

Vanessa Frydeborg
Ajia Pennavaria

Kan det være fordelaktig å benytte genotypiske resistensbestemmelser for linezolidresistens hos Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)?

Bacheloroppgave i Bioingeniør
Veileder: Kine Husteli Kristiansen
Mai 2020

Vanessa Frydeborg
Ajia Pennavaria

**Kan det være fordelaktig å benytte
genotypiske resistensbestemmelser
for linezolidresistens hos
Meticillinresistente *Staphylococcus
aureus* (MRSA)?**

Bacheloroppgave i Bioingeniør
Veileder: Kine Husteli Kristiansen
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Vi er to kvinnelige studenter som skriver denne bacheloroppgaven som en avsluttende del av vår Bachelorgrad ved Bioingeniør-utdanningen ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim.

Verden står i dag ovenfor en skremmende utvikling hos bakterier – antibiotikaresistens. Enkelte stammer av Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) har blitt resistent mot linezolid, et av de siste effektive antibiotikamidlene mot bakterien. Vår oppgave går ut på å finne ut om det kan være fordelaktig å benytte genotypiske resistensbestemmelser sammen med fenotypiske i kampen mot å detektere og følge linezolidresistensen.

Dette synes vi har vært, og enda er, et veldig interessant, viktig og skremmende tema. Prosessen med å skrive bacheloroppgaven har vært lærerik, og til tross for utfordringer i forbindelse med den pågående Covid-19-pandemien, har vi her vårt endelige og ferdige produkt!

Vi vil rette en stor takk til vår kunnskapsrike og behjelpelige foreleser og veileder, Kine Husteli Kristiansen. Tusen takk for alle gode og konstruktive tilbakemeldinger og oppmuntringer som har vært til stor hjelp under oppgaveskrivingen. Vi vil også takke spesialbioingeniør Torunn Gresdal Rønning og overlege Hege Enger ved nasjonalt referanselaboratorium for MRSA ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi, St. Olavs Hospital i Trondheim for besvarelse på spørsmål og gjennomlesing av oppgaven.

Sammendrag

Formålet med denne oppgaven var å finne ut av hvorfor det kan være hensiktsmessig å benytte genotypisk resistensbestemmelse sammen med fenotypisk resistensbestemmelse av linezolidresistens hos Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). I sammenheng med den økende trusselen MRSA har i samfunnet i dag, har det blitt lagt fokus på fordeler og ulemper ved fenotypiske og genotypiske resistensbestemmelser.

I oppgaven svares det på problemstillingen: Hvorfor er det en fordel å benytte genotypisk resistensbestemmelse av linezolid hos MRSA?

For å finne ut av dette ble det utført en litteraturstudie. Hovedfokuset ble lagt på *Staphylococcus aureus*, MRSA, mekanismene som fører til antibiotikaresistens og de ulike metodene for resistensbestemmelse.

Litteratursøket bestod hovedsakelig av å lese seg opp på nødvendig teori ved bruk av ulike databaser, faglige lærebøker og relevante nettsider.

Resultatet belyser utfordringer og uoverensstemmelser spesifikt til fenotypiske metoder ved deteksjon av linezolidresistens hos MRSA og *Staphylococcus aureus* generelt. Det blir også diskutert fordeler og ulemper ved bruk av polymerase kjedereaksjon (PCR) som genotypisk metode for å påvise de ulike genene som koder for linezolidresistens.

Litteraturstudien konkluderer med at å benytte og øke bruken av genotypiske metoder vil kunne bidra til bedre kontroll av linezolidresistens hos MRSA. Dette kan gi bedre og enklere kontroll over forekomsten av resistensgenene *cfr*, *poxtA* og *optrA*, og dermed resistensutviklingen hos MRSA.

Antibiotikaresistens kommer ikke til å forsvinne eller minske av seg selv. Vi håper at med nye opplysninger og bedre verktøy vil veien mot å benytte genotypiske resistensbestemmelser satses mer på i framtiden i kampen mot antibiotikaresistens.

Abstract

The purpose of this thesis is to outline the use of genotypic susceptibility testing in addition to phenotypic susceptibility testing for linezolid resistance in Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and why this would be suitable. Taking into context the increasing threat that MRSA poses to today's society, both the advantages and disadvantages of phenotypic and genotypic susceptibility testing were of direct focus.

This report seeks to answer the question: Why is it advantageous to utilize genotypic susceptibility testing of linezolid in MRSA?

To do this, a literature review was conducted with a focus on *Staphylococcus aureus*, MRSA, as well as the mechanisms that lead to antibiotic resistance and the various methods used in antibiotic resistance testing. The literature examined consisted largely of necessary theory found using various databases, textbooks, and relevant websites.

The results of the review highlight the challenges and discrepancies specific to phenotypic methods in the detection of linezolid resistance in MRSA and *Staphylococcus aureus* in general. The advantages and disadvantages of using the polymerase chain reaction (PCR) as the preferred genotypic method for detection of various genes encoding for linezolid resistance were also discussed.

This literature review concludes that together, the utilization of PCR and at the same time increasing the use of genotypic methods, will be able to contribute to better control of linezolid resistance in MRSA. This can lead to improved and more manageable control over the presence of the specific resistance genes *cfr*, *poxA*, and *optrA*, and thus resistance development within MRSA.

Antibiotic resistance will not slow down or disappear on its own. We hope that with new information and improved tools, that genotypic susceptibility testing will be of stronger focus in the coming years in the fight against antibiotic resistance.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse.....	IV
Forkortelser	1
1. Innledning	2
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1.1 Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1.2 Antibiotika og resistensutvikling	4
1.1.3 Linezolid	7
1.1.4 Resistensbestemmelse	8
1.2 Konvensjonell PCR.....	10
1.2.1 Primere	12
1.2.2 Visualisering av PCR produkt.....	12
1.3 Real-Time PCR	13
1.3.1 TaqMan-probe.....	15
1.4 Multi-Plex PCR.....	16
2. Materiale og Metoder.....	18
2.1 Valg av metode	18
2.2 Litteratursøk.....	18
2.3 Validitet og reliabilitet	19
2.4 Etske sider.....	20
2.5 Feilkilder	20
3. Resultater og diskusjon	21
3.1 Oppfølging av linezolidresistensen	21
3.2 utfordringer og uoverensstemmelser ved bruk av fenotypiske resistensbestemmelser	21
3.3 utfordringer ved bruk av genotypiske resistensbestemmelser.....	24
3.4 Konklusjon.....	25
5. Referanser	27

Forkortelser

E-test – Epsilometertest

EuCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HLA – Human leukocyt-antigen

K-res – Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens

NordiCAST – Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

NTNU – Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

MRSA – Meticillinresistente *Staphylococcus aureus*

MSSA – Meticillinsensitive *Staphylococcus aureus*

MIC – Minste inhiberende konsentrasjon

PBP – Penicillinbindende protein

PCR – Polymerase kjedereaksjon

VPN – Virtual private network

1. Innledning

1.1 *Staphylococcus aureus*

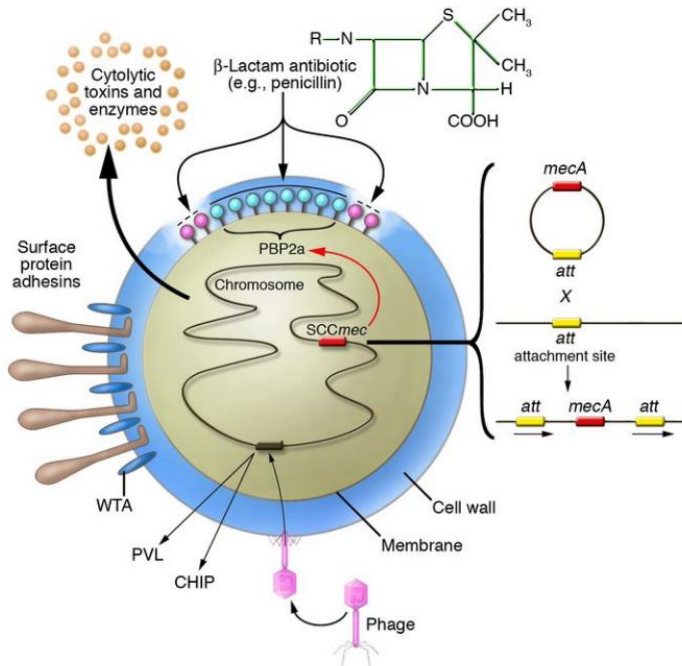
Stafylokokker er en bakterietype som tilhører menneskets normalflora på hud og i slimhinner, og de deles inn i to hovedgrupper; hvite og gule stafylokokker. De gule stafylokokkene, også kalt *Staphylococcus aureus*, er den mest patogene av disse to, og forårsaker hyppigst sykdom. Sykdommene kan variere fra sårinfeksjoner, matforgiftning, toksisk sjokksyndrom og livstruende sykdommer som sepsis, lungebetennelse og hjernehinnebetennelse (1).

En av årsakene til at *Staphylococcus aureus* kan forårsake mange ulike sykdommer kommer blant annet av bakteriens virulensfaktorer. Dette er blant annet cytotoxiner som fører til poredannelse og inflammatoriske forandringer (2), og en stor variasjon av enzymer som protease, lipaser og hyluronidase som ødelegger vev, se figur 1. I tillegg har de et superantigen som binder til human leukocyt-antigen (HLA) klasse 2-proteiner, og videre fører til massiv celleaktivering og økt cytokinproduksjon. Superantigenet gjør at bakteriene unngår det spesifikke immunforsvaret (3).

1.1.1 Meticillinresistente *Staphylococcus aureus*

Sammen med den økende antibiotikabruken i verden har resistente bakterier blitt en stadig mer økende trussel, og med nyutviklede antibiotikatyper kommer det nye resistensmekanismer og resistensgener (4).

Staphylococcus aureus deles ofte inn i meticillinsensitive (MSSA) og meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (4). Meticillin er en penicillinase-resistent penicillin (5), og årsaken til resistensen er at MRSA har genene *mecA* eller *mecC*. Disse koder for et penicillinbindende protein, PBP2a, som har lav affinitet til betalaktamantibiotika som meticillin, andre penicilliner og cefalosporiner. *MecA*-genet er lokalisert i Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) (5), dette er illustrert i figur 1.



Figur 1: En skematisk illustrasjon av MRSA sine virulensfaktorer og hvordan den har resistens mot meticillin. Blant virulensfaktorene er det her overflateproteiner, cytotoxiner og enzymer. I tillegg er SCCmec uthevet med mecA-genet som koder for det penicillinbindende proteinet PBP2 som gir resistens mot betalaktamantibiotika. (6)

MRSA smitter vanligvis gjennom direkte kontaktsmitte, men det kan i noen tilfeller forekomme luftsmitte via avstøtte hudceller. I seg selv gir ikke MRSA verre infeksjoner enn andre stafylokokker, men grunnet den økende antibiotikaresistensen er den derimot vanskeligere å få behandlet. Det er derfor et stort fokus på å hindre at MRSA spres på sykehus og andre helseinstitusjoner. Dette gjøres ved å utføre nøye smitteoppsporing, isolasjon av mistenkte tilfeller og undersøkelser. Forekomsten av MRSA er foreløpig lav i Norge, men økt reisevirksomhet fører til et større smittepress mot norske helseinstitusjoner (4).

Det er viktig å ha gode rutiner på å oppspore og hindre spredning av MRSA, men det er vel så viktig å behandle riktig. Økt antibiotikabruk er en av de hovedårsakene til at antibiotikaresistens har blitt et så stort problem som det er i dag. For å redusere selektivt trykk hos bakteriestammene må bruken av antibiotika reduseres (7). Dette gjelder også ved kontroll av videre resistensutvikling hos MRSA.

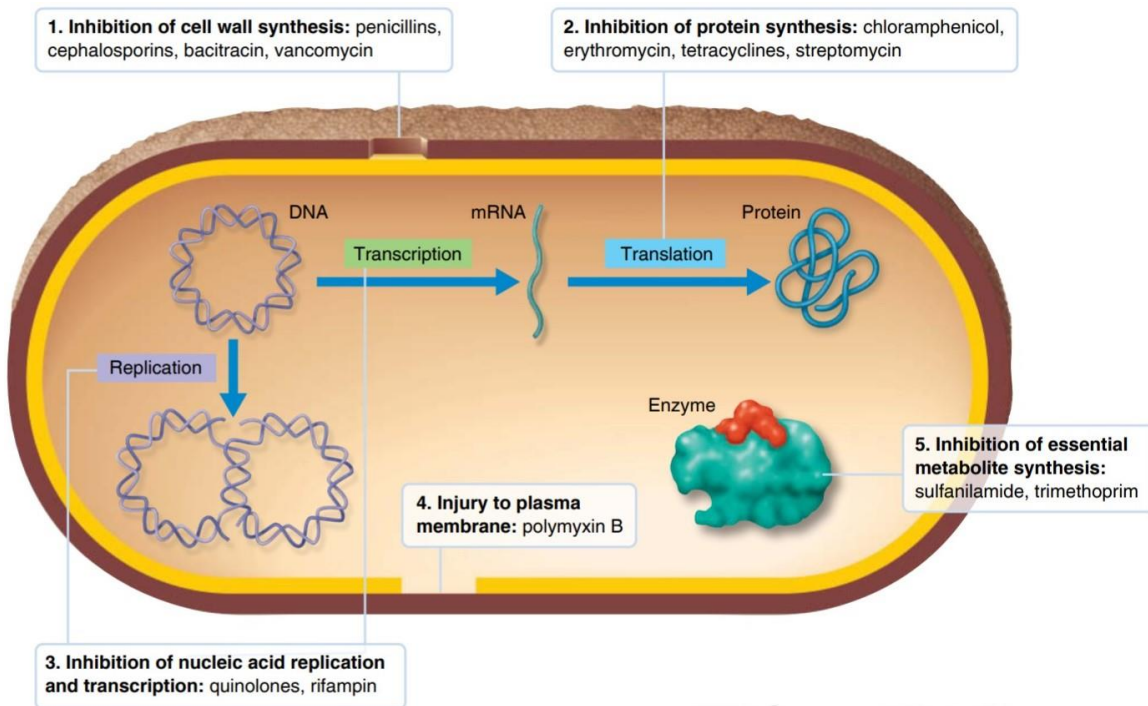
For å bidra med og følge utviklingen av MRSA i Norge ble det i 2006 opprettet et nasjonalt referanselaboratorium for MRSA ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi, St. Olavs Hospital i Trondheim. Der utføres det genotypisk karakterisering av stammene, noe som bidrar til god epidemiologisk overvåking i landet som hjelper med å både identifisere nye stammer og utbrudd på nasjonal basis (8). I tillegg blir det holdt oversikt over generell antibiotikaresistens og nye resistensutviklinger ved laboratoriet Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens (9) ved Universitetssykehuset i Nord-Norge (10).

1.1.2 Antibiotika og resistensutvikling

Antibiotika er en av de største oppfinnelsene innen moderne medisin, og har forhindre mange dødsfall, redusert barnedød og økt levealderen betraktelig. Antibiotika kan enten fungere bakteriostatisk ved å hindre vekst og/eller formering, eller bakterisidisk ved å drepe bakteriene. Dette foregår hovedsakelig gjennom å angripe bakteriene på fem ulike måter; inhibering av celleveggsyntesen, proteinsyntesen, DNA-replikasjonen, essensielle metabolske trinn eller depolarisering av cellemembranen (11), se figur 2. Dessverre har den voldsomme bruken av antibiotika ført til gode vekstvilkår for de resistente bakteriene, noe som videre er årsaken til den økende mengden resistente bakterier (12).

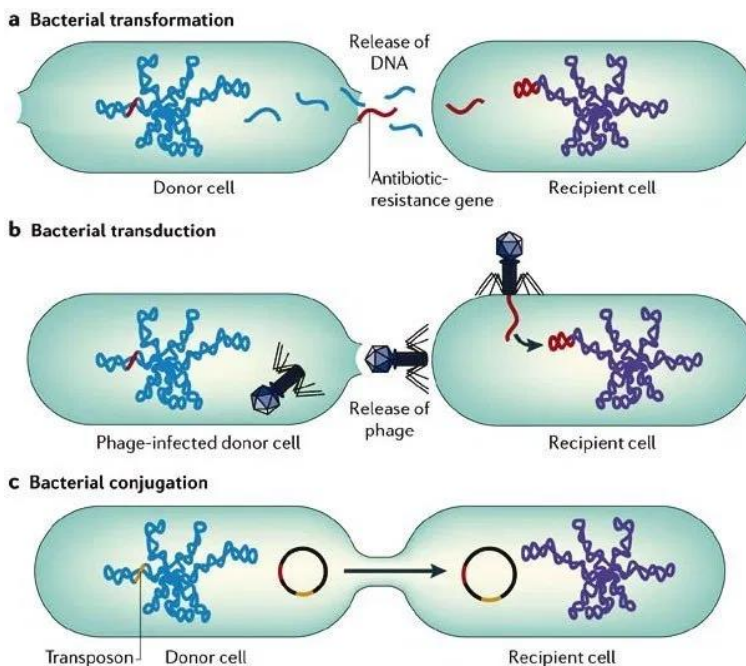
Antibiotikaresistens er en trussel mot global helse som krever tiltak både nasjonalt og internasjonalt for å forhindre en fremtid uten effektiv antibiotika. Den største konsekvensen av å ikke ha effektiv antibiotika vil være at infeksjoner som i dag regnes som ufarlige kan gi dødelige utfall (13). I tillegg vil det påvirke prosesser som operasjoner, transplantasjoner og kreftbehandling hvor det også er helt nødvendig med antibiotika (14).

Bakterier som har utviklet resistens mot antibiotika har økt de kliniske og økonomiske belastningene for helsevesenet med mer enn 50%, samt bidratt til en økt risiko for at nye patogener rammer verdensbefolkningen (15). Derfor har det blitt nødvendig med utvikling av nye metoder som kan påvise resistens hos bakterier, både for å kunne identifisere dem, forstå funksjonen deres, og behandle pasienter så effektivt som mulig.



Figur 2: Viser de ulike mekanismene antibiotika kan angripe bakteriecellen på; inhibering av celleveggsyntese, proteinsyntese, DNA-replikasjon, essensielle metabolske trinn og skade av cellemembranen. (16)

Bakterienes resistens kan deles inn i to hovedkategorier - naturlig og ervervet resistens. Naturlig resistens kommer av iboende gener som koder for en bestemt resistensmekanisme, eller manglende strukturer og metabolske prosesser som antibiotikumet er rettet mot. Ervervet resistens kommer derimot av genetiske mutasjoner som kan videreføres med horisontal genoverføring (17). Den horisontale genoverføring kan foregå på tre ulike måter; transformasjon, konjugasjon eller transduksjon, som vist i figur 3. Transformasjon er opptak av nakent DNA, konjugasjon er overføring av DNA mellom to levende bakterier og transduksjon er overføring av DNA mellom bakterier gjennom bakteriofager (17).

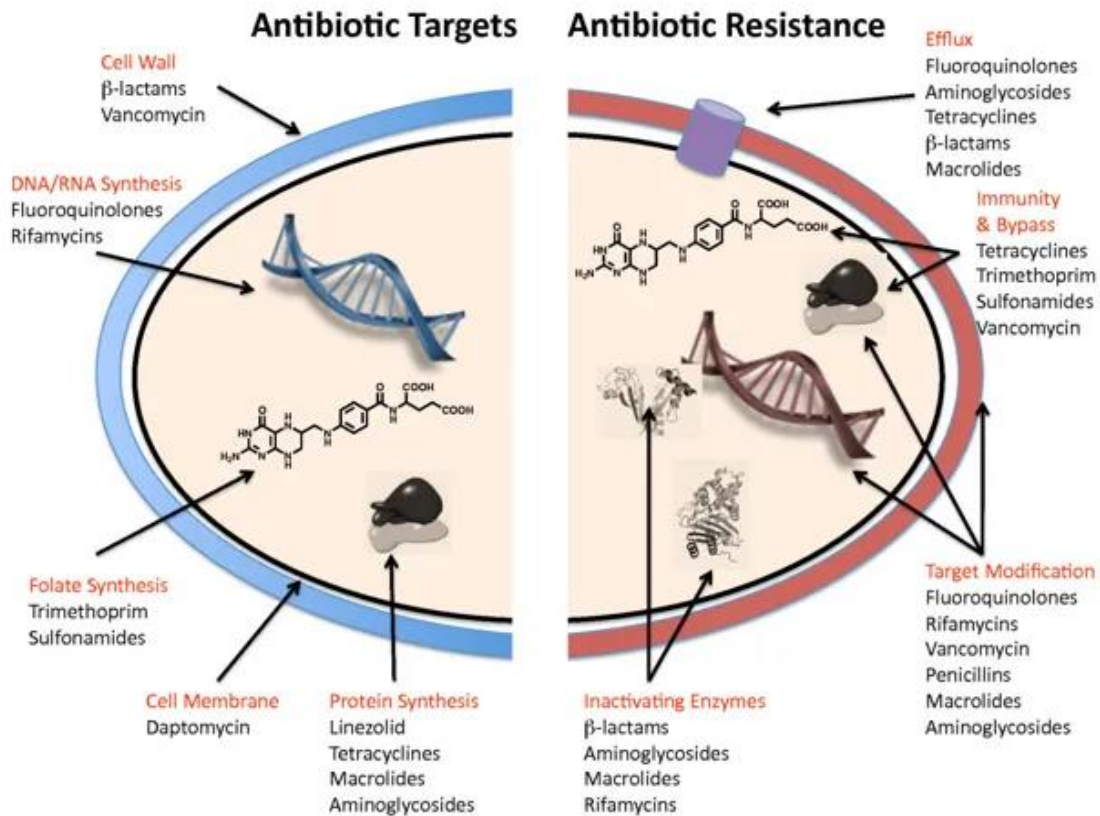


Figur 3: Illustrasjon av horisontal genoverføring; transformasjon hvor det er opptak av nakent DNA, transduksjon hvor bakteriofager overfører DNA og konjugasjon hvor det er direkte overføring av DNA. (18)

Det er flere ulike mekanismer som forårsaker bakteriens resistens, alle påvirket av hvordan antibiotika angriper bakterien, se figur 4. MRSA har som sagt *mecA*-genet som koder for et helt nytt PBP2 som gjør at betalaktamantibiotika ikke klarer å binde seg. Bakteriene kan også ha enzymer som hydrolyserer antibiotikumet eller tilsette kjemiske grupper på sårbare områder på antibiotikumet, som gjør at det ikke kan bindes til målproteinene eller at reaksjonen går saktere (19). En annen måte er at bakteriene kan redusere permeabiliteten i cellemembranen for antibiotikumet. Hydrofile antibiotika går gjennom cellemembranen ved hjelp av noen membranproteiner kalt poriner. Disse kan være uspesifikke, men ved å enten fjerne noen av porinene eller gjøre porinene mer spesifikke hindrer bakterien at antibiotikumet slipper gjennom (19).

Bakteriene har også naturlige måter å unngå antibiotika, og en av dem er med efflux-pumpen. Efflux-pumpen pumper effektivt antibiotika ut av cellene, og ved å øke mengden av denne pumpen kan bakterien unngå påvirkning av antibiotikumet. En siste måte er å endre, amplifisere

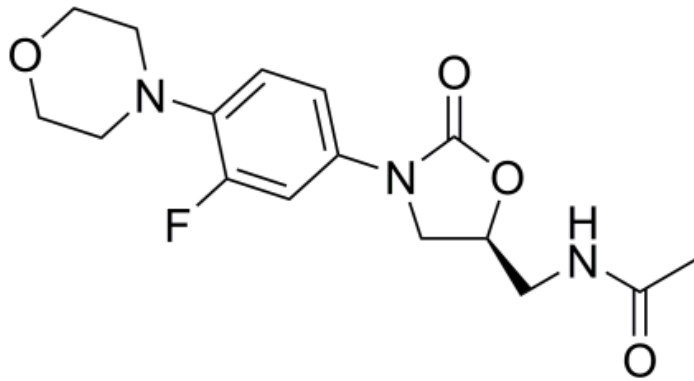
eller fjerne overflateproteinene som antibiotikumet kan feste seg til på bakteriens cellemembran (19).



Figur 4: En oversikt over antibiotikumets angrepspunkt mot bakteriens resistensmekanismer sammen med hvilke typer antibiotika som gjelder for de ulike. (20)

En bakterie kan med bakgrunn i alle de ulike resistensmekanismene etter hvert bli resistent mot flere ulike antibiotika, og dermed bli multiresistente, som vil si at de er resistente mot mer enn to typer antibiotika. Multiresistente bakterier er krevende å behandle, spesielt de tilfellene hvor det ikke finnes flere alternativer å behandle med. Dette problemet har oppstått med enkelte MRSA-stammer som er resistente mot linezolid (19), et av få effektive antibiotika mot bakterien (21).

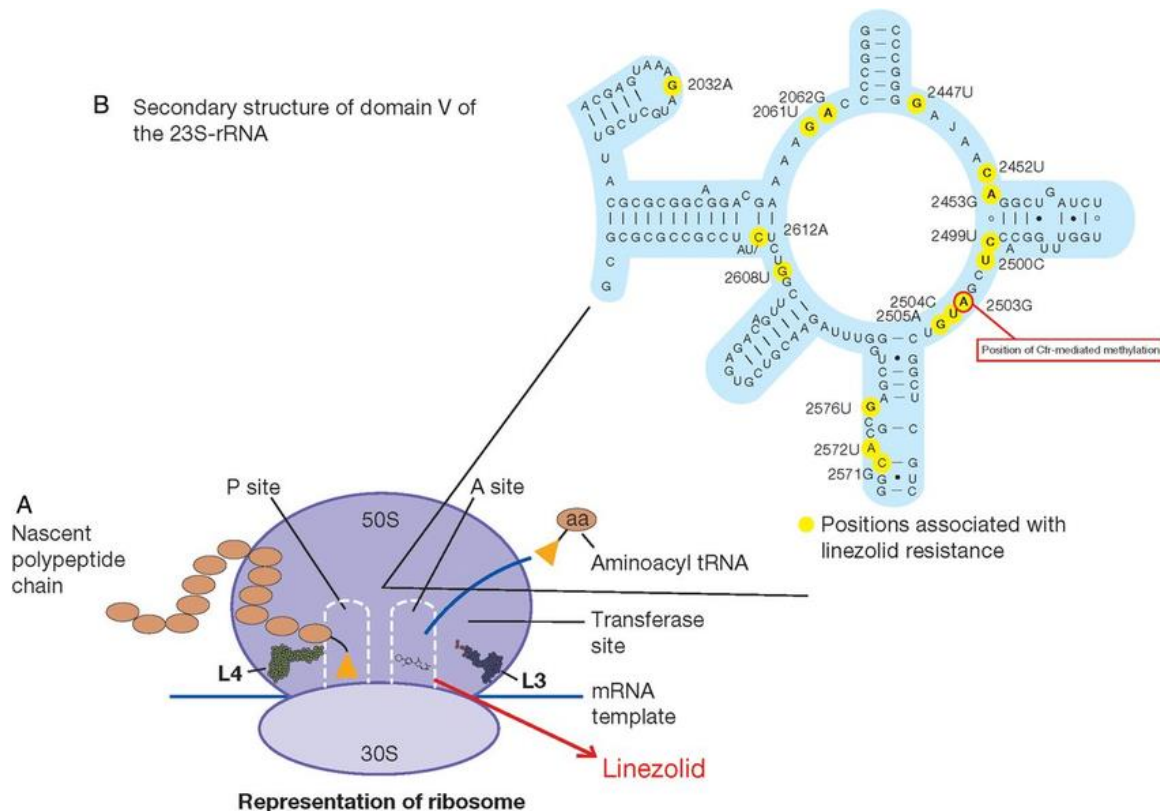
1.1.3 Linezolid



Linezolid er en type helsyntetisk antibiotika kalt oxazolidinoner som inhiberer bakterienes proteinsyntese ved å binde seg til rRNA. Dette er en ny og unik mekanisme hos antibiotika som ble dannet på grunn av den økende antibiotikaresistensen hos multiresistente gram positive kokker (22). Figur 5 viser den kjemiske strukturen til linezolid.

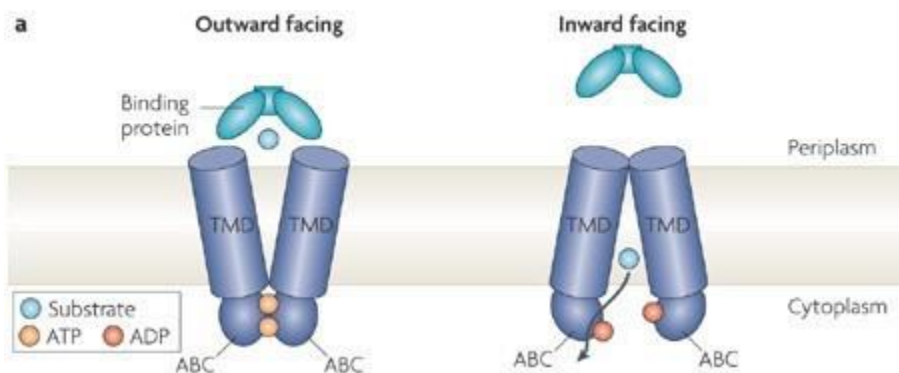
Figur 5: Den kjemiske strukturen til linezolid. (23)

Linezolid kan også brukes hos noen få gram negative anaerobe bakterier og noe mykobakterier (24), og kan benyttes ved alvorlige infeksjoner som lungebetennelse og hud- og vevsinfeksjoner (22). Siden linezolid er blant få effektive antibiotika mot MRSA, begrenses bruken av medikamentet for å forhindre at bakteriene utvikler unødig resistens, da dette kan føre til at det ikke finnes andre måter å behandle de linezolidresistente bakteriene på.



Figur 6: Illustrasjon A viser bindingssetet linezolid binder seg til, og dermed hindrer tilgangen til aminoacyl tRNA. Her vises også de ribosomale proteinene L3 og L4 som er assosiert med resistens. Illustrasjon B viser domene V i 23S rRNA hvor mutasjonen som fører til resistens er. Målposisjonen for cfr-genet, posisjon A2503 er uthevet i rød boks. (25)

Linezolidresistens kommer av mutasjoner i bindingssetet til linezolid i 23S rRNA eller L3, L4 og L22 ribosomale proteiner (21), som illustrert i figur 6. Hos MRSA er det også funnet overførbar linezolidresistens med horisontal genoverføring med gene *cfr*, *optrA* og *poxA*. *Cfr* koder for metyltransferase som modifiserer en aminosyre i 23S rRNA (26), se illustrasjon B i figur 6, og fører til at linezolid ikke klarer å binde seg. *PoxA*-genet koder for et protein som er 32% likt *optrA*, og begge disse gene defineres som en ATP-bindende kassett som gir resistens ved ribosomal beskyttelse (27). Ved å påvirke ATP-pumpene og eventuelt produsere flere av ATP-pumpene kan bakterien unngå å bli påvirket av linezolid ved å effektivt pumpe mer antibiotika ut av bakterien (28), se figur 7 for illustrasjon av en ATP-pumpe.



Figur 7: Viser en ATP-pumpe som omgjør ATP til ADP, og bruker energien til å frakte molekyler inn og ut av celledommen. Gene *poxA* og *optrA* koder for ATP-pumper. (29)

For å kunne behandle bakterieinfeksjoner er det ofte nødvendig å utføre resistensbestemmelse, og dette kan gjøres med flere ulike metoder. Dette er også viktig for å kunne følge med på potensiell utvikling av resistens hos bakterier som for eksempel MRSA hvor det har forekommet flere tilfeller med resistens mot linezolid (21) (30).

1.1.4 Resistensbestemmelse

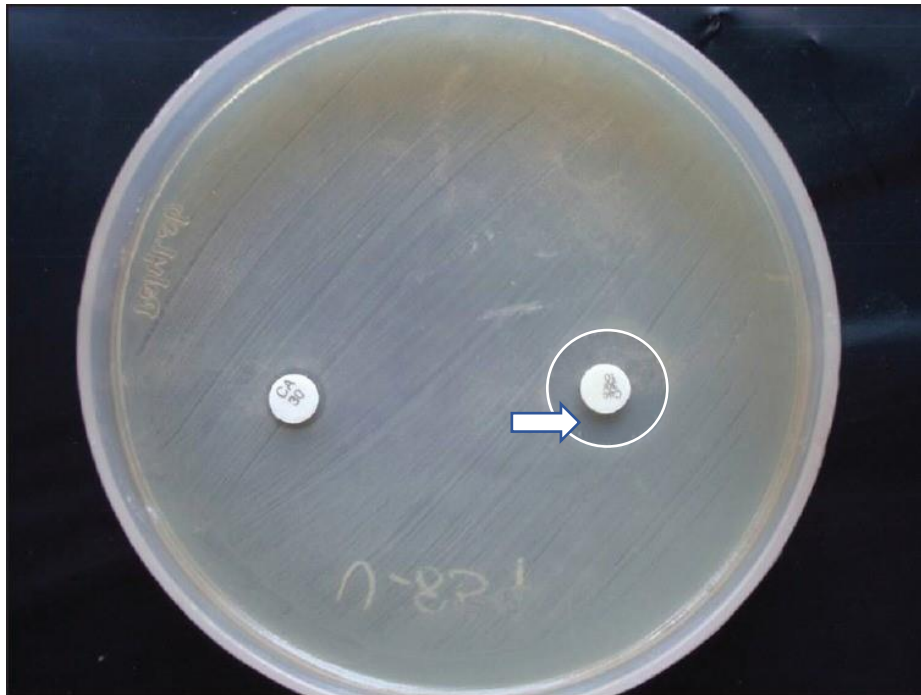
Resistensbestemmelse er en mikrobiologisk undersøkelse av hvilke typer antibiotika en bakterie er sensitiv, intermediær eller resistent for, ved hvilke konsentrasjoner dette gjelder eller deteksjon av ulike resistensgener. Ved å undersøke dette, kan det lages en oversikt over hvilke typer antibiotika som kan benyttes til behandling, samt at resistensutviklingen kan overvåkes for å forhindre feil- og overbehandling.

1.1.4.1 Fenotypisk resistensbestemmelse

Fenotypisk resistensbestemmelse gjøres manuelt, og kan utføres på flere ulike metoder. For å resistensbestemme kan det benyttes mm-verdier for hemningssonen som viser om bakterien er resistente, intermediære eller sensitive. Minste inhiberende konsentrasjon (MIC) kan også benyttes (5), en verdi som utgis i mg/L som viser den minste mengden antibiotika som er effektiv mot bakteriene. Ut ifra disse verdiene kan det vurderes hvorvidt en antibiotika er mulig å bruke som behandlingsform.

Felles for alle metodene er at de er standardiserte, noe som er viktig for å sikre at resultatene er pålitelige. Dette innebærer at mediet som benyttes er av høy kvalitet med riktig pH, saltinnhold og av riktig type, samt at oppgitt temperatur, inkubasjonstid og atmosfære er korrekt. I tillegg er mm-verdiene bestemt av Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (NordiCAST), som igjen benytter verdier European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (31) (32). EUCAST er en vitenskapelig organisasjon som jobber med å definere og bestemme brytningspunkter, samt lage standardiserte metoder for å resistensbestemme (33). Dette gjør de basert på mikrobiologiske data, kliniske studier og farmakologiske parametere for de ulike midlene (31). På grunn av variasjon i hvilke bakteriestammer og ulik resistens som finnes i ulike land, finnes det en egen organisasjon for de nordiske landene, NordiCAST. De tilpasser retningslinjene til nordiske land basert på EUCAST sine med endringer etter nordiske resistensforhold og behandlingstradisjoner.

Agardiffusjonsmetoden er blant de vanligste å bruke (34). En suspensjon med en bestemt konsentrasjon spres utover en agar, og inkuberes med et utvalg antibiotikatabletter eller med en Epsilometer-test (E-test). Ved lappediffusjonsmetoden blir det en synlig hemningssone rundt tablettene som brukes til å bestemme om bakterien er resistent, intermediaer eller sensitiv mot antibiotikumet. Hemningssonen som er diameteren i mm rundt tablettene, illustrert i figur 8, vil gi en rimelig god korrelasjon til en bakteriestammes MIC (35).



Figur 8: Modifisert illustrasjon av to antibiotikatabletter hvor den til høyre har fått en hemningssone (se pil i sirkel). Antibiotikatabletten til venstre har ingen hemningssone og er dermed resistent. (36)

E-test baserer seg også på å finne en bakteriestammes MIC, men denne metoden utføres på agar med plaststrimler som har en økende konsentrasjon antimikrobielt middel langs med strimmelen.

Etter inkubasjon kan MIC-en leses direkte av strimmelen, hvor det første området uten vekst inntil strimmelen er bakteriestammens MIC, som illustrert i figur 9. Denne metoden kan brukes på langsomtvoksende og kravstore bakterier, særlig ved vanskelige kliniske infeksjoner eller på bakteriestammer som har økende antibiotikaresistens (35). Ved begge disse tilfellene vil det være gunstig å gi nøyaktig mengde antibiotikakonsentrasjon for å unngå overbehandling som kan føre til unødvendig resistensutvikling.



Figur 9: Modifisert illustrasjon av E-test etter inkubasjon. Det første området uten vekst inntil E-testen er bakteriestammens MIC (se pilene). (36)

1.1.4.2 Genotypisk resistensbestemmelse

I tilfeller når fenotypiske resistensbestemmelser ikke er avgjørende, kan genetiske analyser brukes til å undersøke tilstedeværelse av et spesifikt gen eller punktmutasjon som bidrar til utvikling av antibiotikaresistens (35). Det vil si at genotypisk resistensbestemmelse går ut på å påvise genene som koder for antibiotikaresistens direkte.

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er et av de mest effektive og raskeste verktøyene som benyttes for å detektere et spesifikt gen eller en spesifikk mutasjon som bidrar til antibiotikaresistens. PCR går ut på å analysere genotype av selve organismen og ikke bare hvordan bakterien uttrykker seg fenotypisk (38).

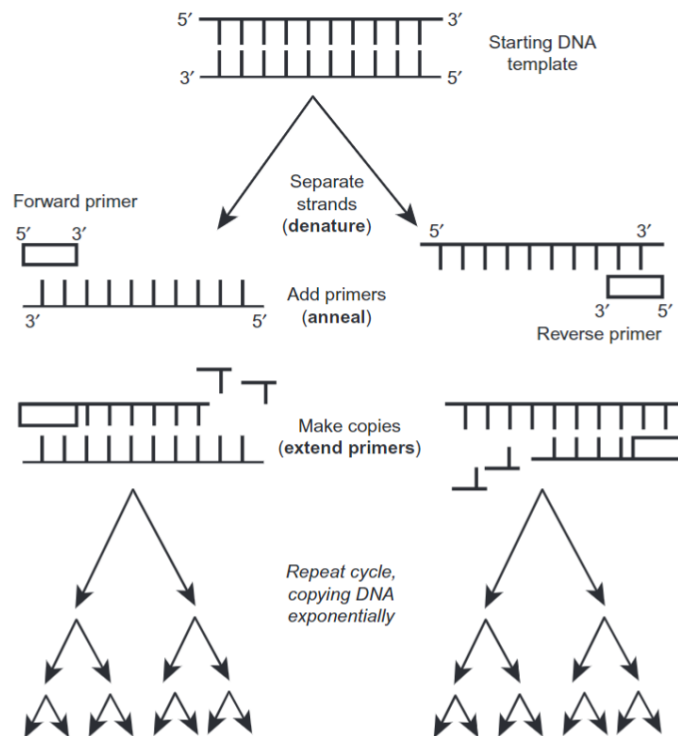
1.2 Konvensjonell PCR

PCR er en analysemetode for *in vitro* amplifikasjon av spesifikke DNA sekvenser der mengde utgangsmaterialet i teorien ikke er en begrensende faktor (39). Det vil si at svært lite

utgangsmaterialet trengs for å amplifisere store mengder DNA både raskt og spesifikt, noe som gjør det mulig å lage millioner av kopier av bestemte DNA sekvenser på kun et par timer (40). PCR er verdenskjent og brukes av blant annet helsepersonell og forskere i diagnostisering av genetiske sykdommer, som identifikasjonsverktøy i rettssaker, påvisning av virusinfeksjon og direkte påvisning av antibiotikaresistente gener i bakterier.

DNA er bygget av to tråder med komplementære nukleotider til hverandre. Dette gjør at de to trådene passer til hverandre og holdes sammen av hydrogenbindinger. Ved bruk av PCR utnyttes DNAs evne til å binde og tvinne sammen komplementære basesekvenser slik at en ny DNA tråd syntetiseres ut fra den eksisterende som man ønsker å se nærmere på (41). For å få dannet et PCR-produkt kreves det templat-DNA, et primersett, frie nukleotidbaser og en termostabil DNA polymerase.

Metoden benytter temperaturmanipulering og en tre-trinns reaksjonssekvens: denaturering, hybridisering og elongering (41). Amplifiserte PCR-produktene vil etter hvert fungerer som templat-DNA til neste syklus. Prosessen gjentas 20-40 ganger og på denne måten blir DNAet amplifisert eksponentielt (39). Dette illustreres i figur 10.



Figur 10: Skjematisk illustrasjon over de ulike trinnene i PCR. Repetitive sykluser av denaturering, hybridisering og elongering foregår ved ulike temperatur som gjør at mengde DNA fordobles med hver syklus. Dobbelttrådet DNA blir enkelttrådet ved høytemperatur. Deretter binder de to primerne til motsatte maltråder for å definere området som skal amplifiseres. Ved hjelp av DNA polymerase og frie nukleotider syntetiseres det komplementære tråder til templat-DNA. Etter n sykluser, dannes det $2n$ nye kopier av det amplifiserte området. (42)

Denaturering er det første trinnet i PCR og foregår ved 94 - 95°C. Ved denne temperaturen vil ikke hydrogenbindinger som holder dobbeltrådet DNA sammen kunne opprettholdes (39). Dette gjør at DNA-trådene skilles fra hverandre slik at det kun gjenstår enkeltrådet DNA i prøven. DNAet blir på denne måten gjort tilgjengelig for hybridisering mellom templat-DNA og spesifikke primere.

Hybridisering innebærer at primere binder seg til sine komplementære basesekvenser på enkeltrådet templat-DNA i reaksjonsbrønn (43). Ved dette trinnet senkes temperaturen til 50 - 65°C, avhengig av primerens smeltepunkt. Hybridiseringen av primere vil utgjøre startpunkt for DNA-polymerase ved neste trinn (39).

Elongering foregår ved å øke temperaturen til 72°C, som er optimal temperaturen til enzymet DNA-polymerase (44). Enzymet vil kunne forlenge primerne på templat-DNA og bygger en ny komplementær tråd. Det virker ved å hekte på de frie nukleotidbasene – adenin, tymin, cytosin og guanin (A, T, C, G) – fra et allerede eksisterende startpunkt som er der primerne fester seg. I løpet av en syklus blir de to trådene til templat DNA kopiert, som gjør at mengde DNA fordobles med hver syklus (45).

Det finnes likevel varianter av PCR som har blitt utviklet for å øke spesifisiteten og kvaliteten til analysen ved å benytte det grunnleggende prinsippet, men som bruker noen tilleggskomponenter i analysen. Disse forklares videre under Real-Time-PCR og Multi-Plex PCR.

1.2.1 Primere

PCRs framgang baseres hovedsakelig på selektiviteten til primerne som velges å bruke i reaksjonen (40). En primer består av en kort, enkeltrådet nukleotidsekvens, som er komplementært til sekvensen i templat-DNA som ønskes kopiert (45). Det er vanlig at disse må designes og bestilles på forhånd og for å få til dette, må DNA-sekvensene på hver side av området som skal amplifiseres kjennes til (44).

DNA er som beskrevet dobbeltrådet der de to trådene peker i motsatte retninger. DNA polymerase syntetiserer nytt DNA i 3'-ende til 5'-ende retning, er det derfor nødvendig med et primersett til hver sekvens som skal kopieres, en forward- og revers-primer som passer til hver sin tråd (41). Under optimale betingelser vil primerne binde seg til sine komplementære basesekvenser i templat-DNA og utgjøre startpunktet for DNA polymerase å bygge på (45).

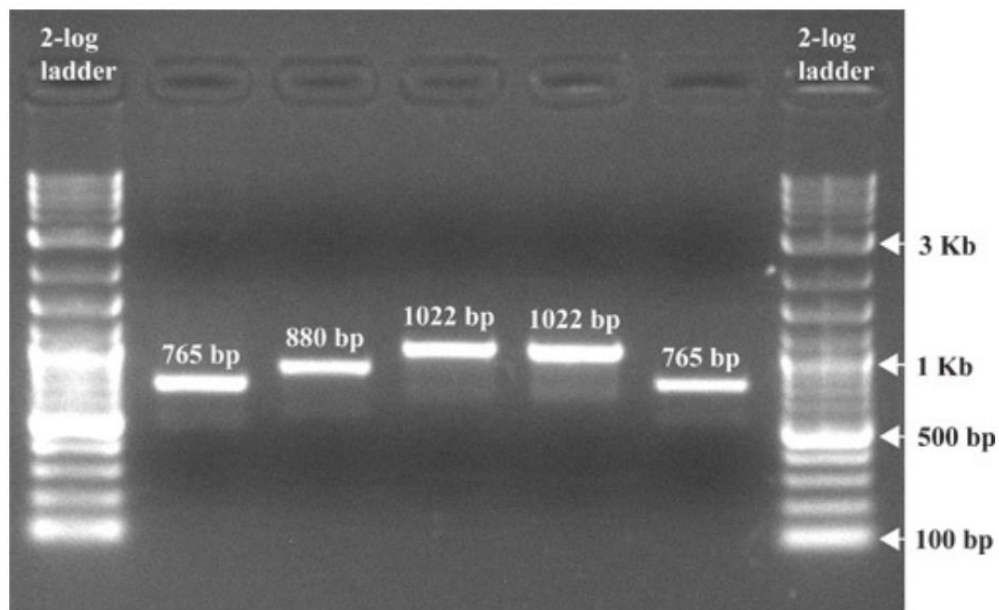
1.2.2 Visualisering av PCR produkt

En vanlig metode for deteksjon og visualisering for analyse av PCR-produkt er ved bruk av agarose-gelelektroforese (45). Elektroforese er en teknikk som benyttes for å skille nukleinsyrer (DNA/RNA) basert på ulik bevegelsesevne når de utsettes for et elektrisk felt.

Metoden blir vanligvis utført på en agarosegel hvor agarose, som er et langt suktermolekyl, bidrar til å danne en matriks av porer av ulike størrelser, avhengig av konsentrasjon i gelen. Porestørrelsen i gelen begrenser DNAs bevegelseshastigheten der de større fragmentene beveger seg saktere gjennom gelen enn de som er små. Når gelen blir eksponert for strøm vil DNA, som

er negativt ladet, kunne bevege seg mot den positive elektroden med en hastighet basert på molekylenes størrelse hvor de minste fragmentene beveger seg raskest, og lengst ned i gelen (40).

Etter separeringen, blir de ønskede DNA-fragmentene påvist med fargestoffet ethidium bromid som fester seg til dobbeltrådet DNA. Når fargestoffet belyses med UV-lys vil det føre til en emisjon av energi (lys av en bestemt bølgelengde) som gjør at DNA-fragmentene synliggjøres (46). Her vises fragmentene som diskrete bånd på gelen sammensatt av sekvenser med identisk lengde (40). PCR-produktene sammenlignes med en størrelsesmarkør som analyseres samtidig og gjør det mulig å bestemme størrelsen på båndene som kommer fram etter fargingen (46). Størrelsesmarkøren er viktig for å kontrollere at antall basepar til de sekvensene man undersøker er riktig. Figur 11 viser et eksempel av DNA-fragmentene analysert ved gelelektroforese sammenlignet med en størrelsesmarkør.



Figur 11: Eksempel av PCR-produkt analysert med gelelektroforese. To størrelsesmarkører vises helt til høyre og venstre, mens forskjellige PCR produktene med lik størrelse vises som bånd inne imellom. Bp står for basepar der antall basepar tilsvare molekylens størrelse. (46)

1.3 Real-Time PCR

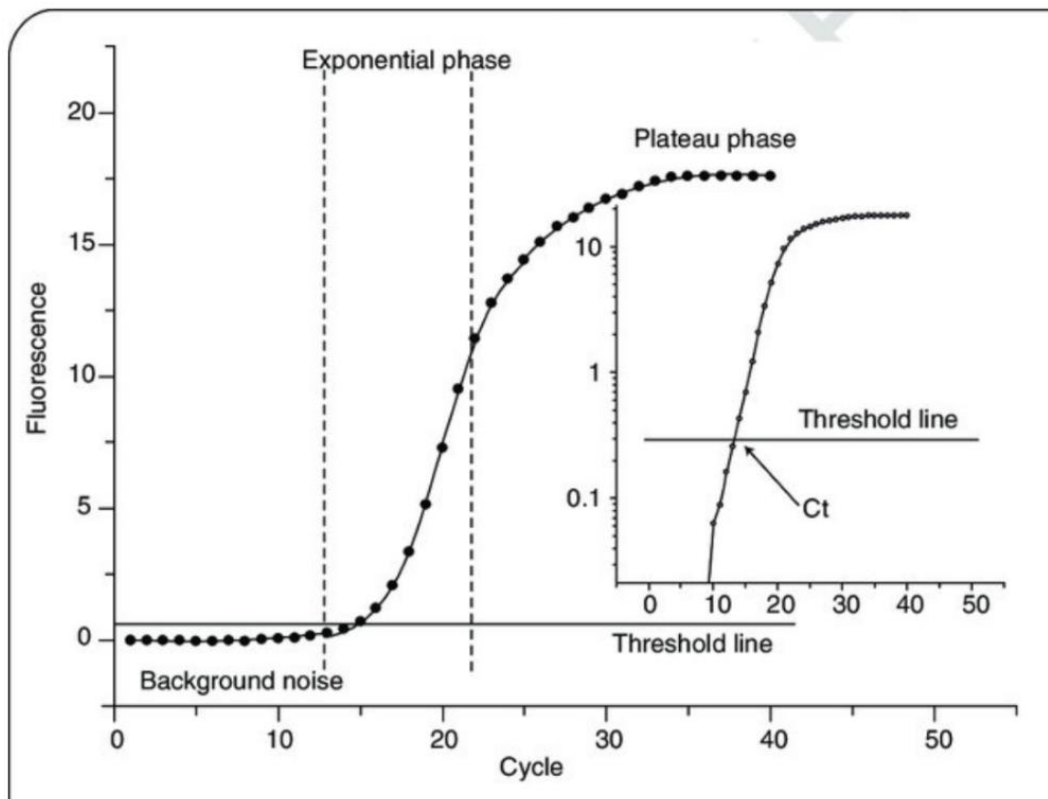
Real-Time PCR, også kjent som kvantitativt PCR, er en PCR-variant som benytter samme amplifikasjonsprinsipp som konvensjonell PCR, men påviser istedenfor PCR-produkt ved bruk av fluorescens som detekteres i "sann-tid" (16).

Denne metoden benytter de samme komponentene som konvensjonell PCR, i tillegg til et optisk system og fluorescerende prober, hvor under optimale betingelser vil føre til at det dannes en økende mengde fluorescens i løpet av reaksjonen. Dette er en kvantitativ metode der mengde

fluorescens er direkte proporsjonal med mengde PCR-produkt som genereres. Det vil si at økende mengde fluorescens som måles etter hver syklus og intensiteten til signalet, gjenspeiler den øyeblikkelige mengden DNA i prøven på det bestemte tidspunktet (44).

For å få dette til, benyttes det som sagt fluorescerende prober, som for eksempel TaqMan-prober som binder spesifikt til den gitte målsekvensen som ønskes amplifisert. Proben utnytter den selektive bindingen mellom komplementære basesekvenser slik at man kan være sikker på at signalet har kommet fra ekte amplifikasjon av målsekvensen (47).

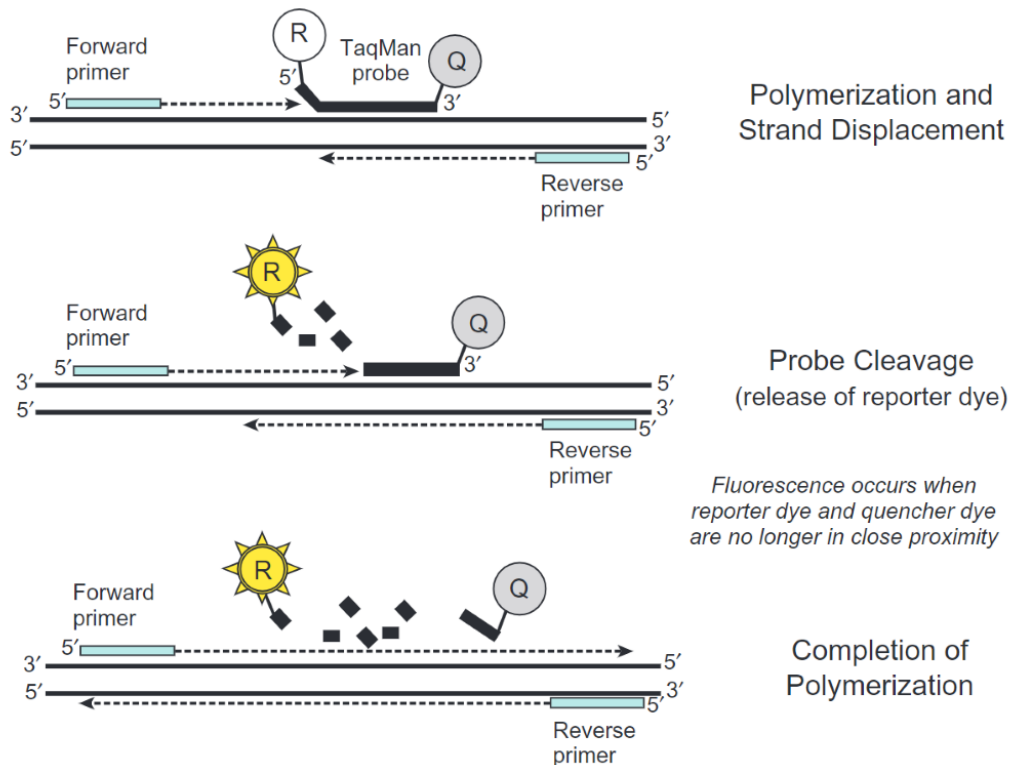
Som nevnt, måles det mengde fluorescens i prøven ved hver PCR-syklus, som da tilsvarer mengde DNA i prøven. Det lages en amplifikasjonskurve hvor den målte fluorescensen på y-aksen plottes mot antall PCR-sykluser på x-aksen. Kurvene får en sigmoid form og deles i tre faser (se figur 12) som representerer mengde PCR-produkt under hele PCR-analyse (42). Den første fasen viser lite endring i mengde fluorescens og kan tenkes at ikke tilstrekkelige mengder amplifikasjon detekteres over bakgrunn fluorescens (48). Den andre fasen omfatter den eksponentielle vekstfasen som gjenspeiler eksponentiell amplifikasjon av DNAet i prøven og den tredje fasen der amplifikasjonen stopper opp og kurven flater ut. Ut fra kurven beregnes det i tillegg en C_T -verdi som reflekterer antall sykluser av PCR-reaksjonen som må til før fluorescensen i en prøve har nådd en gitt terskelverdi og kan detekteres. Det vil si når fluorescensen i prøven er detekterbar over bakgrunnsfluorescens. Dette sier noe om hvor mye DNA er til stede i utgangspunkt i prøven. Jo mer utgangsmaterialet, jo lavere C_T - verdi (42). Hvis amplifikasjonen lykkes er det derfor forventet med en fin sigmoid kurve som resultat, og hvis ikke blir det ujevne topper med lav fluorescens, som helst skal være under terskelverdien.



Figur 12: Amplifikasjonskurve fra Real-Time PCR analyse. Sigmoid-kurven viser oppdeling i tre faser. Fase I viser bakgrunnsfluorescensen som ligger under terskelsverdien. Spesifikk fluorescens fra mål-sekvensen vil ikke kunne detekteres over bakgrunnsfluorescensen ved denne fasen. Fase II viser detekterbar fluorescens som har krysset terskelsverdien og vokser eksponentielt. Ved denne fasen er mengde målt fluorescens proporsjonal med mengde PCR-produkt som har blitt dannet. Fase III viser når kurven flater ut på grunn av at den begrensede mengden reagens i reaksjonen blir brukt opp. C_T -verdi representerer antall PCR-sykluser før mengde fluorescens krysser terskelsverdi. (49)

1.3.1 TaqMan-probe

En TaqMan-probe er en kort oligonukleotid merket i 5'-ende med en reporter og i 3'-ende med en quencher (50). Reporteren er konjugert med en fluorescerende forbindelse som emitterer en spesifikk farge ved en bestemt bølgelengde (42). Proben er spesifikk i at den selektivt binder seg og ligger mellom de to spesifikke primerne for DNA-sekvensen som er av interesse. Proben er intakt når den bindes til templat-DNA og vil ikke produsere et målbart signal på grunn av at quencher hemmer fluorescens fra reporter (50). Det som gjør at proben fluorescerer er at reporteren kløyves og fjernes av DNA-polymerase slik at det blir avstand mellom reporteren og quencheren (42). Denne prosessen illustreres i figur 13.



Figur 13: Illustrasjon av TaqMan-probe, frigjørelse av reporter og dannelse av fluorescens. Proben fester seg til området inne imellom forward- og revers-primer, der reporteren blir kløyd av DNA-polymerase ved ny DNA-syntese fra 3'-ende til 5'-ende. Avstand mellom frigjort reporter og quencher gjør at det dannes fluorescens som måles av instrumentet. (42)

Proben, sammen med primerne vil kunne binde seg til sine komplementære sekvenser ved hybridiseringstemperatur og ved elongeringsfasen vil DNA-polymerase binde seg til utgangspunktet på primerne og begynne nysyntese av DNA. Hvis proben er bundet til riktig sekvens blir reporteren kløyd av av DNA-polymerase slik at den frigjøres og danner målbart fluorescens. Dette betyr at med hver PCR-syklus blir flere prober kløyd og mer fluorescens generert (50). Avhengig av hvor mange forskjellige DNA-sekvenser som ønskes amplifisert, brukes det flere prober merket med ulike fluorescerende-reporter molekyler.

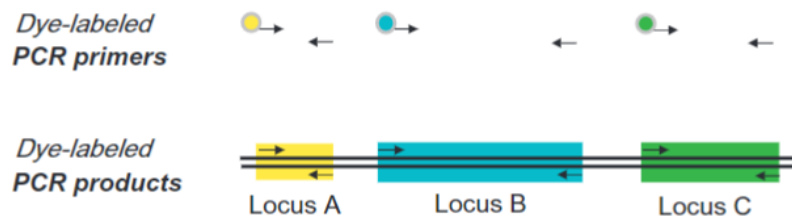
1.4 Multi-Plex PCR

Multi-plex PCR er en PCR-variant der to eller flere målsekvenser amplifiseres i en enkelt reaksjonsbrønn. Det vil si at det analyseres flere ulike DNA-segmenter av interesse samtidig. Teknikken krever to eller flere primersett som er spesifikke for de ulike sekvensene de skal bindes til (51).

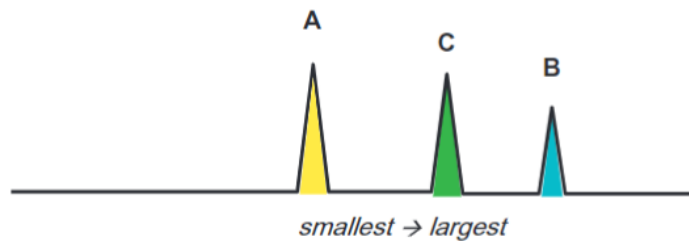
Multi-plex real-time PCR som utnytter fluorescensproduksjon som målemetode krever derfor også flere forskjellige fluorescerende prober av ulike farge. På denne måten vil instrumentets optiske system klarer å skille mellom de ulike bølglengder, som da tilsvarer hver unik sekvens

som ønskes amplifisert (52). Figur 14 illustrerer metoden med et eksempel av tre ulike fluoriserende prober.

(a) Simultaneous amplification of three locations on a DNA template



(b) Resolution of PCR products with size-based separation method



Figur 14: Eksempel av multi-plex PCR ved bruk av ulike primere til hver sekvens som skal amplifiseres. Tre primersett av ulike farger vises her som binder seg til forskjellige gensekvenser på samme templat-DNA-tråd (a). Amplifisert PCR-produktene kan skilles etter størrelse (b), eller basert på fargen som avgis. (42)

Med dette som bakgrunn har vår problemstilling blitt “Hvorfor er det en fordel å benytte genotypisk resistensbestemmelse av linezolid hos MRSA?”

2. Materiale og Metoder

2.1 Valg av metode

For å få bedre forståelse og mer kunnskap om hvorfor det er en fordel å benytte genotypisk resistensbestemmelse av linezolid hos MRSA, ble det i denne oppgaven brukt litteraturstudie som metode. En litteraturstudie bygger på tidligere etablert kunnskap og går ut på systematisk innsamling, bearbeiding og analyse av materiale fra skriftlig tekst (53).

Metoden innebærer at vi skriver hvor og hvordan vi fant kildene og hvordan vi vurderer reliabilitet og validitet til det utvalgte materialet. Dette skal inkludere hvilke bøker, nettsider og databaser som ble benyttet, samt hvilke søkeord og ulike kriterier til litteratursøk vi brukte for innhenting av informasjon. Eventuelle feilkilder til selve litteratursøk skal også vurderes opp mot mulige konsekvenser.

2.2 Litteratursøk

Litteratursøket bestod hovedsakelig av å lese seg opp på nødvendig teori og startet ofte ved å søke generelt på google. Videre ble det søkt i mer spesifikke databaser som google scholar, pubmed og oria, hvor det ble brukt mer nøyaktige søkeord. Google scholar er en søkebase som blant annet inneholder vitenskapelige artikler, bøker og rapporter. Pubmed regnes som den viktigste kilden for faglig informasjon innen medisin og helse, og var derfor den søkebasen vi benyttet mest (54). Oria er en søketjeneste tilgjengelig via NTNU som består av en samling av bøker, artikler, tidsskrifter og masteroppgaver (55). Under søking på både oria og pubmed ble det benyttet NTNU sitt virtual private network (VPN), og dette var til stor hjelp under litteratursøket da vi fikk tilgang til veldig mange gode artikler og databaser. Ved å tilegne oss mer informasjon før vi snevret inn søkene var det enklere å vite hva slags informasjon som var nødvendig å få mer kunnskap om, samt at det ga mye mer forståelse for teorien som skulle skrives.

Mye av arbeidet bestod av å få tydelig oversikt over de grunnleggende prinsippene som en genotypisk resistensbestemmelse metode går ut på. Derfor ble det brukt relativt «enkle» søkeord ved litteratursøk til teoridelen som, resistance mechanisms, linezolid, PCR, real-time PCR, osv. Dette kunne gi hundrevis eller tusenvis av søketreff som måtte blas gjennom for å finne artikler som vi syntes var brukbare for å svare på problemstillingen. For å finne enda mer spesifikke artikler til resultat- og diskusjonsdelen brukte vi både sammenligningsstudier og en kombinasjon av søkeord for å få mer konkrete resultater. Inklusjonskriteriene som ble benyttet for å avgrense antall søketreff var tidsrom, helst innen de siste ti årene, om fulltekst til artiklene var mulig å få tilgang på med eller uten VPN fra NTNU og at språket var engelsk eller norsk. Et tidsrom innen ti år ble valgt på grunn av at genotypiske resistensbestemmelse er relativt nytt og kan forventes å utvikle seg i de kommende årene. Derfor ville vi i denne oppgave ha den mest oppdaterte materialet som mulig. Det var selvfølgelig et krav med tilgang til fulltekst slik at materialet

kunne leses og tolkes i sin helhet og på grunn av at vi behersker både norsk og engelsk var disse to språkene de som kunne benyttes.

I litteratursøket til teoridelen ble eksempelvis søkeordene “linezolid AND resistance AND staphylococci” benyttet, hvor resultatet ble 589 artikler. Et annet eksempel er “antibiotic[Title/Abstract] AND resistance[Title/Abstract]) AND mechanism”, hvor det ble huket av for de 10 siste årene, og hvor det ble 8688 artikler. Ved å søke etter materialet til prinsipper om PCR ble søkeordene (polymerase chain reaction[Title]) AND PCR[Title] brukt og huket av for fulltekst, tidsrom innen de siste 10 årene, engelsk/norsk språk, som førte til 220 søketreff.

Til resultat- og diskusjonsdelen ble eksempelvis søkeordene “((linezolid resistance) AND Staphylococcus aureus) AND "Comparative Study"[pt],” brukt og huket av for fulltekst med et tidsrom innen de siste 10 årene som førte til 90 artikler. Et annet eksempel for å finne materialet spesifikt til problemstillingen ble søkordene “(((Linezolid resistance[Title]) AND susceptibility testing) AND MRSA) AND Phenotypic) AND Genotypic” brukt, hvor det ble 6 søketreff.

Nettsider som mesh.uia.no ble benyttet for å finne synonymer til søkeordene for å utvide søket. Vitenskapelige artikler publisert i de nevnte databaser, relevante nettsider samt lærebøker brukt innenfor celle og molekylær biologi og molekylær genetikk, var hovedkildene som ble benyttet i denne oppgaven.

2.3 Validitet og reliabilitet

«Validiteten angir hvilken grad de innsamlede data representerer det vi ønsker å måle. Validiteten er relatert til gyldigheten i studien og sier noe om hvor godt datamaterialet illustrerer kjernen i de problemstillingene som studien skal belyse» (56). Med hensyn til den teoretiske problemstillingen som vi har valgt å svare på, vil validiteten representerer metodens dokumentarbarhet. Dette svarer på spørsmålet om hvor godt vårt valg av litteratur var og hvor representativt litteraturens innhold er i forhold til resultatene vi har kommet fram til.

«Reliabilitet testes ved etterprøving ... Reliabilitet er et mål på om man måler på rett måte» (56). I sammenheng med at vi har valgt litteraturstudie som metode, som baserer seg på en datagjennomgang, vil det si at reliabiliteten er et mål om selve innhenting av skriftlige materiale og at dette ble utført på en sikker og tydelig måte slik at oppgaven kan gjennomføres av en annen med tilsvarende resultater.

Av vitenskapelige artikler ble pubmed og oria hovedsakelig benyttet. Først og fremst var de lett tilgjengelige for oss og i og med at pubmed er oppgitt av helsebiblioteket og NTNU som en kilde til forskning, ble det sett som en troverdig database å kunne bruke. Påliteligheten av de enkelte kildene ble likevel vurdert baserte seg på hva slags type litteratur det var, utgivelsesår og forfatteren(e). Det ble også sjekket publiseringssted, hvordan oppbygningen av artikkelen var, og om det var en god og variert litteraturliste. Enkelte artikler som er benyttet i denne oppgaven er utgitt på tidlig 2000-tallet, men her ble informasjonen i artikkelen sjekket opp mot andre artikler

for å se om den var pålitelig nok. Enkelte kilder ble også funnet gjennom litteraturlistene til relevante artikler.

Ved valg av materiale, ble det foretrukket å finne og bruke vitenskapelige artikler som kun omhandlet relevant teori. Dette var gunstig både for å snevre inn antall artikler under søking, samt at informasjonen som ble funnet skulle være aktuelt for oppgaven. Det ble også benyttet primærkilder så langt det var mulig.

Søk etter relevant litteratur i form av bøker ble hovedsakelig oria og nasjonalbiblioteket benyttet. Påliteligheten baserte seg på fagligbakgrunn og utdanningsnivå til de ulike forfatterne og årstallet for utgivelsen. Ikke minst at bøkene tilhørte de relevante fagene som dekker konseptene og prinsippene som ble diskutert og forklart i innledningen.

Av nettsider ble påliteligheten vurdert ut ifra utgiver, forfatter, om det var oppgitt referanser og årstall med eventuelle oppdateringer. Eksempelvis ble det benyttet artikler publisert på folkehelseinstituttet.no, helsedirektoratet.no og stolav.no, noe som anses som pålitelige kilder da dette er statlige institusjoner og sykehus. Et annet eksempel er nettsiden til firmaet ThermoFischer Scientific; et selskap som tilbyr utstyr, reagens, software med mer, og også instrumenter som benyttes ved genotypisk resistensbestemmelse. Som produsent beregnes derfor dette også som en pålitelig kilde. Eucast.org er en annen nettside som ble brukt til innhenting av informasjon til resultat- og diskusjonsdelen. Denne nettsiden fant vi pålitelig fordi det er en vitenskapelig organisasjon som lager de standardiserte metodene og brytningspunktene for resistensbestemmelse som sykehus og laboratorier bruker.

2.4 Etiske sider

I og med at denne oppgaven baserer seg på litteratur funnet på internett, har det vært viktig å kreditere referansene korrekt. Dette er nødvendig for å unngå plagiering (direkte kopi av tekst uten referanse), samt at leseren skal kunne finne igjen referansene, sette seg inn i stoffet eller for å kunne etterprøve resultatene (57).

2.5 Feilkilder

Etter hvert som denne oppgaven har blitt skrevet har det vært mye prøving og feiling, og på grunn av dette har det kommet fram noen punkter som kunne gjort oppgaveskrivingen enklere og mer effektiv. For det første kunne det med fordel ha blitt brukt VPN mye tidligere i oppgaven, da dette ikke ble tatt i bruk før uke 2-3 av skrivingen. Dette skal likevel ikke ha hatt noen stor betydning for oppgavens helhet. Et annet punkt var at det kunne ha vært mer konsekvent bruk av AND og OR for å avgrense søketreff og å gjøre litteratursøkingen enda mer effektiv. Ellers var det meste av litteraturen som ble brukt skrevet på engelsk, noe som kan ha medført til oversettelsesfeil. Dette har vi etter beste evne prøvd å unngå ved å tolke riktig og oversette.

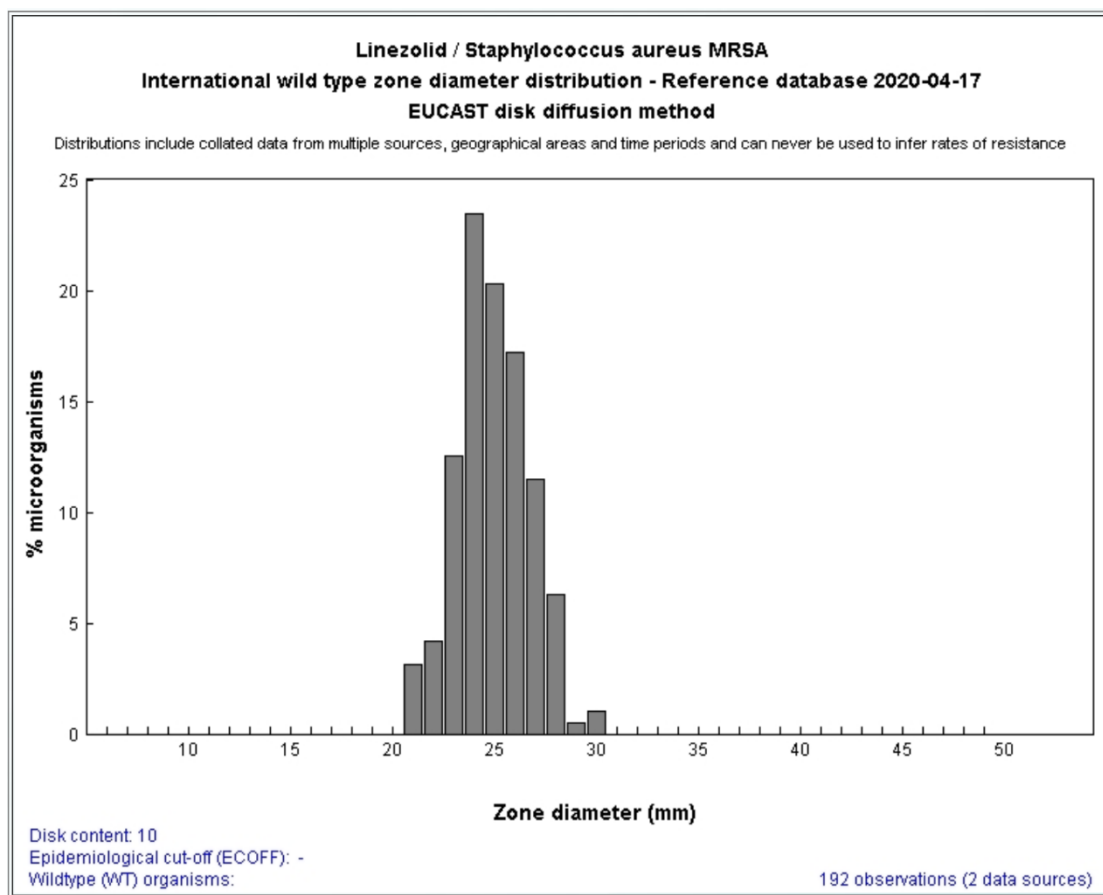
3. Resultater og diskusjon

3.1 Oppfølging av linezolidresistensen

Linezolid ble godkjent for klinisk bruk i USA i 2000 (58) og i Norge i 2001 og er som sagt effektiv mot multiresistente bakterier som MRSA (59). På grunn av antibiotikumets syntetiske forbindelser skulle den gi en redusert sannsynlighet for utviklingen av naturlige forekommende resistensmekanismer (60). Likevel ble det påvist linezolidresistens hos MRSA i USA i 2001 (61), og første tilfelle av resistens hos MRSA og MSSA i Norge i 2016 (personlig meddelse). Dette er problematisk da linezolid er blant de siste effektive antibiotikamidlene mot MRSA. Likevel er linezolidresistens hos *Staphylococcus aureus* fremdeles sjeldent ifølge EUCAST (62) med en global resistens dokumentert på 0,05% (63). Oppfølgingen av linezolidresistens skal følges tett og skjer ved bruk av fenotypiske metoder som agar diffusjon eller E-test, samt genotypiske metoder som PCR. Det er her det har dukket opp utfordringer.

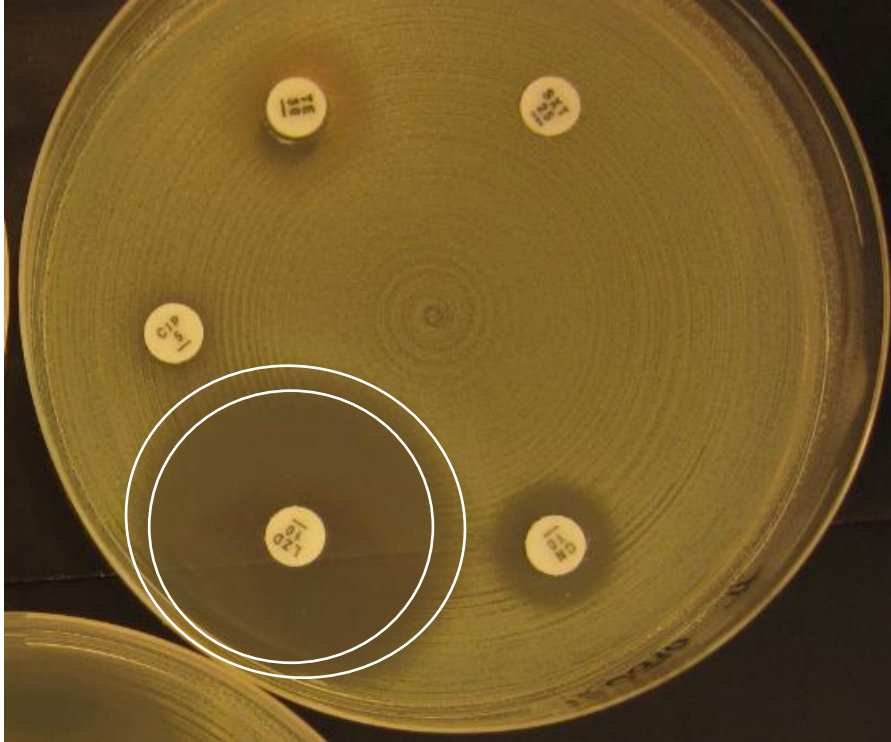
3.2 Utfordringer og uoverensstemmelser ved bruk av fenotypiske resistensbestemmelser

Fenotypiske metoder er enkle, billige og kan benyttes på alle typer bakterier, samt at det kan testes for mange ulike antibiotika samtidig. Ikke minst er metodene standardiserte, noe som i teorien skal sikre at resultatene er like og korrekte uansett hvem og hvor testene utføres. Til tross for at fenotypiske resistensbestemmelser er standardiserte har EUCAST gjort det klart at metodene, for eksempel MIC-analyser, har variasjoner i MIC-verdiene, og dermed ikke alltid er pålitelige. Selv om det i tillegg benyttes referansemetoder, kan MIC-verdiene variere på dagen og med den som utfører selve testen (31). Resistensbestemmelse av MRSA mot linezolid har vist seg å spesifikt gi vanskeligheter ved avlesning, der variasjonen i rapporterte hemningssoner er stor. Se figur 15 for oversikt over fordeling av dokumenterte hemningssoner til MRSA mot linezolid.



Figur 15: Viser spredningen og fordelingen av hemningssonene til MRSA mot linezolid. (55)

Med et brytningspunkt på 21 mm (31), er mange av de rapporterte stammene langt over grensen for å være sensitiv, men stadig flere tilfeller blir rapportert med mindre hemningssoner. Hos St. Olavs hospital, Avdeling for Mikrobiologi, har de også uttrykt sine meninger om fenotypiske resistensbestemmelser av MRSA mot linezolid: resistensoppsettet blir «krevende å lese av på grunn av at linezolid er bakteriostatisk og sonene får dermed en del «slørvekst» og kan bli vanskelig å sette «cut-off». Før var grensen 23 mm, men nå er den satt ned til 20-21mm. Dermed er det flere som kommer under «resistent» som kan være resistente eller som er sensitive» (Direkte sitat fra Torunn Gresdal Rønning, St.Olavs Hospital). Se figur 16 for hvordan hemningssonen til MRSA er, og hvordan denne “slørveksten” ser ut.



Figur 16: Viser en MillerHinton agar i et resistensoppsett for MRSA, hvor LZD-tabletten er linezolid. Her er bakterien sensitiv mot linezolid, men bildet viser likevel "slørveksten" (se sirklene). Det er denne slørveksten som gjør at det er vanskelig å avlese hemningssonen. (Bilde tatt av Nasjonalt referanselaboratorium MRSA ved St.Olavs Hospital)

Slørvekst og usikkerheten ved avlesning av brytningspunktet er ikke det eneste problemet som finnes med fenotypisk resistensbestemmelse av linezolid mot MRSA. Så tidlig som i 2012 viste et forskningsprosjekt begrenset detekterbarhet av linezolid resistente *Staphylococcus aureus* ved bruk av E-test. Stammene hadde påvist mutasjoner i domene V i 23S rRNA, bekreftet med PCR. Likevel ble 78% av de resistente stammene feilklassifisert som sensitiv ved bruk av standard resistensagar og inkubasjonstid (64). Enda tidligere, i 2008, ble det observert at *cfr*-mediert linezolidresistens i MRSA ikke ble detektert ved bruk av agardiffusjon og E-test ved standard inkubasjonstid. Etter 24 timers inkubasjon var stammene lest av som sensitiv, men etter 48 timers inkubasjon utviklet det seg en dobbel hemningszone som viste seg å være resistent (62). Studien konkluderte med at en begrenset påvising av linezolidresistens ved bruk av standard prosedyrer, og at en lenger inkubasjonstid kan være nødvendig.

Mulighet for «stille mutasjoner» er en annen grunn som gir årsak til bekymringer når det gjelder uoverensstemmelser mellom fenotypiske og genotypiske uttrykk hos bakteriestammene. I en artikkel publisert av K-res i 2016 beskrives det et utbrudd forårsaket av skjulte resistensegenskaper i en annen type gram positiv bakterie, der selve bakterien hadde et resistensgen, men som var slått av og ikke kom til uttrykk ved bruk av fenotypiske metoder før antibiotikabehandlingen ble satt i gang (66). Anbefalingen i dette tilfellet var å benytte en spesifikk utviklet PCR-analyse i tillegg til standard fenotypiske metoder. Med hensyn til

linezolidresistens hos MRSA er det, så langt vi vet, ikke enda dokumentert slike skjulte resistantegenskaper, men det er kjent at *Staphylococcus aureus* ofte er bærer av inaktiverede gener som koder for antibiotikaresistens (67).

Graden av resistens vil også være avgjørende ved bestemmelse om en bakteriestamme er resistent eller ikke. Linezolidresistens i *Staphylococcus aureus* viser seg å ha en direkte proporsjonalitet med antall mutasjoner i 23S rRNA gener (68) (66). Dette kan tolkes at ved mindre antall mutasjoner i 23S rRNA, vil bakterien vise en lavere grad av resistens sammenlignet med en bakteriestamme som har akkumulert flere mutasjoner. Fenotypiske analyser kan da være uegnet for denne type påvisning, i og med at bakterien allerede har utviklet kjente resistensgener som kan være vanskelige å detektere. En spesifikk PCR-analyse vil derimot kunne påvise disse genene direkte, slik at det unngås slike uoverensstemmelser.

3.3 utfordringer ved bruk av genotypiske resistensbestemmelser

PCR-analyser skiller seg fra standardiserte fenotypiske metoder ved at de krever lite utgangsmaterialet for å få amplifisert PCR-produkt slik at man slipper å dyrke bakteriekolonier med langinkubasjonstid. Analysen kan utføres direkte på prøvematerialet og er svært egnet for bruk på mikroorganismer som er vanskelig å dyrke (38). Ved bruk av spesifikke og validerte primere vil ikke forurensning være en stor risiko og kommersielle test-kits er tilgjengelig for kjøp som gjør det lett å få etablert en PCR-metode i laboratoriet (42).

Genotypiske resistensbestemmelser er likevel ikke uten ulemper. PCR-analyser er for det første dyrere enn fenotypiske resistenstester. De krever dyre instrumenter, utstyr og reagenser med spesifikke krav om vedlikehold. I tillegg er det nødvendig å vite hvilke gener man er ute etter for å analysere bakteriene, samt at de krever hver en spesifikk utviklet PCR-analyse for påvisning (38). For eksempel har det vært problemer på grunn av at MRSA kan inneha enten *mecA*- eller *mecC*-genet, og det har vært tilfeller hvor MRSA har blitt tatt for å være MSSA fordi det kun ble analysert for *mecA*-genet, og ikke *mecC* (70).

En av ulempene med genotypisk resistensbestemmelse er at metodene ikke er standardiserte. Dette medfører en del arbeid for å kunne utvikle og validere en PCR-metode, som igjen kan føre til mange potensielle problemer. Per i dag er det ikke utviklet en PCR-analyse for påvisning av *cfr*, *optrA* og *poxA* gener som koder for linezolidresistens hos MRSA. Dette betyr at det må designes og valideres både primere og prober til analysen, samt skal det optimaliseres med hensyn til hybridiseringstemperatur.

Når det brukes primere vil det være en mulighet for uspesifikk binding, som vil si at primeren binder seg til en sekvens som er lik målsekvensen, men ikke identisk, og videre fører til amplifikasjon av feil gensekvens (71). Med multiplex-PCR der flere DNA-sekvenser amplifiseres samtidig i samme reaksjonsbrønn, økes det risiko for primer-dimer-dannelse mellom forward og revers-primere, som vil si at primerne binder seg til hverandre og ikke til

målsekvensen (41). I begge tilfellene vil det føre til amplifikasjon av uspesifikke PCR-produkter og analysen mislykkes.

Videre er det viktig å tilpasse temperaturen ved de ulike trinnene i PCR-metoden til primerne for å finne den optimale temperaturen. Dette må gjøres for hver analyse, og det gjøres ved å analysere med ulike temperaturer (72). Dette tar tid og bruk av dyre reagenser som primere og prober før selve analysen kan godkjennes for bruk i en klinisk omsetning.

Disse generelle utfordringene som en genotypisk metode kan ha, kan likevel løses på ulike måter. Primer-dimer dannelse forbygges ved at det velges basesekvenser som ikke viser selv-komplementaritet (71), og uspesifikke bindinger hindres ved at primer valg valideres av ulike valideringsprogrammer på forhånd (73). Videre vil bruk av agarose gelelektroforese som deteksjonsmetode kontrollere at amplifisert PCR-produkt er av riktig størrelse og dermed korrekt. Ved real-time PCR vil bruk av TaqMan-prober gi en økt spesifikk binding mellom proben og målsekvensen, og dermed økt sannsynlighet for at det produseres ekte fluorescenssignal (74). Det finnes i tillegg mye litteratur som beskriver hvordan en slik PCR-analyse optimaliseres og de ulike faktorene som kan påvirke eventuelle resultater (51) (75) (76) (77).

Med hensyn til genene som koder for linezolidresistens, nemlig *cfr*, *poxA* og *optrA*, er disse gensekvensene allerede kjent og forsket på i ulike bakteriestammer (78) (27) (75). Det kan derfor være en fordel med multiplex real-time PCR for å teste de ulike genene samtidig. Dette er gunstig både med tanke på arbeid, tid og kostnader (74).

3.4 Konklusjon

Linezolidresistens hos *Staphylococcus aureus* er sjeldent, men likevel bekymringsfullt når det gjelder behandling av MRSA. Uoverensstemmelser mellom fenotypiske og genotypiske resistensbestemmelser kan være en av årsakene til at linezolidresistens underrapporteres og spres videre via overførbare resistensgener. Til tross for ulempen hos genotypiske resistensbestemmelser når det kommer til standardisering av metodene, samt større kostnader, gir likevel nøyaktigheten av å påvise gener store fordeler når det er usikkerhet rundt fenotypiske resistensbestemmelser. Behovet for å detektere resistensgener som koder for linezolidresistens har allerede ført til at det har blitt utviklet en multiplex-PCR for deteksjon av genene *cfr*, *poxA* og *optrA* hos enterokokker (78). Dette kan brukes til å lage en høyst nødvendig PCR-analyse for MRSA. Likevel må det tas hensyn til de internasjonale standardiserte fenotypiske metodene som er av stor nytte i dag. I en rapport fra EUCAST konkluderte en subkomite at helgenomsekvensering kan erstatte fenotypisk testing når det gjelder overvåking av resistens hos *S. aureus* da korrelasjonen mellom fenotypi og genotypi er relativt god. Metoden er likevel ikke god nok til å kunne alene erstatte fenotypiske metoder hvor formålet er å veilede i pasientbehandling (9). Med hensyn til materialet som har blitt funnet og presentert, mener vi at å benytte og øke bruken av genotypiske metoder vil kunne bidra til bedre kontroll av

linezolidresistens hos MRSA. Dette kan gi bedre og enklere kontroll over forekomsten av resistensgenene *cfr*, *poxA* og *optrA*, og dermed resistensutviklingen hos MRSA. En dag vil kanskje genotypisk resistensbestemmelser erstatte fenotypiske resistensbestemmelser?

5. Referanser

1. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of Staphylococcus aureus: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog.* 2011;2011:601905-.
2. Lowy FD. Staphylococcus aureus Infections. *New England Journal of Medicine.* 1998;339(8):520-32.
3. Sjursen H. Toksisk sjokk-syndrom. 2008.
4. Stafylokokkinfeksjoner (inkl. MRSA-infeksjoner) - veilder for helsepersonell fhi.no: FHI (Folkehelseinstituttet); 2019 [updated 23.08.2019. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/stafylokokkinfeksjoner-inkl.-mrsa-i/>.
5. Murray PRR, Kenneth S.; Pfaller, Michael A. *Medical microbiology.* 9th edition ed. <https://www.clinicalkey.com/student/content/toc/3-s2.0-C201800009242020>.
6. Foster TJ. The Staphylococcus aureus "superbug". *J Clin Invest.* 2004;114(12):1693-6.
7. Lee C-R, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):4274-305.
8. Hospital SO. Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA stolav.no2016 [updated 24.03.2020; cited 2020 28.03]. Available from: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/nasjonalt-referanselaboratorium-mrsa#generelt>.
9. K-res. Bruk av genomsekvensering i resistensbestemmelse av bakterier. unno. 2016.
10. Nord-Norge U. K-res [Available from: <https://unn.no/fag-og-forskning/k-res>.
11. Basic mechanisms of antibiotic action and resistance: David M. Rollins; 2000 [updated August 2000; cited 2020. Available from: <https://science.umd.edu/classroom/bsci424/Chemotherapy/AntibioticMechanisms.htm>.
12. Hva er antibiotikaresistens <https://www.antibiotika.no/hva-er-antibiotikaresistens/>: antibiotika.no; 2019 [Available from: <https://www.antibiotika.no/hva-er-antibiotikaresistens/>.
13. Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens 2015-2020 Oslo: Departementene; 2015 [Available from: https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi_antibiotikaresistens_230615.pdf.
14. O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance.* 2014.
15. Burcham ZM, Schmidt CJ, Pechal JL, Brooks CP, Rosch JW, Benbow ME, et al. Detection of critical antibiotic resistance genes through routine microbiome surveillance. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213280-e.
16. Tortora GJ. *Microbiology : an introduction.* 13th ed. ed. Case CL, Funke BR, editors: Pearson; 2019.
17. Helsedirektoratet. Antibiotika i sykehus. helsedirektoratet.no: Helsedirektoratet; 2019 09.05.2019.
18. Tankeshwar A. Gene Transfer Mechanism in Bacteria and It's types <https://microbeonline.com/key-information-regarding-gene-transfer-mechanism-bacteria/2013> [
19. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology.* 2015;13(1):42-51.
20. Wright GD. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology.* 2010;8(1):123.
21. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. The emerging problem of linezolid-resistant Staphylococcus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2012;68(1):4-11.
22. Diekema DJ, Ronald N. Oxazolidinone antibiotics. *The lancet.* 2001.

23. Kumar M, Curtis A, Hoskins C. Application of Nanoparticle Technologies in the Combat against Anti-Microbial Resistance. *Pharmaceutics*. 2018;10.
24. Birmingham MC, Rayner CR, Meagher AK, Flavin SM, Batts DH, Schentag JJ. Linezolid for the Treatment of Multidrug-Resistant, Gram-Positive Infections: Experience from a Compassionate-Use Program. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(2):159-68.
25. Munita JM, Bayer A, Arias C. Evolving Resistance Among Gram-positive Pathogens. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;61.
26. Tian Y, Li T, Zhu Y, Wang B, Zou X, Li M. Mechanisms of linezolid resistance in staphylococci and enterococci isolated from two teaching hospitals in Shanghai, China. *BMC Microbiology*. 2014;14(1):292.
27. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, Galeotti CL, Morroni G, Pollini S, et al. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(7):1763-9.
28. Wilson DN. The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance. *mBio*. 2016;7(3):e00598-16.
29. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(3):218-27.
30. Azhar A, Rasool S, Haque A, Shan S, Saeed M, Ehsan B, et al. Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 2017;66(9):1328-31.
31. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0: EUCAST; 2020 [updated 2020-01-01. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf?fbclid=IwAR2Q63YbVhD7X6Zlrg4mMLuIIOSPFRfrvKROIFhnoGLDIq5q6fMGELqfTro.
32. NordicASTs breakpoint tables 2020 [cited 2020 01.04.]. Available from: <http://www.nordicast.org/brytpunktstabeller>.
33. EUCAST Statutes: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2020 [Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Statutes_20160411_approved_by_General_Committee.pdf.
34. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(2):49.
35. Caugant DAH, E.Arne. Resistensbestemmelse og resistensutvikling hos bakterier. 2002.
36. Gjelsvik ST. Utbrudd av vankomycinresistente enterokokker på Haukeland universitetssjukehus. 2016.
37. Anjum MF, Zankari E, Hasman H. Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiol Spectr*. 2017;5(6).
38. Cockerill FR, 3rd. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(2):199-212.
39. Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: Madan L, Nagpal O-MB, Cornel Baltă and Shymaa Enany, editor. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science: IntechOpen*; 2019.
40. Alberts B. *Essential cell biology*. 4th ed. ed. New York: Garland Science; 2014.
41. Ghannam MG, Varacallo M. *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR)*. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.
42. Butler JM. Butler JM, editor. San Diego: Academic Press; 2012 2012/01/01/.
43. Tietz NW, Bruns DE, Burtis CA. *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 7th ed. ed. St. Louis, Mo: Elsevier; 2015.
44. Sjøberg NO. *Molekylær genetikk*. Høvik: Vett & viten; 2013. 345 s. ill. 27 cm p.
45. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(3):1-4.

46. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012(62).
47. Ltd P. Primer Design: Beginner's Guide to Real-Time PCR: Novacyt Group; [Available from: https://www.primerdesign.co.uk/assets/files/beginners_guide_to_real_time_pcr.pdf].
48. Dorak MT. Real-time PCR. New York: Taylor & Francis; 2006.
49. Ståhlberg A, Zoric N, Åman P, Kubista M. Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005;5(2):221-30.
50. Real-Time PCR Handbook: Thermo Fisher Scientific Inc.; 2014. Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>.
51. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47-51.
52. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods*. 2001;25(4):430-42.
53. komiteene Dnf. Kvalitative og kvantitative forskningsmetoder – likheter og forskjeller etikkom.no: De nasjonale forskningsetiske komiteene; 2010 [Available from: <https://www.etikkom.no/forskningsetiske-retningslinjer/Medisin-og-helse/Kvalitativ-forskning/1-Kvalitative-og-quantitative-forskningsmetoder--likheter-og-forskjeller/>].
54. Rein JO. Nyheter og fagressurser for medisin, sykepleie, helse og omsorgsfag [Internet]: NTNU.no. 2017. [cited 2020]. Available from: <https://www.ntnu.no/blogger/ub-mh/2017/11/20/kan-vi-stole-pa-pubmed/>.
55. [Available from: https://bibsyst-almaprimo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/search?vid=NTNU_UB&lang=no_NO].
56. Olsson N. Praktisk rapportskrivning. Trondheim: Tapir akademisk; 2011. 76 s. ill. p.
57. Hvorfor referere? : Søk og skriv; [updated 30.09.19. Available from: <https://sokogskriv.no/kildebruk-og-referanser/sitering-og-etikk/>].
58. Monaco M, Pimentel de Araujo F, Cruciani M, Coccia EM, Pantosti A. Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;409:21-56.
59. Brubakk OB, Arvid; Sjursen, Haakon; Viggen, Bjørg. Bruken av et nytt antibakterielt middel i Norge. *Tidsskriftet*. 2007.
60. Moellering RC, Jr. Linezolid: The First Oxazolidinone Antimicrobial. *Annals of Internal Medicine*. 2003;138(2):135-42.
61. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus. *Lancet*. 2001;358(9277):207-8.
62. Testing TECoAS. Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes version 3.2. eucast.org: EUCAST; 2020.
63. Dr Kiranjeet Kaur DMK, Dr Amarjit Kaur Gill. LINEZOLID RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS: AN EMERGING PROBLEM. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH* 2019;8(12).
64. Ikeda-Dantsuji Y, Nakae T, Ariyoshi K, Mizuno H, Moriyama H, Nagura O, et al. Limited detectability of linezolid-resistant Staphylococcus aureus by the Etest method and its improvement using enriched media. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61(7):998-1002.
65. Arias CA, Vallejo M, Reyes J, Panesso D, Moreno J, Castañeda E, et al. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the cfr gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):892-6.
66. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Rønning TG, Radtke A, et al. A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(7):4119-27.

67. Kime L, Randall CP, Banda FI, Coll F, Wright J, Richardson J, et al. Transient Silencing of Antibiotic Resistance by Mutation Represents a Significant Potential Source of Unanticipated Therapeutic Failure. *mBio*. 2019;10(5):e01755-19.
68. Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Sakai F, Yanagisawa C, Nakae T, Sakai F, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2011;17(1):45-51.
69. Besier S, Ludwig A, Zander J, Brade V, Wichelhaus TA. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1570-2.
70. Bard JD, Lee F. Why Can't We Just Use PCR? The Role of Genotypic versus Phenotypic Testing for Antimicrobial Resistance Testing. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2018;40(11):87-95.
71. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009;67(1):6-20.
72. Sjøberg NO. Molekylær genetik : genteknologi, humant DNA. 4. utg. ed. Nesbru: Vett & viten; 2006.
73. Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba JJ, Andrade MJ. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol*. 2015;1275:31-56.
74. Essentials of Real Time PCR: Applied Biosystems; [Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>].
75. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012(63):e3998.
76. Wadle S, Lehnert M, Rubenwolf S, Zengerle R, von Stetten F. Real-time PCR probe optimization using design of experiments approach. *Biomol Detect Quantif*. 2015;7:1-8.
77. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl*. 1993;3(3):S18-29.
78. 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. *J Microbiol Methods*. 2019;160:101-3.
79. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM, Pichon B, Kinnevey PM, Earls MR, et al. Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(12):3252-7.

