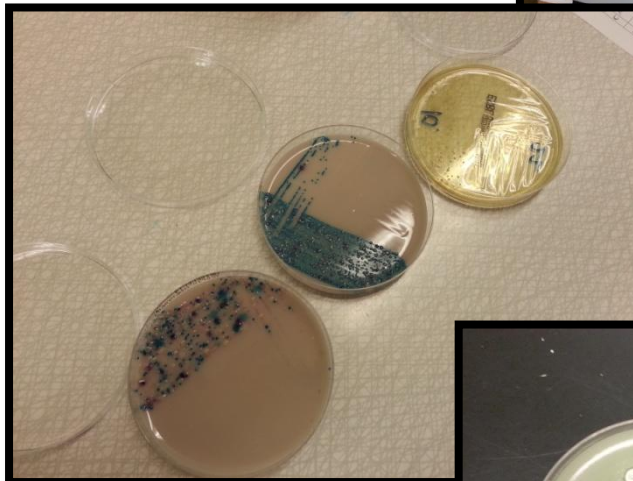
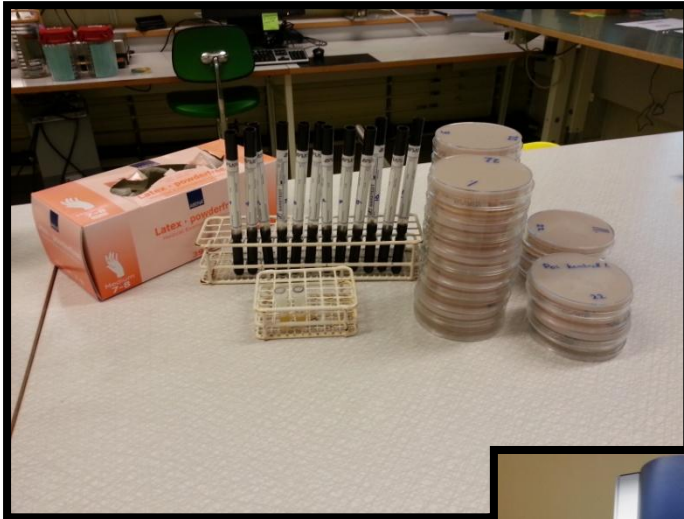


## Finns ESBL-producerande tarmbakterier hos hästar i Blekinge?



## Innehållsförteckning

|   |                 |
|---|-----------------|
| <b>Inledning</b>  | <b>Sida 2</b>   |
| <b>Syfte</b>  | <b>Sida 3</b>   |
| <b>Teori</b>  | <b>Sida 3-5</b> |
| Vad är ESBL?  | <b>Sida 3</b>   |
| Hur hittar man ESBL (hur screenar man efter ESBL-producerande bakterier)? | <b>Sida 3</b>   |
| Vad är lappdiffusion?   | <b>Sida 4</b>   |
| Hur kan man artbestämma bakterier?  | <b>Sida 5</b>   |
| <b>Metoder</b>  | <b>Sida 6</b>   |
| <b>Resultat</b>   | <b>Sida 6</b>   |
| <b>Diskussion</b>   | <b>Sida 7</b>   |
| <b>Källförteckning</b>  | <b>Sida 8</b>   |
| <b>Bilaga 1</b>   |                 |

## Inledning

ESBL-producerande tarmbakterier (extended spectrum betalactamase) är ett stort och växande problem över världen. Bakterierna sprids över världen när människor reser och flyttar mellan olika länder och även djur (både sällskapsdjur och livsmedelsproducerande djur) bär på dem. ESBL-bildande bakterier har en förmåga att sprida sig snabbt och dessutom är dessa bakterier ofta multiresistenta, vilket innebär att de är resistenta mot flera olika antibiotikagrupper och detta gör att de är extra svåra att behandla. Jag är mycket intresserad i mikrobiologi och därför valde jag att rikta in mitt projektarbete på det här området.

Det har varit väldigt spännande att få arbeta med ett projekt som är så oerhört aktuellt. Forskare och läkare uppmärksammar dessa speciella tarmbakterier och undersökningar görs där man försöker hitta ett sätt att minska spridningen på ESBL-bildande bakterier. Under hösten 2012 inleddes en stor studie där Smittskyddsinstitutet (SMI), Livsmedelsverket och Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) tillsammans tänker utreda hur bakterier som producerar ESBL sprids i samhället. Studien pågår till och med år 2014 och under perioden kommer avföringsprov från 2000 friska personer samlas in och SVA och livsmedelsverket kommer att analysera olika livsmedel, såsom grönsaker, kött och vatten. Med hjälp av studien vill man få en klarare bild på hur situationen i samhället ser ut när det gäller antibiotikaresistenta tarmbakterier. Man vill också få en ökad förståelse hur spridningen av dessa bakterier går till.

År 2007 infördes anmälningsplikt för ESBL-producerande bakterier och därför har man en relativt bra uppfattning om hur många som bär på dessa bakterier varje år. De senare åren har ESBL-bildande bakterier ökat med en skrämmande takt. Bakterier med resistensmekanismen ESBL är nu flera gånger vanligare än de övriga anmälningspliktiga resistenta bakteriearter som till exempel vancomycinresistenta enterokocker (VRE) och meticillinresistenta stafylokocker (MRSA). År 2012 rapporterades 7225 fall av ESBL-producerande bakterier hos människa i Sverige. Samma år fann man 2097 fall av MRSA.

Även om resistensutvecklingen i Sverige ser allvarlig ut, är vi ett land där som har en lägre andel ESBL-bildande bakterier än andra Europeiska länder. De allra flesta ESBL-producerande bakterier påträffas i områdena kring stillahavsområdet, Asien och Sydamerika. SMI jobbar hårt med att kartlägga problemets utbredning och ett sätt att försöka förhindra resistensutvecklingen är att minska användningen av bredspektrum antibiotika.

Förekomsten av ESBL-producerande bakterier hos hästar har däremot inte varit klarlagd på grund av en lägre grad av provtagning av djur. År 2010 rapporterades 12 fynd av ESBL-producerande bakterier hos häst i Sverige och sammanlagt har man hittat 33 fynd av ESBL-bildande bakterier mellan åren 2008 och 2011. Orsakerna till att spridningen av resistenta bakterier är mindre hos hästar än hos människor kan kanske ge oss ledtrådar om vad vi borde förändra i humanvården för att minska spridningen av dessa bakterier bland människor.

## Syfte

Syftet med mitt projektarbete är att besvara frågeställningen: Finns ESBL-producerande tarmbakterier hos hästar i Blekinge? Jag har valt att arbeta med den metod som används mest inom humanvården, för att hitta ESBL-producerande bakterier hos människor. Därför får jag även en oerhört bra inblick i hur man arbetar inom klinisk mikrobiologi och hur de senaste analysmetoderna fungerar. Mitt projektarbete kommer att presenteras dels skriftligt och dels muntligt. Dessutom kommer jag att göra en monter som ger en lättförståelig bild över hur mitt arbete har genomförts, samt innehålla kortfattad fakta för att skapa en förståelse av vad ESBL är.

## Teori

### Vad är ESBL?

ESBL är ett enzym som bryter ner nyare betalaktamantibiotika, vilka utgör en viktig kategori av bredspektrum antibiotika. Bakterierna som har den här mekanismen är resistenta mot viktiga antibiotika som till exempel penicilliner och cefalosporiner. Den här resistensutvecklingen är väldigt allvarlig, då dessa är antibiotika som man använder vid många svåra infektioner.

Definitionen av ESBL-producerande bakterier är att de tillverkar ESBL som bryter ner tredje generationens cefalosporiner och att genen för enzymet är plasmidburen. Detta innebär att egenskapen för att kunna producera ESBL inte sitter i bakteriernas kromosomer utan i cirkulära DNA-fragment, så kallade plasmider. Bakterier kan därför lätt sprida genen för ESBL mellan olika arter och generationer. Det finns bakterier som är naturligt resistenta mot betalaktamantibiotika, så kallat kromosomalt resistenta. Det innebär att de bär sina resistensmekanismer i sitt kromosomala DNA. Dessa bakterier har funnits länge och är inget orosmoment, utan det är den skenade resistensutvecklingen där bakterier som tidigare slogs ut av antibiotika plötsligt börjar uppvisa resistensmekanismer som är det stora problemet i sjukvården.

Det är gramnegativa stavar (huvudsakligen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* och *Proteus mirabilis*) som bär och sprider generna för ESBL-produktion mellan sig. Bild 1 visar gramfärgade *Escherichia coli*, förstorade hundra gånger i mikroskop.

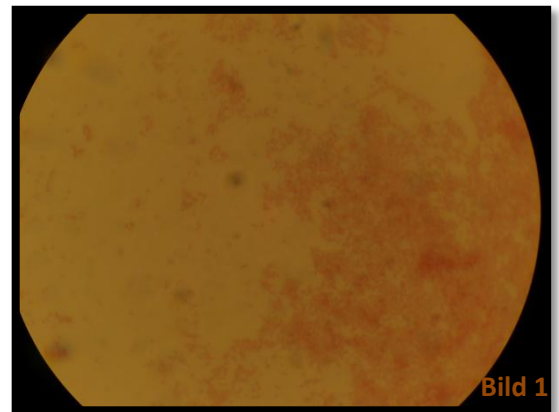


Bild 1

### Hur hittar man ESBL (hur screenar man efter ESBL-producerande bakterier)?

När man söker efter ESBL-producerande bakterier använder man sig av en ESBL-specifik agarplatta. I den ESBL-specifika agarplattan, har man tillsatt antibiotikumet Cefotaxim (med koncentrationen 1,0 mg/L) i agarn. De bakterier som klarar av att stå emot antibiotikumet och växa, kan förväntas vara ESBL-producerade, men för att kunna ge ett säkert resultat, gör man fortsatta tester med bakterien (se lappdiffusion). Bild 2 föreställer en ESBL-specifik agarplatta med riklig tillväxt av ESBL-producerande bakterier.

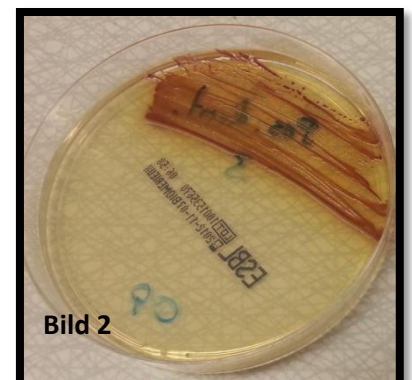


Bild 2

### Vad är lappdiffusion?

För att säkert kunna avgöra om en bakterie är resistent mot antibiotika, använder man sig av lappdiffusionsteknik. Lappdiffusionsteknik går ut på att man har små runda porösa filterpapper, som är indränkta med antibiotika. När dessa så kallade diskar placeras på en agarplatta, där man har strukit på ett jämt lager med bakterier, diffunderar antibiotikumet ut i agarn. Det blir på så vis en spridning av antibiotika med formen av en cirkel, där koncentrationen är lägst längst ut i kanterna och högst i mitten, nära disken. Ju närmare antibiotikadysken bakterien klarar av att växa desto mer resistent är den.

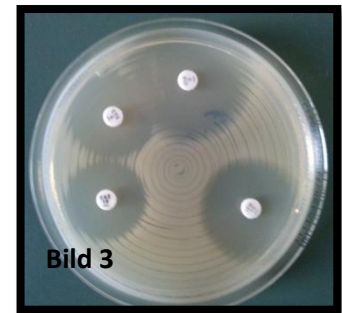


Bild 3

För att få en jämförbar metod i olika länder, har man infört ett mätsystem. Detta mätsystem går ut på att man mäter diametern på det fria området kring antibiotikadysken. Det finns en internationell databas där man har samlat så kallade MIC-värden (Minimum Inhibitory Concentration). Varje bakterie har tillsammans med varje enskilt antibiotikum ett speciellt MIC-värde och en utifrån detta framtagen zondiametergräns som avgör om en bakterieska klassas som antibiotikaresistent eller inte.

När man misstänker att man har hittat en ESBL-bildande bakterie, använder man sig av speciella filterpapper, där man förutom ett antibiotikum har tillsatt klavulansyra. Klavulansyran inaktiverar vissa enzymer och hindrar därför antibiotikumet från att brytas ner. Dock har klavulansyran ensam ingen effekt mot bakterieinfektioner. På detta sätt kan man få ett tydligt svar på om en bakterie bär på generna för ESBL-produktion.

Ett annat sätt att bedöma förekomst av antibiotikaresistens är att använda sig av speciella remsor (E-tester). På baksidan av remsorna har man applicerat ett antibiotikum med en stigande koncentration, i ena änden av remsan är koncentrationen hög och i andra änden väldigt låg. På det här sättet kan man se hur hög antibiotikakoncentration som bakterierna klarar av att växa i (se bild 4).



Bild 4

Bild 5 visar en normalkänslig Escherichia coli medan bild 6 visar en ESBL-producerande bakterie av samma art. Disk B på de bägge bilderna innehåller cefpodoxim, ett antibiotikum tillhörande cefalosporingruppen, vilket normalt är effektivt mot Escherichia coli (stor zon på bild 5). På bild 6 är zonen däremot liten (=resistent). Disk A innehåller utöver cefpodoxim klavulansyra vilket hämmar ESBL och gör att zonen på bild 6 åter blir stor. Detta är ett så kallat positivt ESBL-test.

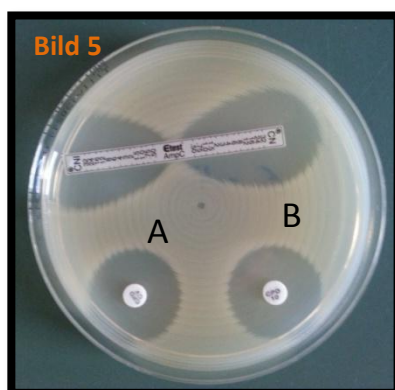


Bild 5

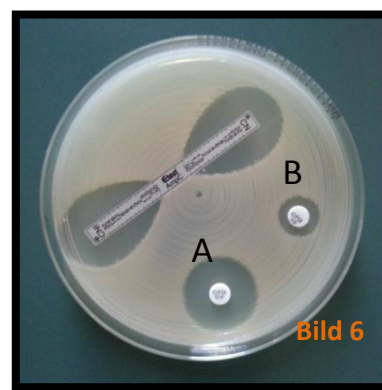
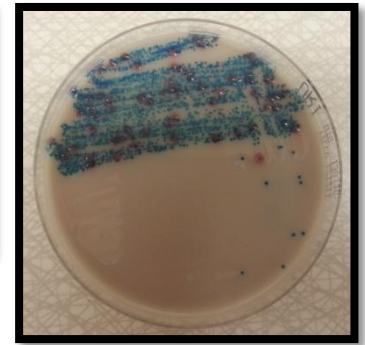
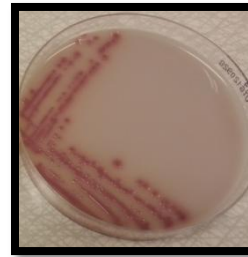


Bild 6

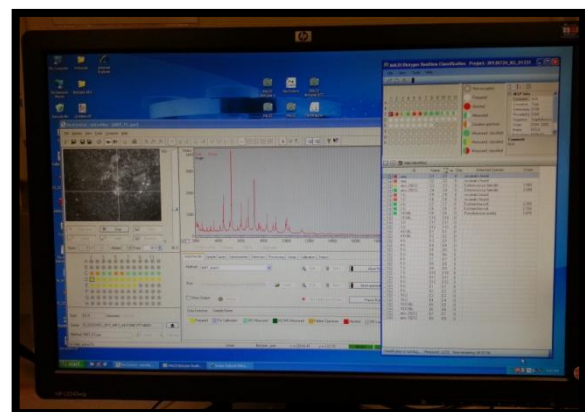
### Hur kan man artbestämma bakterier?

Uriselect 4 är en chromogen platta, vilket innebär att olika bakteriearter får olika färger när de växer på plattan. Det är inte riktigt klart vad Uriselect 4 innehåller, men huvudsakligen rör det sig om sockerarter som vissa bakterier kan jäsa medan andra inte gör det. Utöver detta innehåller agarn indikatorer som ger färgomslag utifrån den enskilda bakteriens jäsningsmönster. Exempelvis, bildar *Escherichia coli* rosa kolonier på



Uriselect 4 och detta innebär att bakterien producerar beta-galaktosidas. Bilderna visar ett urinprov (till vänster) och ett faecesprov (till höger) som är utodlade på Uriselect 4, de rosa kolonierna av *Escherichia coli* syns tydligt.

Uriselect 4 ger en bra hänvisning om vilken bakterie som man undersöker, men för att kunna vara säker på vilken art det är, använder man sig av MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight). MALDI-TOF är en metod som inom sjukvården används för att artbestämma bakterier och jästsvampar. Metoden är en masspektrometri där en laser joniserar proteinerna i provet som därefter leds in i ett elektrostatiskt fält till en massanalysator. De lättaste proteinerna kommer att få upp en högre hastighet och kommer att nå detektorn snabbare än de tyngre och större proteinerna. En dator läser av i vilken ordning som proteinerna kommer och bildar utifrån detta ett masspektrum som jämförs med ett referensspektrum. När datorn har gjort en jämförelse, får man fram ett scorevärde från 0 till 3. Ett scorevärde som ligger över 2 betraktas som en tillförlitlig artbestämning, medan ett värde under 1,7 anses som väldigt osäkert.



## Metod

Jag har valt att använda mig av moderna metoder som idag används rutinmässigt inom humanvården. För mig var det en väldigt viktig del i projektarbetet, att jag skulle få en inblick och förståelse i hur man arbetar inom mikrobiologi.

### Provinsamling, odling och artbestämning av bakterier

- Träckprover från fyrtio hästar samlades in med copan-pinnar.
- Varje prov ströks ut på en Uriselect 4 och en ESBL-specifik agarplatta.
- Därefter sattes agarplattorna i värmeskåp med temperaturen 35 °C.
- Efter sexton timmar togs stället med agarplattorna ut ur värmeskåpet.
- Varje agarplatta granskades noggrant.
- På Uriselect 4 söktes koliform växt (framför allt E.coli), som uttryckte sig som rosa små kolonier på agarplattan.
- På ESBL-plattan söktes bakterier som klarade av att motstå antibiotikumet.
- Under hela arbetets gång odlades och undersöktes positiva kontroller, som redan innan konstaterats innehålla ESBL-producerande bakterier.
- Från de Uriselect 4, där det misstänktes växa koliform växt, gjordes MALDI-TOF.
- Innan proven sattes för analys i MALDI-TOF, applicerades proven på en speciell analysplatta, Target Plate.
- Ovanpå varje bakterieprov applicerades Matrix (en lättflyktig organisk substans).
- Proven analyserades och svar erhöles.

### Lappdiffusion

Nedanstående teknik används om man hittar bakterierkolonier på den ESBL-specifika agarplattan. Då ingen av proverna i den här undersökningen innehöll ESBL-producerande bakterier, kunde jag endast fortsätta att arbeta med de positiva kontrollerna.

- Vid misstanke om tillväxt av ESBL-producerande bakterier, utfördes ett lappdiffusionstest.
- Proven blandades först med natriumklorid.
- Med hjälp av instrumentet DensiCheck kontrollerades att koncentrationen var mellan 0,4 och 0,6 McFarland.
- Blandningen ströks ut i ett jämt lager över en speciell agarplatta vid namn Mueller Hinton.
- På agarplattorna placerades sedan antibiotikadiskar och E-tester.
- Efter sexton timmar i värmeskåp, studerades tillväxten på varje agarplatta och storleken på zonerna kring antibiotikadiskar och E-tester noterades.

## Resultat

Ingen av de fyrtio proverna var positiv, vilket innebär att ingen av de undersökta hästarna bar på ESBL-producerande tarmbakterier (se bilaga 1).

## Diskussion

Av de fyrtio proverna som jag samlade in, var ingen positivt för ESBL. Jag försökte ta slumpmässiga stickprov som var utspridda över Blekinge, därför skulle man kunna dra slutsatsen att det inte är vanligt med ESBL-producerande tarmbakterier hos hästar i Blekinge. För att kunna ge ett mer noggrant resultat, bör man göra en ännu större undersökning med ännu fler hästar.

Varför är det inte så vanligt med ESBL-bildande bakterier hos hästar som hos människor? Man har sett tydliga kopplingar mellan hög antibiotikaanvändning och stor spridning av multiresistenta bakterier. Målet är att man ska försöka minska användningen av antibiotika hos både människor och djur. Under 2011 registrerade man en minskad försäljning av alla antibiotikaklasser och det för alla djurslag. År 2011 såldes 64,4 ton antibiotika till människor och samma år såldes 12,3 ton till djur. Detta också skulle kunna vara en bidragande orsak till att ESBL-bildande tarmbakterier inte är lika vanligt förekommande hos hästar som hos människor.

Enligt en lokal veterinär i Blekinge, Lars Hegestad, har man under en period minskat användningen och nu de senaste åren har man helt slutat använda betalaktamantibiotika hos hästar. Detta kan vara ytterligare en bidragande orsak till att antalet hästar som bär på bakterier med dessa gener är relativt få.

ESBL-producerade bakterier är ett globalt problem på så sätt att de sprids snabbt över hela världen. Människor reser på semester och råkar få i sig ESBL-bildande bakterier. Sedan tar människorna med sig dessa bakterier hem. Även om Sverige är ett land som jobbar flitigt med att minska användningen av antibiotika, så drabbas vi av att man inte har kommit lika långt i utvecklingen i länder som till exempel Egypten. Hästar är inte ute och reser på samma sätt som människor och därför utsätts inte de av olika bakterier på samma sätt som människor.

Metoden för att hitta ESBL-producerade bakterier, är väl framarbetad och relativt enkel att genomföra. Den är standardiserad och reproducerbar, vilket innebär att man ska kunna göra om testet igen och få samma svar på samma bakterie. Detta är väldigt viktigt, för att kunna få en bra bild på hur resistentmekanismerna förekommer i Sverige och i andra länder. Man ska exempelvis kunna genomföra ett test här i Blekinge och få samma resultat som någon som utför testet i Spanien.

När man gör ett stort arbete, är det väldigt viktigt att man är källkritisk och noggrann med att källorna dels är trovärdiga och att de stämmer överens. Jag har försökt att ha ett källkritiskt arbetsätt och därför har jag använt mig av källor som myndigheter och andra erkända faktabaser, som till exempel nationalencyklopedin.

## Tack!

Jag skulle vilja tacka Oskar Ekelund, läkare på Mikrobiologen i Karlskrona, för allt stöd i samband med projektarbetet. Dessutom vill jag också tacka all personal på Mikrobiologen i Karlskrona för ert intresse och vänliga bemötande.



## Källförteckning

<http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/djur/sjukdomarhosdjur/antibiotikaresistens/esbl.4.510b667f12d3729f91d80004008.html>

<http://www.socialstyrelsen.se/smittykydd/sjukdomar/smittsammasjukdomarochsmittamnen/esbl>

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/esbl/>

<http://www.sva.se/sv/Mer-om-SVA1/Publikationer/Antibiotikaresistens/SVARM-rapporter/Sammanfattning-2011/>

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/presstjanst/pressmeddelanden-och-pressinbjudningar/2012/2-000-avforingsprov-ska-ge-svar-om-resistenta-bakterier/>

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/amnesomraden/antibiotikaresistens/kunskapsunderlag/esbl-resistens-hos-tarmbakterier/>

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/upload/Publikationer/antibiotika-och-varhygien/ESBL-resistens-tarmbakterie-forslag-till-atgardsprogramt.pdf>

<http://www.strama.se/dyn/12,,.html>

<http://www.ne.se/betalaktamantibiotika>

<http://www.ne.se/betalaktamaser>

[http://www.ne.se/lang/multiresistent-bakterie?i\\_h\\_word=esbl](http://www.ne.se/lang/multiresistent-bakterie?i_h_word=esbl)

<http://www.ne.se/lang/resistensutveckling>

<http://www.ne.se/resistensbest%C3%A4mning>

<http://www.ne.se/lang/cefalosporiner>

[http://www.scb.se/Statistik/JO/JO0107/2010M06/JO0107\\_2010M06\\_SM\\_JO24SM1101.pdf](http://www.scb.se/Statistik/JO/JO0107/2010M06/JO0107_2010M06_SM_JO24SM1101.pdf)

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/extended-spectrum-beta-lactamase-esbl/>

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/meticillinresistenta-gula-stafylokokker-mrsa/>

<http://www.eucast.org/>

SVARM 2011, Swedish Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2012.

SWEDRES 2011, A Report on Swedish Antibiotic Utilisation and Resistance in Human Medicine. Swedish Institute for Communicable Disease Control (SMI), Stockholm, Sweden, 2012

**Bilaga 1**

Tabellen visar resultaten för varje prov på både Uriselect-plattan och ESBL-plattan.

|    | Uriselect 4 | ESBL-platta |
|----|-------------|-------------|
| 1  | -           | -           |
| 2  | E.coli      | -           |
| 3  | E.coli      | -           |
| 4  | E.coli      | -           |
| 5  | -           | -           |
| 6  | -           | -           |
| 7  | E.coli      | -           |
| 8  | E.coli      | -           |
| 9  | E.coli      | -           |
| 10 | E.coli      | -           |
| 11 | -           | -           |
| 12 | -           | -           |
| 13 | E.coli      | -           |
| 14 | E.coli      | -           |
| 15 | -           | -           |
| 16 | E.coli      | -           |
| 17 | E.coli      | -           |
| 18 | -           | -           |
| 19 | E.coli      | -           |
| 20 | E.coli      | -           |
| 21 | E.coli      | -           |
| 22 | E.coli      | -           |
| 23 | E.coli      | -           |
| 24 | -           | -           |
| 25 | E.coli      | -           |
| 26 | E.coli      | -           |
| 27 | -           | -           |
| 28 | -           | -           |
| 29 | E.coli      | -           |
| 30 | E.coli      | -           |
| 31 | E.coli      | -           |
| 32 | E.coli      | -           |
| 33 | -           | -           |
| 34 | E.coli      | -           |
| 35 | E.coli      | -           |
| 36 | E.coli      | -           |
| 37 | E.coli      | -           |
| 38 | E.coli      | -           |
| 39 | E.coli      | -           |
| 40 | E.coli      | -           |