SPA-TYPING AV STAMMER AV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FRA BLODKULTURER ANALYSERT VED UNN TROMSØ 2007-2008

5. årsoppgave, stadium IV,
Profesjonsstudiet i Medisin, Universitetet i Tromsø

Student: Anette Midtgard, kull 06
e-post: anettemi@hotmail.com

Veiledere:

Johanna U. Ericson Sollid, professor, leder av Forskningsgruppe for vert-mikrobe-interaksjoner HMI
Institutt for medisinsk biologi, Det helsevitenskapelige fakultet, UiT

Anne-Sofie Furberg, dr.med, epidemiolog, prosjektleder Tromsø staf- og hudstudien
Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN
Institutt for samfunnsmedisin, Det helsevitenskapelige fakultet, UiT

Tromsø, dato 20.08.11

Innhold

1 Sammendrag....3
2 Introduksjon/bakgrunn....4
2.1 Stafylokokkinfeksjon....4
2.2 Bærerskap av *S. aureus*....5
2.3 Nosokomiale *S. aureus*-infeksjoner....10
2.5 Staphyloccus protein A-genet....12
2.6 Tromsø staf- og hudstudien....13
2.7 Mål for oppgaven....14
3 Materialer og metoder....15
3.1 Materialer....15
3.2 Metoder....18
4 Resultater....22
4.1 *spa*-PCR og gel elektroforese....22
4.2 *S. aureus spa*-typer og *spa*-repats....22
4.3 BURP clustering....24
4.4 Sammenfall av *spa*-typer....24
4.5 Klonalt slektskap av *spa*-typer....26
5 Diskusjon....28
5.1 *S. aureus spa*-typer og *spa*-repeats....28
5.2 Isolatet som ikke lot seg *spa*-type....28
5.3 Frekvens av *spa*-typer....29
5.4 Sammenfall av *spa*-typer....30
5.5 Konklusjon....31
6 Tabeller....32
7 Figurer....38
8 Referanser....46

1 Sammendrag

Bakgrunn

Staphylococcus aureus er et av de vanligste patogenene som kan skape sykdom hos mennesket. Mange av oss er bærere av bakterien i nese eller hals, og det er vist at persisterende bærere har høyere risiko for å utvikle *S. aureus*-infeksjoner enn andre. De fleste *S. aureus*-infeksjonene blant bærere er forårsaket av pasientens egen bakteriestamme.

Materiale og metode

140 blodkulturisolater fra pasienter med *S. aureus* bakteriemi analysert ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø i år 2007 og 2008 ble *spa*-typet og analysert ved BURP, for å undersøke bakterieisolatenes populasjonsstruktur. Man sammenliknet så med populasjonsstrukturen av *S. aureus*-bærerisolater fra en generell befolkning fra Tromsø kommune.

Resultater

Man fant 80 ulike *spa*-typer i blodkulturisolatene av *S. aureus.* De hyppigste *spa*-typene var t084, t012, t002, t015 og t065. Fem nye *spa*-typer ble funnet. 29 *spa*-typer fra blodkulturisolater kunne man ikke gjenfinne i bærerisolatene fra en generell befolkning. Ved BURP-analyse kunne man se slektskap mellom disse og bærerisolatene.

Diskusjon

Alle de hyppigste *spa*-typene blant bærere fant man igjen i blodkulturisolatene. De hyppigste *spa*-typene fra blodkultur fant man også igjen blant bærerisolatene. Man kunne ikke se noen stor forskjell i *S. aureus* populasjonsstruktur mellom blodkulturisolater fra pasienter fra Tromsø kommune og bærerisolater fra en generell befolkning innenfor samme kommune. Et lite blodkulturmateriale er imidlertid en svakhet ved oppgaven.

2 Introduksjon/bakgrunn

2.1 Stafylokokkinfeksjon

Staphylococcus aureus er en av de vanligste årsakene til bakterielle infeksjoner blant pasienter i og utenfor sykehus, og påvises ved opptil halvparten av alle hud- og bløtdelsinfeksjoner (1).

Foruten hud- og bløtdelsinfeksjoner som subkutane abscesser, impetigo, furunkler og follikulitt kan *S. aureus* også forårsake alvorligere infeksjoner som staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), toksisk sjokksyndrom (TSS), septisk artritt, pneumoni, endokarditt og sepsis (2, 3).

S. aureus er en av de vanligste patogenene som forårsaker bakteriemi (4). Globalt sett er *S. aureus* det nest vanligste patogenet som forårsaker bakteriemi. I europeisk sammenheng er *S. aureus* det vanligste patogenet bak nosokomial bakteriemi (4). I 2009 var *S. aureus* det tredje vanligste patogenet i blodkultur i Norge (10,6 %), etter koagulasenegative stafylokokker (22,3 %) og *Escherichia coli* (23,0 %) (5).

Forekomsten av både samfunnservervede og sykehuservervede infeksjoner forårsaket av gule stafylokokker har økt og øker jevnt. Behandling av disse infeksjonene vanskeliggjøres av økende resistens hos bakteriene (6).

Meticillinresistent S. *aureus* (MRSA) ble for første gang rapportert i 1961 (7). I en meta-analyse av Safdar et al. fant man at pasienter kolonisert med MRSA hadde 4 ganger høyere sannsynlighet for å utvikle invasiv *S. aureus*-infeksjon sammenliknet med pasienter som var koloniserert med meticillinsensitiv *S. aureus* (MSSA) (8).

Det første kliniske isolatet av *S. aureus* med redusert følsomhet for vancomycin ble rapportert i 1997 (9), og i 2002 ble det første kliniske isolatet av vancomycin-resistent *S. aureus* (VRSA) identifisert (10).

2.2 Bærerskap av *S. aureus*

Sammenhengen mellom nesebærerskap av *S.aureus* og stafylokokksykdom

ble først rapportert av Danbolt i 1931. Siden den tid har flere studier bekreftet Danbolts funn. *S. aureus* koloniserer hud og slimhinner hos mennesker og mange dyrearter. Vestibulum nasi koloniseres hyppigst, men også hud, perineum og pharynx er hyppige koloniseringssteder for *S. aureus*. (2)

2.2.1 Nesebærerskap

Vestibulum nasi har blitt sett på som den primære koloniseringsnisjen for *S. aureus* (11).

Mekanismer bak nesebærerskap

Kolonisering av *S. aureus* av vestibulum nasi kan ses på som et resultat av tiltrekkende og frastøtende krefter. For å bli nesebærer av bakterien må fire forutsetninger være oppfylt. For det første må nesen komme i kontakt med *S. aureus*. For det andre må *S. aureus* binde seg til reseptorer i nesen. For det tredje må bakterien være istand til å unndra seg vertsforsvaret for å kunne overleve i nesen, og til sist må den være istand til å forplante seg og vokse i nesen (2).

Hvilke faktorer som gjør at *S. aureus* foretrekker nesen som koloniseringsnisje er ikke forstått fullt ut. I en oversiktsartikkel fra 2001 ser Peacock et al. på hvilke faktorer hos vert og bakterie som er bestemmende for nesebærerskap av *S. aureus* (12):

Faktorer hos verten:

Vestibulum nasi er den dominerende koloniseringsnisjen for *S. aureus*. Epitelet i vestibulum nasi består av flerlaget keratinisert ikke-ciliert epitel. *S. aureus* kan binde til dette epitelet direkte, eller via bestanddeler i mucus eller serum assosiert til epitelcellene. Bakterieadherens er sterkere til modne epitelceller med høyere keratiniseringsgrad enn til lavere modningsgrader dypere i epidermis. Muciner synes også forsterke binding av *S. aureus* til epitelcellene i vestibulum nasi, da bakterien binder sterkere til epitelceller

dekket av mucin enn epitelceller som ikke er dekket av mucin.

Variasjon i fenotype i vestibulum nasi hos verten har blitt beskrevet, der nesesekret fra noen bærere manglet antimikrobiell aktivitet mot *S. aureus* in vitro, mens nesesekretet fra ikke-bærere var baktericidalt (13). En studie har også vist at *S. aureus* lettere binder seg til avstøtte epitelceller fra bærere enn fra ikke-bærere (14).

Individuell immunrespons kan bidra til å påvirke bærerstatus. Muligens kan lokal immunoglobulin A (IgA) immunrespons spille en rolle. Det at bærerfrekvenser av *S. aureus* er høyere hos grupper av immunkompromitterte pasienter, som for eksempel HIV-pasienter og pasienter med insulinbehandlet diabetes mellitus enn hos friske, kan også indikere at immunforsvaret påvirker bærerstatus (12).

Faktorer hos mikroben:

Selv om det ikke eksisterer noen konsensus om hvilke faktorer som medierer binding av *S. aureus* til epitelceller i nesen, mener man at blant annet adhesiner, hydrofobiske interaksjoner, overflatespenninger, fibronektinbindende protein, fibrinogenbindende protein, kollagenbindende protein, cell wall teichoic acid, lipoteichoic acid og kapsulære polysakkarider kan være involvert (12, 15).

Bakteriens koloniseringsevne påvirkes også av andre bakterier. Når en økologisk nisje som vestibulum nasi allerede er okkupert av andre bakterier, klarer ikke *S. aureus* å etablere en lokal populasjon. Denne bakterielle konkurransen kan være én forklaring på status som ikke-bærer av *S. aureus* (16).

Inndeling av nesebærerskap

Det har vært vanlig å skille mellom tre ulike typer nesebærerskap av *S. aureus:* persisterende bærere (cirka 20 %), intermitterende bærere (cirka 30 %) og ikke-bærere (cirka 50 %) (2, 15, 17).

I motsetning til persisterende bærere som koloniseres av samme *S. aureus*-stamme over tid, koloniseres de intermitterende bærerne med ulike stammer (2, 18, 19).

Van Belkum et al. fant at persisterende nesebærere av *S. aureus* har høyere risiko for infeksjon med bakterien, mens intermitterende bærere og ikke-bærere deler den samme lave risikoen. Titer av antistoffer mot ulike *S. aureus*-proteiner (17 ulike) var lik mellom intermitterende bærere og ikke-bærere, men forskjellig fra persisterende bærere, som hadde høyere nivåer av IgA og IgG mot enkelte *S. aureus*-proteiner. Resultatene fra hans studie indikerte at det egentlig bare finnes to ulike bærergrupper av *S. aureus:* persisterende bærere og andre bærere (20).

Flere studier har vist at de fleste *S. aureus*-infeksjonene blant bærere er forårsaket av pasientens egen nesebakterie; bakteriestammen i nesen og det kliniske bakterieisolatet har ofte samme genotype (2, 6, 17, 20).

Persisterende bærere har ofte en sterk preferanse for en spesifikk *S. aureus*-stamme og har ofte en høyere bakterieload (flere colony forming units, CFU) i dyrkning enn de intermitterende bærerene. Dette kan føre til økt spredning av bakterien og økt risiko for infeksjon. Sammenliknet med ikke-bærere er nesebærere oftere kolonisert med *S. aureus* også på andre deler av kroppen (2). Spesielt hendene, fingrene og området rundt nesen er hyppig kolonisert med nesestammen av *S. aureus* (21).

Risikofaktorer for bærerskap

Barn er oftere persisterende bærere av *Staphylococcus aureus* enn voksne. En overgang fra persisterende bærer til intermitterende bærer eller ikke-bærer skjer i løpet av oppvekst og ungdomstid (2, 11, 22).

Nesebærerrater av *Staphylococcus aureus* varierer mellom etniske grupper, der kaukasere har høyere bærerrate. Menn har høyere frekvens av bærerskap enn kvinner. Pasienter med kroniske sykdommer som diabetes mellitus, langtkommen leversykdom, HIV og dialysepasienter (både hemodialyse og peritonealdialyse) er vist å ha høyere bærerfrekvenser av *S. aureus* i nesen.

Pasienter med hudsykdommer og *S. aureus* hudinfeksjoner er også hyppigere nesebærere av bakterien. Miljøfaktorer kan også påvirke bærerstatus. Hospitalisering har vist seg å være en viktig risikofaktor. Videre kan nesekolonisering og bærerstatus "spres" mellom individer i en husstand (2).

Nesebærerskap og hender kolonisert med *S. aureus* er sterkt assosiert med hverandre (2, 23). Wertheim et al. fant i 2006 sammenheng mellom nesepilling og nesebærerskap av *S. aureus.* Om nesepillingen er årsak til eller konsekvens av *S. aureus* nesebærerskap vet man imidlertid ikke (23).

Transmisjon

S. aureus er istand til å overleve i flere måneder på enhver overflate (2). Transmisjon skjer hovedsaklig ved overførsel av *S. aureus* fra en overflate, via hendene til nesen. Lufttransmisjon spiller mindre rolle for direkte spredning av *S. aureus*, men er av betydning for spredning til miljøet, som så blir reservoar for videre spredning til nese via hender. Helsepersonell er via hendene sine en viktig kilde og vektor for spredning av *S. aureus*, både når det gjelder autoinfeksjon, der pasienten smittes av sin egen bakterie, og når det gjelder kryss-infeksjon mellom pasienter med ulike stammer av bakterien (21).

2.2.2 Halsbærerskap

Vestibulum nasi blir sett på som det primære koloniseringsstedet for S. aureus (11). Pharynx og tonsillae palatinae (ganetonsillene) har ikke i like stor grad blitt ansett som en viktig koloniseringsnisje for S. aureus. Screening av pasienter og helsearbeidere med tanke på MRSA bærerskap har derfor ofte begrenset seg til neseprøver (24).

I løpet av de siste årene har imidlertid halsbærerskap av *S. aureus* blitt grundigere studert. I en studie fra 2007 av Mertz et al. ble 2966 individer screenet for *S. aureus* bærerskap med prøver fra hals og nese. Sensitiviteten

for å oppdage bærerskap økte med 25,7 % ved å inkludere halsprøver i screeningen, sammenliknet med neseprøver alene. 12,8 % av de screenede individene var halsbærere uten samtidig å være nesebærere, og disse ville man ikke oppdaget ved prøver tatt fra vestibulum nasi alene (24).

I en studie av Nilsson og Ripa fra 2006, screenet man 259 ortopediske pasienter ved innleggelsestidspunkt og 87 helsearbeidere fra den samme ortopediske avdelingen, for nese- og halsbærerskap av *S. aureus*. Blant disse fant man høyere bærerfrekvenser for hals (44 %) enn for nese (32 %). Med få unntak var nesebærerne også halsbærere (25).

Liknende funn har man også funnet blant pediatriske intensivpasienter. I Nakamuras studie fra 2010 ble 331 pasienter i alderen 0-18 år ble screenet for *S. aureus* bærerskap ved innleggelsestidspunkt. 34,1 % av pasientene var kolonisert med *S. aureus* i pharynx, mens 23,2 % var kolonisert i vestibulum nasi. Blant bærere var halskolonisering langt hyppigere (92,6 %) enn nesekolonisering (63,1 %) (26).

Ved å legge til halsprøver som en del av MRSA-screeningen vil man kunne fange opp også de som kun er halsbærere av *S. aureus*, som ved screening kun med neseprøver ikke vil oppdages (24-27). Halsprøver, i tillegg til neseprøver og prøver fra sår, er nå rutine ved MRSA-screening av pasienter og helsepersonell i Norge (28).

2.3 Nosokomiale S. aureus-infeksjoner

Nesebærerskap av *S. aureus* er en viktig risikofaktor for utvikling av nosokomiale infeksjoner (2, 6, 15). De fleste nosokomiale *S. aureus*-infeksjonene forårsakes av pasientens egen stamme av bakterien, som ofte er tilstede på hud eller slimhinner hos pasienten allerede på innleggelsestidspunktet (29-31) . Von Eiff et al. fant at *S. aureus*-stammer fra blod- og neseisolater var klonalt identiske hos rundt 80 % av pasienter med *S. aureus* bakteriemi. Kateterassosierte infeksjoner var den hyppigste årsak til *S. aureus* bakteriemi, etterfulgt av infeksjoner i hud, bløtvev og beinvev (29). Wertheim et al. har i en senere studie bekreftet disse funnene

(31).

Persisterende bærere har høyere risiko for *S. aureus*-infeksjon enn andre bærergrupper, men mortaliteten av *S. aureus*-bakteriemi er høyere hos ikke-bærere sammenliknet med hos bærere. Kanskje kan bærere være immunologisk tilpasset til sin egen *S. aureus*-stamme, og ha en mer adekvat immunrespons og beskyttende immunitet mot bakterien enn ikke-bærere (31). Verkaik et al. fant at persisterende bærere har høyere antistofftitere enn ikke-bærere for blant annet TSST-1, SEA, ClfA og ClfB. Dette kan muligens bidra til å forklare noe av forskjellen mellom risiko og utfall av *S. aureus*-infeksjoner mellom bærere og ikke-bærere. Anti-TSST-1 IgG er vist å ha en nøytraliserende effekt; mennesker med høye verdier av dette antistoffet utvikler ikke toksisk sjokksyndrom ved infeksjon med en *S. aureus*-stamme som uttrykker TSST-1 (32).

Eradikering av *Staphylococcus aureus* nesebærerskap med topikale antibiotika som mupirocin kan redusere forekomst av *S. aureus*-infeksjoner. Hos individer som er vellykket sanert og har blitt kvitt nesebakterien, skjer imidlertid rekolonisering med *S. aureus* innen få uker eller måneder (16). Redusert forekomst av infeksjoner etter eradikasjon er hittil kun vist effektivt blant kirurgiske pasienter og dialysepasienter (2, 15).

2.4 Om *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus

S. aureus er en Gram-positiv kokk som tilhører genus *Staphylococcus*. Den vokser i klaser, noe som reflekterer dens evne til å dele seg i mer enn ett plan, har en cellestørrelse på cirka 1 mikrometer og opptrer som hvite eller gyldne kolonier på blodagar. *S. aureus* er katalase- og koagulase positiv (3).

Virulensfaktorer

Staphylococcus aureus innehar både overflateproteiner og andre

virulensfaktorer som bidrar til dens virulens. Mucopeptider og koagulase er tilstede i alle stammer, mens celleassosierte virulensfaktorer (kapsel, protein A, fibronektinbindende protein, kollagenbindende proteiner) og ekstracellulære virulensfaktorer (enterotoksiner, epidermolytisk toksin, toxic shock syndrome toxin, hemolysiner, leukocidin, staphylokinase) kun er tilstede hos enkelte stammer (3). *S. aureus* produserer i tillegg ulike enzymer, som protease, lipase og hyaluronidase, som destruerer vev og kan fremme spredning av infeksjon til nærliggende vev (6).

I en nylig studie screenet Gill et al. 239 *S. aureus*-isolater med tanke på tilstedeværelse av gener delaktige i kompliserte *S. aureus*-infeksjoner (bakteriemi med infeksiøs endokarditt eller hematogen spredning til ben eller ledd). Blant gener assosiert med komplisert infeksjon fant man blant annet regulatoriske proteiner, autolysiner og proteiner med ukjent funksjon (33).

Staphylococcus protein A (SpA)

Mange stammer av *S. aureus* har protein A bundet til mucopeptid i celleveggen. SpA er istand til å binde Fc-regionen av immunoglobulin G (IgG), og reduserer dermed opsonisering og fagocytose av bakterien (3). Videre kan *Staphylococcus* protein A binde til ulike strukturer på vertscellene, som for eksempel von Willebrands faktor og reseptorer på blodplater, og kan slik fremme adhesjon av bakterien til trombocytter (34). Ved binding til komplementreseptorer på blodplater kan protein A blant annet bidra i patogenesen bak infeksiøs endokarditt (35). Ved å binde til C-reaktivt protein (CRP), kan protein A virke immunmodulerende på CRPs rolle i forsvar mot mikroorganismer (36).

2.5 Staphyloccus protein A-genet

X-regionen av *spa*-genet er en region med høy grad av polymorfisme, lokalisert rett oppstrøms for den C-terminale sekvensen som koder for

binding til celleveggen. X-regionen kalles også for short sequence repeat (SSR)-regionen (37). Denne regionen består av et varierende antall av 21-, 24- eller 27 basepar lange repeats (variable number of tandem repeats, VNTR) (38). Ulike nukleotidsammensetninger i denne regionen vil gi ulike *spa*-typer (39). Delesjoner og duplikasjoner av repetetive enheter samt punktmutasjoner synes å gi opphav til mangfoldet i X-regionen (37). Se *Figur 1* for oversikt over *spa*-genet.

Spa-typing

Ulike teknikker for genotyping blir brukt for å klassifisere *S. aureus*-stammer for bruk i epidemiologiske undersøkelser. PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) har blitt ansett som gullstandard. Sekvensbaserte metoder for genotyping, som multi-locus sequence typing (MLST) og *spa*-typing har flere fordeler framfor PFGE; de er enklere i bruk, samt at resultater er lettere å reprodusere, transportere og sammenlikne (40). MLST er dyrere og krever mer laboratorieressurser enn *spa*-typing (41).

Staphylococcus aureus har en overveiende klonal evolusjon og populasjonsstruktur (42). Som et resultat av dette har det blitt vist at sekvensering av X-regionen av *spa*-genet gir informative "typing" resultater, og *spa*-typing anses som en solid og høyt diskriminerbar metode (39).

2.6 Tromsø staf- og hudstudien

Bakgrunnen for Tromsø staf- og hudstudien (the Tromsø Staph- and Skin Study, TSSS) er et ønske om bedre kunnskap om de underliggende biologiske mekanismene for *S. aureus* nesebærerskap. På bakgrunn av økning i antibiotikaresistens og mangel på eliminasjonsstrategier med langvarig effekt mot *S. aureus* nesebærerskap, trengs nye strategier for forebygging av stafylokokksykdom.

Tromsø staf- og hudstudien er et samarbeidsprosjekt mellom en rekke ulike fagmiljø ved Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN) og Universitetet i

Tromsø, utgående fra Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN. Studien har som mål å få økt kunnskap om hvilke faktorer hos vert, bakterie og miljø som fremmer vekst av gule stafylokokker i nesen hos mennesker i Tromsø.

Tromsø staf- og hudstudien er den første befolkningsbaserte studien av *S. aureus* nesebærerskap i Norge. Som en del av den sjette Tromsøundersøkelsen (43) ble det i perioden september 2007 til august 2008 tatt nese- og halsprøver fra 3996 individer fra en generell befolkning bosatt i Tromsø kommune, for å vurdere kolonisering med *S. aureus* i nese og hals.

Av 2996 av disse individene ble det tatt repeterte nese- og halsprøver ved to ulike tidspunkt for å vurdere *S. aureus* bærerskap. Individene var i alderen 30-87 år, med en gjennomsnittsalder på 54,5 år. 1711 var kvinner, 1285 var menn.

Nese- og halsprøvene ble analysert for tilstedeværelse av *S. aureus*. 57 % av individene var ikke-bærere av *S. aureus*, 16 % intermitterende bærere og 27 % persisterende bærere: 21,1 % var persisterende nesebærere, 2,7 % persisterende halsbærere og 3,2 % var persisterende bærere av *S. aureus* både i nese og hals (44).

Nese- og halsprøvene ble *spa*-typet og clustret ved BURP (se senere). Det er dette materialet jeg har valgt å bruke som sammenlikningsgrunnlag for mine resultater.

Tromsø staf- og hudstudien er tilrådd av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Nord-Norge (REK Nord) og godkjent av Datatilsynet som del av den sjette Tromsøundersøkelsen.

2.7 Mål for oppgaven

Man ønsker med denne oppgaven å undersøke populasjonsstrukturen for invasive *S. aureus*-isolater analysert ved UNN Tromsø i år 2007 og 2008. Fra tidligere er populasjonsstrukturen for *S. aureus* nese- og halsisolater fra bærere i en generell befolkning fra Tromsø kommune undersøkt som en del

av den sjette Tromsøundersøkelsen. Speiler blodkulturisolatene bakteriepopulasjonen hos den generelle befolkningen, eller kan man se forskjell mellom invasive isolater og bærerisolater? Er det de samme stammene som sirkulerer i befolkningen som gir invasiv sykdom?

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Bakterieisolater

Isolater av *S. aureus* fra blodkulturer analysert ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø, i år 2007 og 2008. Totalt 151 isolater ble analysert. Ved nærmere gjennomgang ble 11 isolater ekskludert, se *Tabell 1*. Man stod da igjen med 140 isolater; 70 isolater fra år 2007 og 70 isolater fra 2008.

To av stammene var meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (prøve nummer 235 og 246), de øvrige stammene var meticillinsensitve *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Alle isolatene lå nedfrosset ved -20 °C på Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø. Egne frysestammer med løpenummer ble laget fra disse og ble oppbevart i fryser ved -70 °C ved Institutt for medisinsk biologi, Vert-mikrobe interaksjoner, Universitetet i Tromsø.

Til bakterieisolatene ble det knyttet pasientdata som fødselsår, kjønn og postnummer. Disse dataene ble koblet opp mot løpenummer.

Bakterieisolatene stammet fra 140 individer i alderen 0-99 år, med en gjennomsnittsalder på 62,4 år. 48 (34,3 %) var kvinner, 92 (65,7 %) var menn.

36 av isolatene stammet fra individer med postnummer tilhørende Tromsø kommune. Disse var i alderen 0-93 år, med en gjennomsnittsalder på 59,4 år. 12 av disse var kvinner (33,3 %), 24 var menn (66,7 %).

104 av isolatene stammet fra individer med postnummer tilhørende andre kommuner i Nord-Norge. Disse var i alderen 0-99 år, med en gjennomsnittsalder på 63,4 år. 36 av disse var kvinner (34,6 %), 68 var menn (65,4 %).

Kontrollstammer

Staphylococcus aureus, ATCC 25923: ble brukt som positiv kontroll ved *spa*-PCR.

Staphylococcus epidermidis, ATCC 12228: ble brukt som negativ kontroll ved *spa*-PCR.

Vekstmedier

Vekstmedium	Innhold
Blodagar	Blood Agar Base No 2 Oxoid CM0271, humant fullblod 70ml/l, dH_2O.
Frysebuljong	Brain Heart Infusion Oxoid CM 225 33 g/l, glyserol 100 ml/l, dH_2O

Kjemikalier

Kjemikalium	Innhold
0,9 % NaCl	NaCl
2x ReddyMix™ PCR MasterMix, Thermo Scientific Incorporation	0.625 enheter ThermoPrime *Taq* DNA polymerase, 75mM Tris-HCl (pH 8.8 ved 25 °C), 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 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_2O
10 x TBE-buffer	0,89 M Tris-base, 0,89 M borsyre, 20 mM EDTA, dH_2O. pH 8,3
0.5 x TBE-buffer	20 gangs fortynning av 10 x TBE-buffer

Gel elektroforese

SeaKem® LE Agarose til gel elektroforese, Lonza Rockland Incorporation, USA

GelRed™ nucleic acid gel stain, 10.000 i H_2O, Biotium Incorporation

Markør for molekylærvekt

Standard molekylærvekt	Innhold
1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Corporation, USA	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, TE-buffer, loading buffer (med glyserol)

Se *Figur 2*

Oligonukleotid primere for *spa*-PCR

Primer	Sekvens 5'-3'
spa-1113f	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C
spa-1514r	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT

(40)

Spa-PCR mastermix

<u>Innhold per 27 µl mastermix:</u>
15 µl 2x ReddyMix™
0,15 µl primer Spa1113f (100 pmol/µl)
0,15 µl primer Spa1514r (100 pmol/µl)
1,8 µl 25 mM $MgCl_2$
9,9 µl MQ H_2O

Verifisering av non-typeable *S. aureus*

StaphAurex® Plus kit, Remel
Slidex Staph Plus kit, bioMerioux Clinical Diagnostics
3 % H_2O_2 for katalasetest

3.2 Metoder

Tillaging av frysestammer

Det ble laget egne frysestammer av de aktuelle bakterieisolatene av *S. aureus.* De originale isolatene ble avidentifisert ved tildeling av løpenummer til de nye frysestammene.

Iskrystaller med *S. aureus* fra frosne kulturer fra Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø, ble spredt på blodagarskåler og inkubert over natten ved 37 °C.

Neste dag ble kolonier hentet fra blodskål med 10 µl øser og suspendert i frysebuljong. Det ble samtidig gjort ny utspreding fra frysebuljong til blodagarskål som kontroll på kontaminering. Disse ble inkubert natten over ved 37 °C og deretter visuelt sjekket for forurensning. Hvis ingen tegn til kontaminasjon ble de nye frysestammene brukt i det videre arbeidet. Frysestammene ble frosset ved -70 °C.

Utsåing av *S. aureus*

Iskrystaller med *S. aureus* fra de ovennevnte frysestammene ble spredt på blodagar for å oppnå vekst av enkeltkolonier for cellesuspensjoner. Blodagarskålene ble inkubert ved 37 °C over natten.

Tillaging av cellesuspensjoner

2-3 kolonier av *S. aureus* fra blodagarskål ble resuspendert i 200 µl MQ

H_2O i Eppendorfrør, og blandet ved vortexing. Ved øyemål ble det sjekket at alle suspensjonene hadde tilnærmet lik celletetthet. Eppendorfrørene ble oppbevart på is under arbeidet i påvente av PCR.

Den samme metoden ble brukt for å lage suspensjoner av positiv kontroll ATCC 25923 (*S. aureus*) og negativ kontroll ATCC 12228 (*S. epidermidis*).

spa-PCR

spa-PCR ble kjørt for å amplifisere opp X-regionen av *spa*-genet før gel elektroforese.

27 µl mastermix ble pipettert til hvert PCR-rør, og 3 µl av bakteriesuspensjonene ble tilsatt. 3 µl av ATCC 25923, ATCC 12228 og MQ H2O ble også tilsatt hvert sitt rør for henholdsvis positiv kontroll, negativ kontroll og mastermix- og kontamineringskontroll.

Innholdet i PCR-rørene ble blandet ved hjelp av en minisentrifuge, før de ble satt til PCR ved bruk av GeneAmp PCR System 9700 Thermal cycler etter følgende program:

Denaturering: 95 °C, 10 min	
Denaturering: 95 °C, 15 sek Annealing: 60 °C, 15 sek Elongering: 72 °C, 1 min	x 35 sykluser
Elongering: 72 °C, 10 min Hold: 4 °C, ∞	

Gel elektroforese

For gel elektroforese av PCR-produktene ble det brukt 2 % agarosegel. Gelen ble laget ved å tilsette 1,2 g SeaKem® LE Agarose til 60 ml 0,5 x TBE buffer og koke blandingen i mikrobølgeovn 1-2 minutter. Blandingen ble avkjølt til cirka 60-70 °C, før 3 µl GelRed™ ble tilsatt blandingen i avtrekksskap. Gelen ble helt i gelkar, og stivnet i løpet av cirka 30 minutter.

Den stivnede gelen ble lagt i elektroforesekar med 0,5 x TBE-buffer som dekket gelen fullstendig. 3µl PCR-produkt ble pipettert over i hver brønn,

og 3 µl Kb Plus DNA ladder som mål på molekylærvekt ble pipettert over i første og siste brønn.

Gelen ble kjørt på 80 Volt i 60 minutter.

Etter elektroforesen ble det tatt bilde av gelen ved hjelp av UV-transilluminasjon (G:Box) og programvaren GeneSnap.

Sekvensering av PCR-produktene

Spa-PCR-produktene ble sendt til Macrogen Europe, Nederland for sekvensering. Ikke-adekvate sekvenser (vurdert etter å ha lagt inn sekvensene i Ridom StaphType Software, se nedenfor), ble resekvensert av Macrogen. Stammer som ikke hadde godkjente sekvenser etter resekvensering ved Macrogen, ble sekvensert på nytt ved DNA sekvenseringslab ved Universitetssykehuset i Nord-Norge.

Analyse av *spa*-sekvenser

For analyse av sekvensene brukte man programvaren Ridom StaphType, som beskrevet av Harmsen et al. (45). Denne programvaren tillater en rask bestemmelse av *spa*-repeats og *spa*-typer. I analysen gir programvaren hver base en kvalitetsverdi som et relativt mål på sannsynligheten for feil i sekvensen. Ut i fra kvalitetsverdiene for hver enkelt base, lager programvaren en konsensussekvens basert på 5´- og 3´-sekvens, oppdager de ulike *spa* repeats og tilegner stammen en *spa*-type.

Ridom StaphType benytter seg av numeriske koder for *spa*-repeats og *spa*-typer. For å forsikre seg om uniform terminologi når det gjelder bruk av disse kodene, synkroniserer programvaren opp mot en sentral database, som finnes tilgjengelig på internett: http://www.spaserver.ridom.de/ .

Ridom StaphType-programvaren tildeler en numerisk pålitelighetsverdi til hver konsensussekvens. Denne sier noe om hvor pålitelig tildelingen av en spesifikk *spa*-type til hver enkelt sekvens er. Kun sekvenser med pålitelighet

"excellent" (pålitelighetsverdi 120) og fullstendige 5´- og 3´-sekvenser ble tatt med i vurderingen. Stammer som ikke oppnådde denne kvalitetsverdien ble resekvensert inntil verdien ble oppnådd og sekvensene i 5´- og 3´-retning var fullstendige.

Etter *spa*-typingen ved hjelp av Ridom StaphType synkroniserte man den lokale databasen med den sentrale SpaServer databasen (46).

BURP-analyse

"Based upon repeat patterns", BURP, er en algoritme for å gruppere beslektede *spa*-typer inn i clusters, og beskriver det klonale slektskapet mellom ulike *spa*-typer. Denne algoritmen er integrert i programvaren Ridom StaphType.

To brukerstyrte parametre påvirker inndelingen i clusters: eksklusjon av *spa*-typer som er kortere enn x antall repeats, og det maksimale antall "costs", kostnader, y, for å plassere *spa*-typer til et cluster. Korte *spa*-typer kan ekskluderes fra videre analyse fordi de inneholder begrenset med informasjon, og det er umulig å antyde deres evolusjonelle historie. Kostnader beskriver den genetiske forskjellen mellom to ulike *spa*-typer, og definerer cluster-dimensjonen. Én kostnad tilsvarer én genetisk hendelse.

I denne oppgaven ble standard parametre brukt: x=5 og y=4 (38).

Det ble gjort BURP-analyse på to materialer; først ble blodkulturisolatene analysert for seg, deretter gjorde man en samlet BURP-analyse på nese- og halsisolatene fra Tromsø staf- og hudstudien og inkluderte blodkulturisolatene.

4 Resultater

4.1 *spa*-PCR og gel elektroforese

spa-PCR ble kjørt for å amplifisere opp X-regionene av *spa*-genet før prøvene ble sendt til sekvensering. Gel elektroforese av PCR-produktene ble gjort for å forsikre seg om tilstedeværelse av *spa*-PCR-produkter før sekvensering.

Se *Figur 3* for eksempel på gel elektroforese.

Med unntak av én prøve fikk man fluorescerende bånd på cirka 250-400 basepar (bp) for alle prøvene ved gel elektroforese. Prøve nr 139 var negativ på gel elektroforese selv etter tre kjøringer. Denne ble verifisert som *S. aureus* med katalasetest, StaphAurex kit og Slidex Staph Plus kit, og var positiv for alle tre.

4.2 *S. aureus spa*-typer og *spa*-repats

spa-sekvensene ble analysert ved hjelp av programvaren Ridom StaphType. I de 140 blodkulturisolatene av *S. aureus* (analysert ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø i år 2007 og 2008) fant man totalt 80 *spa*-typer. Ett isolat var non-typeable (NT), det vil si kunne ikke tildeles en *spa*-type. Dette var det samme isolatet som man ikke fikk DNA PCR-produkt for og som var negativ ved gel elektroforese.

For oversikt over alle *spa*-typer i materialet, se *Tabell 2*.

Fem av 80 *spa*-typer var nye *spa*-typer, ikke beskrevet tidligere (såkalte novel *spa* types, se *Tabell 3*). Etter synkronisering med Ridom SpaServer fikk fire av disse tildelt *spa*-typer.

En av sekvensene (prøve nummer 107) inneholdt et mellomrom, GAP, på 24 basepar mellom kjente *spa*-repeats. Dette ble ikke gjenkjent av Ridom StaphType programvaren som et *spa*-repeat, ei heller etter synkronisering med Ridom SpaServer. Sekvensen ble sendt til Ridom, som analyserte sekvensen som et nytt (novel), ikke tidligere beskrevet *spa*-repeat (se *Tabell*

4). Når alle repeats i sekvensen var identifisert, kunne stammen tildeles *spa*-type.

spa-typer totalt for alle blodkulturisolatene

De hyppigste *spa*-typene i materialet var t084 (11 isolater), t012 (10 isolater), og t002, t015 og t065, hver med 7 isolater. Tilsammen inneholdt disse fem *spa*-typene 30 prosent av bakterieisolatene i materialet (42 av 140 isolater). For oversikt og fordeling av *spa*-typer, se *Figur 4.*

spa-typer i bakterieisolater fra Tromsø kommune

Av de totalt 140 bakterieisolatene fra blodkultur, var 36 fra pasienter med postnummer tilhørende Tromsø kommune. Blant disse isolatene fant man totalt 25 *spa*-typer. De hyppigste *spa*-typene innenfor gruppen var t015, t025, t065 og t084, hver med 3 isolater. Disse fire *spa*-typene inneholdt 33 prosent av bakterieisolatene fra pasienter fra Tromsø kommune (12 av 36 isolater). Til s*pa*-typene t002, t012 og t021 hørte to isolater hver. For oversikt og fordeling av *spa*-typer, se *Figur 5.*

spa-typer i bakterieisolater fra øvrige kommuner

Av totalt 140 bakterieisolater fra blodkultur, var 104 fra pasienter med postnummer ikke tilhørende til Tromsø kommune. Blant disse isolatene fant man totalt 69 *spa*-typer. De hyppigste *spa*-typene var t012 (8), t084 (8), t002 (5), t015 (4), t065 (4) og t008 (3), antall isolater per *spa*-type angitt i parentes. Tilsammen inneholdt disse fem *spa*-typene 28 prosent av bakterieisolatene fra blodkultur fra pasienter med postnummer ikke tilhørende Tromsø kommune. For oversikt og fordeling av *spa*-typer, se *Figur 6.*

4.3 BURP clustering

Blodkulturisolater

Ved hjelp av BURP-clustering kunne populasjonsstrukturen for de 80 *spa*-typene bestemmes.

spa-typene ble gruppert inn i totalt 11 *spa*-klonale kompleker (*spa*-CCs) og 17 enkeltstående *spa*-typer, såkalte singletons. Sju *spa*-typer (åtte bakterieisolater) ble ekskludert fra BURP-analyse på grunnlag av parametrene repats og costs.

Se *Tabell 2* for *spa*-typer og korresponderende *spa*-CCs.

De største *spa*-klonale kompleksene (*spa*-CC) var *spa*-CC 728 som inneholdt 19 bakterieisolater og 10 *spa*-typer, *spa*-CC 012 som inneholdt 22 bakterieisolater og 8 *spa*-typer, og *spa*-CC 084 som inneholdt 18 bakterieisolater og 8 *spa*-typer. Disse tre *spa*-CCs inneholdt til sammen 42 % av bakterieisolatene (59 av 140 bakterieisolater) og 33 % av *spa*-typene (26 av 80 *spa*-typer).

Se *Figur 7* for kart over *spa*-klonale komplekser, og *Figur 8* for *spa*-CCs og tilhørende antall bakterieisolater.

Neser- og halsprøver samt blodkulturisolater

For å undersøke slektskap av ikke-sammenfallende *spa*-typer fra blodkulturisolatene (se nedenfor) med isolatene fra nese- og halsprøvene fra Tromsø staf- og hudstudien ble det gjort en BURP-analyse på disse materialene samlet.

4.4 Sammenfall av *spa*-typer

spa-typene fra blodkulturisolatene av *S. aureus* ble sammenliknet med *spa*-typer fra nese- og halsprøver fra Tromsø staf- og hudstudien, for å

undersøke om det forelå sammenfall av *spa*-typer i de to materialene.

Som en del av Tromsø staf- og hudstudien (TSSS) ble totalt 2459 nese- og halsprøver av *S. aureus spa*-typet og clustret ved BURP; 1346 isolater fra den første prøvetakningen og 1113 isolater fra den andre prøvetakningen . De vanligste *spa*-typene fra den første screeningen var t084 (8,6 %), t012 (7,6 %) og t065 (5,1 %). Etter disse fulgte *spa*-typene t015 og t021. Tar man med isolatene fra den andre prøvetakningen endres prosenttallene til henholdsvis 8,3 %, 7,7 % og 5,4 % (47).

Blodkulturisolatene versus nese- og halsisolatene

29 av totalt 80 *spa*-typer fra blodkulturisolatene kunne ikke gjenfinnes i nese- og halsisolatene fra TSSS (se *Tabell 5*). Seks av *spa*-typene fra blodkulturisolatene sammenfalt kun med halsprøveisolater fra TSSS-materialet. Dette gjaldt *spa*-typene t172, t246, t550, t688, t800 og t3032. De øvrige *spa*-typene fra blodkultur sammenfalt med neseprøveisolater eller med både nese- og halsprøveisolater.

Alle de fem hyppigste *spa*-typene fra blodkultur (t084, t012, t002, t015 og t065) kunne gjenfinnes i nese- og halsisolatene fra Tromsø staf- og hudstudien.

Blodkulturisolatene fra pasienter med postnummer tilhørende Tromsø kommune (n=36) inneholdt 25 ulike *spa*-typer. Fire av disse (t430, t520, t2656 og t3233) kunne ikke gjenfinnes blant nese- og halsisolatene. De hyppigste *spa*-typene fra blodkulturisolater fra pasientene fra Tromsø kommune (t015, t025, t065 og t084) kunne alle gjenfinnes i nese- og halsisolatene.

Blodkulturisolater fra pasienter tilhørende Tromsø kommune versus øvrige kommuner

12 av 25 *spa*-typer fra blodkulturisolatene fra pasienter bosatt i Tromsø kommune kunne ikke gjenfinnes i materialet fra pasienter bosatt utenfor Tromsø kommune. Dette gjaldt *spa*-typene t056, t105, t223, t430, t491,

t520, t800, t1102, t1671, t2271, t2656 og t3233.

55 av 69 *spa*-typer fra blodkulturisolatene fra pasienter bosatt utenfor Tromsø kunne ikke gjenfinnes i blodkulturisolatene fra pasienter bosatt i Tromsø kommune. 14 av 69 *spa*-typer kunne gjenfinnes.

4.5 Klonalt slektskap av *spa*-typer

For å undersøke slektskap mellom *spa*-typene fra blodkulturmaterialet med *spa*-typene fra nese- og halsprøvene fra Tromsø staf- og hudstudien (TSSS), valgte man å slå sammen materialene og gjøre en BURP-clustering på hele materialet. Spesielt var man interessert i å se om de 29 *spa*-typene fra blodkultur som ikke sammenfalt med *spa*-typer fra nese-og halsprøvene, var klonalt beslektet med sistnevnte.

De tre *spa*-typene som i blodkulturmaterialet ble ekskludert fra BURP-analyse, ble ekskludert i BURP også her. De øvrige 26 *spa*-typene fra blodkultur som ikke sammenfalt med *spa*-typer fra TSSS, ble clustret inn sammen med *spa*-typer fra TSSS-isolatene (se *Tabell 5*). 7 *spa*-typer ble gruppert inn i *spa*-klonale komplekser (*spa*-CCs) som vi finner igjen etter å ha gjort BURP-analyse på blodkulturisolatene alene. De resterende 19 *spa*-typene ble gruppert inn i *spa*-CCs som vi ikke finner ved BURP på kun blodkulturstammene.

Noen av *spa*-CCs fra BURP-analyse på blodkulturisolatene gjenfinnes som en del av et større *spa*-CC etter BURP-analyse på blod-, nese- og halsisolatene samlet. Dette gjaldt *spa*-CC 728 og *spa*-CC 065 som clustrert inn under *spa*-CC 012, *spa*-CC 430 som clustret inn under *spa*-CC 024, og *spa*-CC 2439 som clustret inn under *spa*-CC 005.

Ingen av *spa*-typene fra blodkultur som man ikke fant igjen i TSSS, fungerte som koblinger mellom *spa*-klonale komplekser (*spa*-CCs) etter BURP-analyse på hele materialet, ingen nye store *spa*-klonale komplekser ble dannet.

Ser man kun på blodkulturisolatene fra pasienter fra Tromsø kommune, var det fire *spa-typer* som ikke kunne gjenfinnes i nese- og halsprøvene fra

TSSS. t3233 clustret til *spa*-CC 012, t430 og t520 clustret til *spa*-CC 024. t2656 var singleton.

5 Diskusjon

5.1 *S. aureus spa*-typer og *spa*-repeats

Blant de 140 blodkulturisolatene av *S. aureus* fant man 80 ulike *spa*-typer. Fem nye *spa*-typer og ett nytt *spa*-repeat ble oppdaget i blodkulturisolatene. For disse isolatene har det skjedd en genetisk endring som har ført til en ny, unik X-region av protein A. X-regionen av Staphylococcus protein A-genet gjennomgår punktmutasjoner samt delesjoner og duplikasjoner av repetitive enheter. Disse genetiske endringene kan gi opphav til nye *spa*-typer og nye *spa*-repeats (37).

5.2 Isolatet som ikke lot seg *spa*-type

De fleste stammer av *Staphylococcus aureus* lar seg *spa*-type ved bruk av standard primere for PCR og sekvensering. En sjelden gang treffer man imidlertid på stammer som ikke lar seg *spa*-type – non-typeable (NT) isolater. Mulige forklaringer på dette kan være enten en total mangel på protein A, eller en mutasjon i C-regionen av *spa*-genet. C-regionen koder for binding til immunoglobulin G (IgG), og det er i denne regionen forward primer for *spa*-typing er lokalisert. Ved en mutasjon i denne regionen kan det tenkes at primer ikke vil binde, og man får ikke amplifisert opp *spa*-DNR ved PCR (34).

For prøve nummer 139 fikk man ikke DNA-produkt etter *spa*-PCR. Prøven ble verifisert som *S. aureus* ved katalasetest, StaphAurex kit og Slidex Staph Plus kit. Mangelen på *spa*-PCR DNA-produkt gjorde at man heller ikke fikk DNA-sekvens for prøven etter sekvensering.

Det kan være grunn til å tro at denne stammen har undergått en mutasjon i primerbindende område som beskrevet over, eller at *spa*-genet mangler totalt. For å finne ut av hvilke genetiske endringer som ligger bak måtte man ha amplifisert og sekvensert hele *spa*-genet, ikke bare X-regionen av genet (34).

5.3 Frekvens av *spa*-typer

Alle de hyppigste *spa*-typene fra Tromsø kommune (t015, t024, t065 og t084) ble også funnet i blodkulturisolater fra pasienter bosatt utenfor Tromsø kommune. Derimot ble en av de hyppigste *spa*-typene fra blodkulturisolater fra pasienter utenfor Tromsø, t008, ikke funnet i Tromsø-materialet. Til denne *spa*-typen hørte imidlertid kun tre av blodkulturisolatene.

Befolkningsmengde

Blodkulturisolatene av *S. aureus* som ble analysert ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø i 2007 og 2008, stammet i all hovedsak fra pasienter bosatt i Nord-Norge nord for Hamarøy, det vil si fylkene Finnmark og Troms samt kommunene Narvik, Ballangen, Evenes, Tjeldsund og Tysfjord i Nordland fylke. Ved inngangen til år 2008 hadde disse områdene et befolkningstall på 252.801 (48). Derav hadde Tromsø kommune en befolkningsmengde på 65.286. Tromsø kommunes folkemengde utgjorde dermed en fjerdedel (25,8 %) av den samlede folkemengden i disse områdene.

Totalt 140 blodkulturisolater ble analysert. 36 (25,7 %) av disse stammet fra pasienter med postnummer tilhørende Tromsø kommune. Ut ifra folketallene kan man ikke se noe forskjell i total forekomst av *S. aureus* bakteriemi mellom pasienter bosatt i og utenfor Tromsø kommune. Resultatene er imidlertid ikke justert for alders- og kjønnssammensetning i befolkningene. Lavt antall bakterieisolater fra pasienter med stor aldersspredning begrenset mulighetene for mer detaljerte epidemiologiske analyser.

Det at *spa*-typer i blodkulturisolater fra pasienter fra øvrige kommuner ikke kunne gjenfinnes i blodkulturisolater fra pasienter fra Tromsø kommune, kan også forklares ut fra befolkningsmengde og antall prøver. Materialet fra øvrige kommuner var tre ganger så stort som materialet fra Tromsø kommune og inneholder dermed et større antall *spa*-typer.

Tidspunkt for prøvetaking

Prøveperiodene for de to ulike materialene overlapper ikke fullstendig. Mens blodkulturisolatene stammer fra hele år 2007 og 2008, var perioden for prøvetaking av nese- og halsprøvene i Tromsø staf- og hudstudien september 2007 til august 2008. Muligens kan de ikke helt overlappende prøveperiodene ha medvirket til at enkelte *spa*-typer fra blodkultur ikke var å finne i nese- og halsprøvene.

Endogen smitte med egen bærerstamme

Med denne oppgaven ønsket man primært å sammenlikne *spa*-typer fra blodkulturisolater tatt fra pasienter bosatt i Tromsø kommune, med *spa*-typer fra nese- og halsprøver tatt fra individer fra en generell befolkning bosatt i Tromsø kommune. Det viste seg imidlertid at antall blodkulturisolater fra pasienter fra Tromsø kommune kun var 36.

Von Eiff et al. fant at over 80 % av pasienter med *S. aureus* bakteriemi var smittet av sin egen nesestamme av *S. aureus* (29). Om pasientene med *S. aureus* bakteriemi i denne oppgaven var smittet endogent av sin egen bærerstamme fra nese eller hals, kan man ut fra denne oppgaven ikke si noe om. Man kunne ha sett på om Tromsø-pasientene med *S. aureus*-bakteriemi var deltagere under nese- og halsscreeningen med tanke på *S. aureus* bærerskap og på denne måten kanskje funnet enkelte endogene smittere. Dette går imidlertid ut over oppgavens mål, og sannsynligheten for at noen av de 36 pasientene faktisk var deltakere i den sjette Tromsøundersøkelsen og ble screenet for bærerskap av *S. aureus* er liten.

5.4 Sammenfall av *spa*-typer

29 av totalt 80 *spa*-typer fra blodkultur kunne ikke gjenfinnes i nese- og halsprøvene fra Tromsø staf- og hudstudien. Ved BURP-analyse på blodkultur-, nese- og halsisolatene samlet, ble tre blodkulturisolater ekskludert fra analysen, og de resterende 26 ble vellykket gruppert inn i *spa*-klonale komplekser (*spa*-CCs) sammen med nese- og halsisolater fra

Tromsø staf- og hudstudien.

Selv om de 26 *spa*-typene fra blodkultur ikke direkte sammenfalt med *spa*-typer fra nese- og halsprøver, indikerer en vellykket gruppering av blodkulturisolatene inn i *spa*-CCs sammen med nese- og halsisolatene likevel en klonal beslektethet av *spa*-typer.

5.5 Konklusjon

De hyppigste *spa*-typene fra blodkulturmaterialet ble gjenfunnet i bærerisolatene. De hyppigste *spa*-typene fra bærerisolatene kunne også gjenfinnes blant blodkulturene. 29 *spa*-typer fra blodkultur kunne ikke gjenfinnes blant bærerisolatene, men etter å ha gjort BURP-analyse på disse materialene samlet kunne man se at *spa*-typene var klonalt beslektet.

På grunnlag av materialene i denne oppgaven kan man ikke se noen stor forskjell i *S. aureus* populasjonsstruktur mellom blodkulturisolatene fra pasienter fra Tromsø kommune og bærerisolatene fra Tromsø staf- og hudstudien.

Svakheter ved oppgaven er et lite materiale, spesielt med tanke på blodkulturisolater fra pasienter fra Tromsø kommune. Tidsperiodene for prøvetaking mellom blodkultur og bæreisolater er heller ikke helt overlappende.

6 Tabeller

***Tabell 1*:** Ekskluderte stammer av *Staphylococcus aureus*

Stamme nr	**Årsak til eksklusjon**
128	fra antatt samme person som prøve 113, *men ulik spa-type.*
220	fra antatt samme person som prøve 219, *men ulik spa-type*
224	fra antatt samme person som prøve 223
245	fra antatt samme person som prøve 244
248	fra antatt samme person som prøve 244
250	fra antatt samme person som prøve 249
306	fra antatt samme person som prøve 304
320	fra antatt samme person som prøve 317
423	fra antatt samme person som prøve 317
419	halsscreeningsprøve, feillagret som blodkultur
142	ingen pasientdata knyttet til prøven
Totalt: 11	**antall ekskluderte stammer**

Tabellen viser stammer med likt prøveår der pasientinfo knyttet til stammen var lik med hensyn på fødselsår, fødselsmåned og kjønn. Disse ble antatt å komme fra samme person, og kun den første prøven ble tatt med i videre analyse. For to av prøvene som ble ekskludert stemte *spa*-type fra antatt første og andre prøve ikke overens.

Tabell 2: Bakterieisolater fra blodkultur og tilhørende *spa*-typer og *spa*-klonale clusters (*spa*-CCs) etter BURP-analyse på blodkulturisolatene.

Prøvenummer	***Spa*-type**	***Spa*-CC**
101	t015	1: spa-CC 728
102	t015	1: spa-CC 728
103	t1875	3: spa-CC 084
104	t150	4: spa-CC 078
105	t4714	3: spa-CC 084
106	t223	7: spa-CC 2439

107	t8048	8: spa-CC 002
108	t065	6: spa-CC 065
109	t024	5: spa-CC 430
110	t645	singleton #7
111	t2656	singleton #13
112	t282	Excluded
113	t160	singleton #3
114	t084	3: spa-CC 084
115	t1321	6: spa-CC 065
116	t330	6: spa-CC 065
117	t563	6: spa-CC 065
118	t024	5: spa-CC 430
119	t021	2: spa-CC 012
120	t491	3: spa-CC 084
121	t1599	singleton #11
122	t026	Excluded
123	t1239	2: spa-CC 012
124	t002	8: spa-CC 002
125	t840	2: spa-CC 012
126	t026	Excluded
127	t230	1: spa-CC 728
129	t024	5: spa-CC 430
130	t774	3: spa-CC 084
131	t1898	4: spa-CC 078
132	t084	3: spa-CC 084
133	t197	5: spa-CC 430
134	t172	11: no founder
135	t002	8: spa-CC 002
136	t084	3: spa-CC 084
137	t279	3: spa-CC 084
138	t032	7: spa-CC 2439
139	NT	
140	t520	5: spa-CC 430
141	t008	5: spa-CC 430
143	t5222	6: spa-CC 065
144	t2271	2: spa-CC 012
145	t012	2: spa-CC 012
146	t635	Excluded
147	t021	2: spa-CC 012
201	t880	singleton #10
202	t012	2: spa-CC 012
203	t065	6: spa-CC 065
204	t1102	10: no founder
205	t078	4: spa-CC 078
206	t084	3: spa-CC 084
207	t800	singleton #9
208	t3033	4: spa-CC 078
209	t084	3: spa-CC 084
210	t012	2: spa-CC 012
211	t129	Excluded

212	t015	1: spa-CC 728
213	t528	Excluded
214	t078	4: spa-CC 078
215	t012	2: spa-CC 012
216	t012	2: spa-CC 012
217	t688	singleton #8
218	t065	6: spa-CC 065
219	t4895	1: spa-CC 728
221	t105	8: spa-CC 002
222	t084	3: spa-CC 084
223	t065	6: spa-CC 065
225	t065	6: spa-CC 065
226	t021	2: spa-CC 012
227	t7366	Excluded
228	t216	11: no founder
229	t056	4: spa-CC 078
230	t127	singleton #2
231	t230	1: spa-CC 728
232	t2143	6: spa-CC 065
233	t002	8: spa-CC 002
234	t246	singleton #5
235	t002	8: spa-CC 002
236	t012	2: spa-CC 012
237	t189	singleton #4
238	t298	2: spa-CC 012
239	t012	2: spa-CC 012
240	t084	3: spa-CC 084
241	t012	2: spa-CC 012
242	t164	9: no founder
243	t067	8: spa-CC 002
244	t1671	4: spa-CC 078
246	t4298	5: spa-CC 430
247	t002	8: spa-CC 002
249	t246	singleton #5
251	t3032	3: spa-CC 084
301	t008	5: spa-CC 430
302	t550	1: spa-CC 728
303	t091	singleton #1
304	t330	6: spa-CC 065
305	t032	7: spa-CC 2439
307	t216	11: no founder
308	t4304	9: no founder
309	t3176	Excluded
310	t122	2: spa-CC 012
311	t015	1: spa-CC 728
312	t7367	singleton #14
313	t160	singleton #3
314	t375	singleton #6
315	t230	1: spa-CC 728
316	t630	1: spa-CC 728

317	t021	2: spa-CC 012
318	t021	2: spa-CC 012
319	t160	singleton #3
321	t430	5: spa-CC 430
322	t3928	1: spa-CC 728
323	t084	3: spa-CC 084
324	t3233	2: spa-CC 012
325	t630	1: spa-CC 728
326	t084	3: spa-CC 084
401	t012	2: spa-CC 012
402	t012	2: spa-CC 012
403	t065	6: spa-CC 065
404	t7365	7: spa-CC 2439
405	t2439	7: spa-CC 2439
406	t084	3: spa-CC 084
407	t084	3: spa-CC 084
408	t7323	1: spa-CC 728
409	t065	6: spa-CC 065
410	t4006	1: spa-CC 728
411	t728	1: spa-CC 728
412	t015	1: spa-CC 728
413	t894	10: no founder
414	t2103	singleton #12
415	t002	8: spa-CC 002
416	t1315	4: spa-CC 078
417	t722	1: spa-CC 728
418	t085	3: spa-CC 084
420	t002	8: spa-CC 002
421	t008	5: spa-CC 430
422	t067	8: spa-CC 002
424	t015	1: spa-CC 728
425	t015	1: spa-CC 728
426	t122	2: spa-CC 012
427	t024	5: spa-CC 430

Spa-typer merket som singletons clustret ikke til andre *spa*-typer i materialet fra blodkultur. *Spa*-typer merket som "excluded" i kolonnen *spa*-CC er *spa*-typer som ble ekskludert fra BURP-analyse på grunnlag av parametrene minimalt antall repeats, x, og costs, y. NT= non-typeable, stammen av *Staphyloccus aureus* kunne ikke *spa*-types. Bakterieisolater merket med rødt er meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Øvrige isolater er meticillinsensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA).

spa repat sekvens kan hentes ned fra:
http://www.spaserver.ridom.de/spaserver/query

Tabell 3: Nye *spa*-typer

Spa-type	**Prøvenummer**	**Repeatsekvens**
t7323	408	08-16-16-34-34-17-34-16-34
t7365	404	26-23-13-109-31-05-17-25-25-16-28
t7366	227	26-31-13
t7367	312	08-16-02-25-02-25-24-24-25-17-25
t8048	107	26-23-17-34-17-20-17-444-17-16

(28)

Spa-typer som ikke var tidligere beskrevet, men ble funnet for første gang i stammene fra blodkultur. Hvert repeat består av en sekvens på 21, 24 eller 27 basepar. Repeat 444 i spa-type t8048 er ikke tidligere beskrevet (se under).

Tabell 4: Nytt *spa*-repat

Spa repat	**Prøvenr**	**DNA-sekvens**
r444	107	AAAGAAGTCAACAACAAGCCTGGT

(28)

Ikke tidligere beskrevet *spa*-repeat, funnet for første gang i *S. aureus*-isolat fra blodkultur.

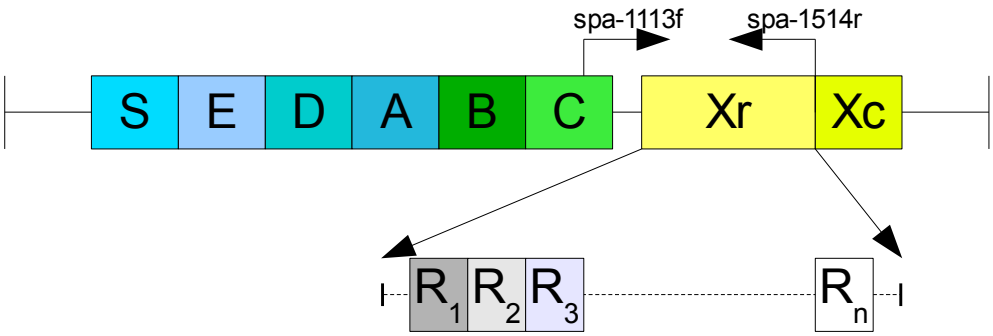
Tabell 5*: spa*-typer i stammer fra blodkultur som ikke gjenfinnes i nese- og halsprøvene fra Tromsø staf- og hudstudien.

Spa-type	**Spa-CC 1**	**Spa-CC 2**
t032	7: spa-CC 2439	spa-CC 005
t1239	2: spa-CC 012	spa-CC 012
t1315	4: spa-CC 078	spa-CC 078
t1321	6: spa-CC 065	spa-CC 012
t1599	#11	cluster 19: no founder
t1898	4: spa-CC 078	spa-CC 078
t2143	6: spa-CC 065	spa-CC 012
t2439	7: spa-CC 2439	spa-CC 005
t2656	#13	spa-CC 153

t3033	4: spa-CC 078	spa-CC 078
t3176	Excluded	Excluded
t3233	2: spa-CC 012	spa-CC 012
t3928	1: spa-CC 728	spa-CC 012
t4006	1: spa-CC 728	spa-CC 012
t4298	5: spa-CC 430	spa-CC 024
t430	5: spa-CC 430	spa-CC 024
t4304	9: no founder	spa-CC 996/164
t4714	3: spa-CC 084	spa-CC 084
t4895	1: spa-CC 728	spa-CC 012
t520	5: spa-CC 430	spa-CC 024
t563	6: spa-CC 065	spa-CC 012
t635	Excluded	Excluded
t728	1: spa-CC 728	spa-CC 012
t880	#10	spa-CC 012
t7323	1: spa-CC 728	spa-CC 012
t7365	7: spa-CC 2439	spa-CC 005
t7366	Excluded	Excluded
t7367	#14	cluster 20: no founder
t8048	8: spa-CC 002	spa-CC 002

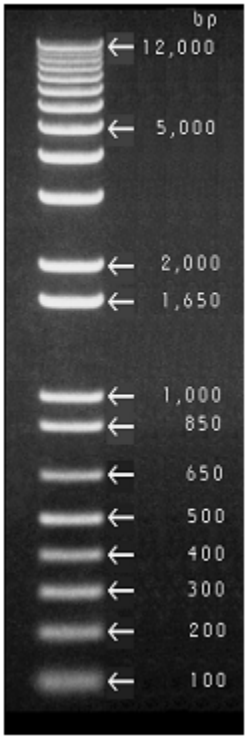
Spa-CC 1: *spa*-klonalt kompleks etter BURP-analyse på blodkulturisolatene alene. *Spa*-CC 2: *spa*-klonalt kompleks etter BURP-analyse på blodkultur-, nese- og halsisolatene samlet. Dette ble gjort for å undersøke slektskap av de ikke-sammenfallende blodkulturisolatene med isolater fra Tromsø staf- og hudstudien. Med unntak av tre isolater som ble ekskludert fra BURP-analyse, fant man via *spa*-klonale komplekser slektskap for alle blodkulturisolatene.

7 Figurer



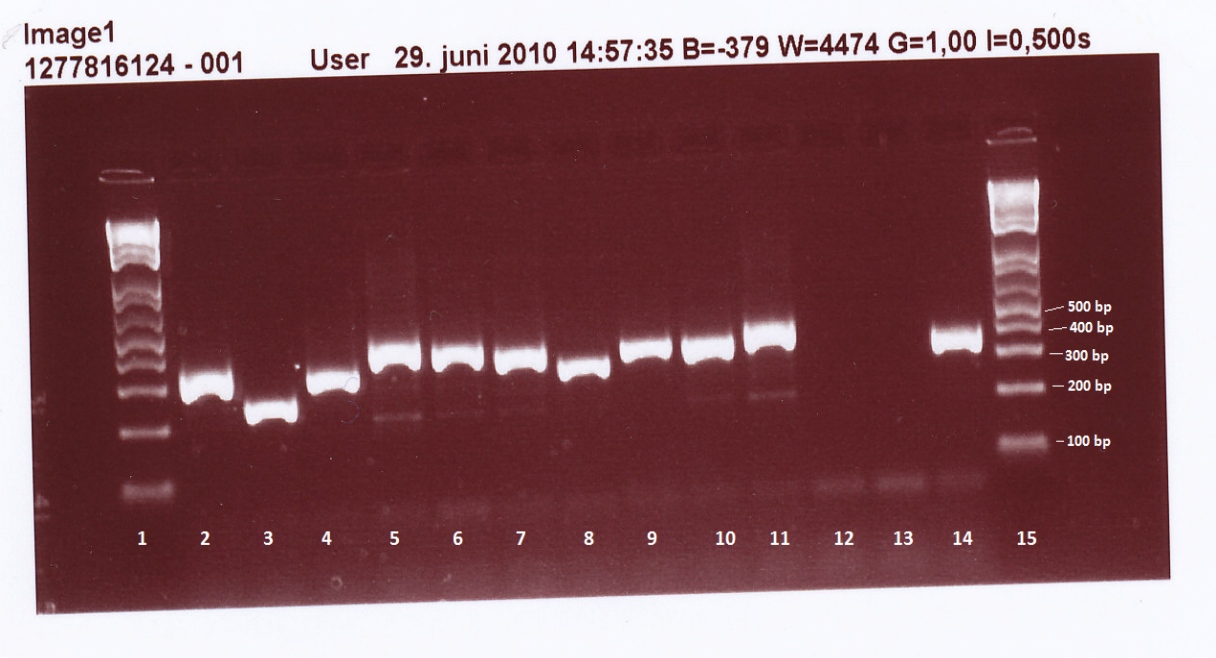
Figur 1: Kart av protein A-genet. De ulike områdene koder for ulike deler av genet. Region S i den N-terminale delen koder for signalsekvensen, mens E, D, A, B og C koder for de immunoglobulin G-bindende regionene. Den C-terminale regionen, X-regionen, koder for den COOH-terminale delen av proteinet. Videre er X-regionen delt inn i to domener: X_R kodende for repeat-regionen, og X_C som inneholder en konservert sekvens kodende for binding til celleveggen. Hvert *spa*-repat inneholder 21, 24 eller 27 basepar. Hver X-region inneholder minimum ett *spa*-repeat, og per 16.08.11 inneholder den lengste spa-typen (t8135) 25 repeats (http://spa.ridom.de/spatypes.shtml). På grunnlag av sammensetning av repeats kan *spa*-typen bestemmes.

Modifisert fra Baum et al. 2009 og Shopsin et al. 1999 (19, 20).

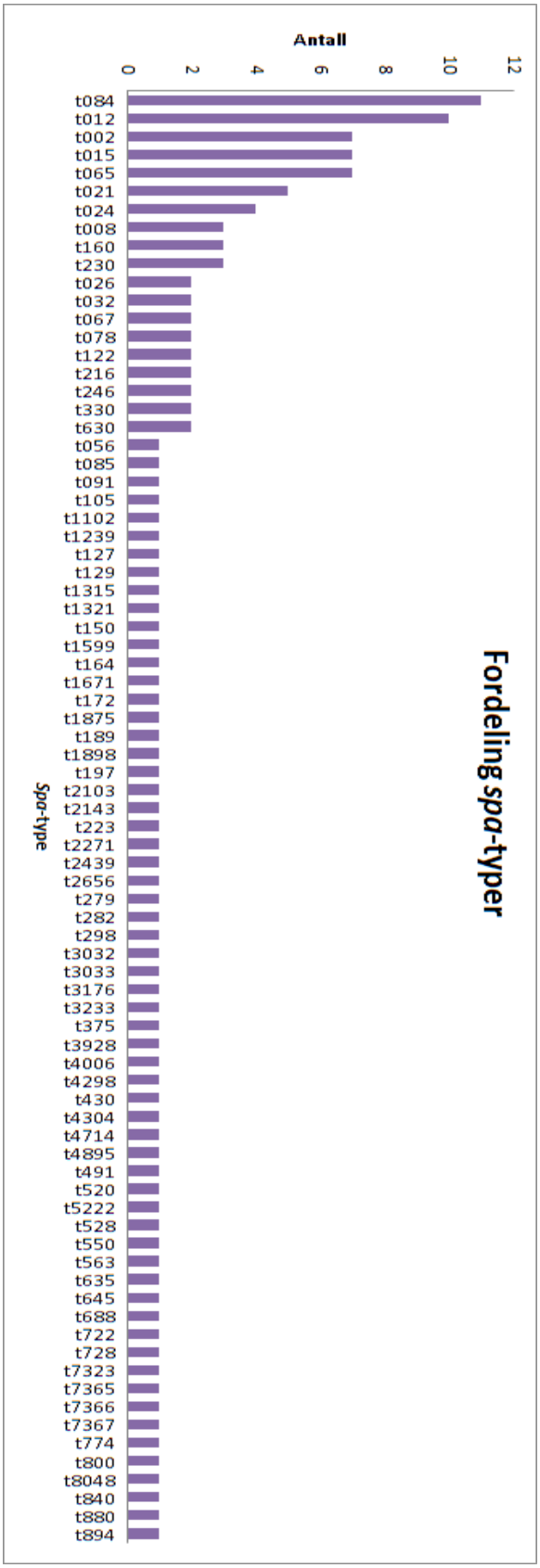


Figur 2: Markør for molekylærvekt: 1Kb Plus DNA molecular weight standard, Invitrogen (49).

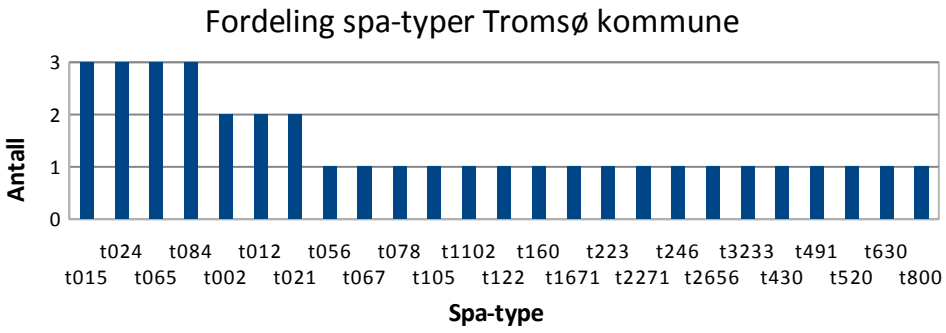
Figur 3: Eksempel på gel elektroforese



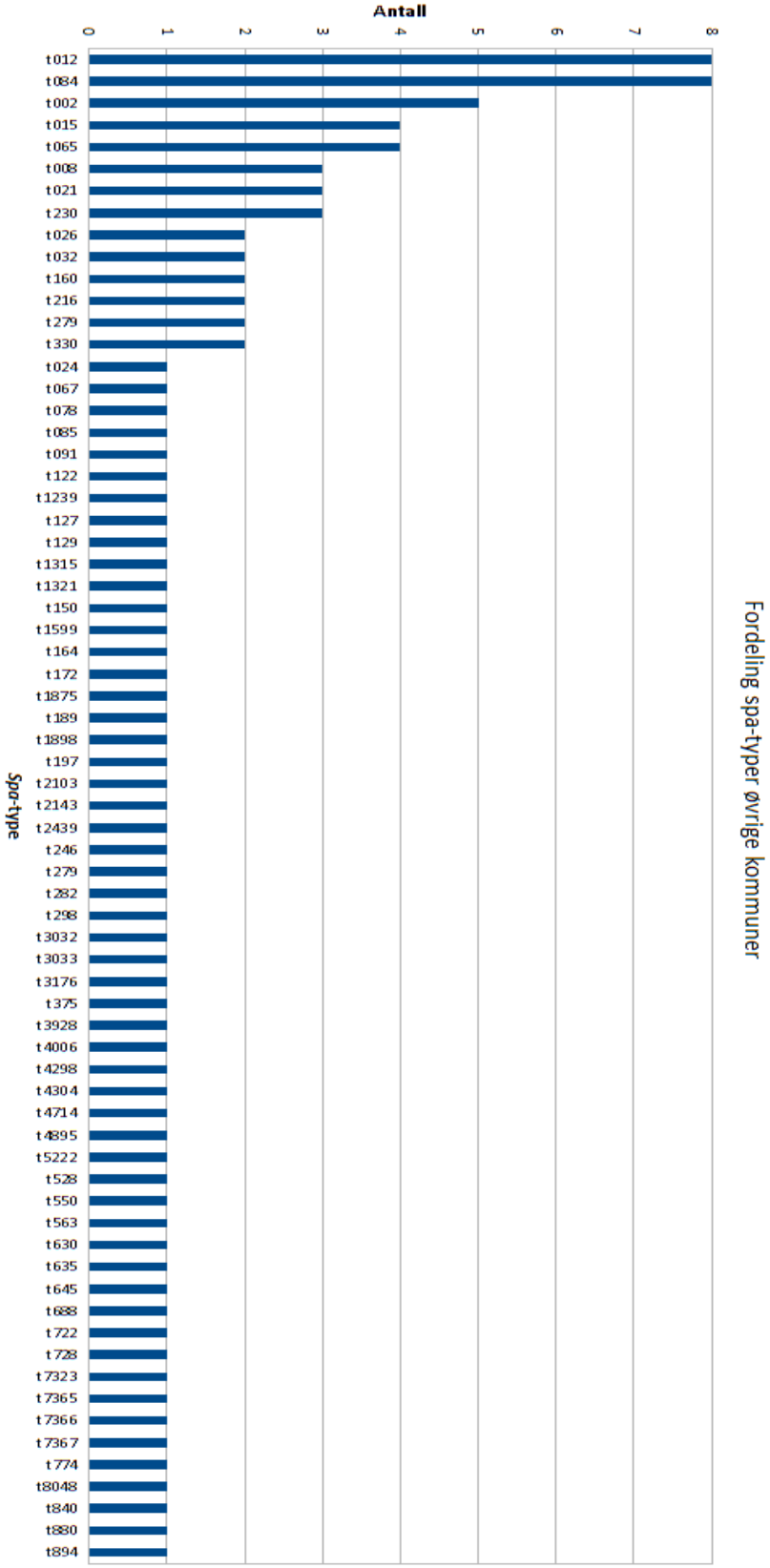
Eksempel på gel elektroforese av *spa*-PCR-produkter. Første og siste brønn: Kb+ markør for molekylærvekt, brønn 2-11: blodkulturisolat 111-120, brønn 12: mastermix- og kontamineringskontroll, brønn 13: negativ kontroll ATCC 12228 *Staphylococcus epidermidis* og brønn 14: positiv kontroll ATCC 25923 *Staphylococcus aureus.*



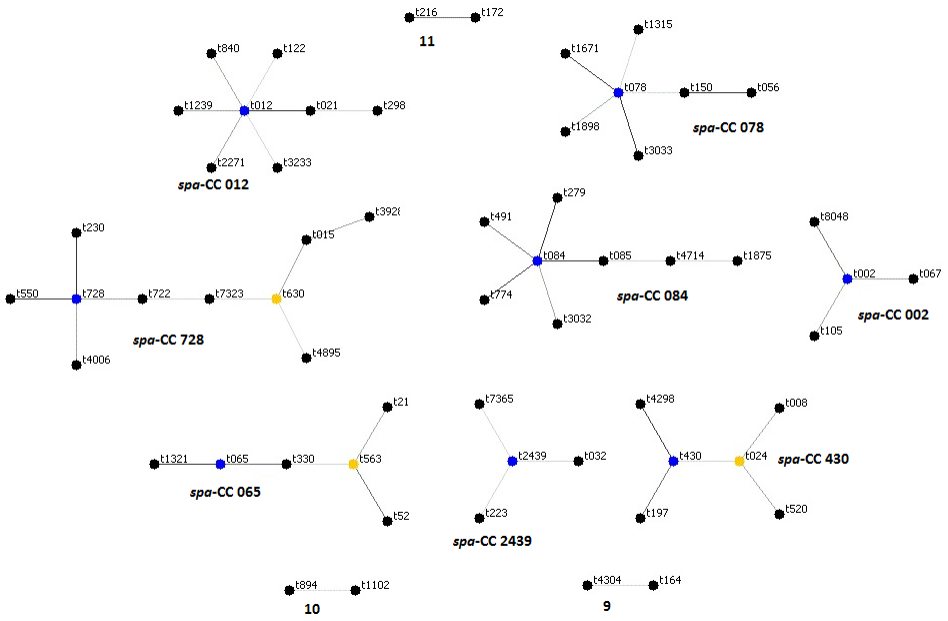
Figur 4: *Spa*-typer og antall *S. aureus* blodkulturisolater til hver *spa*-type, totalt for hele materialet med blodkulturer fra 140 pasienter med *S. aureus* bakteriemi.



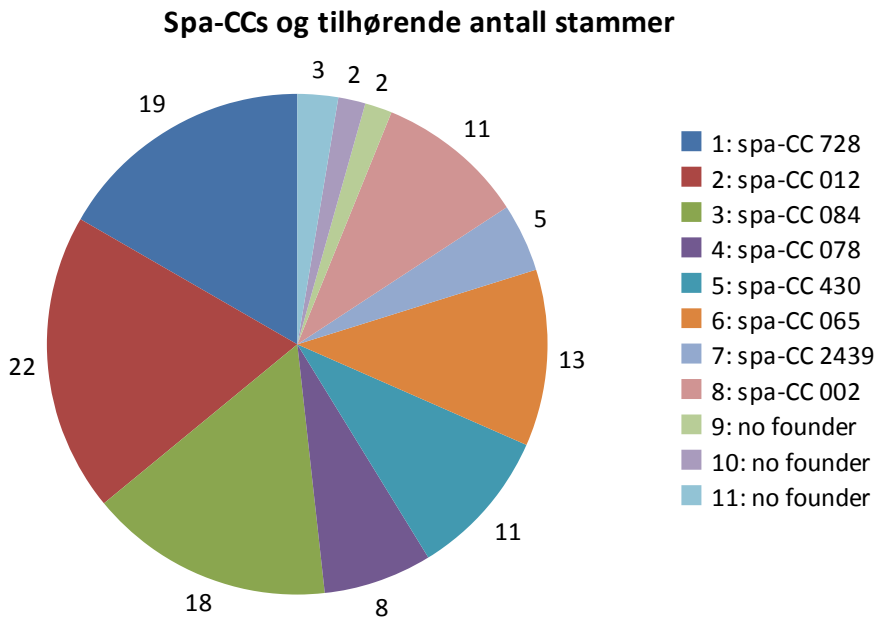
Figur 5: *Spa*-typer og antall *S. aureus* blodkulturisolater til hver *spa*-type, fra pasienter bosatt i Tromsø kommune.



Figur 6: *Spa*-typer og antall *S. aureus* blodkulturisolater til hver *spa*-type, fra pasienter fra Nord-Norge utenom Tromsø kommune.



Figur 7: *Spa*-klonale komplekser (*spa*-CCs) basert på BURP-analyse av *spa*-typer fra *S.aureus*-stammer fra 140 blodkulturer. Blå: grunnlegger (founder) av *spa*-CC. Gul: delgrunnlegger (subfounder) av *spa*-CC. Nummer 9-11: *spa*-CCs uten grunnlegger. Utelatt fra figuren er 14 *spa*-typer gruppert som singletons. Syv *spa*-typer ble ekskludert fra BURP-clustering på grunnlag av parametrene repeats og costs.



Figur 8: *Spa*-klonale komplekser (*spa*-CCs) etter clustering av *spa*-typer fra blodkultur ved BURP-analyse. Tallene ved hver kakebit representerer antall av bakterieisolatene fra blodkultur som clustret til det enkelte *spa*-CC.

8 Referanser

1. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, 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. Clin Infect Dis. 2001 May 15;32 Suppl 2:S114-32.

2. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis. 2005 Dec;5(12):751-62.

3. Mims C, Dockrell HM, Goering RV, et al. M. Medical Microbiology, updated third edition 2004.

4. del Rio A, Cervera C, Moreno A, et al. Patients at Risk of Complications of Staphylococcus aureus Bloodstream Infection. Clinical Infectious Diseases. 2009;48(s4):S246-S53.

5. NORM/NORM-VET 2009. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø/Oslo 2010.

6. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 1998 Aug 20;339(8):520-32.

7. Jevons M. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J. 1961: 2:124-33.

8. Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with Staphylococcus aureus. Am J Med. 2008 Apr;121(4):310-5.

9. Reduced susceptibility of Staphylococcus aureus to vancomycin--Japan, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1997 Jul 11;46(27):624-6.

10. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003 Apr 3;348(14):1342-7.

11. Williams RE. Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. Bacteriol Rev. 1963 Mar;27:56-71.

12. Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus? Trends Microbiol. 2001 Dec;9(12):605-10.

13. Cole AM, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. Infect Immun. 1999 Jul;67(7):3267-75.

14. Aly R, Shinefield HI, Strauss WG, et al. Bacterial adherence to nasal mucosal cells. Infect Immun. 1977 Sep;17(3):546-9.

15. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):505-20.

16. Nouwen J, Boelens H, van Belkum A, et al. Human factor in Staphylococcus aureus nasal carriage. Infect Immun. 2004 Nov;72(11):6685-8.

17. Kluytmans JAJW, Wertheim HFL. Nasal Carriage of Staphylococcus aureus and Prevention of Nosocomial Infections. Infection. 2005;33(1):3-8.

18. Eriksen NH, Espersen F, Rosdahl VT, et al. Carriage of Staphylococcus aureus among 104 healthy persons during a 19-month period. Epidemiol Infect. 1995 Aug;115(1):51-60.

19. VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, et al. Follow-up of Staphylococcus aureus nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3133-40.

20. van Belkum A, Verkaik Nelianne J, de Vogel Corné P, et al. Reclassification of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Types. The Journal of Infectious Diseases. 2009;199(12):1820-6.

21. Solberg CO. Spread of Staphylococcus aureus in hospitals: causes and prevention. Scand J Infect Dis. 2000;32(6):587-95.

22. Armstrong-Esther CA. Carriage patterns of Staphylococcus aureus in a healthy non-hospital population of adults and children. Ann Hum Biol. 1976 May;3(3):221-7.

23. Wertheim HF, van Kleef M, Vos MC, et al. Nose picking and nasal carriage of Staphylococcus aureus. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006

Aug;27(8):863-7.

24. Mertz D, Frei R, Jaussi B, et al. Throat Swabs Are Necessary to Reliably Detect Carriers ofStaphylococcus aureus. Clinical Infectious Diseases. 2007;45(4):475-7.

25. Nilsson P, Ripa T. Staphylococcus aureus Throat Colonization Is More Frequent than Colonization in the Anterior Nares. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(9):3334-9.

26. Nakamura MM, McAdam AJ, Sandora TJ, et al. Higher Prevalence of Pharyngeal than Nasal Staphylococcus aureus Carriage in Pediatric Intensive Care Units. Journal of Clinical Microbiology. 2010;48(8):2957-9.

27. Mertz D, Frei R, Periat N, et al. Exclusive Staphylococcus aureus throat carriage: at-risk populations. Arch Intern Med. 2009 Jan 26;169(2):172-8.

28. MRSA-veilederen: Nasjonalt folkehelseinstitutt; 2009.

29. von Eiff C, Becker K, Machka K, et al. Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group. N Engl J Med. 2001 Jan 4;344(1):11-6.

30. Pujol M, Pena C, Pallares R, et al. Nosocomial Staphylococcus aureus bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. Am J Med. 1996 May;100(5):509-16.

31. Wertheim H, Vos M, Ott A, et al. Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. The Lancet. 2004;364(9435):703-5.

32. Verkaik Nelianne J, de Vogel Corné P, Boelens Hélène A, et al. Anti-Staphylococcal Humoral Immune Response in Persistent Nasal Carriers and Noncarriers ofStaphylococcus aureus. The Journal of Infectious Diseases. 2009;199(5):625-32.

33. Horsburgh MJ, Gill SR, McIntyre LM, et al. Potential Associations between Severity of Infection and the Presence of Virulence-Associated Genes in Clinical Strains of Staphylococcus aureus. PLoS ONE. 2011;6(4):e18673.

34. Baum C, Haslinger-Loffler B, Westh H, et al. Non-spa-Typeable Clinical Staphylococcus aureus Strains Are Naturally Occurring Protein A Mutants. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(11):3624-9.

35. Peerschke EI, Ghebrehiwet B. The contribution of gC1qR/p33 in infection and inflammation. Immunobiology. 2007;212(4-5):333-42.

36. Das T, Mandal C. Protein A--a new ligand for human C-reactive protein. FEBS Lett. 2004 Oct 8;576(1-2):107-13.

37. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains. J Clin Microbiol. 1999 Nov;37(11):3556-63.

38. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrügge C, et al. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of Staphylococcus aureus populations based on spa polymorphisms. BMC Microbiology. 2007;7(1):98.

39. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, et al. Characterization of Clonal Relatedness among the Natural Population of Staphylococcus aureus Strains by Using spa Sequence Typing and the BURP (Based upon Repeat Patterns) Algorithm. Journal of Clinical Microbiology. 2008;46(8):2805-8.

40. Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, et al. Assignment of Staphylococcus Isolates to Groups by spa Typing, SmaI Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(7):2533-40.

41. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, et al. spa Typing Method for Discriminating among Staphylococcus aureus Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(2):792-9.

42. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, et al. How Clonal Is Staphylococcus aureus? Journal of Bacteriology. 2003;185(11):3307-16.

43. Jacobsen BK, Eggen AE, Mathiesen EB, et al. Cohort profile: The Tromso Study. International Journal of Epidemiology. 2011.

44. Olsen K, Simonsen GS, Sundsfjord A. Prevalence and predictors of

Staphylococcus aureus nasal and throat carriage in a general population of North Norway - *The Tromsø Staph and Skin Study.* ECCMID; Helsinki 2009.

45. Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5442-8.

46. www.spaserver.ridom.de.

47. Sangvik M, Slind Olsen R, Furberg A-S. *spa*-typing of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal and throat carriers in a general population. The Tromsø Staph and Skin Study. ISSSI; Bath 2010.

48. Folkemengd, etter kjønn, alder og kommune. 1. januar 2008. Statistisk sentralbyrå; 2008 [30.05.2011]; Available from: http://www.ssb.no/emner/02/01/10/folkemengde/arkiv/tab-2008-03-13-19.html, http://www.ssb.no/emner/02/01/10/folkemengde/arkiv/tab-2008-03-13-20.html, http://www.ssb.no/emner/02/01/10/folkemengde/arkiv/tab-2008-03-13-21.html.

49. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10787018.pdf. [30.05.2011].