

## Klinisk bakteriologi på Karolinska sjukhuset, fyra forskare berättar.



**Christian Giske**, överläkare, professor i klinisk bakteriologi.

Jag började jobba på KS i oktober 2002 och disputerade i 2007 på en avhandling om resistensmekanismer hos *Pseudomonas aeruginosa*. I avhandlingen studerade jag både kromosomala och plasmidmedierade resistensmekanismer. Bland de plasmidmedierade mekanismerna beskrevs för första gång karbapenemaser i Sverige, betalaktamaser som kan bryta ned karbapenemer. Hos *P. aeruginosa* är dessa nästan alltid av typen metallobetalaktamaser.

Avhandlingen omfattade även ett delarbete där vi för första gång använde multilocus sequence typing (MLST) för att typa multiresistenta gramnegativa bakterier. På detta vis kunde vi för första gång påvisa några kloner som sedermera blivit kända som högriskkloner av *P. aeruginosa*. Dessa studier inspirerade även studier av liknande typ med övriga gramnegativa patogener och gav äntligen en möjlighet att hitta en gemensam internationell terminologi för att beskriva viktiga kloner.

Efter min avhandling fortsatte jag jobba med överförbara betalaktamaser, men jobbade från och med nu med två arter inom Enterobacteriaceae – *Escherichia coli* och *Klebsiella pneumoniae*. Gällande *E. coli* gjordes viktiga försök både på att förstå populationsstrukturen av extended-spectrum betalaktamas (ESBL)-producerande *E. coli* i Sverige och vi kunde beskriva förekomsten av den viktiga klonen sekvenstyp (ST)131, som i Sverige i många år har utgjort kring 40% av fallen av ESBL-producerande *E. coli* i invasiva infektioner. Vidare, gjordes arbete för att förstå längden av bärarskap av ESBL-producerande *E. coli* och den klonala dynamiken under ett pågående bärarskap. Samtidigt kom de första fallen av karbapenemresistenta *K. pneumoniae* till Sverige. Jag var den första som kunde beskriva klonen ST258, den mest ökända högriskklonen inom *K. pneumoniae*. Denna beskrevs i samarbete med Centres for Disease Prevention and Control i Atlanta, USA. Sedan visade det sig att samma klon även fick spridning i Israel, Grekland och Italien, samt även Kina. Arbetet med *K. pneumoniae* ledde även till ett intresse för att studera orsaker till att vissa kloner är framgångsrika. Detta ledde i sin tur till ökat intresse för bioinformatisk karakterisering av högriskkloner med helgenomsekvensering, följt av bl a analys av virulensgener *in silico*. I fortsättningen av detta etablerades även virulensmodeller och forskningen tog en mer experimentell riktning. Under denna tid började även intresset för metagenomisk sekvensering att öka och gruppen gjorde två arbeten där vi använde metagenomisk sekvensering av blod från sepsispatienter. I fortsättningen av detta påbörjades även olika projekt för att karakterisera tarmens mikrobiota, framför allt kopplat till tarmbärarskap av resistenta gramnegativer. Jag blev under denna tid även ordförande för den europeiska referensgruppen för antimikrobiell resistensbestämning (EUCAST). Sedan 2018 fick jag en professur i klinisk bakteriologi på Institutionen för laboratoriemedicin, som i skrivande stund kombineras med en tjänst som medicinsk ledningsansvarig överläkare för det kliniska laboratoriet i Solna. Forskargruppen jobbar just nu både med nya metoder för resistensbestämning (inklusive kombinationstestning av antibiotika), nya drug delivery system för antibiotika, studier av hur antibiotika påverkar tarmens mikrobiota, mekanistiska studier av orsaker till att vissa bakteriekloner är framgångsrika och till slut även hur bakteriofager kan användas för att bota bärarskap med resistenta bakterier. I perioden som kommer är den övergripande visionen för min verksamhet att fortsätta förstå hur risken för svår sjukdom orsakad av multiresistenta gramnegativa bakterier kan modifieras genom olika strategier för att bota bärarskap av resistenta bakterier i mikrobiotan.



### **Måns Ullberg, överläkare, docent.**

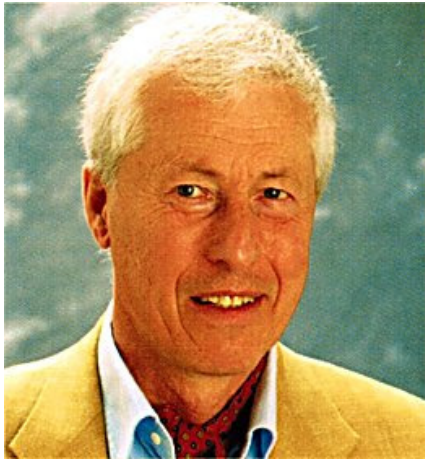
Undertecknat kom till klinisk mikrobiologi i maj 1987. I bagaget hade jag ett avhandlingsarbete om naturliga killerceller från immunologen och tumörbiologen på KI. Göran Kronvall var då både professor och klinikchef på klinisk mikrobiologi (en idag ovanlig kombination). Samtidigt som jag påbörjade min specialistutbildning i klinisk bakteriologi började Göran och jag söka efter gemensamma forskningsprojekt. Göran hade redan under sin tid i Lund intresserat sig för interaktionen mellan bakterier och olika plasmaproteiner. De bindande strukturerna på bakterieytan fick namnet receptiner då de inte var egentliga receptorer i farmakologisk mening.

En ny publicerad artikel från USA antydde att proteiner i det fibrinolytiska systemet kunde binda bakterieytan hos streptokocker. Vi knöt därför kontakt med Björn Wiman som var professor i koagulation. Björn hade tillgång till plasminogen av hög kvalitet. Vi kunde med radioaktiv teknik visa att plasminogen kan binda ytan på ett stort antal bakteriearter bl a viktiga patogener som betahaemolytiska streptokocker, pneumokocker, Haemophilus influenzae och Neisseria meningitidis. Genom vidare samarbete med Björn Wiman och en finsk grupp kunde vi visa att bundet plasminogen kunde aktiveras till plasmin på bakterieytan. De tre sistnämnda arterna, som ju kan förorsaka meningit, kunde även binda till lamininet i basalmembraner (exponeras bl a i plexus choroideus där liquor bildas). Min doktorand Thomas Eberhard kunde sålunda med en vävnadsmodell med rekonstituerat basalmembran visa att pneumokocker med aktivt plasmin på ytan lättare kan passera igenom basalmembran. Detta antydde att receptinerna för plasminogen och laminin på ytan hos pneumokocker, Neisseria och Haemophilus tillsammans skulle kunna utgöra en virulensfaktor vid uppkomsten av meningit. Totalt resulterade vårt gemensamma arbete inom detta fält i 13 publikationer.

Görans och mitt gemensamma intresse för datorer gav också frukt. Jag började undersöka möjligheten av att skicka ut laboratoriesvaren i realtid. Jag var ju intresserad av programmering och utvecklade egenhändigt två system som skickade ut svarsrapporter med hjälp av telefonmodem i krypterad form eller i form av fax. Dessa system blev mycket uppskattade och fick omfattande spridning (det var ju innan internet). Mitt intresse för IT-frågor på laboratoriet ökade allt mer och i mitten av 90-talet fick jag i uppgift av divisionschefen att leda den första IT-sektionen för Karolinska laboratoriet. Denna bildades genom att man slog samman alla IT-resurser som fanns på de olika laboratorierna.

Under denna tid blev jag specialist i klinisk bakteriologi och fick också ut min docentur. Samtidigt som jag var en av de yngsta specialisterna i Stockholm uppstod som följd av ett generationsskifte i Uppsala ett vakuum. Jag valde att i mars 1999 bli klinikchef för systerlaboratoriet i Uppsala där jag stannade till 2007.

Under tiden jag verkade i Uppsala hade Karolinska Sjukhuset och Huddinge Sjukhus slagits samman till en gemensam organisation. När jag i mar 2007 återvände till Stockholm och Karolinska blev det denna gång till Huddinge där jag efter ett halvår fick jag ta över som områdeschef för klinisk bakteriologi. Jag fortsatte Kathrine Dornbuschs arbete med att konsolidera verksamheten efter integrationen av Solna och Huddinge. En av de rekryterade läkarna Volkan Özenci var mycket forskningsaktiv och vi påbörjade gemensamma kliniska forskningsprojekt med syfte att snabba upp den diagnostiska processen. Jag hade sedan tidigare goda kontakter med industrin och var känd för att gärna prova ny teknik. På detta sätt fick vi tillgång till nyutvecklade instrument från BioMérieux (Virtuo och Vitek MS), Abbot (IRIDICA) och utvecklade tillsammans med BD-Kiestra ett nytt instrument (Inocula) för utodling av bakterier på agarplattor. Vidare införde vi ny teknik för artbestämning av bakterier (MALDI-TOF) baserad på masspektrometri av ffa ribosomala proteiner. Sedan 2017 är laboratoriet referenslaboratorium för klinisk mykologi och vi arbetar nu intensivt för att lyfta svensk mykologi till god internationell nivå.



**Björn Petrini**, överläkare, adj.professor, verksamhetsansvarig på tuberkulos- och svamp-sektionerna, Klinisk mikrobiologi, Karolinska Universitetssjukhuset (KS) 1993-2007.

### **Tuberkulosavdelningen**

Tyngdpunkten i verksamheten har legat vid påvisande av *M. tuberculosis* i kliniska prov, samt resistensbestämning för antituberkulösa läkemedel. Antalet kliniska prov ökade kraftigt i samband med omstruktureringen av Smittskyddsinstitutet.

Tekniska förbättringar genomfördes under perioden som odling och resistensbestämning i automatiserade buljongsystem och införande av PCR i rutindiagnostiken. Med dessa tekniker förkortades svarstiderna drastiskt. Epidemiologisk kartläggning av *M. tuberculosis* har skett i samarbete med Smittskyddsinstitutet och Smittskyddsläkaren.

Icketuberkulösa mykobakterier (NTM) vid klinisk sjukdom har tilldragit sig allt större intresse över tid. Med förbättrade odlingsbetingelser har ett stort antal NTM diagnostiserats och kunnat knytas till sjukdom, ofta hos immunsupprimerade eller på annat sätt predisponerade patienter.

Artdiagnostiken av NTM med gensekvensering har gjort det möjligt att snabbt identifiera i princip alla beskrivna arter.

Ett stort antal publikationer i internationell fackpress har utgått från sektionen. Vetenskapligt samarbete har skett med universitetslaboratorier i Denver, Bangkok, Bangalore, Beijing och Köpenhamn.

### **Svampsektionen.**

Svampsektionen är Sveriges största och mest diversifierade och är även sedan 2017 referenslaboratorium inom mykologi i landet.

Ett stort antal prov från slemhinnor (jästsvamp) och hud (dermatofyter) analyseras. Särskilt hos immunsupprimerade och intensivvårdspatienter sker resistensbestämning av isolaten. Hos dessa och andra patienter kan blododling vara positiv för svamp.

Gensekvensering har varit ett effektivt verktyg för karakterisering av svårtygade isolat.

Sektionen tar också emot prov på i Sverige sällsynta s k exotiska mykoser (*Histoplasma*, *Coccidioides* m fl). Pga smittriskan vid växt av dessa svampar är odlingsproven centraliserade till Karolinska Sjukhusets säkerhetslaboratorium.

En kraftfull metodutveckling vad gäller standardisering av resistensbestämning av jästsvampstammar har skett under ledning av doc Erja Chryssanthou i samarbete med en europeisk referensgrupp

Ett stort antal publikationer har utgått från sektionen, samt 2 doktorsavhandlingar, en i Stockholm och en i Addis Ababa. Samarbete har skett med universitetslaboratorier i Addis Ababa, Bangalore och Milano.



**Kathrine Dornbusch**, Mikrobiolog, FD, Docent, adj. Professor, 1990-1999.

**Period 1 1970-1973** Kliniska bakterieisolats känslighet för olika antibiotikagrupper undersöktes med en standardiserad lappdiffusionsmetod i Sverige. Via s.k. regressionslinjer, där antibiotikalappens hämningszon (mm) för isolatet korrelerades till icke växt vid den lägsta hämmande koncentration (MIC ug/ml) för medlet, ingjutet i samma agarmedium, inokulat och inkubation som vid lapptestet,

visade antibiotikalappens hämningszon om bakterien var känslig (S, känslig för terapi med ordinär dosering), måttligt känslig (I, kräver högre dosering) eller resistent (R, påverkas ej av medlet under kliniska förhållanden).

Regressionslinjer för olika antibiotikagrupper med olika bakteriearter och varierande känsligheter, samt tolkningsmallar med brytpunkter för antibiotikakänslighets grupper (S, I, R) producerades och distribuerades till landets laboratorier. Nationella möten arrangerades för kvalitetskontroll av metodiken. Vid ett tillfälle sändes kliniska isolat av *Klebsiella spp* från ett laboratorium i London till 13 laboratorier i Europa och USA med önskan om resistensbestämning med resp. laboratoriums rutinmetod. Resultatet visade att olika lappinnehåll, agarmedier, inokulat och brytpunkter för känslighet användes vilket resulterade i olika resultat för samma stam ! Ett standardiserat internationellt kvalitetssäkringsprogram efterfrågades.

Vid antibiotikaterapi kan mätning av medlets koncentration i kroppsvätskor (ex. i serum, liquor, urin) med mikrobiologisk metod vara ett stöd vid bedömning om medlet ifråga når infektionshärden i tillräckligt hög koncentration, eller för att undvika en för hög koncentration, då vissa medel (ex. aminoglykosider) kan orsaka allvarliga biverkningar. Vid laboratoriet utarbetades metodik för att vid kombinerad antibiotikabehandling kunna mäta nivåer i kroppsvätskor för varje enskilt medel, ex. användande av en indikatorbakterie med känslighet för bara ett av medlen, alt. kemisk inaktivering av alla medel utom det som skall mätas eller att separera medlen genom kromatografi eller gelelektrofores innan mikrobiologisk bestämning. Den senare metoden ingick som ett delarbete i en doktorsavhandling 1974.

Period 1 resulterade i 6 artiklar i välrenommerade medicinska tidskrifter. Undertecknad var medförfattare i läroboken Medicinsk Mikrobiologi: teori, diagnostik och teknik. Ed. G.Svartz-Malmberg & T. Holme 1976 (Kap.9 H. Ericsson, K. Dornbusch Antibiotika och kemoterapeutika).

**Period 2 (1987-1993) och Period 3 (2000-2003).** Vid bakteriella infektioner är ökande resistens mot flertalet antibiotikagrupper ett allvarligt terapeutiskt problem. Resistens mot beta-laktamantibiotika kan orsakas av bakteriers produktion av inaktiverande enzym, s.k. beta-laktamaser, ex. plasmidburna TEM-, SHV-, CMY-2, ESBL-, kromosomala konstitutiva AmpC,- och inducerbara PSE- och OXA-beta-laktamaser.

I ett europeiskt samarbete (European Study Group on Antibiotic Resistance (ESGAR) med KS-laboratoriet som initiativtagare och centrallaboratorium, insamlades 1980-1990 regelbundet konsekutiva blod- och sepsisisolat från 45 laboratorier i 15 länder. De testades för antibiotikakänslighet med MIC-bestämningar och omfattade främst *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* och *Staphylococcus aureus*. Bland de svenska Gram-negativa isolaten var resistensnivåerna ex. mot ampicillin 35% (blod) , 45% (urin), piperacillin 5% resp. 6%, cefuroxim 12% resp. 22%, cefotaxim 3% resp. 5%, och mot ceftaxidim, imipenem och gentamicin 1-0.1 %. Resistensnivåerna var högst i Sydeuropa (SE). Bland > 3000 Gram-negativa blodisolat var resistensnivåerna i SE mot ex. cefotaxim 14% (övriga Europa 2-3%), ceftazidime 8% (2-4%), ciprofloxacin 4% (0.5-1%). Detta gällde även mot fyra aminoglykosider (amikacin, netilmicin, tobramycin, gentamicin) såsom 18-34% hos isolat från Grekland, 12-14% från Italien och 16-20 % från Spanien, beroende på högre förekomst av plasmidburna aminoglykosidmodifierande enzym (AGME), främst AAC(3)V, AAC(6`II), ANT(2``). I Sverige låg resistensnivåerna på 1-3%. De höga resistensnivåerna i Sydeuropa var i dåtid högst oväntade, men har i nutid snabbt spridit sig över hela kontinenten, även i Sverige.

Känslighet hos *Haemophilus influenzae* med speciesspecifika brytpunkter för kloramfenikol, tetracykliner och andra medel mot luftvägsinfektioner testades, och även *in vitro* aktiviteter mot sepsis- och urinisolat av nyaste cefalosporiner och penemer med stabilitet mot beta-laktamaser och av aminoglykosider mot europeiska sepsis- och urinisolat med AGME. Därvid gjorde FDA, USA, besök vid KS-laboratoriet för kvalitetssäkring av metoder och med utmärkt resultat. Dessutom verifierades resistens mot ciprofloxacin hos sepsisisolat av *E.coli* och *Klebsiella sp* genom studier av mutationer i målgenen medförande resistens.

Andra studier resulterade i två doktorsavhandlingar 1995 och 1998. Vid behandling av Gram-negativa infektioner med nyare cefalosporiner kan vissa arter med produktion av inducerbart beta-laktamas mutera till ständig hyperproduktion av enzymet. Optimal metodik utarbetades för att påvisa sådana isolat i diagnostiken för att förhindra misslyckad terapi. Dessutom kunde hos sepsisisolat av *E.coli* och *Klebsiella sp*. med resistens mot nyaste cefalosporinerna påvisas beta-laktamaser med olika substratprofiler, aktiviteter, isoelektriska punkter och efter DNA-hybridisering, såsom både kromosomala, plasmidburna och med utvidgat spektrum. Överföring av resistens från sepsisisolat till plasmidfri, känslig *E.coli* via konjugation eller transformation kunde hos mottagaren två plasmider påvisas enzym med olika profiler (pI 6,6 och pI 6.8). Närvaro av multipla resistensgener på konjugativa plasmider kan medföra begränsade terapeutiska möjligheter. Hos vissa isolat av *Klebsiella oxytoca*, restenta mot aztreonam och cefuroxim, påvisades enzym tillhörande kromosomalt kodade OXY-2 (pI 5.25, substratprofil, DNA-sekvensering). Från resistent givare kunde kryptiska plasmider överföras till plasmidfri *E.coli* . Därvid uttryckte plasmiden högre aktivitet av AmpC-liknande enzym med 99.7% identitet med CMY-2 från *Kl. pneumoniae* och 97.0 % identitet från kromosomalt AmpC från *Citrobacter freundii*. Alltså kan överföring en enzymassocierad genregion från kromosom till plasmid vara möjlig och AmpC hos *C.freundii* kan vara det evolutionära ursprunget till plasmidburet CMY-2. Perioderna 2 och 3 resulterade i 12 publicerade arbeten i välrenommerade medicinska tidskrifter.