

Ane Kleiven
Tonje Mjølsvik Madsen

Metoder for deteksjon av linezolidresistens

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Heidi Græsmann
Mai 2020

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Ane Kleiven
Tonje Mjølsvik Madsen

Metoder for deteksjon av linezolidresistens

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Heidi Græsmann
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven er utarbeidet av Ane Kleiven og Tonje Mjølsvik Madsen, ved Bioingeniørutdanningen ved NTNU i Trondheim. Oppgaven ble opprinnelig gitt av avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs hospital. Grunnet endrede omstendigheter er vår oppgave utarbeidet teoretisk. Vi har hentet inspirasjon fra den opprinnelige oppgaven.

Vi ønsker å rette en stor takk til vår veileder Heidi Græsmann ved institutt for Bioingeniørfag, for godt samarbeid underveis i prosessen. Alle samtaler har vært til god hjelp.

Bachelorprosessen har vært svært lærerik og utfordrende. Vi har fått muligheten til å lære mer om bioingeniørens rolle i forbindelse med resistensbestemmelse, noe vi ser på som givende for det kommende arbeidslivet.

God lesing!

Sammendrag

Utbredt resistensutvikling er en dagsaktuell utfordring. Flere stammer av bakterien *Staphylococcus aureus* er multiresistente. Multiresistente stammer av *S. aureus* kan behandles med det syntetiske antibiotikumet linezolid, men det er også utviklet resistens overfor dette antibiotikumet.

En av resistensmekanismene knyttet til linezolidresistens, er tilstedeværelsen av resistensgener som *cfr*, *optrA* og *poxtA*. Disse kan overføres horisontalt mellom bakteriearter.

Hensikten med dette prosjektet er å presentere laboratoriemetodene som ville blitt benyttet i opprinnelig oppgave: fenotypisk og genotypisk resistensbestemmelse av linezolid. Primere til PCR-deteksjon av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxtA* er en sentral del av oppgaven.

Primere fra tidligere publiserte singleplex PCR ble sammenlignet med egendesignede primere, designet i dataprogrammet *Primer3*. Egendesignede primere ble designet med hensyn til primerlengde, smeltetemperatur og %GC-innhold.

Egendesignede primere skiller seg fra tidligere publiserte primere på flere måter, og varierer både i primerlengde, smeltetemperatur og %GC-innhold. Primere fra tidligere publiserte studier er testet ut, og har fungert til amplifisering. Egendesignede primere er ikke testet ut i praksis, og er designet for å belyse essensielle betingelser knyttet til primerdesign.

Videreutvikling av en tidligere publisert multiplex PCR for amplifisering av resistensgenene, til en real time PCR, vil være et naturlig steg i retning AMM sitt ønske om en multiplex real time PCR for deteksjon av overførbar linezolidresistens.

Abstract

Resistance development is a current global issue. Several bacterial strains of *Staphylococcus aureus* have shown to be multiresistant. Multiresistant strains of *S. aureus* can be treated with the synthetic antibiotic linezolid. However, resistance against linezolid has also developed.

One of the mechanisms related to linezolid resistance, is the presence of resistance genes such as *cfr*, *optrA* and *poxtA*. These genes can be transferred between bacteria horizontally.

This project aims to present theory related to the laboratory methods, that would have been used in the original project: phenotypical and genotypical resistance determination of linezolid. Primers for PCR detection of the resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxtA*, is a central part of this study.

Previously published singleplex PCR was compared with self designed primers, designed in the software *Primer3*. Self designed primers were designed based on primer length, melting temperature and %GC-content.

Self designed primers differ from previously published primers in several ways. The primers vary in primer length, melting temperature and %GC-content. Primers from published studies have shown to be functional for amplification. Self designed primers have not been tested in the laboratory and are designed to focus on essential terms in primer design.

Further development of a published multiplex PCR for amplification of the resistance genes, would be a natural step towards AMM's wish for a multiplex real time PCR for detection of transferable linezolid resistance.

Liste over forkortelser

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
F-plasmid	Fertility plasmid
R-plasmid	Resistance plasmid
30S	Den lille ribosomale subenhet
50S	Den store ribosomale subenhet
GTP	Guanosin trifosfat
IF1-3	Initieringsfaktor 1-3
PTC	Peptidyl transferase center
<i>cfr</i>	Chloramphenicol-florfenicol resistance gene
<i>optrA</i>	Oxazolidinone and phenicol resistance gene
<i>poxA</i>	Phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene
ARE ABC-F-proteiner	Antibiotic Resistance ATP-binding cassette F-proteiner
AMM	Avdeling for medisinsk mikrobiologi
PCR	Polymerase Chain Reaction
MIC	Minste inhiberende konsentrasjon
T_m	Smeltetemperatur
FRET	Förster resonance energy transfer
RFU	Relative Fluorescence Units
C_t	Cycle threshold
%GC-innhold	Primerens prosentandel av guanin og cytosin
bp	Basepar
RT	Revers transkriptase

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Liste over forkortelser	IV
1. Innledning	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2 Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.3 Antibiotika og deres angrepspunkter	3
1.4 Antibiotikaresistens og resistensutvikling	4
1.5 Linezolid og dets virkningsmekanisme	6
1.6 Linezolidresistens	7
1.7 Oppgavens hensikt	9
2. Materiale og metode	10
2.1 Dyrkning, identifikasjon og resistensbestemmelse av <i>S. aureus</i>	10
2.2 Resistensbestemmelse med diffusjonstester	12
2.3 Ekstraksjon av bakterielt DNA	14
2.4 Prinsippet for Polymerase Chain Reaction (PCR)	15
2.5 Real Time Polymerase Chain Reaction	17
2.6 Design av primere og prober til Real Time Polymerase Chain Reaction	20
2.7 Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction	22
2.8 PCR i litteratur benyttet til deteksjon av resistensgenene	24
2.9 Primerdesign med dataprogrammet <i>Primer3</i>	26
3. Resultater	28
4. Diskusjon	31
5. Referanser	35
6. Vedlegg	38
Vedlegg 1	38
Vedlegg 2	40
Vedlegg 3	41
Vedlegg 4	42
Vedlegg 5	43

1. Innledning

Antibiotikaresistens er en stadig større utfordring i helsevesenet, og vokser i takt med økende bruk av antibiotika. Resistensutviklingen gjør at flere patogene mikrober har svært få behandlingsalternativer. Flere bakteriestammer har utviklet multiresistens, deriblant *Staphylococcus aureus*. Linezolid benyttes i dag til behandling av enkelte infeksjoner forårsaket av multiresistente bakterier. Utfordringen med dette, er at det også utvikles resistens overfor dette antibiotikumet. Denne delen av oppgaven omhandler teori knyttet til *S.aureus* og linezolidresistens.

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), også kjent som gule stafylokokker, er en gram positiv kokk. Bakterien finnes som normalflora på hud, i nese, svelg og endetarm hos friske personer. *S.aureus* kan forårsake infeksjon ved skade på hud, der bakterien får tilgang til underliggende vev med annen bakterieflora eller sterile områder. *S. aureus* kan overføres mellom individer gjennom direkte kontaktsmitte og gjennom indirekte kontakt med andre overflater. Smitte oppstår også ved kontakt med døde hudceller i luft.

S. aureus er en av de vanligste årsakene til sykehusinfeksjoner, både grunnet utstrakt antibiotikabruk og at mange pasienter har nedsatt immunforsvar.

S. aureus fremkaller sykdom gjennom ulike virulensfaktorer. Virulensfaktorer gir mikroben spredningsevne og evne til å unngå immunforsvaret. Enzymer som hyaluronsyre, lipase og protease bidrar til nedbrytning av omkringliggende vev, og legger til rette for spredning. Overflateproteiner, kapsel og enzymet koagulase er virulensfaktorer som gjør *S. aureus* mindre mottakelig for fagocytose. *S.aureus* produserer også toksiner, som skader og dreper omkringliggende celler, samt gir symptomer (1).

Infeksjoner forårsaket av *S. aureus* behandles med antibiotika med forskjellige angrepspunkter. Bakteriene er tilpasningsdyktige, og har evne til å utvikle resistens overfor disse.

1.2 Meticillinresistente *Staphylococcus aureus*

Ettersom flere bakterier har utviklet resistens overfor mer enn én type antibiotikum, multiresistens, blir behandlingsalternativene stadig færre. Når det gjelder *S. aureus*, er det flere bakteriestammer som har utviklet resistens mot alle betalaktamantibiotika. Noen stammer er også resistente overfor andre typer antibiotika. Multiresistente *S. aureus* betegnes “meticillinresistente *Staphylococcus aureus*” (MRSA). MRSA kan forårsake infeksjoner med få behandlingsalternativer (2).

Linezolid benyttes i dag som siste behandlingsutvei mot MRSA-infeksjoner, der annen behandling ikke har noen effekt. Norsk legemiddelhandbok presiserte i 2016 at linezolid kun bør benyttes mot resistente enterokokker og stafylokokker. Årsakene til dette, er at det er begrenset klinisk erfaring med linezolid. Det er også en del bivirkninger knyttet til legemiddelet (3).

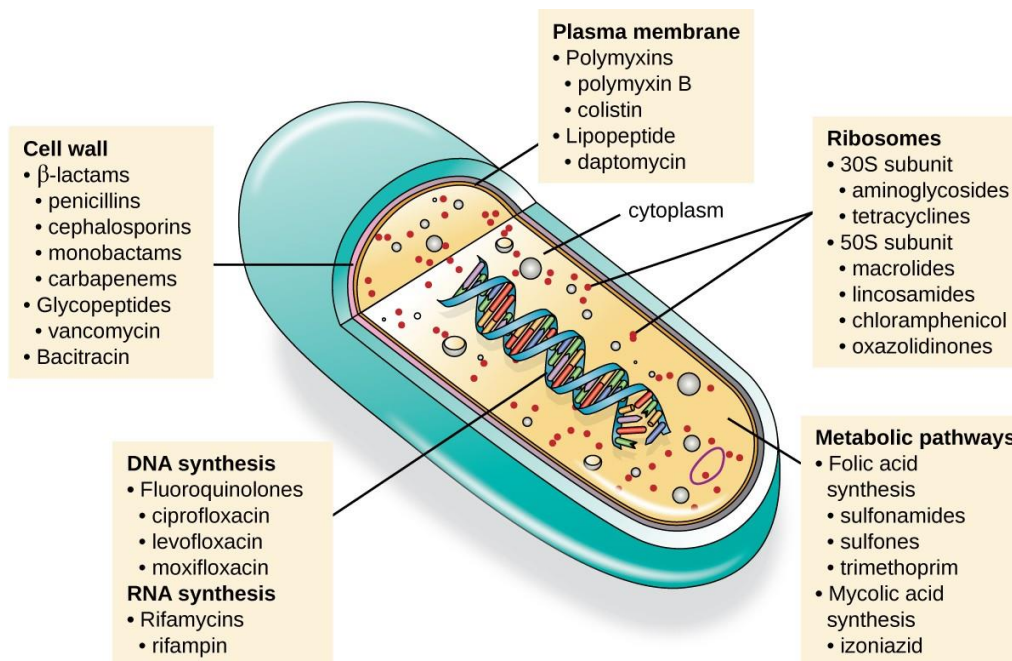
Norge fokuserer mye på forebyggende arbeid mot MRSA-infeksjoner i helseinstitusjoner. Myndighetene har utarbeidet en rekke retningslinjer som omhandler tiltak knyttet til MRSA-smitte. Folkehelseinstituttet og Helsedirektoratet har i den forbindelse utgitt en nasjonal veileder. Dette er et av tiltakene som skal hindre at MRSA etablerer seg, og blir en del av bakteriefloraen ved norske helseinstitusjoner (4).

1.3 Antibiotika og deres angrepspunkter

Antibiotika benyttes til behandling av infeksjoner forårsaket av bakterier. Antibiotika deles inn i midler som hemmer mikrobens vekst og formering uten bakteriedød (bakteriostatisk), og midler som fører til direkte bakteriedød (bactericid). Antibiotika kategoriseres også som bred- eller smalspektret. Smalspektret antibiotika angriper få bakteriegrupper. Bredspektret antibiotika angriper en større andel bakteriegrupper, og kan gi bivirkninger.

Antibiotika har forskjellige angrepspunkter i bakteriecellene. Antibiotika fungerer blant annet ved å hemme celleveggsyntese, hindre proteinsyntese, hemme nukleinsyresyntese, depolarisere cellemembranen og hemme essensielle metabolske trinn i cellen.

Figur 1 gir en oversikt over de ulike angrepspunktene (5).



Figur 1: Antibiotika angriper ulike deler av bakteriecellen (5).

Prosjektet omhandler resistens mot antibiotikumet linezolid, og virkningsmekanismene knyttet til andre antibiotika vil ikke bli beskrevet i detalj.

1.4 Antibiotikaresistens og resistensutvikling

Utbredt resistensutvikling er en dagsaktuell utfordring. Årsaker til dette er høyt totalforbruk i hele verden. Antibiotika benyttes ofte til behandling, uten at bakterier er påvist. Det høye forbruket i kombinasjon med utstrakt reisevirksomhet, øker risikoen for at resistente bakterier spres. En annen viktig årsak til resistensutvikling er det lokale forbruket, for eksempel på et sykehus, hvor antibiotika benyttes mye.

Bakterier kan utvikle forskjellige resistensmekanismer. Disse kommer til uttrykk på flere måter. Bakterien kan produsere antibiotikahemmende enzymer. Bakterien kan aktivt pumpe ut antibiotikumet av bakteriecellen. Bakterien kan hindre at antibiotikumet slipper inn. Bakterien kan endre målmolekylet, slik at antibiotikumet ikke kan utøve sin funksjon. Sistnevnte mekanisme ses blant annet ved linezolidresistens (1).

Bakteriens genom består av ett enkelt kromosom. Mange bakterier har i tillegg plasmider: mobile, ikke-kromosomale DNA-molekyler. Årsakene til bakteriers resistens er knyttet til mutasjoner i bakteriens kromosom, eller opptak av DNA ved hjelp av plasmider og transposoner (1).

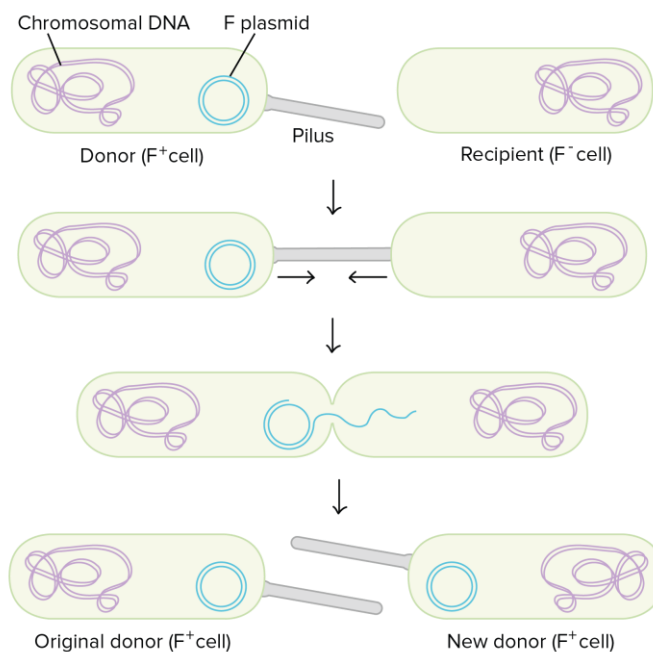
Mutasjoner gir grunnlag for både små og store DNA-forandringer. Små forandringer skyldes ofte punktmutasjoner, som kun endrer ett basepar i bakteriens DNA. Punktmutasjoner kan gi resistente egenskaper (1).

Store mutasjoner gir opphav til større omorganiseringer av bakteriecellens genom, ved at lengre DNA-sekvenser flyttes til andre områder av genomet. Flyttbare DNA-sekvenser kalles transposoner, og kan inneholde resistensgener. Forflytning av resistensgener skjer både innenfor kromosomer og plasmider. Resistensgener er gener som gjør bakterier resistente overfor enkelte antibiotika, ved at følsomheten reduseres (1).

Spredning av resistensgener forekommer både gjennom celledeling (vertikal genoverføring), og genoverføring mellom forskjellige bakterieceller (horisontal genoverføring). Det er påvist flere horisontalt overførbare resistensgener som gir linezolidresistens. Disse genene vil bli nærmere omtalt under avsnitt *1.6 Linezolidresistens*.

Horisontal genoverføring forekommer ved mekanismene transformasjon, transduksjon og konjugasjon. Transformasjon forekommer når fritt DNA i bakteriens omgivelser tas opp av en bakterie, og integreres i cellens eget DNA. Dette skjer enklest når det frie DNAet stammer fra nært beslektede celler. Transduksjon forekommer når DNA overføres fra en bakterie til en annen, ved hjelp av bakteriofager. Deler av bakteriens DNA tas opp ved virusreplikasjon, og blir en del av nye bakteriofager (6).

Konjugasjon er en mekanisme hvor overføring av gener skjer ved direkte kontakt mellom to celler. Overføringen skjer ved hjelp av sex-pili. Donorcellen (F^+) overfører deler av sitt plasmid til mottakercellen (F^-). Den delen av plasmidet som overføres, kalles F-plasmid eller R-plasmid, avhengig av hvilke gener plasmidet inneholder. F-plasmidet inneholder gener nødvendige for integrering i vertens kromosom, samt gener for egen formering - i tillegg til gener som koder for sex-pili. R-plasmidet inneholder også resistensgener, og gir mottakercellen nye egenskaper i form av resistens. Noen bakterier har F- eller R-plasmidet som en del av sitt kromosom. Der dette er tilfellet, vil mekanismen for konjugasjon være noe avvikende (7). Den generelle mekanismen for konjugasjon er illustrert på figur 2.



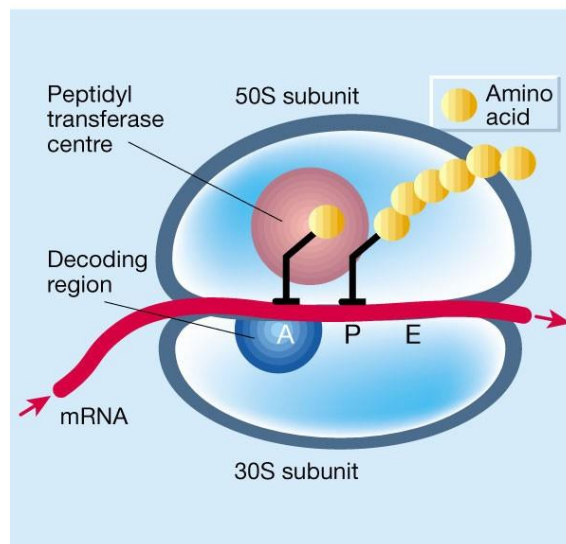
Figur 2: Det generelle bildet på horisontal genoverføring gjennom konjugasjon, hvor donorcellen overfører sitt F-plasmid til mottakercellen (8).

1.5 Linezolid og dets virkningsmekanisme

Linezolid er et fullstendig syntetisk antibiotikum, og tilhører en gruppe bakteriostatiske antibiotika som kalles oxazolidinoner. Linezolid ble godkjent for klinisk bruk på starten av 2000-tallet, som det første antibiotikumet i denne gruppen (9). I senere tid er andre oxazolidinoner tatt i bruk klinisk, tedizolid er ett av disse (10).

Oxazolidinoner har, i likhet med flere andre antibiotikagrupper, proteinsyntesen som sitt angrepspunkt. Linezolid inhiberer proteinsyntesen ved å hindre initiering av translasjonen. Translasjonen igangsettes etter dannelsen av et initieringskompleks. Komplekset består av den lille ribosomale subenhet (30S), den store ribosomale subenhet (50S), mRNA, fmet-tRNA (tRNA som bærer aminosyren methionin), GTP (energikilde) og initieringsfaktorer (IF1-3). Det ferdige initieringskomplekset utgjør til sammen 70S. 70S er et ribosom spesifikt for prokaryote organismer. Når 70S er dannet, initieres translasjonen (11).

Linezolid inhiberer translasjonen ved å binde seg til 50S. 50S er bygd opp av to forskjellige rRNA-sekvenser (5S og 23S), samt 34 ulike proteiner. Linezolid binder seg til peptidyl transferase center (PTC), som er lokalisert midt i 50S, og er omgitt av 23S rRNA-nukleotider. Dannelsen av 70S hindres ved at linezolid binder seg til PTC på ribosomet. Dermed hindres også proteinsyntesen i de prokaryote cellene (12). Figur 3 viser hvor PTC er lokalisert i ribosomet.



Figur 3: Forenklet illustrasjon av 70S-ribosomet og translasjonen. Figuren viser hvor PTC er lokalisert på 50S (13).

1.6 Linezolidresistens

Som nevnt er linezolid et syntetisk antibiotikum, og bakteriene har derfor ikke et naturlig reservoar av resistensgener overfor dette antibiotikumet (14). Det er likevel utviklet resistens mot linezolid. Graden av resistens har holdt seg relativt lav siden medikamentet ble tatt i bruk klinisk, men det oppdages stadig nye tilfeller av linezolidresistens verden over. Utviklingen av resistens overvåkes kontinuerlig, og det forskes på mekanismene bak.

Resistens mot linezolid kan oppstå både ved spontane kromosomale mutasjoner, og ved horisontal overføring av resistensgener som *cfr*, *optrA* og *poxA*.

Mutasjoner i 23S rRNA-sekvensen i 50S er den vanligste mekanismen bak linezolidresistens. Denne mekanismen skyldes som regel punktmutasjoner. Punktmutasjonene fører til direkte endring av PTC. Gram positive bakterier har flere genkopier av 23S rRNA, og for at resistens skal oppstå må flere av disse kopiene være muterte. Mutasjonene som er oppdaget, er både mutasjoner i den delen av 23S rRNA-sekvensen med direkte tilknytning til linezolid's bindingssete, og mutasjoner oppstått i områder av sekvensen med større avstand til bindingssetet. 23S rRNA kan ha én eller flere mutasjoner, og det undersøkes om et flertall av mutasjoner gir høyere grad av resistens (15).

Mutasjoner i gener som koder for ribosomale proteiner, som L3, L4 og L22, er også knyttet til linezolidresistens. Mutasjoner i genet *rplC*, som koder for protein L3, er den mutasjonen som er mest undersøkt. En del av L3 er lokalisert i nærheten av PTC, hvor linezolid har sitt bindingssete (16). Selv om mekanismene bak muterte ribosomale proteiner ikke er fullstendig kjent, tyder forskning på at slike mutasjoner gir redusert følsomhet for linezolid (17).

Det er oppdaget flere resistensgener som føre til linezolidresistens, deriblant *cfr*, *optrA* og *poxA*. Disse kan overføres horisontalt. Tilstedeværelse av resistensgenene, påvirker linezolid's bindingsevne til PTC.

Cfr står for chloramphenicol-florfenicol resistance gene, og koder for en metyltransferase. Metyltransferasen består av 349 aminosyrer, og metylerer adenosin i nukleotidposisjon 2503 (A2503) i 23S rRNA. Tilstedeværelse av *cfr* gir på den måten en metylert 23S rRNA, som endrer PTC. PTC er bindingssetet for en rekke antibiotika, deriblant linezolid, og mutasjoner

i PTC vil påvirke bindingen av disse. *cfr*-genet er en del av et transposon, og er som regel plassert på et R-plasmid. Plasseringen av *cfr*-genet, gir grunnlag for genoverføring til andre bakterier ved konjugasjon. Overføring av *cfr*-genet kan føre til at linezolid-sensitive stammer av *S. aureus*, blir resistente (18).

Resistensgener som *optrA* og *poxA*, er også knyttet til linezolidresistens. *Optra* og *poxA* koder for ABC-F-proteiner, assosiert med antibiotikaresistens (ARE ABC-F-proteiner). Proteinene tilhører “The ATP-binding cassette (ABC) superfamily”, og finnes i alle arter. Mange av proteinene har i oppgave å transportere stoffer gjennom cellemembranen. Transporten skjer ved hjelp av to ATP-bindende domener og to transmembrane domener. Resistensmekanismen bak resistensgener som *optrA* og *poxA* har lenge vært usikker. Forskere har undersøkt om resistensen skyldes en effluksmekanisme eller ribosombeskyttelse. Forskning har i senere tid vist at ARE ABC-F-proteiner ikke har transmembrane domener. Resistens forårsaket av *optrA* og *poxA* skyldes derfor ikke en effluksmekanisme (19). ARE ABC-F-proteiner gir resistens gjennom beskyttelse av ribosomet. Beskyttelsen skjer ved at proteinene interagerer med PTC i ribosomet og fjerner det bundne antibiotikumet. Resistensgenene som koder for ARE ABC-F-proteiner kan, i likhet med *cfr*, overføres til andre bakterier ved konjugasjon. ARE ABC-F-proteiner forårsaker ikke bare linezolidresistens. ARE ABC-F-proteiner vil også hindre binding av andre antibiotika med bindingssete i PTC (19).

Nedsatt linezolidfølsomhet forårsaket av resistensgener, forutsetter at disse genene er transkribert. Det forskes på hva som fører til transkripsjon av resistensgener (20).

1.7 Oppgavens hensikt

Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital benytter i dag diffusjonstest til deteksjon av linezolidresistens. Avdelingen benytter også en in-house Polymerase Chain Reaction-test (PCR-test) til deteksjon av resistensgenet *cfr*. Oppgaven var innledningsvis gitt av AMM ved St. Olavs hospital, som ønsket å utvikle en multiplex real time PCR for deteksjon av de overførbare resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*.

Grunnet endrede omstendigheter, ble oppgaven omgjort til å være teoretisk. Hensikten med denne oppgaven er å presentere laboratoriemetodene som ville blitt benyttet i opprinnelig oppgave: fenotypisk og genotypisk resistensbestemmelse av linezolid. Linezolidresistens er knyttet til resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*.

I oppgaven presenteres singleplex PCR som er publisert for deteksjon av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*. Primersekvenser som er benyttet for amplifikasjon av resistensgenene er sentralt i oppgaven. Oppgaven presenterer dataprogrammet *Primer3*, benyttet til primerdesign i undervisningssammenheng. Programmet ble i oppgaven benyttet til primerdesign for singleplex PCR til amplifisering av *cfr*, *optrA* og *poxA*. Hensikten med eget design av primere var å belyse essensielle betingelser knyttet til primerdesign. I oppgaven vil tidligere publiserte primere bli sammenlignet med egendesignede primere.

2. Materiale og metode

Bakteriers følsomhet for antibiotika, heretter omtalt som resistensbestemmelse, inngår i mikrobiologisk undersøkelse av pasientmateriale. Resistensbestemmelse benyttes til valg av antibiotika som kan ha effekt i behandling av aktuell infeksjon. Resistensbestemmelse benyttes også for generell overvåking av forekomst og utvikling av antibiotikaresistens. Resistensbestemmelse inkluderer metoder basert på bakterienes evne til å vokse i nærvær av ulike antibiotika og/eller deteksjon av kjente resistensgener.

Linezolid er ett av flere antibiotika som inngår i resistensbestemmelse av MRSA. Denne oppgaven baserer seg på litteratur og metoder benyttet til deteksjon av linezolidresistente MRSA ved St. Olavs hospital. St. Olavs hospital er nasjonalt referanselaboratorium for MRSA. De følgende avsnitt består av teori knyttet til metoder for deteksjon av linezolidresistente MRSA. Metoden planlagt brukt for deteksjon av resistensgener ved St. Olavs hospital var en multiplex real time PCR. Denne metoden er beskrevet i delkapittel 2.7. Siste del av kapittelet presenterer publisert litteratur med primere for amplifisering av resistensgenene, samt bruk av *Primer3* til primerdesign.

2.1 Dyrkning, identifikasjon og resistensbestemmelse av *S. aureus*

S. aureus vokser på dyrkningsmedier som sjokoladeagar og blodagar ved 37 °C.

Bakteriekolonier kan undersøkes etter ett døgn. *S. aureus* skiller seg fra andre stafylokokker, ved at den produserer enzymet koagulase. Bakteriens evne til produksjon av koagulase, utnyttes i identifikasjonstesten *Staph Plus* (Bio-Rad Laboratories). *Staph Plus* består av IgG, fibrinogen og antistoff mot kapsel på *S. aureus*. Disse er bundet til latexpartikler. Protein A, clumping faktor og kapselpolysakkarider på *S. aureus*, binder seg til latexpartiklene. Dersom *S. aureus* er tilstede, vil agglutinasjon oppstå (21).

Bakterien resistensbestemmes etter identifikasjon. Det finnes ulike metoder for resistensbestemmelse, deriblant diffusjonstest og PCR. Diffusjonstester er basert på at bakteriene under vekst eksponeres for ulike antibiotika. PCR er en genotypisk metode for påvisning av resistensgener. Begge metoder er nærmere beskrevet i egne kapitler. Funn av MRSA-stammer etter resistensbestemmelse, sendes til referanselaboratoriet for MRSA ved St. Olavs hospital. Laboratoriet oppbevarer identifiserte MRSA-stammer i

laboratoriets stammebank. MRSA-stammene benyttes til resistensovervåkning. I årsrapporten til referanselaboratoriet fra 2017 står det følgende: “Referanselaboratoriet har ansvar for innsamling av alle nye isolater av MRSA i landet i samarbeid med landets medisinske laboratorier, samt å gjennomføre en genotypisk karakterisering av tilsendte stammer” (22).

2.2 Resistensbestemmelse med diffusjonstester

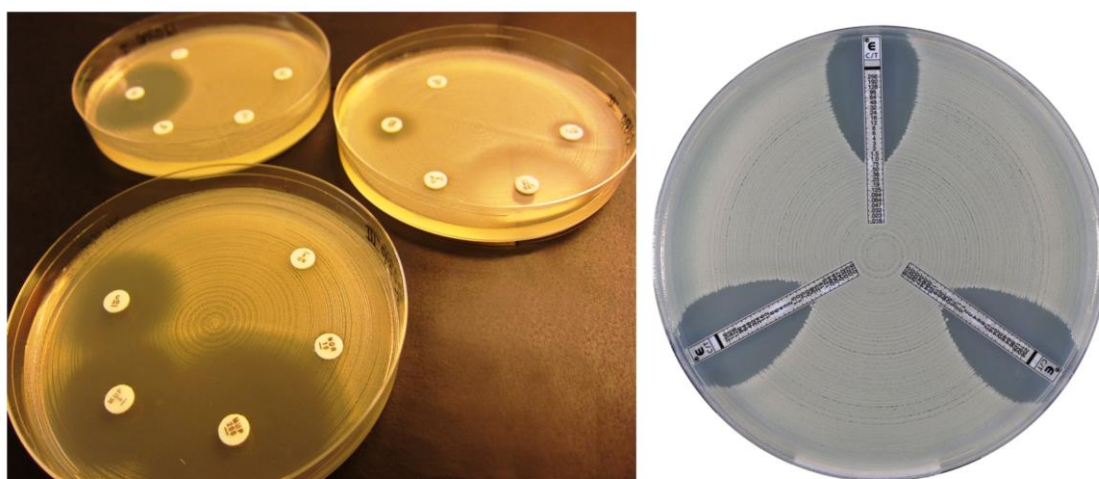
Den vanligste fenotypiske metoden for resistensbestemmelse er diffusjonstesting.

Bakteriekolonier fra renkultur overføres til fysiologisk saltvann, for å lage en bakteriesuspensjon. Tettheten i bakteriesuspensjonen måles med et densitometer.

Bakteriesuspensjonen fortynnes med saltvann til en tetthet på 0.5 McFarland. Suspensjonen spres på overflaten av en resistensagar, og antibiotika plasseres på mediet, før det inkuberes ved 37 °C i ett døgn. Det finnes flere typer diffusjonstester. Lappediffusjon og E-test er to av disse. Avlesning og vurdering av følsomhet er basert på hemningssoner; sonen med fravær av vekst som omgir de enkelte antibiotika (23).

Lappediffusjon er en metode hvor antibiotikatabletter plasseres på resistensagaren, med jevn avstand. Resultatene for hvert antibiotikum blir utgitt som sensitiv, intermedier eller resistent (S-I-R), avhengig av størrelsen på hemningssonen (23). Resistensbestemmelse ved lappediffusjon er vist på figur 4.

E-testen er en strips med graderende antibiotikakonsentrasjon som i likhet med antibiotikatablettene, plasseres på resistensagaren med jevn avstand. E-testen gir en indikasjon på minimum mengde medikament nødvendig for at antibiotikumet skal ha effekt i behandling, kjent som *minste inhiberende konsentrasjon* (MIC) (23). Resistensbestemmelse ved E-test er vist på figur 4.



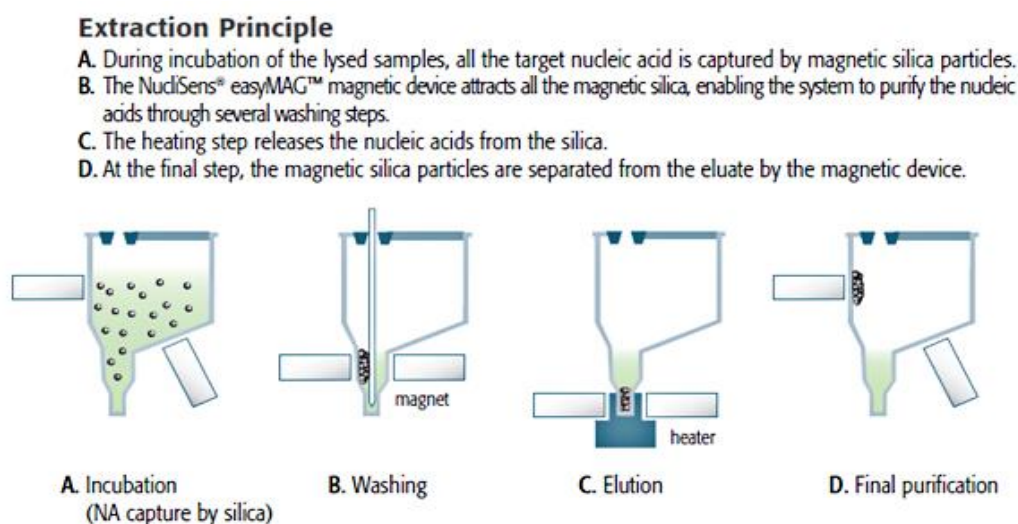
Figur 4: Diffusjonstest ved lappediffusjon (venstre) (24) og E-test (høyre) (25). Diffusjonstestene er avbildet etter inkubasjon, og viser hemningssoner for ulike antibiotika.

Diffusjonstest gjør det mulig å finne ut hvilke antibiotika mikroben er sensitiv for, og fungerer ved rutinemessig resistensbestemmelse. PCR kan benyttes til påvisning av resistensgener som *cfr*, *optrA* og *poxA*. Ekstraksjon av bakterielt DNA utføres før PCR.

2.3 Ekstraksjon av bakterielt DNA

Ekstraksjon benyttes for å tilgjengeliggjøre DNAet før amplifisering. Ekstraksjonsprosessen består i hovedsak av tre trinn: lysering av bakteriecellene, separasjon av DNA fra andre cellekomponenter og rensing av DNAet.

Ekstraksjon kan utføres ved å benytte Booms metode. Metoden kan automatiseres. Første trinn i ekstraksjonen er lysering. Hensikten med lysering er å bryte bakteriens cellemembran og cellevegg, slik at DNAet tilgjengeliggjøres før separasjon og rensing. Lysebuffer er en av flere mulige lyseringsmetoder. Booms metode er basert på at de frie nukleinsyrene i prøven binder seg til magnetiske silicakuler. De nukleinsyrebundne kulene trekkes mot magnetene, og ubundet cellemateriale fjernes så ved vasking. Metoden krever flere vasketrinn for at DNA-produktet skal bli så rent som mulig. Siste trinn i metoden er frigjøring av nukleinsyrene fra silicakulene. Dette kalles eluering. Elueringen foregår ved at prøven varmes opp, slik at bindingene mellom silicakulene og nukleinsyrene blir brutt (26). Figur 5 illustrerer prinsippet for Booms metode.



Figur 5: Ekstraksjon ved Booms metode. Lyserte nukleinsyrer binder seg til magnetiske silicakuler., og resterende cellemateriale fjernes. Prøven vaskes gjentatte ganger, for å rens DNAet (27).

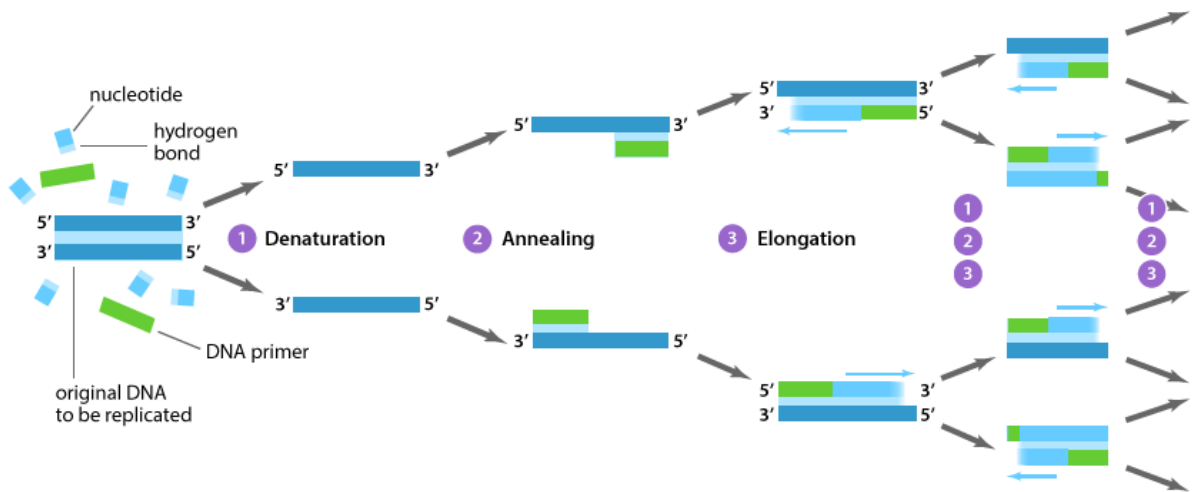
2.4 Prinsippet for Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode innen genteknologi, som benyttes for amplifisering av en bestemt DNA-sekvens. PCR har mange bruksområder, og kan blant annet benyttes til påvisning av resistensgener. De kommende avsnitt beskriver det teoretiske prinsippet for PCR.

Amplifikasjon av DNA ved hjelp av PCR, krever to spesifikke primere (forward og reverse). Primere er korte DNA-segmenter, komplementære til DNA-sekvensen som skal oppformeres. Den spesifikke DNA-sekvensen amplifiseres ved at primerne danner basepar med hver sin DNA-tråd. Forward primer binder seg på 3'-enden av den kodende tråden. Reverse primer binder seg på 3'-enden av den ikke-kodende tråden. Enzymet DNA-polymerase forlenger DNA-trådene i 5'-3'-retning (28).

En PCR-syklus består av tre prinsipielle trinn: denaturering, annealing og polymerisering. Mengden DNA dobles for hver syklus. Første trinn i en PCR-syklus er denaturering, hvor dobbeltrådet DNA blir enkeltrådet. Hydrogenbindingene mellom DNA-trådene blir brutt, ved at temperaturen i reaksjonen økes til cirka 95°C. Denaturering etterfølges av annealing. Temperaturen i reaksjonen senkes og primerne binder seg til hver sin DNA-tråd. Annealingstemperaturen bestemmes av primernes smeltetemperatur (T_m). En primers smeltetemperatur, avhenger av lengden og sammensetningen av nukleotider. Annealing er utgangspunktet for polymerisering i neste trinn. Polymerisering foregår ved 72°C. Ved denne temperaturen har DNA-polymerase høyest enzymaktivitet. DNA-polymerase fester nukleotider på den frie 3'-enden på begge primere (28). Figur 6 illustrerer de tre trinnene i en PCR-syklus: denaturering, annealing og polymerisering.

Det finnes mange PCR-metoder til amplifikasjon av én eller flere DNA-sekvenser. Metoder beregnet for amplifisering av én sekvens, betegnes singleplex PCR. Metoder beregnet for amplifisering av flere sekvenser, betegnes multiplex PCR. Avsnitt 2.7 omhandler multiplex PCR.

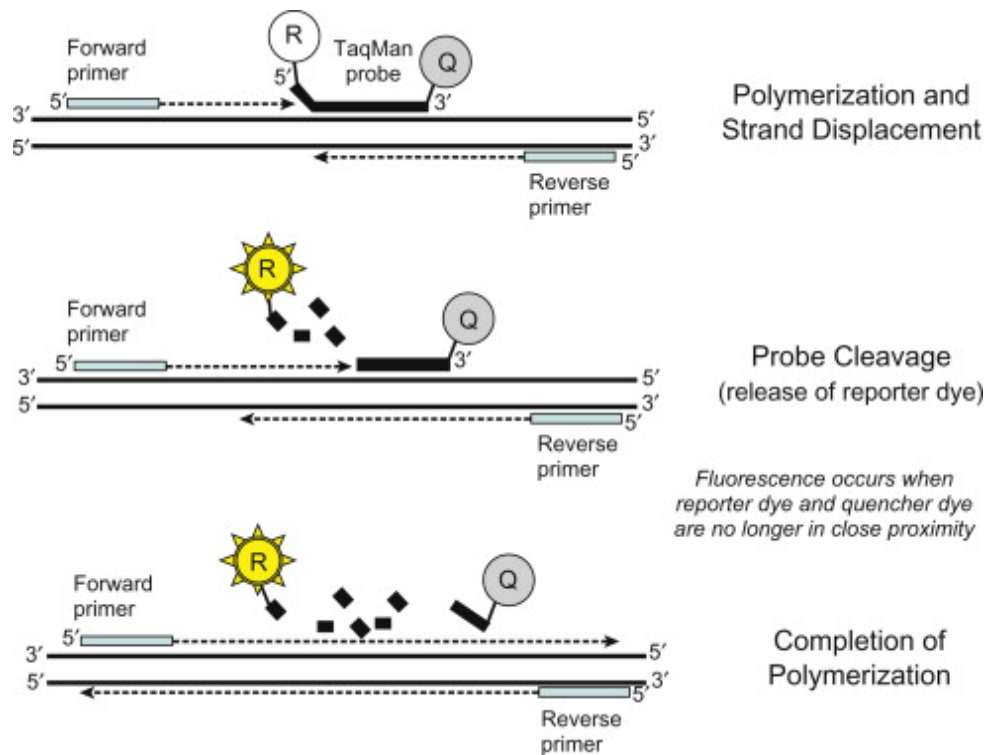


Figur 6: DNA amplifiseres ved PCR-reaksjonens tre trinn - denaturering, annealing og polymerisering. Mengden DNA fordobles for hver syklus (29).

2.5 Real Time Polymerase Chain Reaction

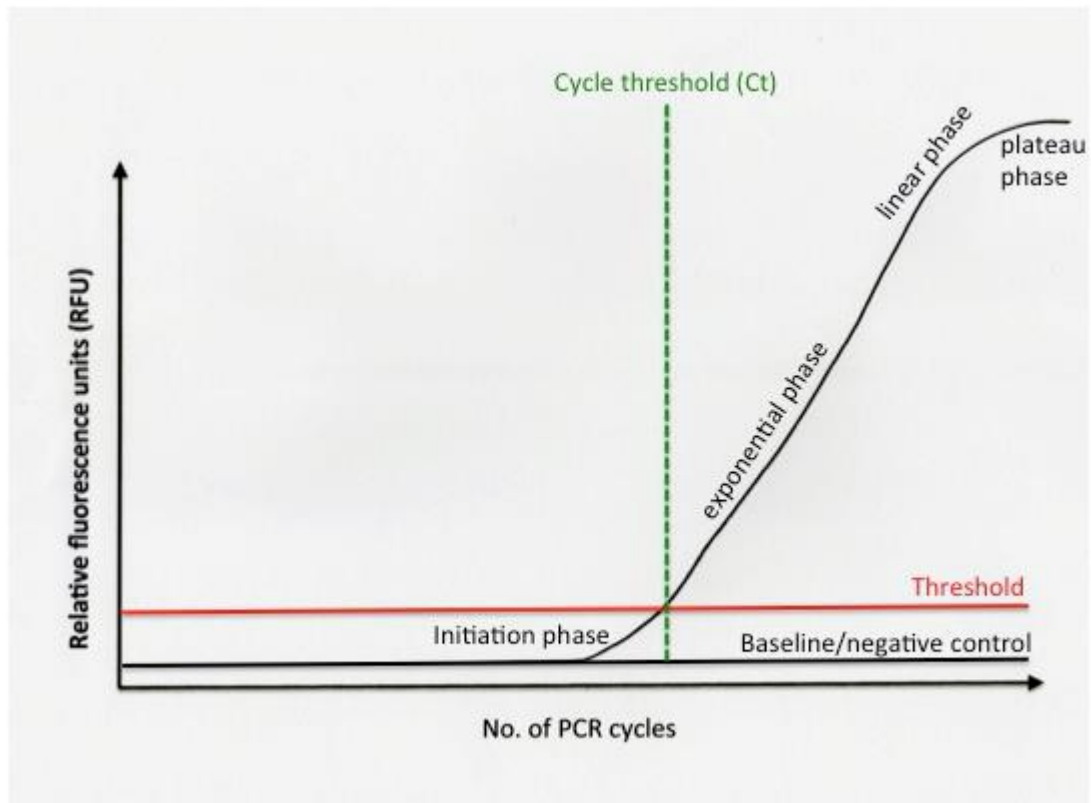
Real time PCR baserer seg på konvensjonell PCR, men til forskjell fra denne kan PCR-reaksjonen følges i sanntid. Real time PCR gjør det altså mulig å følge PCR-reaksjonen syklus for syklus. Mengden PCR-produkt måles til enhver tid ved hjelp av fluorescens. Det finnes flere fluorescensmetoder for å detektere PCR-produktet i sanntid. Benyttelse av spesifikke prober, som TaqMan, er en av disse. TaqMan-prober designes, avhengig av sekvensen eller sekvensene man ønsker å amplifisere. Probedesign vil bli nærmere omtalt i avsnitt 2.6 (28).

TaqMan-proben er en kort DNA-sekvens, komplementær til template-DNA. Proben binder seg i sekvensen mellom de primerbindende setene. TaqMan-proben har to fluoroforer bundet til seg: en reporterfluorofor og en quencherfluorofor. Quencheren absorberer energi utsendt fra reporteren, så lenge molekylene er i nærheten av hverandre. Energioverføringen er basert på *Förster resonance energy transfer* (FRET); energioverføring fra en fluorofor til en annen. DNA-polymerasen i TaqMan (Taq Polymerase) forlenger DNA-sekvensen som skal oppformes. Taq-polymerasens exonucleaseaktivitet bidrar til spalting av TaqMan-proben. Proben erstattes med nukleotider. Reporter- og quencherfluoroforen adskilles ved spalting. Reporterfluoroforen sender ut detekterbar fluorescens ved bestråling av lys (30). Figur 7 viser polymerisering i real time PCR, hvor TaqMan-proben spaltes og fluorescens oppstår.



Figur 7: Real time PCR, hvor fluorescens oppstår ved at TaqMan-proben spaltes (31).

Fluorescensen måles ved hjelp av et fluorometer. Resultatene fra real time PCR blir presentert ved hjelp av en amplifikasjonskurve. Kurven viser mengde fluorescens, i *Relative Fluorescence Units* (RFU) per syklus. Kurven har en threshold-linje. Threshold-linjen er satt til en bestemt fluorescensverdi, hvor fluorescenssignalet er høyere enn bakgrunnssignalet (støy). Amplifikasjonskurven er illustrert på figur 8. Figuren illustrerer også *Cycle threshold* (Ct), skjæringspunktet mellom fluorescenskurven og threshold. Ct-verdien er antall sykluser som må til for at fluorescenssignalet skal nå threshold. Ct sier noe om mengden template-DNA fra start (32). Real time PCR med TaqMan-prober, har som nevnt høy spesifisitet. Spesifisiteten gjør at metoden egner seg til deteksjon av resistensgener. Som et eksempel, vil tilstedeværelse av resistensgenet *cfr*, gi en fluorescenskurve som krysser threshold. En prøve uten gensekvensen til *cfr*, vil ikke krysse threshold.



Figur 8: Den generelle amplifikasjonskurven i real time PCR viser mengden fluorescens (RFU) per syklus (33).

2.6 Design av primere og prober til Real Time Polymerase Chain Reaction

Primere er essensielle for amplifisering av spesifikke DNA-sekvenser. Primerne må designes spesifikt for hver PCR-metode. Det benyttes forskjellige dataprogrammer til primerdesign, hvor det tas hensyn til kriterier som primerens lengde, dannelse av sekundærstrukturer, primerens smeltetemperatur og primerens prosentandel av guanin og cytosin (%GC-innhold). Spesifikke primere gjør det mulig å amplifisere resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxTA*.

Primerne må være lange nok til at de bindes spesifikt til det valgte området på DNA-sekvensen. Primerens spesifisitet øker for hver nukleotid. Korte primere kan potensielt binde seg til komplementære nukleotider på uønskede områder på DNA-sekvensen. Lange primere kan gjøre binding til template-DNA problematisk, blant annet grunnet forhøyet smeltetemperatur. Omkring 20 nukleotider er vanlig primerlengde. Primerlengden vil variere, avhengig av hva som skal amplifiseres (34).

Primere kan binde seg til seg selv og andre, slik at sekundærstrukturer oppstår. Hairpin er et eksempel på en sekundærstruktur. Hairpin dannes ved at to områder på primeren har komplementære baser, slik at primeren danner struktur med seg selv. Sekundærstrukturer kan også oppstå ved at to like primere (self dimer) eller to ulike primere (cross dimer) binder seg til hverandre. Sekundærstrukturer kan forebygges ved å ha jevn fordeling av de forskjellige basene i primeren. Repetitive sekvenser, som CCCCC eller ATATATAT, kan føre til sekundærstrukturer og uspesifikk binding til template-DNA (34). Dataprogrammer kan benyttes for å undersøke om designede primere danner sekundærstrukturer.

Dataprogrammene vil også ta høyde for primerens spesifisitet til ønsket DNA-sekvens, slik at uønsket binding til andre DNA-sekvenser unngås.

Primerens smeltetemperatur er essensiell for annealing til template-DNA.

Smeltetemperaturen er definert som temperaturen hvor ene halvdel av primeren er fri, og den andre halvdel er bundet til template-DNA. Primerens smeltetemperatur kan beregnes ved formelen $2x(A+T) \text{ } ^\circ\text{C} + 4x(G+C) \text{ } ^\circ\text{C}$, og brukes som utgangspunkt ved valg av annealingstemperatur. Dette er en forenklet formel, som kun gir en indikasjon på smeltetemperaturen.

Annealingstemperaturen settes lavere enn smeltetemperaturen, for å sikre spesifikk binding til template-DNA. Eksempelvis kan en for høy annealingstemperatur føre til utilstrekkelig annealing mellom primer og template. Utilstrekkelig annealing resulterer i et lavt utbytte av PCR-produkt. Motsatt, kan en for lav annealingstemperatur gi uspesifikke PCR-produkter, ved at primerne binder seg til uønskede områder på DNA-sekvensen (34). Det er en fordel at smeltetemperaturene til forward- og reverse primer er så like som mulig. Høy differanse mellom disse kan føre til et svakt oppformert PCR-produkt ved at kun én primer binder seg ved annealing (34).

Mengden av nukleotidene guanin og cytosin (%GC-innhold) øker primerens bindingsstyrke til template-DNA, noe som tas hensyn til ved primerdesign. Bindingen mellom G og C består av tre hydrogenbindinger, i motsetning til A og T som består av to. %GC-innhold påvirker en primers smeltetemperatur. Dieffenbach et al. forteller at primere med 20 nukleotider og et %GC-innhold på 50%, vil ha en smeltetemperatur mellom 56 og 62°C. Primeren binder seg også sterkere til template-DNA dersom 3'-enden på primeren ender på G- eller C (34).

Amplifisering av resistensgener utført med real time PCR, har i tillegg til primere, spesifikke prober. Probens spesifisitet er avgjørende for deteksjon av det oppformerte produkt. Proben må være komplementær til ønsket område av gensekvensen, mellom forward og reverse primer. Probedesign innebærer blant annet valg av reporter- og quencherfluorofor. Riktig valg av disse kan være med på å optimere PCR-resultatene.

Det finnes forskjellige reporterfluoroforer, som dekker ulike områder av emisjonsspekteret. Valg av reporterfluorofor til real time PCR, baserer seg hovedsakelig på instrumentet som benyttes. Instrumentet må kunne detektere det emitterte lyset fra fluoroforen, og detektorene varierer mellom ulike instrumenter. Instrumentet må også ha evne til å kalibrere fluoroforen (35). FAM (6-carboxyfluorescein) er et mye benyttet reportertermolekyl. FAM har en emisjonsbølgelengde på 520 nm, som ligger i den grønne regionen i det synlige spektrum. Denne fluoroforen er kompatibel med de aller fleste instrumenter. FAM har evne til å detektere svakt oppformerte produkter, da intensiteten av fluorescenssignalet er høy (35). Quenchere er fluoroforer med høy absorpsjonsevne, som ikke emitterer lys. Quenchere må ha evne til å redusere signalstøy når proben er intakt. Det finnes ulike typer quencherer, og en quencher velges på bakgrunn av reportertermolekylet (36).

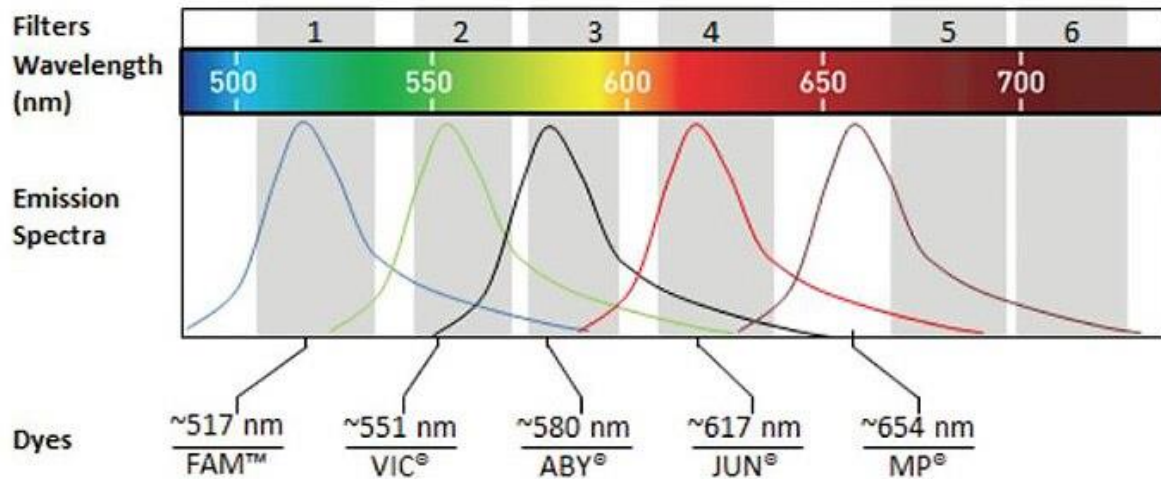
2.7 Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction

Multiplex real time PCR muliggjør amplifisering av flere ulike DNA-sekvenser samtidig, og kan derfor benyttes til amplifikasjon av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxtA*. Multiplex real time PCR er en tids- og kostnadseffektiv metode. Metoden krever kun små mengder prøvemateriale, da alle reaksjonene skjer i samme prøvebrønn. Multiplex real time PCR krever spesifikke primere og prober til alle DNA-sekvensene som ønskes amplifisert. Alle primerpar og prober tilsettes i samme reaksjonsmikse, noe som kompliserer metodeutviklingen (37).

Innføring av nye multiplex real time PCR, innebærer en rekke undersøkelser som danner grunnlaget for en spesifikk og funksjonell metode. Spesifikke primere designes for hver DNA-sekvens som ønskes amplifisert. Primerdesignet er mer krevende enn ved singleplex PCR. Risikoen for dannelse av sekundærstrukturer øker med antallet primere i reaksjonsmiksen. Primernes smeltetemperatur er en annen avgjørende faktor ved multiplex real time PCR. Primernes smeltetemperatur må være så lik som mulig for de ulike primerne, for å kalkulere en felles annealingstemperatur. Primere i en multiplex PCR designes med tilnærmet samme lengde og %GC-innhold, da dette er faktorer som påvirker smeltetemperaturen (37).

Probedesign til multiplex real time PCR, bygger på samme prinsipp som ved singleplex real time PCR. Probene som benyttes til deteksjon av DNA-sekvensene, designes med forskjellige fluoroforer. Fluoroforene som benyttes ved multiplex real time PCR sender ut fluorescens ved ulike bølgelengder, slik at de ikke overlapper i emisjonsspekteret. Alle valgte fluoroforer må være kompatible med samme instrument (35).

Figur 9 illustrerer emisjonsspekteret og emisjonsbølglengden til fem fluoroforer.



Figur 9: Emisjonsbølgelengden til fem fluoroforer brukt til real time PCR (38).

Proessen ved innføring av nye multiplex real time PCR, innebærer at de enkelte primerpar og prober i første omgang testes ved singleplex real time PCR. Videre følger utprøving og optimalisering av metoden med multiplex real time PCR. Optimalisering innebærer korrigerende av faktorer som konsentrasjoner, temperaturer og tid (37).

Oppgaven vil heretter hovedsakelig fokusere på singleplex PCR, som metode for amplifisering av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*.

2.8 PCR i litteratur benyttet til deteksjon av resistensgenene

Litteratursøk ble benyttet for å undersøke om det var publisert PCR for deteksjon av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxxA*. Tre referanseartikler ble utlevert i beskrivelsen av opprinnelig prosjekt. Artikkelen beskriver utviklede PCR for amplifikasjon av resistensgenene. Det er blitt søkt spesielt etter informasjon om sekvensdata, primere og temperaturprofiler i PCR-syklus i disse artikkelene. Informasjonen presenteres kortfattet i de kommende avsnitt. Metodene benyttet for å detektere PCR-produktene vil også bli belyst.

Etablert analyse av *cfr* ved singleplex PCR og gelelektroforese

Artikkelen utgitt av Kehrenberg og Schwarz (39), omhandler forskning omkring resistensgenene *fexA* og *cfr* i stafylokokkstammer. Artikkelen beskriver blant annet amplifisering av *cfr*, med egendesignede primere. Singleplex PCR er benyttet som metode, med gelelektroforese til deteksjon av PCR-produkt. Den beskrevne amplifiseringen gir et PCR-produkt på 746 basepar (bp).

Etablert analyse av *optrA* ved singleplex PCR og gelelektroforese

Brenciani et al. (20) har blant annet undersøkt tilstedeværelse av resistensgenene *cfr* og *optrA* i enterokokkstammer. Primere til amplifisering av *optrA* ble designet og publisert i dette studiet. Det er referert til artikkelen beskrevet i forrige avsnitt, og det er benyttet samme primere og PCR-metode for deteksjon av *cfr* (39). Informasjon om primersekvensene og produktstørrelse er tilgjengelig i supplerende data (vedlegg 1). Singleplex PCR ble benyttet som metode til amplifisering for hvert av de to resistensgenene. Deteksjonsmetoden for de amplifiserte produktene var gelelektroforese. De har også undersøkt stammens genuttrykk med PCR med revers transkriptase (RT) og uten RT. Resultatet fra gelelektroforese av PCR-produkter er vist i figur S1 i vedlegg 1. Størrelsen på PCR-produktet for *optrA* er oppgitt til å være 422 bp. Referansesekvenser til genene *cfr* og *optrA* er oppgitt med "accession number" AJ57936 og KP399637 (20).

Etablert analyse av *cfr*, *optrA* og *poxxA* med multiplex PCR og gelelektroforese

Bender et al. (40) har designet en multiplex PCR for simultan deteksjon av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxxA*. Det er benyttet tidligere publiserte primere for *cfr* og *optrA*, beskrevet i de to forrige avsnittene (39) (20). Primere for amplifisering av *poxxA* ble designet av Bender et al. i dette studiet. Sekvensdata for *poxxA* er ikke beskrevet i artikkelen. Gelelektroforese ble

benyttet til deteksjon av PCR-produktene. PCR-metoden beskrevet i artikkelen, forventer PCR-produkt med en fragmentstørrelse på 533 bp for poxtA (40).

2.9 Primerdesign med dataprogrammet *Primer3*

Det er gjort eget forsøk med primerdesign til singleplex PCR for analyse av *cfr*, *optrA* og *poxxA* i dette prosjektet. Primerdesignet ble utført for å belyse essensielle betingelser knyttet til primere. Oppgaven ble avgrenset ved kun å ta hensyn til primerlengde, smeltetemperatur og %GC-innhold. Primere designet i *Primer3* vil ikke bli testet ut i praksis, da dette er en teoretisk oppgave.

Primerdesignet ble innledet ved å søke etter gensekvensene til *cfr*, *optrA* og *poxxA* i *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)* (41). CARD er en database som blant annet inneholder gensekvenser assosiert med antibiotikaresistens. Gensekvensene til *cfr* (42), *optrA* (43) og *poxxA* (44) er vist i vedlegg 2, 3 og 4. Merk at disse sekvensene kan skille seg fra sekvenser benyttet i presenterte artikler (se avsnitt 2.8).

Primer3 (version 4.1.0) ble benyttet som dataprogram til primerdesign (45). Dataprogrammet er til fri bruk, og muliggjør primerdesign med egenvalgte innstillinger. Innstillingene innebærer blant annet valg av primerlengde, smeltetemperatur, %GC-innhold og mulighet for dannelse av sekundærstrukturer. Utviklerne understreker at det ikke finnes noen garanti for at resultater gitt av programmet, vil fungere i praksis (45).

Primerdesignet ble utført ved å sette inn gensekvensene for *cfr*, *optrA* og *poxxA* i *Primer3*. Programmets standardinnstillinger ble benyttet. Standardinnstillingene er bestemt av utviklerne til *Primer3*, på bakgrunn av teori om PCR og primerdesign. Primerdesignet utført i denne oppgaven baserer seg som nevnt på primerlengde, smeltetemperatur og %GC-innhold. Standardinnstillingen for tillatt differanse i smeltetemperatur, mellom forward og reverse primer, er satt til 5°C. Smeltetemperaturene er utgangspunktet for å kalkulere en annealingstemperatur. Beregning av smeltetemperatur i *Primer3* er basert på termodynamikk presentert i artikkelen "*Predicting DNA duplex stability from the base sequence*" (46). Standardinnstillingene er vist i tabell 1.

Tabell 1: Standardinnstillingene for primerlengde, smeltetemperatur og %GC-innhold i Primer3

	Minimum	Optimum	Maksimum
Primerlengde	18	20	23
Smeltetemperatur, T_m (°C)	57,0	59,0	62,0
%GC-innhold	30,0	50,0	70,0

I tillegg til de nevnte standardinnstillinger, vil programmet ta hensyn til en rekke andre standardinnstillinger ved design. Programmet gir ut flere forslag til primere. Forslagene rangeres etter hvor nære de er optimum til alle standardinnstillingene i programmet. Primerne programmet utga som de mest optimale, er vist i tabell 2, 3 og 4 i resultater.

Vedlegg 5 viser et utklipp fra *Primer3*, med primere til amplifikasjon av *cfr*-sekvensen.

3. Resultater

Valg av primere og PCR-innstillinger er to essensielle trinn i utviklingen av nye PCR. Denne delen av oppgaven presenterer ulike primere for amplifisering av *cfr*, *optrA* og *poxTA*. Egendesignede primere ble sammenlignet med primere fra tidligere publisert litteratur. Publiserte PCR-innstillinger til en multiplex PCR, for amplifisering av resistensgenene, presenteres til slutt.

Resultatene er vist i tabell 2, 3 og 4, og inneholder informasjon knyttet til primerparene: primerlengde, smeltetemperatur, annealingstemperatur, %GC-innhold og amplifiseringsstørrelse.

Smeltetemperaturen ble beregnet ved hjelp av formelen $2x(A+T)^{\circ}C + 4x(G+C)^{\circ}C$, både for primerparene hentet fra artikler, og for egendesignede primerpar. Dette ble gjort for å kunne sammenligne smeltetemperaturene. *Primer3* benytter, som nevnt, en annen formel for beregning av smeltetemperatur. Smeltetemperaturene beregnet i *Primer3* er også oppgitt i tabellen.

Annealingstemperaturene i tabellene ble hentet fra presenterte artikler, der anvendt temperatur var oppgitt. *Primer3* gir ingen informasjon om annealingstemperatur.

%GC-innhold i primere hentet fra presenterte artikler, ble beregnet ved hjelp av formelen:

$$\frac{\text{Antall } (G + C)}{\text{Totalantallet nukleotider}} \times 100\%$$

Primer3 beregner %GC-innhold automatisk.

Tabell 2 viser primersekvenser for amplifisering av *cfr*, med tilhørende informasjon. Tabellen inneholder to primerpar for resistensgenet, hvor det øverste primerparet er hentet fra litteratur (39), og det nederste er designet i *Primer3*. Design av egne primere er beskrevet i avsnitt 2.9.

Tabell 2: Primerpar for amplifisering av *cfr*, hentet fra artikkel og designet i dette prosjektet

<i>cfr</i>	Primersekvens	Primerlengde (nukleotider)	T _m (°C)	Annealingstemperatur (°C)	%GC	Amplifiseringsstørrelse (bp)
Referanse (39)	Forward primer: TGAAGTATAAAGC AGGTTGGGAGTCA	26	74	48	42,3	746
	Reverse primer: ACCATATAATTGA CCACAAGCAGC	24	68		41,7	
Egendesignede primere	Forward primer: ATGGGAATGGGTG AAGCTCT	20	60 (<i>Primer 3</i> : 58,70°C)	(Ikke oppgitt i <i>Primer3</i>)	50,00	211
	Reverse primer: TCAATTGCTGCG TTCCTCA	20	58 (<i>Primer3</i> : 58,40 °C)		45,00	

Tabell 3 viser primersekvenser for amplifisering av *optrA*, med tilhørende informasjon.

Tabellen inneholder to primerpar for resistensgenet, hvor det øverste primerparet er hentet fra litteratur (20). Informasjon knyttet til dette primerparet finnes i artikkelens supplerende data (vedlegg 1). Det nederste primerparet er designet i *Primer3*.

Tabell 3: Primerpar for amplifisering av *optrA*, hentet fra artikkel og designet i dette prosjektet

<i>optrA</i>	Primersekvens	Primerlengde (nukleotider)	T _m (°C)	Annealingstemperatur (°C)	%GC	Amplifiseringsstørrelse (bp)
Referanse (20)	Forward primer: TACTTGATGAACCT ACTAACCA	22	60	Ikke oppgitt	36,4	422
	Reverse primer: CCTTGAAGTACTGA TTCTCGG	21	62		47,6	
Egendesignede primere	Forward primer: AAGGGGACAGAAG CTTGAA	20	60 (<i>Primer 3</i> : 58,85°C)	(Ikke oppgitt i <i>Primer3</i>)	50,00	229
	Reverse primer: AGCAGTTCTGACCT CTGTGT	20	60 (<i>Primer 3</i> : 58,58°C)		50,00	

Tabell 4 viser primersekvenser for amplifisering av *poxA*, med tilhørende informasjon.

Tabellen inneholder to primerpar for resistensgenet, hvor det øverste primerparet er hentet fra litteratur (40), og det nederste er designet i *Primer3*.

Tabell 4: Primerpar for amplifisering av *poxA*, hentet fra artikkel og designet i dette prosjektet

<i>poxA</i>	Primersekvens	Primerlengde (nukleotider)	T _m (°C)	Annealingstemperatur (°C)	%GC	Amplifiseringsstørrelse (bp)
Referanse (40)	Forward primer: AAAGCTACCCATA AAATATC	20	52	50	30,0	533
	Reverse primer: TCATCAAGCTGTTT GAGTTC	20	58			
Egendesignede primere	Forward primer: AAACGAATGGGTC AAGAGCG	20	60 (Primer3: 58,84°C)	(Ikke oppgitt i <i>Primer3</i>)	50,00	163
	Reverse primer: ACCCCGAATAGTG GAAGGTG	20	62 (Primer3: 59,09°C)		55,00	

Bender et al. beskriver sine PCR-innstillinger for amplifisering av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*, i en multiplex PCR. PCR-innstillingene for én syklus er presentert i tabell 4.

Amplifiseringen bestod av 30 sykluser (40).

Tabell 5: Innstillinger for én PCR-syklus i en multiplex PCR for amplifisering av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*.

PCR-trinn:	Temperatur (°C)	Tid (s)
Denaturering	96	30
Annealing	50	30
Polymerisering	72	30

Det må presiseres at metoden, i tillegg til trinnene vist i tabell 4, bestod av et innledende denatureringstrinn (2 minutter) og et avsluttende elongeringstrinn (5 minutter).

4. Diskusjon

Oppgavens hensikt var som nevnt å presentere laboratoriemetodene for fenotypisk og genotypisk resistensbestemmelse av linezolid. Det ble fokusert på singleplex PCR for amplifisering av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*. Ved innføring av nye PCR, er det naturlig å søke i litteratur, for å se om det tidligere er utviklet PCR for ønsket gensekvens. Primere fra publiserte studier for deteksjon av resistensgenene, ble sammenlignet med egendesignede primere. Denne delen av oppgaven forsøker å se på PCR som metode til resistensbestemmelse, samt diskutere noen av forskjellene mellom publiserte og egendesignede primere.

PCR som laboratoriemetode for resistensbestemmelse

Denne oppgaven har forsøkt å undersøke ulike laboratoriemetoder for deteksjon av linezolidresistens. Gjennom arbeidet med oppgaven, er det erfart at PCR benyttes som deteksjonsmetode av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*. Forskjellige PCR-metoder benyttes til dette formål, eksempelvis singleplex- og multiplex PCR, hvor PCR-produktene kan detekteres på forskjellige måter. PCR er beskrevet i avsnitt 2.4-2.7. PCR er som nevnt en genotypisk metode. Sammenlignet med fenotypiske metoder, som diffusjonstester, kan PCR gi mer informasjon om årsaken til bakteriens resistens. Tilstedeværelse av resistensgener som *cfr*, *optrA* og *poxA*, kan eksempelvis være årsaken til linezolidresistens.

Utelukkende benyttelse av PCR til resistensbestemmelse av linezolid kan være en utfordring, da tilstedeværelse av et resistensgen ikke nødvendigvis fører til linezolidresistens. Dette ble erfart i studiet utført av Brenciani et al., hvor genet for *cfr* var tilstede, men ikke uttrykt (se avsnitt 2.8). Genet ble detektert med PCR, men videre studie med RT-PCR viste at *cfr* var “silent” (20). Studiet benytter også diffusjonstest for å kartlegge bakteriens følsomhet overfor antibiotika. Dette viser at PCR i kombinasjon med andre metoder for resistensbestemmelse, som diffusjonstest, gir et mer helhetlig bilde på bakteriens resistens.

Sammenligning av primere til amplifisering av resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*

Det ble som beskrevet i avsnitt 2.8 valgt å se på publisert litteratur som presenterer singleplex PCR, for deteksjon av resistensgenene. Dette er en naturlig del ved innføring av nye PCR. Egne primere ble designet i dataprogrammet *Primer3*, for å belyse noen essensielle betingelser knyttet til primerdesign. Primerne ble designet med hensyn til primerlengde, smeltetemperatur og %GC-innhold, for å se nærmere på disse betingelsene. Tidligere publiserte primere skiller seg fra egendesignede primere på flere måter, som vist i resultatdelen (tabell 2, 3 og 4).

Enkelte primere funnet i litteratur har flere nukleotider enn egendesignede primere. Som beskrevet i avsnitt 2.6 om primerdesign, øker primerens spesifisitet for hver ekstra nukleotid. Primerne til amplifisering av *cfr* har 26 (forward) og 24 (reverse) nukleotider. Disse er potensielt mer spesifikke enn egendesignede primere til *cfr*, som er kortere.

Primerne for *cfr* fra litteratur, har høyere smeltetemperatur enn egendesignede primere (se tabell 2). Økt smeltetemperatur kan ha sammenheng med den økte primerlengden til *cfr*. Primerne for *optrA* og *poxA* fra litteratur, har til sammenligning lavere smeltetemperaturer. Disse primerne består av færre nukleotider.

Flere av primerne hentet fra litteratur har høyere differanse i smeltetemperatur mellom forward og reverse primer, sett i forhold til egendesignede primere. Eksempelvis er differansen i smeltetemperatur 6°C, mellom forward og reverse primer for *cfr*. Primerne for *poxA* har samme differanse. *Primer3* har til sammenligning en grense på 5°C, når det gjelder differanse i smeltetemperatur. Programmets standardinnstilling er årsaken til at egendesignede primere, er designet med en lavere differanse i smeltetemperatur. Høy differanse i smeltetemperatur mellom forward og reverse primer kan påvirke annealing (se avsnitt 2.6).

Litteratur som beskriver amplifisering av *cfr*, benytter en annealingstemperatur på 48°C. Smeltetemperaturene er beregnet til å være 68°C og 74°C. Til sammenligning har metoden for amplifisering av *poxA*, benyttet en annealingstemperatur (50°C) nærmere smeltetemperaturene på 52°C og 58°C. Høy differanse mellom valgt annealingstemperatur og primernes smeltetemperaturer, kan føre til uspesifikke primerbindinger på DNA-sekvensen (se avsnitt 2.6). Utprøving av annealingstemperatur er som nevnt en del av optimaliseringen

ved innføring av nye PCR. Artikkelen hvor amplifiseringen av *optrA* er beskrevet, har ikke oppgitt annealingstemperatur. *Primer3* gir ikke ut anbefalinger til valg av annealingstemperatur. Dette er en av begrensningene ved primerne designet i *Primer3*.

%GC-innhold for egendesignede primere ligger mellom 30-70%. Dette er standardinnstillingen i dataprogrammet *Primer3*. Primere funnet i artikler har noe lavere %GC-innhold. %GC-innhold øker bindingsstyrken mellom primer og template-DNA (se avsnitt 2.6).

PCR-produktene for de aktuelle genene fra publisert litteratur, skiller seg fra PCR-produktene foreslått av *Primer3*. PCR-produktene utgitt av *Primer3*, er kortere og mer like i størrelse. *Primer3* utgir produkter med fragmentstørrelse på 211 bp for *cfr*, 229 bp for *optrA* og 163 bp for *poxA*. Metodene hentet fra litteratur forventer PCR-produkter med fragmentstørrelse på 746 bp for *cfr*, 422 bp for *optrA* og 533 bp for *poxA*. Artikkelen utgitt av Bender et al. benytter som nevnt designede primere til en multiplex PCR, med gelelektroforese til deteksjon (se avsnitt 2.8). Dette kan forklare forskjellen i amplifikasjonsstørrelse på disse produktene.

Gjennom arbeidet med oppgaven ble litteratursøk benyttet, for å undersøke utprøvde PCR-innstillinger i publiserte multiplex PCR for amplifisering av *cfr*, *optrA* og *poxA*. Dette ble undersøkt da valg av PCR-innstillinger er en del av prosessen når nye PCR skal utvikles. PCR-innstillingene fra artikkelen utgitt av Bender et al. er vist i tabell 5.

Avsnittene over beskriver noen av forskjellene mellom egendesignede primere, og primere funnet i artikler. Egendesignede primere ble designet med hensyn til smeltetemperatur, lengde og %GC-innhold, med bruk av standardinnstillingene i *Primer3*. Det er usikkert hvor funksjonelle primerne er på andre områder. Primerne er eksempelvis ikke undersøkt for sekundærstrukturer, og er ikke blitt testet ut i praksis. Primerdesignet i *Primer3* ble benyttet for å se nærmere på essensielle betingelser ved primere, samt gjøre et forsøk på å bruke et primerdesignprogram. Primere hentet fra litteratur er testet ut, og har fungert til amplifisering. Primerne er sannsynligvis justert etter utprøving. Det kan se ut til at *Primer3* er et noe forenklet dataprogram til primerdesign, spesielt dersom programmet skal benyttes til utvikling av real time PCR. Det finnes andre programvarer som designer både primere og prober.

Oppgavens hensikt omhandlet innledningsvis en multiplex metodeutvikling for resistensgenene *cfr*, *optrA* og *poxA*. Ved innføring av nye PCR, er det naturlig å søke i litteratur, for å se om det tidligere er utviklet PCR for ønsket gensekvens. Litteratursøket utføres før man eventuelt designer egne primere. Den publiserte multiplex PCR for amplifisering av resistensgenene, benytter gelelektroforese som deteksjonsmetode. Videreutvikling av den publiserte multiplex PCR for deteksjon av resistensgenene, vil være et naturlig steg i retning AMM sitt ønske om en multiplex real time PCR for deteksjon av overførbar linezolidresistens. Videreutviklingen vil blant annet innebære design av spesifikke prober, til hvert av de tre resistensgenene.

5. Referanser

1. Schøyen R. Mikroorganismer og sykdom: lærebok i mikrobiologi og infeksjonssykdommer for helsepersonell. 9. utg. Oslo: Gyldendal akademisk; 2011. 496 s.
2. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, mfl. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*. april 2019;17(4):203–18.
3. Forening for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok. L1.2.11.1 Linezolid | Legemiddelhåndboka [Internett]. Norsk legemiddelhåndbok. 2016 [sitert 29. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.11.1/Linezolid>
4. Nasjonalt folkehelseinstitutt, Helsedirektoratet. MRSA-veilederen [Internett]. 2009 [sitert 25. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2009-og-eldre/mrsa-veilederen.pdf>
5. Parker N, Schneegurt M, Tu A-HT, Lister P, Forster BM. Mechanisms of Antibacterial Drugs. I: Microbiology [Internett]. OpenStax; 2016 [sitert 23. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://opentextbc.ca/microbiologyopenstax/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>
6. Rogers K, Kadner RJ. Bacteria - Exchange of genetic information [Internett]. *Encyclopedia Britannica*. 2017 [sitert 5. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.britannica.com/science/bacteria>
7. Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Bacterial conjugation. *An Introduction to Genetic Analysis 7th edition* [Internett]. 2000 [sitert 4. mai 2020]; Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21942/>
8. Conjugation, transformation & transduction | Bacteria (article) | Khan Academy [Internett]. [sitert 24. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.khanacademy.org/science/biology/bacteria-archaea/prokaryote-structure/a/genetic-variation-in-prokaryotes>
9. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Des Devel Ther*. 18. juni 2018;12:1759–67.
10. Kisgen JJ, Mansour H, Unger NR, Childs LM. Tedizolid: A new oxazolidinone antimicrobial. *Am J Health Syst Pharm*. 15. april 2014;71(8):621–33.
11. Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1. mars 2005;69(1):101–23.
12. Long KS, Vester B. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. februar 2012;56(2):603–12.
13. Williamson JR. Small subunit, big science. *Nature*. september 2000;407(6802):306–7.
14. Toh S-M, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, mfl. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular Microbiology*. 1. juni 2007;64(6):1506–14.
15. Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals (Basel)*. 24. juni 2010;3(7):1988–2006.
16. Pakula KK, Hansen LH, Vester B. Combined Effect of the Cfr Methyltransferase and Ribosomal Protein L3 Mutations on Resistance to Ribosome-Targeting Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* [Internett]. 24. august 2017 [sitert 26. mars 2020];61(9). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5571294/>
17. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: Stable in vitro activity

- following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resistance Updates*. 1. april 2014;17(1):1–12.
18. Vester B. The cfr and cfr-like multiple resistance genes. *Research in Microbiology*. 1. februar 2018;169(2):61–6.
 19. Antonelli A, D’Andrea MM, Brenciani A, Galeotti CL, Morroni G, Pollini S, mfl. Characterization of poxtA, a novel phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1. juli 2018;73(7):1763–9.
 20. Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, Manso E, Mingoia M, Giovanetti E, mfl. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene optrA and a silent multiresistance gene cfr. *J Antimicrob Chemother*. 1. april 2016;71(4):1118–9.
 21. Bio-Rad Laboratories Diagnostics Group. PASTOREX STAPH PLUS pakningsvedlegg [Internett]. 2015 [sitert 4. mai 2020]. Tilgjengelig på: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/no/56353_881175_NO.pdf
 22. Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA. Årsrapport for MRSA [Internett]. 2017 [sitert 2. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/Laboratoriemedisin/Avdeling%20for%20medisinsk%20mikrobiologi/MRSA/%C3%85rsrapport%20for%20MRSA%20referanselaboratorium%202017.pdf>
 23. Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål. Resistensbestemmelse av bakterier metodebeskrivelse [Internett]. 2012 [sitert 2. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://unn.no/documents/kompetansetjenester,%20sentre%20og%20fagr%C3%A5d/afa%20%20arbeidsgruppen%20for%20antibiotikasp%C3%B8rsm%C3%A5l/metoder/resistensbestemmelse%20av%20bakterier%20metodebeskrivelse%20afa%20v1%201%202012.pdf>
 24. Bioingeniøren. MRSA – et økende helseproblem [Internett]. Bioingeniøren. 2012 [sitert 2. mai 2020]. Tilgjengelig på: <http://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/2012/fagartikkel-mrsa--et-okende-helseproblem/>
 25. ETEST® Ceftolozane/Tazobactam (C/T) [Internett]. bioMérieux Clinical Diagnostics. [sitert 2. mai 2020]. Tilgjengelig på: Test strip for MIC determination of Ceftolozane/Tazobactam
 26. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. mars 1990;28(3):495–503.
 27. NUCLISENS® EASYMAG® [Internett]. bioMérieux United Kingdom & Ireland. [sitert 1. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.biomerieux.co.uk/product/nuclisensr-easymagr>
 28. Søren Nørby PKAN. *Medicinsk genetik*. 2. utg. 4 oplag. København: FADL; 2017. 423 s.
 29. PCR - Introduction | ABM Inc. [Internett]. [sitert 2. mai 2020]. Tilgjengelig på: https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php
 30. CLC BIO. TaqMan manual [Internett]. [sitert 5. mai 2020]. Tilgjengelig på: <http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/551/index.php?manual=TaqMan.html>
 31. TaqMan - an overview | ScienceDirect Topics [Internett]. [sitert 24. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taqman>
 32. Thermo Fischer Scientific. Real-time PCR: understanding Ct [Internett]. 2016 [sitert 5. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169->

- CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf
33. The Lowdown on Real-Time PCR – Part 1 - Nordic Biosite [Internett]. [sitert 24. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://nordicbiosite.com/blog/the-lowdown-on-real-time-pcr-part-1-2>
 34. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 12. januar 1993;3(3):S30–7.
 35. Ellen Prediger, Integrated DNA Technologies, Ellen Prediger. Selecting dyes for multiplex qPCR [Internett]. [sitert 5. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/recommended-dye-combinations-for-multiplex-qpcr>
 36. Ellen Prediger, Integrated DNA Technologies. qPCR Probes—selecting the best reporter dye and quencher [Internett]. [sitert 5. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/qpcr-probes-selecting-the-best-reporter-dye-and-quencher>
 37. Henegariu O, Heerema N a., Dlouhy S r., Vance G h., Vogt P h. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques.* 1. september 1997;23(3):504–11.
 38. TaqMan Multiplex Real-Time PCR (qPCR) Solution - NO [Internett]. [sitert 5. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/taqman-multiplex-qpcr-solution.html>
 39. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant *Staphylococcus* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1. april 2006;50(4):1156–63.
 40. Bender JK, Fleige C, Klare I, Werner G. Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxxA* in enterococci of clinical origin. *Journal of Microbiological Methods.* 1. mai 2019;160:101–3.
 41. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, mfl. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 8. januar 2020;48(D1):D517–25.
 42. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database [Internett]. [sitert 3. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://card.mcmaster.ca/ontology/40028>
 43. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database [Internett]. [sitert 3. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://card.mcmaster.ca/ontology/40402>
 44. *poxxA*.
 45. Untergasser A, Koressaar T, Skaletsky H, Rozen S, Remm M. Primer3 - Input [Internett]. 1996 [sitert 4. mai 2020]. Tilgjengelig på: <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>
 46. Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1. juni 1986;83(11):3746–50.

6. Vedlegg

Vedlegg 1

Supplementary data

Table S1. Principal oligonucleotide primer pairs used

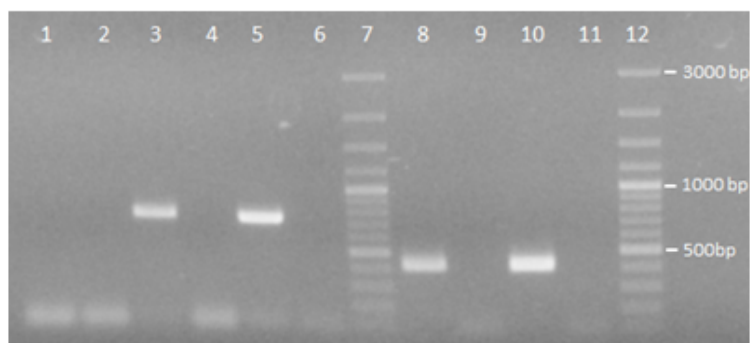
Gene	Primer		Reference	Product size (bp)
	Designation	Sequence (5'-3')		
Resistance genes				
<i>optrA</i>	optrA-fw ^a optrA-rv	TACTTGATGAACCTACTAACCA CCTTGAACACTGATTCTCGG	This study	422
<i>optrA</i>	optrA-longfw optrA-longrv	TTGTCCAAAGCCACCTTTGCAATTG GATGAGAGAATTGGAAGTTATGTAA	This study	1,968
<i>cfr</i>	cfr-fw ^a cfr-rv	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	1	746
<i>cfr</i>	cfr-longfw cfr-longrv	ATGAAAGAAATGAATTTAATAATA TATTATTAATAATTCATTTCTTTCAT	This study	1,059
<i>fexA</i>	fexA-fw fexA-rv	CGCATCTGAGTAGGACATAGC TTGCCCGAACCTCCCATTG	This study	1,046
<i>fexB</i>	fexB-fw fexB-rv	TAACATCAGTACGGATATTG AGTCTACACTTGGCTTAGG	This study	374
Mutations in 23S rDNA				
<i>rDNA23S</i>	V1 V2	GCGGTCGCCTCCTAAAAG ATCCCGGTCCTCTCGTACTA	2	420
Detection of circular intermediates				
<i>optrA</i>	optrA-inv1 optrA-inv2	TGGTTAGTAGGTTTCATCAAGTA CCGAGAATCAGTAGTTCAAGG	This study	
<i>cfr</i>	cfr-inv1 cfr-inv2	CCGTTTCTACTCTCTCATTG TATTGACGCTGCTTGTGGT	This study	

^a The primer pair was used also in RT-PCR experiments.

References

1. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006; **50**: 1156-63.
2. Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G *et al.* Linezolid resistance in Sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 2004; **190**: 311-7.

Figure S1. Electrophoresis of RT-PCR performed on total RNA from *E. faecium* E35048 and from *Staphylococcus epidermidis* SP1. Lanes 1 to 6, transcription analysis of *cfp* gene. Lanes 8 to 11, transcription analysis of *optrA* gene. Lane 1: *E. faecium* E35048 RT+ (RT-PCR with reverse transcriptase); Lane 2: *E. faecium* E35048 RT- (RT-PCR without reverse transcriptase); Lane 3: *S. epidermidis* SP1 (positive control) RT+; Lane 4: *S. epidermidis* SP1 RT-; Lane 5: DNA sample of *E. faecium* E35048 (positive control); Lane 6: DNA sample of *E. faecalis* ATCC 29212 (negative control); Lane 7: GeneRuler 100-bp plus DNA Ladder (Thermo Scientific); Lane 8: *E. faecium* E35048 RT+; Lane 9: *E. faecium* E35048 RT-; Lane 10: DNA sample of *E. faecium* E35048 (positive control); Lane 11: DNA sample of *E. faecalis* ATCC 29212 (negative control); Lane 12: GeneRuler 100-bp plus DNA Ladder (Thermo Scientific). The numbers on the right are molecular size markers.



Vedlegg 2

cfr-nukleotidsekvens hentet fra CARD

5'ATGAATTTTAATAATAAAACAAAGTATGGTAAAATACAGGAATTTTAAAGAAGTAATAATGAGCCTGA
TTATAGAATAAAACAAATAACCAATGCGATTTTTAAACAAAGAATTAGTCGATTTGAGGATATGAAGGT
TCTTCCAAAATTACTTAGGGAGGATTTAATAAATAATTTGGAGAAACAGTTTTGAATATCAAGCTCTTA
GCAGAGCAAAATTCAGAGCAAGTTACGAAAGTGCTTTTTGAAGTATCAAAGAATGAGAGAGTAGAAAC
GGTAAACATGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCATTTTGTATATCATCACAATGCGGATGTAATTTTGG
GTGTAATTTTGTGCTACAGGCGACATTGGATTGAAAAAAACCTAACTGTAGATGAGATAACAGATCA
AGTTTTATACTTCCATTTATTAGGTCATCAAATTGATAGCATTTCCTTTATGGGAATGGGTGAAGCTCTA
GCCAACCGTCAAGTATTTGATGCTCTTGATTTCGTTTACGGATCCTAATTTATTTGCATTAAGTCCTCGTAG
ACTTTCTATATCAACGATTGGTATTATACCTAGTATCAAAAAATAACCCAGGAATATCCTCAAGTAAAT
CTTACATTTTCATTACACTCACCTTATAGTGAGGAACGCAGCAAATTGATGCCAATAAATGATAGATACC
CAATAGATGAGGTAATGAATATACTCGATGAACATATAAGATTAACCTCAAGGAAAGTATATATAGCTT
ATATCATGTTGCCTGGTGTAAATGATTCTTTGAGCATGCAAACGAAGTTGTTAGCCTTCTTAAAAGTCCG
CTATAAATCAGGGAAGTTATATCATGTAATTTGATACGATACAATCCTACAATAAGTGCACCTGAGAT
GTATGGAGAAGCAAACGAAGGGCAGGTAGAAGCCTTTTACAAAGTTTTGAAGTCTGCTGGTATCCATGT
CACAAATTAGAAGTCAATTTGGGATTGATATTGACGCTGCTTGTGGTCAATTATATGGTAATTATCAAAAT
AGCCAATAG 3'

Vedlegg 3

optrA-nukleotidsekvens hentet fra CARD

5'TTGTCCAAAGCCACCTTTGCAATTGCTAGTACTAACGCAAAGGAGGATATGAAAATGCAATACAAAAT
AATTAATGGTGCCGTTTACTATGATGGTAATATGGTGTTGGAAAACATCGGTATTGAAATCAATGATAA
TGAAAAGATTGCTATTGTTGGTAGAAATGGATGTGGAAAACAACCTTGCTAAAAGCTATTATAGGCGA
AATTGAATTAGAAGAAGGAACTGGTGAAAAGTGAGTTTCAAGTAATAAAGACCGGTAACCTTATATTAG
CTATTTAAGACAGATGCCTTTTGAAGATGAAAGTATATCAATGGTGGATGAAGTCCGTACGGTATTTAA
GACGCTTATTGATATGGAAAACAAGATGAAACAGCTGATAGATAAAAATGGAGAATCAATATGATGATA
AAATCATCAATGAATACTCTGATATCAGTGAAAGGTATATGGCTCTTGGAGGTCTAACCTACCAAAAAG
AATATGAAACGATGATTCGTAGTATGGGTTTTACTGAAGCAGATTATAAAAAACCCATTTCTGAATTTT
AGGTGGTCAGCGAACTAAGATAGCTTTTATAAAAAATACTTTTAAACAAAAGCCAGACATTCTATTACTT
GAACCTACTAACCCACTTGATATAGAAAACAATACAATGGTTGGAGAGTTATTTGAGAAGTTATAAAATCT
ACATTGGTTATTATTTCCCATGATAGAATGTTTCTTAATCGAATTGTGGATAAAGGTTTATGAAATCGAAT
GGGAGAGACCAAATGTTATAAAGGTAATTATTCAGCCTTTGAGGAGCAAAAACGAGAAAATCATATC
AAACAGCAAAAAGATTACGACTTGCAACAGATGAAAATTGAAAGGATTACACGCTTGATTGAACGTTTT
CGTTATAAACCTACGAAAGCTAAAATGGTGCAATCTAAAATTAATTAATACAGCGTATGCAAATATTA
AATGCACCAGACCAATACGATACAAAACTTATATGTCTAAATTTCAACCGAGAATCAGTAGTTCAAGG
CAAGTATTAAGTGCTTCAGAACTTGTGATAGGCTATGATACTCCTCTTGCAAAGGTTAATTTCAACCTTG
AAAGGGGACAGAAGCTTGGAATTGTTGGGAGTAATGGTATTGGTAAATCCACGTTGCTTAAAACACTTA
TGGGTGGTGTGGCAGCATTGTCTGGAGATTTTAAATTCGGATACAATGTTGAAATTAGCTATTTTGACCA
ACAGCTTGCTCAAATCAGTGGAGATGATACACTATTTCGAAATTTTCAAAGCGAATACCCTGAGCTAAA
TGACACAGAGGTCAGAACTGCTCTTGGCTCATTTAGTTTAGTGGAGATGATGTTTTTAGACCGGTGTC
TCTTTGTCAGGTGGAGAAAAGGTTAGATTGACATTATGTAAATTATTATATAAACGTAATAATGTTTTAA
TCTTAGATGAACCGACAAACCACATGGATATTATTGGAAAAGAGAATTTAGAGAATATCTTATGCAGTT
ATCAAGGTACAATTAATTTTGTGTCACATGATAGATATTTTACTAATAAGATTGCTGACAGATTACTTGT
TTTTGATAAGGATGGTGTAGAGTTTGTACAATCTACTTATGGTGAGTACGAGAAAAAAGGATGAATTC
TGAAAAGCCATTTAATAACATTAAGTTGAGCAGAAAGTAGAGAAAAATAACACAGTAAAAGGCGATC
GTAACCTCATTGAGAAGGAGAAGGTTAAGAAGGAGAAAACGAATTGAAAAGCTTGAAGTGTTAATAAAT
CAATATGATGAAGAATTGAAAAGATTGAATAAAATCATTTCTGAACCAACAATTCTTCTGATTATATA
GTACTGACGGAAATACAAAAATCAATTGATGATGTTAAAAGGTGTCAGGGTAATTATTTAATGAATGG
GAACAGTTGATGAGAGAATTGGAAGTTATGTAA 3'

Vedlegg 4

poxA-nukleotidsekvens hentet fra CARD

5' ATGAAAGGTAAAAATATGAATTTAGCCTTTGGGTTGGAAGAAATTTATGAGGATGCTGAGTTTCAAAT
CGGAGATTTGGATAAAGGTCGGTATTGTTCGGCGTGAACGGAGCCGAAAGACCACCTTGTTCCGCCTGCT
GTTGGGAGAACTTGAACCTGATAATGGTTCACCTGACCAGTGGAAATGCCCGTATTGGTTATCTCCACA
GGAAATTGTCTTGGAAGATGAGGATATTACCGTTTGGGATTCCTTTTTGAGGGACGTCCGATTA
GTATGAGCAGGAATTGGAAGAAATCTATAAAAAGCTTGAAACCGCAGTCAATGCAGAGCAGGAAGCAC
TGCTTGCCCGAATGGGAACATTGCAAGAACGCTTGGAGTATTTTCGACTTCTATGAGGCAGAAACAATTC
TGTTGGAGTTTGCAGATAAAATGAGCATTGATGCAGAATTATATCATCGTCCGATGAGAGAGCTTTCAG
GCGGACAAAAATCCAAAATGGCATTGTCAGACTACTATATTCAAACCGGAAATTCATTGTTGGATG
AGCTACCAACCATTTAGATGTCAGCACAAAGGATTTTGTATAAAATACTTAAAGAATTATAGGGGTT
CGGTACTGATTATCAGCCATGATATTGATTTTCTAAATCGGATTATCAACAAAATTATGTACATCAACAA
AGCTACCCATAAAAATATCTGTTTATGATGGAGACTACTACATCTACAAGAAAAAGTATGCAGAGGAACA
GCGGATTCGTGAAATGGCGATTGTACAGCAGGAAAAAGAAATAAAGGAGCTTTCGATTTTGTACAAA
AAGCAAAACAAGCCAGTCAGACCAATCATCACCTCAAACGAATGGGTCAAGAGCGAGCCTTGCGGCTT
GATAAAAAGCGTGGAGAGCTGCAAAAGAGAAATCGACTGTACAAGCGTGTGAAGATGGATATTCGCC
CAAGCGTGAAGGGGCACAAGTCCCTTAGAGGTGGAAAATATCACCTTCCACTATTCGGGGTATCCAC
CCTTATCAGAACCTTTCCTTTCAGATTAACGGAAGAGAACGATTTCTTGTGGTGGGTGAAAACGGTGT
GGTAAATCCACCTTATTGAAATTGATGATGGGTATTCTCAGTCCAGATGAAGGATGCATTTCGCTTTAAC
AGAAAACGATATTGCATATTATGCACAGGAACTCGAACAGCTTGATGAAAACAAAACGGTCATTGACA
ATGTGGAGTCTGAAGGATATACACCGTGGCAATCAGAGCCGTAAGCAACTTCTGTTTATGATG
ACGATGTAAACAAGAAAGTATCTGTGCTGTCCCCTGGAGAAAAAGCAAGGGTTGCCCTTTCGAAAATCC
TATTACAGAAAGCCAATCTTTTGATACTGGACGAGCCGACCAACCACCTTGACCCAGAAACGCAGAAAA
TCATTGGCGGCAACTTCAATTTGTTTGGAGGAAACCATTATTGCCGTTAGCCATAACCCATCCTTTGTGGA
ACAAATCGGAATTAGCCGTATGCTTATTTGCCAGCGGTCGAATTGAACCCTATCCCGTGAGCTGCTT
GGTATTATTATGAAATCAACGGTCTGTTGCAAAGTTTTAA 3'

KEYS (in order of precedence):

>>>>> left primer
<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
1 LEFT PRIMER	295	21	59.04	47.62	0.00	0.00	0.00	GCAGGTTGGGAGTCATTTTGT
RIGHT PRIMER	482	20	58.70	50.00	0.00	0.00	0.00	AGAGCTTCACCCATTCCCAT
PRODUCT SIZE:	188,	PAIR ANY_TH COMPL:	3.97,	PAIR 3'_TH COMPL:	0.00			
2 LEFT PRIMER	790	20	57.83	45.00	21.98	9.39	0.00	TCTCTTGAGCATGCAAACGA
RIGHT PRIMER	1018	20	58.56	50.00	0.00	0.00	0.00	GACCACAAGCAGCGTCAATA
PRODUCT SIZE:	229,	PAIR ANY_TH COMPL:	0.00,	PAIR 3'_TH COMPL:	0.00			
3 LEFT PRIMER	207	21	58.49	42.86	0.00	0.00	0.00	AGCAGAGCAAAAATTCAGAGCA
RIGHT PRIMER	380	20	57.80	45.00	0.00	0.00	0.00	TTCAATCCAATGTCGCCTGT
PRODUCT SIZE:	174,	PAIR ANY_TH COMPL:	0.00,	PAIR 3'_TH COMPL:	0.00			
4 LEFT PRIMER	655	20	57.07	45.00	0.00	0.00	0.00	GAGGAACGCAGCAAATTGAT
RIGHT PRIMER	809	20	57.83	45.00	20.33	10.81	0.00	TCGTTTGCATGCTCAAGAGA
PRODUCT SIZE:	155,	PAIR ANY_TH COMPL:	10.65,	PAIR 3'_TH COMPL:	8.63			

Statistics

	con	too	in	in	not	no	tm	tm	high	high	high	high	high		
	sid	many	tar	excl	ok	bad	GC	too	too	any_th	3'_th	hair-	poly		
	ered	Ns	get	reg	reg	GC%	clamp	low	high	compl	compl	pin	X		
													stab	ok	
Left	5571	0	0	0	0	2032	0	2842	70	0	0	75	48	0	504
Right	5572	0	0	0	0	1787	0	2997	70	0	0	31	47	0	640

Pair Stats:

considered 6940, unacceptable product size 6934, primer in pair overlaps a primer in a better pair 1582, ok 6
libprimer3 release 2.4.0

(primer3_results.cgi release 4.1.0)

