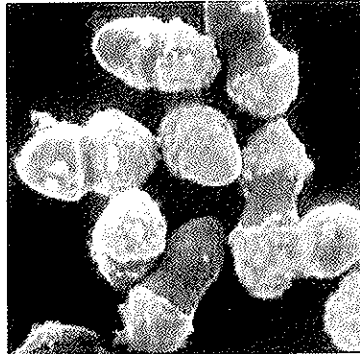


**Forsvinner
antibiotikaresistente bakterier
i fravær
av
antibiotika?**



Enterococcus faecium

Torfinn Lørdøen Gaarden

5. års oppgave

ved

Avdeling for mikrobiologi og virologi
Institutt for medisinsk biologi
Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø

Og

Avdeling for mikrobiologi
Universitetssykehuset i Nord Norge
Norge

2002

Under veiledning
av
Arnfinn Sundsfjord & Pål Johnsen

Innholdsfortegnelse

Ord og begreper		3
Resyme		5
Introduksjon		6
Teori:	Antibiotikaresistens	8
	Enterokokker	8
	Økologi	10
	Plasmider	11
Materiale:	Beskrivelse av materialet	12
Metode:	Plasmidisolering	13
	Restriksjons-enzym-analyse	13
	Plasmidelektroforese	13
	Vakuumblotting	13
	Southern blot hybridisering	14
	Puls-felt gel elektroforese (PFGE)	14
Resultater		15
Diskusjon		18
Litteraturliste		20
Appendix A		
Appendix B		

Ord og begreper

Antibiotika versus antimikrobielle midler:

Antimikrobielle midler refererer generelt til midler som brukes mot mikrober (eks. Sopp og bakterier). Antibiotika refererer til antimikrobielle midler som kan produseres av mikroben selv. Disse begrepene brukes om hverandre i oppgaven som en samlebetegnelse på midler med antimikrobiell virkning.

CNS:

Sentralnervesystemet.

Coliciner:

Coliciner er en klasse bakteriociner som binder til den negativt ladde overflaten på følsomme bakterier og danner en spenningsavhengig kanal i membranen, som dreper ved å ødelegge cellens energipotensiale (1d).

Genus:

Genus betyr slekt, eks. Stafylokokker (1e, 11a).

GRAF:

Glykopeptid resistente *Enterococcus faecium*.

Konjugasjon:

Konjugasjon er overføring av DNA fra en bakterie til en annen via direkte cellekontakt. Prosessen kan kontrolleres av et "fertilitets" plasmid, som bærer gener for de proteinene som trengs for å utføre konjugasjonen (5).

Plasmid:

Plasmider er ekstrakromosomale DNA molekyler som er i stand til å replikere uavhengig av bakteriens kromosom. Plasmidene kan ha ulike strukturer som *kovalent lukket sirkulært* (KLS), *åpent sirkulært* og *lineært*.

Species:

Species betyr art, eks. *Staphylococcus aureus* (1e, 11a).

Supercoiled:

Plasmid DNAet finnes i en tett pakket, spiralførmert sirkulær struktur, hos kovalent lukkede sirkulære plasmider.

Transduksjon:

Overføring av DNA fra en celle til en annen ved hjelp av bakteriofager. Det vil si at en celle blir infisert av virus som produserer kapsler til å frakte sitt eget DNA i, deler av cellens DNA kan også komme inn i en slik kapsel og dermed transporteres ut av cellen og inn i andre celler.

Transformasjon:

Overføring av DNA fra en bakterie til en annen. Ved at fritt DNA (for eksempel fra en død bakterie) tas opp og stabiliseres av en annen bakterie. Gener fra en bakterie kan også overføres til en annen i laboratoriet ved hjelp av elektroporering eller kjemisk behandling av mottakercellene.

Transposon:

Transposon er et stykke DNA som kan flytte seg selv inntacellulært fra et sted til et annet, enten innad eller mellom kromosomalt DNA, plasmid DNA og bakteriofager. Transposon kan kode for antibiotikaresistens, enzymer, toksiner eller ulike metabolske enzymer. De kan føre til mutasjoner i genet de flytter til, eller starte uttrykking av gener i nærheten av hvor de settes inn. Transposoner er ikke i stand til å replikere uavhengig, de replikerer som en del av det "verts" DNA de sitter i (5b).

Konjugativt transposon:

Konjugativt transposon er et transposon som er i stand til å overføre seg selv mellom bakterier.

Resyme

Bakgrunnen for denne studien er oppdagelsen av glykopeptid resistente enterokokker (GRE) på europeiske kyllinggårder i 1994-95, hvor glykopeptidet avoparcin ble brukt som førtilskudd for å fremme veksten av kyllingene. Glykopeptidantibiotika er siste skanse i behandlingen av antibiotikaresistente Gram positive infeksjoner. Påvisning av overførbare høygradig glykopeptidresistens hos enterokokker ble derfor ansett for å være en trussel mot menneskets helse. Avoparcin ble av denne grunn forbudt i Danmark og Norge i 1995, og i resten av Europa fra 1997. Ut fra hypotesen om at de resistente bakteriene kunne utkonkurreres av følsomme bakterier ved å fjerne glykopeptider fra miljøet, var det forventet at GRE raskt skulle bli borte etter at avoparcin ble fjernet fra foret i 1995. I ettertid viser norske undersøkelser at GRE persisterer blant bønder og i deres miljø på tidligere avoparcineksponerte gårder, på tross av at antibiotiketrykket er fjernet (12).

Hypotesen i denne oppgaven er at persistens av GRE uten antibiotikaseleksjon, kan skyldes persistens av utvalgte GRE stammer og /eller persistens av et mobilt genetisk element som bærer transposon Tn1546 som koder for høygradig glykopeptidresistens type *vanA*.

Materialet i denne oppgaven består av fekale glykopeptidresistente *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), som er isolert fra en kyllingbonde på tre ulike tidspunkt; høsten 1998, våren 1999 og høsten 1999. Fra hvert prøvetidspunkt er det hentet 10 isolater. Gården til denne bonden var eksponert for avoparcin i perioden fra 1986 til 1995. Gården er tidligere undersøkt og funnet positiv for *vanA* glykopeptidresistente enterokokker.

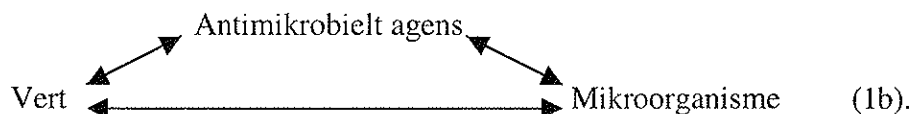
Metodene som er brukt i denne oppgaven er *puls-felt gelelektroforese* for å undersøke på genetisk slektskap mellom isolatene. For å lete etter et eventuelt mobilt genetisk element som koder for glykopeptidresistens, er det utført *plasmidisolering ved hjelp av alkalisk lysis metoden*. Plasmidene er kuttet med restriksjonsenzym og kjørt på *agarosegelelektroforese* for å skille de ulike DNA-fragmentene fra hverandre. Fragmentene ble overført til en membran ved hjelp av *vakuumblooming*. Membranen ble *hybridisert* med prober som er komplementære til de genene (Tn1546) vi lette etter. Man får da svar på om disse genene er til stede i plasmidet. Dersom genene påvises kan man sammenligne størrelsen på DNA-fragmentet genet sitter på hos de ulike isolatene. Ut fra dette er det mulig å si noe om sannsynligheten for at det er det samme mobile genetiske elementet som går igjen i ulike stammer.

Funn viser liten heterogenitet i stammer i prøver som er tatt på samme tidspunkt, mens det ses stor heterogenitet mellom stammer når man sammenligner prøver tatt på ulike tidspunkt. Uavhengig av prøvetidspunkt finner man at GRE-stammene har et plasmidfragment inneholdende Tn1546 lignende sekvenser (*vanY-Z*) som er av lik størrelse etter kutting med et bestemt restriksjonsenzym.

Resultatene indikerer at persistens av et spesifikt plasmid som inneholder Tn1546, kan være årsaken til persistens av *vanA* GRE ved fravær av seleksjon fra antibiotika.

Introduksjon

Infeksjonssykdommer kan kontrolleres ved hjelp av medikamenter (kjemoterapi), immunisering og helsebringende omgivelser som riktig ernæring og god hygiene (1a). Interaksjonen mellom vert, patogen mikrobe og antimikrobielt agens kan ses på som et triangel.



I denne oppgaven blir det sett nærmere på forholdet mellom antimikrobielt agens og mikroorganisme. Introduksjon av penicillin i klinisk praksis på 1940-tallet revolusjonerte behandlingen av Gram-positive infeksjoner i den vestlige verden. Før antibiotika var tilgjengelig, hadde bakteriemier som skyldtes stafylokokker en dødelighet på omtrent 90% (2a). Etter at antibiotika ble tilgjengelig har morbiditet og mortalitet til både streptokokk- og stafylokokk infeksjoner som pneumoni, sepsis, sårinfeksjoner og barsefeber sunket dramatisk. Imidlertid ble det raskt oppdaget at noen tilfeller av stafylokokkinfeksjoner var resistente overfor penicillinbehandling (2a). Den raskt økende forekomsten av resistens og manglende utvikling av nye antibakterielle agens på 1990-tallet er en internasjonalt anerkjent alvorlig trussel for behandling av livstruende infeksjoner (1c).

Enterokokker er en del av normalfloraen i gastrointestinaltractus hos mennesker og en hyppig årsak til en rekke infeksjoner. Enterokokker er som gruppe resistent mot en rekke antibiotika. Førstevalg i behandling av enterokokkinfeksjoner har vært penicilliner og aminoglykosider, mens glykopeptider (vankomycin og teikoplanin) har vært brukt som siste utvei ved manglende effekt av disse (10). Glykopeptid resistente enterokokker (GRE) har ført til tilfeller av infeksjoner med bakterier som er resistente mot alle tilgjengelige antibiotika. GRE kan overføre glykopeptidresistente elementer til andre Gram-positive bakterier *in vitro* og *in vivo*. Forståelsen av spredning av GRE er derfor av stor betydning for å forebygge glykopeptidresistens i andre patogene mikrober (3a).

Glykopeptidet avoparcin ble i tidsrommet fra 1986 til 1995 brukt som fortilskudd for å øke veksten hos kyllinger på en rekke norske kyllinggårder. På midten av 1990-tallet ble det avdekket et større reservoar av *vanA* type glykopeptidresistente enterokokker, hos dyr som hadde vært eksponert for avoparcin. I 1995 ble avoparcin forbudt, for å begrense muligheten for spredning av GRE til mennesker og sykehusmiljø (12). Teorien var at dersom man fjernet det selektive trykket fra avoparcin, ville GRE med tiden bli mindre utbredt, eller forsvinne helt fra miljøet. Ved undersøkelser 3 år etter seponering av avoparcin er GRE fortsatt til stede. På tidligere eksponerte norske gårder var 18% av bøndene GRE positive, mens 99% av kyllingprøvene inneholdt GRE 3 år etter avoparcinforbudet (12).

En større studie for å forstå mekanismene bak dette er satt i verk i samarbeid mellom veterinærinstituttet i Oslo. Avdeling for mikrobiologi og virologi (AMV), UiTø og mikrobiologisk avdeling Universitetssykehuset i Nord Norge (UNN). Studien er basert på prøvemateriale fra 30 kyllingfarmer, hvor avoparcin var i bruk frem til 1995. Prøver er (og blir) tatt fra bønder og kyllinger på disse gårdene vår og høst hvert år til og med 2003.

Målet med denne oppgaven er å undersøke om persistens av GRE uten seleksjon fra antibiotika kan skyldes persistens av enkelte GRE stammer og /eller persistens av et mobilt

genetisk element som bærer *vanA* resistensgenene. For å undersøke dette nærmere, analyseres prøvene fra en av bøndene tatt på de tre ulike tidspunkt.

Teori

Antibiotikaresistens:

Hva er antibiotikaresistens? Bakteriens resistens mot antimikrobielle agens må relateres til noe. I et medisinsk-klinisk perspektiv er bakteriestammen ansett for å være resistent når den tolererer en antibiotikakonsentrasjon som er høyere enn det som er oppnåelig *in vivo* (1c).

Typer resistens:

Primær resistens (iboende, naturlig resistens) er når en bakterie har innebygde gener som beskytter den mot antibiotika den selv produserer (11b). Det er en iboende egenskap knyttet til bestemte bakterie genus eller species.

Sekundær resistens (ervert resistens) oppstår hos normalt følsomme bakterier. Resistens mekanismene er ofte beslektet med lignende naturlig forekommende mekanismer hos primært resistente antibiotikaproduserende bakterier (11b).

Hvor kommer antibiotikaresistensen fra? Gener som koder for antibiotikaresistens ser ut til å stamme fra mikroorganismer som produserer antibiotika, eller fra organismer som deler de samme økologiske nisjene som antibiotikaproduserende mikrober. Disse genene er i første rekke utviklet for å forsvare bakterien fra selvdestruksjon. Hypotesen er at resistensgener har kommet på avveie fra deres opprinnelige vert (7c).

Det genetiske grunnlaget for antibiotikaresistens kan oppstå gjennom:

1. Mutasjoner i kromosomale gener i en bakteriecelle.
2. Ervert nytt DNA gjennom konjugasjon, transformasjon eller transduksjon.

Biokjemiske mekanismer for antibiotikaresistens omfatter:

1. Bakterien endrer struktur på antibiotika målet, slik at affiniteten mellom mål og antibiotika blir lavere. Eksempel er glykopeptidresistente enterokokker.
2. Bakterien kan endre opptaket av eller øke utskillelsen av antibiotika, slik at det ikke får angrepet målet inne i cellen. Eksempel er tetracyklin og makrolidresistens hos ulike streptokokker.
3. Bakterien kan produsere enzymer som inaktiverer antibiotika. Eksempel er β -laktamase produserende *Staphylococcus aureus*.

Enterokokker:

Enterokokker er fakultative anaerobe Gram positive kokker, som opptrer alene, i par eller korte kjeder. De produserer ikke cytokromenzymer, men katalasetesten kan være svakt positiv i pseudokatalase produserende species. Optimal vekst er ved 35°C, men de har evne til å vokse i temperaturer mellom 10 og 45°C, i buljong som inneholder 6,5% NaCl. Enterokokker hydrolyserer esculin ved tilstedeværelse av 40% gallsalt. Nesten alle stammer er homofermentative og produserer ikke gass. Laktat er endeproduktet ved nedbrytning/forbrenning av glukose. Noen species er mobile (7b).

Enterokokkenes egenskaper tillater dem å vokse i ulike miljø, som jord, mat, vann, dyr, fugler og insekter. Enterokokker er en del av normalfloraen i gastrointestinaltractus hos mennesker og varmblodige dyr (7b).

Klinisk betydning:

Enterokokker er en hyppig årsak til en hel rekke infeksjoner hos mennesker. Vanligst er infeksjon i urinveier, blodbanen, endocard, abdomen, galleveier, brannsåer og i forbindelse med fremmedlegemer i kroppen som for eksempel intravaskulære katetre. Enterokokker kan også infisere CNS, lunger, bløtvev, paranasale sinuser, øre, øye og tannkjøtt. Disse infeksjonsfokus er sjeldne. *E. faecalis* står for 80-90% av enterokokkinfeksjoner hos mennesker, mens *E. faecium* utgjør 10-15% mens en rekke andre species utgjør de resterende. På 1970 og 80 tallet ble enterokokker etablert som en av de viktigste nosokomiale patogener. De er nå den 4. hyppigste årsaken til sykehusinfeksjoner og den tredje hyppigste årsaken til bakteriemi i USA (9).

Primær og sekundær antibiotikaresistens i enterokokker:

Enterokokker er som gruppe, resistent overfor cefalosporiner, antistafylokokk penicilliner, lave konsentrasjoner av clindamycin og aminoglykosider, trimetoprim og sulfa *in vivo* (10).

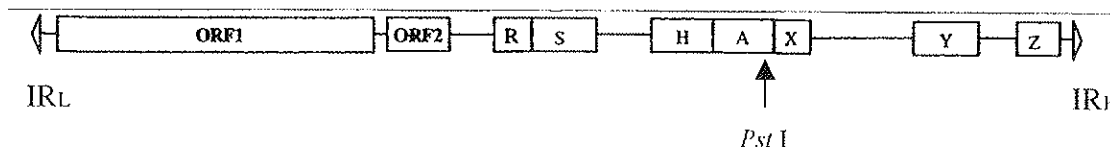
I flere tiår har behandlingsregimet for enterokokk-endokarditt vært penicillin eller ampicillin kombinert med et aminoglykosid. Monoterapi med en av delene har vist seg å være tilstrekkelig ved andre typer enterokokkinfeksjoner. Ved penicillinallergi hos pasienten eller ved ampicillinresistente enterokokker brukes vankomycin (10).

Ervervet resistens mot aminoglykosider og β -laktamer:

Enterokokker har utviklet resistens mot både gentamicin og streptomycin noe som har ført til tap av synergisme mellom aminoglykosid og penicillin. Penicillinaseproduserende *E. faecalis* ble rapportert tidlig på 1980-tallet (10).

Glykopeptidresistens:

Seks typer glykopeptidresistens i enterokokker er rapportert (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* og *vanG*). I denne oppgaven studeres *vanA* type glykopeptidresistens hos enterokokker. Denne typen resistens gjør bakterien svært motstandsdyktig mot glykopeptider. Mekanismen for resistens er blitt karakterisert for *vanA* -clusteret på syv gener, funnet på transposon Tn1546 (se figur 1). Ved tilstedeværelse av en inducer som vankomycin, blir transkripsjon av gener (*vanH*, *vanA*, *vanX*) som er nødvendig for resistens mot vankomycin aktivert som et resultat av interaksjoner av en sensorisk kinase (*vanS*) og en responsregulator (*vanR*). De transkriberte genene oversettes til enzymer, hvor noen danner celleveggforløpere som slutter med D-alanyl-D-lactat som vankomycin binder med svært lav affinitet (10). Resultatet blir at bakterien ikke skades eller hindres i celleveggssyntesen ved tilstedeværelse av glykopeptidantibiotika.



Figur 1. Transposonet Tn1546. ORF1 og ORF2 koder for proteiner som er involvert i transposisjon; R og S koder for proteiner som regulerer uttrykket av glykopeptidresistens; H, A og X må uttrykkes for å oppnå glykopeptidresistens; Y og Z koder for medvirkende proteiner. IRL og IRR markerer venstre og høyre inverterte repeterte sekvenser til transposonet. Pila fra *Pst* I indikerer hvor enzymet kutter i *vanA*. (15)

Mobilitet av elementer som inneholder gener for vankomycinresistens:

Enterokokker har ulike systemer av bakterie "mating" (konjugasjon), som kan spre gener mellom ulike bakterier. Disse systemene inkluderer plasmider som kan replikere i flere andre Gram positive species, feromon responderende plasmider som effektivt kan overføres mellom *E. faecalis* stammer og konjugative transposon. Funn av gener for vankomycinresistens på konjugative så vel som mobiliserbare elementer øker bekymringen for mulig overføring av resistens til andre mer patogene organismer. Eksperimentelt er det vist at vankomycinresistens kan overføres fra enterokokker til *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* og *Streptococcus pyogenes* (10).

GRE skaper problemer i valg av behandling fordi resistensen ofte oppstår i multiresistente stammer av *E. faecium*. Disse stammene er ofte resistent overfor erythromycin, tetracyclin, fluoroquinoloner, rifampin, og aminoglycosider. Terapi ved infeksjoner forårsaket av slike stammer omfatter kombinasjon av ulike antibiotika uten dokumentert effekt (10).

Økologi:

Økologi er definert som studien av forholdet mellom miljøet og organismene, og forholdet mellom organismene. *Adaptasjon* refererer til den evolusjonære prosessen som gjør at en organisme blir mer tilpasset sitt miljø. *Fitness (dugeligheten)* til en organisme er definert som det relative bidrag av dens genotype til neste generasjon relativt til bidrag fra andre genotyper. Dugeligheten representerer den kombinerte effekten av alle andre fenotypiske egenskaper på kapasiteten for overlevelse og reproduksjon av en bestemt genotype i et bestemt miljø. *Seleksjon* refererer til en ikke tilfeldig prosess av ulik reproduksjon av ulike genotyper. *Genetisk drift* er definert som en tilfeldig forandring i genfrekvens i små isolerte populasjoner, som skyldes andre faktorer enn naturlig seleksjon (7a).

"Kostnadene" for bakterien ved antibiotikaresistens:

Besittelsen av et antibiotikaresistensgen lønner seg helt klart for bakterien når det korresponderende antibiotika er til stede. *Hva skjer imidlertid med den resistente bakterien når antibiotika ikke er tilstede? Må bakterien betale en pris i dugelighet, som leder til en situasjon hvor den blir utkonkurrert av følsomme revertanter eller nye følsomme stammer?* Dersom dette er tilfelle, vil en strategi for å kontrollere spredning av antibiotikaresistens være å stoppe bruken av den aktuelle antibiotikaen til den resistente genotypen forsvinner eller synker til en tilstrekkelig lav andel (7a).

Ved fravær av antibiotika, kan resistente genotyper ha veksthastigheter som er lavere enn deres følsomme motstykker. En rekke undersøkelser har vist at ved fravær av seleksjon for egenskaper som plasmidene koder for, påfører plasmidet verten en økt kostnad i dugelighet. Dette fører til en lav stabilitet av plasmidet i miljøet da de bakteriene uten plasmider vil vokse raskere og utkonkurrere sine plasmidbærende motstykker (7a).

Kan kostnaden forbundet med resistens egenskaper bli redusert ved å tillate vert-plasmid å tilpasse seg? *In vitro* studier av *E. coli* bekrefter at naturlig seleksjon kan resultere i fiksering av kompensatoriske mutasjoner som gjenoppretter den fysiologiske funksjonen som var blitt svekket av resistensmutasjonen. Ved laboratorieforsøk har Lenski og samarbeidspartnere (13) vist at plasmidbærende bakterier som har fått tilpasse seg over en viss periode har et konkurransemessig fortrinn i forhold til deres plasmidfrie isogene motstykker. Dette er forenelig med at antibiotikasensitivitet i prinsippet er en fornybar ressurs. Man må imidlertid raskt stoppe bruken av antibiotika dersom resistens oppstår for å hindre at resistente genotyper

skal bli i stand til å adaptere seg til resistensgenet gjennom kompensasjonsmekanismer for de kostnader det representerer (7a).

Plasmider:

Plasmider er ekstrakromosomale, (oftest sirkulære) DNA molekyler som er i stand til å replikere uavhengig av bakteriens kromosom. Selv om plasmider vanligvis er ekstrakromosomale kan de også integreres i bakteriens kromosom. Plasmider kan klassifiseres i 3 grupper i henhold til overførbarhet. Selvoverførbare (konjugative) plasmider koder selv for de egenskaper som er nødvendig for å kunne overføres mellom celler. Disse plasmidene er store (>25 Kb) siden de inneholder mange gener som trengs for overføring. Plasmider av denne typen forekommer vanligvis i få (1-3) kopier per celle. Ikke overførbare plasmider er små i størrelse siden de ikke inneholder gener for overføring. Spredning av disse plasmidene skjer ved at de fordeler seg i de to nye cellene ved celledeling (vertikal genoverføring). De er ofte til stede med mange (10-60) kopier per celle. Mobiliserbare plasmider er plasmider som er for små til et fullt sett gener som koder for konjugasjon. Disse plasmidene kan imidlertid overføres til andre celler ved å "låne" genprodukter for konjugasjon av selvoverførbare plasmider (5c). Plasmider forekommer i både Gram positive og Gram negative bakterier, og flere ulike typer plasmider kan forekomme i en celle (5a).

For at et plasmid skal persistere i en populasjon av voksende celler, må replikasjonsraten tilsvare delingshastigheten til verten (6a). For å opprettholde stabil sameksistens med verten må plasmidet replikere gjennomsnittlig en gang per bakteriegenerasjon (6b). Dersom celler som får et plasmid favoriseres ved naturlig seleksjon, vil det spre seg raskere. Eksempel på dette er antibiotikaresistente bakterier som raskt sprer seg i miljøer som er eksponert for antibiotika (6a). Sammenlignende undersøkelser av plasmider isolert fra bakterier fra preantibiotisk tid og etter klinisk bruk av antibiotika har vist at plasmidtypene ikke har endret seg. Imidlertid inneholder bakterieplasmidene nå antibiotikaresistensgener.

Bakterie species varierer lite over store tidsperioder. *E. coli* og *Salmonella typhimurium* har svært lik fysiologi og genetisk organisasjon. Molekylære studier har vist at de skilte lag i evolusjonen for 120-160 mill. år siden. Med bakgrunn i dette er det imponerende at bakterier raskt kan tilpasse seg miljøforandringer som blant annet inntreden av antibiotika. En mulig forklaring på dette er tilstedeværelse av mobile genetiske elementer herunder plasmider. Kromosomet sikrer genetisk stabilitet, mens mobile gener tillater "eksperimentering" og raske forandringer. Plasmidene synes å kunne fungere som et bibliotek av genetisk informasjon bakteriene kan benytte seg av (6b).

En høy grad av strukturell fluiditet hjelper plasmider i deres rolle som distributører av gener mellom prokaryoter. Rekombinasjon og transposisjon endrer plasmidgenomer og danner stadig nye genotyper. Regioner av plasmid eller kromosomalt DNA kan mobiliseres når det blir omgitt av insersjonssekvenser. Transposisjon kan føre til storskala plasmid-rearrangering. Videre kan plasmidet fusjoneres med andre plasmider eller integreres i kromosomet. Denne strukturelle fluiditeten gjør det mulig å se på et plasmid som en forbigående assosiasjon av informasjonsmoduler trekt ut fra en universelt tilgjengelig genpol (6c).

Materiale

Ved avdeling for mikrobiologi og virologi, UiTø ble det isolert 10 glykopeptid resistente *Enterococcus faecium* (GREF) isolater fra en bonde på tre ulike tidspunkt (høst-1998, vår-1999 og høst-1999) (3b). Isolatene fra høsten 1998 benevnes H98 1 til 10, isolatene fra våren 1999 benevnes V99 1 til 10 og isolatene fra høsten 1999 benevnes H99 1 til 10. Bonden arbeidet på en kyllinggård som var eksponert for avoparcin i perioden fra 1986 til 1995, og som tidligere var undersøkt og funnet positiv for *vanA* GRE. I denne oppgaven er GREF stammer fra denne bonden nærmere analysert. Isolatene er tatt ved å inokulere faeces fra bonden i en enterococcosel buljong med vankomycin (8 mg/L). Etter inkubering over natt ved 37°C ble prøvematerialet sådd ut på en agarskål med vankomycin (6 mg/L). Ti enkeltkolonier fra hver prøve, identifisert som *E. faecium* og resistent mot vankomycin, var plukket ut, frosset ved -70°C og skulle så undersøkes i denne oppgaven.

Metode

Prinsippet og bakgrunnen for hver enkelt metode er beskrevet her. Den detaljerte metodebeskrivelsen kan ses i Appendix A.

Plasmidisolering ved alkalisk lysis metoden

Metoden er basert på å skille kovalent lukket sirkulært (KLS) plasmid DNA fra kromosomalt DNA under alkalisk pH. Kromosomalt DNA er ikke kovalent lukket og blir delt opp i lineære fragmenter under ekstraheringsprosessen. Påfølgende denaturering ved høy pH og rask nøytralisering med natrium- eller kaliumacetat gjør at kromosomalt DNA felles ut mens KLS plasmid DNA holder seg løst. Plasmid DNA kan siden felles ut ved å tilsette alkohol. Metoden er hovedsakelig brukt for gram negative bakterier, men kan modifiseres og brukes på gram positive bakterier. Modifiseringen går ut på å bryte ned celleveggens peptidoglykanlag med lysozym og /eller lysostaphin (4).

Restriksjons-enzym-analyse

Et restriksjonsenzym kutter DNA i sekvensbestemte seter, slik at man får delt DNA opp i flere fragmenter. Ved å kjøre det kuttete DNA på gelelektroforese kan man bestemme størrelsen til de ulike fragmentene. Restriksjonsenzymet *Pst* I kutter transposon Tn1546 i enden av *vanA*. Man får da to fragmenter som inneholder deler av *vanA*, hvor det ene fragmentet inneholder en mindre del (på 57 bp) av *vanA* og hele *vanY-Z* (se figur 1). I denne studien ser vi spesielt etter om dette sistnevnte fragmentet er likt i de ulike prøvene. Et slikt fragment vil inneholde høyre delen av Tn1546 (fig.1) og flankerende bakterie DNA av ulik størrelse avhengig av integrasjonssted for Tn1546. Størrelsen til fragmentene bestemmes ved hjelp av plasmidelektroforese, hvilke fragmenter som inneholder *vanA* og *vanY-Z* bestemmes ved hjelp av hybridisering.

Plasmidelektroforese

Plasmidets migrasjonshastighet i agarosegelen avhenger av plasmidets størrelse og struktur. Graden av migrasjon av superkoilede molekyler er invers proporsjonal til logaritmen av molekylets vekt. Dette forholdet kan brukes til å estimere størrelsen på ukjente plasmider. Man må imidlertid skille mellom ekvivalente topologiske former siden superkoilede plasmider migrerer mye raskere enn åpent sirkulært eller lineære molekyler. Ferske preparater av plasmid DNA er hovedsakelig superkoilet, men dersom det er nukleasekontaminasjon i prøven kan man få relakserte og lineære former. Vanlig agarosegelelektroforese kan ikke skille molekyler som er større enn 20-30 kb. Puls-felt gel elektroforese tillater en oppløsning av DNA-fragmenter på opptil 2000 kb (6d).

Vakuumblotting med vakugene XL system (Pharmacia biotech)

Man ønsker å overføre enkeltrådet DNA fra en gel til en membran. På membranen blir DNA trådene tilgjengelig slik at det kan hybridiseres til en probe. Således kan man bestemme om et bånd inneholder DNA som er komplementært til proben. DNA i gelen må først denatureres slik at man får enkeltrådet DNA. Membranen vil binde enkeltrådet DNA, og man får da overført mønstret av DNA bånd til membranen.

Kontrollert syrebehandling av gelen depurinerer DNA og øker overføring av store DNA-fragmenter (> 10kb) fra gelen til membranfilteret ved Southern blot.

Southern blot hybridisering

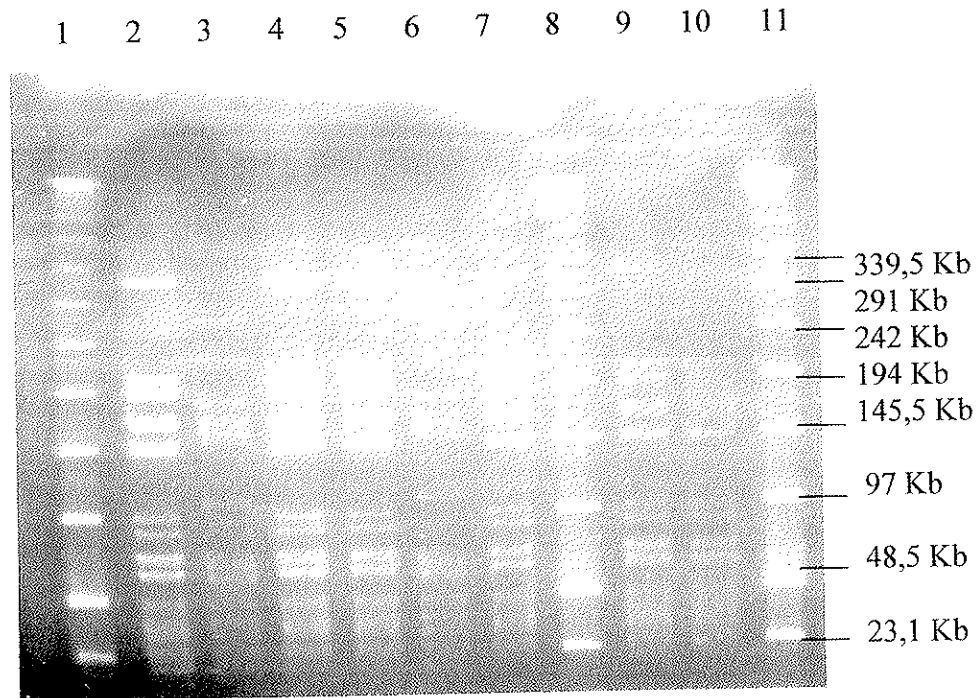
Når et nylonfilter legges på agarosen, adsorberes DNA til filteret og representerer på denne måten en posisjonell kopi av DNA i gelen. Det aktuelle DNA fragmentet kan så detekteres ved å utnytte fragmentets evne til å hybridisere til en DNA probe. Hybridisering er dannelse av dobbeltrådede nukleinsyre ved parring av komplementære baser hos to enkeltrådede molekyler. Prehybridisering preparerer membranen til probehybridisering ved å blokkere uspesifikke nukleinsyrebindingssteder på membranen slik at bakgrunnen blir lavere. DIG-merket probe (DIG = digoxigenin) kan detekteres ved chemiluminescens. DIG Luminescent Detection Kit er et ikke-radioaktivt system som bruker digoxigenin, et steroid hapten, for å merke DNA i hybridiseringen og påfølgende luminescens deteksjon. Dermed kan en gå tilbake til gelen med DNA fragmenter og lokalisere posisjonen til fragmentet som er av interesse (8).

Puls-felt gel elektroforese (PFGE) av enterokokker

I korthet går metoden ut på å støpe hele bakterier inn i en agaroseplugg, og så lysere bakteriene slik at fritt DNA foreligger i agarosepluggen. Deretter kuttes bakteriens DNA med et restriksjonsenzym som har få kuttsteder i DNAet. En del av agarosepluggen appliseres så på gelen. Puls-felt gel elektroforese skiller seg fra vanlig elektroforese ved at det elektriske feltet alternerer mellom to retninger. Valg av ulike pulsprogrammer (lengden på den alternerende elektriske pulsen), kan få både store og små fragmenter godt separert samtidig. Resultatet blir at man med PFGE kan skille mye større fragmenter enn ved vanlig agarosegelelektroforese. Formålet med PFGE er å sammenligne genetisk slektskap mellom ulike bakterieisolater, og se om de kommer i fra samme stamme (klonalt slektskap). For å vurdere slektskap brukes Tenover kriteriene (14). Har isolatene ingen ulike fragmenter er de helt uadskillelige, ved en forskjell på 2-3 fragmenter er de nært beslektet, ved en forskjell på 4-6 fragmenter er de mulig beslektet og ved en forskjell på 7 fragmenter eller mer er de ulike. Disse kriteriene forutsetter at man har minst 15-20 bånd og at isolatene ikke er samlet i en tidsperiode som strekker seg over mer enn ett år. PFGE-resultatene som vises i denne oppgaven er generert av stipendiat Pål Johnsen. Jeg har vært med som observatør for å få en innføring i metoden.

Resultater

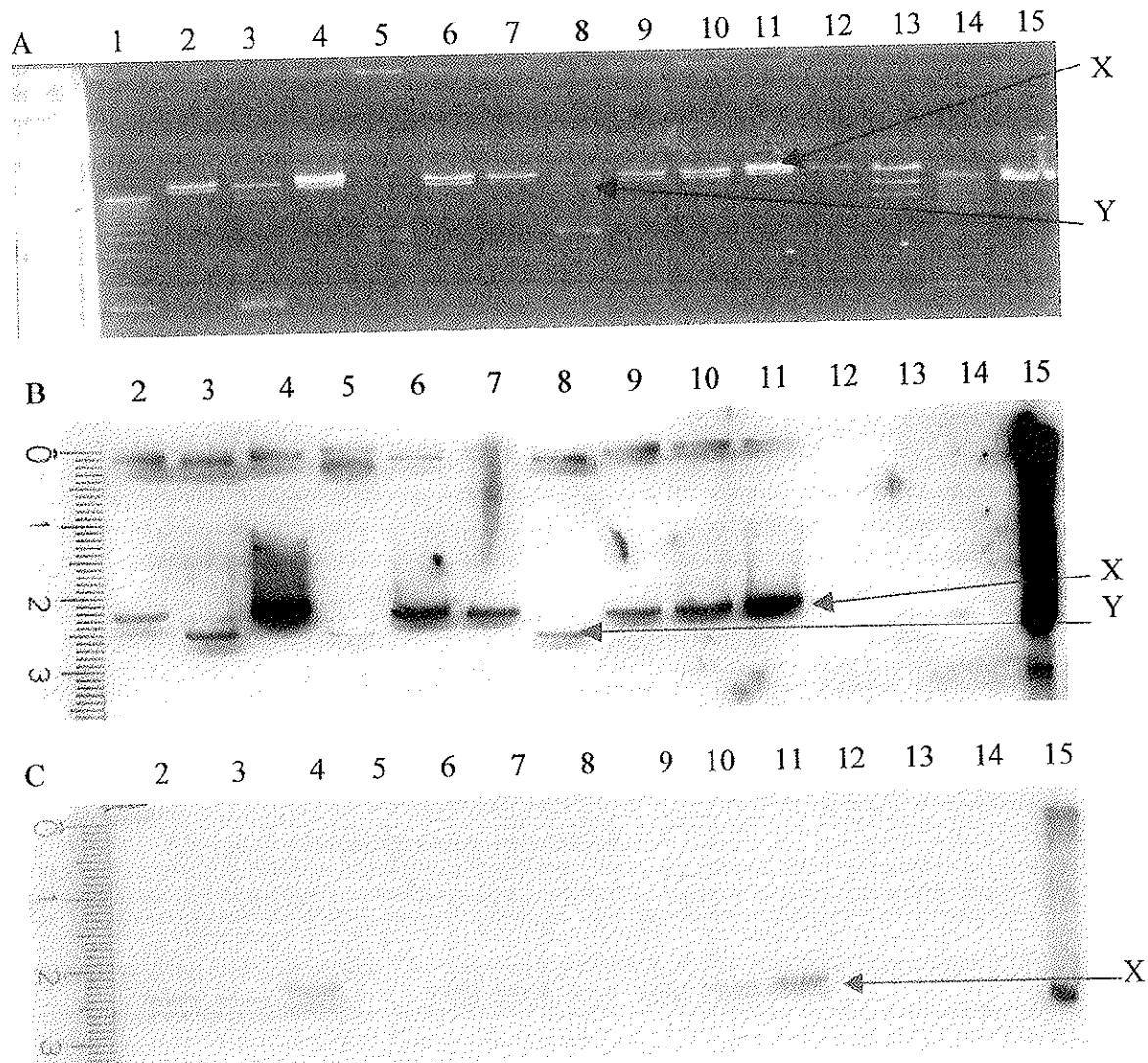
Puls-felt gel elektroforese (PFGE) er utført for hvert av bakterieisolatene, for å kunne vurdere genetisk slektskap mellom *E. faecium*- isolatene.



Figur 2. PFGE av *E. faecium* isolatene V99 3-10, kuttet med restriksjonsenzymet *Sma* I. Bane 1, 8 og 11 inneholder DNA størrelsesmarkør (Low Range PFG Marker NO350S, New England Biolabs), bane 2-7 inneholder isolatene V99 3-8, bane 9 og 10 inneholder isolatene V99 9 og 10.

Fra isolatene V99 1-10 har isolat 2 (Appendix B, figur 4, bane 14), 4 og 7 (figur 2, bane 3 og 6) helt like PFGE-mønstre. Disse er forskjellige fra isolat 1 (Appendix B, figur 4, bane 13), 3, 5, 6, 8, 9 og 10 (figur 2, bane 2, 4-5, 7, 9-10) har helt like PFGE-mønstre. Fra isolatene H98 1-10 (Appendix B, figur 4, bane 2-7, 9-12) og H99 1-10 (Appendix B, figur 6, bane 2-5, 7-8, 10-13), finner man at PFGE mønsteret innad i hvert av prøvetidspunktene er helt like. Kuttemønsteret for isolater fra ulike tidspunkt er helt forskjellige. Dette er forenelig med at det er ulike GRE-populasjoner som koloniserer bonden på ulike tidspunkter. Tenoverkriteriene brukes for å skille stammene (se diskusjon).

Plasmid DNA fra de ulike stammene er analysert. Plasmidene er kuttet med restriksjonsenzymet *Pst* I. Dette enzymet er valgt siden det kutter på kjent sted i *vanA*. Etter kutting med *Pst* I kjøres materialet på gelelektroforese for å skille de ulike fragmentene. DNA overføres fra gelen til en membran ved hjelp av vakuumblooming. De aktuelle DNA fragmentene (*vanA* og *vanY-Z*) ble så påvist ved å hybridisere separat med henholdsvis en *vanA* og *vanY-Z* probe. Ved hjelp av størrelsesmarkører kan man bestemme posisjonen til DNA-fragmentene som *vanA* og *vanY-Z* sitter på. Ut fra dette kan man si om *vanA* og *vanY-Z* sitter på like store genfragmenter hos de ulike stammene. Man kan således (ut i fra en kombinasjon av PFGE-resultater og denne plasmidanalysen) få en indikasjon på om persistens av GRE uten antibiotika seleksjon, skyldes persistens av utvalgte GRE stammer, og /eller persistens av et mobilt genetisk element som bærer *vanA*.



Figur 3. Bane 1 og 14 inneholder DNA størrelsesmarkør (1 Kb DNA-ladder hvor størrelsen på øverste bånd er 12 Kb), bane 2-11 plasmid-DNA fra V99 1-10, bane 12 ukuttet λ (48,5 Kb), bane 13 λ kuttet med *Hind* III (hvor størrelsen på båndene ovenfra og ned er 23,1 Kb, 9,4 Kb og 6,6 Kb), bane 15 XLA (PCR fragment av *Tn1546* som er omtrent 10 Kb stort, er positiv kontroll). A: Gelbilde etter elektroforese av plasmider kuttet med *Pst* I. B: Gelen fra A er blottet og hybridisert med en *vanA* probe. C: Gelen fra A er blottet og hybridisert med en *vanY-Z* probe. X er et fragment i størrelsesorden 20-50 Kb som gir positiv hybridisering i figur B og C, og Y er et fragment i størrelsesorden 10 Kb som gir positiv hybridisering i figur B bane 3, 5 og 8.

Isolatene V99 2, 4 og 7 i bane 3, 5 og 8 har et DNA-fragment på omtrent 10 Kb (figur 3A) som hybridiserer positivt med *vanA* (figur 3B). De øvrige isolatene fra V99 har et DNA-fragment på 20-50 Kb (figur 3A) som hybridiserer positivt med *vanA* (figur 3B). Isolatene 2, 4 og 7 V99 i bane 3, 5 og 8 er innad like PFGE typer, men er forskjellige fra de øvrige isolatene fra V99, som også er innad like. Hos alle isolatene fra V99 (unntatt isolat 4 i bane 5) finner man et DNA-fragment på omtrent 20-50 Kb (figur 3A) som hybridiserer positivt med *vanY-Z* (figur 3C) (signalene er svake, særlig i bane 5, men helt klart synlig på originalbildet). Hos H98 isolatene finner man et DNA-fragment på 20-50 Kb (Appendix B, figur 5A) som hybridiserer positivt med *vanA* (Appendix B, figur 5B) og *vanY-Z* (Appendix B, figur 5C). Man finner også et DNA-fragment i størrelsesorden 7 Kb (Appendix B, figur 5A) som hybridiserer positivt med *vanA* (Appendix B, figur 5B). Hos H99 isolatene finner man et DNA-fragment på omtrent 20-50 Kb (Appendix B, figur 7A) som hybridiserer positivt med

vanA (Appendix B, figur 7B) og *vanY-Z* (Appendix B, figur 7C). Disse analysene viser at *vanA* resistensgenene sitter på store plasmider i GREF-stammene.

Diskusjon

Prøvematerialet er analysert med henblikk på å undersøke nærmere om persistens av GRE uten antibiotikaseleksjon skyldes persistens av enkelte GRE stammer og /eller persistens av et mobilt genetisk element som bærer *vanA* resistens genene.

PFGE analysene viser at det er svært liten heterogenitet i isolater som er hentet fra samme tidspunkt, derimot ses en stor forskjell PFGE-mønsteret mellom isolater hentet fra ulike tidspunkt. Dette indikerer at det er dominerende ulike GRE-stammer på ulike tidspunkter som koloniserer bonden. Eneste unntaket er isolater tatt våren 1999 hvor tre av isolatene har et PFGE mønster som avviker fra de øvrige syv. Disse tre isolatene er imidlertid innbyrdes like. Dette er forenelig med to ulike stammer fra dette tidspunktet. Resultatet viser at GREF-isolater fra ulike tidspunkt ikke synes å ha noe nært genetisk slektskap. Teoretisk kan stammene ha forandret seg i løpet av tiden mellom prøvetakingstidspunktene, slik at de på PFGE fremstår som ulike stammer. Sannsynligheten er imidlertid liten for en så stor endring som er observert i vårt materiale skal skje over det gitte tidsrommet.

Ved *vanA* hybridisering finner man:

- (i) I alle prøvene fra H98 to bånd på henholdsvis 20-50 Kb og 7 Kb.
- (ii) I prøvene fra V99 ett bånd på 20-50 Kb i prøve 1, 3, 5, 6, 8, 9 og 10, og et bånd på omtrent 9,6 Kb i prøve 2, 4 og 7.
- (iii) I prøvene fra H99 ett bånd på omtrent 20-50 Kb i alle prøvene.

Positive bånd ved *vanA* hybridisering bekrefter at *vanA* er lokalisert på plasmid DNA i alle GREF-stammene. Prøvene fra H98 skiller seg klart ut ved å ha to sterke bånd som hybridiserer med *vanA*. En mulig forklaring på dette er at plasmidet inneholder to *vanA* kopier, eller at det finnes 2 ulike *vanA* plasmider. Tn1546 kan spre seg intracellulært ved replikativ transposisjon. To bånd ved *vanA* hybridisering kan også forklares ved at *Pst* I kutter i enden av *vanA* (se figur 1), slik at 57 basepar fra *vanA* henger igjen på det elementet som inneholder *vanY-Z*. Dette båndet skulle gi et svakere signal ved *vanA* hybridisering fordi hybridiseringstarget er svært lite (57 bp).

Som følge av dette skal man ha et bånd som hybridiserer med både *vanA* og *vanY-Z*. Dette stemmer klart med båndet på omtrent 20-50 Kb for alle isolatene unntatt isolat 2, 4 og 7 V99. Disse isolatene har ikke noen klar og tydelig hybridisering med *vanA* på stedet hvor *vanY-Z* båndet på 20-50 Kb ligger.

Prøvene fra V99 og H99 er forenelig med en *vanA* kopi, da disse har bare ett bånd som hybridiserer kraftig med *vanA*. Dersom prøvene ikke gir to bånd med *vanA* hybridisering, kan dette skyldes at det andre elementet med *vanA* er like stort som elementet med *vanY-Z*, og at de dermed blir liggende oppå hverandre. En annen mulighet er at elementet er så lite at det under elektroforesen vandrer ut av gelen.

Ved *vanY-Z* hybridisering av plasmid DNA finner man i alle isolatene et positivt DNA fragment på omtrent 20-50 Kb. Undersøkelsene tillater ikke en mer presis angivelse av størrelse til dette fragmentet siden vanlig agarosegelelektroforese skiller svært dårlig mellom fragmenter som er mer enn 20 Kb store. Dette fragmentet representerer høyre siden for kuttstedet til *Pst* I på Tn1546 (se figur 1) og flankerende bakterie DNA av ulik størrelse avhengig av integrasjonssted for Tn1546 (endefragmentanalyse). Tilstedeværelse av Tn1546

integrert på samme sted i plasmid DNA i ulike stammer vil gi Tn1546-ende-fragmenter av lik størrelse som vist i de ulike GREF-stammene her. Dette er forenelig med et plasmid som går igjen i alle stammene, også de som er klart ulike i PFGE profil.

Oppsummering av resultatene:

PFGE-analyser tyder på variasjon i GREF stammer mellom ulike tidspunkt. Plasmid DNA analyser (ved *vanA* probe) tyder på persistens av plasmider med *vanA*. Tn1546 ende-fragment-analyse (ved *vanY-Z* probe) av plasmid DNA viser et repetert DNA fragment med lik størrelse mellom ulike GREF stammer. Resultatene kan indikere at samme plasmid er til stede i ulike GREF-stammer, og har beveget seg mellom disse. Resultatene må undersøkes videre med andre metoder for å bekrefte eller avkrefte denne hypotesen.

Det er vanskelig å si noe om persistens av enkelte GRE stammer er årsaken til persistens av glykopeptidresistens. Erfaring på labben har i ettertid vist at dersom man tar en prøve og fordeler på ti rør til dyrkning, får man større heterogenitet i stammematerialet, enn om man tar samme prøve og dyrker i ett rør som man så tar 10 prøver fra og analyserer. Analyser av disse funnene pågår.

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt og videre undersøkelser vil bli gjort på andre gårder og viser tilsvarende funn. Det arbeides videre med å identifisere plasmidet som bærer *vanA* resistensgenet.

Jeg vil takke avdeling for mikrobiologi og virologi, UiTø og avdeling for mikrobiologi, UNN for en positiv innstilling til veiledning, bruk og tilrettelegging av utstyr og hjelpelig til faglige og praktiske spørsmål. Spesielt vil jeg takke veileder Arnfinn Sundsfjord for meget god tilrettelegging og svært grundig tilbakemelding underveis i skriveprosessen. Jeg vil også sende en stor takk til Pål Johnsen for meget godt samarbeid på laboratoriet og mange faglige innspill. Til slutt vil jeg sende en ekstra stor takk til alle på laboratorium L9.131, som velvillig har øst av sine dyrekjøpte erfaringer og spart undertegnede for masse tid og frustrasjon.

Litteraturliste

1. MIMS, Playfair, ROITT, Wabelin, Williams.
Medical Microbiology 2. edition. London: Mosby, 1998:
a) s. 407, b) s. 411, c) s. 413, d) s. 47-48, e) s. 17
2. Gunnar Skov Simonsen
VanA-type Glycopeptide Resistant Enterococci in Norway, Reservoirs-Transmission-Persistence. Department of Medical Microbiology University and University Hospital of Tromsø, Norway 2002:
a) s.3
3. Arnfinn Sundsfjord – Project description.
Reversal of Van A glycopeptide resistance in enterococci in the absence of antibiotic selection.
a) s.1, b) s.7
4. Trelfall J., and N. Woodford. 1988. Methods in molecular biology. Diag. Bacteriol. Protocols. 46: 225-236.
5. Warren Levinson, MD, PhD, Ernest Jawetz, MD, PhD,
Medical Microbiology and Immunology, Fifth edition. Stamford: Appleton & Lange 1998:
a) s. 9, b) s. 10
6. David K. Summers
The Biology of Plasmids. Department of Genetics, University of Cambridge, 1996:
a) s. 20-21, b) s. 23-24, c) s. 26, d) s. 15-16
7. Pål J. Johnsen
Stability of vancomycinresistance determinants of VanA type in *Enterococcus faecium* and in vitro studies of competitive fitness between isogenic vancomycin resistant and susceptible *E. faecium*. Department of Medical Microbiology University and University Hospital of Tromsø, Norway 2000:
a) s. 12-14, b) s. 18, c) 16
8. ManiatisT., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press. USA.
9. Bradley D. Jett, Mark M. Huycke, and Michael S. Gilmore
Virulence of Enterococci, Clinical Microbiology Reviews, oct. 1994, P. 462-478.
10. Barbara E. Murray, M.D.
Vancomycin-resistant Enterococcal-infections.
The New. England Journal of Medicine. Mars 9. 2000, 710-721.
11. Niels Høiby
Basal og klinisk mikrobiologi 2. udgave. Århus FADL's Forlag, 1998:
a) s. 75, b) s. 83-84

12. K. Borgen, G. S. Simonsen, A. Sundsfjord, Y. Wasteson, Ø. Olsvik og H. Kruse. Continuing high prevalence of vanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. *Journal of Applied Microbiology* 2000, 89, 478-485.
13. Bouma, J. E., and R.E. Lenski. 1988. Evolution of a bacteria plasmid association. *Nature*, 335: 351-2
14. Fred C. Tenover, Robert D. Arbeit, Richard V. Goering, Patricia A. Mickelsen, Barbara E. Murray, David H. Persing, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 1995, p. 2233-2239.
15. A. Sundsfjord, G. Skov Simonsen and P. Courvalin
Human infections caused by glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp: are they a zoonosis? *European society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 7 (suppl. 4), 16-33

Appendix A

Plasmidisolering ved alkalisk lysis metoden:

Reagenser:

Løsning I - TEG-Lysozyme løsning:

Løs lysozym (20mg/ml) i TEG buffer. Lag alltid fersk løsning. TEG-buffer (50 mM Glucose, 20 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA).

Løsning II – NaOH-SDS løsning:

1 ml løsning (880 μ l dH₂O, 20 μ l NaOH 10M, 100 μ l SDS 10% blandet i den oppgitte rekkefølge. Løsningen må alltid være fersk.

Løsning III

5 M Na acetat	60 ml
glacial acetic acid	11,5 ml
H ₂ O	28,5 ml

Prosedyre:

1. Innokuler 5ml BHI løsning med en koloni fra den aktuelle stammen. Dyrkes over natt ved 37°C under konstant røring.
2. Hell 1,5 ml av celleløsningen i et Eppendorfrør og sentrifuger ved 13.000 omdreininger per min. 3 min ved romtemperatur. Hell av supernatanten og gjenta dette trinnet med nye 1,5 ml av celleløsningen i samme Eppendorfrør.
3. Løs pelleten i 100 μ l av løsning I (TEG-Lysozyme buffer 20 mg/ml). Inkuber ved 37°C i en time i vannbad.
4. Tilsett 200 μ l av løsning II (NaOH-SDS). Lukk Eppendorfrøret og vend røret forsiktig fire ganger. La røret stå 5 min. på is.
5. Tilsett 150 μ l av løsning III (kaliumacetat). Lukk Eppendorfrøret og rist forsiktig. Dersom det er store plasmider (> 20-30 kb) bør man unngå å riste, bland ved å vende røret raskt fem ganger. La røret stå 10 min. på is.
6. Sentrifuger Eppendorfrøret i 5 min. ved 13.000 omdreininger per min. Overfør supernatanten til et annet rør.
7. Tilsett 200 μ l TE-mettet fenol og 200 μ l kloroform. Bland godt ved å riste. Dersom det er store plasmider, bland ved å vende røret raskt fem ganger. Sentrifuger 3 min. ved 13.000 omdreininger per min. Overfør 350-400 μ l av supernatanten til et nytt rør. Gjenta dette trinnet og overfør 300-350 μ l av supernatanten til et nytt rør. Unngå å få med interfasen.

8. Tilsett 800 μ l 100% etanol som holder romtemperatur og rist. Sentrifuger i 5 min. 13.000 omdreininger per min. ved romtemperatur.
9. Hell av supernatanten. Unngå å miste pelleten.
10. Tilsett 1 ml 70% etanol som holder romtemperatur og vask pelleten ved riste røret kraftig.
11. Sentrifuger Eppendorfrøret i 5 min. 13.000 omdreininger per min. ved romtemperatur. Fjern supernatanten forsiktig. Tørk pelleten under vakuum 5-10 min. eller lufttørke i 30 min.
12. Løs pelleten i 20- (50) μ l (avhengig av kopinummeret) TE buffer med DNase-fri RNase (Rnase Dnase free Roche Boehringer, 500 μ g/ml) i 30-60 min.

Restriksjons-enzym-analyse:

Kutt en time med det foretrekte enzymet (Pst I) (8,0 μ l DNA, 5 μ l dH₂O, 1,5 μ l restriksjonsbuffer og 0,5 μ l enzym i hvert rør). Lag en felles løsning av dH₂O, restriksjonsbuffer og enzym for å redusere sannsynligheten for å gjøre volum feil ved pipetering av små volumer.

Plasmidelektroforese:

Reagenser:

0,5 x TBE – Buffer
Agarose
Ethidiumbromid

0,8% gel:

0,32 g. agarose tilsettes 40 ml 0,5 x TBE, varmes i mikrobølgeovn til koking, tas ut og tilsettes ethidiumbromid 0,5 μ l/10ml. Hell løsningen i gelform og la stå til herding i 30 min.

Vakuumblotting med vakugene XL system:

Prosedyre:

Legg gelen i 0,5 x TBE buffer, appliser prøvematerialet ned i brønnene.
Kjør gelen 1 time på 9V/cm.

Reagenser:

- I. Depurineringsløsning: 0,25 M HCl

- II. Denatureringsløsning: 1,5 M NaCl,
0,5 M NaOH
- III. Nøytraliseringsløsning: 1,0 M Tris-Base,
1,5 M NaCl
- IV. Overføringsløsning: 20 x SSC

Apparatur:

VacuGene TM XL fra Pharmacia Biotech
Vakuumpumpe
UV-crosslinker

Utstyr:

Nylonmembran med positiv ladning (Boehringer Mannheim)
Vakuumblokk
Støtteplate
Plastikkmaske

Prosedyre:

1. Vakuumblokk-enheten skal være ren og tørr og klar til bruk med pumpe montert.
2. Den porøse støtteplate fuktes godt i deionisert vann. Plasser den i blokket med den blanke siden opp.
3. Klipp ut en passende størrelse på membranen. Bruk hansker. Det er viktig å ta minst mulig på membranen, ellers setter det merke. Preparer masken slik at overlapping av vinduet og gelen er mellom 3-10 mm.
4. Plasser membranen på den porøse støtteplate. Legg maske over membranen med en overlapp på ca. 5mm. Pass på at det ikke er luftbobler mellom membranen og den porøse plate.
5. Legg gelen over membranen, slik at brønnene er i kant med vinduet. Pass på at det ikke er luftbobler mellom gelen og membranen. Små sprekker i gelen må tettes med agarose for å få en god forsegling.
6. Sett på topprammen og fest den med klemmer.
7. Depurinering: Tilsett ca. 50 ml (avhengig av gelstørrelsen) av løsning I ved hjelp av en pipette midt på gelen. Start vakuumpumpe og still den inn på 50 mbar. Gelen må alltid være dekket av løsning når pumpe står på. Innkuber i 20 min. Benytt de sammenleggbare beina på karet slik at blokket heller. Væsken på gelen strykes forsiktig av, og løsningen fjernes vha. pipette eller vakuumpumpe.
8. Denaturering: Tilsett ca. 50 ml av løsning II på samme måte som pkt. 7. Innkuber i 20 min. Fjern løsningen som beskrevet over.

9. Nøytralisering: Tilsett ca. 50 ml av løsning III på samme måte som pkt. 7. Innkuber i 20 min. Fjern løsningen som beskrevet over.
10. Overføring: Hell løsning IV på gelen slik at den dekker gelen med ca. to ganger dens tykkelse. Pass på når du heller løsningen på gelen, slik at den ikke løfter seg. Innkuber i 60 min. Pass på at gelen er dekket av løsning under overføringen. Fjern løsningen.
11. Slå av pumpa, merk brønnene med blyant og fjern gelen.
12. Vask membranen i løsning IV i 10 min. for å fjerne agarose. La membranen tørke i 30 min.
13. Til slutt fikseres DNA til membranen ved UV-crosslinking (150 mJoule). Membranen renses deretter i dest. vann og lufttørkes. Membranen lagres ved 4°C innpakket i aluminiumsfolie.
14. For å evaluere overføringen av DNA til membran kan gelen på nytt med ethidiumbromid og sjekkes i UV-lys. (8)

Southern blot hybridisering:

Prosedyre:

1. Forvarm hybridiseringsovnen (Hybaid) til 68°C og forvarm samtidig 20 ml prehybridiserings-løsning (5 x SSC, 0,1% N-lauroylsarcosine (w/v), 0,02% SDS (w/v), 1% blokkeringsløsning). Sett membranen i prehybridisering i 1-2 timer i hybridiseringsrør. Sjekk at membranen ligger riktig vei i røret i forhold til roteringa av røret, ellers "kollapser" den.
2. Kok probeløsninga ca. 10 min. Fjern prehybridiseringsløsninga og tilsett probeløsninga til membranen i røret. Innkuber over natt ved 68°C i hybridiseringsovnen 16-20 timer.
3. Posthybridiseringsvask: Vask 2 x 5 min. med 100ml 2 x stringensbuffer (2 x SSC, 0,1% SDS) ved 68°C. Vask 2 x 15 min. med 100 ml 0,5 x stringensbuffer (0,5 x SSC, 0,1% SDS) ved 68°C (forvarm løsningen). Alt kan gjøres i hybridiseringsrør, men ved bakgrunnsproblemer vask i brett.

Immunologisk deteksjon

4. Vask membranen raskt (5 min.) i vaskebuffer (0,1 M maleinsyre, 0,15 M NaCl, pH7,5, Tween 20 (v/v) 0,3%) ved romtemperatur.
5. Innkuber i 30 min. i 100 ml 1 x blokkeringsløsning i maleinsyrebuffer (0,1 M maleinsyre, 0,15 M NaCl, pH 7,5). Dvs. 10 ml 10 x blokkeringsløsning i 90 ml maleinsyrebuffer ved romtemperatur.

6. Innkuber 30 min. i 20 ml av 1:10 000 fortynning av anti-DIG-AP konjugat i blokkeringsløsning. Dvs. 1 μ l anti-DIG-AP per 10 ml 1 x blokkeringsløsning.
7. Skift vaskekar. Vask 2 x 15 min. i 100 ml vaskebuffer.
8. Ekvilibrer 2-5 min. i 20 ml deteksjonsbuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 NaCl, pH 9,5).
9. Legg membranen i hybridiseringsposen og drypp 6-7 dråper (1 ml) CSPD over. Lukk posen og spre væsken utover. Unngå luftbobler. Inkuber i 5 min. og stryk over med papir slik at overskuddsvæske kommer ut. Forsegle posen.
10. Innkuber membranen ved 37°C (varmeskap) i 5-15 min. for å fremme luminescent reaksjonen.
11. Eksponering: Tape fast membranen til fotoplata. På mørkerommet klippes Lumi-film Chemiluminescent detection film tilpasset membranen. Eksponeringstida varierer, evt. 15-30 min. ved romtemperatur. Legg i fremkallingsmaskinen. Dersom svake signaler, eksponer over lengre tid.

Stripping av membranen

12. Vask membranen raskt i dH₂O.
13. Vask i 2 x 15 min. med forvarmet strippeløsning ved 37°C for å fjerne DIG-merka probe.
14. Vask grundig i 2 x SSC (2 x 15 min.).
15. Prehybridiser og hybridiser med ny probe. (8).

PFGE av enterokokker:

Reagenser:

PIV-buffer:

0,01 M Tris-HCl, pH 7,6
1 M NaCl

TE-buffer:

0,01 M Tris-HCl, pH 8,0
0,001 M EDTA

Basisbuffer:

0,1 M EDTA, pH 8,0

0,06 M Tris-HCl, pH 8,0
1 M NaCl
0,5% Brij 58

Mutanolysin:

10 000 U løses i 1 ml ddH₂O
Fryses i porsjoner a 40 µl

Lysisbuffer (til 10 plugger): Lages fersk på bruksdagen!

Basisbuffer	10 ml
Deoxycholate 0,2%	0,02 g
N-laurosylysarcosine, Sodiamsalt 0,5%	0,05 g
Lysozyme 1 mg/ml	0,01 g
RNAse ONE	1 µl
Mutanolysin (10 U/µl)	40 µl

Proteinase K-stock:

100 mg Proteinase K løses i 10 ml 50 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM CaCl₂
Fryses v/ -20°C i passe porsjoner

ESP-buffer:

0,5 M EDTA pH 9-9,5
1% Na-lauryl sarcosine

10 x TBE-buffer med pH 8,0:

Tris base	108 g/l
Borsyre	55 g/l
EDTA	9,3 g/l

Komponentene løses i sterilt vann til totalt 1 l.

Apparatur:

Innova 4000 ristemaskin/inkubator
CHEF-DR III styringsenhet/CHEF-DR II styringsenhet
Elektroforesekammer
Kjøleenhet
Regulerbar hastighetspumpe
Fotoapparat / Gel Doc

Prosedyre:

A. Preparering av PFGE plugger

1. Inokuler kolonier fra en over natt-dyrkning på blodagar til 5 ml BHI-medium. Resuspender med en pasteurpipette. Innkuber over natt ved 37°C, på rising.
2. Overfør 2,5 ml av bakteriesuspensjonen til et falconrør, og sentrifuger ved 3500 rpm. i 10 min.

3. Fjern supernatanten med en pasteurpipette, og resuspender pelleten i 1 ml PIV-buffer.
4. Overfør 150 μ l av blandingen til et eppendorfrør, og ekvilibrer ved 50°C (vannbad).
5. Bland suspensjonen godt med 70 μ l 3,2% LMP agarose(0,32g agarose + 10 ml 0,5 x TBE) som er kokt opp og ekvilibrert til 50°C (sluttkonsentrasjon: 0,8% LMP). Vær nøye med at suspensjons- blandingen og agarosen blir skikkelig blandet, bruk vortekser! Støp en plugg ved å bruke plugg- støpeformen. La pluggen stivne ved å la den stå ved 4°C i ca 15 min. (Velger å blande bakteriene med 70 μ l agarose, da vi vet at mye av agarosen sitter igjen i pipettespissen. Det korrekte volumet er 50:1).
6. Overfør pluggen til et eppendorfrør med 1 ml lysisbuffer. Innkuber over natt ved 37°C.
7. Fjern lysisbufferen, og vask pluggen med 1 ml ddH₂O.
8. Innkuber pluggen i 50 μ l/ml proteinase K-løsning (1 ml ESP-buffer tilsatt 5 μ l proteinase K stock) over natt ved 50°C (vannbad).
9. Vask pluggen i 1 ml TE-buffer i 30 min ved romtemperatur og forsiktig risting x 3. Ved 2. vask tilsettes 2 μ l 0,5 M Pfa-block SC i TE-bufferen for å hemme eventuelle rester av proteinase K. Pfa-block hemmer serin proteaser ved kovalent binding.
10. Dersom pluggen skal lagres, overføres den til et merket eppendorfrør med 1 ml fersk TE-buffer. Pluggen lagres ved 4°C.

B. Restriksjonsenzymkutting av DNA og gelelektroforese

1. Kutt av omtrent en 1/8-del av pluggen og plasser den i et eppendorfrør.
2. Lag restriksjonsezymmixen. 20 U Sma I per 125:1 total enzym-mix. Promega (10U/:l)

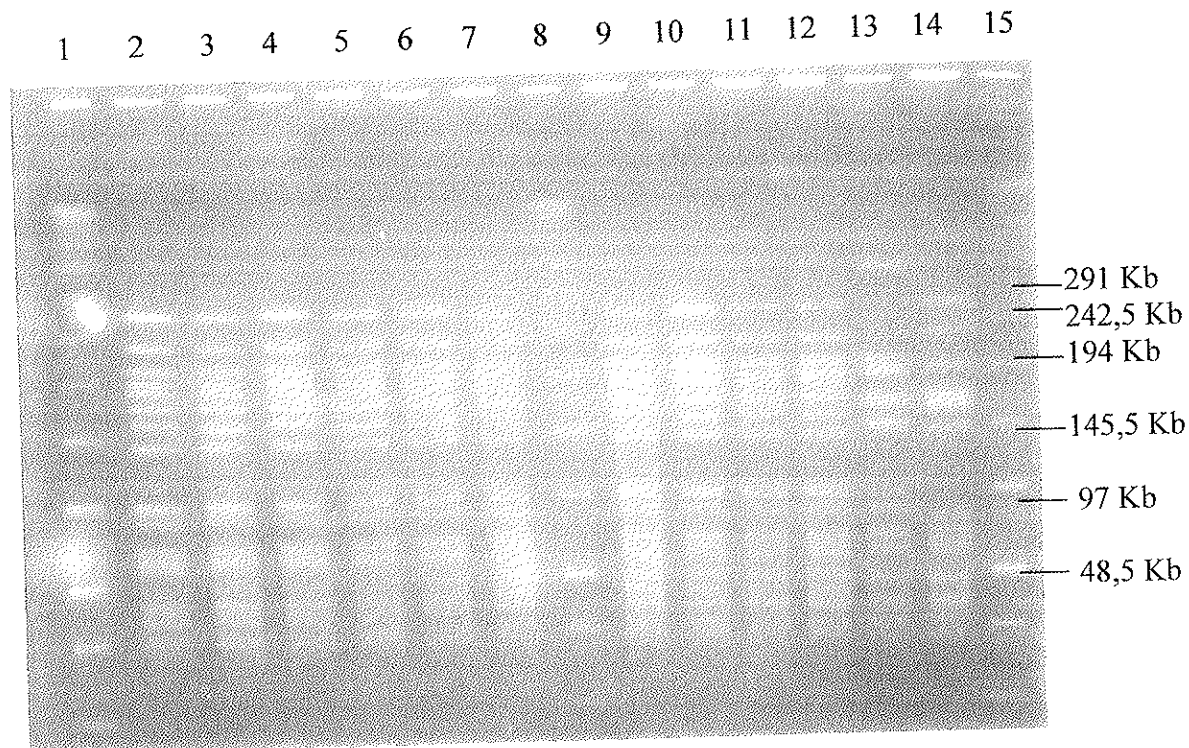
Totalmix til 13 plugger:	125:1 x 13 = 1625	:1
Buffer 10 x : 12,5 :l x 13 =		162,5 :1
20 U Sma I: 20 U x 13 = 260 U \Rightarrow 260:10 =		26 :1
ddH ₂ O		1436,5 :1

Tilsett 125 μ l av restriksjonsezymmixen til den avskårne pluggdelen, og innkuber ved romtemperatur over natt på forsiktig risting.

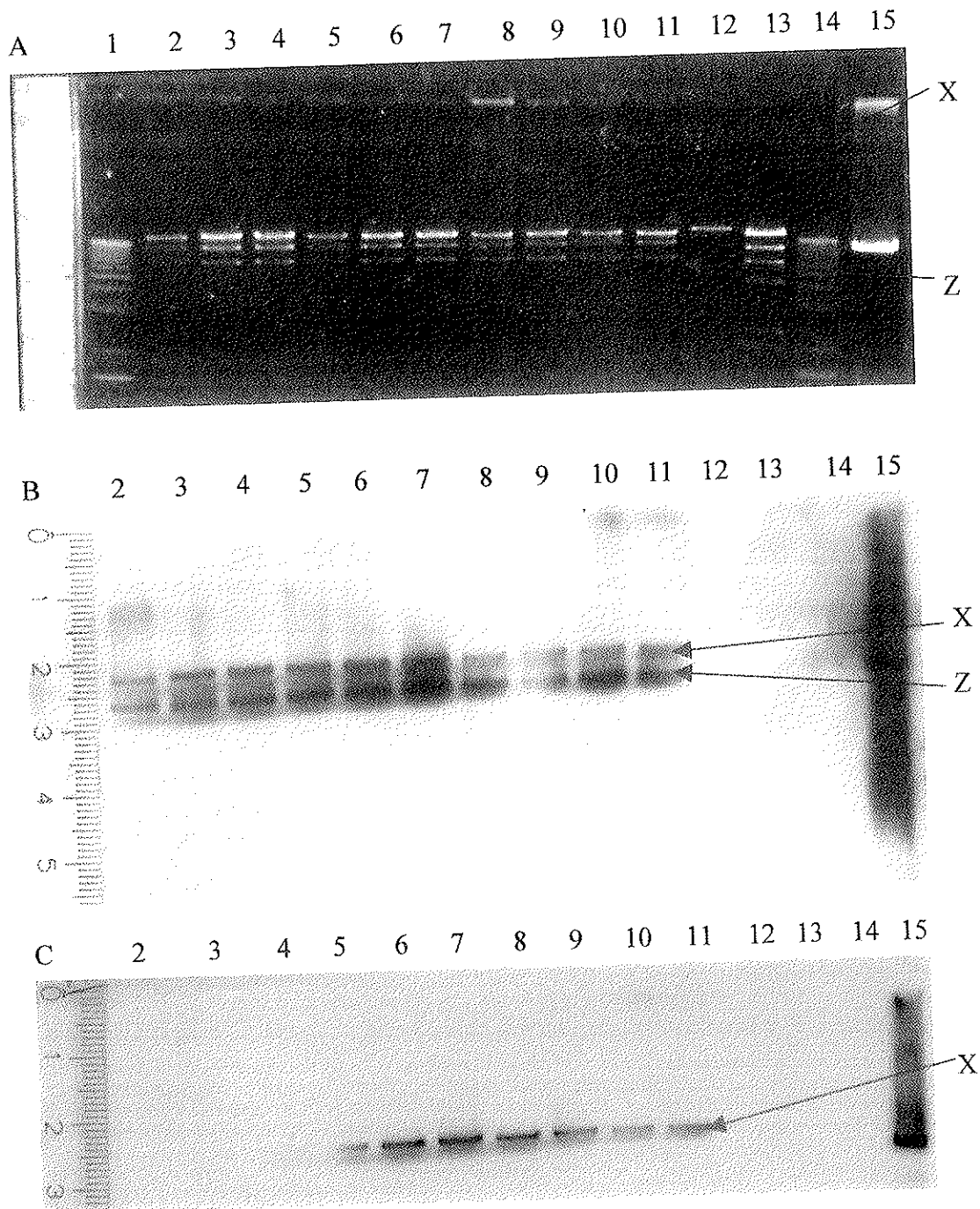
3. Løs 1,2% agarose i 0,5 x TBE buffer (dvs. 1,2 g agarose + 100 ml 0,5 x TBE), 100 ml agaroseløsning per gel, og la agarose løsningen avkjøles til 50-60°C (vannbad). Vær obs på at litt av agarosen skal være igjen til å forsegle brønnene.

4. Monter sammen gelformen med plattformen, sett på plass kammen og sjekk at formen er i vater. Fyll formen med nesten all den avkjølte agaroseløsningen. La gelen stivne (tar omtrent 30 min. ved romtemperatur). Resten av agaroseløsningen plasseres i vannbad ved omtrent 50-60°C.
5. Fyll elektroforesekammeret med omtrent 2 l 0,5 x TBE buffer (1,8 l er nok når sirkulasjonsslangene allerede er fylt med buffer). Skru på buffersirkulasjonen og la bufferen avkjøles til 12°C. Sjekk at kammeret er i vater.
6. Ved hjelp av spatel, plasser den avskårne delen av agarosepluggen mot fronten av brønnen og skyv den helt ned i bunnen. Forsegl brønnen med resten av 1,2% agaroseløsningen. Pass på å unngå luftbobler i brønnen. La gelen stå 10 min. ved 4°C.
7. Fjern all løs agarose som finnes rundt og under plattformen. Agarosebiter vil kunne føre til at sirkulasjonsslangene og kjøleenheten tettes. Trykk kjør plattformen med gelen ned i rammen i elektroforesekammeret. Programmer og kjør elektroforese.
Programparametrene er:

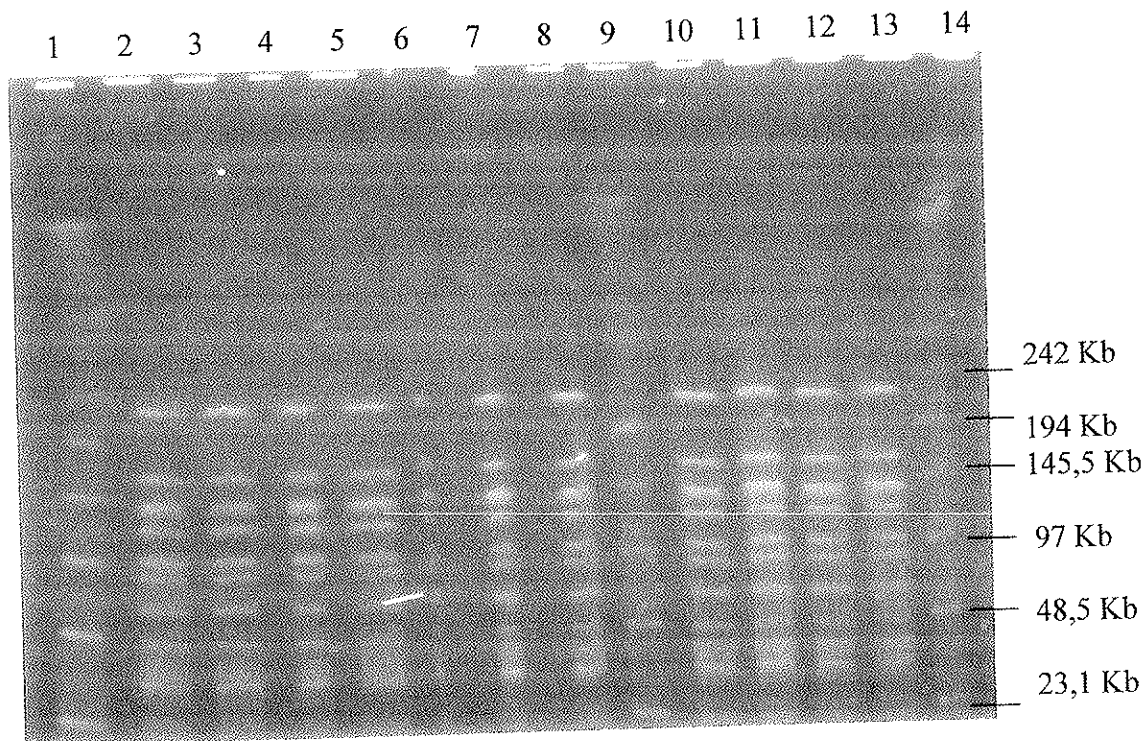
Pulstider:	1-35 s.
Total kjøretid:	30 t
Volt:	6,0 V/cm.
Vinkel:	120°
Buffertemp:	12°C
Agarosekons.:	1,2%
Gel running buffer:	0,5 x TBE
8. Når programmet er ferdig, tas gelen og plattformen opp av elektroforesekammeret og gelen plasseres i et EtBr-bad (500 ml deionisert H₂O + 50 µl EtBr 10 mg/ml). La gelen farges i 1 time og deretter avfarg den i 1 time (eller over natt) i deionisert H₂O. Fotografer gelen.
9. Straks elektroforesen er ferdig og agarosegelen er fjernet fra elektroforesekammeret, la all bufferen renne ut av bufferslangen foran. Tørk opp all resterende buffer i karet med papirtørkle (vær forsiktig med elektrodene). Dette er nødvendig for at bufferrester ikke skal tørke inn og samle seg opp i kammeret.

Appendix B

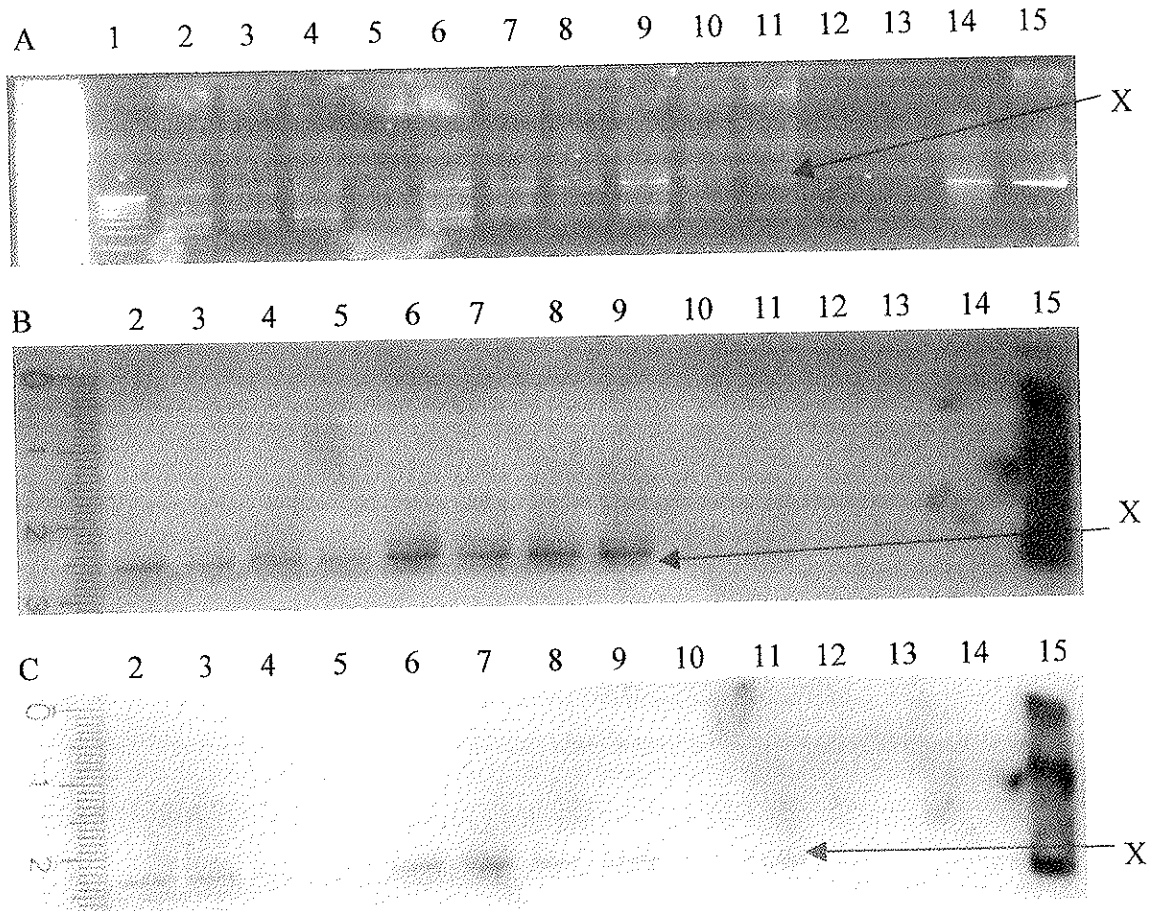
Figur 4. PFGE av *E. faecium* isolatene H98 1-10 og V99 1-2, kuttet med restriksjonsenzymet *Sma* I. Bane 1, 8 og 15 inneholder DNA størrelsesmarkør (Low Range PFG Marker, N.E. Biolabs, NO350S), bane 2-7 inneholder isolatene H98 1-6, bane 9-12 inneholder isolatene H98 7-10, bane 13 og 14 inneholder isolatene V99 1-2.



Figur 5. Bane 1 og 14 inneholder DNA størrelsesmarkør (1 Kb DNA Ladder hvor størrelsen på øverste bånd er 12 Kb), bane 2-11 plasmid DNA fra H98 1-10, bane 12 ukuttet λ (48,5 Kb), bane 13 λ kuttet med *Hind* III (hvor størrelsen på båndene ovenfra og ned er 23,1 Kb, 9,4 Kb, og 6,6 Kb), bane 15 XLA (PCR fragment av *Tn1546* som er omtrent 10 Kb stort, positiv kontroll). A: Gelbilde etter elektroforese av plasmider kuttet med *Pst* I. B: Gelen fra A er blottet og hybridisert med en *vanA* probe. C: Gelen fra A er blottet og hybridisert med en *vanY-Z* probe, bane 2 og 3 gir dårlig synlig resultat da denne delen av membranen gled ut av probeløsninga ved hybridisering (originalbildet viser synlige signaler også i bane 2 og 3). X er et fragment i størrelsesorden 20-50 Kb og Z er et fragment i størrelsesorden 7 Kb.



Figur 6. PFGE av *E. faecium* i isolatene H99 1-10, kuttet med restriksjonsenzymet *Sma* I. Bane 1,9 og 14 inneholder DNA størrelsesmarkør (Low Range PFG Marker NO350S, New England Biolabs), bane 2-5 inneholder isolatene H99 1-4, bane 6 feil, bane 7 og 8 isolatene H99 5-6 og bane 10-13 isolatene H99 7-10.



Figur 7. Bane 1 og 14 inneholder DNA-størrelsesmarkør (1 Kb DNA ladder hvor størrelsen på øverste bånd er 12 Kb), bane 2-11 plasmid DNA fra H99 1-10, bane 12 ukuttet λ (48,5 Kb, ikke synlig), bane 13 λ kuttet med *Hind* III (hvor størrelsen på båndene ovenfra og ned er 23,1 Kb, 9,4 Kb og 6,6 Kb) og bane 15 XLA (PCR fragment av *Tn1546* som er omtrent 10 Kb, positiv kontroll). A: Gelbilde etter elektroforese av plasmider kuttet med *Pst* I. B : Gelen fra A er blottet og hybridisert med en *vanA* probe (bane 10 og 11 er synlige på originalbildet). C: Gelen fra A er blottet og hybridisert med en *vanY-Z* probe (bane 5 og 10 er synlige på originalbildeet). X er et fragment i størrelsesorden 20-50 Kb.