, CA, USA)

### 3.5.1 Frigiving av DNA frå bakteriane

*E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15 vart sådd ut på blodagarplater og inkubert i 18 timar over natt ved 37 °C. Neste dag vart ein godt isolert koloni plukka frå plata med ei ause og overført til 50 µL sterilt vatn. Prøvene vart sett i ein Thermomixer og kokt ved 95 °C i 10 minutt ved 350 rpm for å opna celleveggen og frigi DNA. Prøvene vart sentrifugert ved 14000 x g i 5 minutt og sett på is. Mengda av DNA i supernatanten vart målt ved bruk av NanoDrop™ spektrofotometer. Supernatanten vart vidare brukt som templat for polymerasekjedereaksjon (PCR).

### 3.5.2 Polymerasekjedereaksjon 1, amplifisering frå genomisk DNA

**Tabell 3:** viser detaljar for dei sju hushaldningsgena og dei tilhøyrande primerane brukt i PCR-reaksjonane(42).

Lokus	Primer	Primersekvens	Storleik på PCR-produkt	Genprodukt
<i>aspC</i>	aspC-F4	5' - GTT TCG TGC CGA TGA ACG TC - 3'	594 bp	Aspartat-aminotransferase
	aspC-R7	5' - AAA CCC TGG TAA GCG AAG TC - 3'		
<i>clpX</i>	clpX-F6	5' - CTG GCG GTC GCG GTA TAC AA - 3'	672 bp	ATP-bindande sub-eining av clp-protease
	clpX-R1	5' - GAC AAC CGG CAG ACG ACC AA - 3'		
<i>fadD</i>	fadD-F6	5' - GCT GCC GCT GTA TCA CAT TT - 3'	580 bp	Acyl-CoA syntetase
	fadD-R3	5' - GCG CAG GAA TCC TTC TTC AT - 3'		
<i>icdA</i>	icd-F2	5' - CTG CGC CAG GAA CTG GAT CT - 3'	669 bp	Isositrat-dehydrogenase
	icd-R2	5' - ACC GTG GGT GGC TTC AAA CA - 3'		
<i>lysP</i>	lysP-F1	5' - CTT ACG CCG TGA ATT AAA GG - 3'	628 bp	Lysinspesifikk permease
	lysP-R8	5' - GGT TCC CTG GAA AGA GAA GC - 3'		
<i>mdh</i>	mdh-F3	5' - GTC GAT CTG AGC CAT ATC CCT AC - 3'	650 bp	Malatdehydrogenase
	mdh-R4	5' - TAC TGA CCG TCG CCT TCA AC - 3'		
<i>uidA</i>	uidA-277F	5' - CAT TAC GGC AAA GTG TGG GTC AAT - 3'	658 bp	β-glukoronidase
	uidA-934R	5' - CCA TCA GCA CGT TAT CGA ATC CTT - 3'		

For kvart av dei sju hushaldningsgena i tabell 3 vart det førebudd PCR-reaksjonar som inneheld både forward og reverse primer. 7 PCR-røyr for kvar av dei tre bakteriestammene vart tilsett 18  $\mu\text{L}$  vatn, 1  $\mu\text{L}$  av kvar av dei to primerane for kvart gen, 25  $\mu\text{L}$  GoTaq® Green Master Mix og 5  $\mu\text{L}$  templat (supernatanten frå førre avsnitt). Viss pelleten med cellerestar frå bakteriane var stor, vart volumet av templatet redusert. Mengda vatn vart då også justert, slik at totalvolumet i PCR-røyra vart 50  $\mu\text{L}$ . Innhaldet i røyra vart spunne ned og sett i Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR-maskin på programmet vist i tabell 4.

**Tabell 4:** Viser PCR-programmet ved amplifisering frå genomisk DNA.

Steg	Termosyklus	Temperatur [°C]	Tid [minutt]	Antal syklusar
1	Start	95	5.00	1
2	Denaturering	95	0.45	35
	Hybridisering	58	0.45	
	Polymerisering	72	0.40	
3	Avslutt	72	7.00	1
4	Hold	12	$\infty$	1

### 3.5.3 Agarose gelelektroforese

1 % agarosegel vart laga ved å løysa 1 g agarose i 100 mL TAE-buffer og varma blandinga i ein mikrobølgeovn. 1  $\mu\text{L}$  GelRed™ vart tilsett per 25 mL gel for å kunna synleggjera DNA-banda i gelen etter køyring. Etter avkjøling vart gelen tømt over i ei form og ein kam vart sett i. Då gelen hadde stivna, vart det tømt nok TAE-buffer over til å dekkja den heilt, og kammen vart fjerna forsiktig. 5  $\mu\text{L}$  EZLoad™ molekylvektsmarkør vart overført til den første brønnen i gelen. Vidare vart 5  $\mu\text{L}$  av prøvane overført til kvar sin brønn, og gelen vart køyrd ved 150 V i ca 30 min. GoTaq Green master mix har høg nok tettleik til at prøvane kan brukast direkte i gelen, og ikkje treng å tilsetjast loading buffer. Etter køyring vart banda i gelen framkalla og tatt bilete av under UV-lys.

### 3.5.4 Reinsing av PCR-produkt

5  $\mu\text{L}$  av PCR-reaksjonsproduktet vart tilsett 2  $\mu\text{L}$  ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. Dette vart inkubert ved 37 °C i 15 minutt for å fjerna gjenverande primerar og nukleotidar. Vidare vart blandinga inkubert ved 80 °C i 15 minutt for å deaktivera ExoSAP-IT®. Inkuberingsstega vart gjort i Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR-maskin. Det reinsa PCR-produktet vart fortynna

10 gonger ved å blanda 1  $\mu\text{L}$  reinsa PCR-produkt med 9  $\mu\text{L}$  vatn. Konsentrasjonen av DNA i dei 7 prøvane for kvar bakteriestamme vart målt ved bruk av NanoDrop™ spektrofotometer.

### 3.5.5 Polymerasekjedereaksjon 2, amplifisering for sekvensering.

Ein ny PCR-reaksjon vart sett opp, og kvart gen vart amplifisert med begge primerane, men i fråskilte reaksjonar, slik at kvart røyr berre inneheld forward eller reverse primer. 14 PCR-røyr for kvar stamme vart difor tilsett 6  $\mu\text{L}$  vatn, 1  $\mu\text{L}$  primer, 1  $\mu\text{L}$  10x fortynna DNA-templat (frå førre PCR-reaksjon), 1  $\mu\text{L}$  sekvenseringsbuffer og 1  $\mu\text{L}$  BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix til eit totalvolum på 10  $\mu\text{L}$ . Innhaldet i røyra vart spunne ned og sett i Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR-maskin på programmet vist i tabell 5. PCR-produkta vart så sendt til sekvensering.

**Tabell 5:** Viser PCR-programmet brukt ved amplifisering for sekvensering.

Steg	Termosyklus	Temperatur [°C]	Tid [minutt]	Antal syklusar
1	Start	96	5.00	1
2	Denaturering	96	0.30	25
	Hybridisering	58	0.15	
	Polymerisering	60	4.00	
3	Avslutt	72	15.00	1
4	Hold	12	$\infty$	1

### 3.6 Prøveopparbeiding for proteomikk

Filter aided sample preparation (FASP) er ein metode som vert brukt til å omforma protein ekstrahert frå biologisk materiale til peptid som er passende til proteomiske analysar med massespektometri. For å folda ut proteina og gjera dei løyselege, vert natrium-laurylsulfat (SDS) og dithiotretiol (DTT) tilsett. Desse er nødvendige for å få alle peptida, inkludert membranprotein, lineære og i løysing, men kan skapa problem ved enzymatisk kløyving og kan dominera massespektera. FASP-metoden har løyst dette ved at SDS og DTT vert tilsett før prøvane vert overført til filter. Filtera held tilbake dei lineære proteina, men tillet utvasking av detergentar ved å tilsetja konsentrert urealøysing. Ved hjelp av filtera får ein også vaska ut salt og andre reagensar av låg molekylvekt. Etter vasking vert endoproteasar for enzymatisk kløyving av peptida tilsett filtera og dette vert inkubert. Etter inkubering kan dei kløyvde

peptida vaskast ut av filtera med vatn. Peptida som ikkje vart kløyvd av enzyma sit att i filtera, og kan vidare behandlast med andre enzym. FASP gir difor prøvar frie for detergentar, i tillegg til at filtereiningane fungerer som reaksjonsstad for den enzymatiske kløyvinga av peptida og separerar dei kløyvde peptida frå dei ubehandla(43, 44).

Materiale:

- 10 mL tris-bufra saltvatn (TBS): 50 mM Tris, 150 mM NaCl. (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- 10 mL ekstraksjonsbuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 med 2,5 % natriumlaurylsulfat (SDS). SDS: UltraPure SDS solution 10 %, produktnummer 24730-020 (Invotrogen™, Life Technology Corporation, Carlsbad, CA, USA)
- 1 mL dithiothreitol (DTT)-løysing: 10 mM DTT i 100 mM ammoniumbikarbonat
- 5 mL urealøysing (UA): 8 M urea i 0,1 M Tris-HCl, pH 8.5. Urea, produktnummer U5128 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 0,5 mL 0,05 M jodacetamid i UA: iodoacetamide, produktnummer 163-2109 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Tris-HCl buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- LysC stock: lysyl endopeptidase MS, produktnummer 125-05061, 10 µg/µL i 50 mM Tris-HCl-buffer, pH 8,5, enzym-til-protein-ratio 1:50, 30 °C. (Wako chemicals USA Inc, Virginia, USA)
- Trypsin stock: Sequence grade modified trypsin, produktnummer V5111, 0,4 µg/µL i 40 mM ammoniumbikarbonat-buffer, enzym-til-protein-ratio 1:100, 37 °C. (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- 60 % acetonitril med 0,1 % metansyre: acetonitrile LC-MS Chromasolv®, produktnummer 34967 Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 80 % acetonitril med 0,1 % metansyre: acetonitrile LC-MS Chromasolv®, produktnummer 34967 Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- H<sub>2</sub>O: Water Chromasolv®Plus for HPLC, produktnummer 34877 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Blodagarplater med 12 µg/mL tobramycin (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)
- Blodagarplater med 48 µg/mL gentamicin (Substratlab, MIA, 4. Etg labbygget)

NB: Urea- og jodacetamidløysingane skal vera nylaga og brukast innan ein dag.

### **3.6.1 Dyrking av bakteriar**

Dei to *E. coli*-stammene BK15 og U15 vart sådd ut på blodagarplater og inkubert i 18 timar over natt ved 37 °C.

Vidare skulle bakteriane dyrkast med og utan antibiotikæksponering. Blodagarplater som inneheld ½ MIC-konsentrasjon, 12 µg/mL tobramycin for U15-stamma og 48 µg/mL gentamicin for BK15-stamma, vart difor tillaga (sjå tabell 1). Bakteriemasse som fylte ei 10 µL ause for kvar av dei to stammene vart resuspendert i 1,2 mL buljong. 200 µL av denne suspensjonen vart overført til nye plater og fordelt jamt. BK15 vart på denne måten sådd ut på tre vanlege blodagarplater og tre blodagarplater med 48 µg/mL gentamicin. U15 vart sådd ut på tre vanlege blodagarplater og tre blodagarplater med 12 µg/mL tobramycin. Platene vart inkubert i 18 timar over natt ved 37 °C.

### **3.6.2 Hausting av celler**

Veksten på platene frå dag to vart skrappt av og resuspendert i 1 mL TBS ved pipettering og/eller bruk av vortex. Ut frå mengda av vekst vart det vurdert om ein måtte bruka bakteriemasse frå to eller tre plater. Fire røyr vart tillaga; for kvar av dei to stammene på vanlege blodagarplater, og for BK15 og U15 på blodagarplater med aminoglykosid. Under det vidare arbeidet vart røyra oppbevart på is. Prøvane vart sentrifugert i 10-20 min ved 6000 x g, 4 °C. Supernatanten vart forsiktig fjerna ved pipettering og pelleten vart resuspendert i 1 mL TBS. Røyra vart igjen sentrifugert i 10-20 min ved 6000 x g, 4 °C. Supernatanten vart forsiktig fjerna ved pipettering og pelleten på ca 50-100 mg vart resuspendert i 1 mL ekstraksjonsbuffer. Suspensjonen vart overført til 2 mL FastPrep®Lysing matrix A røyr, og oppbevart på is.

### **3.6.3 Mekanisk lysering av bakteriecellene**

For å lysera bakteriecellene vart røyra køyrd i FastPrep®-24 ribolyser i 45 sekund ved 6,5 m/s og kjølt på is i 5 minutt. Etter lysering vart prøvane sentrifugert i 45 minutt ved 10000 x g, 4 °C. 500 µL av supernatanten vart overført til eit eppendorfrøyr og sett på is. Protein-konsentrasjonen i prøvane vart bestemt med Direct Detect™ spektrometer. Viss prøvane ikkje skal brukast direkte, kan dei lagrast i inntil 2 dagar ved 4°C.

### 3.6.4 Filter Aided Sample Preparation (FASP)-metode

LysC:

Ut frå målingane av proteinkonsentrasjon, vart kvar av prøvane fortynna med vatn til ei løysing på 50  $\mu\text{L}$  med 100  $\mu\text{g}$  totalt proteininnhald. Det vart tilsett 1  $\mu\text{L}$  DTT per 10  $\mu\text{L}$  prøve og røyra vart sett til inkubering ved 56  $^{\circ}\text{C}$  i 45 minutt. Prøvene vart no overført til filtereiningar på reine oppsamlingsrøyr, 200  $\mu\text{L}$  UA vart tilsett og røyra vart sentrifugert ved 14000 x g i 15 minutt. Nye 200  $\mu\text{L}$  UA vart tilsett og prøvane vart sentrifugert ved 14000 x g i 15 minutt. Væska som var samla opp i røyra så langt vart kasta. 100  $\mu\text{L}$  jodacetamidløysing vart tilsett til filtera og blanda ved 600 rpm i ein Thermomixer i 1 minutt før prøvane vart inkubert i mørke i 20 minutt. Røyra vart sentrifugert ved 14000 x g i 10 minutt. 100  $\mu\text{L}$  UA vart tilsett filtera og røyra vart sentrifugert ved 14000 x g i 15 minutt. Dette steget vart gjentatt 2 gonger. 100  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl buffer vart tilsett og røyra vart sentrifugert ved 14000 x g i 10 minutt. Dette steget vart gjentatt 2 gonger. 50  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl buffer med 2  $\mu\text{g}$  LysC (enzym-til-protein-ratio 1:50) vart tilsett og blanda ved 600 rpm i ein Thermomixer i 1 minutt. Prøvene vart inkubert i eit vått kammer ved 30  $^{\circ}\text{C}$  i 4-18 timar (gjerne over natt).

Nye oppsamlingsrøyr vart sett på filtera. Kløyvingsprodukta av LysC frå førre dag vart samla opp ved å sentrifugera røyra ved 14000 x g i 15 minutt. 50  $\mu\text{L}$  vatn vart tilsett filtera og prøvane vart sentrifugert ved 14000 x g i 15 minutt. Dette steget vart gjentatt 2 gonger. Filtera vart tatt av oppsamlingsrøyra og sett på nye røyr. Røyra med eluat frå kløyvinga med LysC vart sett i SpeedVac vakuumpkonsentrator der volumet vart redusert til rundt 25  $\mu\text{L}$ , noko som tok ca 1,5 timar. Etter konsentrering vart prøvane filtrert gjennom Stage-spissar med C8 Empore filter:

Stage-spissane vart laga til ved å stikka ut tre C8 Empore filter og plassera desse oppå kvarandre i ein pipettespiss. 20  $\mu\text{L}$  60 % acetonitril med 0,1 % metansyre vart tilsett Stage-spissane for å væte kolonna. Dette vart pressa gjennom filteret med ei sprøyte og kasta. Prøvene vart overført til Stage-spissane, pressa sakte gjennom filtera med sprøyta og samla opp i eppendorfrøyr. 20  $\mu\text{L}$  80 % acetonitril med 0,1 % metansyre vart tilsett Stage-spissane, pressa sakte gjennom og samla i same røyr som i førre punkt. Dette steget vart gjort for å sikra at alle peptida vart eluert. Prøvene vart til slutt sett i SpeedVac til dei var tørre, ca. ein time.



Trypsin:

Filtera på dei nye oppsamlingsrøyra vart tilsett 40  $\mu\text{L}$  40 mM ammoniumbikarbonat-buffer med 1  $\mu\text{g}$  trypsin (enzym-til-protein-ratio 1:100) og blanda ved 600 rpm i ein Thermomixer i 1 minutt. Prøvane vart inkubert i eit vått kammer ved 37 °C i 4-18 timar (gjerne over natt).

Prøvane vart sentrifugert ved 14000 x g i 15 minutt for å samla opp kløyvingsprodukta med trypsin. 100  $\mu\text{L}$  vatn vart tilsett filtera og røyra vart sentrifugert ved 14000 x g i 15 minutt. Dette steget vart gjentatt 2 gonger. Oppsamlingsrøyra vart sett i SpeedVac der volumet vart redusert til rundt 25  $\mu\text{L}$ . Etter konsentrering vart desse prøvane, med kløyvingsprodukt frå trypsin, filtrert gjennom Stage-spissar med C8 Empore filter og tørka med SpeedVac på same måte som produkta frå kløyving med LysC.

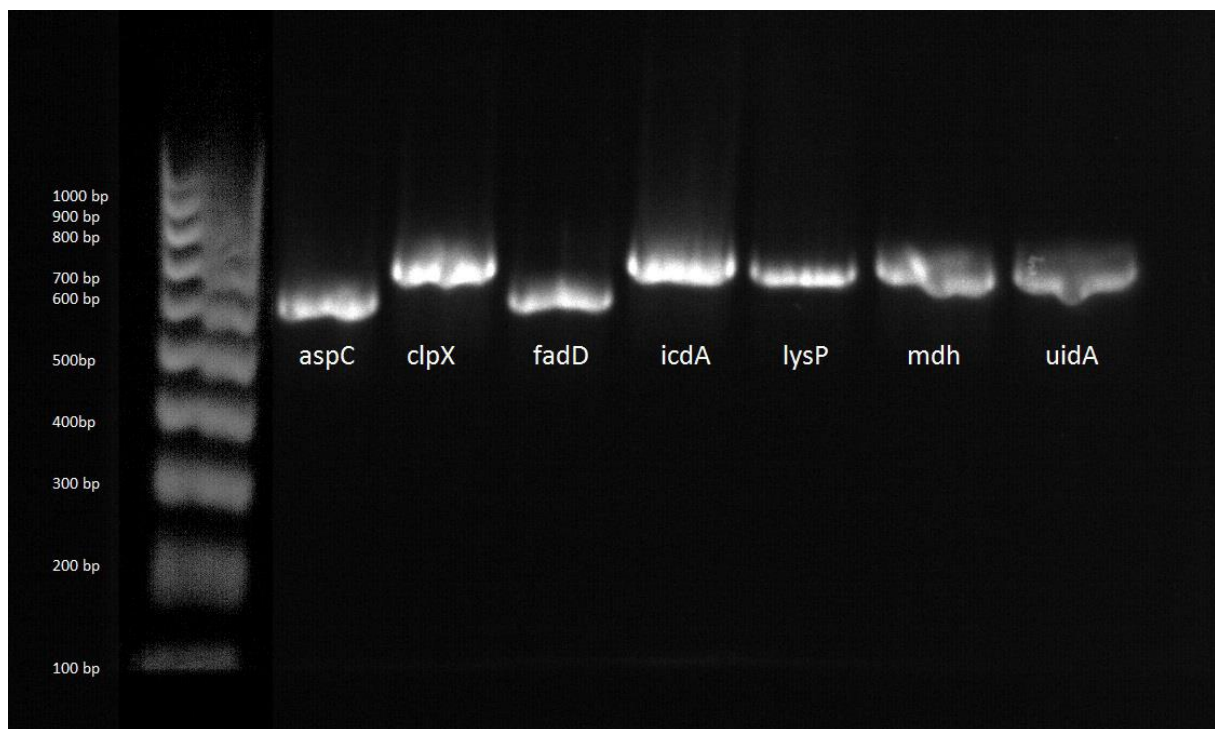
Prøvane med kløyvingsprodukt med LysC og trypsin vart sendt til analysering med LC-MS/MS.

## 4. Resultat

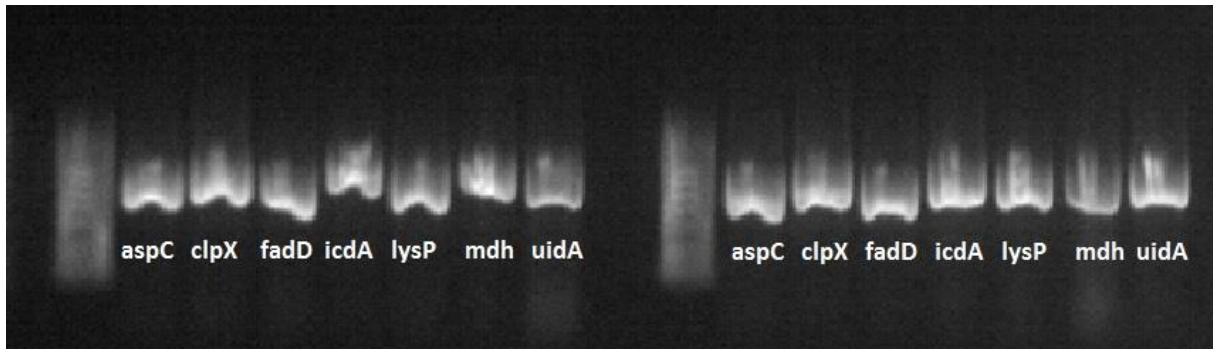
### 4.1 Karakterisering av stammene

#### 4.1.1 MLST

MLST vart gjort for å undersøkje eventuelt slektskap mellom *E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15 og plassera stammene fylogenetisk. Etter amplifisering av dei 7 hushaldningsgena frå genomisk DNA vart PCR-produkta køyrd i ein agarosegel for å fastslå at prøvane inneheld riktig produkt. Figur 11 viser banda i agarosegelen for *E. coli*-stamma BK15, og figur 12 viser banda for BK21 til venstre og U15 til høgre. Lengst til venstre i figurane er molekylvektsmarkøren for å kunna samanlikna storleiken og mengda av PCR-produkta.



**Figur 11:** Viser DNA-banda i agarosegelen for *E. coli*-stamma BK15. Brønn 1 (lengst til venstre) viser molekylvektsmarkøren, medan brønn 2-8 viser hushaldningsgena *aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh* og *uidA*.



**Figur 12:** Viser DNA-banda i agarosegelen for *E. coli*-stammene BK21 til venstre og U15 til høyre. Brønn 1 (lengst til venstre) viser molekylvektsmarkøren, medan brønn 2-8 viser hushaldningsgena *aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh* og *uidA* for kvar stamme.

Gelane viser at alle gena vart amplifisert opp i god mengd, og ein ser kun eitt band i kvar bane, som uttrykk for at PCR-produkta er reine. I figur 11 er banda for molekylvektsmarkøren relativt tydelege, og ein kan samanlikna storleiken på PCR-produkta med den oppgitte storleiken presentert i tabell 3. (metode) Her ser ein at riktig PCR-produkt er amplifisert. Frå figur 12 er det vanskelegare å samanlikna banda med molekylvektsmarkøren, fordi denne er utydeleg. Men ved å samanlikna banda for BK21 og U15 med banda for BK15, ser ein at desse har same mønster, og ein kan gå ut frå at riktig produkt er amplifisert også her.

Etter reinsing og fortynning av PCR-produkta frå den første amplifiseringsreaksjonen, vart konsentrasjonen av DNA i prøvane målt ved bruk av NanoDrop. Målingane er vist i tabell 6. Desse vart brukt for å kontrollera at riktig mengd templat vart tilsett i PCR-reaksjonen for sekvensering.

**Tabell 6:** Viser resultatata frå konsentrasjonsmålingar av DNA på NanoDrop™ for dei tre *E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15.

Gen	Konsentrasjon [ng/μL]		
	BK15	BK21	U15
<i>aspC</i>	164,1	108,5	128
<i>clpX</i>	188,3	205,7	154,5
<i>fadD</i>	145,6	188,2	134
<i>icdA</i>	119,3	148,3	127,1
<i>lysP</i>	128,9	126,7	128,1
<i>mdh</i>	118,6	131,4	143,9
<i>uidA</i>	105,8	132,4	125,6

Dei ulike allela av hushaldningsgena og sekvenstypene til dei tre *E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15 som vart identifisert ved MLST er presentert i tabell 7. For stammene BK15 og U15 vart alle allela gjenkjent i databasen, og stammene vart identifisert som høvesvis sekvenstype 85 og 34. For BK21 vart allela til seks av sju hushaldningsgen identifisert, men for *uidA* kom det ikkje noko klart treff. Sekvensen for *uidA* var ufullstendig og for kort til å dekkja heile allelet. I databasen var det kun ein tidlegare identifisert sekvenstype med same allelprofil på dei seks første hushaldningsgena som vart funne i vårt arbeid. Denne hadde allelnummer 1 for *uidA*, som gir sekvenstype 169. For sekvensen av *uidA* vart det funne 99,8 eller 100 % homologi med seks ulike alleltypar, inkludert alleltype 1. I sekvensen er det ein nukleotid i forskjell, ein noko brei topp i kromatogrammet som kan tolkast som to etterfølgande adeninbasar og dermed gi 100 % homologi med dei seks alleltypene. BK21 kan difor vera sekvenstype 169, men ein ny sekvenstype kan heller ikkje utelukkast.

**Tabell 7:** Viser allel- og sekvenstypene som vart identifisert ved MLST av dei sju hushaldningsgena *aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh* og *uidA* i dei tre *E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15.

	<i>aspC</i>	<i>clpX</i>	<i>fadD</i>	<i>icdA</i>	<i>lysP</i>	<i>mdh</i>	<i>uidA</i>	Sekvens- type	Klonal- gruppe
<b>BK15</b>	3	3	2	4	6	2	36	85	62
<b>BK21</b>	3	3	1	15	1	1	1?	169?	23
<b>U15</b>	21	53	56	8	40	55	72	34	N/A

#### 4.1.2 Proteomikk

Proteomikken vart gjort for å detektera dei AME som var påvist med PCR i dei resistente stammene, og for å undersøkje om stammene uttrykkjer eventuelle andre AME. I proteomikk-eksperimentet vart stammene BK15 og U15 analysert. Det vart laga til to prøvar for kvar stamme; ein der bakteriane vart eksponert for antibiotika og ein utan antibiotika-eksponering. Eksponeringa vart gjort ved å dyrka bakteriane på blodagarskåler som inneheldt aminoglykosid i ½ MIC-konsentrasjon for stammene. Peptida utvunne frå prøvane vart kløyvd med LysC og trypsin, før dei vart sendt til analysing med LC-MS/MS.

#### **BK15**

Massespektra etter LC-MS/MS frå prøvane vart analysert mot ein database med 163 ulike proteinsekvensar av kjente AME i programvara MaxQuant versjon 1.4.1.2 (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Tyskland), som vart brukt både til identifisering og kvantifisering av uttrykte AME. Dette søket gav ingen treff for BK15. Det vart seinare funne at

databasen var ufullstendig, og eit nytt søk mot ytterlegare 5 proteinsekvensar frå kjente AME vart gjort. Dette søket gav eit treff for BK15, og resultatane er presentert i tabell 8. Det vart funne at BK15 uttrykkjer AAC(3)-II, og dette vart identifisert ut frå ein peptidsekvens. Enzymet vart berre funne i prøven der stamma var eksponert for gentamicin (BK15+).

**Tabell 8:** Viser identifiserte AME i prøvane av BK15 med (BK15+) og utan (BK15-) gentamicineksponering.

Prøve	LFQ-intensitet (log2)	Protein ID	Peptidsekvens
BK15+	21,99	AAC(3)-II	TWLPFDPATAGTYR
BK15-	0	-	-

## U15

Massespektra etter LC-MS/MS frå U15-stamma vart analysert mot den same databasen med 163 ulike proteinsekvensar frå kjente AME, og resultatane er presentert i tabell 9. Dette søket gav treff for fire AME; AAC(6')-Ib3, AAC(6')-Ib-cr, ANT(3'')-Ia og APH(2'')-IVa. Av desse enzyma vart berre AAC(6')-Ib-cr identifisert i begge prøvane, både med (U15+) og utan (U15-) tobramycin-eksponering. AAC(6')-Ib3 og APH(2'')-IVa vart berre funne i U15-, medan ANT(3'')-Ia berre vart funne i U15+.

**Tabell 9:** Viser identifiserte AME i prøvane av U15 med (U15+) og utan (U15-) tobramycin-eksponering.

Protein-ID	LFQ intensitet (log2) U15-	LFQ intensitet (log2) U15+
AAC(6')-Ib3	24,08	-
AAC(6')-Ib-cr	30,19	29,88
ANT(3'')-Ia	-	22,18
APH(2'')-IVa	24,87	-

Det vart også gjort eit nytt søk, der peptidsekvensane frå U15-prøvane kun vart samanlikna med proteinsekvensen frå AAC(6')-Ib-cr, og resultatane er vist i tabell 10.

**Tabell 10:** Viser resultatane av søket med prøvane av U15 mot proteinsekvensen av AAC(6')-Ib-cr.

Prøve	LFQ intensitet (log2)	Protein ID	Antal sekvensar
U15+	29,86	AAC(6')-Ib-cr	9
U15-	30,20	AAC(6')-Ib-cr	10

Frå dette søket vart AAC(6')-Ib-cr identifisert frå 9 ulike peptidsekvensar i U15+, medan U15- hadde treff for 10 ulike sekvensar. Dei ulike sekvensane er vist i tabell 11. Sekvens nummer 4 var berre tilstades i U15-, og ikkje i U15+. Dei ni andre sekvensane vart funne i begge prøvane, både med og utan eksponering for tobramycin.

**Tabell 11:** Viser dei identifiserte peptidsekvensane som stammar frå AAC(6')-Ib-cr i prøvane av U15 med (U15+) og utan (U15-) tobramycin-eksponering.

Nummer	Peptidsekvens	Intensitet U15+ (log2)	Intensitet U15- (log2)
1	ALVELLFNDPEVTK	25,78	25,95
2	GIDQLLANASQLGK	27,55	27,73
3	IQTDPSPSNLR	25,62	26,34
4	IQTDPSPSNLRAIRCYK	0,00	25,56
5	LMTEHDLAMLYEWLNR	27,41	27,60
6	LVRALVELLFNDPEVTK	23,70	24,25
7	QGTVTTPYGPAVYMVQTR	22,32	23,02
8	SHIVEWWGGEEAR	21,95	22,05
9	WEEETDPGVR	26,17	25,98
10	YSIVTNSNDSVTLR	25,68	25,69

## 4.2 Stabilitetstesting av antibiotika

### 4.2.1 Buljong mikrofortynning

Buljong mikrofortynning vart utført fleire gonger i løpet av arbeidet med denne oppgåva, for å kontrollere at antibiotikaløysingane hadde forventa effekt. Då løysingane var nylaga, vart det sett opp buljong mikrofortynning på alle dei tre aminoglykosida med både *E. coli* ATCC 25922 og *S. aureus* ATCC 29213. Resultatet av dette er vist i tabell 12.

**Tabell 12:** Kolonnene til venstre for kvar av bakteriestammene viser dei målte MIC-verdiane for *E. coli* og *S. aureus* for nylaga løysingar av dei tre aminoglykosida. I kolonnene til høgre er forventa MIC, altså MIC-områda dei målte verdiane bør liggja innanfor.

Aminoglykosid	MIC <i>E. coli</i> ATCC 25922 [mg/L]		MIC <i>S. aureus</i> ATCC 29213 [mg/L]	
	Målt MIC	Forventa MIC	Målt MIC	Forventa MIC
<b>Amikacin</b>	0,5	0,5-4	1	1-4
<b>Gentamicin</b>	1	0,25-1	0,5	0,12-1
<b>Tobramycin</b>	0,5	0,25-1	0,5	0,12-1

Då aminoglykosida hadde vore lagra 2 månadar, vart det gjort ei ny buljong mikrofortynning med *E. coli* ATCC 25922. Denne gongen vart berre tobramycin testa, sidan det kun var denne som vart brukt i forsøka på MALDI-TOF. Resultata frå dette oppsettet er vist i tabell 13.

**Tabell 13:** Viser MIC for *E. coli* for tobramycin som hadde vore lagra 2 månadar i frys.

Aminoglykosid	MIC <i>E. coli</i> ATCC 25922 [mg/L]
Tobramycin	1

Etter 4 månadar lagring i frys, vart alle tre aminoglykosida kontrollert med buljong mikrofortynning med *E. coli* ATCC 25922. Resultata frå dette er vist i tabell 14.

**Tabell 14:** Viser MIC for *E. coli* for løysingar av dei tre aminoglykosida som hadde vore lagra 4 månadar i frys.

Aminoglykosid	MIC <i>E. coli</i> ATCC 25922 [mg/L]
Amikacin	1
Gentamicin	0,5
Tobramycin	0,5

Det vart også sett opp ei buljong mikrofortynning der dei kliniske *E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15 vart inkludert. Dette vart gjort for å sjå at dei kliniske stammene har høgare MIC enn kontrollstamma ATCC 25922. Det vart brukt same tobramycinkonsentrasjonar som i dei andre oppsetta (4-0,031 mg/L). Resultata frå dette oppsettet er vist i tabell 15. Kontrollstamma hadde hemma vekst frå 1 mg/L, medan dei kliniske isolata hadde vekst i alle brønnane.

**Tabell 15:** Viser resultata frå buljong mikrofortynning for tobramycin på alle fire *E. coli*-stammene.

Stamme	ATCC 25922	BK15	BK21	U15
MIC <i>E. coli</i> [mg/L]	1	>4	>4	>4

I løpet av arbeidet med oppgåva måtte ei ny tobramycinløysing lagast til, fordi det begynte å gå tomt for den første. Denne vart også kontrollert med buljong mikrofortynning med *E. coli* ATCC 25922, og resultata er vist i tabell 16.

**Tabell 16:** Viser MIC for *E. coli* for den andre nylaga tobramycinløysinga.

Aminoglykosid	MIC <i>E. coli</i> ATCC 25922 [mg/L]
Tobramycin (ny løysing)	1

Resultata frå dei ulike oppsetta av buljong mikrofortynning kan samanliknast med dei forventa MIC-områda for *E. coli* ATCC 25922 og *S. aureus* ATCC 29213 for dei ulike aminoglykosida, som vist i tabell 12. Her ser ein at alle resultata frå desse oppsetta ligg innanfor det forventa spekteret av MIC-verdiar.

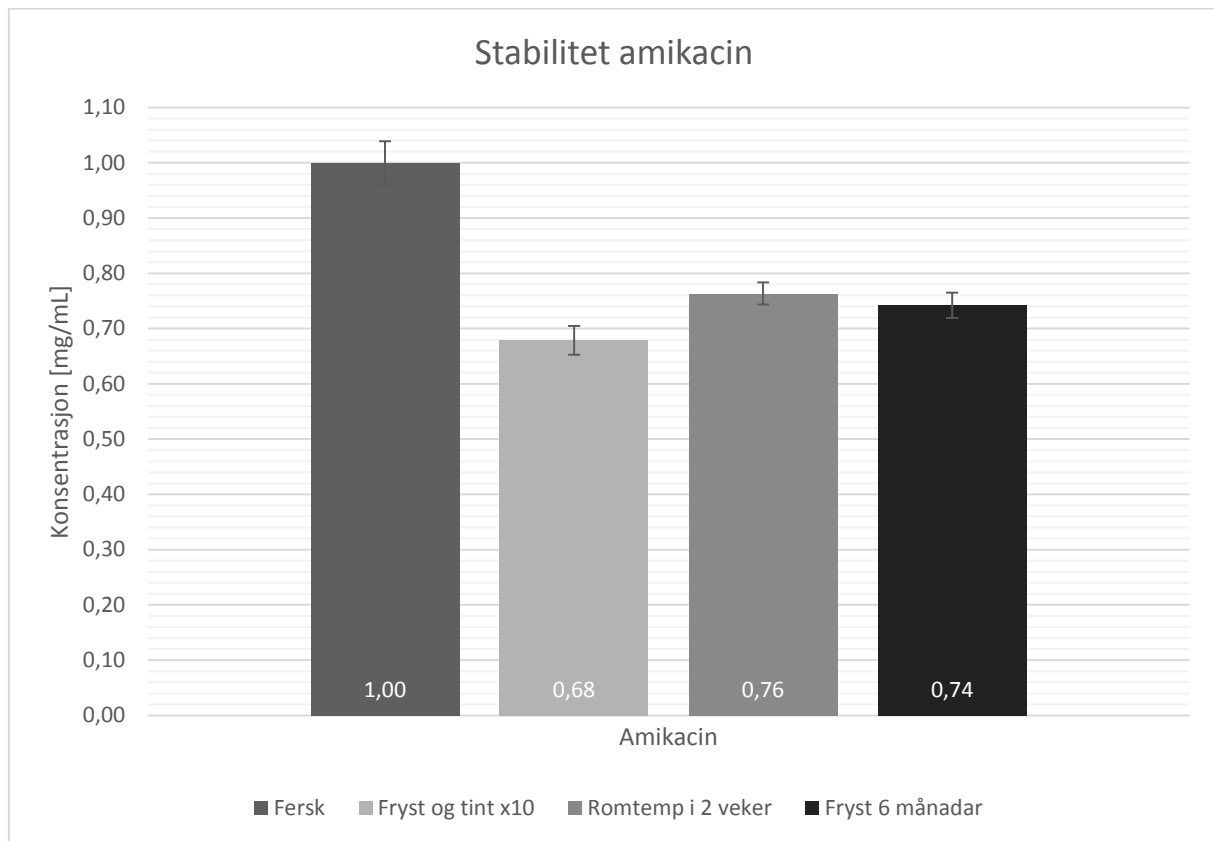
#### 4.2.2 Kromatografisk testing

I starten av arbeidet med oppgåva vart det laga 1 mg/mL-løysingar av dei tre aminoglykosida amikacin, gentamicin og tobramycin i vatn. Løysingane vart fordelt i mindre prøvar som vart behandla ulikt. Prøvane omfatta aminoglykosidløysingar som hadde stått i frys i 6 månadar, løysingar som fekk stå i romtemperatur i 2 veker før dei vart sett tilbake i frys, løysingar som hadde vore fryst og tint 10 gonger før dei vart sett tilbake i frys og for tobramycin ei løysing av ein ny batch som hadde vore lagra i frys i 3 månadar. Desse vart analysert ved LC-MS/MS saman med nylaga løysingar av dei tre aminoglykosida. Resultata for konsentrasjonsmålingane er vist i figur 13-17, og desse er presentert som gjennomsnittet av dei ni målingane for kvar prøve. Konsentrasjonane er rekna ut i forhold til dei nylaga aminoglykosidløysingane på 1 mg/mL. For gentamicin er det gått ut frå at kvar av dei tre formene C1, C1a og C2 utgjer ein tredel i blandinga.

Det vart gjort ein Wilcoxon non-parametrisk test av resultata for å kunna seia noko om endringane i konsentrasjon var statistisk signifikante. Det vart brukt Bonferroni-korreksjon av p-verdiane for testing av fleire hypotesar. Dette vil seia at signifikansnivået på 0,05 vart justert ned for å redusera sannsynet for å påvisa falske signifikante p-verdiar ved mange hypotesetestar. Resultata frå konsentrasjonsmålingane har fire grupper som vert samanlikna for amikacin og gentamicin og fem grupper for tobramycin. Justert p-verdi vert difor høvesvis  $\frac{0,05}{4} = 0,0125$  og  $\frac{0,05}{5} = 0,01$ . Resultata frå signifikanstestinga er presentert i tabell 17-19.



## Amikacin



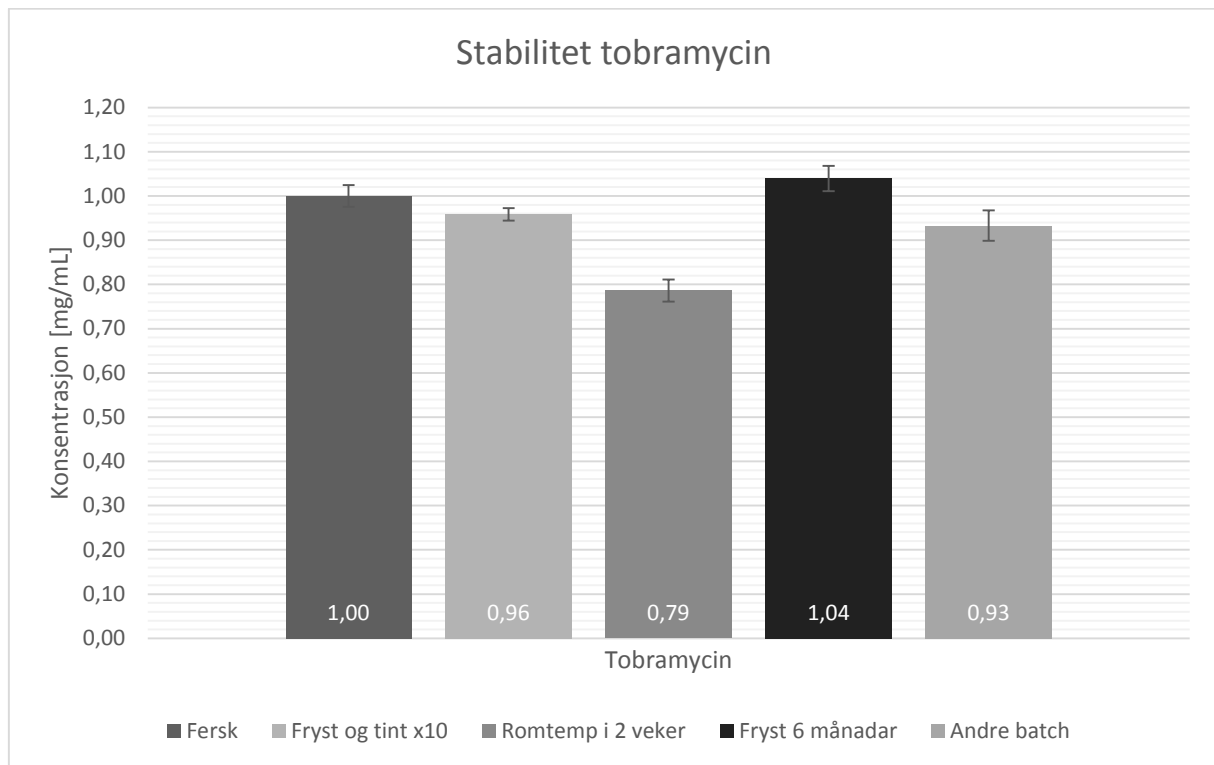
**Figur 13:** Viser konsentrasjonen av amikacin i dei ulike løysingane.

Frå figur 13 ser ein at den gjennomsnittlege konsentrasjonen frå dei 9 målingane av den ferske løysinga av amikacin er 1 mg/mL. For løysinga som vart fryst og tint 10 gonger har den gjennomsnittlege konsentrasjonen gått ned til 0,68 mg/mL, og for løysingane som har stått i romtemperatur i to veker og vore fryst i seks månadar er konsentrasjonane høvesvis 0,76 og 0,74 mg/mL. Tabell 17 viser p-verdiane for samanlikninga av konsentrasjon i den ferske løysinga av amikacin mot dei lagra løysingane. Alle p-verdiane er under 0,0125, noko som vil seia at reduksjonen i konsentrasjon er signifikant for dei tre lagra løysingane samanlikna med den ferske.

**Tabell 17:** Viser p-verdiane for samanlikninga av konsentrasjon av amikacin i den ferske løysinga mot løysingar lagra på ulik måte.

	Type lagring	n	p-verdi
Fersk løysing mot	Fryst og tint x 10	9	<0,001
	2 veker romtemperatur	9	<0,001
	Langtidsfryst	9	<0,001

## Tobramycin



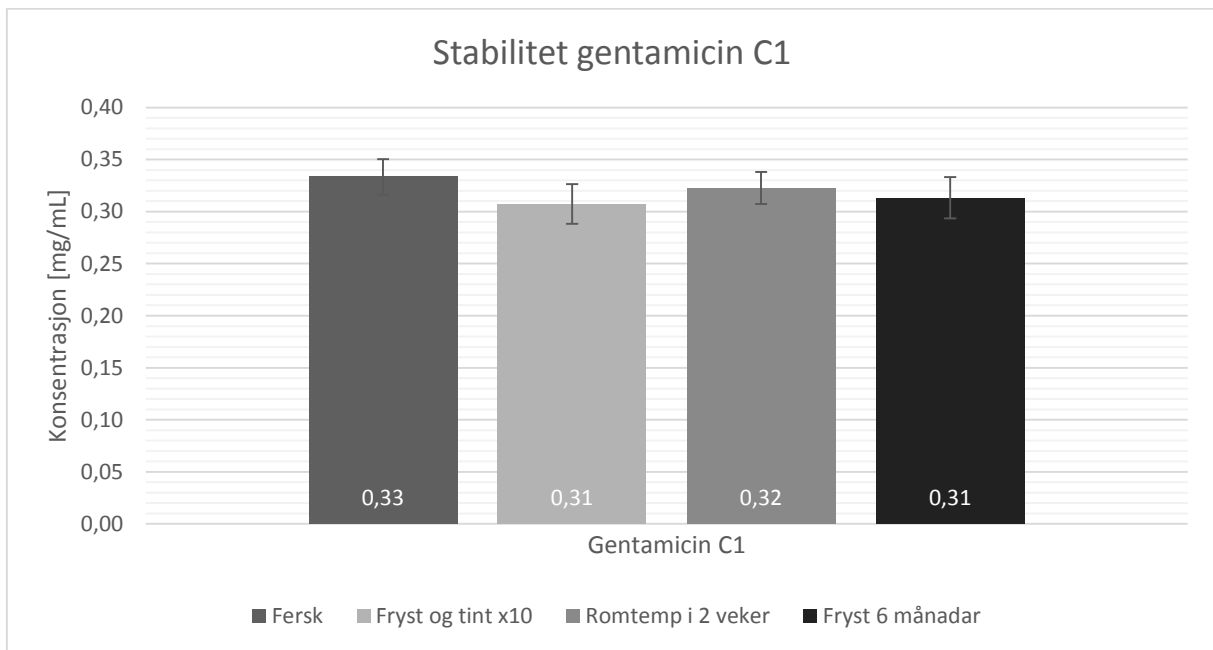
**Figur 14:** Viser konsentrasjonen av tobramycin i dei ulike løysingane.

Figur 14 viser at den gjennomsnittlege konsentrasjonen av tobramycin i den ferske løysinga er 1 mg/mL. Løysingane som var fryst og tint 10 gonger og hadde stått i romtemperatur i 2 veker viser ein nedgang i konsentrasjon til høvesvis 0,96 og 0,79 mg/mL. Løysinga som hadde vore lagra i frys i seks månadar viser ein gjennomsnittleg konsentrasjon på 1,04 mg/mL, medan tobramycinløysinga frå den andre batchen har ein gjennomsnittskonsentrasjon på 0,93 mg/mL. Tabell 18 viser p-verdiane for samanlikninga av konsentrasjon i den ferske løysinga av tobramycin mot dei lagra løysingane. Alle p-verdiane er under 0,01, noko som vil seia at endringa i konsentrasjon for dei fire lagra løysingane samanlikna med den ferske er signifikant.

**Tabell 18:** Viser p-verdiane for samanlikninga av konsentrasjon av tobramycin i den ferske løysinga mot løysingar lagra på ulik måte.

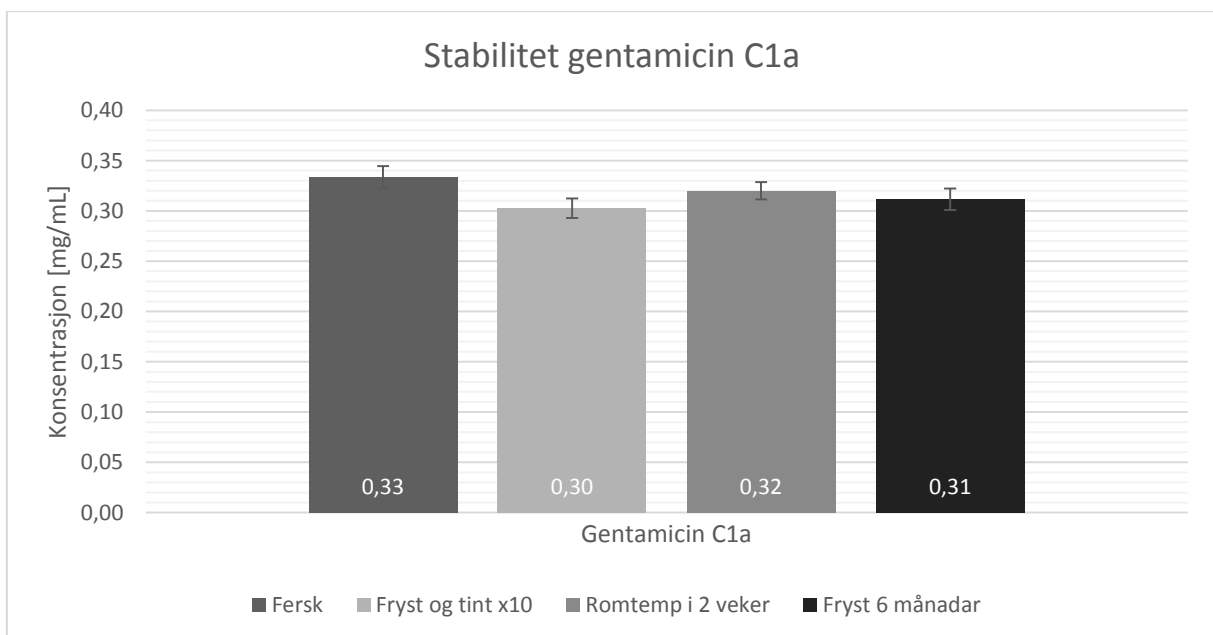
	Type lagring	n	p-verdi
Fersk mot	Fryst og tint x 10	9	<0,001
	2 veker romtemperatur	9	<0,001
	Langtidsfryst	9	0,004
	Anna batch	9	0,001

## Gentamicin



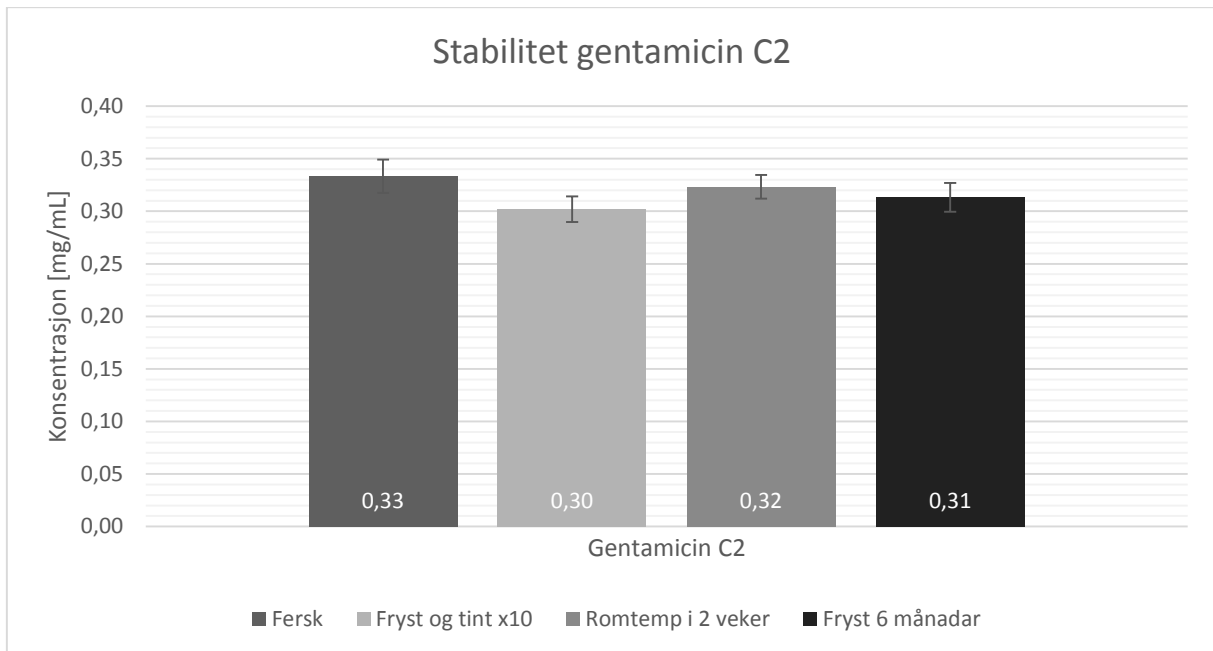
**Figur 15:** Viser konsentrasjonen av gentamicin C1 i dei ulike løysingane.

Figur 15 viser at gjennomsnittskonsentrasjonen av gentamicin C1 i den ferske løysinga av gentamicin er 0,33 mg/mL. Løysinga som var fryst og tint 10 gonger, løysinga lagra i romtemperatur i to veker og løysinga lagra i 6 månadar viser alle ei nedgang i konsentrasjon til høvesvis 0,31, 0,32 og 0,31 mg/mL i forhold til den ferske løysinga.



**Figur 16:** Viser konsentrasjonen av gentamicin C1a i dei ulike løysingane.

Figur 16 viser at gjennomsnittskonsentrasjonen av gentamicin C1a i den ferske løysinga av gentamicin er 0,33 mg/mL. Løysinga som var fryst og tint 10 gonger, løysinga lagra i romtemperatur i to veker og løysinga lagra i 6 månadar viser alle ei nedgang i konsentrasjon til høvesvis 0,30, 0,32 og 0,31 mg/mL i forhold til den ferske løysinga.



**Figur 17:** Viser konsentrasjonen av gentamicin C2 i dei ulike løysingane.

Figur 17 viser at gjennomsnittskonsentrasjonen av gentamicin C2 i den ferske løysinga av gentamicin er 0,33 mg/mL. Løysinga som var fryst og tint 10 gonger, løysinga lagra i romtemperatur i to veker og løysinga lagra i 6 månadar viser alle ei nedgang i konsentrasjon til høvesvis 0,30, 0,32 og 0,31 mg/mL i forhold til den ferske løysinga.

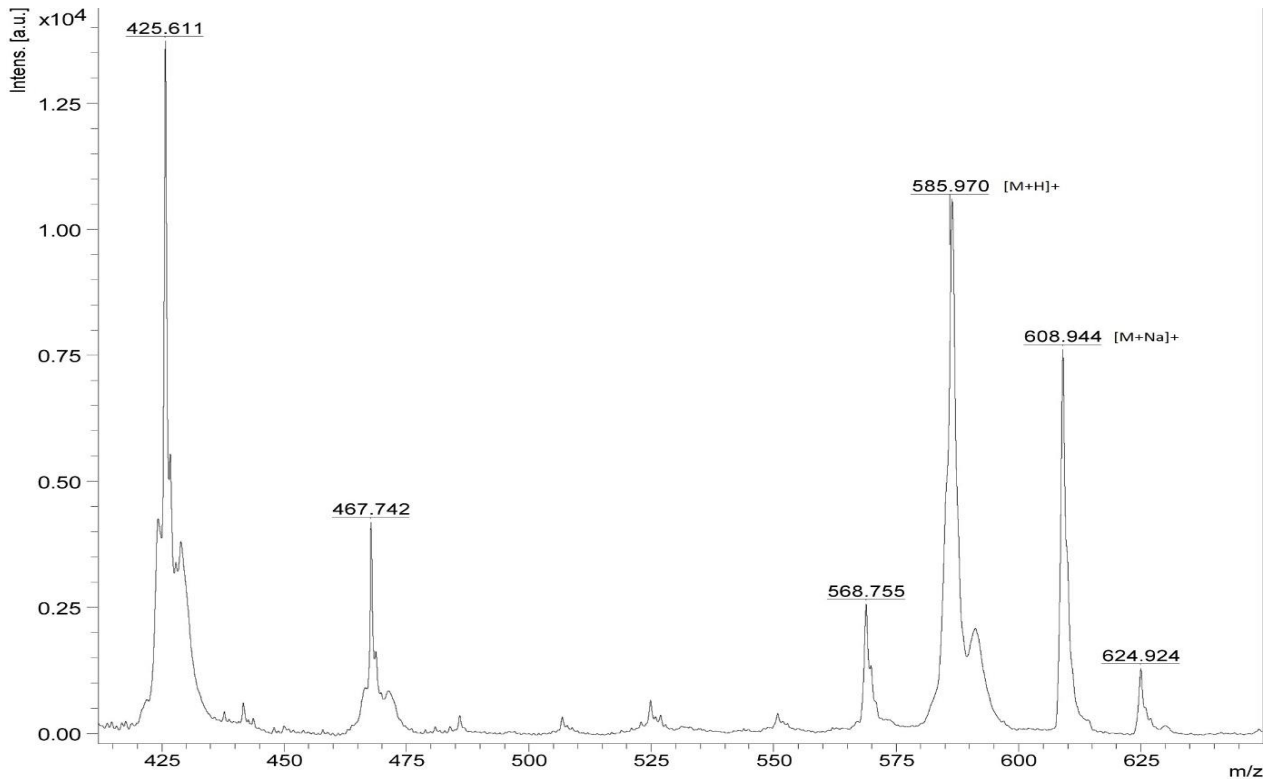
Den statistiske samanlikninga av signifikans vart gjort for dei tre gentamicinformene sett under eitt, og resultatane av dette er presentert i tabell 19. Også her er alle p-verdiane lågare enn 0,0125 og nedgangen i konsentrasjon av gentamicin i dei lagra løysingane samanlikna med den ferske løysinga er signifikant.

**Tabell 19:** Viser p-verdiane for samanlikninga av konsentrasjon av gentamicin i den ferske løysinga mot løysingar lagra på ulike måtar.

	Type lagring	n	p-verdi
Fersk mot	Fryst og tint x 10	27	<0,001
	2 veker romtemperatur	27	0,005
	Langtidsfryst	27	<0,001

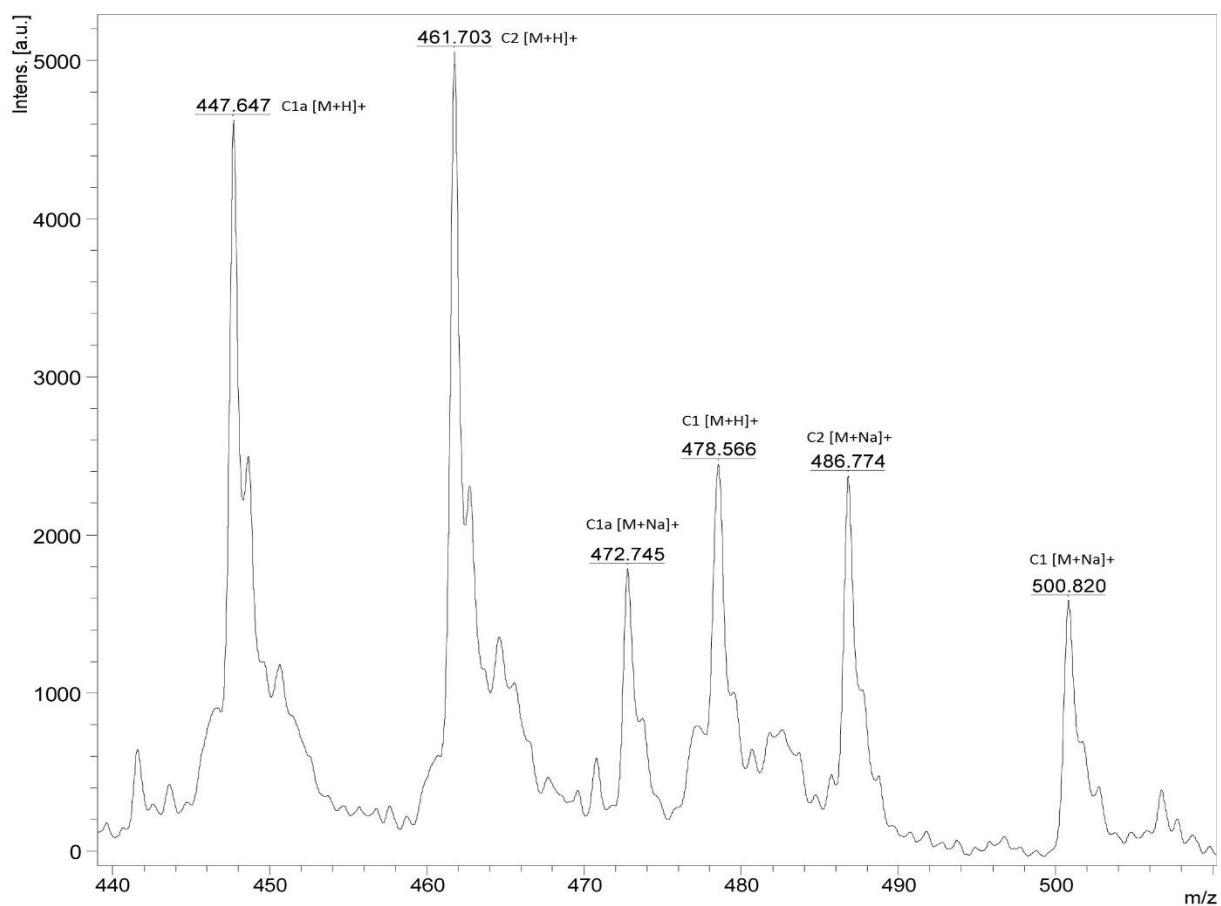
### 4.2.3 Aminoglykosid på MALDI-TOF

Reine 1 mg/mL løysingar av dei tre aminoglykosida amikacin, gentamicin og tobramycin vart analysert med MALDI-TOF massespektrometri, og massespektera er presentert i figur 18-20.



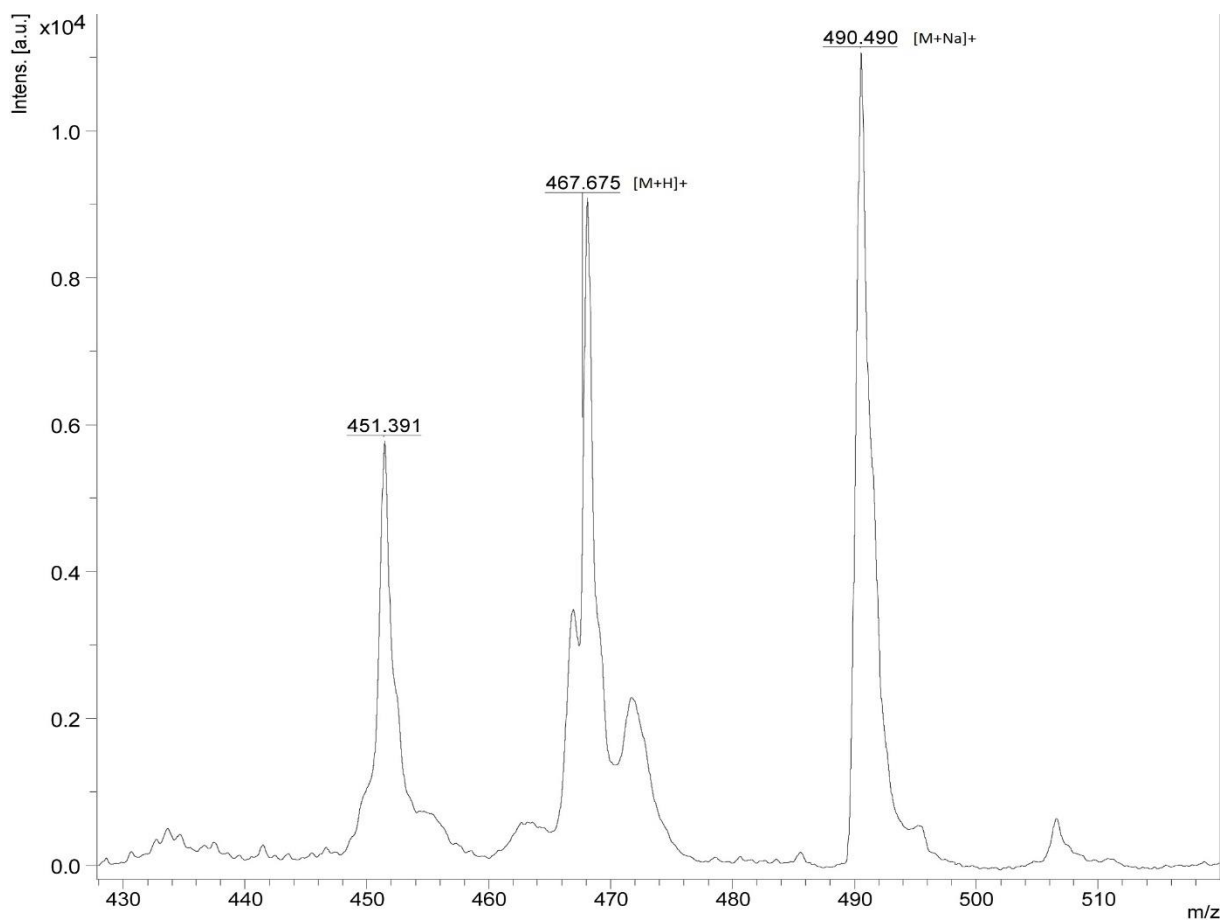
**Figur 18:** Viser massespekteret for 1 mg/mL-løysinga av amikacin.

Molekylmassen av amikacin er 585,6 g/mol. Massespekteret i figur 18 viser det protonerte molekylionet ved 585,970 m/z. Amikacin danna også eit ion der natrium var lagt til, noko som gir eit tillegg av 23 m/z. Dette ionet er vist som toppen ved 608,944 m/z i massespekteret.



**Figur 19:** Viser massespekteret for 1 mg/mL-løysinga av gentamicin.

Gentamicin er samansett av tre ulike former; gentamicin C1a, C2 og C1, med høvesvis molekylmasse 449,5, 463,6 og 477,6 g/mol. Toppene for dei protonerte molekyliona er vist i massespekteret i figur 19 ved 447,647 m/z (gentamicin C1a), 461,703 m/z (gentamicin C2) og 478,566 m/z (gentamicin C1). Spekteret viser også toppar for dei tre formene av gentamicin med tillegg av natrium ved 472,745 m/z (gentamicin C1a), 486,744 m/z (gentamicin C2) og 500,820 m/z (gentamicin C1).



**Figur 20:** Viser massespekteret av 1 mg/mL-løysinga av tobramycin.

Molekylmassen av tobramycin er 467,5 g/mol. Massespekteret i figur 20 viser det protonerte molekylionet ved 467,675 m/z. På same måte som dei andre aminoglykosida, danna tobramycin eit ion med tillegg av natrium, og dette er vist i toppen ved 490,490 m/z.

### 4.3 Påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-ToF

For å utvikla prosedyren og finna best mogleg oppsett av denne metoden, vart tobramycin brukt. Resultata under omhandlar difor berre tobramycin. Ulike parametrar vart endra i ulike forsøk og er presentert under i kvar sine avsnitt.

Massespektra frå forsøka vart henta frå MALDI-ToF Microflex™ instrumentet og behandla på programvara flexAnalysis™ version 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland).

#### 4.3.1 Konsentrasjon

Det vart gjort forsøk med ulike konsentrasjonar av tobramycin, for å finna ein konsentrasjon der tobramycin var detekterbart i spekteret. Konsentrasjonane som vart testa ut var mellom 0,01-1 mg/mL og resultata er vist i tabell 20. Tobramycinløysinga på 1 mg/mL er løyst i vatn, medan dei svakare løysingane er fortynna i Tris-HCl buffer. Under desse forsøka var inkubasjonstida 1 time.

**Tabell 20:** Viser intensiteten og arealet under kurven (AUC) for toppane ved 379 og 490 m/z frå massespektera frå oppsett med ulike konsentrasjonar av tobramycin for dei fire *E. coli*-stammene. (IB = ikkje bestemt, IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Kons. [mg/mL]	Stamme Topp [m/z]	Kontroll		BK21		BK15		U15	
		379	490	379	490	379	490	379	490
1	Intensitet	32918	3475	IB	IB	35177	3417	26654	4817
	AUC	27442	3977	IB	IB	25751	3635	21258	5625
0,5	Intensitet	18258	739	11128	767	11781	719	17793	1495
	AUC	18115	855	8386	832	10085	832	16931	2188
0,4	Intensitet	14201	1637	17863	672	12878	496 m	11983	134 m
	AUC	13956	2114	16832	759	18895	IM	9223	IM
0,3	Intensitet	20464	486	27168	304 m	17355	179 m	21048	417 m
	AUC	18799	516	25060	IM	14441	IM	20463	IM
0,2	Intensitet	14472	167 m	17254	208 m	21428	202 m	14800	156
	AUC	11450	IM	14634	IM	19595	IM	11262	175
0,1	Intensitet	13289	98 m	10031	124 m	13396	104 m	31358	267 m
	AUC	9571	IM	8614	IM	10502	IM	31654	IM
0,01	Intensitet	15345	IM	IB	IB	25200	IM	IB	IB
	AUC	12352	IM	IB	IB	19424	IM	IB	IB

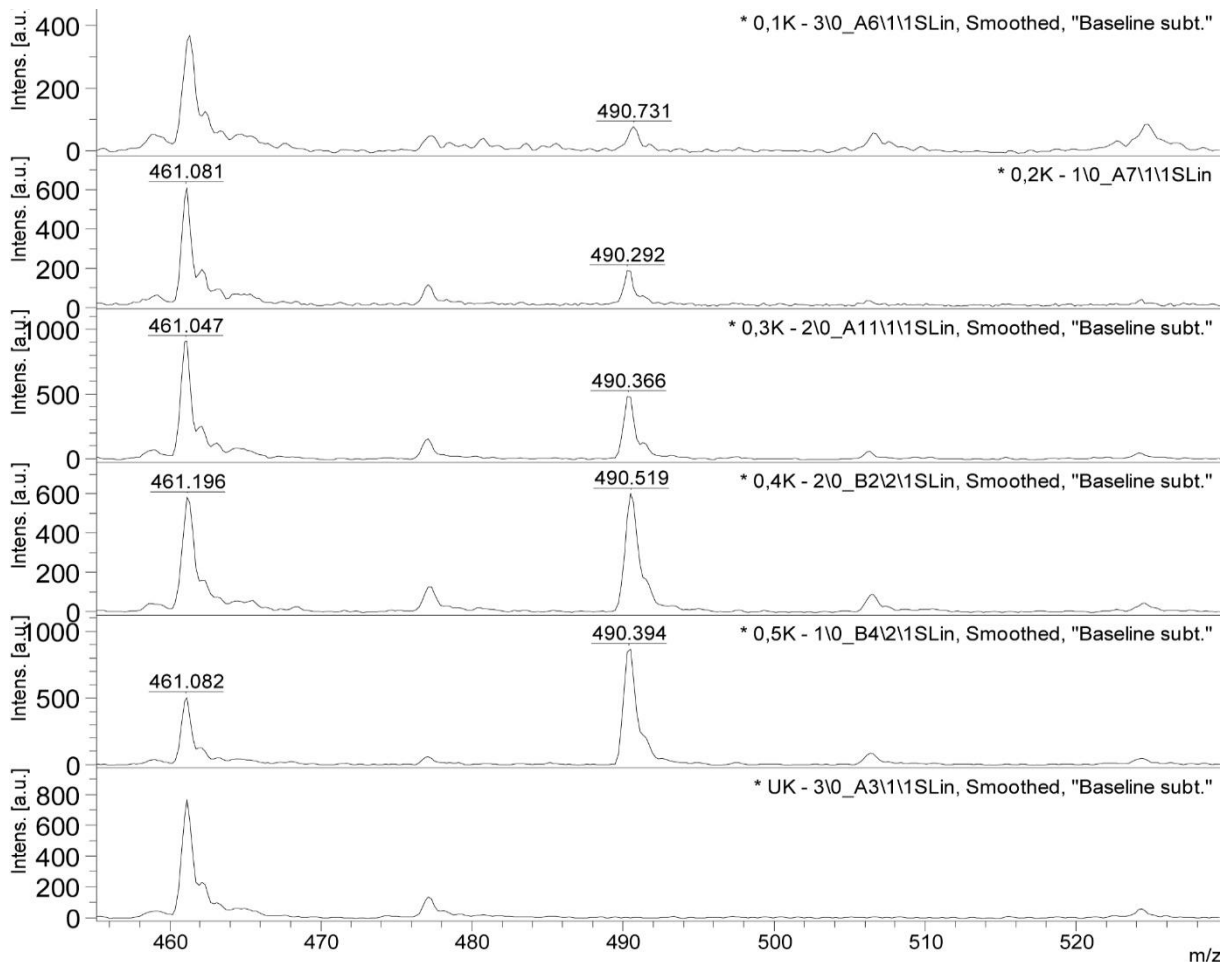
Toppen ved 379 m/z kjem frå matriksen, og denne er tatt med i tabellane for å kunna samanlikna intensiteten på toppane. Toppen ved 490 m/z er frå tobramycin. Verdiane merka med «m» er sett manuelt i massespekteret, fordi toppane var for låge til at dette vart gjort automatisk av programvara. Av same grunn har desse toppane ikkje nokon verdi for AUC, som her er merka med IM (ikkje målbar). Det tidlegaste forsøket vart sett opp med tobramycinkonsentrasjon på



0,01 mg/mL med kontrollstamma ATCC 25922 og BK15. Som ein ser av tabell 20, vart det ikkje detektert noko topp ved 490 m/z. 0,01 mg/mL er difor ein for låg konsentrasjon, og dette oppsettet vart forkasta. Av den grunn vart det ikkje gjort forsøk med BK21 og U15 med 0,01 mg/mL tobramycin, og desse verdiane er merka med IB (ikkje bestemt) i tabellen. For 1 mg/mL med BK21 vart det heller ikkje gjort noko forsøk, difor manglar desse verdiane i tabellen (IB).

Resultata frå dette forsøket viser at konsentrasjonar mellom 0,1-1 mg/mL gir detekterbare toppar for tobramycin ved 490 m/z i massespektera for både kontrollstamma og dei kliniske isolata. For dei høgaste konsentrasjonane (1 , 0,5 og til dels 0,4 mg/mL) vart denne toppen merka automatisk av programvara. For dei lågare konsentrasjonane vart toppen mindre og mindre tydeleg i spektera og måtte som regel merkast manuelt.

Figur 21 viser massespektra for den sensitive kontrollstamma med ulike konsentrasjonar av tobramycin. I det nedste spekteret er det ikkje tilsett tobramycin, her er bakteriane inkubert i rein Tris-HCl-buffer og elles behandla på same måte som dei andre prøvane. Dette spekteret viser fråver av tobramycintoppen ved 490 m/z, slik som forventet. Dei fem øvste spektera i figuren er med 0,1-0,5 mg/mL tobramycin, frå øvst til nedst. I desse spektera vart det påvist ein tydeleg topp ved 490 m/z, og intensiteten av denne toppen aukar proporsjonalt med aukande konsentrasjon av tobramycin. Frå spektera er det difor tydeleg at toppen ved 490 m/z representerer tobramycin.



**Figur 21:** Viser massespektra for *E. coli*-stamma ATCC 25922 ved dei ulike konsentrasjonane av tobramycin. Det øvste spekteret viser kontrollstamma med 0,1 mg/mL tobramycin, og dei påfølgjande 4 spektra med 0,2, 0,3, 0,4 og 0,5 mg/mL tobramycin. Det nedste spekteret viser kontrollstamma utan tilsett antibiotika.

#### 4.3.2 Müller Hinton-buljong

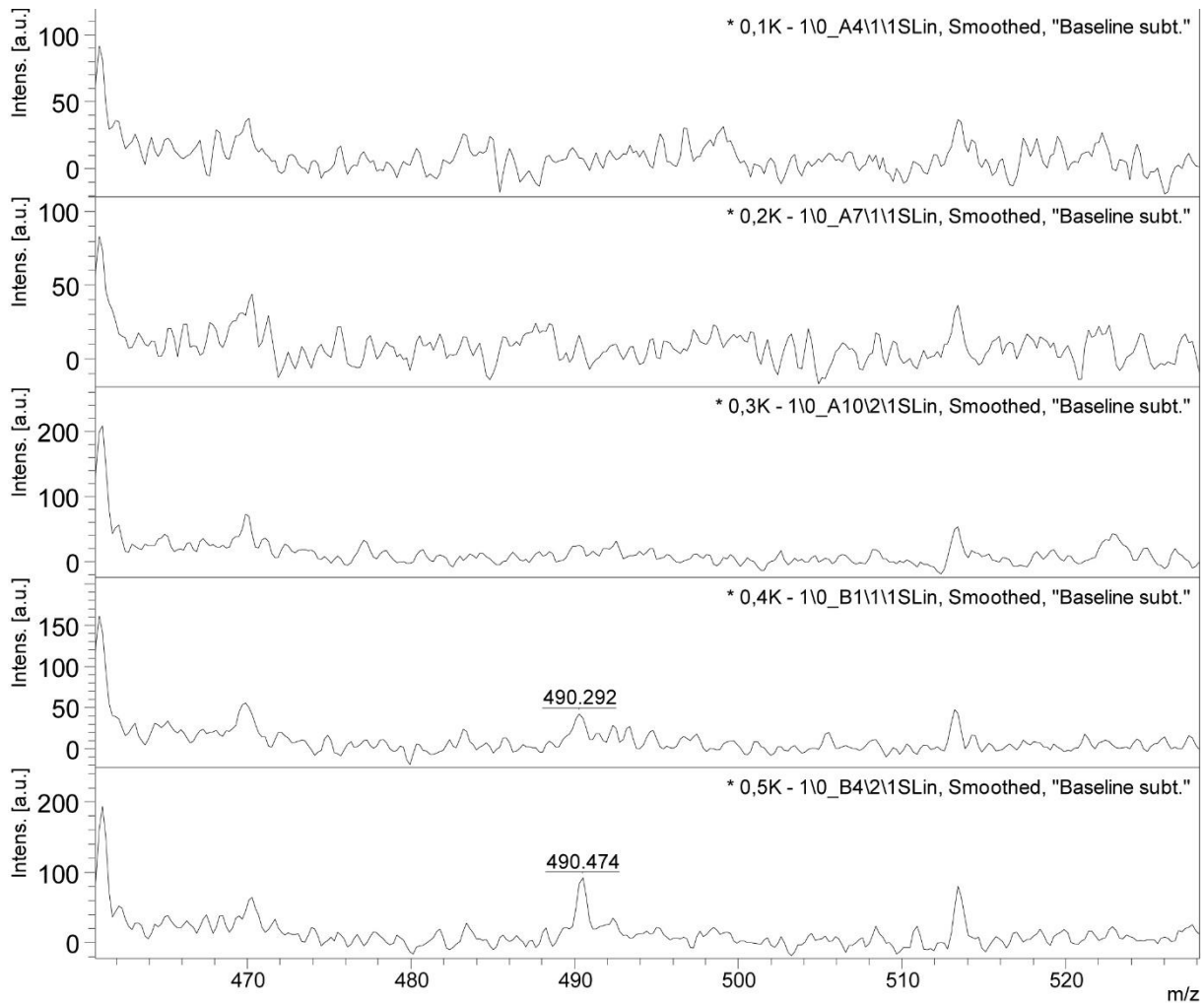
Eit forsøk vart sett opp der tobramycin vart fortynna i Müller Hinton-buljong i staden for i Tris-HCl-buffer. Frå forsøka med buljong mikrofortynning viste dei kliniske isolata resistens ved å gi høge MIC-verdiar etter inkubering i Müller Hinton buljong. Dette oppsettet vart difor gjort for å sjå om buljongen tilfører kofaktorar til løysinga som gjer at AME vert meir aktive. Resultata av analysen på MALDI-ToF er vist i tabell 21. I dette forsøket var toppen som representerer matriksen ved 379  $m/z$  ikkje tydeleg for nokre av spektra, og vart heller ikkje merka automatisk av programvara. Det vart difor valt å bruka toppen ved 190  $m/z$ , som også kjem frå matriksen, som samanlikning i dette forsøket, sidan denne var tydeleg i alle spektra. Inkuberingstida i dette oppsettet var 1 time.

**Tabell 21:** Viser intensiteten og AUC for toppane ved 190 og 490 m/z frå massespektera for forsøket med ulike tobramycinkonsentrasjonar i Müller Hinton buljong. (IB = ikkje bestemt, IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Kons. [mg/mL]	Stamme Topp [m/z]	Kontroll		BK21		BK15		U15	
		190	490	190	490	190	490	190	490
0,5	Intensitet	1382	91 m	1548	115 m	2274	108 m	3802	171 m
	AUC	677	IM	883	IM	1116	IM	1927	IM
0,4	Intensitet	1616	42 m	742	26 m	662	50 m	1915	54 m
	AUC	793	IM	341	IM	284	IM	923	IM
0,3	Intensitet	1122	IM	2788	60 m	1755	34 m	747	IM
	AUC	531	IM	1360	IM	689	IM	347	IM
0,2	Intensitet	746	IM	368	IM	4469	IM	1931	IM
	AUC	334	IM	157	IM	1915	IM	989	IM
0,1	Intensitet	565	IM	800	IM	5756	IM	503	IM
	AUC	251	IM	344	IM	2890	IM	204	IM

Tabell 21 viser at tobramycintoppen ved 490 m/z ikkje var synleg i spektera ved 0,1, 0,2 og til dels 0,3 mg/mL. For dei høgare konsentrasjonane var toppen synleg, men var svært låg. Toppen måtte merkast manuelt i spektera, og verdiane for intensitet viser at toppen var mykje lågare i dette forsøket enn i dei med Tris-HCl-buffer ved tilsvarende konsentrasjonar.

Figur 22 viser kontrollstamma med ulike konsentrasjonar av tobramycin fortynna i Müller Hinton-buljong. Det øvste spekteret er med 0,1 mg/mL tobramycin, og dei påfølgjande fire spektera med 0,2, 0,3, 0,4 og 0,5 mg/mL. Spektera viser mykje støy i området rundt 490 m/z og dei toppane som er synlege, er låge og lite definerte i spektera. Fordi tobramycintoppen ved 490 m/z ikkje er tydeleg i spektera, vart det valt å ikkje bruka Müller Hinton buljong vidare i arbeidet.



**Figur 22:** Viser kontrollstamma med ulike konsentrasjonar av tobramycin, 0,1-0,5mg/mL frå øvst til nedst, fortynna i Müller Hinton-bujong.

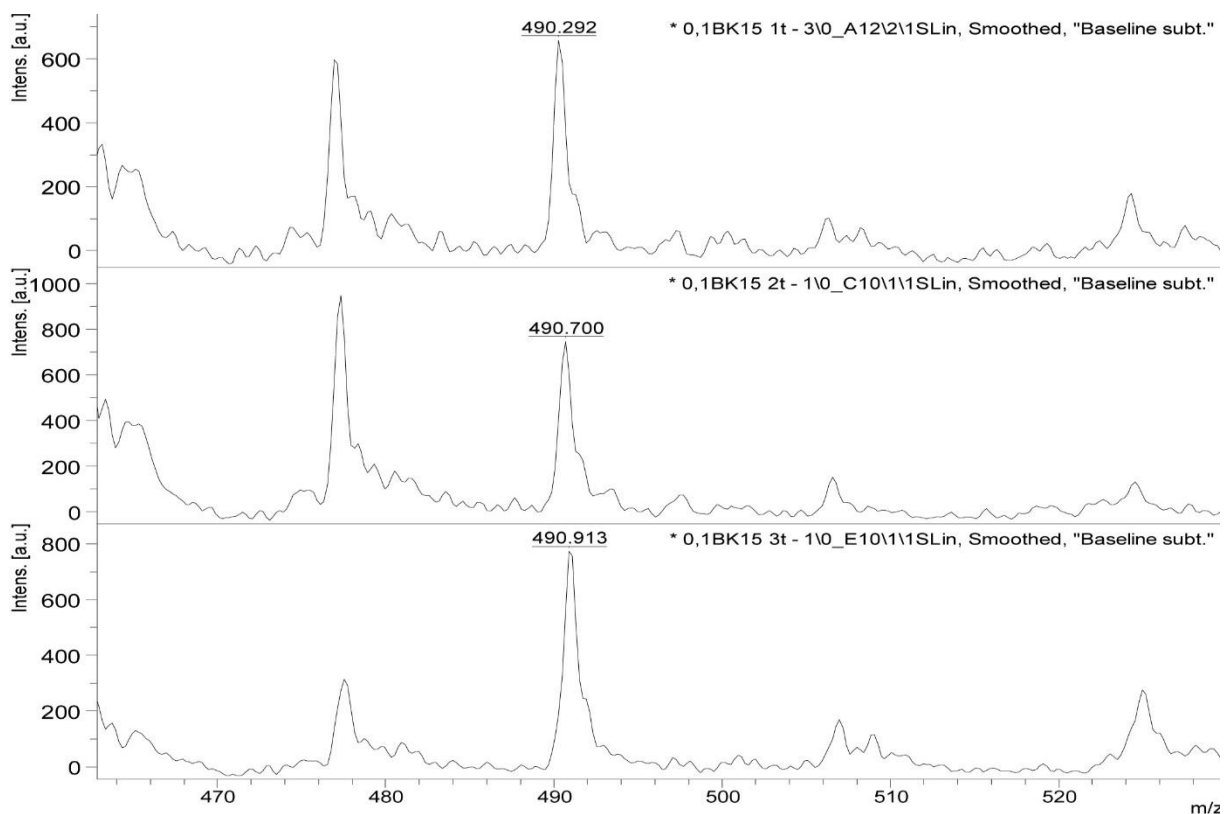
### 4.3.3 Inkubering

Det vart gjort forsøk der tida bakteriane vart inkubert i nærver av tobramycin vart variert. Dette vart prøvd for å sjå om lenger inkuberingstid gjorde at AME fekk tid til å modifisera ein større del av tobramycinmolekyla og difor kunne gi større forskjellar mellom resistente og sensitive stammer. Inkuberingstidene som vart forsøkt var 1, 2 og 3 timar, med konsentrasjon av tobramycin på 0,1 og 0,5 mg/mL. Resultata frå forsøket er presentert i tabell 22.

**Tabell 22:** Viser intensiteten og AUC for toppane ved 379 og 490 m/z i forsøk gjort med 0,1 og 0,5 mg/mL tobramycin og ulike inkuberingstider. (IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Tid [timar]	Kons. [mg/mL]	Stamme Topp [m/z]	Kontroll		BK21		BK15		U15	
			379	490	379	490	379	490	379	490
1	0,5	Intensitet	21871	1815	22542	3528	24369	3292	29929	3435
		AUC	20009	2193	22160	4204	20028	3854	27957	4076
2	0,5	Intensitet	28904	2397	30590	4818	34779	3461	28061	3675
		AUC	23572	2834	26258	5254	31443	4167	23319	4351
3	0,5	Intensitet	34042	2786	24091	4977	24531	1770	25746	3778
		AUC	27939	3197	19997	5674	24497	2167	21003	4367
1	0,1	Intensitet	21504	723 m	25668	1194	23882	657 m	26872	680 m
		AUC	17620	IM	22845	1459	19394	IM	27538	IM
2	0,1	Intensitet	29243	691 m	31858	910 m	23956	747 m	26736	422 m
		AUC	24980	IM	25929	IM	22307	IM	23442	IM
3	0,1	Intensitet	31868	1161 m	18553	655 m	10999	772 m	27085	1172 m
		AUC	35342	IM	13958	IM	21893	IM	21835	IM

Tabell 22 viser at tobramycintoppen ved 490 m/z var tydeleg og relativt høg for alle prøvane i dette oppsettet. For kontrollstamma heldt intensiteten av 490-toppen seg relativt stabil for dei ulike inkuberingstidene ved begge konsentrasjonane av tobramycin. Det same gjeld for dei kliniske isolata. Dette er også illustrert i figur 23, som viser BK15-stamma med 0,1 mg/mL tobramycin og inkubering i 1, 2 og 3 timar. Intensiteten av toppen ved 490 m/z held seg stabil, og viser ikkje nokon nedgang i intensitet med aukande inkuberingstid. Frå desse resultatata ser det difor ut til at å auka inkuberingstida frå ein til to eller tre timar ikkje gir noko påviseleg endring i toppen ved 490 m/z for dei resistente stammene i forhold til kontrollstamma.



**Figur 23:** Viser massespektra for BK15-stamma med 0,1 mg/mL tobramycin. Det øvste spekteret viser inkubering i 1 time, og dei to påfølgjande i 2 og 3 timar.

#### 4.3.4 Lysering

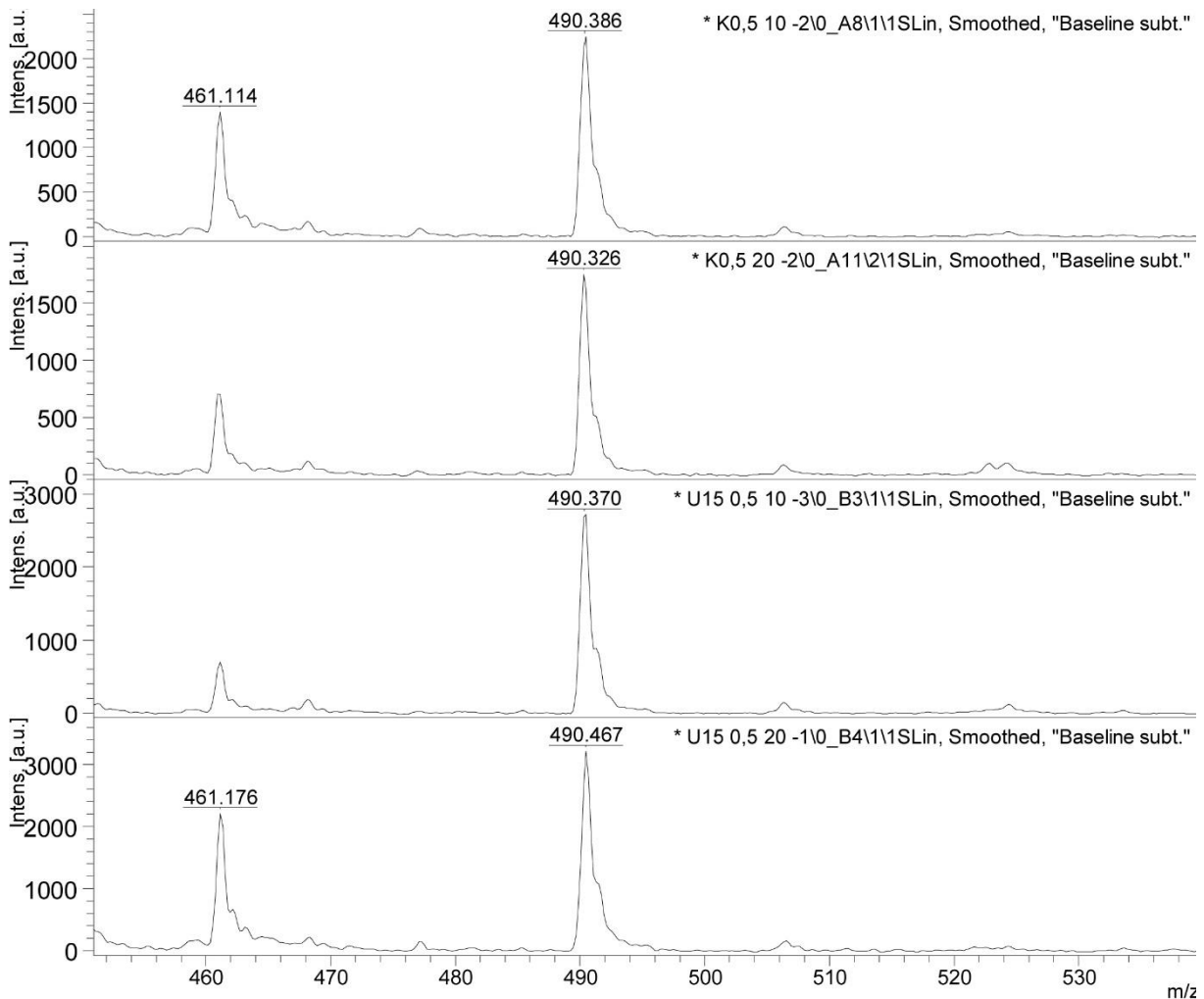
Eit oppsett vart gjort der bakteriecellene vart lysert mekanisk før dei vart eksponert for tobramycin. Dette vart gjort for å sjå om lysering kunne frigjera AME i løysinga og gi dei betre tilgang til tobramycinmolekyla. Det vart forsøkt å tilsetja 10 og 20  $\mu\text{L}$  av supernatanten etter lyseringa til prøvar med 30  $\mu\text{L}$  0,5 mg/mL tobramycin. Kontrollstamma og U15 vart brukt i forsøket, og resultatane er presentert i tabell 23. Inkuberingstida i dette oppsettet var 2 timar.

**Tabell 23:** Viser intensiteten og AUC for toppane ved 379 og 490 m/z frå massespektra for forsøket gjort med mekanisk lysering av bakteriecellene.

Bakteriar tilsett	Stamme Topp [m/z]	Kontroll		U15	
		379	490	379	490
10 $\mu\text{L}$	Intensitet	17163	2215	21331	2737
	AUC	14606	2790	19014	3203
20 $\mu\text{L}$	Intensitet	23767	1747	18457	3047
	AUC	19450	2003	15762	3879

Tabell 23 viser at toppen for tobramycin ved 490 m/z var tydeleg for alle prøvane i dette oppsettet. Den resistente stamma U15 viser ikkje nokon reduksjon i intensiteten av toppen i forhold til kontrollstamma verken ved tilsetjing av 10 eller 20  $\mu\text{L}$  supernatant. Figur 24 viser

massespektra frå forsøket med 0,5 mg/mL tobramycin. Også her ser ein at toppane er tilnærma like for kontrollstamma i forhold til U15. Dette indikerer at lysering av cellene ikkje betrar tilhøva for påvising av AME med MALDI-ToF.



**Figur 24:** Viser massespektra for U15 og kontrollstamma med 0,5 mg/mL tobramycin. Dei to øvste spektra er med høvesvis 10 og 20  $\mu$ L supernatant frå kontrollstamma tilsett, medan dei to nedste spektra er med 10 og 20  $\mu$ L supernatant frå U15 tilsett.

#### 4.3.5 Propionyl CoA

Det vart forsøkt å tilsetja propionyl CoA for å sjå om tilføring av meir kofaktor ville auka enzymaktiviteten til AME. Propionyl CoA vart tilsett i 1:1-forhold i mol/mL med tobramycin i prøvane. Tobramycinkonsentrasjonar på 0,5 og 0,1 mg/mL vart brukt, og inkuberingstida var 2 timar.

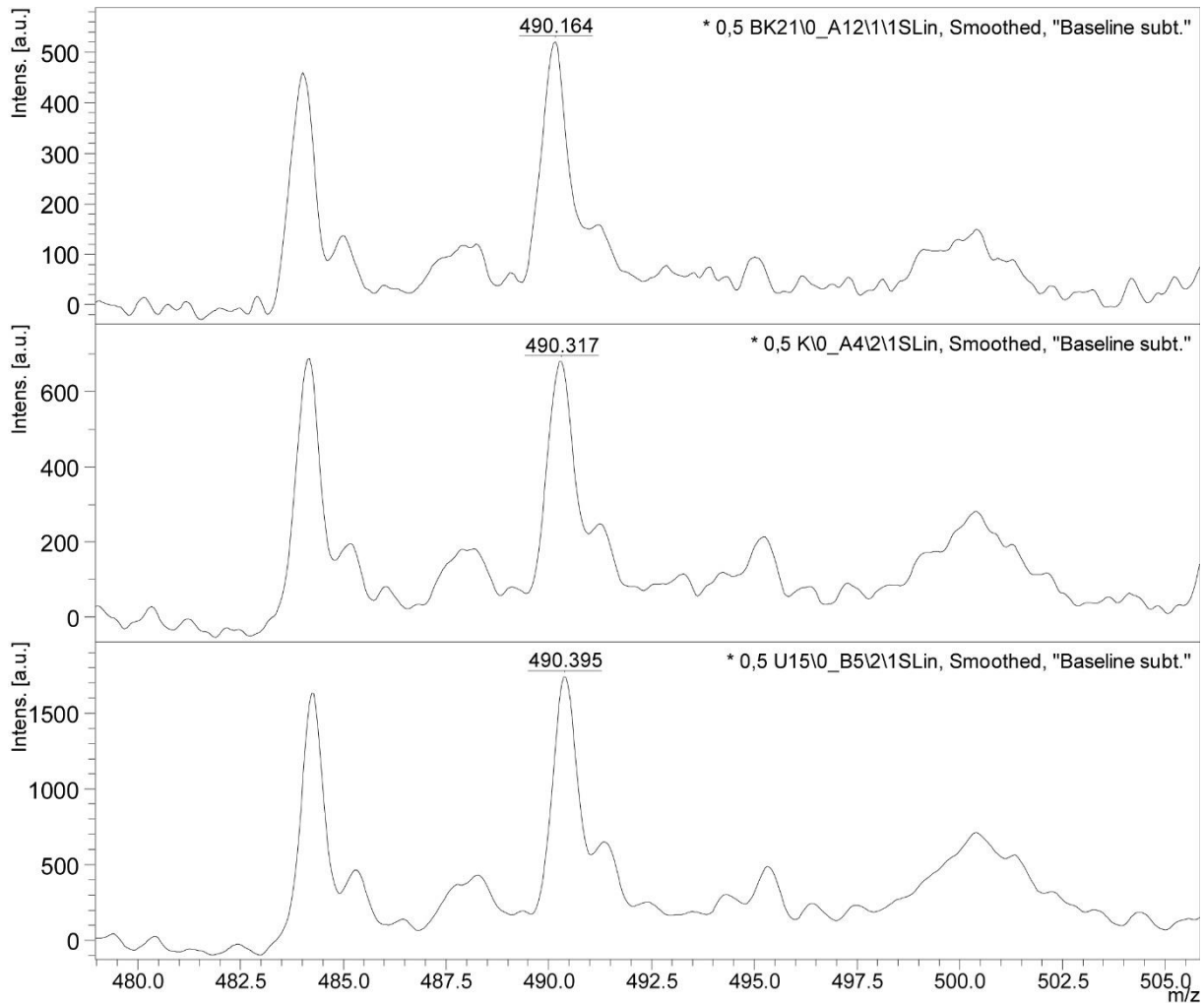
**Tabell 24:** Viser intensiteten og AUC for toppane ved 379 og 490 m/z frå massespektera for dei ulike stammene i forsøka tilsett propionyl CoA med tobramycinkonsentrasjonar på 0,5 og 0,1 mg/mL. (IB = ikkje bestemt, IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Kons. [mg/mL]	Stamme Topp [m/z]	Kontroll		BK21		BK15		U15	
		379	490	379	490	379	490	379	490
0,5	Intensitet	9741	679 m	3704	520 m	IB	IB	16511	1738 m
	AUC	7190	IM	2494	IM	IB	IB	13648	IM
0,1	Intensitet	8139	181 m	12959	459 m	7350	143 m	1486	63 m
	AUC	5804	IM	9912	IM	5236	IM	972	IM

Resultata frå oppsettet er presentert i tabell 24. For BK15 vart det ikkje sett opp ein prøve med 0,5 mg/mL, og verdiane for dette manglar difor i tabellen (IB). Ved 0,5 mg/mL ser ein ikkje nokon nedgang i intensitet av toppen ved 490 m/z for dei kliniske isolata i forhold til kontrollstamma. Ved 0,1 mg/mL er det ein viss nedgang i intensitet av 490-toppen for BK15 i forhold til kontrollstamma. For U15 er toppen ved 490 m/z låg, men viss ein samanliknar denne med intensiteten av toppen ved 379 m/z, er den relativt sett høgare enn for kontrollstamma. Ein ser difor ikkje nokon tydeleg reduksjon i intensiteten av toppen ved 490 m/z for dei resistente isolata i forhold til den sensitive kontrollstamma.

Massespektera i figur 25 viser at å tilsetja propionyl CoA gav noko meir støy i spektera i forhold til i tidlegare forsøk. Likevel er toppane ved 490 m/z tydelege og lette å identifisera. I tillegg er toppane ved 490 m/z lågare i dette forsøket enn i tidlegare forsøk med tilsvarende konsentrasjonar. Intensiteten av toppane ved 0,5 mg/mL ligg her mellom 500-1800, mot tidlegare forsøk der dei var mellom 2000-5000.





**Figur 25:** Viser massespektra for tilsetjing av propionyl CoA ved 0,5 mg/mL tobramycin. Spektra viser frå øvst til nedst viser BK21, kontrollstamma og U15.

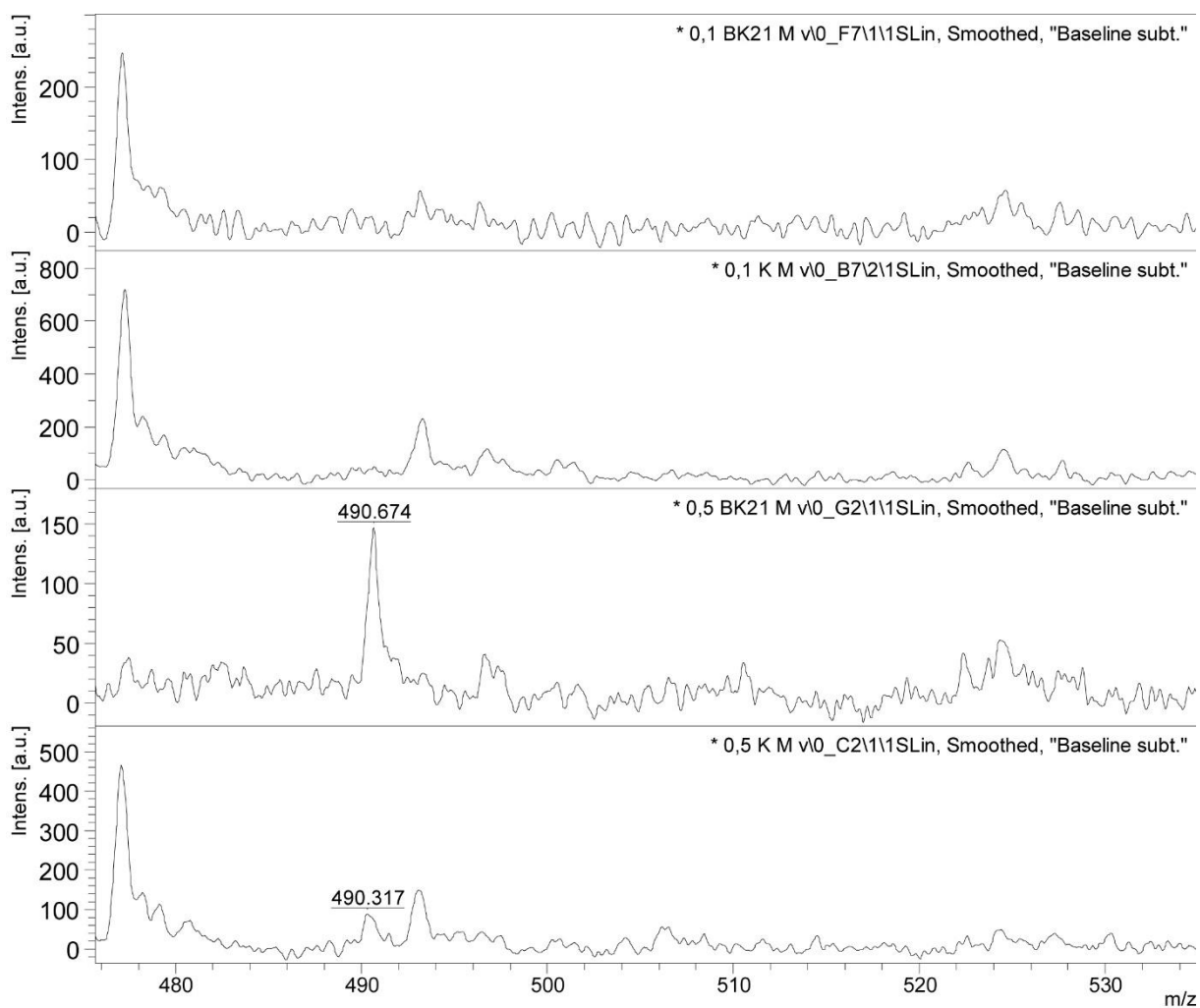
#### 4.3.6 Auka mengd bakteriar

Det vart også forsøkt å tilsetja meir bakteriar til prøvane. Dette vart gjort for å sjå om meir bakteriar, og difor større mengd AME i prøvane i forhold til tobramycin, ville gi påviselege forskjellar mellom sensitiv og resistente stammer. Ei overfylt 1  $\mu$ L-ause med bakteriemasse frå fleire koloniar vart brukt, mot dei tidlegare forsøka, der 1  $\mu$ L bakteriemasse frå ein enkel koloni vart tilsett prøvane. Inkuberingstida i dette forsøket var 2 timar.

**Tabell 25:** Viser resultatata frå forsøka der meir bakteriar av kontrollstamma og BK21 vart tilsett prøvar med 0,1 og 0,5 mg/mL tobramycin. (IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Kons. [mg/mL]	Stamme	Kontroll		BK21	
	Topp [m/z]	379	490	379	490
0.5	Intensitet	6530	89 m	6010	146 m
	AUC	4913	IM	4822	IM
0.1	Intensitet	13034	IM	4849	IM
	AUC	9465	IM	3345	IM

Frå tabell 25 ser ein at tilsetjing av meir bakteriar førte til at toppane ved 490 m/z vart mindre tydelege for både kontrollstamma og BK21 ved begge konsentrasjonane. For 0,1 mg/mL var toppen ikkje påviseleg i spektra i det heile. Ved 0,5 mg/mL var toppen tilstades for BK21, men var svært låg for kontrollstamma. Dette er også vist i figur 26. Dei to øvste spektra viser resultatata ved 0,1 mg/mL tobramycin for høvesvis BK21 og kontrollstamma, der toppen ved 490 m/z ikkje kan påvisast. BK21 ved 0,5 mg/mL tobramycin er presentert i det nest nedste spekteret, og er den einaste prøven i dette forsøket som viser ein tydeleg topp ved 490 m/z. Det nedste spekteret viser kontrollstamma med 0,5 mg/mL tobramycin, der toppen ved 490 m/z er svært låg og utydeleg. Tilsetjing av meir bakteriar i prøvane gir meir støy i spektra og fører til at toppen ved 490 m/z ikkje er påviseleg for kontrollstamma. Frå dette forsøket er det vanskeleg å samanlikna forskjellar mellom kontrollstamma og den kliniske stamma, sidan tobramycintoppen ikkje er påviseleg for kontrollstamma for desse konsentrasjonane av tobramycin.



**Figur 26:** Viser massespektra ved tilsetjing av meir bakteriar i prøvane. Spektra viser frå øvst til nedst; BK21 med 0,1 mg/mL tobramycin, kontrollstamma med 0,1 mg/mL tobramycin, BK21 med 0,5 mg/mL tobramycin og kontrollstamma med 0,5 mg/mL tobramycin.

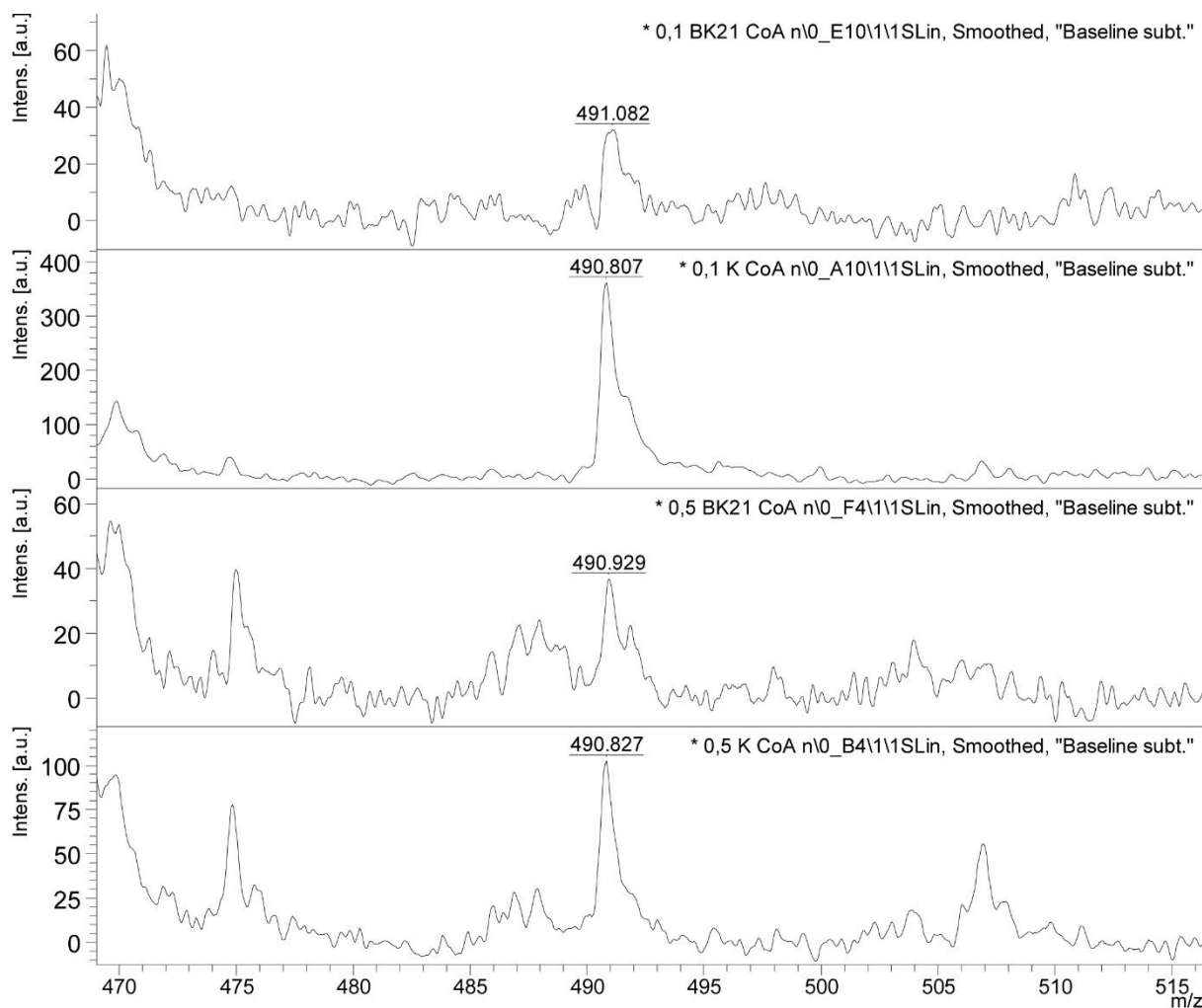
#### 4.3.7 2,5-DHB matriks (med propionyl CoA)

Eit oppsett vart gjort der 2,5-DHB vart brukt som matriks i staden for HCCA. Dette vart gjort for å sjå om ein annan type matriks gav endringar i massespekteret som gjorde det lettare å visa forskjellar mellom prøvane. I dette forsøket vart det i tillegg tilsett propionyl CoA i 1:1-forhold i mol/mL til tobramycin, og inkuberingstida var 2 timar.

**Tabell 26:** Viser resultatata frå forsøka der 2,5-DHB vart brukt som matriks på prøvar av kontrollstamma og BK21 med 0,5 og 0,1 mg/mL tobramycin. (IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

<b>Kons.</b> [mg/mL]	<b>Stamme</b>	<b>Kontroll</b>	<b>BK21</b>
	<b>Topp [m/z]</b>	<b>490</b>	<b>490</b>
<b>0,5</b>	<b>Intensitet</b>	103 m	37 m
	<b>AUC</b>	IM	IM
<b>0,1</b>	<b>Intensitet</b>	341	32 m
	<b>AUC</b>	435	IM

Resultata frå forsøket er presentert i tabell 26. Toppen ved 379 m/z er ikkje med som samanlikning, sidan denne kjem frå HCCA-matriksen og ikkje var tilstades i spektera i dette forsøket. Det er heller ikkje tatt med noko annan topp til å samanlikna intensitetane av toppane mellom prøvane. Likevel ser det ut til at det er ein reduksjon i intensiteten av toppen ved 490 m/z for BK21 i forhold til kontrollstamma ved begge konsentrasjonane av tobramycin. Frå figur 27 ser ein massespektera frå forsøket. For kontrollstamma er det klare toppar ved 490 m/z både for 0,1 og 0,5 mg/mL tobramycin. For BK21 er toppen ved 490 m/z låg og lite tydeleg i spektera for begge konsentrasjonane av tobramycin. Frå dette forsøket ser det ut til at analysen av stammene med propionyl CoA og 2,5-DHB-matrix gir ein påviseleg forskjell i intensiteten av tobramycintoppen mellom BK21 og kontrollstamma.



**Figur 27:** Viser massespektra frå forsøket med propionyl CoA og 2,5-DHB matriks. Spektra viser frå øvst til nedst BK21 med 0,1 mg/mL tobramycin, kontrollstamma med 0,1 mg/mL tobramycin, BK21 med 0,5 mg/mL tobramycin og kontrollstamma med 0,5 mg/mL tobramycin.

#### 4.3.8 Laserintensitet

Eit forsøk vart gjort der laserintensiteten på MALDI-TOF-instrumentet vart justert manuelt. Dette vart gjort for å kontrollera om andre laserintensitetar ville gi betre spekter i forhold til oppløysing og fragmentering av iona. Dei klaraste spektra frå MALDI-ionisering vert danna når laserintensiteten er litt høgare enn intensitetsgrensa for danning av ion(21). Laserintensiteten vart difor redusert for å sjå om dette ville gi mindre fragmentering av analyttiona. Kvar prøve vart avsett på fleire spotar på MALDI-plata, slik at dei kunne analyserast med laserintensitetar mellom 29-34 %. Prøvane vart inkubert i 2 timar.

**Tabell 27:** Viser intensitet og AUC for toppane ved 379 og 490 m/z frå massespektera for prøvar av kontrollstamma og BK15 analysert med laserintensitet mellom 29-34 %. (IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Laser-intensitet	Stamme	Kontroll		BK15	
	Topp [m/z]	379	490	379	490
29 %	Intensitet	3318	293	6968	868
	AUC	2081	285	5392	1090
30 %	Intensitet	7209	352	6582	440
	AUC	4845	353	4390	441
31 %	Intensitet	3145	271	10306	960
	AUC	1983	284	7927	1100
32 %	Intensitet	5145	252	16461	901
	AUC	3416	270	11030	954
33 %	Intensitet	7045	625	21802	1631
	AUC	4455	581	18282	1995
34 %	Intensitet	8661	727 m	21051	1427
	AUC	5777	IM	14364	1573

Resultata frå oppsettet er presentert i tabell 27. Toppane ved 490 m/z var tydelege i alle spektra og vart merka automatisk av programvara (utanom for kontrollstamma ved 34 % laserintensitet. Intensiteten av toppane ved 379 og 490 m/z aukar med aukande laserintensitet. Viss ein ser på forholdet mellom desse to toppane for kvar prøve, held intensiteten av toppen ved 490 m/z seg relativt stabil ved analysane med ulike laserintensitetar. Det er ingen tydeleg nedgang i intensiteten av tobramycintoppen for BK15 i forhold til kontrollstamma. Frå desse resultata ser det ut til at ulik laserintensitet ikkje påverkar forholda for påvising av AME med MALDI-ToF.

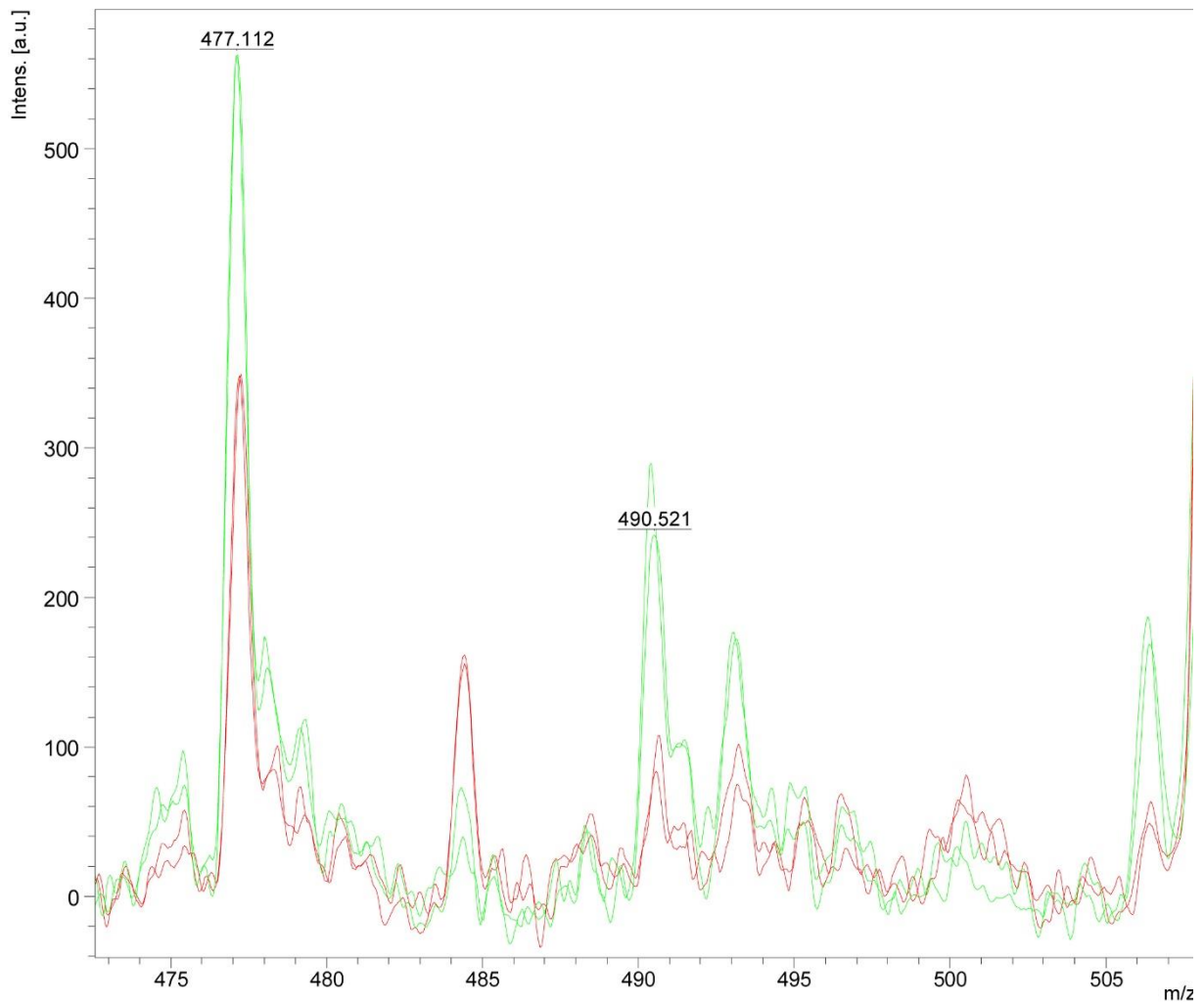
#### 4.3.9 Meir bakteriar og propionyl CoA ved ulike laserintensitetar

Eit forsøk vart gjort der fleire parameterar vart endra samtidig. I dette oppsettet vart prøvane tilsett meir bakteriar i tillegg til propionyl CoA, og dei vart analysert ved laserintensitetar mellom 29-34 %. Prøvane vart inkubert i 2 timar.

**Tabell 28:** Viser intensitet og AUC for toppane ved 379 og 490 m/z frå massespektera frå prøvane av kontrollstamma og BK15 tilsett meir bakteriar og propionyl CoA, analysert på laserintensitetar mellom 29-34 %. (IM = ikkje målbar, m = merka manuelt)

Laser-intensitet	Stamme	Kontroll		BK15	
	Topp [m/z]	379	490	379	490
29 %	Intensitet	546	43 m	829	27 m
	AUC	301	IM	489	IM
30 %	Intensitet	474	56 m	464	26 m
	AUC	259	IM	271	IM
31 %	Intensitet	574	84 m	208	23 m
	AUC	363	IM	134	IM
32 %	Intensitet	541	95 m	2189	105 m
	AUC	339	IM	1418	IM
33 %	Intensitet	2059	289 m	2177	108 m
	AUC	1441	IM	2201	IM
34 %	Intensitet	1589	242 m	4805	84 m
	AUC	1169	IM	3169	IM

Resultata frå forsøket er presentert i tabell 28. Intensiteten av alle toppane er relativt låg, både for toppen ved 379 og 490 m/z. Toppene ved 490 m/z måtte merkast manuelt i alle spektera, og er særleg låge ved dei lågare laserintensitetane. Alle prøvane viser ein nedgang i intensitet av tobramycintoppen for BK15 i forhold til kontrollstamma. Ved laserintensitetar mellom 29-32 % var toppen ved 490 m/z for låg og uklar i spektera for kontrollstamma til at den kan samanliknast med BK15. Men for dei høgare laserintensitetane (33-34 %) var tobramycin-toppen tydeleg i spektera. Dette er vist i figur 28. Her er spektera for kontrollstamma (grøn) og BK15 (raud) ved laserintensitetar 33 og 34 % lagt over kvarandre. Toppene i spektera ved 490 m/z er tydelege for kontrollstamma. For BK15 er toppene mykje lågare og skil seg ikkje like klart ut frå støy i spekteret. Frå dette forsøket ser det ut til at tilsetjing av meir bakteriar og propionyl CoA analysert ved dei høgaste laserintensitetane kan gi ein påviseleg forskjell mellom kontrollstamma og BK15.



**Figur 28:** Viser massespektra av prøvane av kontrollstamma (grøn) og BK15 (raud) tilsett meir bakteriar og propionyl CoA, analysert på 33 og 34 % laserintensitet.



## 5. Diskusjon

### 5.1 Karakterisering av stammene

#### 5.1.1 MLST

Dei tre kliniske isolata BK15, BK21 og U15 vart typa for å undersøkje om dei høyrer til same eller relaterte sekvenstypar som er spesielt mottakelege for mobile genetiske element eller sekvenstypar som er spesielt virulente. Av *E. coli* er særleg sekvenstype 131 assosiert med multiresistente stammer og spreiding av resistensgen. ST 131 er no ein global epidemisk multiresistent sekvenstype som gir mange ulike ekstraintestinale infeksjonar, mellom anna livstruande sepsis(45). BK15, BK21 og U15 vart påvist som høvesvis sekvenstype 85, 169 (noko usikkert) og 34. Ingen av desse sekvenstypane er omtalt i samanheng med multiresistente stammer eller utbrot. Dette stemmer godt med den epidemiologiske situasjonen i Noreg, der dei aminoglykosidresistente stammene i hovudsak er polyklonale. Men det finst også eit døme på aminoglykosidresistent *E. coli* av sekvenstype 648, som er assosiert med ekstendert spektrum  $\beta$ -laktamase-produksjon(46). Aminoglykosidresistensen er også i stor grad skulda av ko-resistens(19, 20).

#### 5.1.2 Proteomikk

Dei proteomiske eksperimenta vart gjort for å detektera AME som tidlegare hadde vorte påvist ved PCR i dei resistente stammene, i tillegg til å sjå om stammene kunne inneha fleire typar AME som det ikkje vart screena for med PCR. Proteomikk vart gjort både med og utan påverknad av antibiotika for å sjå om eksponering for aminoglykosid endra uttrykkinga av AME i stammene. Desse analysane gav semi-kvantitativ deteksjon av AME i dei ulike prøvane. Kvantifiseringa vart gitt i form av label free quantification (LFQ)-intensitet som gir den relative mengda av protein i dei ulike prøvane basert på massespektra for kvart protein(47).

I arbeidet med proteomikk er det viktig å hugsa at resultatane berre vert så gode som databasen ein søker mot. Viss databasen manglar informasjon om til dømes eit AME, vil ein heller ikkje få identifisert dette i resultatane.

#### BK15

For BK15 vart enzymet AAC(3)-II identifisert. Dette var som forventet, ut frå at genet for enzymet hadde vorte påvist ved PCR i denne stamma. Enzymet vart berre identifisert i prøven som hadde vore eksponert for gentamicin, frå ein enkelt peptidsekvens frå databasen.

Identifisering frå berre ein sekvens gjer dei kvantitative resultatata noko meir usikre, og det kan tenkjast at enzymet også er uttrykt i prøven utan gentamicineksponering, men at akkurat denne sekvensen ikkje var tilstades i tilstrekkeleg mengd til å fangast opp. Likevel kan resultatata frå dette forsøket tyda på at eksponeringa for gentamicin aukar uttrykkinga av AAC(3)-II i BK15.

Frå proteomikkanalysen passa den identifiserte peptidsekvensen med fleire nært slekta protein i underklassen AAC(3)-II. Den identifiserte sekvensen har 10 aminosyrer i forskjell frå referansesekvensane for både AAC(3)-IIa og AAC(3)-IIc, men er identisk med publisert sekvens av AAC(3)-II funne i plasmid i *Citrobacter freundii*(48).

## U15

Søket med massespektra av U15 mot databasen gav treff for fire ulike AME; AAC(6')-Ib3, AAC(6')-Ib-cr, ANT(3'')-Ia og APH(2'')-IVa. Søket gav treff for to ulike AAC(6')-Ib, så dette vart undersøkt nærare. Det vart gjort ei BLAST-søk for dei identifiserte peptidsekvensane for AAC(6')-Ib3 og -Ib-cr, og alle desse peptida kom inn med 5-25 treff på ulike AAC(6')-Ib med 100 % homologi. Ved tidlegare karakterisering av stamma vart genet for AAC(6')-Ib-cr påvist med PCR, så mest truleg er det dette enzymet som vert funne også i denne analysen. Det kan ikkje utelukkast at U15 uttrykkjer fleire ulike typar AAC(6')-Ib, men det vert rekna som lite sannsynleg at stamma inneheld fleire gen som er så like. På bakgrunn av dette vart det gjort eit nytt søk, der peptidsekvensane frå U15-prøvene kun vart samanlikna med proteinsekvensen frå AAC(6')-Ib-cr. Dette søket gav treff for AAC(6')-Ib-cr både i prøven med og utan tobramycineksponering, frå høvesvis 9 og 10 peptidsekvensar. LFQ-intensiteten for dei to prøvene var ganske lik, så det er vanskeleg å seia om eksponeringa for tobramycin har innverknad på uttrykkinga av AAC(6')-Ib-cr i U15-stamma.

ANT(3'')-Ia vart også identifisert i U15-stamma, og berre i prøven med eksponering for tobramycin. Enzymgruppa ANT(3'') modifierer aminoglykosida spectinomycin og streptomycin(6), så dette enzymet ville ikkje ha påverka analysen på MALDI-ToF med amikacin, tobramycin og gentamicin. Likevel ser det her ut til at eksponeringa for tobramycin har påverka uttrykkinga av ANT(3'')-Ia i U15-stamma, slik at enzymet vert identifisert i prøven med, og ikkje i prøven utan tobramycineksponering. På den andre sida vart dette enzymet identifisert frå berre ein peptidsekvens, så dei kvantitative resultatata er noko usikre.

APH(2'')-IVa vart kun identifisert i prøven utan eksponering for tobramycin, frå fleire ulike peptidsekvensar. Enzymgruppa APH(2'') er kjent for å gi resistens mot gentamicin, men er tidlegare identifisert berre i Gram-positive bakteriar(5). Frå MIC-testen gjort for U15-stamma,

ser ein at MIC-verdien for gentamicin er låg, på 0,75 mg/L. APH(2'')-IVa gir difor ikkje fenotypisk resistens mot gentamicin. Dette kan skuldast mutasjonar i genet, slik at enzymet ikkje lenger er verksamt for modifisering av gentamicin, latent resistens, eller at enzymet ikkje er uttrykt i stor nok mengd til å gi resistens.

## 5.2 Stabilitetstesting av antibiotika

### 5.2.1 Buljong mikrofortynning

Forventa MIC-verdiar for ATCC 25922 av *E. coli* og ATCC 29213 av *S. aureus* spanner over tre eller fire tofalds fortynningstrinn for dei ulike aminoglykosida. Frå alle oppsetta av buljong mikrofortynning med ATCC-stammene, med nylaga aminoglykosidløysingar, løysingar lagra to og fire månadar i frys og den andre nylaga tobramycinløysinga, låg dei målte MIC-verdiane innanfor dette forventa spekteret av MIC-verdiar. Desse resultatane viser at aminoglykosida held seg stabile nok ved lagring i frys til å ha forventa MIC-verdiar for dei sensitive stammene. Viss ein ser på resultatane frå den kromato-grafiske testinga av aminoglykosida, var den største målte nedgangen i konsentrasjon observert for amikacinløysinga som hadde vore fryst og tint 10 gonger (sjå figur 13). I denne løysinga hadde konsentrasjonen sunke til 0,68 mg/mL. Teoretisk sett ville denne nedgangen i konsentrasjon berre gjera seg gjeldande i buljong mikrofortynning ved å gi ein MIC-verdi som var eitt fortynningstrinn høgare. Dette stemmer også over eins med resultatane frå buljong mikrofortynning for amikacin. Oppsettet med *E. coli* ATCC 25922 og amikacinløysinga som hadde vore lagra fire månadar i frys, viser ein MIC-verdi eit fortynningstrinn høgare (1 mg/L) enn for den nylaga løysinga (0,5 mg/L). Likevel er målingane framleis innanfor det forventa spekteret av MIC-verdiar. Buljong mikrofortynning er difor ein for grov måte til å seia noko om nedgang i konsentrasjon av aminoglykosidløysingane, men viser at aminoglykosida framleis er verksame etter lang tids lagring i frys.

Buljong mikrofortynning vart også gjort for dei resistente *E. coli*-stammene BK15, BK21 og U15 med tobramycin. Dette var ikkje for å bestemma MIC-verdiane, men for å sjå at desse stammene viste resistens og hadde høgare MIC-verdiar enn den sensitive stamma. Difor vart forsøket gjort med dei same konsentrasjonane av tobramycin i fortynningsrekkjene som tidlegare. Dei kliniske isolata hadde, som forventa, vekst i alle brønnane. Av dette ser ein at stammene gir fenotypisk resistens mot tobramycin etter inkubering over natt i Müller Hinton-buljong.

## 5.2.2 Kromatografisk testing

### Amikacin

Ved den kromatografiske analysen av dei ulike amikacinløysingane, vart den gjennomsnittlege konsentrasjonen bestemt til 1,00 mg/mL for den ferske løysinga, 0,68 mg/mL for løysinga fryst og tint 10 gonger, 0,76 mg/mL for løysinga lagra i romtemperatur i to veker og 0,74 mg/mL for løysinga lagra seks månadar i frys. Dei ni målingane for kvar av løysingane kom inn med liten variasjon, og standardavviket for målingane vert difor lite. På bakgrunn av dei nøyaktige målingane kan ein seia noko om forskjellen i konsentrasjon i dei ulike løysingane. Dei tre lagra løysingane viste alle ein statistisk signifikant og relativt stor reduksjon i konsentrasjon i forhold til den ferske løysinga. Løysinga som vart fryst og tint 10 gonger hadde den største nedgangen i konsentrasjon, og denne er signifikant større enn for dei to andre lagra løysingane. Løysingane lagra i romtemperatur i to veker og i frys i seks månadar har begge lågare konsentrasjon enn den ferske løysinga, men det er ikkje noko signifikant forskjell mellom desse to. Desse resultata viser at alle dei tre formene for lagring fører til redusert konsentrasjon av amikacin i løysinga, og at gjentatt frysing og tining under lagringa har størst påverknad på stabiliteten av amikacin. Amikacin er relativt ustabil ved lagring og har meir nedgang i konsentrasjon enn tobramycin og gentamicin.

### Tobramycin

Frå den kromatografiske testinga av dei ulike tobramycinløysingane, vart den gjennomsnittlege konsentrasjonen målt til 1,00 mg/mL for den ferske løysinga. Gjennomsnittleg konsentrasjon for dei lagra løysingane var 0,96 mg/mL for løysinga fryst og tint 10 gonger, 0,79 mg/mL for løysinga lagra to veker i romtemperatur, 1,04 mg/mL for løysinga lagra seks månadar i frys og 0,93 mg/mL for løysinga lagra tre månadar i frys. Også her hadde dei ni målingane for kvar løysing liten variasjon, og standardavvika for gjennomsnittskonsentrasjonane er små. Alle dei lagra løysingane viste statistisk signifikant endring i konsentrasjon av tobramycin i forhold til den ferske løysinga. Løysinga som hadde vore fryst og tint 10 gonger viste ein relativt liten nedgang i konsentrasjon (til 0,96 mg/mL) i forhold til resultata for amikacin. Tobramycinløysinga som hadde vore lagra i romtemperatur i to veker viste størst reduksjon i konsentrasjon (til 0,79 mg/mL), og denne nedgangen var signifikant større enn for dei andre lagra tobramycinløysingane. Løysinga som hadde vore lagra seks månadar i frys viste høgare konsentrasjon enn den ferske løysinga (1,04 mot 1,00 mg/mL). Dette var overraskande fordi ein ventar at aminoglykosida vert brote ned i løysing, og at konsentrasjonen difor minkar ved lagring. Ei

mogleg forklaring på denne auken i konsentrasjon er at noko av vatnet i løysinga har sublimert under frysinga. På denne måten vert volumet redusert og løysinga meir konsentrert. Ei anna mogleg forklaring er at konsentrasjonen på løysinga var høgare enn 1 mg/mL i utgangspunktet, noko som ville ha påverka alle dei lagra tobramycinløysingane og gitt falskt høge konsentrasjonsmålingar. Løysinga av tobramycin som hadde vore lagra tre månadar i frys, viste ein relativt liten nedgang i konsentrasjon til 0,93 mg/mL i forhold til den ferske løysinga. Desse resultatane viser at alle formene for lagring gir ein nedgang i konsentrasjon av tobramycin i løysinga, og at oppbevaring i romtemperatur i tillegg til langtidslagring i frys er det som påverkar stabiliteten av tobramycin mest. Tobramycin verkar å vera rimeleg stabil ved lagring i frys, og har mindre nedgang i konsentrasjon enn amikacin for alle formene for lagring.

### **Gentamicin**

For stabilitetstestinga av gentamicin vart dei tre gentamicinformene C1, C1a og C2 analysert kvar for seg. Gjennomsnittskonsentrasjonen av gentamicin C1 vart målt til 0,33 mg/mL for den ferske løysinga, 0,31 mg/mL for løysinga som hadde vore fryst og tint 10 gonger, 0,32 mg/mL for løysinga som hadde stått i romtemperatur i to veker og 0,31 mg/mL for løysinga som hadde vore lagra seks månadar i frys. Gentamicin C1a og C2 fekk like konsentrasjonsmålingar for dei ulike løysingane; 0,33, 0,30, 0,32 og 0,31 mg/mL for høvesvis fersk løysing, løysing fryst og tint 10 gonger, løysing lagra to veker i romtemperatur og løysing lagra seks månadar i frys. Alle dei lagra løysingane viste statistisk signifikant reduksjon i konsentrasjon i forhold til den ferske løysinga. Dei ulike formene for gentamicin viser like mønster for stabilitet ved lagring, men det er vanskeleg å seia noko om kva type lagring som er mest skadeleg, sidan forskjellane i konsentrasjon mellom løysingane lagra på ulik måte er så små. Frå dette forsøket ser ein at dei tre formene for gentamicin er stabile ved lagring i frys og heller ikkje vert mykje påverka av gjentatt frysing og tining eller oppbevaring i romtemperatur.

Det vart også prøvd eit anna system for denne stabilitetstestinga, der aminoglykosidløysingane vart fortynta 1:100 i acetonitril. Her vart prøvematerialet injisert i eit UPLC-system med revers fase kolonne. Mobilfase A var 0,1 % maursyre i vatn og mobilfase B var metanol. Dette oppsettet viste at aminoglykosida, og særleg gentamicin, var ustabile i acetonitril, og konsentrasjonen minka tydeleg mellom analysane. Presisjonen for desse seriane vart difor gjennomgåande dårleg, og metoden utan fortynting i acetonitril vart brukt i staden.

### 5.3 Påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-TOF

I arbeidet med påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-TOF vart verdiane for intensitet og AUC for toppane som representerer tobramycin henta ut frå massespektera. AUC vart vurdert som eit mål fordi dette sannsynleg vil gi riktigare samanlikning av massespekter frå ulike prøvar av same stamme enn ved å bruka intensitetsverdiane åleine. AUC kunne ikkje kalkulerast for alle toppane i spektera når desse var for låge. Difor omhandlar diskusjonen intensitetsverdiane i massespektera, sidan desse kunne innhentast for dei aktuelle toppane. Ved eventuell matematisk samanlikning og fastsetjing av ein cut-off-verdi, vil AUC vera det korrekte målet.

I arbeidet med tolking av massespektera for påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-TOF massespektrometri, vart det sett etter fleire typar endringar i massespektera for dei resistente stammene i forhold til den sensitive kontrollstamma.

Først og fremst vart det sett etter reduksjon i intensitet for toppane som representerer tobramycin i massespektera. Bakgrunnen for dette er at når AME modifierer aminoglykosida, legg dei ei gruppe (acetyl, AMP eller fosfat) til molekylet, og toppen for dette modifiserte molekylet vil koma på ein annan posisjon i massespekteret. Toppen for umodifisert aminoglykosid vil då verta mindre fordi konsentrasjonen er redusert. Ved ionisering med MALDI, er protonert molekylion, molekylion med tillegg av natrium eller ion med dobbel lading vanlege produkt. Tobramycin har ei molekylvekt på 467,5 Da, og det vart difor forventa å finna toppar ved ca. 467 m/z for det protonerte molekylionet, ved ca. 490 m/z for ionet av tobramycin med tillegg av natrium eller ved ca. halvparten av desse verdiane (233,5 og 245 m/z) for dei førstnemnde iona med dobbel lading. I massespektera vil toppane koma inn med ei nøyaktigheit på +/- 1 m/z.

Frå spekteret av den reine 1 mg/mL-løysinga vart toppen for molekylionet ved 467 m/z påvist. Men i spektera for prøvane tilsett bakteriar var denne toppen ikkje synleg eller svært låg, og på grunn av dette var det vanskeleg å seia noko om forskjellar mellom stammene på bakgrunn av denne toppen. Toppene forventa ved 233,5 og 245 m/z, for rein tobramycin og tobramycin med tillegg av natrium med dobbel ladning var heller ikkje tydelege i spektera og kunne ikkje brukast til å samanlikna stammene. Derimot hadde toppen for tobramycin med tillegg av natrium ved 490 m/z høgare intensitet enn molekylionet i spekteret for rein løysing av tobramycin, og var også synleg i spektera for prøvane tilsett bakteriar. Difor vart denne toppen

brukt for å undersøkje forskjellar mellom stammene, og ein såg då etter reduksjon i intensiteten av toppen i prøvane for dei kliniske isolata i forhold til kontrollstamma.

Ein slik reduksjon i intensitet av toppen ved 490 m/z vart observert i fleire av oppsetta. I forsøket der tobramycinkonsentrasjonar mellom 0,01-1 mg/mL vart testa ut, ser det ut til at 0,3 mg/mL gir ein nedgang i intensiteten av toppen ved 490 m/z. For kontrollstamma hadde toppen ein intensitet på 486, og var høgare enn for dei kliniske stammene med intensitetsverdiar på 304 (BK21), 179 (BK15) og 417 (U15) (sjå tabell 20). Forskjellane vert tydelegare når ein ser på intensiteten av toppane ved 490 m/z i forhold til toppane frå matriksen ved 379 m/z for dei ulike prøvane. Denne toppen vart tatt med som samanlikning, sidan den er tilstades i alle spektra. For BK15 og BK21 hadde toppen ved 490 m/z lågare intensitet i spekteret enn for kontrollstamma, sett i forhold til matrikstoppene ved 379 m/z, medan for U15 hadde toppen tilnærma lik intensitet som for kontrollstamma. Sjølv om forsøket viste lovande resultat, vart det valt å ikkje bruka denne konsentrasjonen i vidare oppsett, og i staden vart 0,1 og 0,5 mg/mL brukt. 0,5 mg/mL vart valt fordi denne konsentrasjonen gav klare toppar ved 490 m/z for alle prøvane. 0,1 mg/mL vart valt på bakgrunn av teorien om at jo lågare tobramycin-konsentrasjonen var, jo større del av molekyla rakk enzymbinding å omforma, og jo lettare ville det vera å observera forskjellane mellom sensitive og resistente stammer. I ettertid ser det ut til at 0,3 mg/mL kanskje hadde vore ein betre konsentrasjon å jobba med, og dette burde gjerast i vidare forsøk.

Ulike matriksar gir ulik ionisering, påverkar stabilitet og fragmentering av analyttane og gir ulik bakgrunn i spektra(49). Difor kan ulike matriksar ha innverknad på om eit ion er tydeleg i spekteret eller ikkje, og til dømes meropenem treng 2,5-DHB-matriks for å kunna visualiserast i spektra(37). Dette var bakgrunnen for å prøva 2,5-DHB-matriksen i arbeidet med denne oppgåva. Resultata frå dette oppsettet viste at toppen ved 490 m/z også kunne påvisast med 2,5-DHB-matriks i prøvar tilsett propionyl CoA. I tillegg vart det observert ein nedgang i intensiteten av tobramycintoppen ved 490 m/z for den resistente stamma i forhold til kontrollstamma. For kontrollstamma var intensiteten av toppen 103 og 435 ved 0,5 og 0,1 mg/mL tobramycin, medan intensitetsverdiar for BK21 var 37 og 32 for dei to konsentrasjonane (sjå tabell 26). Sidan tobramycintoppen vart tydeleg påvist også med HCCA-matriksen, vart det valt å fortsetja å bruka denne heller enn 2,5-DHB-matriksen. Frå desse resultata kan det sjå ut til at 2,5-DHB-matriksen gir klarare forskjellar mellom stammene, og det burde ha vore sett opp fleire forsøk med denne matriksen for å undersøkje dette nærare.

Det siste oppsettet som viste ein nedgang i intensitet av toppen ved 490 m/z hjå dei resistente stammene i forhold til kontrollstamma, var forsøka gjort med tilsetjing av meir bakteriar og propionyl CoA. Frå resistensprofilen på dei kliniske isolata, fekk dei tre stammene påvist to ulike typar AAC-enzym. AAC brukar acetyl CoA som donorsubstrat for acetylering av aminoglykosida. Green et.al gjorde ein studie som viser at AAC(6') og AAC(3) også kan bruka propionyl CoA som substrat for å modifisera aminoglykosid ved å overføra ei propionylgruppe til molekyla(50). Propionyl CoA er tilgjengeleg kommersielt, og frå studien er det vist at dette var best eigna for å kunna brukast som substrat for å modifisera både amikacin, gentamicin og tobramycin. Grunnen til at det vart prøvd å tilsetja propionyl CoA, var i tilfelle enzyma ikkje fekk nok CoA frå bakteriane til å kunna modifisera aminoglykosida effektivt. Meir bakteriar vart også tilsett for å sjå om ein ved å auka forholdet mellom bakteriemengd og konsentrasjon av tobramycin kunne få tydelegare forskjellar mellom kontrollstamma og dei resistente stammene. Frå resultata i avsnitt 4.3.9, vart det observert ein nedgang i intensiteten av toppen ved 490 m/z for BK15 i forhold til kontrollstamma ved tilsetjing av meir bakteriar og propionyl CoA analysert ved 33 og 34 % laserintensitet. Frå desse resultata såg det ut til at dette oppsettet gjorde det mogleg å påvisa aminoglykosidresistens med MALDI-ToF. Det vart forsøkt å gjera forsøket på nytt med dei andre kliniske isolata og med gentamicin og amikacin. Forskjellen mellom resistant og sensitiv stamme som vart observert i det første oppsettet, vart ikkje vist kvar gong i dei påfølgjande forsøka. Resultata frå dette oppsettet er difor ikkje reproducerbare.

I tillegg til endringar i toppane som representerer dei umodifiserte aminoglykosida i massespektera, vart det sett etter toppar som kjem frå dei modifiserte aminoglykosida. AAC tilfører naturleg acetyl til aminoglykosida, som gir eit tillegg av 43 Da til molekylmassen. Difor vart det sett etter toppar i spektera ved 510 og 533 m/z for ionet av rein tobramycin eller tobramycin med tillegg av natrium, som hadde vorte modifisert med acetyl. I forsøka der propionyl CoA vart tilsett, var det også ei moglegheit for toppar i spekteret av tobramycin med tillegg av propionyl (57 Da) ved 524 eller tobramycin med tillegg av natrium og propionyl ved 547 m/z. Ingen av desse toppane vart funne i spektera frå forsøka. Frå proteomikken vart det også vist at U15-stamma inneheld enzym av familiane APH og ANT i tillegg til AAC som var påvist frå før. Dette gjer at toppar for aminoglykosida modifisert med fosfor og AMP også er mogleg i spektera. Når stamma uttrykkjer fleire ulike typar AME kan same aminoglykosid-molekyl modifiserast med fleire ulike grupper. Dette gjer at spektera vert komplekse, og det er vanskeleg å leita etter toppane som representerer dei modifiserte aminoglykosida.



I tillegg til oppsetta gjort med 0,3 mg/mL tobramycin, med 2,5-DHB matriks og med tilsetjing av meir bakteriar og propionyl CoA som er diskutert over, vart det også forsøkt å endra andre faktorar i oppsettet. Desse endringane var fortytning av tobramycin i Müller Hinton-buljong, auka inkuberingstid, mekanisk lysing av bakteriecellene, tilsetjing av propionyl CoA, auka mengd bakteriar og variert laserintensitet. Ingen av desse oppsetta gav resultat som viste forskjellar i massespektra mellom dei kliniske isolata og kontrollstamma.

#### **5.4 Avgrensingar ved metoden**

Ved påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-TOF massespektrometri, vil denne metoden berre fanga opp resistens forårsaka av aminoglykosidmodifiserande enzym. Viss det er andre resistensmekanismer tilstades, som efflukspumper, endringar i bindesetet eller redusert opptak, vil dette ikkje påvisast, sjølv om bakterien viser fenotypisk resistens. Slik den epidemiologiske situasjonen er i Noreg i dag, er AME den viktigaste resistensmekanismen, og utvikling av ein metode som påviser denne med massespektrometri vil framleis vera eit verdifullt framsteg.

Ei anna avgrensing med metoden er at systemet som vert analysert er komplekst. Same stamme kan inneha fleire ulike AME, noko som kompliserer tolkinga av massespektra og gjer det vanskeleg å etablere ein metode som fungerer.

#### **5.5 Vidare arbeid**

I vidare utarbeiding av metoden for påvising av aminoglykosidresistens med MALDI-TOF massespektrometri kunne eit enklare system vorte prøvd ut. Spekteret som representerer bakterien og tilsetjing av til dømes propionyl CoA utgjer mange toppar i massespektra og gjer det vanskeleg å identifisere toppane som kjem frå modifisering med AME. Til dømes kunne ein reinsa eitt enkelt AME og studert effekten dette hadde på eit aminoglykosid. Slik hadde ein kanskje fått eit klarare bilete av kva modifikasjonar som vart gjort og kva toppar dette gav i massespekteret, før ein tok dette vidare til system som inkluderte bakterieceller.

Vidare arbeid med 0,3 mg/mL tobramycin burde gjerast, for å sjå om dette kunne vera ein meir ideell konsentrasjon for påvising av AME. Vidare utprøving med 2,5-DHB som matriks kunne også gjerast for å undersøkje om denne gjer det mogeleg å påvise tydelege forskjellar mellom resistente og sensitive stammer. I tillegg kunne andre matriksar også vore prøvd.

## **6. Konklusjon**

Bruk av MALDI-TOF massespektrometri er ein lovande metode til resistensbestemming av mikrobar fordi den er tilgjengeleg, billeg og rask. Resistens mot aminoglykosid er ein kompleks prosess, som ofte er samansett av fleire resistensmekanismar. Nærvær av fleire ulike typar aminoglykosidmodifiserande enzym i same bakteriestamme kompliserer påvisinga av resistens med massespektrometri, fordi aminoglykosida kan modifiserast i fleire posisjonar. Nokre av oppsetta i arbeidet viste lovande resultat for vidare arbeid, men framleis trengst vidareutvikling før ein rutinemetode kan etablerast.

## 7. Referanseliste

1. Legemiddelhåndboken. Aminoglykosider [06.05.2014]. Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/29538/?ids=29539#i29539>.
2. Schatz A, Bugle E, Waksman SA. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.\*†. *Experimental Biology and Medicine*. 1944;55(1):66-9.
3. Bonomo RA, Tolmasky M. Enzyme-mediated resistance to antibiotics : mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. xviii, 357 p., 8 p. of plates p.
4. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006;70(2):140-50.
5. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*. 2010;13(6):151-71.
6. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;16(3):430-50.
7. Hatala R, Dinh T, Cook DJ. Once-Daily Aminoglycoside Dosing in Immunocompetent Adults A Meta-Analysis. *Annals of Internal Medicine*. 1996;124(8):717-25.
8. Isoherranen N, Soback S. Determination of Gentamicins C1, C1a, and C2 in Plasma and Urine by HPLC. *Clinical Chemistry*. 2000;46(6):837-42.
9. Alberts B. *Essential cell biology*. 3rd ed. ed. New York ; London: Garland Science; 2010.
10. Eva-Lena Andersson MS. Uppsala Universitet; 2007. Available from: [http://xray.bmc.uu.se/~kurs/BiostrukfunkX2/Practical\\_7\\_BSF/ribosome\\_practical.html](http://xray.bmc.uu.se/~kurs/BiostrukfunkX2/Practical_7_BSF/ribosome_practical.html).
11. Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chemical Biology*. 2012;8(1):105-15.
12. Wachino J-i, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resistance Updates*. 2012;15(3):133-48.
13. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*. 2003;362(9399):1888-93.
14. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*. 1993;57(1):138-63.
15. Helsedirektoratet. Nasjonal faglig retningslinje for bruk av antibiotika i sykehus [07.05.14]. Available from: <http://helsedirektoratet.no/sites/antibiotikabruk-i-sykehus/Sider/default.aspx>.
16. P.C Lindemann BCH, I Smith, H Sjursen, H Mylvaganam. Aminoglykosider bør fortsatt brukes i empirisk sepsisbehandling. *Tidsskrift for den norske legeförening*. 2013;10.
17. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine*. 2006;34(6):1589-96.
18. NORM/NORM-VET 2012 Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2013. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic). [cited 2014].
19. Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;78(1):66-9.
20. Lindemann PC, Risberg K, Wiker HG, Mylvaganam H. Aminoglycoside resistance in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Western Norway. *APMIS*. 2012;120(6):495-502.

21. Gross JH. Mass spectrometry : a textbook. Berlin ; New York: Springer; 2004. xviii, 518 p. p.
22. Pavia L, Kriz, Vyvyan. Introduction to spectroscopy. 4. ed: Brokks/Cole; 2009. 656 p.
23. Ahmed FE. Utility of mass spectrometry for proteome ana lysis: part I. Conceptual and experimental approaches. Expert Review of Proteomics. 2008;5(6):841-64.
24. Gross J. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Mass Spectrometry. 2. ed: Springer-Verlag; 2011.
25. Karas M, Glückmann M, Schäfer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. Journal of Mass Spectrometry. 2000;35(1):1-12.
26. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. Clinical Microbiology and Infection. 2011;17(7):1007-12.
27. Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Monson Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(3):887-92.
28. Wojewoda CMD. Pathology Consultation on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Microbiology. American Journal of Clinical Pathology. 2013;140(2):143-8.
29. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. PROTEOMICS – Clinical Applications. 2013;7(11-12):767-78.
30. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Clinical Infectious Diseases. 2009;49(4):543-51.
31. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clinical Infectious Diseases. 2009;49(11):1749-55.
32. Digranes A. Resistensbestemmelse av bakterier. Faglig Forum. Oslo: LEO Pharma AS; 2008.
33. EDWARDS-JONES V, CLAYDON MA, EVASON DJ, WALKER J, FOX AJ, GORDON DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry. Journal of Medical Microbiology. 2000;49(3):295-300.
34. Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ. Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Specimens by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. Biomedical and Environmental Sciences. 2013;26(6):430-6.
35. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry To Identify Vancomycin-Resistant Enterococci and Investigate the Epidemiology of an Outbreak. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(9):2918-31.
36. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against  $\beta$ -Lactam Antibiotics. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(3):927-37.
37. Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E, Bergerová T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(9):3222-7.
38. I. Burkhardt VP, K. Bode, S. Zimmermann Detecting aminoglycoside resistance by mass spectrometry. Berlin: ECCMID; 2013.
39. Eucast. Routine internal quality control as recommended by EUCAST, Version 3.1, valid from 2013-01-01 [06.05.2014]. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/EUCAST Routine QC tables 3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/EUCAST_Routine_QC_tables_3.1.pdf).

40. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;16(0):38-53.
41. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3140-5.
42. Shigatox.net. Primers for multilocus sequence analysis of pathogenic *E. coli* [06.05.2014]. Available from: [http://shigatox.net/ecmlst/protocols/mlst\\_primers.html](http://shigatox.net/ecmlst/protocols/mlst_primers.html).
43. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*. 2009;6(5):359-62.
44. Wiśniewski JR, Zielinska DF, Mann M. Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Analytical Biochemistry*. 2011;410(2):307-9.
45. Zubair A Qureshi YD. *Escherichia coli* sequence type 131: epidemiology and challenges in treatment. *Informa Healthcare Journals*. 2014.
46. Tomazella GG, Risberg K, Mylvaganam H, Lindemann PC, Thiede B, de Souza GA, et al. Proteomic analysis of a multi-resistant clinical *Escherichia coli* isolate of unknown genomic background. *Journal of Proteomics*. 2012;75(6):1830-7.
47. Nahnsen S, Bielow C, Reinert K, Kohlbacher O. Tools for Label-free Peptide Quantification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(3):549-56.
48. Gołębiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Żylińska J, Baraniak A, et al. Complete Nucleotide Sequence of the pCTX-M3 Plasmid and Its Involvement in Spread of the Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Gene blaCTX-M-3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(11):3789-95.
49. Garaguso I, Borlak J. Matrix layer sample preparation: An improved MALDI-MS peptide analysis method for proteomic studies. *PROTEOMICS*. 2008;8(13):2583-95.
50. Green KD, Chen W, Houghton JL, Fridman M, Garneau-Tsodikova S. Exploring the Substrate Promiscuity of Drug-Modifying Enzymes for the Chemoenzymatic Generation of N-Acylated Aminoglycosides. *ChemBioChem*. 2010;11(1):119-26.