

**Samspill mellom *Staphylococcus epidermidis* og *Staphylococcus aureus*
kolonisering i nese. Basert på data fra Fit futures (FF) - en del av
Tromsøundersøkelsen.**

5. års oppgave, stadium IV.
Profesjonsstudiet i medisin, Universitet i Tromsø

Stud. med. Jon Anders Fjose, kull 07.
E-post: jaf026@post.uit.no

En stor takk til mine veiledere:

Claus Klingenberg, Overlege, Barneavd. UNN/Barneavd. IKM, UiT.

Elizabeth Aarag Fredheim, Post.doc. Barneavd.. IKM, UiT

Anne Sofie Furberg, Prosjektleder, Fit Futures, ISM, UiT

Tromsø 01.06.12

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	3
Innledning	3
Metode	3
Resultat	3
Diskusjon	3
Konklusjon	3
INNLEDNING	4
Staphylococcus slekten	4
Identifisering	4
Infeksjoner	5
Virulens faktorer	6
Resistens	6
Epidermidis serine protease, Esp	9
Fit Future-Staf studiet i Tromsø	9
BAKGRUNN/MÅL	10
MATERIALE	11
Kontrollstammer	11
Medium	11
Kjemikalier	12
Oligonukleotid primere	13
METODE	14
Oversikt over forsøket	14
Bakterie isolater	14
Stafylokokk-skål	15
MRSA-skåler	15
Anrikningsbuljong	15
Gram-farging	15
Katalase-test	16
Påvisning av KNS vha Staphaurex Plus	16
Frysing av stammer	16
Påvisning av ulike bakteriekoloni arter vha ID32 Staf	16
Forbedrelser til ID32-STAF	16
Klargjøring/inkubering av bakteriekolonier	16
Avlesning.....	17
Identifisering av <i>S. epidermidis</i> ved hjelp av sekvensering av PCR-produkt	17
Isolering av DNA	17
PCR -reaksjonen	17
Gel elektroforese for å bekrefte PCR-produkt før sekvensering.....	18
Fjerning av overflødige primere og nukleotider fra PCR produkt.....	18
Klargjøring til sekvensering	19
Sekvensering	19
RESULTATER	20
DISKUSJON	20
Våre resultater	20
Implikasjoner	21
Kritikk av oppgaven	21
KONKLUSJON	22
REFERANSER	27

Sammendrag

Innledning

S. aureus er vanligste årsak til samfunns- og sykehuservervede bakterielle infeksjoner, og i de fleste tilfeller smittes man av egne nesebakterier. En global fremvekst av resistente *S. aureus* har medført vanskeligere behandling og økt mortalitet. *S. epidermidis* danner biofilmer i intravaskulære katetere, og er viktigste årsak til infeksjoner hos neonatale og immunsupprimerte. Forsøk med intranasale *S. epidermidis* med *esp*-gen har vist seg å hemme veksten *S. aureus* i nesen, en observasjon vi ønsker å undersøke i denne oppgaven.

Metode

Vår oppgave i forsøket var initialt å isolere *S. epidermidis* stammer fra nesen til elever i Fit-Future prosjektet, og senere undersøke isolatene for *esp*-gen. Med selektive medier, katalase-, koagulase- og gram-testing ønsket vi å øke sannsynligheten for at skålene inneholdt *S. epidermidis* før arts-identifisering vha ID32Staf og PCR/gel-elektroforese/sekvensering.

Resultat

Vi fant 92 isolater med *S. epidermidis*, og 83 (93 %) av dem hadde *esp*-gen. I kun 7 (7,6 %) av *S. epidermidis* skålene fant vi *S. aureus*, og i disse skålene hadde *S. epidermidis* isolatene *esp*-gen. Blant Fit-Future elevene var det *S. aureus* bærerskap på over 40 % i neseprøver.

Diskusjon

Blant elevene som hadde *S. epidermidis* i nesen, var *S. aureus* bærerskapet betraktelig lavere enn blant Fit-Future elevene. Dette funnet tolkes slik at *S. epidermidis* hemmer veksten av *S. aureus*. Imidlertid, i de 7 skålene hvor vi fant *S. aureus*, hadde *S. epidermidis* isolatene også *esp*-gen, og her har *esp*-genet tilsynelatende ikke hemmet veksten av *S. aureus*.

Konklusjon

Vi konkluderer vi med at i de tilfellene der vi påviser *S. epidermidis* i nesen var det lav forekomst av *S. aureus* bærerskap. Sammenhengen mellom *esp*-innholdende *S. epidermidis* og *S. aureus* er uavklart.

Innledning

Staphylococcus slekten

Stafylokokker er 0,5-1,5 µm store, gram positive, fakultativt anaerobe, ikke-mobile og ikke-sporedannende bakterier som lever enkeltvis, i par i kjeder eller som oftest i grupper¹.

Av de 46 artene og 24 stammene i slekten *Staphylococcus*², forekommer de fleste i normalfloraen hos mennesker og dyr³, og enkelte har fått navn etter verts- og nisjepreferanser. Eksempelvis finnes *S. delphini* på delfiner, og på mennesker finnes *S. auricularis* i øregangen, *S. capitis* i hodebunnen og *S. epidermidis* på huden og slimhinner i munn, hals og tarmkanal. Huden i aksillen og perineum inneholder flere stafylokokker enn huden ellers på kroppen. Fremre del av neseborene er viktigste tilholdssted for *S. aureus* og *S. epidermidis*^{4,5,6}, og de fleste *S. aureus* infeksjoner forårsakes av pasientens egne nesebakterier⁷. Det er årsaken til at prøvematerialet her blir hentet i fra nesen.

Stafylokokkene skilles fra andre gram positive bakterier som streptokokkene og enterokokkene ved at de produserer katalase. Stafylokokkene deles inn i to grupper etter evnen til å koagulere blod, i koagulase-negative og -positive arter. *S. epidermidis* er den vanligste arten av koagulase-negative stafylokokker (KNS) hos mennesker. *S. aureus* er den overveiende dominerende arten blant de koagulase-positive stafylokokkene, men det finnes også noen få andre arter i denne gruppen¹.

Identifisering

I dag brukes en kombinasjon av fenotypiske og genotypiske tester, en såkalt polyfasisk tilnærming ved identifisering av Stafylokokk-arter⁸.

I 1970 utviklet Kloos og Schleifer en systematisk tilnærming til fenotypisk arts-identifisering, en tilnærming som vi også brukte innledningsvis i arbeidet i denne oppgaven. Fenotypisk testing inkluderer alt fra pigmentproduksjon, vekstkrav og oksidative- og fermentative- reaksjoner på karbohydratholdige næringsmedier, samt novobiocin følsomhet og en rekke enzymatiske reaksjoner⁹.

ID32-STAF er en automatisert, fenotypisk hurtigtest basert på ulike enzymatiske reaksjoner. Fenotypiske hurtigtester gir imidlertid ikke et helt pålitelig skille mellom

ulike KNS pga varierende gen-ekspressjon ¹⁰. Man har grunn til å tro at PCR-amplifikasjons-sekvenseringsmetoder som amplifiserer 16S *rRNA*, *sodA* eller *tuf* gener er langt mer presise ¹¹⁻¹³. Eksempelvis er sekvensvariasjonene av 16S-*rRNA*-kopiene relativt lave og arts spesifikke ¹⁴.

Infeksjoner

Stafylokokkene fremkaller sykdom ved direkte invasjon av vev og blod, eller ved frigjøring av toksiner. Til de hyppigste hud-infeksjoner regnes furunkler, karbunkel, cellulitis, lymphangitis, lymfadenitis, pyoderma og impetigo. Infeksjon i ledd og knokler resulterer i infeksiøs artritt og osteomyelitt. Bakteriemi kan ses ved endokarditt og septisk sjokk. Mens matforgiftning, toksisk epidermal nekrolyse og toksisk sjokk syndrom hører til de toksinbetingete sykdommene¹⁵.

Infeksjoner oppstår etter smitte fra eget smittereservoar, såkalt endogen smitte, ved at bakterier trenger inn i via hud-defekter, ved inokulasjon eller via implantater. Eksogen kontaktsmitte, fra person til person, er en vanlig smittevei, og puss fra åpne sår er særskilt smittefarlige. Luftsmitte er ikke uvanlig i sykehusmiljø hvor mikrober festet på hudpartikler skaller av og svever rundt i luften i et stort antall ⁴.

S. aureus forårsaker sjelden alvorlig infeksjon hos friske mennesker, men er en viktig sykdomsfremkallende bakterie i miljøer med spesielt infeksjonsmottakelige personer ¹⁶. *S. aureus* er vanligste årsak til samfunns- og sykehuservervede bakterielle infeksjoner, og påvises i halvparten av alle hud- og bløtdelsinfeksjoner ¹⁷. Globalt sett er *S. aureus* den viktigste årsak til nosokomial bakteriemi ¹⁸ og i Norge tredje vanligste patogen i blodkultur etter KNS (19,3 %) og *E. coli* (23,4 %) ¹⁹.

Omfanget av KNS infeksjoner har økt de siste 20 årene ^{1,20}, og har utviklet seg til å en viktig patogen hos immunsupprimerte, for tidlig fødte og pasienter med biologiske implantater. De vanligste KNS infeksjoner hos mennesker forårsakes av *S. epidermidis*, og især i forbindelse med bruk intravaskulære katetere. *S. epidermidis* er en fremherskende årsak til neonatale infeksjoner, nosokomial bakteriemi, protese-klaff endokarditt, kirurgiske sår, sentral-venøs shunt infeksjoner, intravaskulær kateter-relaterte infeksjoner, peritoneale dialyse-relaterte infeksjoner og ledd-protese infeksjoner²¹⁻²³

Biofilm er en ansamling av mikroorganismer hvor cellene heftes til hverandre eller til levende- eller ikke-levende overflater vha en selvprodusert matrix, en ekstracellulær polymerisk substans (EPS) som består av polysakkarider, proteiner og DNA²⁴.

Biofilm beskytter mot vertsimmunitet, antibiotika- og ytre fysisk –og kjemisk miljøer. Da *S. epidermidis* er en opportunistisk bakterie som finnes i et stort antall på huden og i slimhinnene, får bakterien lettere innpass på kreftavdelinger og på nyfødte intensivavdelinger hvor bruken av kanyler- og intravaskulære katetere er relativ stor og pasientene har et svekket immunforsvar. Økningen av *S. epidermidis* infeksjoner de siste årene skyldes sannsynligvis økt behandling av immunsupprimerte- og bruk av kanyler/kateter i sykehusmiljøene ²⁵.

Virulens faktorer

Virulensfaktorer er forhold hos bakterien som forårsaker infeksjon og sykdom, og tilskrives bakteriens strategier og/eller –produkter. Det gjelder faktorer som muliggjør kolonisering og invasjon, omgåelse av vertens immunforsvar eller ved å starte en inflammatorisk respons hos verten ²⁶. *S. epidermidis* har få virulens faktorer i forhold til *S. aureus*, men den viktigste er evnen til å danne biofilm ²⁷. Tabell 1 gir en oversikt over de viktigste og mest kjente virulens faktorene i *S. aureus* og *S. epidermidis*.

Resistens

Bakterier oppnår resistens ved I) å endre på "antibiotika target", II) endre på metabolske prosesser i bakteriecellen som hemmes av det anti-mikrobielle middelet, III) efluks (aktiv utskillelse) fra bakteriecellen, IV) redusert penetrasjon gjennom celleveggen, V) enzymatisk inaktivering av antibiotikumet ²⁸.

De fleste stammer av gule stafylokokker var følsomme for penicillin da man for alvor begynte å bruke antibiotika på slutten av 2. verdenskrig. I årene etter økte andelen av penicillinase dannende stafylokokker dramatisk pga det plasmid-kontrollerte *beta-lactamase* genet (*bla*-genet). Penicillinase dannende bakterier inneholder Beta-laktamase som bryter ned beta-laktamringen og inaktiverer penicillin (type V mekanisme i forhold til ovennevnte inndeling) ²⁸.

Som et mottrekk utviklet man i 1960 methicillin, det første penicillinase-resistente penicillinet ⁴. Det første methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) ble første gang påvist i

Storbritannia allerede i 1961 ²⁹. Methicillin er i dag erstattet av andre beta-laktamase-stabile penicilliner som kloksacillin og dikloksacillin og er første valget for behandling av stafylokokk infeksjoner i land med lav forekomst av MRSA ⁴.

Methicillin-resistens er kromosomalt betinget ⁴. Resistensen skyldes en mutasjon i *mecA* genet som gir et abnormt penicillin-bindende protein (PBP-2) og resistens mot alle penicilliner og andre beta-laktam antibiotika (type I mekanisme i forhold til ovennevnte inndeling) ²⁸. *mecA* genet inngår i et større DNA-segment som kalles staphylococcal-cassette chromosome mec, SCCmec. HA-MRSA (Hospitality-Associated Methicillin Resistent *S. aureus*) skilles genetisk fra CA-MRSA (Community-Associated Methicillin Resistent *S. aureus*) med et større SCCmec som innehar resistens gener mot flere ikke-beta-laktam antibiotika ³⁰.

Fra 1961 til midten av 1990-tallet utviklet sykehuservervede MRSA seg til et globalt problem ^{16,30}. I dag er forekomsten av HA-MRSA høy i en rekke land, f.eks på ca 50 % i amerikanske intensivavdelinger ⁴. I Norge, Sverige, Finland, Danmark og Nederland er prevalensen av selv sykehuservervet MRSA lav, og tilskrives restriktive retningslinjer for antibiotika-bruk samt overvåkingsprogram over flere tiår ³⁰.

I Norge er det Universitetssykehuset i Nord-Norge, UNN, som har det nasjonale ansvaret for overvåking av antibiotika-resistente agens og rapporterer at MRSA prevalensen er under 1 % ¹⁹. I 1995 ble MRSA-infeksjoner meldingspliktige til Folkehelseinstituttets Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS). Da ble det påvist 20 infeksjoner. 335 infeksjoner ble meldt i 2006, og antall meldte MRSA-infeksjoner økte med 277 % fra 2001 til 2006 ¹⁶.

Etter midten av 1990 tallet har også omfanget av samfunnsvervede MRSA eksplodert på verdensbasis ³⁰. CA-MRSA stammene rammer andre populasjoner og gir et annet klinisk bilde enn sykehuservervede MRSA ³¹. Tidligere unge og friske rammes i større grad av CA-MRSA-assosierte hud- og bløtvevsinfeksjoner, men det er også rapportert om alvorligere nekrotiserende pneumonier og sepsis ³⁰. HA-MRSA gir på den annen side oftere invasive infeksjoner som bakteriemi, sepsis og pneumoni blant eldre pasienter.

Det første isolatet med redusert følsomhet for vancomycin (*S. aureus* with intermediate resistance to vancomycin- VISA) ble rapportert i 1996 i Japan ³², og forekomsten er økende i blant annet USA ³³. Vancomycin-resistent *S. aureus* (VRSA) ble først rapportert i 2002 ³⁴, og det foreligger 9 isolater med VRSA i USA ³⁰. Fremveksten av multiresistente *S. aureus* som MRSA og VISA har gjort behandlingen vanskeligere og medført økt mortalitet ³⁵.

Ca 1/3 av befolkningen i USA, Japan, Storbritannia og en rekke OECD-land er asymptomatiske bærere av *S. aureus* og har økt risiko for *S. aureus* infeksjoner^{36,37}. Det er derfor vanlig å bruke fermenteringsproduktet mupirocin fra *Pseudomonas fluorescens* for å fjerne intranasale kolonier av *S. aureus* ³⁸. Stafylokokker, streptokokker og enkelte gram-negative bakterier som *H. influenzae* samt *N. gonorrhoeae* er følsomme for mupirocin, og ved eradikerings-programmer av *S. aureus* var det på midten av 80-tallet effektiv i over 90 % tilfellene ³⁹. Imidlertid er det rapportert økende forekomst mupirocin-resistente *S. aureus* og dette antas å være hovedårsaken til lavere dekoloniserings-prosent i dag enn i 1985 da mupirocin ble introdusert ³⁸.

Økt antibiotika forbruk fører til seleksjon av antibiotika-resistente agens ⁴⁰. Presset på å bruke antibiotika som MRSA er følsom for, som f.eks vancomycin eller linezolid, øker med forekomsten av MRSA. Disse medikamentene kan bli førstehåndspreparat i Norge om MRSA øker til et globalt-nivå. Det er kostbart og pasienten er utsatt for flere bivirkninger, men mest av alt frykter man utbredelse av multiresistente *S. aureus*. Disse medikamentene forbeholdes per i dag til alvorlige infeksjoner, og jo mer de brukes, desto raskere nærmer vi oss en situasjon hvor vi ikke lenger har virksomme medikamenter mot alvorlige stafylokokkinfeksjoner. Antall resistente bakterier øker, men utviklingen av nye antibiotika holder ikke tritt med behovet. Det er derfor viktig å utvikle nye medikamenter som virker bakteriostatisk eller som bakteriecid ¹⁶.

Epidermidis serine protease, Esp

Iwase et al. (2010) gjennomførte en bakteriologisk analyse av flora fra nesen til 88 frivillige elever i videregående skole. Initialt var det lite som tydet på at *S. epidermidis* bærerskap hemmet kolonisering *S. aureus*. Blant de 28 *S. aureus*-bærerne fant man i 26 av tilfellene *S. epidermidis*. Og blant de 60 som ikke var *S. epidermidis*-bærere fant man 58 personer som hadde *S. aureus* kolonier. Det var ingen signifikant forskjell i *S. epidermidis* prevalensen mellom *S. aureus*-bærere og ikke-bærere.

Samlet fant man 960 isolater av *S. epidermidis* som senere ble inkubert på vekstmedium i lag med *S. aureus*. I en dose-avhengig konsentrasjon hemmet 428 *S. epidermidis* isolater dannelsen av *S. aureus*, mens de øvrige 528 ikke gjorde det. Med disse funnene antok man at det fantes to typer *S. epidermidis* med tanke på påvirkning av *S. aureus* vekst: En hemmende *S. epidermidis* og en ikke-hemmende.

S. epidermidis supernatanter fra de hemmende *S. epidermidis* isolatene viste seg også å hemme eksisterende *S. aureus* biofilmer. Med en serie fraksjoneringsmetoder som salt-presipitering-, gelfiltrasjons- og ione-kromatografi-, klarte man å isolere et 27kDa stort protein fra de hemmende *S. epidermidis* isolatene som fikk navnet Epidermidis serine protease, Esp. Dette proteinet var fraværende i de ikke-hemmende isolatene. For å forsikre seg om at Esp-proteinet virkelig ødelegger biofilm, brukte man serine-protease hemmeren; amidinophenyl methansulphonyl fluoride (APMSF). Biofilm ødeleggelsen uteble da man brukte APMSF.

I et nytt forsøk så man på sammenhengen mellom *S. aureus* kolonisering og tilstedeværelsen av hemmende *S. epidermidis* i nesen. Med regresjons analyse fant man signifikant lavere *S. aureus* funn i skålene med hemmende *S. epidermidis* (OR=0,29 og CI 0,11-0,75). Forfatterne konkluderer med at tilstedeværelsen av hemmende *S. epidermidis* er en avgjørende faktor for fraværet av *S. aureus*.

Fit Future-Staf studiet i Tromsø

Formålet til Fit-Future Staf studiet er å studere forekomsten av *S. aureus* og eventuelt MRSA-bærerskap i Tromsø. Man ønsker å studere risikofaktorer for bærerskap som kjønn, alder, etnisk bakgrunn, underliggende sykdom, genotype og miljøfaktorer for bærerskap, samt andelen av permanente og -intermitterende bærere. Deltakerne var

frivillige elever på første trinn i videregående skole, 15-16 år, i Tromsø kommune. Noen av deltagerne ble invitert til å gi to prøver med 1-6 ukers mellomrom (fase 1 og 2). Prøver fra nese og hals regionen ble tatt på Copan transport medium. Personopplysninger som alder og kjønn ble lagret i en database og til hver prøve ble det laget et serienummer.

Bakgrunn/mål

Forekomsten av samfunnservervete og sykehuservervete antibiotika-resistente *S. aureus* infeksjoner øker jevnt, og vanskelig-gjøres av en økende forekomst av multiresistente bakterier⁴¹. Tross omfattende forskning på utvikling av nye antibiotika, klarer man ikke å holde tritt med resistensutviklingen¹⁶. Det vanskeliggjør behandlingen, medfører økt mortalitet³⁵ og aktualiserer arbeidet med å utvikle bakteriehemmende eller bakteriedrepende midler i kampen mot MRSA. Oppdagelsen av at *esp*-genet i *S. epidermidis* (neseprøver) hemmer *S. aureus* kolonisering og biofilm dannelse⁴², kan være starten på prosess med å finne et nytt medikament, primært til eradikering av *S. aureus* i nesen. Det foregår et omfattende forsøk av *S. aureus* og MRSA-bærerskap i Fit-Future studiet ved UiT. Vårt forsøk løper parallelt med Fit-Future studiet. Vi utnyttet databasen fra Fit-Future studiet, samtidig som vi gjorde et selvstendig studie i forhold til bærerskap av *S. epidermidis* og prevalens av *esp*-genet. Sammenslåing av disse dataene kan muligens gi oss svar på om det er en sammenheng mellom bærerskap av *S. epidermidis* og prevalens av *esp*-gen og bærerskap av *S. aureus* i nesen jamfør forsøket til Iwase et al. (2010).

Materiale

Kontrollstammer

Art	Stamme (internt frysenr.)
<i>S. aureus</i>	NCTC 8325 (25-60)
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228 (6-1)

Medium

Type	Innhold
Staphylococcus-skål.	chromID TM <i>S. aureus</i> agar (SAID), 20,1 g vegetabiliske –og animalske peptoner (svin eller biovint), 0,65 g Tris, 0,53 g kromogen blanding, 4,1 g selektiv blanding, 14 g agar, demineralisert H ₂ O 1L.
MRSA-skåler.	82,5 g CHROMagar TM MRSA MR 502, 1000 ml dH ₂ O, 1ml CHROMagar TM Supplement SU 620 (kromogen mix, selektiv for MRSA)
Blodagar	Blood Agar Base No 2 Oxoid CM02715 M NaOH, Humant fullblod 70ml/l, dH ₂ O.
Anrikningsbuljong	m Staphylococcus Broth, 10 g pancreas casein-digest, gjær-ekstrakt, 2 g lactose, 10 g mannitol, 5g dikaliumfosfat, 75 g NaCl
Frysekultur	Brain Heart Infusion Oxoid CM 225, 33 g/l, glyserol 100 ml/l, dH ₂ O.

Kjemikalier

Type	Innhold
2x ReddyMix™ PCR MasterMix, Thermo Scientific Incorporation	0.625 enheter ThermoPrime <i>Taq</i> DNA polymerase, 75mM Tris-HCl (pH 8.8 ved 25 °C), 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.5 mM MgCl ₂ , 0.01 % (v/v) Tween® 20, 0.2 mM hver av dATP, dCTP, cGTP og dTTP, presipitant og rødfarge for elektroforese
MgCl ₂ Stock Solution, Roche Diagnostics GmbH	25 mM MgCl ₂ , dH ₂ O
NaCl	0,9 % NaCl
Gram I, Gram II, Gram III, Gram IV	Krystallfiolett, jod-jodkalium, 96 % etanol, safraninrødt
Katalase	3 % hydrogenperoksyd
Test Latex	Gule polystyrene latex-partikler dekket med humant fibrinogen og kanin IgG
API-ampuller	0,85 % NaCl
NIT-I	0,4 g sulfanylsyre , 30 g eddikesyre , 70 ml H ₂ O
NIT-II	0,6 g N,N-dimetyl-1-naftylamin, 30 g eddiksyre, 70 ml H ₂ O
VPA	20 g kaliumhydroxid , 100 ml H ₂ O
VPB	12 g α-naftol, 100 ml etanol
FB	7,5 g natriumlaurylsulfat, 50 ml dimetylformamid (DMF), 50 ml dimetylsulfoxid (DMSO)
Mastermix	12,5 µl ReddyMix, 3 µl MgCl (25 mM), 2 µl primer f (5pmol/ml), 2 µl primer R (5pmol/ml), 2,4 µl ddH ₂ O
10 x TBE-buffer	0,89 M Tris-base, 0,89 M borsyre, 20 mM EDTA, dH ₂ O. pH 8,3
0.5 x TBE-buffer	20 gangs fortynning av 10 x TBE-buffer
TE-buffer	1 M Tris HCl på pH 8,0 (Sigma T-5941), 0,5

SeaKem® LE Agarose til gel elektroforese, Lonza Rockland Incorporation, USA	EDTA pH 8,0 (Sigma E-5134), dH ₂ O, 5M NaOH, 5 M HCl
1 Kb Plus DNA	GelRed™ nucleic acid gel stain, 10.000 i H ₂ O, Biotium Incorporation
Ladder, Invitrogen	0 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, TE-buffer, loading buffer (med glyserol)
Corporation, USA	1 µl templat, 1 µl Big Dye
Sekvenseringsløsning	1,6 µl primer (5pmol/µl), 4 µl sekvenseringsbuffer, 2,3 µl ddH ₂ O

Oligonukleotid primere

Type

16s-primer, forward

16s-primer, revers

Esp-primer, forward

Esp-primer, revers

Innhold

TGC CTA ATA CAT GCA AGT CGA GC.

TCC CTA ATA ACA GAG TTT TAC GAT

GTT TGG TGA CAC TCT TAA G

ATG AAA AAG AGA TTT TTA TCT

Metode

Oversikt over forsøket

Med en vattpinne ble det tatt en neseprøve på Copan transportmedium fra deltakerne i Fit-Future studiet. Neseprøven ble strøket ut på både *S. aureus*-selektive (chromID *S. aureus*-skåler og CHROMagar MRSA-skåler) og ikke-selektivt medium (blodagar) direkte, såkalt direkte utsæd. Vattpinnen ble så inkubert i et kulturmedium (anrikningsbuljong) som fremmer vekst av alle stafylokokk arter over natta. Også fra denne kulturen ble det strøket ut prøver, både på selektivt og ikke-selektivt medium, såkalt primær anrikning. De selektive skålene var selektive for *S. aureus*. De ikke-selektive blodskålene fra den primære anrikningen ble fra Fit-Futures prosjektets side brukt til å forsikre seg om at prøvetakningen var tilstrekkelig. Disse blodskålene ble så overtatt av oss for å samle et materiale av *S. epidermidis*.

Fra hver blodskål selekterte vi 2 kolonier med morfologi som KNS; relativt små, gråhvite kolonier, som ble strøket ut på hver sin blodskål og inkubert ved 37 °C i ca 24 timer. Fra disse skålene ble det plukket kolonier for videre karakterisering ved gramfarging, katalase-test - og koagulase-test. Blodskåler med forurensing av ikke-KNS ble kassert. Resten ble frosset ned ved -70 °C til senere identifisering vha ID32Staf og 16s-PCR/gel-elektroforese/sekvensering. Isolater som etter identifisering var *S. epidermidis*-positive, ble frosset ned med frysenummer og siden undersøkt for *esp*-genet vha *esp*-PCR/gel-elektroforese/sekvensering.

Bakterie isolater

Vi identifiserte *S. epidermidis* på blodskålene fra de primære anrikningene i Fit-Future undersøkelsen vha ID32Staf og 16s-PCR/gel-elektroforese/sekvensering. Hvert av isolatene fikk egne frysenummer, og frosset ned ved -70 °C i egne rør. Frysenumrene er koblet opp mot serienumrene til hver enkel neseprøve og personopplysninger i databasen.

Hvert av isolatene med *S. epidermidis* er videre analysert for innhold av *esp*-genet vha *esp*-PCR/gel-elektroforese og avslutningsvis med sekvensering. Data om eventuell innhold av *S. aureus* i isolatene ble hentet inn fra Fit-Future prosjektet.

Stafylokokk-skål

ChromID TM *S. aureus* agar (SAID) er et bruksklart medium til selektiv isolering av stafylokokkarter og identifisering av *S. aureus*. En rik næringsbase med ulike peptoner og to kromogene substrat selekterer vekst av stafylokokk arter. Kolonier av *S. aureus* vil skille ut alfa-glucosidase som gir en spontan grønnfarge ⁴³.

MRSA-skåler

Selektiv medium for påvisning av MRSA. 82,5 g CHROMagar TM MRSA MR502 løses i 1000 ml destillert vann. Løsningen tilsettes 1 ml CHROMagar TM MRSA Supplement som inneholder en kromogen-mix for å selektere vekst av MRSA, og som gjør påvisning av *S. aureus* lettere ved at det dannes rosa kolonier. 20 ml agar tappes fra til hver skål, oppbevares mørkt ved 4 °C inntil bruk ⁴⁴.

Anrikningsbuljong

Staphylococcus Broth er et patentert medium selektivt for stafylokokk arter. I dette forsøket ble anrikningsmediet brukt for å oppkonsentrere stafylokokk arter etter utstrøk på direkte utsæd, og før utstryk på primær anrikning. 104 gram pulver av Staphylococcus Broth ble blandet med 1L destillert vann og autoklavert ved 121 grader Celsius i 15 minutter. 2-2,5 ml medium skylles over paper pads, hvorpå den inkuberte membranen plasseres. Neseprøvene ble strøket ut på mediet og inkubert ved 35 grader celsius i 48 timer. Pepton bidrar med nødvendig nitrogen, aminosyrer og mineraler til bakterievekst. Laktose og mannitol er karbohydrat kilder. Gjær-ekstrakter frigjør B-vitamin og fremmer bakterievekst, mens den høye salt konsentrasjonen favoriserer stafylokokk arter ⁴⁵.

Gram-farging

Gram-farging er en metode for å dele inn bakterier etter evnen til å binde fargestoffet. En bakteriekoloni strykes utover i en dråpe saltvannløsning på et tidligere flambert objektglass. Bakterie løsningen lufttørkes, og fikseres til objektglasset ved å føre glasset 3 ganger gjennom en gassflamme. Preparatet tilsettes Gram I (krystallfiolett) som får virke i 30 sekund før det skylles forsiktig med vann, og deretter tilsettes det Gram II (jod-jod løsning) på samme vis. Preparatet avfarges med Gram III (etanol) og skylles med vann. Gram IV (safraninrødt) skal så dekke preparatet i ca 1 minutt før det igjen skylles med vann. Preparatet lufttørkes og mikroskoperes med immersjonsolje ved 100 X forstørrelse ⁴⁶.

Prinsippet er at gram positive bakterier har cellevegg med et tykt peptidoglycan-lag som blir blålig etter farging med krystallfiolett og jod-jod løsning. Fargen lar seg ikke avfarge med alkohol. De gram negative bakteriene har imidlertid et tynt indre peptidoglycan-lag og en ytre lipopolysakarid-fosfolipid membran som ødelegges av alkohol. Når man til slutt tilfører den safrinrøde kontrast-fargen, blir celleveggen rødfarget.

Katalase-test

Stafylokokker og mikrokokker innehar enzymet katalase som spalter hydrogenperoksid til vann og oksygen-gass. Ved tilførsel av 3 % hydrogenperoksid vil man få en spontan gassdannelse hos katalase-positive, mens reaksjonen uteblir i katalase-negative enterokokker og streptokokker ⁴⁷.

Påvisning av KNS vha Staphaurex Plus

1 dråpe Latex og en dråpe Kontroll Latex tilsettes hver sin sirkel på agglutinasjonsplaten. 6 kolonier fra agarskålen blandes i hvert av reagensene. Man vipper platene fram og tilbake i 30 sekunder. Positivt resultat gir agglutinasjon i Test-Latex og ingen agglutinasjon i Kontroll-Latex. Ingen agglutinasjon i noen av reagensene tyder på et negativt resultat. Gule latex-partikler er dekket med fibrinogen og kanin-immunglobulin, IgG spesifikt for *S. aureus* overflateantigen og koagulase protein A, og vil agglutinere ved kontakt med *S. aureus* ⁴⁸.

Frysing av stammer

Bakteriekolonier stod til inkubasjon på blodskåler ved 37 °C i ca 24 timer. Renheten til bakteriene ble kontrollert på blodskålene. Med en øse ble en rikelig mengde bakteriekolonier høstet og lagt i frysebuljong, whirlmixet i 10-15 sekunder og frosset ned ved 70 °C ⁴⁹.

Påvisning av ulike bakteriekoloni arter vha ID32 Staf

Forbedrelser til ID32-STAF

Forbruksmaterialet man bruker i ID32Staf er kostbart. Man ønsker derfor å øke sannsynligheten for at bakteriene som testes med ID32staf metoden kommer ut som *S. epidermidis*. Det kjøres derfor ID32Staf på bakteriekolonier som fra før av har vist seg å være gram positive, katalase positive og koagulase negative slik KNS er.

Klargjøring/inkubering av bakteriekolonier

Frysestammene ble strøket ut på nye blodskåler og inkubert i 24 timer ved 37 °C.

Blodskålene ble kontrollert for forurensing. Hver strips består av 20 mikrobrønner med

dehydrerte substrat. Brønnene inokuleres med en salt-og bakterie suspensjoner som rekonstituerer brønn-substratene. 2 ml API-ampuller med 0,85 % NaCl løsninger blandes med 1-4 bakterie-kolonier fra blodskålene til en bakteriekonsentrasjon tilsvarende en turbiditet på 0,5 McFarland. Med en pipette slemmes 200 ul av løsningen i hver brønn. Mineralolje tilsettes i GLU, ADH og URE brønnene. Stripsene dekkes med aluminiumsfolie, legges i plastikkbokser med fuktige tørkekluter i bunn, og inkuberes ved 37 C i 24 timer ⁵⁰.

Avlesning

En dråpe NIT-1 og NIT 2 i NO₃-brønnen, 1 dråpe VPA og en dråpe VPB i VP-brønnen og til slutt en dråpe FB-reagens fra betta-GAL til Pyr A brønnene. Avventer i 5 minutt før stripsen kjøres gjennom ID32Staf-maskinen for avlesning. I brønnene gir bakterieløsninger arts-spesifikke reaksjoner, fargenyanser og fargekombinasjoner som ID32Staf maskinen leser av. Avlesnings-maskinen legger frem sannsynligheter for hvilke bakterier brønnene inneholder ⁵⁰.

Identifisering av *S. epidermidis* ved hjelp av sekvensering av PCR-produkt

Isolering av DNA

Klargjøring av templat til PCR (Polymerase Chain Reaction) reaksjonen skjer ved at 8-10 bakteriekolonier legges over i 1ml TE-buffer som spinnes i 5000 rpm i 5 min. Resuspenderer pellets i 100 µl TE-buffer. Koker løsningen i 10 min, og spinner det igjen på 5000 rpm i 5 min. Templatene i supernatanten overføres til egne rør.

PCR -reaksjonen

22,5 µl mastermix + 2,5 µl av templat tilsettes hvert PCR-rør og blandes med en minisentrifuge. PCR reaksjonen kjøres i PCR maskin;
PTC 2400, Perkin Elmer, Gene AMP, etter følgende program:

16s-PCR:

Denaturering 94 °C i 2 minutter
Denaturering 94 °C i 30 sekunder
Annealing 68 °C i 30 sekunder x 25
Elongering 72 °C i 30 sekunder
Elongering 72 °C i 10 minutter
Hold 4 °C ∞

esp-PCR:

Denaturering 94 °C i 2 minutter

Denaturering 94 °C i 10 sekunder

Annealing 50 °C i 30 sekunder x 32

Elongering 72 °C i 60 sekunder

Elongering 72 °C i 1 minutt

Hold 4 °C ∞

PCR brukes for å amplifisere DNA. PCR-produktene/templatene kan kjøres på en gel-elektroforese. Ved å kjøre 16s-PCR produktet på gel-elektroforese ønsker man å forsikre seg om at man har klart å isolere DNA før sekvensering. Arts-identifikasjonen skjer ved sekvensering av PCR-produktet. Gel-elektroforese av Esp-produktet gir imidlertid direkte svar på om man har isolert *esp*-genet eller ikke. Likevel kan det være ønskelig å sende Esp-produktet til sekvensering for å undersøke om det kan være små forskjeller i sekvensene.

Ved 94 °C denaturer dobbeltrådet DNA til enkelttrådet DNA . Under annealingen senkes temperaturen til 68 °C eller 50 °C, og primerne kan feste seg til komplementære baser på templatene. Primerne er oligonukleotider som markerer starten på en DNA-sekvens på et templat. Under elongeringen vil DNA-polymerasen katalyserer baseparingen av komplementære nukleotider i retning fra primerne på templatene. I dsDNA er trådene komplementære og har motsatt retning; 5'-3' og 3'-5' retning. Forward og revers primerne har hver sine retninger i forhold til en gitt DNA sekvens, og en mastermix må inneholde begge for at DNA-tråden skal fordobles for hver PCR runde⁵¹.

Gel elektroforese for å bekrefte PCR-produkt før sekvensering

1% agarose gel ble laget ved å blande 0,62 g SeaKem LE agarose i 62 ml 0,5 x TBE-buffervann. Blandingen ble kokt i mikrobølgeovn i 1-2 minutter, avkjølt i avtrekkskap til 60-70 °C og tilsatt 3 µl GelRed TM. Gelen ble helt opp i gelkar og stivnet i løpet av 30 minutter. Den stivnede gelen ble lagt i elektroforese-kan og dekket med 0,5 x TBE-buffer. 3/5 µl PCR-produkt ble pipetert over i hver brønn, og 3 µl Kb Plus DNA ladder ble pipetert i første og siste brønn som mål på molekylærvækt. Gelen ble kjørt på 80 volt i en time. Det ble tatt bilde av gelen vha transilluminasjon etter programvaren GeneSnap.

Fjerning av overflødig primere og nukleotider fra PCR produkt

5 µl PCR-løsning tilsettes 2 µl ExoSAP-IT, og inkuberes ved 37 °C for å degradere resterende primere og nukleotider. Løsningen inkuberes ved 80 °C i 15 min for å

inaktivere ExoSAP-IT. Denne løsningen kan oppbevares i kjøleskapet i månedsvis før sekvensering.

Klargjøring til sekvensering

1 µl PCR-løsningen/templat tilsettes 1 µl Big Dye,

1,6 µl primer (5pmol/µl), 4 µl sekvenseringsbuffer og 2,3 µl ddH₂O. Denne

sekvenseringsløsningen kjøres på PCR-maskinen etter følgende sekvenseringsprogram:

Denaturering 96 °C i 1 minutter

Denaturering 96 °C i 10 sekunder

Annealing 50 °C i 5 sekunder x 25

Elongering 60 °C i 60 sekunder

Hold 4 °C ∞

Sekvensering

Sekvenserings løsningen ble klargjort, og sendt til Sekvenseringslabben ved UiT for sekvensering etter Sanger metoden. En variant av *E. coli* polymerase I syntetiserer en komplementær template. Man tilsetter primere, deoksynukleotider og 2',3'-dideoksynukleotider. 2',3'-dideoksynukleotidene er radioaktivt-merket eller fluorescens-merket og mangler en 3'-hydroksylgruppe som terminerer DNA-syntesen. Røntgen/UV-lys fotografering av sekvenseringsgelen viser da ulike DNA-fragment lengder som representerer hver av baseparene, og man kan lese av baserekkefølgen/DNA sekvensen⁵¹.

Resultater

Av de 92 isolatene med *S. epidermidis* ble 86 isolater identifisert vha ID32-STAF, 24 isolater vha sekvensering og 17 isolater med både ID32Staf og sekvensering (tabell 2). I fase I og II fant man også *S. aureus* i henholdsvis 3 og 4 skåler. Totalt gir det 7 isolater med *S. aureus*. Det vil si at $(7 \times 100)/92 = 7,61$ % av *S. epidermidis* skålene inneholdt også *S. aureus*.

Totalt 83 (90,2 %) av *S. epidermidis* isolatene hadde *esp*-gen (tabell 3). I syv av 92 skåler med *S. epidermidis* ble det også funnet *S. aureus* isolat (tabell 3). Tabell 3 viser sammenhengen mellom tilstedeværelse/fravær av *esp*-genet i *S. epidermidis* og bærerskap av *S. aureus*. Vi fant ingen signifikans ved kji-kvadrat test.

Fit-Future prosjektets leder Anne-Sofie Furberg rapporterer 24.05.12 at over 40 % av forsøkspersonene var bærere av *S. aureus*, uansett om prøvene var tatt fra elevenes nese eller hals og uansett vekstmedium.

Diskusjon

Våre resultater

I de 92 skålene hvor vi fant *S. epidermidis* kolonier, fant vi kun 7 skåler med *S. aureus* som tilsvarer 7,6 % *S. aureus*, samlet for de prøvene vi samlet inn fra fase I og II. Foreløpige resultater fra Fit-Future tyder på at over 40 % av forsøkspersonene var bærere av *S. aureus*, uansett om prøvene var tatt fra elevenes nese eller hals og uansett vekstmedium. Det betyr at forekomsten av *S. aureus* er betydelig lavere fra de forsøkspersonene vi isolerte *S. epidermidis*. Også i forhold til andre kilder, har vi funnet betydelig lavere forekomst av *S. aureus* enn det som er vanlig i nese. Ca 20 % og 30 % er henholdsvis persisterende og intermediære bærere av *S. aureus* i nesene⁷. Mens Wertheim, Melles et al. 2005 har sett på et tilfeldig utvalg *S. aureus* i en populasjon, har vi i vårt forsøk primært selektert for *S. epidermidis*, og siden fått informasjon om tilstedeværelse av *S. aureus* fra Fit-Future prosjektet. Iwase et al. (2010) fant at *Esp*-innholdene *S. epidermidis* inhiberer biofilm og kolonisering av *S. aureus*. Da et flertall av *S. epidermidis* isolatene våre inneholdt *esp*-gen (83 stk eller 90,2 %), er det ikke helt

uventet at forekomsten av *S. aureus* er så lav. Den store forskjellen i *S. aureus* funn mellom Fit-Future deltakerne og *S. epidermidis* skålene i forsøket vårt, kan tyde på at *S. epidermidis* hemmer *S. aureus* slik det også kommer frem i forsøket til Iwase et al. (2010). Iwase et al. (2010) fant imidlertid en signifikant forskjell mellom hemmende og ikke-hemmende *S. epidermidis*. Hvor førstnevnte isolater hemmet veksten av *S. aureus*, mens de ikke hemmende gjorde det ikke. Denne forskjellen finner vi ikke i dette forsøket. I de 7 skålene hvor vi fant *S. aureus*, hadde alle *S. epidermidis* isolatene *esp*-gen (Tabell 3). I disse 7 skålene har tilstedeværelse av *esp*-gen, ikke hemmet veksten av *S. aureus*. Denne observasjonen svekker imidlertid hypotesen om at Esp hemmer veksten av *S. aureus*. Imidlertid er antallet *S. aureus* observasjoner på 7 stykker så lavt, at det er vanskelig å tillegge denne siste observasjonen en avgjørende betydning.

Implikasjoner

I over et år dyrket Iwase et al. (2010) suksessivt *S. aureus* på vekstmedium og tilsatte Esp, men observerte ingen tegn til utvikling av Esp-resistens. Forfatterne forklarer det med at Esp sin virkningsmekanisme er fundamentalt annerledes enn hittil kjente antibiotika mekanismer som eksempelvis veksthemming og konkurranse om spesifikke bindings molekyler. Så langt har man lyktes med å klonere *esp*-genet i *Brevibacillus choshinensis* slik at man på en effektiv og økonomisk måte kan isolere, og påsikt masseprodusere et Esp-ekstrakt ved ekspresjon av *esp*-genet⁵². Observasjonene i denne oppgaven viser i likhet med Iwase et al. (2010) at hemmende *S. epidermidis* reduserer veksten av *S. aureus*. Man har funnet et protein som hemmer veksten av *S. aureus*, man har funnet metoder for å masseprodusere proteinet på en effektiv måte, og så langt ser det ut som om Esp er lite heftet med resistensproblematikk. Da mennesker går rundt med hemmende *S. epidermidis* i nesen, og ikke tar tilsynelatende skade av det unntatt ved svekket immunforsvar, er det ikke utenkelig at bivirkningene av Esp er beskjedne. Man kan derfor evt. utvikle et medikament som kan dekolonisere *S. aureus* basert på denne Esp-proteasen.

Kritikk av oppgaven

Vi så på sammenhengen mellom tilstedeværelse *S. epidermidis* med eller uten *esp*-gen, og eventuell fravær av *S. aureus* i nesen. Det er imidlertid ikke *esp*-genet som direkte hemmer tilstedeværelse av *S. aureus*. Det er *esp*-genets extracellulære produkt; Epidermidis serine protease (Esp) som bryter ned peptidbindinger mellom aminosyrene Serine i biofilm. At genet finnes i en *S. epidermidis* stamme, er ikke ens betydende med at

genet uttrykkes og dermed hemmer kolonisering av *S. aureus*. For å finne en klar årsaks sammenheng, burde vi derfor ha registrert tilstedeværelsen og aktiviteten til Esp opp mot eventuelt tilstedeværelse/fravær av *S. aureus*. I likhet med Iwase et al. (2010) kunne man ha observert om Esp ble uttrykt, og om hemmingen av *S. aureus* ville opphørt ved anvendelse av Serine-protease hemmeren; amidinophenyl methansulphonyl fluoride (APMSF).

I forsøket fant jeg 92 skåler med *S. epidermidis*, og i 7 av disse fant jeg også *S. aureus* kolonier. Antallet skåler med *S. epidermidis* og *S. aureus* isolater er noe lavt, og gjør det vanskelig å trekke klare konklusjoner. I Barneavdelingens forskergruppe på UNN forstsetter imidlertid arbeider med å finne flere *S. epidermidis* isolater med eller uten *esp*-gen vha PCR/gel-elektroforese og sekvensering, mens man i Fit-Future prosjektet arbeider med å kartlegge forekomsten av *S. aureus*. Her under skal det nevnes at vi bestandig fant flere *S. epidermidis* ved hjelp av 16s-PCR/gel-elektroforese og påfølgende sekvensering, enn ved ID32staff i det samme materialet. Ikke helt uventet har man derfor per i dag til sammen funnet 120 skåler med *S. epidermidis* og i 9 av disse har man så langt funnet *S. aureus*.

Konklusjon

I denne oppgaven fant man kun 7,6 % tilstedeværelse av *S. aureus* i *S. epidermidis* skålene. Tatt i betraktning funnene til Iwase et al. (2010) som konkluderer med at hemmende *S. epidermidis* svekker veksten av *S. aureus*, og at en relativ stor andel av våre *S. epidermidis* isolater hadde *esp*-gen (83 stk eller 90,2%), er våre resultater som forventet.

Forekomsten av *S. aureus* i Fit-Future skålene var over 40 %, uansett lokalisasjon og dyrkningsmedium. Den store forskjellen i forekomsten av *S. aureus* i våre *S. epidermidis* - og i Fit-Future skålene, tyder på at *S. epidermidis* muligens svekker veksten av intranasale *S. aureus*. I motsetning til Iwase et al. (2010) finner vi ikke en så klar sammenheng mellom hemmende *S. epidermidis* og fraværet av *S. aureus* da alle 7 *S. aureus* skålene inneholdt *S. epidermidis* med *esp*-gen. Det lave antallet *S. epidermidis* og *S. aureus* skåler som ble observert i denne oppgaven, gjør det imidlertid vanskelig å trekke sikre konklusjoner.

Tabell 1

Invasjon	Tekoin syrer	Binder bakterien til slimhinneceller og fibronektin i vertens vev.
Kolonisering.	Lipaser	Hydrolyserer lipider i fettvev.
	PIA. (<i>S. epidermidis</i>)	Intercellulær adhesjon og akkumulering, biofilm dannelse.
Omgåelse av immunforsvar	Penicillinase (<i>S. aureus</i>)	Inaktiverer penicillin ved å ødelegge beta-laktamringen.
	Katalase	Omdanner hydrogenperoksid til vann og oksygen.
	Protein A. (<i>S. aureus</i>)	Binder, utfeller og inaktiverer antistoffenes Fc-del.
	Koagulase (<i>S. aureus</i>)	Omdanner fibrinogen til fibrin. Fibrinbelegg beskytter mot leukocytter.
Inflammatorisk prosess	Peptidoglycan	Binder Toll-like-reseptor 2 på monocytter og makrofager som frigjør TNF og cytokiner.
	Tekoin syrer	Binder antistoff og gir komplement-aktivering.
	Enterotoksiner	Varmelabile toksiner gir sentralvenøs kvalme- og oppkast stimulering

Viktige virulens faktorer i stafylokokk-arter, spesielt i *S. aureus* og *S. epidermidis*, utarbeidet etter opplysninger fra Fredheim (2010) og Hovig & Muller (2008).

Tabell 2

Frysenr	Koloni nr	Art ID32	16S sekv	S. Epi	Esp	Nese	
						Fase1	fase 2
6	1	1		1	1	0	0
9	1		1	1	1	0	0
10	1	1		1	1	0	0
13	1	1		1	1	0	0
18	2	1		1	1	0	0
24	1	1	1	1	0	0	0
32	1		1	1	1	0	0
38	1	1	1	1	0	0	0
60	1	1	1	1	1	0	1
62	1	1		1	1	0	0
64	1	1		1	0	0	0
70	1	1		1	0	0	0
72	1	1	1	1	1	0	0
75	2	1		1	1	0	0
81	2	1	1	1	1	0	0
82	1	1		1	1	1	0
87	2	1		1	1	0	0
98	1	1	1	1	1	0	0
106	1	1		1	1	0	0
108	1	1		1	1	0	0
110	1	1	1	1	1	0	0
132	1		1	1	1	0	0
140	1	1		1	1	0	0
144	1	1		1	1	0	0
168	1	1		1	1	0	0
172	1	1		1	1	0	0
176	1	1		1	1	0	0
184	1	1		1	0	0	0
187	1	1		1	1	0	0
188	1		1	1	1	0	0
212	1	1		1	1	0	1
234	1	1		1	1	0	0
236	1	1		1	0	0	0
242	1	1		1	1	0	0
244	1	1		1	0	0	0
304	1	1		1	0	0	0
306	1	1		1	1	0	0
318	1	1		1	0	0	0
400	1	1		1	1	0	0
404	1	1		1	1	0	0
406	1	1		1	1	0	0
410	1	1		1	1	0	0
412	1	1		1	1	0	0
418	1		1	1	1	1	0
420	1	1		1	1	0	0
422	1	1		1	1	0	0
424	1	1		1	1	0	0

426	1	1		1	1	0	0
504	1	1		1	1	0	0
510	1	1		1	1	0	0
514	1	1	1	1	1	0	0
518	1	1		1	1	0	0
520	1	1		1	1	0	0
522	1	1		1	1	0	0
524	1	1		1	1	0	0
526	1	1		1	1	0	0
528	1	1		1	1	0	0
530	1	1		1	1	0	0
532	1	1		1	1	0	0
540	1	1		1	1	0	0
542	1	1		1	1	0	0
544	1	1		1	1	0	0
546	1	1		1	1	0	0
550	1	1		1	1	0	0
602	1	1		1	1	0	0
609	2	1		1	1	0	0
612	1	1		1	1	0	0
614	1	1		1	1	0	0
616	1	1		1	1	0	0
617	1	1		1	1	0	0
621	1	1	1	1	1	0	0
623	1	1		1	1	0	0
625	1	1		1	1	0	0
627	1	1		1	1	0	0
631	1	1		1	1	0	0
635	1	1		1	1	0	0
637	1	1		1	1	0	0
639	1	1		1	1	0	0
640	1	1		1	1	1	0
641	1	1		1	1	0	0
643	1	1		1	1	0	0
645	2		1	1	1	0	0
646	1	1	1	1	1	0	0
648	1	1	1	1	1	0	0
650	1	1	1	1	1	0	0
652	1	1	1	1	1	0	0
655	1	1		1	1	0	0
656	1	1	1	1	1	0	1
657	1	1	1	1	1	0	1
664	1	1	1	1	1	0	0
666	1	1	1	1	1	0	0
668	1	1	1	1	1	0	0
		86	24	92	83	3	4

Rådata fra forsøket. Alle *S. epidermidis* isolatene er gram-positive, katalase-positive og koagulase-negative. Frysenummer: Nedfrosede *S. epidermidis* isolat med løpenummer. Koloninummer: *S. epidermidis* isolater hentet fra koloni 1 eller 2 på samme skål. Art ID32: 1; arts-identifisering vha ID32Staf. 16S sekv: 1; arts-identifisering ved sekvensering. Nese/Fase: Tidspunkt for neseprøvetaking med 1-6 ukers mellomrom, fra fase 1 eller fase 2. I dette tallmateriale vil en elev kun delta i fase I eller fase II.

Tabell 3.

	<i>S. aureus</i>	Ikke <i>S. aureus</i>	Totalt
<i>S. epidermidis</i> med <i>Esp-gen.</i>	7 (7,6 %)	76 (82,6 %)	83 (90,2%)
<i>S. epidermidis</i> uten <i>Esp-gen.</i>	0 (0 %)	9 (9,8 %)	9 (9,8 %)
Totalt	7 (7,6 %)	85 (92,4 %)	92 (100 %)

Tilstedeværelse av *S. epidermidis* med eller uten *esp-gen* og tilstedeværelsen av *S. aureus*
Kji kvadrat test viser en p verdi på 0,36.

Referanser

1. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus, Micrococcus* and Other Catalase - Positive Cocci. I: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Phaller MA. (red). Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2007.
2. J. P. Euzéby: List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Tilgjengelig fra: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. (30.05.12)
3. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clinical microbiology reviews. 1994; **7**(1): 117-40.
4. Hovig B, Muller F. *Staphylococcus*. I: Degré M, Hovig B, Hollag H. (red). Medisinsk mikrobiologi. Oslo: Gyldendal; 2008.
5. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clinical microbiology reviews. 1997; **10**(3): 505-20.
6. Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? Trends in microbiology. 2001; **9**(12): 605-10.
7. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. The Lancet infectious diseases. 2005; **5**(12): 751-62.
8. van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clinical microbiology reviews. 2001; **14**(3): 547-60.
9. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. Journal of clinical microbiology. 1975; **1**(1): 82-8.
10. Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. Journal of clinical microbiology. 2005; **43**(5): 2286-90.
11. Gribaldo S, Cookson B, Saunders N, Marples R, Stanley J. Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative staphylococcal species important in hospital infection. Journal of medical microbiology. 1997; **46**(1): 45-53.
12. Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. Journal of clinical microbiology. 2001; **39**(7): 2541-7.
13. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. Journal of clinical microbiology. 2001; **39**(12): 4296-301.
14. Cilia V, Lafay B, Christen R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Molecular biology and evolution. 1996; **13**(3): 451-61.
15. Nielsen JO, Pedersen C, Bygbjerg I, Vestbo J, Viskum K. Infektionssygdomme. I: Hansen NE, Haunsø S, Schaffalitzky de Muckadell OB. (red). Medicinsk Kompendium. København: Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck; 2004.
16. Elstrom P, Aavitsland P. Meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in Norway. Tidsskrift for den Norske laegeforening: Tidsskrift for praktisk medicin. 2008; **128**(23): 2730-3.

17. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical infectious diseases: An official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001; **32 Suppl 2**: S114-32.
18. del Rio A, Cervera C, Moreno A, Moreillon P, Miro JM. Patients at risk of complications of Staphylococcus aureus bloodstream infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009; **48 Suppl 4**: S246-53.
19. NORM/NORM-VET Rapporten-2010. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø/Oslo 2011. Tilgjengelig fra: <http://www.unn.no/antibiotikaresistens-no/category8924.html>. (30.05.12).
20. Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*. 1988; **1**(3): 281-99.
21. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual review of medicine*. 1999; **50**: 223-36.
22. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1994; **19**(2): 231-43; quiz 44-5.
23. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Seminars in perinatology*. 2003; **27**(4): 293-301.
24. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology*. 2004; **2**(2): 95-108.
25. Fredheim EG. Biofilms of Coagulase-Negative Staphylococci; More pieces to the puzzle. A dissertation for the degree of Philosophia Doctor. Tromsø: Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø; 2010.
26. Lee YM, Almquist F, Hultgren SJ. Targeting virulence for antimicrobial chemotherapy. *Current opinion in pharmacology*. 2003; **3**(5): 513-9.
27. Otto M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2004; **9**: 841-63.
28. Lingaas E. Antibakterielle og antimykotiske midler. I: Degré M, Hovig B, Hollag H. (red). *Medisinsk mikrobiologi*. Oslo: Gyldendal; 2008.
29. Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br Med J*. 1961; **2**: 124-33.
30. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews*. 2010; **23**(3): 616-87.
31. Munckhof WJ, Nimmo GR, Carney J, Schooneveldt JM, Huygens F, Inman-Bamber J, et al. Methicillin-susceptible, non-multiresistant methicillin-resistant and multiresistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: a clinical, epidemiological and microbiological comparative study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2008; **27**(5): 355-64.
32. Hiramatsu K. The emergence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *The American journal of medicine*. 1998; **104**(5A): 7S-10S.
33. Liu C, Chambers HF. Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003; **47**(10): 3040-5.

34. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *The New England journal of medicine*. 2003; **348**(14): 1342-7.
35. Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerging infectious diseases*. 2007; **13**(12): 1840-6.
36. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *The Journal of infectious diseases*. 2006; **193**(2): 172-9.
37. Graham PL, 3rd, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Annals of internal medicine*. 2006; **144**(5): 318-25.
38. Park SY, Kim SM, Park SD. The Prevalence, Genotype and Antimicrobial Susceptibility of High- and Low-Level Mupirocin Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of dermatology*. 2012; **24**(1): 32-8.
39. Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe B, White AR. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985; **27**(4): 495-8.
40. Harbarth S. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-recent advances and future challenges. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006; **12**(12): 1154-62.
41. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*. 1998; **339**(8): 520-32.
42. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010; **465**(7296): 346-9.
43. Cotte C, Fanjat N, Orensa S. et al. -*S. aureus* ID: A new chromogenic medium for the isolation of staphylococci and identification of *Staphylococcus aureus*. Poster 929, Glasgow 2003, 13th ECCMID. 2003.
44. Pakningsvedlegget til CHROMagar. TM MRSA MR502. Chromogenic medium for the isolation and differentiation of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 2009.
45. Clesceri L, Greenberg AE, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. Am Pub Health Association. Washington, D.C. 1998.
46. Kruczak-Filipov P, Shively RG. Gram Stain Procedure. I: Isenberg, Henry D. (red). *Clin. Microbiol. Proc. Handbook*, 1.5.1. 1992.
47. Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical tests in diagnostic microbiology. John Wiley and sons, Inc., New York 13-14. 1975.
48. Wanger AR, Morris SL, Ericsson C, Singh KV, LaRocco MT. Latex agglutination-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from neonates: epidemiologic features and comparison of typing methods. *Journal of clinical microbiology*. 1992; **30**(10): 2583-8.
49. Sewell D. Quality Controll: Long term storage. I: Isenberg HD. (red). *Clin. Microbiol. Procedures Handbook*, 13.2.22. 1992.
50. ID32Staph Pt. bioMerieux: Identification system for non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods. REF 20050. 2006.
51. Ratledge C, Kristiansen B. Basic Biotechnology. New York: Cambridge University Press; 2006.

52. Sugimoto S, Iwase T, Sato F, Tajima A, Shinji H, Mizunoe Y. Cloning, expression and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of applied microbiology*. 2011; **111**(6): 1406-15.