



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

## Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet  
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

**Metodeutvikling og validering av multiplex  
real-time PCR for deteksjon av  
meticillinresistente *Staphylococcus argenteus***

Establishment and validation of multiplex real-time  
PCR for detection of methicillin-resistant  
*Staphylococcus argenteus*

*Av / by*

Benedikte Erlandsen og Helle Bratsberg Holte

**Trondheim, 2021**

# Forord

Denne bacheloroppgaven er utarbeidet av Benedikte Erlandsen og Helle Holte, i forbindelse med avslutningen av bachelorgraden i Bioingeniørfag ved Norges teknisk- og naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven er gitt av avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital. Prosjektet ble gjennomført i perioden 14. mars til 20. mai 2021.

Vi ønsker å rette en spesiell takk til våre fagansvarlige veiledere ved AMM, spesialbioingeniør Torunn Gresdal Rønning, molekylærbiolog Christina Gabrielsen Ås og overlege Hege Enger. Takk for at dere har hjulpet oss med laboratoriarbeid og teoretisk forståelse, samt delt deres brennende engasjement for fagfeltet. Dere har gjort denne perioden svært lærerik og spennende, det har vært givende å få et innblikk i et så dagsakutelt og viktig tema! Vi ønsker også å rette en takk til vår prosessveileder Ina Møller for god veiledning underveis. Takk for at du har delt din gode erfaring med akademisk skriving, og gitt oss nyttige tips og veiledning i det skriftlige arbeidet underveis i prosessen.

Trondheim, 20. mai 2021, Benedikte Erlandsen og Helle Bratsberg Holte

# Sammendrag

## Bakgrunn for oppgaven

Antibiotikaresistens er en global utfordring som i de siste årene har økt kraftig. Det er observert økende resistensutvikling også i Norge og det er derfor viktig å overvåke denne utviklingen. Denne overvåkingen gjøres blant annet av referanselaboratoriet for meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) ved avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital. *S. aureus* er en gram positiv stafylokokk med hyppig resistensutvikling. Resistensutviklingen mot antibiotikumet meticillin skyldes ervervelsen av genet *mecA*. *S. argenteus* har lenge blitt feilidentifisert som *S. aureus*, men har i nyere tid blitt klassifisert som en egen art. Det er også oppdaget meticillinresistente stammer av *S. argenteus*, som følge av ervervelse av *mecA*.

## Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en multiplex real-time PCR-metode for å identifisere meticillinresistente *S. argenteus* basert på målgenene *yhfT*, *lukE* og *mecA*. Denne bakterien identifiseres i dag med helgenomsekvensering, noe som er kostbart, ressurs- og tidkrevende. Da avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital har funksjon som referanselaboratorium for MRSA, er det viktig med korrekt identifikasjon. Til tross for at behandlingen for meticillinresistente *S. argenteus* og MRSA er lik, er det ønskelig å kunne skille dem for å overvåke virulens- og resistensutviklingen av *S. argenteus*.

## Material og metode

Metodeutviklingen innebar optimalisering av qPCR og undersøkelse av metodens effektivitet, sensitivitet og spesifisitet. Primerne og probene ble først vurdert og optimalisert som singleplex qPCR, før sammenslåing til multiplex qPCR. Som et siste trinn i metodeutviklingen ble metodens validitet undersøkt. Til dette ble 40 bakteriestammer med kjent genom benyttet. I tillegg ble det undersøkt om metoden var fungerende med to ulike ekstraksjonsmetoder; kokelysning og enzymatisk ekstraksjon med instrumentet EZ1 Advanced XL fra Qiagen.

## Resultat

Resultatene fra dette prosjektet viser at den nye metoden har god effektivitet og sensitivitet, samt god spesifisitet basert på den valideringen som ble gjort på de kjente bakteriestammene. Metoden fungerer godt med begge ekstraksjonsmetoder.

## Konklusjon

Det kan konkluderes med at etableringen av verdens første artsspesifikke multiplex qPCR for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus* basert på målgenene *yhfT*, *lukE* og *mecA* var suksessfull.

# Abstract

## Background

Antibiotic resistance is a global threat and has increased during recent years. Increasing development of resistance has also been observed in Norway, and it is essential to surveil this development. This surveillance is done, among others, by the reference laboratory for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) at the Department of Medical Microbiology at St. Olav's Hospital. *S. aureus* is a gram-positive staphylococcus with rapid development of resistance, where this methicillin resistance is due to the acquisition of the *mecA* gene. *S. argenteus* has long been misidentified as *S. aureus* but was recently described as a novel species. Methicillin-resistant strains of *S. argenteus* have also been discovered due to the acquisition of *mecA*.

## Aim

The purpose of this project was to establish a multiplex real-time PCR assay to identify methicillin-resistant *S. argenteus* based on the target genes *yhfT*, *lukE*, and *mecA*. Today the identification of this bacteria is done with whole genome sequencing (WGS), which is costly, and resource- and time-consuming. As the Department of Medical Microbiology at St. Olav's Hospital functions as a reference laboratory for MRSA, it is essential with correct identification. Even though the treatment for methicillin-resistant *S. argenteus* and MRSA is the same, it is beneficial to distinguish them for surveillance of the virulence- and resistance development of *S. argenteus*.

## Materials and methods

The development of the qPCR assay involved optimization of the method and examination of effectivity, sensitivity, and specificity. The primers and probes were first evaluated and optimized as a singleplex qPCR before merging into a multiplex qPCR. As a final step in the development, the method's validity was examined on a selection of bacterial strains. For this validation, 40 bacterial strains with a known genome were used. In addition, it was investigated whether the method worked on two different extraction methods; boiling lysis and enzymatic extraction with EZ1 Advanced XL from Qiagen.

## Results

The results from this project show that the new method has good effectivity and sensitivity, and adequate specificity, based on the validation done on the known bacterial strains. The method is well functioning with both extraction methods.

## Conclusion

It can be concluded that the establishment of the world's first species-specific multiplex qPCR for detecting methicillin-resistant *S. argenteus* based on the target genes *yhfT*, *lukE*, and *mecA* was successful.



# Liste over forkortelser

AMM	Avdeling for medisinsk mikrobiologi
Ct	Cycle Threshold
dATP	Deoksyadenosin trifosfat
dCTP	Deoksytytidin trifosfat
dGTP	Deoksyguanosin trifosfat
DHFR	Dihydrofolat reduktase
dNTP	Deoksynukleosid trifosfat
dTTP	Deoksytiamin trifosfat
FRET	Fluorescens Resonans Energy Transfer
GC	GuaninCytosin
HCl	Hydrogenklorid
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
mRNA	Messenger RNA
MRSA	Meticillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Meticillin sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
NFQ	Non fluorescent quencher
PBP	Penicillinbindende protein
PVL	Panton-Valentin leukocidin
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Real-time polymerase chain reaction
R <sup>2</sup>	Determinasjonskoeffisient
rRNA	Ribosomalt RNA
<i>S. aureus (S. aur)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. argenteus (S. arg)</i>	<i>Staphylococcus argenteus</i>
SE	Stafylokokkale enterotoksiner
SCC	Staphylococcus Casette Chromosome
Spa	Staphylococcus protein A
T <sub>a</sub>	Hybridiseringstemperatur
T <sub>m</sub>	Smeltetemperatur
tRNA	Transfer RNA
UNG	Uracil N-glycosylase

# Innhold

<b>Forord</b>	<b>i</b>
<b>Sammendrag</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Liste over forkortelser</b>	<b>iv</b>
<b>Figurer</b>	<b>viii</b>
<b>Tabeller</b>	<b>x</b>
<b>1 Innledning</b>	<b>1</b>
1.1 Resistensutvikling . . . . .	1
1.2 Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA . . . . .	1
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	2
1.3.1 MRSA . . . . .	2
1.3.2 <i>S. aureus</i> -kompleks . . . . .	3
1.4 <i>Staphylococcus argenteus</i> . . . . .	3
1.4.1 <i>yhfT</i> . . . . .	3
1.4.2 <i>lukD</i> og <i>lukE</i> . . . . .	3
1.5 Antibiotikas virkningsmekanismer . . . . .	4
1.5.1 $\beta$ -laktamase . . . . .	7
1.5.2 <i>mecA</i> . . . . .	7
1.6 Spredning av resistensgener . . . . .	8
1.7 PCR . . . . .	9
1.8 Real-time PCR . . . . .	11
1.8.1 TaqMan qPCR . . . . .	11
1.8.2 qPCR-kinetikk . . . . .	12
1.9 Primerdesign . . . . .	14
1.10 Kapillærelektroforese . . . . .	15
1.11 Effektivitet og sensitivitet . . . . .	17
1.12 Bakgrunn for oppgaven . . . . .	17
1.13 Hensikt med oppgaven . . . . .	19
<b>2 Material og metode</b>	<b>20</b>
2.1 Ekstraksjon av bakterielt DNA . . . . .	20
2.2 Måling av DNA-konsentrasjon . . . . .	21
2.3 Forbehandling av primere . . . . .	22
2.4 Singleplex qPCR . . . . .	22
2.4.1 Tillaging av reaksjonsmix . . . . .	23

2.4.2	Bestemmelse av optimal hybridisering- og polymeriseringstemperatur . . . . .	23
2.4.3	Kapillærelektroforese . . . . .	24
2.5	Multiplex qPCR . . . . .	25
2.5.1	Tillaging av reaksjonsmix . . . . .	25
2.5.2	Bestemmelse av optimal hybridisering- og polymeriseringstemperatur . . . . .	26
2.5.3	Kapillærelektroforese . . . . .	26
2.6	Effektivitet- og sensitivitetstesting . . . . .	26
2.7	Validering av qPCR metode . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Resultater</b>	<b>28</b>
3.1	Ekstraksjon av bakterielt DNA og måling av DNA-konsentrasjon . . .	28
3.2	Singleplex qPCR . . . . .	28
3.2.1	Analysering og vurdering av primere og prober . . . . .	28
3.3	Multiplex qPCR . . . . .	38
3.4	Effektivitet- og sensitivitetstesting . . . . .	40
3.5	Validering av qPCR metode . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>45</b>
4.1	Vurdering av ekstraksjonsmetodene . . . . .	45
4.2	Vurdering av spesifisitet til primere og prober . . . . .	46
4.3	Optimalisering av qPCR . . . . .	49
4.4	Effektivitet og sensitivitet . . . . .	50
4.5	Validering av qPCR metode . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>52</b>
	<b>Bibliografi</b>	<b>53</b>
	<b>Vedlegg</b>	<b>57</b>
A	Vedlegg 1: Gjennomsnittlige Ct-verdier ved utprøving av hybridiserings- og polymeriseringstemperaturer . . . . .	57
B	Vedlegg 2: Beregninger Excel . . . . .	59
C	Vedlegg 3: Bakteriestammer til validering . . . . .	65
D	Vedlegg 4: Prosedyre MRSA . . . . .	67

# Figurer

1.1	Hovedvirkningsmekanismene til antibiotika på bakteriecellen (Laget med BioRender.com). . . . .	4
1.2	Inhibering av proteinsyntesen ved bruk av antibiotika (Laget med BioRender.com). . . . .	5
1.3	Skjematisk oversikt over mekanismene bak hvordan antibiotika kan inhibere folsyremetabolismen (Laget med BioRender.com). . . . .	6
1.4	$\beta$ -laktamring (Laget med ChemDraw 20.0). . . . .	7
1.5	Hvordan enzymet $\beta$ -laktamase kløyver $\beta$ -laktamringen (Laget med ChemDraw 20.0). . . . .	7
1.6	Prinsipp for horisontal genoverføring ved transformasjon (Laget med BioRender.com). . . . .	8
1.7	Prinsipp for horisontal genoverføring ved transduksjon (Laget med BioRender.com). . . . .	9
1.8	Prinsipp for horisontal genoverføring ved konjugasjon (Laget med BioRender.com). . . . .	9
1.9	Prinsipp for konvensjonell PCR (Laget med BioRender.com). . . . .	10
1.10	Prinsipp for qPCR med TaqMan-probe (Laget med BioRender.com). . . . .	11
1.11	Prinsipp TaqMan probe (Laget med BioRender.com). . . . .	12
1.12	Amplifikasjonskurve qPCR. Figuren illustrerer de tre fasene kurven kan deles inn i; initieringsfase, eksponentiell fase og platåfase (Laget med BioRender.com). . . . .	13
1.13	Sammenhengen mellom DNA-mengde og Ct-verdi. (A) viser reaksjonskurver for tre ulike prøver og deres Ct-verdi som settes med terskelgrensen. (B) Standardkurven plottes med kjente verdier (sorte punkter) for prøve 1-3 ut fra målt Ct-verdi. Figur hentet fra (McPherson og Moller 2007). . . . .	13
1.14	Illustrasjon av reaksjonen som foregår inne i et kapillærrør under elektroforese. Figuren illustrerer elektroforetisk og elektroosmotisk mobilitet (Butler 2012). . . . .	16
2.1	Oversikt over fullstendig prøvegang fra bakterieoppvekst til analysering med Quantstudio 5 Real-Time PCR (Laget med BioRender.com). . . . .	23
2.2	DNA-chip primes først med gel-dye mix og tilsettes deretter gel-dye mix, ladder og prøvemateriale (Laget med BioRender.com). . . . .	25
3.1	Amplifikasjonsplott for <i>yhfT</i> -genet av prøve CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ) ved temperatur 54-64 °C. . . . .	29
3.2	Resultatet av kapillærelektroforese for PCR-produkt av målgen <i>yhfT</i> fra prøve CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ). . . . .	30
3.3	Amplifikasjonsplott for <i>yhfT</i> -genet av prøve CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ) ved temperatur 60-70 °C. . . . .	31

3.4	Resultater av kapillærelektroforese for PCR-produkt av målgen <i>yhfT</i> ved temperatur 60-70 °C fra prøve CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ). . . . .	32
3.5	Amplifikasjonsplott for <i>yhfT</i> -genet av prøve CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ) med primer <i>yhfT2-F</i> ved 54-64 °C . . . . .	33
3.6	Resultater av kapillærelektroforese for <i>yhfT</i> med primer <i>yhfT2-F</i> ved 62 °C og 64 °C i PCR-produkter fra prøve CCUG 70917T ( <i>S. argenteus</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aureus</i> ). . . . .	34
3.7	Amplifikasjonsplott for <i>lukD</i> -genet. Plottet viser detekterbar amplifikasjon av både CC 2250 ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ). . . . .	35
3.8	Resultater av kapillærelektroforese PCR-produkter for <i>lukD</i> fra prøve CC 2250 ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ). . . . .	36
3.9	Amplifikasjonsplott for <i>lukE</i> -genet av prøve CC 2250 ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ) ved temperatur 54-64 °C. . . . .	37
3.10	Resultater av kapillærelektroforese av PCR-produkter for <i>lukE</i> fra prøve CC 2250 ( <i>S. arg</i> ) og CCUG 60578 ( <i>S. aur</i> ). . . . .	38
3.11	Amplifikasjonsplott for multiplex qPCR på målgenene <i>yhfT</i> (grønn), <i>lukE</i> (blå), og <i>mecA</i> (rød). . . . .	39
3.12	Resultat av kapillærelektroforese på PCR-produkt fra multiplex qPCR ved 62 °C. PCR-produktene har ulik lengde der <i>yhfT</i> har en lengde på 127 bp, <i>lukE</i> på 103 bp og <i>mecA</i> på 155 bp. . . . .	40
3.13	Eksempel på beregning av effektivitet i Excel på prøve CC 2250 ( <i>S. arg</i> ) ved 62 °C, målgen <i>yhfT</i> , EZ1-eluat. . . . .	41
3.14	Effektivitetsberegning for CC 2250 ( <i>S. arg</i> ) ved 62 °C, målgen <i>lukE</i> , EZ1-eluat. . . . .	42
3.15	Effektivitetsberegning for multiplex qPCR på målgenene <i>lukE</i> , <i>mecA</i> , <i>yhfT</i> , EZ1-eluat. Utført på stamme CC 2250 ( <i>S. arg</i> ). . . . .	43

# Tabeller

2.1	Referansestammer og bakteriestammer fra stammebank, samt informasjon om genotype . . . . .	20
2.2	Reagenser benyttet til ekstraksjon av bakterielt DNA ved kokelysering og enzymatisk ekstraksjon med EZ1 . . . . .	20
2.3	Tillaging av 1:10 fortyninger etter ekstraksjon . . . . .	21
2.4	Reagenser benyttet for tillaging av bruksløsning for måling av mengde DNA ved bruk av Qubit fluorometer . . . . .	21
2.5	Tillaging av løsninger brukt til kvantitering av DNA med Qubit fluorometer . . . . .	21
2.6	Informasjon om primer- og prober for målgenene <i>yhfT</i> , <i>lukD</i> og <i>lukE</i> .	22
2.7	Tillaging av nye primer- og probeløsninger fra stamløsning på 100 $\mu$ M	22
2.8	Tillaging av reaksjonsmix for singleplex qPCR-metode . . . . .	23
2.9	Innstillinger for singleplex qPCR . . . . .	24
2.10	Oversikt over bakteriestamme, målgen og temperaturgradient analysert under bestemmelse av optimal hybridiseringstemperatur . .	24
2.11	Tillaging av reaksjonsmix for multiplex qPCR-metode med tre målgener ( <i>yhfT</i> , <i>lukE</i> og <i>mecA</i> ) . . . . .	25
2.12	Innstillinger for multiplex qPCR . . . . .	26
3.1	Målt mengde DNA i standardløsninger, kontrollmateriale, kokelysat og EZ1-eluat . . . . .	28
3.2	Oversikt over resultater på multiplex qPCR, samt gjennomsnittlig Ct-verdi av kokelysat og EZ1-eluat . . . . .	39
3.3	Resultater fra effektivitetsberegning av singleplex qPCR på <i>yhfT2</i> og <i>lukE</i> ved hybridisering- og polymeriseringstemperatur på 62 °C . . .	41
3.4	Resultater fra effektivitetsberegning av multiplex qPCR ved hybridisering- og polymeriseringstemperatur på 62 °C . . . . .	42
3.5	Målt mengde DNA i standardløsninger, kontrollmateriale, kokelysat (ufortynnet) og EZ1-eluat (fortynning 1:10) på prøve CC 2250 ( <i>S. arg</i> )	43
3.6	Laveste bakterietall for deteksjon ved kokelysat og eluat fra EZ1. Fortynningsrekken for kokelysat ble laget fra ufortynnet lysat, mens fortynningsrekken for eluat ble laget fra 1:10 fortynning . . . . .	44
3.7	Resultater fra validering av multiplex qPCR på 40 utvalgte bakteriestammer . . . . .	44
1	Gjennomsnittlig Ct-verdi ved hver temperatur for CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) kokelysat og eluat, analysert på målgenet <i>yhfT</i> . . . . .	57
2	Gjennomsnittlig Ct-verdi for hver temperatur for CCUG 70917T ( <i>S. arg</i> ) kokelysat og eluat, analysert på målgenet <i>yhfT</i> . . . . .	57
3	Gjennomsnittlig Ct-verdi ved hver temperatur for cc 2250 ( <i>S. arg</i> ) kokelysat og eluat, analysert på målgen <i>lukE</i> . . . . .	57

- 4 Gjennomsnittlig Ct-verdi ved hver temperatur for CCUG 70917T (S. arg) kokelysat og eluat, analysert på målgen *yhfT* med primer yhfT2-F 58

# 1. Innledning

## 1.1 Resistensutvikling

Resistensutvikling er en global utfordring og en stor trussel mot folkehelsen. I følge World Health Organization (WHO) er antibiotikaresistens en av de største truslene mot global helse, matsikkerhet og utvikling (WHO 2020). Antibiotikaresistens oppstår naturlig gjennom seleksjon og tilpasningsdyktighet hos bakteriene. Til tross for dette har resistensutviklingen økt kraftig og raskt, trolig grunnet misbruk og overbruk av antibiotika, dårlig smitteforebygging og bruk av antibiotika i matindustrien. Antibiotikaresistens truer effektiv behandling av bakterielle infeksjoner. Dersom behandlingen blir ineffektiv vil det føre til vedvarende infeksjon (WHO u.d). Vedvarende bakterielle infeksjoner resulterer i lengre sykehusopphold, økte kostnader og økt dødelighet. Dette gjelder ikke bare for infeksjoner og sykdommer som krever sykehusinnleggelse, men også for mindre infeksjoner man i dag går til fastlegen for (Berild og Haug 2008).

Antibiotikaresistens er et lite problem i Norge sett i sammenheng med Europa og resten av verden. Det er observert en økende mengde antibiotikaresistente bakterier i flere land nært Norge, men det er også observert økning her i landet (Leegaard 2002). Reisevirksomhet gir økt risiko for importsmitte fra land med forekomst av resistente bakterier. I Norge er det for eksempel observert en økning av ESBL-produserende bakterier. ESBL er en forkortelse for “extended spectrum betalactamase”, og innebærer at bakterien innehar resistensmekanismer mot de vanligste typer  $\beta$ -laktamantibiotika (FHI 2019). ESBL forekommer hyppigst hos gram negative bakterier.

Årsaken til at antibiotikaresistensen fremdeles er lav i Norge skyldes sannsynligvis restriktiv bruk av antibiotika, strenge behandlingstiltak og overvåking av resistensutvikling (Leegaard 2002). Overvåkingen av antibiotikaresistens i Norge foregår gjennom Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS), Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens (NORM), og overvåking av spesifikke mikrober ved laboratorier med nasjonale referansefunksjoner (FHI 2021; Simonsen 2009).

## 1.2 Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA

Nasjonalt referanselaboratorium for meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) ble etablert ved avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital i januar 2006. Oppdraget om nasjonal referansefunksjon ble gitt av Helse- og omsorgsdepartementet, med mål om å kartlegge forekomst og utbredelse av MRSA-stammer i Norge. Dette ansvaret innebærer innsamling av nye MRSA-isolater, opprettholdelse av stammebank og forskning. Laboratoriet skal i



tillegg ha rådgivende og støttende funksjon, samt drive overvåking, beredskap og respons ved utbrudd av MRSA (St.Olavs 2019). Referanselaboratoriet ivaretar en stammebank etablert i mai 2005 og har mottatt tilnærmet alle MRSA-isolater i Norge siden 2008. Alle stammer sendes til referanselaboratoriet sammen med resultater fra resistensbestemmelse for videre genotypisk undersøkelse. Dette gir god epidemiologisk overvåking og er et nyttig hjelpemiddel til identifisering av nyoppståtte stammer (St.Olavs 2020).

## 1.3 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* er en gram positiv, koagulase positiv bakterie som tilhører familien *Staphylococcus*. *S. aureus*, også kalt gule stafylokokker er en del av menneskets normalflora. Bakterien finnes blant annet på huden og slimhinnene (Fetsch 2018). *S. aureus* er en opportunistisk bakterie som kan infisere og kolonisere blant annet blod, hud og bløtvev hos mennesker, og kan gi pyogene eller toksinmedierte infeksjoner (Lakhundi og K. Zhang 2018). *S. aureus* ble først identifisert på 1800-tallet av den tyske kirurgen Anton J. Rosenbach, og ble navngitt *S. aureus* grunnet pigmenteringen av koloniene. Aureus betyr på latin “gull” (Fetsch 2018). *S. aureus* har en høy grad av resistensutvikling og omtrent 1% av infeksjoner med *S. aureus* er MRSA<sup>1</sup>. Dette innebærer at stammen er resistent mot antibiotikumet meticillin og andre  $\beta$ -laktamantibiotika.

### 1.3.1 MRSA

Antibiotikaresistente *Staphylococcus aureus* vokste fram som følge av oppdagelsen av antibiotikumet penicillin i 1928 og den liberale bruken av dette antibiotikumet på 1940-tallet. Disse penicillinresistente bakteriene produserte et enzym,  $\beta$ -laktamase. Grunnet oppdagelsen av denne resistensutviklingen ble det produsert et semisyntetisk antibiotikum, meticillin, som kunne benyttes mot  $\beta$ -laktamase-produserende stafylokokker. Ikke lang tid etter at meticillin ble tatt i bruk, ble det oppdaget meticillinresistente stammer av *S. aureus*. Disse bakteriene omtales som MRSA, meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (Lakhundi og K. Zhang 2018). Årsaken til denne resistensutviklingen skyldes ervervelsen av genet *mecA*. *mecA* koder for et protein, et penicillinbindende protein 2a (PBP2a), og resulterer i resistens mot all  $\beta$ -laktamantibiotika. Genet for *mecA* befinner seg på en mobil genkassett (SCC) som kan overføres horisontalt mellom bakterieartene (Wienders mfl. 2002). MRSA er en av de hyppigste årsakene til infeksjoner ved helseinstitusjoner, men også ellers i samfunnet er det registrert smitte med MRSA (Kaden mfl. 2018). Dette skyldes at bakterien lett spres via kontaktsmitte mellom mennesker, og kontakt med kontaminerte områder og materialer (Murray 2018). Infeksjoner med MRSA er forbundet med økt sykkelighet og dødelighet, samt økte kostnader for helsevesenet og samfunnet (Becker mfl. 2019).

---

<sup>1</sup>Molekylærbiolog CGÅ, referanselaboratorium for MRSA

### 1.3.2 *S. aureus*-kompleks

*S. aureus*-komplekset er nylig definert som et kompleks bestående av tre koagulase positive arter av stafylokokker - *S. aureus*, *S. argenteus* og *S. schweitzeri* (Becker mfl. 2019). Lenge har *S. argenteus* blitt feilklassifisert som *S. aureus*, som trolig skyldes at de har identiske 16S rRNA gener (Thaipadungpanit mfl. 2015). Dette gjør det vanskelig å skille dem fra hverandre uten bruk av genteknologi. *S. aureus* og *S. argenteus* har lignende virulens- og resistensgener, men det er fremdeles hensiktsmessig å kunne skille dem fra hverandre for å overvåke utviklingen av *S. argenteus* (Kaden mfl. 2018).

## 1.4 *Staphylococcus argenteus*

*S. argenteus* er genetisk ulik *S. aureus* og ble først i 2015 beskrevet som en egen art. Siden da har det også blitt identifisert meticillinresistente isolater av *S. argenteus* (Tong mfl. 2015). I tidlige rapporter ble *S. argenteus* beskrevet å ha en lavere virulens og store kliniske forskjeller fra *S. aureus*. Denne antagelsen har i nyere tid vist seg å være feilaktig. *S. argenteus* og *S. aureus* er trolig mer sammenlignbare enn tidligere antatt når det kommer til virulens og klinisk signifikans (Becker mfl. 2019). Virulensfaktorene omfatter en polysakkaridkapsel som beskytter bakterien fra fagocytose, clumping faktor A (ClfA) og overflateproteinet protein A som bidrar til adhesjon til målcellen (Higgins mfl. 2006). Enzymet katalase beskytter bakteriene fra peroxider produsert av nøytrofile granulocytter og makrofager. I tillegg har de enzymet koagulase som fører til koagulering av plasma ved å omdanne fibrinogen til fibrin (Murray 2018). *S. argenteus* har også stafylokokkale exotoksiner (SE) og andre leukocidiner. Exotoksiner stimulerer en enorm frigjørelse av cytokiner og betegnes derfor som et “superantigen” (Murray 2018). Leukocidiner er toksiner som ødelegger hvite blodceller. *S. aureus* har Panton-Valentine leukocidin, mens *S. argenteus* har tilsvarende gener som koder for leukocidiner, blant annet *lukD* og *lukE*. Da det ble oppdaget meticillinresistente stammer av *S. argenteus* ble meldekriteriene for MRSA oppdatert. Dette innebar at meticillinresistente *S. argenteus* skulle behandles på lik måte som MRSA.

### 1.4.1 *yhfT*

*yhfT* er et gen som trolig er godt egnet til å skille mellom *S. argenteus* og *S. aureus*. *yhfT*-genet er artsspesifikt for *S. argenteus* og valgt ut på grunn av mindre enn 70% likhet med tilsvarende gener i andre stafylokokker. *yhfT* koder for et protein som ligner og mest sannsynlig har samme funksjon som langkjedede fettsyre-CoA-ligaser (UniProt 2021). Langkjedede fettsyre-CoA ligaser er enzymer som katalyserer aktivering og dannelse av acyl-CoA thiolestere. Acyl-CoA thiolestere fungerer videre som substrater i anabolske og katabolske prosesser (Knights 2003).

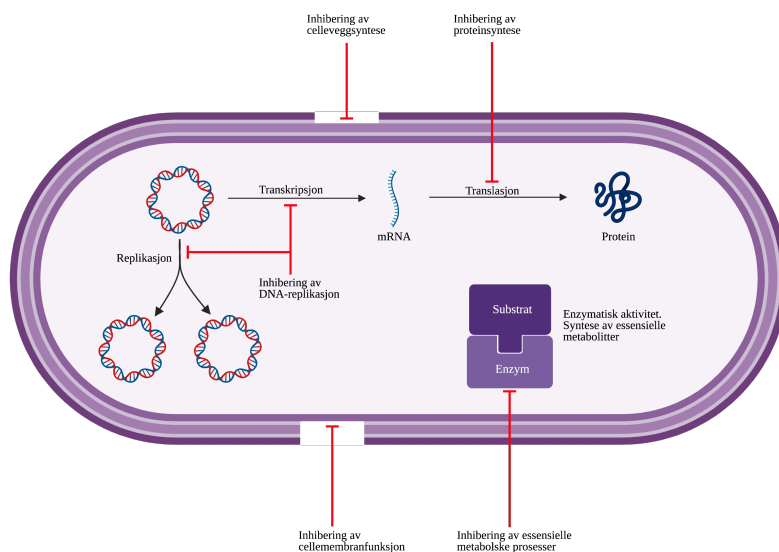
### 1.4.2 *lukD* og *lukE*

*lukD* og *lukE* er to gener som sammen koder for et leukocidin hos *S. argenteus*. Det er et bikomponent leukocidin, som vil si at det er to gener som danner hver sine

proteinprodukt, LukD og LukE (Morinaga mfl. 2003). Disse to monomerene danner til sammen en oktamer. Dette leukocidinet er en del av gruppen poreformede toksiner, en viktig gruppe av stafylokokkale virulensfaktorer. Luke/D-toksinet angriper leukocytter og erythrocytter, og induserer celledød ved perforasjon av plasmamembranen. Poreformasjonen initieres av spesifikke bindinger til reseptorer på leukocytene og erythrocyttene, henholdsvis C-C kjemokinreseptor 5 (CCR5) og Duffy antigenreseptor for kjemokiner (DARC) (Spaan mfl. 2017).

## 1.5 Antibiotikas virkningsmekanismer

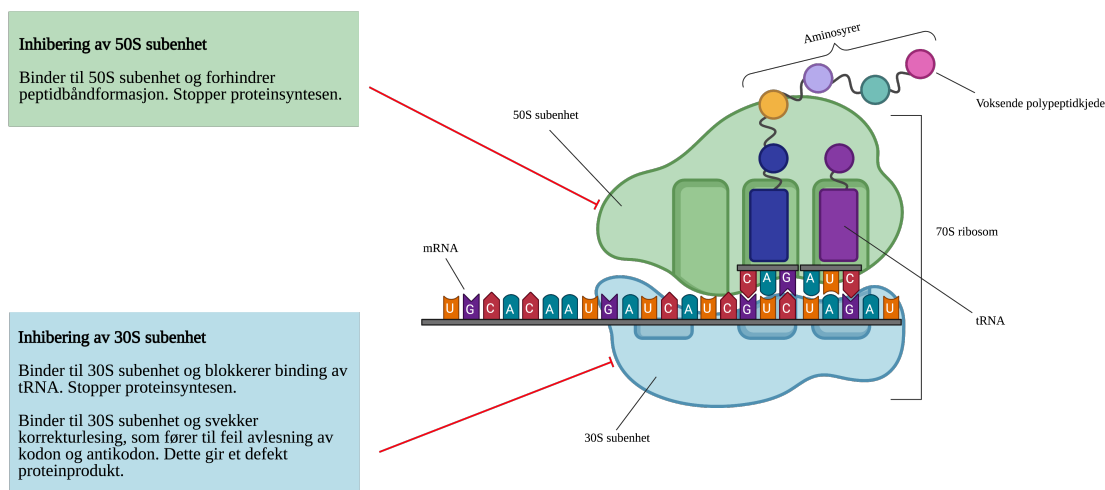
Antibiotika har ulike virkningsmekanismer, og kan enten virke bakteriostatisk eller baktericid. Antibiotika virker bakteriostatisk ved å inhibere formering av bakterien, eller baktericid ved å aktivt drepe bakteriecellen. Det finnes fem grunnleggende virkningsmekanismer for antibiotika - inhibering av proteinsyntese, DNA-replikasjon, depolarisering av cellemembran, inhibering av essensielle metabolske prosesser og celleveggssyntese (Barzic og Ioan 2015). Figur 1.1 illustrerer hvordan de fem grunnleggende virkningsmekanismene til antibiotika virker på bakteriecellen.



**Figur 1.1:** Hovedvirkningsmekanismene til antibiotika på bakteriecellen (Laget med BioRender.com).

Aminoglykosider og tetracykliner er eksempler på antibiotika som inhiberer proteinsyntesen ved å påvirke ribosomets funksjon (Walsh 2003). Et prokaryot ribosom, 70S ribosom, består av 30S subenhet og 50S subenhet. 70S ribosomene danner proteiner fra mRNA, der translasjonen starter med at 30S subenhet gjenkjenner startkodon (AUG) på mRNA. tRNA med komplementært antikodon føres til mRNA via translasjonsfaktorer, og deretter vil 50S subenhet feste seg til komplekset og translasjonen starter. Antibiotika som inhiberer proteinsyntesen vil enten binde til og inhibere 30S subenhet eller 50S subenhet. Aminoglykosider er

antibiotika som har 30S subenhet som mål og binder seg til A-setet, aminoacylsetet. Dette fører til feil avlesning av kodon og antikodon, og resulterer i et defekt proteinprodukt. Tetracykliner er et annet antibiotika som blokkerer binding til A-setet, og forhindrer avlesning og dannelse av proteinprodukt. En annen måte antibiotika inhiberer funksjonen av 30S subenhet er ved å forhindre påkobling av tRNA til ribosomet. Antibiotika med 50S subenhet som angrepsmål kan enten blokkere peptidbåndformasjon mellom aminosyrer, eller interferere med dannelsen av det initielle komplekset mellom 50S og 30S subenhet. Begge disse mekanismene resulterer i at dannelse av protein uteblir (Parker mfl. 2019).

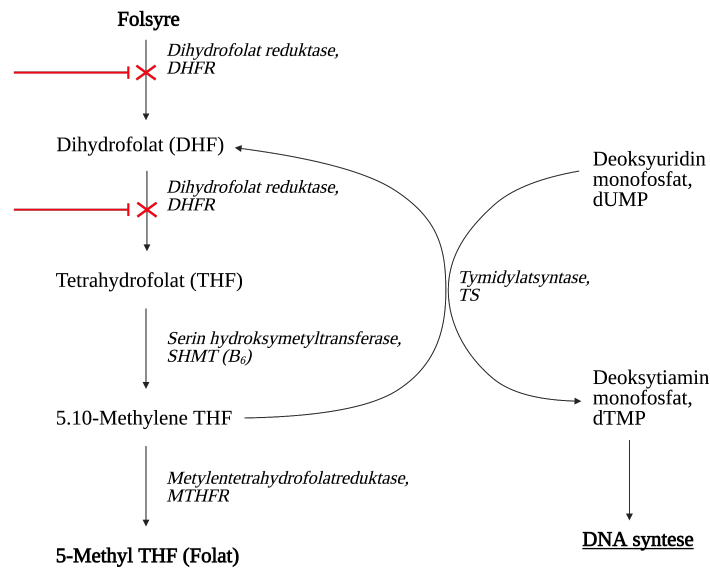


**Figur 1.2:** Inhibering av proteinsyntesen ved bruk av antibiotika (Laget med BioRender.com).

En annen viktig gruppe antibiotika er den gruppen som blokkerer DNA-replikasjon. Dette innebærer å angripe ulike enzymer som er essensielle for replikasjon av DNA, for eksempel topoisomerase type II. Dette er et paraplybegrep for ulike type II topoisomeraseenzym, herunder topoisomerase IV og gyrase som er til stede i bakterieceller. Disse topoisomerasene er en viktig del av DNA-replikasjonen da enzymene bidrar i oppkveiling av DNA-strukturen og muliggjør replikasjon (Schaechter 2009). Det finnes også antibiotika som inhiberer enzymet RNA-polymerase, som syntetiserer mRNA fra DNA-sekvensen. Uten disse enzymene vil DNA-replikasjonen stoppe opp og bakterien vil dø. Et eksempel på en slik type antibiotika er kinolon-antibiotika, som hemmer enkelte topoisomeraser (Walsh 2003).

En cellemembran som ikke er intakt er ikke forenelig med liv. Enkelte antibiotika inkorporeres i fosfolipidmembranen og endrer permeabiliteten og membranpotensialet slik at bakteriecellen dør. Et eksempel på et slikt antibiotikum er daptomycin, som binder seg til cellemembranen ved hjelp av kalsiumioner (Walsh 2003). Antibiotikumet danner en poreformasjon som forstyrrer cellemembranen. Dette resulterer i kalium effluks, depolarisering av membranpotensialet og rask celledød (Steenbergen mfl. 2005).

Noen antibiotika er antimetabolitter og fungerer som kompetitive inhibitorer for metabolske enzymer og prosesser i bakteriecellen. Prokaryoter syntetiserer sin egen folsyre og metabolismen av folsyre er en viktig kofaktor i DNA- og RNA-syntesen. Inhibering av essensielle metabolske prosesser kan gjøres ved å inhibere enzymet dihydrofolat reduktase (DHFR). DHFR katalyserer to-trinnsreduksjonen av folsyre til dihydrofolsyre og deretter omdannelsen av dihydrofolsyre til tetrahydrofolsyre. Den metabolske prosesseringen av folsyre resulterer i produksjon av nukleinsyrebaser. Ved å inhibere DHFR vil produksjonen av nukleinsyrebaser stoppe opp. På denne måten vil antibiotika som inhiberer metabolismen av folsyre også inhibere DNA-replikasjon (Parker mfl. 2019). Antibiotika som sulfonamider er eksempel på antibiotika som virker bakteriostatisk ved å inhibere biosyntesen av folsyre (Walsh 2003).

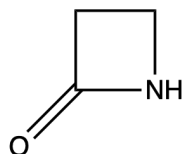


**Figur 1.3:** Sjematisk oversikt over mekanismene bak hvordan antibiotika kan inhibere folsyremetabolismen (Laget med BioRender.com).

Det finnes flere ulike antibiotika som har bakteriens cellevegg som angrepspunkt, for eksempel  $\beta$ -laktamantibiotika (Walsh 2003). Bakteriens cellevegg er avgjørende for bakteriens overlevelse, da celleveggen hindrer vann i å trenge inn i cytoplasma. Celleveggen er bygget opp av peptidoglykaner. Når antibiotika inhiberer syntesen av peptidoglykan i celleveggen, fører dette til at bakteriecellen blir mer mottakelig for osmotisk lysis. Dette er en prosess som kan føre til osmotisk ubalanse og resulterer i at bakterien sprekker. Dette skjer ved at antibiotikaet interagerer direkte med penicillinbindende protein (PBP), og på denne måten inhiberer transpeptidaseaktivitet og dermed syntesen av peptidoglykan (Parker mfl. 2019). Resistensutviklingen hos gule stafylokokker startet med ervervelsen av  $\beta$ -laktamase for å motvirke effekten av  $\beta$ -laktamantibiotika.

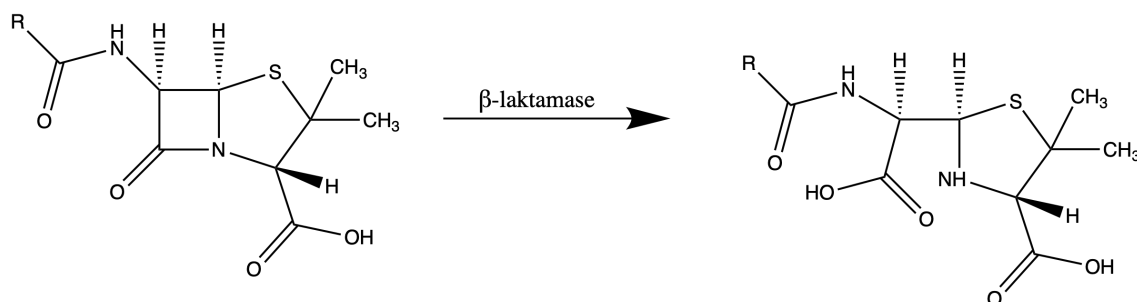
### 1.5.1 $\beta$ -laktamase

Felles for alle  $\beta$ -laktamantibiotika er en  $\beta$ -laktamring (Figur 1.4) som kan binde seg til PBP med høy affinitet. Dette inhiberer syntesen av nye peptidoglykaner i celleveggen.



**Figur 1.4:**  $\beta$ -laktamring (Laget med ChemDraw 20.0).

$\beta$ -laktamase er et enzym som inaktiverer  $\beta$ -laktamantibiotika ved å hydrolysere peptidbåndene i  $\beta$ -laktamringen. Figur 1.5 illustrerer hvordan  $\beta$ -laktamase fører til en endring i antibiotikaets konformasjon, noe som resulterer til at det ikke lenger er effektivt mot bakterien. Produksjonen av  $\beta$ -laktamase er en vanlig og utbredt mekanisme for antibiotikaresistens. Denne typen resistens ble funnet i *S. aureus*-stammer allerede på 1940-tallet etter at penicillin ble introdusert og tatt i bruk (Majiduddin mfl. 2002).



**Figur 1.5:** Hvordan enzymet  $\beta$ -laktamase kløyver  $\beta$ -laktamringen (Laget med ChemDraw 20.0).

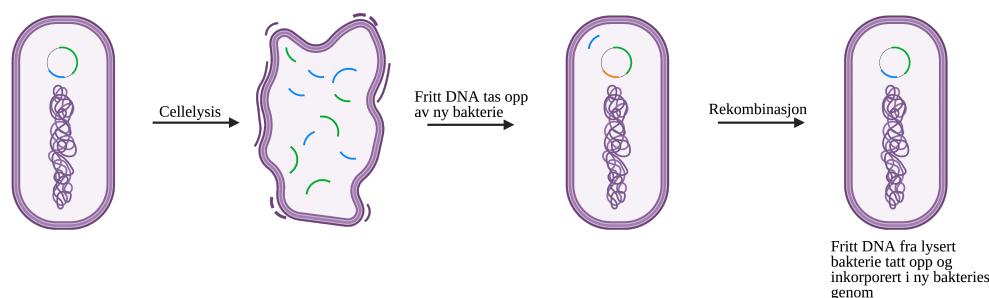
### 1.5.2 *mecA*

*mecA* er et gen som gir resistens hos stafylokokker. Etter utviklingen av det første penicillinastabile  $\beta$ -laktamantibiotikaet, meticillin, ble det oppdaget flere gule stafylokokker som hadde ervervet genet *mecA*. *mecA* koder for et protein kalt penicillinbindende protein 2a (PBP2a). PBP2a er en transpeptidase som katalyserer kryssbinding av peptidoglykanen i celleveggen ved eksponering av meticillin eller andre  $\beta$ -laktamantibiotika (Walsh 2003). Celleveggsyntese er avgjørende for bakterieoverlevelse, og drives av reaksjoner katalysert av PBP. Aktiviteten av PBP er derfor helt avgjørende og dermed et godt mål for  $\beta$ -laktamantibiotika. Genet *mecA* er ervervet av *S. aureus* fra et ukjent non-*S. aureus* opphav (Fishovitz mfl. 2014). Celleveggsyntesen opprettholdes av PBP2a når andre PBP inhiberes. På denne måten vil ikke celleveggsyntesen påvirkes av meticillin eller andre  $\beta$ -laktamantibiotika.

## 1.6 Spredning av resistensgener

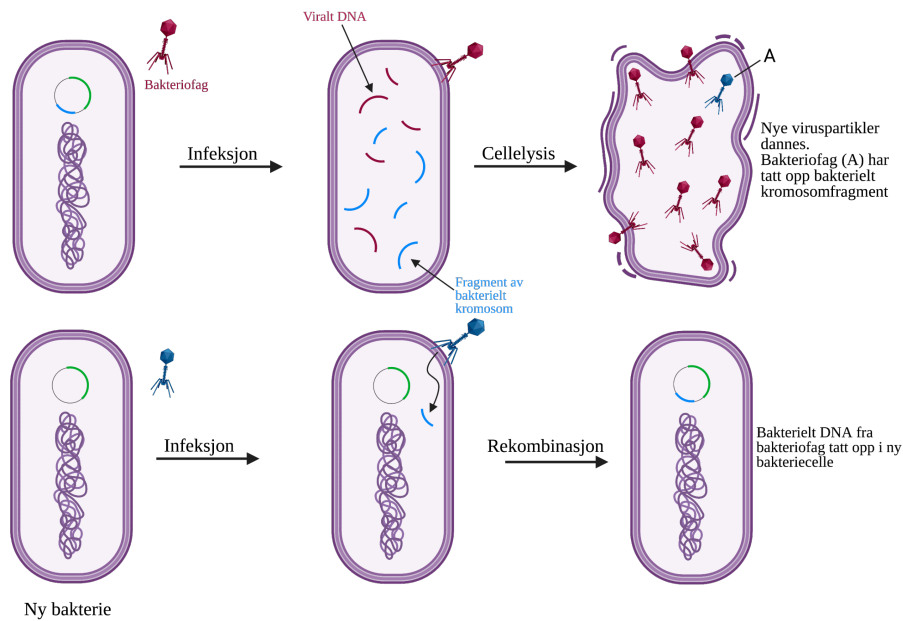
Spredning av resistensgener kan skje ved vertikal eller horisontal genoverføring. Vertikal genoverføring innebærer at resistensgenene overføres til neste generasjon av bakterier ved celledeling. På denne måten vil til slutt de bakteriene som innehar resistensgener overleve, og de sensitive bakteriene dør ut. Horisontal genoverføring er genoverføring på tvers av bakterier. Dette innebærer at et gen som koder for resistens overføres fra en resistent bakteriecelle til en sensitiv bakteriecelle som da blir resistent (Walsh og Wencewicz 2016). Horisontal genoverføring kan skje ved mekanismene transformasjon, transduksjon og konjugasjon.

Transformasjon er opptaket av fritt, nakent DNA fra omgivelsene som deretter integreres i bakteriens DNA. En bakterie går i oppløsning som følge av for eksempel cellysis, som fører til at cellen sprekker og fragmenter av genmateriale blir liggende fritt i omgivelsene. Visse bakterier har evnen til å ta opp fritt DNA fra omgivelsene og inkorporere dette i eget genom. Dette skjer hyppigst mellom bakterier som er nært beslektet (Schøyen 2004).



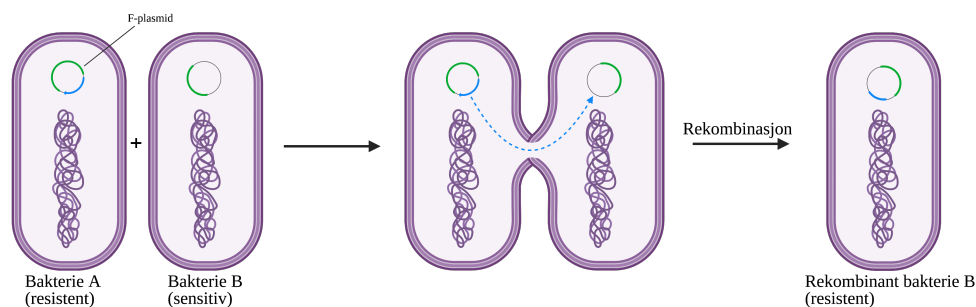
**Figur 1.6:** Prinsipp for horisontal genoverføring ved transformasjon (Laget med BioRender.com).

Transduksjon innebærer at bakterien tar opp DNA som koder for resistensgener ved hjelp av bakteriofager. En bakteriofag er et virus som infiserer bakterier. Under virusreplikasjonen kan en eller flere av bakteriofagene ta opp et gen som koder for resistens fra bakterien og inkorporere det i sitt eget virus-DNA. Når den rekombinante bakteriofagen med bakteriegenet infiserer en ny bakteriecelle, vil bakterie-DNAet overføres til den infiserte bakterien. Dette fører til at DNAet fra den rekombinante bakteriofagen inkorporeres i kromosomet til den infiserte bakterien (Griffiths mfl. 1999). Dette resulterer i en rekombinant bakterie som illustrert i Figur 1.7.



**Figur 1.7:** Prinsipp for horisontal genoverføring ved transduksjon (Laget med BioRender.com).

Konjugasjon er direkte overføring av DNA fra en bakterie til en annen. Den ene bakterien fungerer som en donorcelle og den andre bakterien som en mottakercelle. Donorcellen vil overføre en del av plasmidet, et F-plasmid (F=fertil), til mottakercellen. F-plasmidet inneholder gener som muliggjør genoverføringen slik at plasmidet kan integreres i bakteriekromosomet hos mottakercellen. Dersom genet på plasmidet koder for resistens, vil mottakercellen også kunne uttrykke disse resistensgenene (Schøyen 2004).



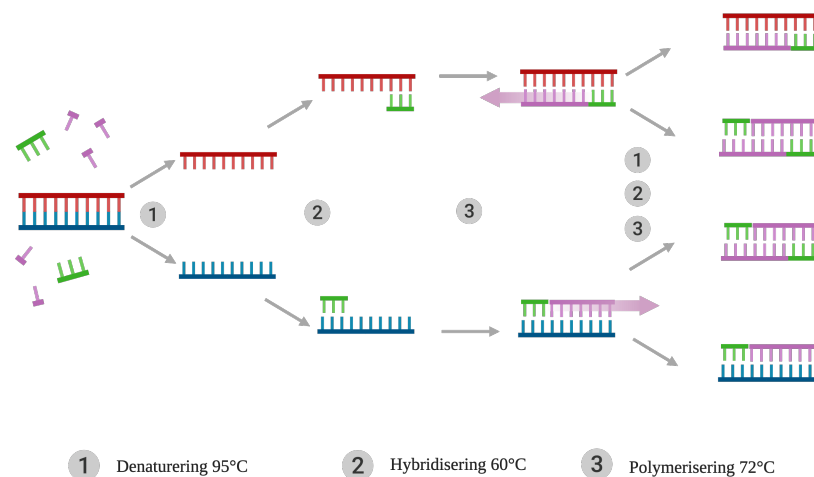
**Figur 1.8:** Prinsipp for horisontal genoverføring ved konjugasjon (Laget med BioRender.com).

## 1.7 PCR

Polymerase kjedereaksjon, PCR, har revolusjonert molekylærbiologien ved å utnytte den naturlige DNA-syntesen in vitro. Det er en hyppig brukt metode for å syntetisere store mengder DNA fra svært lite utgangsmateriale (McPherson og Moller 2007). Metoden går ut på å designe oligonukleotider, kalt primere, som er



komplementære til endene på målsekvensen som ønskes amplifisert. For å kunne designe spesifikke primere og prober, må basesekvensen på templattråden være kjent. Primerne er enkelttrådig oligonukleotider som bindes til komplementær DNA-sekvens for å instruere DNA polymerase hvilken sekvens som skal amplifiseres. *Taq* DNA polymerase er et enzym som katalyserer syntese av DNA, med optimal enzymaktivitet mellom 55-70°C. *Taq* DNA polymerase er det mest brukte enzymet, da dette er varmestabilt og godt egnet til bruk innen PCR-diagnostikk (Coleman og Tsongalis 2017). Deoksynukleotid trifosfat (dNTP) er en samlebetegnelse på nukleotidbasene som er byggesteinene i PCR-reaksjonen, og består av syntetiserte dATP, dTTP, dCTP og dGTP. Buffer tilsettes for å optimalisere enzymaktiviteten og for å bevare DNA, ofte brukes TrisHCl og magnesiumklorid (MgCl<sub>2</sub>). Magnesium er essensielt for PCR-reaksjonen og er en viktig kofaktor for DNA polymerase. I dag blir det produsert ferdige PCR-mixer som inneholder alle disse komponentene. Disse løsningene er svært stabile og effektiviserer PCR-oppsett og -klargjøring (McPherson og Moller 2007). Selve prosessen består av en tretrinns syklus som gjentas 20-40 ganger, hvor trinnene hovedsakelig styres av temperaturendringer. Figur 1.9 illustrerer trinnene i konvensjonell PCR.



**Figur 1.9:** Prinsipp for konvensjonell PCR (Laget med BioRender.com).

1)**Denaturering:** Ved høy temperatur vil dobbelttrådet DNA separeres til enkelttråder. Denatureringstrinnet foregår ved omtrent 94-95 °C.

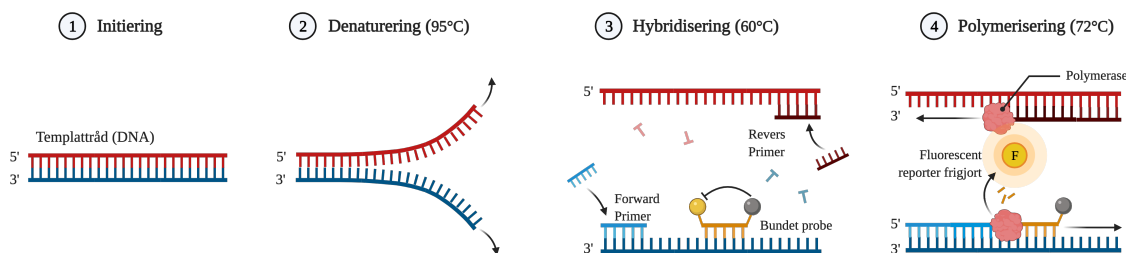
2)**Hybridisering:** Temperaturen senkes slik at forward og revers primer kan hybridisere til sine komplementære sekvenser på templattrådene. Normalt skjer dette trinnet ved omtrent 60 °C. Denne temperaturen er avhengig av smeltepunktet til primerne (Haugen 2020). Hybridiseringstemperaturen er svært viktig for å sikre spesifikk binding mellom primere og templattråd, og er dermed essensiell for resultatet av DNA-amplifikasjon.

3)**Polymerisering:** Etter hybridisering av primere, justeres temperaturen til optimal DNA polymeraseaktivitet. DNA polymerase vil syntetisere ny DNA-tråd i retning 5' til 3', som er komplementær til templattråden.

## 1.8 Real-time PCR

Prinsippet for real-time PCR (qPCR) er likt som ved konvensjonell PCR. Hovedforskjellen er at ved real-time PCR kan deteksjonen av amplifisering måles kvantitativt ved hjelp av en fluorofor probe under selve analysen. Ved konvensjonell PCR må det benyttes elektroforese for visualisering av DNA-fragmentene. Real-time PCR benyttes også kvalitativt for påvisning av spesifikke gener, hvor økt fluorescens indikerer at genet er til stede i prøven (McPherson og Moller 2007). Nyere metoder for real-time PCR har slått sammen hybridiserings- og polymeriseringstrinnet da *Taq* DNA polymerase har temperaturoptimum i området 55-70 °C. Hybridiseringstemperatur ligger også i dette området, rundt 60 °C, og det vil være tidsbesparende å slå sammen disse trinnene (Eppendorf 2021).

Proben designes slik at den bindes til et komplementært område mellom forward og revers primer. Det frigjøres et fluorescerende lys for hver syklus dersom ønsket gensekvens er til stede. Fluorescensmålingen skjer inne i PCR-instrumentet og visualiseres med en reaksjonskurve i et amplifikasjonsplott, som illustrert i Figur 1.12. Avhengig av hvilken probe og fluorofor som benyttes, vil emittert lys fra proben ha en proporsjonal sammenheng med antall sykluser. Det finnes ulike typer prober, blant annet SYBR Green, TaqMan og Fluorescens Resonans Energy Transfer (FRET). Figur 1.10 illustrerer prinsippet for qPCR med TaqMan fluorescerende probe.

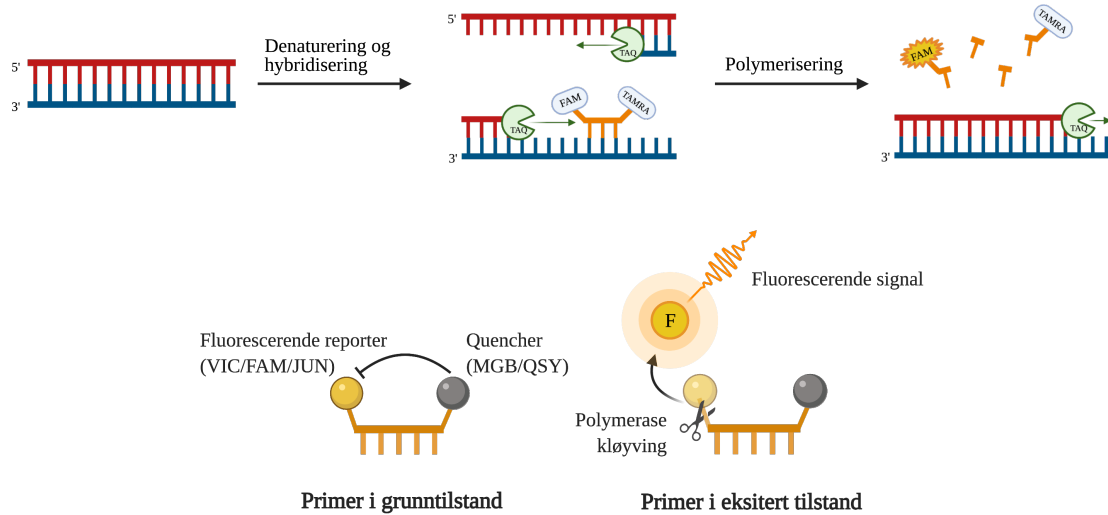


**Figur 1.10:** Prinsipp for qPCR med TaqMan-probe (Laget med BioRender.com).

### 1.8.1 TaqMan qPCR

TaqMan qPCR benytter probe bestående av oligonukleotider med fluorescerende reporter og quencher bundet til henholdsvis 5' og 3' ende av sekvensen. Probesekvensen er designet slik at den hybridiserer spesifikt til området av interesse mellom forward og revers primer. Typisk er proben designet slik at den har en høyere hybridiseringstemperatur enn primerne, og binder seg når polymeriseringen av primerne starter. Ved 5' ende av proben er det bundet et fluorescerende reporter-molekyl. Dette fluorescerende molekylet kan for eksempel være VIC, FAM eller JUN, der disse eksiterer og emitterer fluorescerende lys i ulike bølgelengder. Ved at bølgelengdene ikke overlapper, vil probene ikke interferere eller maskere hverandre under avlesning. Ved 3' ende av proben er det bundet et quencher-molekyl, for eksempel NFQ eller QSY (ThermoFischerScientific 2021). Funksjonen til quencheren er å dempe lyset fra reporter-molekylet når proben er

intakt. Dette skjer ved at quencheren absorberer signalet fra reporteren, som resulterer i lite til ingen fluorescens. Under polymeriseringen vil DNA polymerase erstatte proben som er bundet til DNA-tråden med nye baser, og på denne måten kløyve proben. Kløyvingen av proben fører til at quencher- og reporter-molekyl splittes. Dette genererer fluorescerende lys som avleses under qPCR-analysen og gjør det mulig å monitorere reaksjonen mens den foregår (Butler 2012). Dette er illustrert i Figur 1.11.



**Figur 1.11:** Prinsipp TaqMan probe (Laget med BioRender.com).

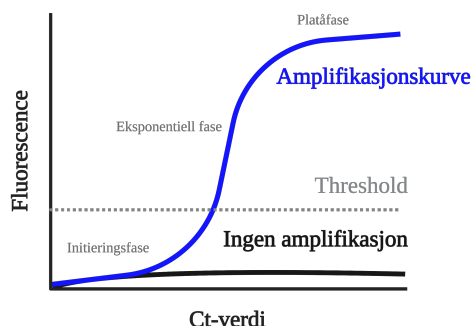
## 1.8.2 qPCR-kinetikk

Fluorescenssignalet øker eksponentielt med antall DNA-tråder som kopieres, forutsatt at proben er bundet til templattråden. Dette visualiseres i et amplifikasjonsplott, der antall sykluser (Ct-verdi) plottes mot korrelerende fluorescenssignal ( $\Delta R_n$ ).  $R_n$  er fluorescenssignalet for den assosierte prøvebrønne.  $\Delta R_n$  defineres som en kompensert  $R_n$ -verdi, ved å subtrahere verdien for baselinjen som vist i Likning 1.1 (ThermoFischer 2015, 2016).

$$\Delta R_n = R_n - \text{baselinje} \quad (1.1)$$

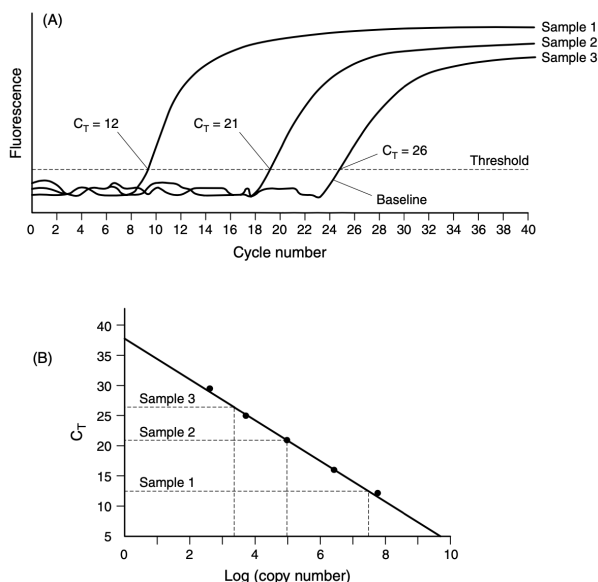
En optimal PCR-kurve har tre distinkte faser, illustrert i Figur 1.12. I første fase av kurven vil det være lite utgangsmateriale og primerne vil hybridisere til komplementære sekvenser. Denne fasen kalles initieringsfasen eller baselinje. Baselinjen defineres som de syklusene hvor fluorescenssignal akkumuleres, men fremdeles ikke har signifikant vekst. Etter hvert som mengde DNA øker, vil man få en stigning på kurven der fluorescenssignalet øker eksponentielt, derav begrepet eksponentiell fase. Senere i reaksjonen vil DNA polymerase være en begrensende faktor og produktet vil være i overskudd. Dette visualiseres ved at reaksjonskurven mister sin eksponentielle vekst og når et platå. Denne platåfasen sier lite om amplifiseringen av målgenet og gir større risiko for feilbindinger. Dette skyldes endret relativ konsentrasjon av de ulike komponentene i reaksjonen. Dermed bør

PCR-analysen avsluttes like etter den eksponentielle fasen (McPherson og Moller 2007).



**Figur 1.12:** Amplifikasjonskurve qPCR. Figuren illustrerer de tre fasene kurven kan deles inn i; initieringsfase, eksponentiell fase og platåfase (Laget med BioRender.com).

For beregning av DNA-mengde benyttes en terskelverdi som skiller mellom bakgrunnsstøy og amplifikasjonssignal. Denne terskelen settes i området der kurven starter sin eksponentielle vekst og kalles threshold. Dersom kurven ikke krysser threshold, tyder dette på at målgenene ikke er til stede i prøven. Cycle threshold ( $C_t$ ) er et mål på den opprinnelige mengden av DNA i prøven.  $C_t$ -verdien indikerer også antall sykluser som kreves for å krysse threshold og at det er amplifisert nok produkt til å gi et signifikant fluorescenssignal. I en prøve med mye utgangsmateriale, vil denne stigningen skje tidligere enn i en prøve med lite utgangsmateriale. Derfor får prøver med høyt innhold av DNA en lavere  $C_t$ -verdi (McPherson og Moller 2007). For å estimere mengde DNA kvantitativt med PCR, lages det en standardkurve fra utgangsmateriale med kjent konsentrasjon.  $C_t$ -verdiene plottes inn for å lage en lineær sammenheng mellom logaritmen til konsentrasjonen og  $C_t$ -verdiene, som illustreres i Figur 1.13.



**Figur 1.13:** Sammenhengen mellom DNA-mengde og  $C_t$ -verdi. (A) viser reaksjonskurver for tre ulike prøver og deres  $C_t$ -verdi som settes med terskelgrensen. (B) Standardkurven plottes med kjente verdier (sorte punkter) for prøve 1-3 ut fra målt  $C_t$ -verdi. Figur hentet fra (McPherson og Moller 2007).

## 1.9 Primerdesign

Primerdesign er et kritisk trinn innledningsvis i utarbeidelsen av en ny PCR-metode. Dette er fordi metodens spesifisitet og effektivitet er nært knyttet til hybridisering av primere til komplementære målgener. Det er derfor viktig å designe primere av god kvalitet som kan amplifisere den ønskede målsekvensen. Det finnes flere programvarer som kan benyttes til primerdesign, der det tas hensyn til ulike kriterier for å sikre gode og spesifikke primere. Ved design av primere bør det tas hensyn til primerens lokasjon på genet, lengde, GC-innhold, GC-clamp, smeltetemperatur, hybridiseringstemperatur og eventuell dannelse av sekundærstrukturer (Best og Roberts 2014). Dette er essensielt for å unngå uspesifikk binding, bakgrunnsstøy eller feil under amplifikasjon.

Primerens lokasjon på genet er viktig for å oppnå spesifikk PCR amplifikasjon, og det må velges en primersekvens som er unik for målgenet. Det nettbaserte verktøyet BLAST kan benyttes for å teste primerens spesifisitet og sannsynligheten for mispriming. Mispriming vil si at primeren hybridiseres til andre lokasjoner på templattråden og gir uspesifikk amplifikasjon (Best og Roberts 2014).

Den optimale primerlengden ligger mellom 18-22 nukleotider. For korte primere vil kunne binde seg uspesifikt, mens det potensielt vil være vanskeligere for lange primere å hybridisere. Optimalt skal primeren ha en slik lengde at den er lang nok til å være spesifikk til målgenet, men kort nok til å effektivt kunne binde seg til templattråden (Best og Roberts 2014).

Innhold av nukleotidene guanin (G) og cytosin (C), GC-innhold, øker primerens bindingsstyrke. Dette skyldes at mellom guanin og cytosin er det tre hydrogenbindinger, i motsetning til adenin (A) og tymin (T) som kun har to hydrogenbindinger. Flere hydrogenbindinger gir økt bindingsstyrke. Prosentandel av GC-innhold bør ideelt ligge mellom 40% og 60% (Best og Roberts 2014).

En GC-clamp er tilstedeværelsen av guanin eller cytosin i de fem siste nukleotidene i 3' ende av primeren. Grunnet flere hydrogenbindinger vil en GC-clamp føre til en sterkere binding til DNA-tråden i 3' ende av primeren. Det er i denne enden polymeriseringen starter fra. Ved å ha for mange nukleotider av enten guanin eller cytosin i GC-clamp, vil det kreve høyere temperatur for å skille primer fra templattråd. Derfor bør det tilstebes å ha ikke ha flere enn tre baser av guanin eller cytosin blant de fem siste nukleotidene i 3' ende av primeren (Best og Roberts 2014).

Den temperaturen der 50% av primerne er hybridisert til DNA-tråden defineres som smeltetemperaturen,  $T_m$ . Primerens smeltetemperatur er en indikator på stabilitet og kan benyttes for å estimere optimal temperatur for hybridiseringstrinnet senere i reaksjonen. Smeltetemperaturen avhenger av primerens lengde og GC-innhold, men ligger stort sett mellom 50 og 60 °C. Økt lengde og økt GC-innhold fører til økt smeltetemperatur. Likning 1.2 kan brukes for å estimere smeltetemperaturen til primeren. Det finnes programvarer som benytter mer komplekse matematiske formler for å estimere optimal smeltetemperatur, og tar hensyn til flere faktorer enn Likning 1.2 (Best og Roberts 2014).

$$T_m = 4^\circ C \cdot (G + C) + 2^\circ C \cdot (A + T) \quad (1.2)$$

Primere som skal benyttes i samme reaksjon, for eksempel i en multiplex PCR-metode, bør ha omtrent lik smeltetemperatur. Differansen mellom primerne bør ikke være mer enn  $\pm 5^\circ C$  (Best og Roberts 2014).

Hybridiseringstemperaturen,  $T_a$ , bør settes lavere enn smeltetemperaturen for å sikre spesifikk binding av primere til templattråd. Høy  $T_a$  kan føre til for lite binding av primere til templattråd, noe som resulterer i redusert amplifikasjon. Derimot vil en for lav  $T_a$  føre til uspesifikk binding, som følge av lavere spesifisitet mellom primer og templat (Best og Roberts 2014). Likning 1.3 kan benyttes for å estimere optimal temperatur for  $T_a$  (PREMIER-Biosoft 2021).

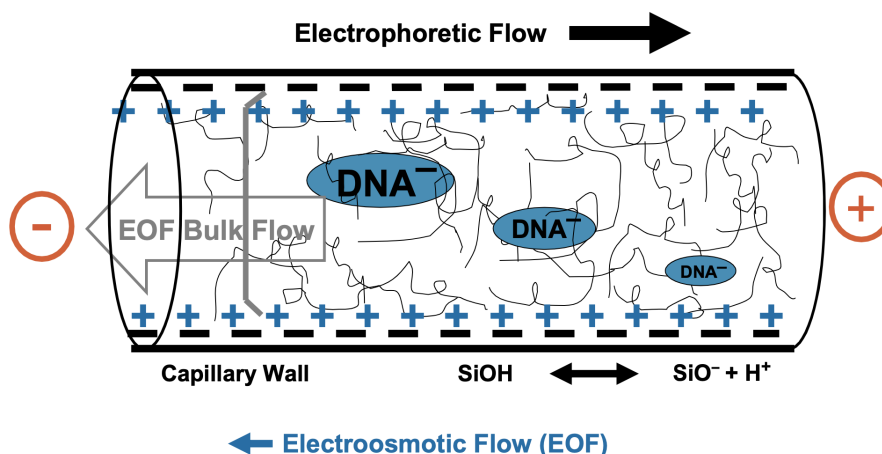
$$T_a = 0.3 \cdot T_m(\text{primer}) + 0.7 \cdot T_m(\text{produkt}) - 14.9 \quad (1.3)$$

Primere kan danne sekundærstrukturer som fører til delvis eller fullstendig tap av amplifikasjon. Disse sekundærstrukturene kan for eksempel være primer dimer og hårnålstrukturer. Primer dimer dannes når to primere binder seg til hverandre i stedet for målgenet, noe som skyldes at deler av primerne er komplementære til hverandre (Best og Roberts 2014). For å unngå primer dimer bør en sørge for at det ikke er for stor komplementaritet mellom primerne. Hårnålstrukturer dannes dersom primeren er komplementær med seg selv. Primeren kan da danne intramolekylære forbindelser slik at den får en konformasjon som en hårnål. Når primeren binder seg til seg selv vil dette føre til tap av ledige primere, som resulterer i lavere amplifikasjon.

## 1.10 Kapillærelektroforese

Elektroforese defineres som differensiering av ladde partikler ved tiltrekning eller frastøtning i et elektrisk felt. Dette benyttes for å skille molekyler basert på størrelse og ladning. Kapillærelektroforese er en metode som utfører separasjonen i kapillærer, og gjør det mulig å bruke et sterkere elektrisk felt enn ved gelelektroforese. Dette er fordi kapillærer har lav ledningsevne og generer lite varme. Bruken av et sterkere elektrisk felt fører til raskere separasjon og høyere gjennomstrømning av prøve. Prøven føres inn i en bufret løsning via kapillærrør. Når det påføres elektrisk strøm, vil fragmentene i prøven migrere som følge av elektroforetisk og elektroosmotisk mobilitet. Elektroforetisk mobilitet er reaksjonen på tilført elektrisk strøm som fører til at kationer migrerer mot den negativt ladde katoden, og anioner migrerer mot den positivt ladde anoden (Harvey 2016). Elektroosmotisk mobilitet oppstår når bufferen beveger seg gjennom kapillærrøret som følge av det elektriske feltet, og vanligvis vil denne bufferen bevege seg mot den negativt ladde katoden. De fleste kapillærrør er kledd med silica og er dekket med polyamid for å gi mekanisk styrke til røret (Skoog 2012). Resultatet gis ut på et elektroferogram og på et gel-lignende bilde med bånd som representerer DNA-fragmentene. En kjent standard (ladder) tas alltid med som en størrelsesmarkør i elektroforeseanalyser. Ladderens består av flere fragmenter med

kjente størrelser som er med på å identifisere størrelsen på fragmentene i prøvematerialet.



**Figur 1.14:** Illustrasjon av reaksjonen som foregår inne i et kapillærrør under elektroforese. Figuren illustrerer elektroforetisk og elektroosmotisk mobilitet (Butler 2012).

Nyere teknologi har gjort det mulig å komprimere kapillærelektroforese i form av en chip, som for eksempel gjøres i instrumentet Bioanalyser fra Agilent. Denne typen analyse er basert på tradisjonell gelelektroforese, men gir også en automatisert størrelsesberegning og digital kvantifisering. Størrelsesformatet reduserer separasjonstid, prøvemengde og reagensforbruk betraktelig (AgilentTechnologies 2006). Chipen inneholder sammenkoblede, gelfylte mikrokanaler som tillater vandring av molekyler gjennom gelporene. Ved påførsel av elektrisk strøm, vil DNA-fragmentene migrere gjennom mikrokanalene og separeres basert på størrelse og ladning. Fargestoffet binder seg til DNA, og detekteres av laserindusert fluorescens under vandringen. Molekylvandringen initieres av elektroder som kommer i kontakt med chip-en når instrumentet lukkes (AgilentTechnologies 2002). Resultatet vises som bånd i et gel-lignende bilde og som kurvetopper i et elektroferogram. Ladderen med kjente fragmenter danner en standardkurve basert på fragmentstørrelse og migreringstid. Til alle brønnene tilsettes det fargemarkører, der markørene består av en øvre og en nedre markør som skal dekke hele vandringsområdet. Disse har kjent konsentrasjon og størrelse, og basert på fargemarkørens vandring vil størrelsen og mengden av prøvefragmentene kunne beregnes (AgilentTechnologies 2006).

Under etablering av en ny PCR-metode er det ønskelig å analysere PCR-produktene med kapillærelektroforese. Dette gjøres for å visualisere størrelse på fragmenter og eventuelle primer dimer og uspesifikke fragmenter. Kapillærelektroforese gir høy oppløsning og god separasjon av PCR-produkter på relativt kort tid. Dersom en PCR-metode genererer uspesifikk amplifikasjon eller primer dimer, vil det være hensiktsmessig å gjøre endringer for å optimalisere metoden før videre metodeutvikling.

## 1.11 Effektivitet og sensitivitet

Ved etablering og optimalisering av en qPCR-metode må metodens effektivitet testes ut, dette er et mål på metodens evne til amplifisering. Dette gjøres ved å analysere en tifolds fortynningsrekke av en positiv kontroll. Resultatene plottes inn som en standardkurve med Ct-verdier på y-aksen og fortynninger på x-aksen. Stigningstallet på standardkurven indikerer PCR-effektiviteten. Et stigningstall på -3.33 tilsvarer en effektivitet på 100%. Dette er fordi hver fortykning er en logaritme, som tilsvarer Ct-differanse på 3.33 (ThermoFisherScientific 2021). For å vurdere metoden som god, må beregnet effektivitet ligge mellom 90-110% (McPherson og Moller 2007). Ved referanselaboratoriet for MRSA stilles det strengere krav til effektivitet, grensen for en god metode settes derfor til 95-105%. Dersom stigningstallet er større enn 3.33 gir dette en effektivitet under 100%. Dette indikerer utilstrekkelig spesifisitet ved design av primere og prober, PCR-inhibitorer eller unøyaktig prøvebehandling og pipettering (ThermoFisherScientific 2021). Et stigningstall mindre enn 3.33 gir en effektivitet over 100%. Dette er i teorien ikke mulig, men kan forekomme dersom metoden detekterer uspesifikke produkter eller det forekommer inhibering under amplifikasjon. Deteksjon av uspesifikke PCR-produkter kan forekomme dersom primer eller probe har bundet seg til uønskede sekvenser, eller ved urent prøvemateriale.

Sensitiviteten defineres som den laveste konsentrasjon av RNA eller DNA som PCR-metoden kan detektere. Sensitivitetstesting er et viktig trinn i etablering av en ny qPCR-metode. For å undersøke metodens sensitivitet settes det opp fortynningsrekker på prøver som er kjent positive på målgenene. Fortynningsekspponentialen til den høyeste fortyningen som fremdeles blir amplifisert benyttes til å beregne minste mengde bakterieceller (Staroscik 2004). Dette gir minste antall celler som må være til stede i prøvematerialet for å få amplifikasjon. For å kunne beregne laveste bakteriecelletall må antall basepar i hele genomet, DNA-konsentrasjon i utgangsmaterialet og kopinummer etter amplifisering være kjent (Staroscik 2004). Bakteriekolonier inneholder svært mange bakterieceller. Det vil si at det ikke stilles like strenge krav til sensitiviteten til PCR-metoder utviklet mot bakterieisolater som for eksempel PCR-metoder utviklet mot virus i direktemateriale<sup>2</sup>.

## 1.12 Bakgrunn for oppgaven

Referanselaboratoriet for MRSA har i dag ingen rutinemessige diagnostiske metoder som er i stand til å spesifikt differensiere mellom meticillinresistente *S. argenteus* og MRSA. Det er i et tidligere prosjekt (Bogestam mfl. 2018) etablert en PCR-metode som benytter en hydrolyserende probe for screening av hovedsakelig MRSA, men med mulighet for å inkludere eller ekskludere deteksjon av *S. argenteus*. Selv om metoden er utviklet for MRSA, kan den detektere *S. aureus* clonal cluster 75 (CC75) stammer, som nylig er re-klassifisert som *S. argenteus*. Da denne metoden kun detekterer denne CC75-stammen, er behovet fremdeles til

---

<sup>2</sup>Spesialbioingeniør TGR og molekylærbiolog CGÅ, referanselaboratoriet for MRSA



stede for en artsspesifikk qPCR for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus*. En annen studie utarbeidet en PCR-metode for identifikasjon av *S. argenteus* basert på et nonribosomal peptid syntetase (*NRPS*) gen (D.-F. Zhang mfl. 2016). Resultatene fra denne studien viste at genet for NRPS hadde 60 aminosyredelesjoner i genproduktet hos *S. aureus*, men at dette ikke forekommer hos *S. argenteus* eller *S. schweitzeri*. Metoden som ble utviklet, benyttet seg av denne forskjellen til å utvikle en metode som kunne skille *S. argenteus* og *S. schweitzeri* fra *S. aureus*. For å kunne skille mellom *S. argenteus* og *S. schweitzeri* ble det benyttet fenotypisk vurdering av bakterieoppvekst. Den fenotypiske vurderingen var basert på kolonifarge der *S. argenteus* hadde hvite kolonier og *S. schweitzeri* hadde gule kolonier. Denne metoden kategoriseres derfor ikke som en artsspesifikk PCR-metode for *S. argenteus* og detekterer heller ikke meticillinresistens. Dessuten vil denne metoden være mer tidkrevende da det ikke er real-time PCR, og for å visualisere PCR-produktene må de analyseres med elektroforese. I tillegg vil det være større sannsynlighet for menneskelig feilvurdering, da metoden baserer seg på subjektiv vurdering av kolonifarge. Denne metoden ble senere videreutviklet i et prosjekt utført av Tunsjø mfl. til en real-time PCR metode for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus* (Tunsjø mfl. 2018). Målgenet var fremdeles *NRPS*, men det ble benyttet SYBR-green slik at metoden kunne gjennomføres på real-time PCR i stedet for endepunkts-PCR med gelelektroforese. *NRPS*-genet er ikke spesifikt for *S. argenteus*, men sekvensen som ble amplifisert var ulik hos *S. aureus* og *S. argenteus*. PCR-produktene som ble dannet var noe forskjellig i både lengde og sekvens, og kunne dermed skilles fra hverandre med både gelelektroforese og real-time PCR med smeltepunktanalyse. Differensieringen baserte seg på smeltepunktene 80-81 °C og 77 °C for henholdsvis *S. argenteus* og *S. aureus*. Denne qPCR-metoden ble ikke implementert i rutinen ved Akershus universitetssykehus<sup>3</sup>, da MALDI-TOF-databasen like etterpå ble oppdatert. Til tross for denne oppdateringen er ikke identifisering med MALDI-TOF (Bruker Daltonics) spesifikk nok. Ofte er scoren til *S. argenteus* og *S. aureus* for like til å kunne si med sikkerhet hvilken art som er identifisert. I tillegg må meticillinresistens bekreftes med PCR på genene *mecA* eller *mecC*.

Kaden mfl. gjennomførte en studie som undersøkte hvilke metoder som var mulig å benytte for deteksjon av *S. argenteus*, og om det var hensiktsmessig å kunne skille *S. argenteus* fra *S. aureus* (Kaden mfl. 2018). Denne studien konkluderte med et behov for utvikling av nye PCR-metoder for å unngå ubemerket spredning og resistensutvikling av *S. argenteus*.

For at referanselaboratoriet for MRSA ved AMM i dag skal kunne skille *S. aureus* og *S. argenteus* må det benyttes helgenomsekvensering. Dette gjøres fordi MALDI-TOF ikke er en god nok metode for differensiering. Til tross for at MALDI-TOF databasen nylig ble oppdatert og omfatter *S. argenteus*, er forskjellen i score for *S. argenteus* og *S. aureus* er ikke tilstrekkelig for å kunne med sikkerhet fastslå bakterieart. Da helgenomsekvensering er kostbart, ressurs- og tidkrevende, er det ikke ideelt å benytte denne metoden i rutinediagnostikk. Som nasjonalt referanselaboratorium er det ønskelig å ha kompetansen og metoden til å kunne skille *S. argenteus* fra *S. aureus*. Til tross for at meticillinresistente *S.*

---

<sup>3</sup>Førsteamanuensis HT, OsloMet

*argenteus* behandles på samme måte som MRSA, er det fortsatt usikkerhet rundt virulens hos denne arten. Ved å etablere en PCR-metode som kan artsbestemme *S. argenteus*, vil dette gi referanselaboratoriet utvidede muligheter til overvåking av spredning, resistensutvikling og videre forskning på denne arten.

### 1.13 Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven er å utvikle en multiplex real-time PCR-metode som muliggjør rask og effektiv deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus*. Metoden skal spesifikt skille denne arten fra *S. aureus*, basert på målgenene *yhfT* (artsspesifikt gen), *lukD/lukE* (leukocidin) og *mecA* (meticillinresistens). Da det er ønskelig å ha flere alternative ekstraksjonsmetoder, skal metoden prøves ut med kokelysring og automatisk ekstraksjon. Metoden som utvikles skal være god nok til å kunne benyttes til diagnostikk, og være innenfor kravene om effektivitet, sensitivitet og spesifisitet som stilles av referanselaboratoriet for MRSA ved AMM.

## 2. Material og metode

I dette prosjektet ble det benyttet tre referansestammer og to bakteriestammer i etableringen av en multiplex qPCR-metode for identifisering av meticillinresistente *S. argenteus*. Referansestammene ble hentet ferdig utsådd på blodagar hos seksjon for substrat og spesialvask ved AMM. Bakteriestammene ble sådd ut på blodagar, og inkubert i vanlig atmosfære ved 35 °C ( $\pm 2$  °C) i 18 timer. Tabell 2.1 gir en oversikt over navn og genotype på bakteriestamme.

**Tabell 2.1:** Referansestammer og bakteriestammer fra stammebank, samt informasjon om genotype

Stamme	Genotype
<i>S. aureus</i> CCUG 15915	-
<i>S. aureus</i> CCUG 60578	<i>mecA</i>
<i>S. argenteus</i> CCUG 70917T	<i>mecA</i>
<i>S. argenteus</i> CC 75	<i>mecA</i>
<i>S. argenteus</i> CC 2250	<i>mecA, lukD, lukE</i>

### 2.1 Ekstraksjon av bakterielt DNA

Ekstraksjon av DNA ble gjort ved to ulike metoder; kokelysering og enzymatisk ekstraksjon med instrumentet EZ1 Advanced XL (Qiagen). Forbehandling av prøvematerialet for hver ekstraksjonsmetode ble gjort som vist i Tabell 2.2.

**Tabell 2.2:** Reagenser benyttet til ekstraksjon av bakterielt DNA ved kokelysering og enzymatisk ekstraksjon med EZ1

Reagenser til ekstraksjon	Kokelysering	EZ1
MGW, $\mu$ L	200	
Bakteriemengde	Full hvit øse	Full hvit øse
TE-buffer, $\mu$ L		200
Proteinase K, $\mu$ L		5
Lysostaphin, $\mu$ L		10

Før ekstraksjon med kokelysering ble bakteriekolonier blandet i MGW og ristet på vortex. Deretter ble suspensjonen inkubert på Thermomixer comfort varmeblokk (Eppendorf) med risting (300 rpm) ved 95 °C i 15 min. Etter inkubering ble rørene sentrifugert (14 100 rcf) i 2 min, og supernatanten (100  $\mu$ L) ble avpipettert og overført til merkede mikrorør.

Automatisk enzymatisk ekstraksjon ble utført med instrumentet EZ1 Advanced XL. Metoden for ekstraksjon som benyttes i instrumentet er basert på en metode utviklet

av Boom mfl. for ekstraksjon av bakterielt DNA fra patogene gram negative bakterier (Boom mfl. 1990).

Det ble tilsatt reagenser og bakteriekolonier som vist i Tabell 2.2. Deretter ble bakteriesuspensjonene inkubert på Thermomixer varmeblokk i to omganger med resting (300 rpm). Første omgang ved 37 °C i 15 min, og andre omgang ved 65 °C i 15 min. Det ble benyttet EZ1 DNA Tissue Kit som inkluderer reagenspatroner med ferdig fordelt reagens (Lot: 166050336), eluatrør, pipettespisser og pipettespissholdere. Programinnstillinger ble satt til 200 µL prøvevolum og 50 µL elueringsvolum.

Etter ekstraksjon ble det laget fortynninger av kokelysat og EZ1-eluat i fortynningsforhold 1:10. Det ble benyttet TrisHCl (EB-buffer, 10 mM, tillaget 20/06-18, pH 8.5), som vist i Tabell 2.3. Ufortynnet DNA-lysat og -eluat ble fryst ned, mens fortynningene ble brukt videre i prosjektet.

**Tabell 2.3:** Tillaging av 1:10 fortynninger etter ekstraksjon

	Kokelysat	EZ1-eluat
Prøvemateriale, µL	10	10
EB-buffer, µL	90	90

## 2.2 Måling av DNA-konsentrasjon

DNA-konsentrasjonene i prøvene ble målt med Qubit 3.0 fluorometer (Thermo Fischer). Det ble laget bruksløsning for måling av mengde DNA som vist i Tabell 2.4 til 15 prøver.

**Tabell 2.4:** Reagenser benyttet for tillaging av bruksløsning for måling av mengde DNA ved bruk av Qubit fluorometer

Reagenser til bruksløsning	1 prøve	15 prøver
Qubit sDNA HS Buffer, µL	199	2985
Qubit sDNA HS Reagent, µL	1	15

Det ble laget prøveløsninger til fluorimetrisk avlesning med Qubit som vist i Tabell 2.5. Instrumentet ble stilt inn på programmet dsDNA High Sensitivity for avlesning av prøver, kontroll og standarder. Standard 1 og standard 2 ble målt for å justere standardkurven i instrumentet, som brukes til beregning av mengde DNA i prøvene. Deretter ble det målt DNA-konsentrasjon i kontroll og prøveløsninger.

**Tabell 2.5:** Tillaging av løsninger brukt til kvantitering av DNA med Qubit fluorometer

Reagenser til måling av DNA	Standard (S1)	Standard (S2)	Kontroll	Prøve
Bruksløsning, µL	190	190	198	198
Standard 1, µL	10			
Standard 2, µL		10	2	
Prøvemateriale, µL				2

## 2.3 Forbehandling av primere

Primere og prober ble på forhånd designet med et verktøy fra Integrated DNA Technologies og bestilt fra selskapet TIB Molbiol, da denne oppgaven er en del av et større forskningsprosjekt. Informasjon om primerne og forventet lengde på PCR-produkt er vist i Tabell 2.6. Primerne ble mottatt som tørrstoff og løst opp i MGW for å oppnå en konsentrasjon på 100  $\mu\text{M}$ . Volum av MGW var oppgitt i følgeskrivet fra produsenten. Løsningene ble videre brukt som primerstamløsninger. Probene ble mottatt ferdig oppløst og klar til bruk.

**Tabell 2.6:** Informasjon om primer- og prober for målgenene *yhfT*, *lukD* og *lukE*

Primer	Lengde (mer)	Tm ( $^{\circ}\text{C}$ )	%GC	PCR produktstørrelse (bp)
LukD-F	21	56.1	47.6	149
LukD-R	20	56.7	50.0	
LukE-F	20	56.5	50.0	103
LukE-R	20	54.7	50.0	
yhfT-F	21	55.9	47.6	142
yhfT-R	20	55.4	50.0	
yhfT2-F	20	62.2	55.0	127
Probe	3' quencher		5' fargestoff	
LukD	NFQ		FAM	
LukE	NFQ		FAM	
yhfT	NFQ		VIC	

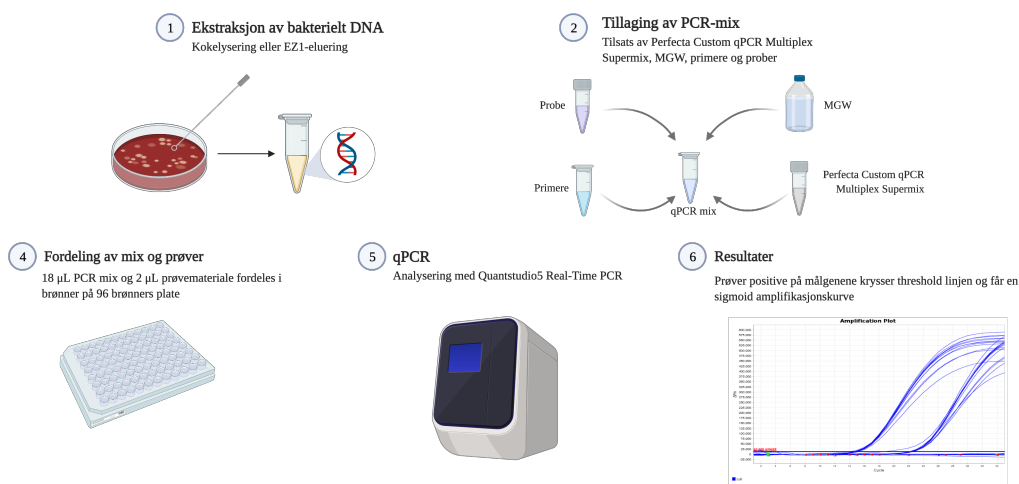
Stamløsningene (100  $\mu\text{M}$ ) av primere og prober ble fortynnet til henholdsvis 12  $\mu\text{M}$  og 8  $\mu\text{M}$ . Fortynningsformelen ble benyttet til beregning av antall  $\mu\text{L}$  av primer- og probestamløsning som måtte tilsettes til MGW for å oppnå ønsket konsentrasjon ved et volum på 100  $\mu\text{L}$ . Tillaging av de nye konsentrasjonene er vist i Tabell 2.7. Disse løsningene ble benyttet videre i tillaging av qPCR reaksjons-mix.

**Tabell 2.7:** Tillaging av nye primer- og probeløsninger fra stamløsning på 100  $\mu\text{M}$

Tillaging av nye primer- og probeløsninger	Forward primer	Revers primer	Probe
MGW, $\mu\text{L}$	88	88	92
Primerstamløsning (Forward), $\mu\text{L}$	12		
Primerstamløsning (Revers), $\mu\text{L}$		12	
Probestamløsning, $\mu\text{L}$			8

## 2.4 Singleplex qPCR

Det ble satt opp singleplex qPCR for hvert enkelt målgen, henholdsvis for *yhfT*, *lukD* og *lukE*. Alle analysene ble utført med QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher). Figur 2.1 illustrerer trinn for trinn prøvegangen fra bakterieoppvekst til qPCR analyse på Quantstudio 5.



**Figur 2.1:** Oversikt over fullstendig prøvegang fra bakterieoppvekst til analysering med Quantstudio 5 Real-Time PCR (Laget med BioRender.com).

### 2.4.1 Tillaging av reaksjonsmix

Tillaging av reaksjonsmix for qPCR singleplex-metoden ble gjort som det fremkommer i Tabell 2.8. Perfecta Custom qPCR Multiplex SuperMix (Quanta Biosciences, Lot: 66157906) er en konsentrert, klar-til-bruk reagensblanding som inneholder *Taq* Polymerase, dNTP og  $MgCl_2$ . Det ble laget reaksjonsmix til 54 prøver ved oppsett av singleplex qPCR.

**Tabell 2.8:** Tillaging av reaksjonsmix for singleplex qPCR-metode

Tillaging av reaksjonsmix	Volum, $\mu L$	
<b>Antall prøver</b>	<b>1</b>	<b>54</b>
Perfecta qPCR SuperMix, UNG	10	540
Primer-F	0.5	27
Primer-R	0.5	27
Probe	0.5	27
MGW	6.5	351
<b>Totalvolum</b>	<b>18</b>	<b>972</b>

### 2.4.2 Bestemmelse av optimal hybridisering- og polymeriseringstemperatur

For å vurdere optimal temperatur, ble det satt opp qPCR med ulik temperaturgradient. Til dette ble det benyttet innstillingen VeriFlex på QuantStudio 5, en teknologi som muliggjør individuelle temperatursoner under samme analyse.

**Tabell 2.9:** Innstillinger for singleplex qPCR

qPCR innstillinger			
Trinn		Temperatur (°C)	Tid (min)
Enzymaktivisering		45	05:00
35 sykluser	Denaturering	95	00:10
	Hybridisering	54-64	00:30
	Polymerisering		

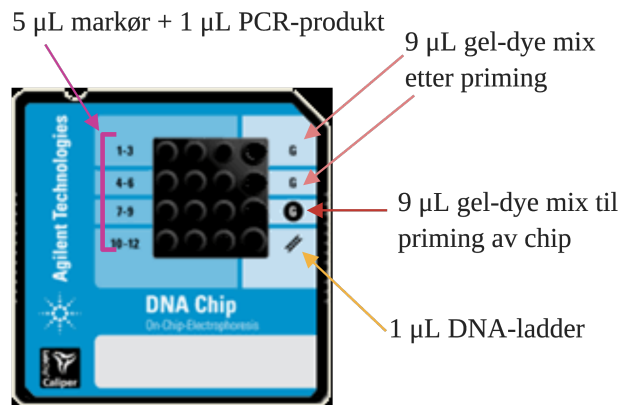
Reaksjonsmix (18 µL) og prøve (2 µL) ble pipettert i brønner på en 96-brønners MicroAmp Optical plate. MGW ble benyttet som negativ kontroll. Temperaturene som ble testet var fra 54 °C til 64 °C med et intervall på 2 °C. Innstillingene for qPCR-programmet er vist i Tabell 2.9. For genet *yhfT* ble det i tillegg satt opp en ny qPCR med temperaturer fra 60 °C til 70 °C med et intervall på 2 °C. Bakteriestamme, målgen og temperaturgradient er oppgitt i Tabell 2.10. Det ble analysert både kokelysat og EZ1-eluat av alle isolatene.

**Tabell 2.10:** Oversikt over bakteriestamme, målgen og temperaturgradient analysert under bestemmelse av optimal hybridiseringstemperatur

Målgen	Stamme	Temperaturgradient (°C)
<i>yhfT</i>	<i>S. argenteus</i> CCUG 70917T	54-64
	<i>S. aureus</i> CCUG 60578	
	<i>S. argenteus</i> CCUG 70917T	60-70
	<i>S. aureus</i> CCUG 15915	
<i>lukD</i> og <i>lukE</i>	<i>S. argenteus</i> CCUG 2250	54-64
	<i>S. aureus</i> CCUG 60578	

### 2.4.3 Kapillærelektroforese

PCR-produktene ble analysert med kapillærelektroforese på 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Det ble benyttet DNA 1000 reagenskit (Lot: 2046) egnet til kapillærelektroforese på DNA-chip. Det ble pipettert PCR-produkt (1 µL) i prøvebrønner og gel-dye mix (9 µL) i alle brønner med unntak av brønner merket med G. DNA-ladder (1 µL) ble pipettert i merket brønn på DNA-chip. Dette er illustrert i Figur 2.2. Det ble benyttet analyseprogrammet DNA 1000 Series II.



**Figur 2.2:** DNA-chip primes først med gel-dye mix og tilsettes deretter gel-dye mix, ladder og prøvemateriale (Laget med BioRender.com).

## 2.5 Multiplex qPCR

Målgene *yhfT*, *lukE* og *mecA* ble slått sammen til en multiplex qPCR metode. Metoden ble analysert på Quantstudio 5 real-time PCR System.

### 2.5.1 Tillaging av reaksjonsmix

Tillaging av reaksjonsmix ble gjort som beskrevet i punkt 2.4.1. Reaksjonsmixen ble laget med Perfecta Custom qPCR Multiplex SuperMix (Lot: 66175824), primere og prober, og MGW som vist i Tabell 2.11.

**Tabell 2.11:** Tillaging av reaksjonsmix for multiplex qPCR-metode med tre målgener (*yhfT*, *lukE* og *mecA*)

Tillaging av reaksjonsmix	Volum, µL	
<b>Antall prøver</b>	<b>1</b>	<b>54</b>
Perfecta qPCR SuperMix, UNG	10	540
Primer <i>yhfT</i> 2-F	0.5	27
Primer <i>yhfT</i> -R	0.5	27
Probe <i>yhfT</i>	0.5	27
Primer <i>lukE</i> -F	0.5	27
Primer <i>lukE</i> -R	0.5	27
Probe <i>lukE</i>	0.5	27
Primer <i>mecA</i> -F	0.5	27
Primer <i>mecA</i> -R	0.5	27
Probe <i>mecA</i>	0.5	27
MGW	3.5	189
<b>Totalvolum</b>	<b>18</b>	<b>972</b>



## 2.5.2 Bestemmelse av optimal hybridisering- og polymeriseringstemperatur

Multiplex qPCR-metoden ble satt opp med innstillingene som vist i Tabell 2.12. Metoden ble satt opp og prøvd ut på alle isolatene beskrevet i Tabell 2.1 ved hybridisering- og polymeriseringstemperatur 62 °C og 35 sykluser.

**Tabell 2.12:** Innstillinger for multiplex qPCR

qPCR innstillinger			
Trinn		Temperatur (°C)	Tid (min)
Enzymaktivisering		45	05:00
35 sykluser	Denaturering	95	00:10
	Hybridisering	62	00:30
	Polymerisering		

Det ble pipettert reaksjonsmix (18 µL) og prøve (2 µL) i brønner på en 96-brønners MicroAmp Optical plate. MGW ble benyttet som negativ kontroll.

## 2.5.3 Kapillærelektroforese

PCR-produktene fra multiplex qPCR ble analysert med kapillærelektroforese som beskrevet i punkt 2.4.3.

## 2.6 Effektivitet- og sensitivitetstesting

Effektivitet- og sensitivitetstesting ble gjort på hvert enkelt målgen ved både singleplex og multiplex qPCR. Det ble satt opp tripler av alle fortyningene på både kokelysat og EZ1-eluat, med MGW som negativ kontroll. PCR-program er vist i Tabell 2.12.

### Effektivitet

Det ble laget en tifolds fortynningsrekke ved å tilsette EB-buffer (45 µL) og prøvemateriale fra primært eluat (5 µL) i et eppendorfrør. Videre fortyninger ble laget ved å pipettere eluat (5 µL) fra tidligere fortykning til EB-buffer (45 µL), slik at differansen mellom hver fortykning ble en logaritme (Log).

Fremstilling av standardkurve og beregning av effektivitet for metoden ble gjort i Excel (Microsoft), der det ble beregnet egne standardkurver for kokelysat og EZ1-eluat. Gjennomsnittlig Ct-verdi for hver tripplett ble beregnet for å lage en standardkurve, med fortyninger i Log-verdi på x-aksen og Ct-verdi på y-aksen. Standardkurvens stigningstall (a) ble satt inn i Likning 2.1 for å beregne effektiviteten av PCR-metoden for det bestemte målgenet.

$$\% \text{ Effektivitet} = 10^{-\frac{1}{a}} - 1 \quad (2.1)$$

Effektivitetstesting ble gjort på bakteriestamme CC 2250 (*S. argenteus* positiv for *yhfT*, *lukE* og *mecA*).

## Sensitivitet

DNA-konsentrasjonen i prøve av bakteriestamme CC 2250 (*S. arg*) ble målt på nytt med Qubit 3.0 Fluorometer som beskrevet i punkt 2.2. Fortynningsrekken med kokelysat ble laget av ufortynnet prøve ( $10^0$ ), mens fortynningsrekken med eluat ble laget av fortynnet prøve ( $10^1$ ). Kalkulator fra URI Genomics Sequencing Center ble benyttet (Staroscik 2004). Likning 2.2 viser hvordan kalkulatoren beregner antall kopier av amplifisert DNA. Likningen benytter mengde DNA (ng) i prøvematerialet, lengde på genomet (bp), Avogadros konstant og antagelsen at gjennomsnittlig vekt av et basepar (bp) er 650 Dalton. Lengden på genomet til *S. argenteus*, templatlengden, er tilnærmet lik 2.8 millioner bp.

$$\text{Kopinumner} = \frac{\text{DNA(ng)} \cdot 6.022 \cdot 10^{23}}{\text{lengde(bp)} \cdot 1 \cdot 10^9 \cdot 650} \quad (2.2)$$

Likning 2.3 ble benyttet for å beregne laveste antall bakterieceller som må være til stede i prøvematerialet for å få amplifikasjon med denne qPCR-metoden. Fortynningsfaktoren ( $x$ ) er den høyeste fortynningen som fikk amplifikasjon.

$$\text{Bakterieceller} = \frac{\text{kopinumner}}{10^x} \quad (2.3)$$

## 2.7 Validering av qPCR metode

Multiplex qPCR-metoden ble testet ut på 40 bakteriestammer av *S. aureus* og *S. argenteus* for å vurdere spesifisiteten og metodens evne til å skille de to artene. Et utvalg av de hyppigste forekommende genotypene av *S. argenteus* og *S. aureus* ble plukket ut og testet. Av disse 40 prøvene, var 20 av prøvene meticillinresistente *S. argenteus* og 20 MRSA. Ti av hver art ble ekstrahert med kokelysering og ti ble ekstrahert med EZ1-eluering. Under denne utprøvingen ble EZ1-eluatene fortynnet 1:10, mens kokelysatene ikke ble fortynnet. Oversikt over bakteriestammene er lagt ved i vedlegg C.

## 3. Resultater

Resultatkapittelet tar for seg resultater og vurdering av henholdsvis singleplex qPCR og multiplex qPCR, hvor amplifikasjonskurver og kapillærelektroforese presenteres samlet for hvert målgen.

### 3.1 Ekstraksjon av bakterielt DNA og måling av DNA-konsentrasjon

Resultatene fra måling av DNA i fortynnede (1:10) bakteriestammer er vist i Tabell 3.1.

**Tabell 3.1:** Målt mengde DNA i standardløsninger, kontrollmateriale, kokelysat og EZ1-eluat

Standard og kontroll		Målt mengde DNA (ng/ $\mu$ L)	
Standard 1		36.87	
Standard 2		22120.78	
Kontrollprøve		10.1	
Stamme	Kokelysat	EZ1-eluat	
<i>S. aureus</i> CCUG 60578	0.370	9.11	
<i>S. argenteus</i> CCUG 70917T	0.191	6.93	
<i>S. aureus</i> CCUG 15915	0.266	7.74	
<i>S. argenteus</i> CC 75	0.279	8.41	
<i>S. argenteus</i> CC 2250	0.134	7.72	

### 3.2 Singleplex qPCR

Resultatkurvene for hver analyse ble vurdert visuelt og basert på Ct-verdi for de ulike parallellene ved hvert temperaturintervall. Negativ kontroll (MGW) viste ingen amplifikasjon på noen av målgenene i singleplex.

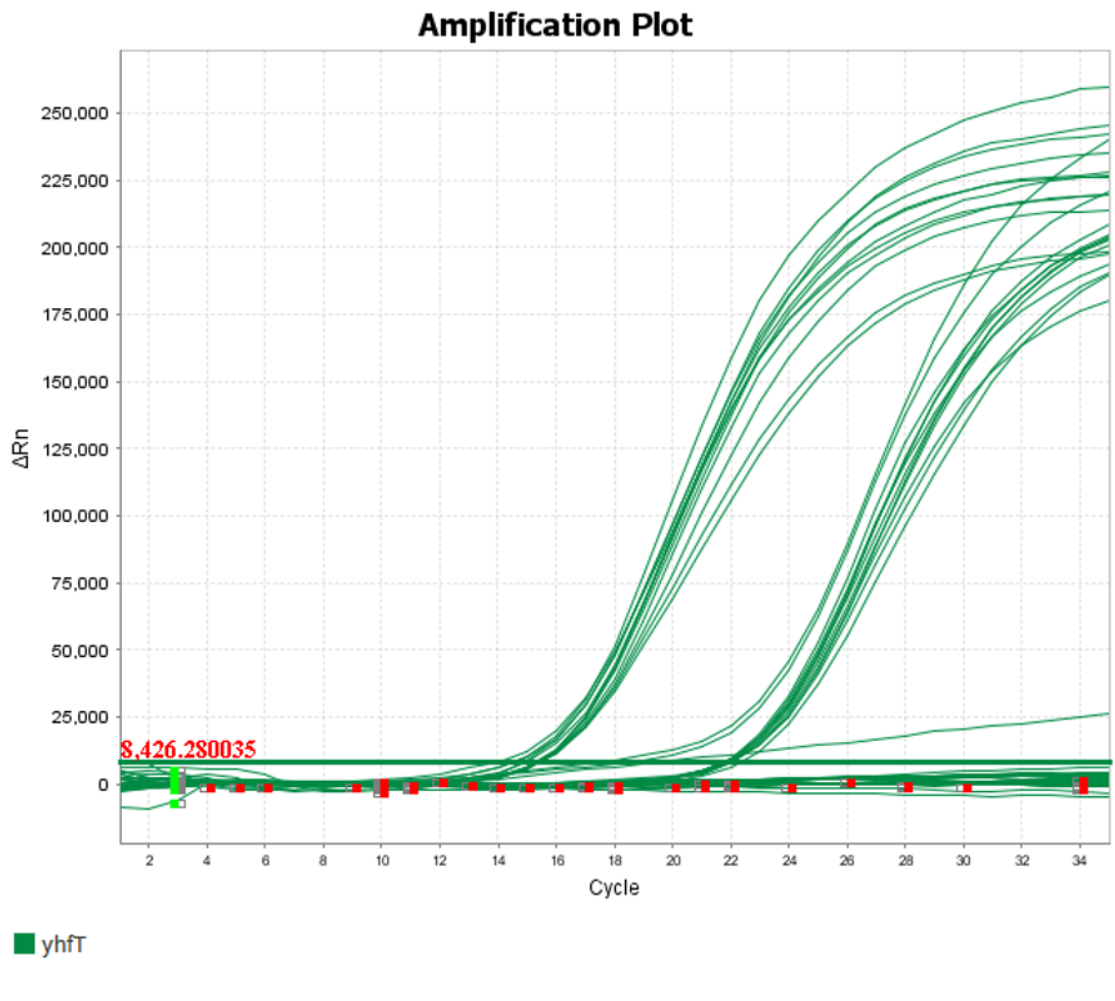
#### 3.2.1 Analysering og vurdering av primere og prober

Amplifikasjonsplottene illustrerer forskjellen i DNA-konsentrasjon mellom kokelysat og EZ1-eluat, som understøtter funnene i Tabell 3.1. De to mest fremtredende, sigmoide kurvegruppene tilsvarer henholdsvis EZ1-eluat og kokelysat.

Det ble analysert to paralleller for hver prøve ved hver temperatur, og gjennomsnittet av Ct-verdiene ble beregnet. Resultatene for samtlige målgen er lagt ved i vedlegg A. Beregningene viste at Ct-verdiene var tilnærmet lik ved alle temperaturer hos alle målgenene.

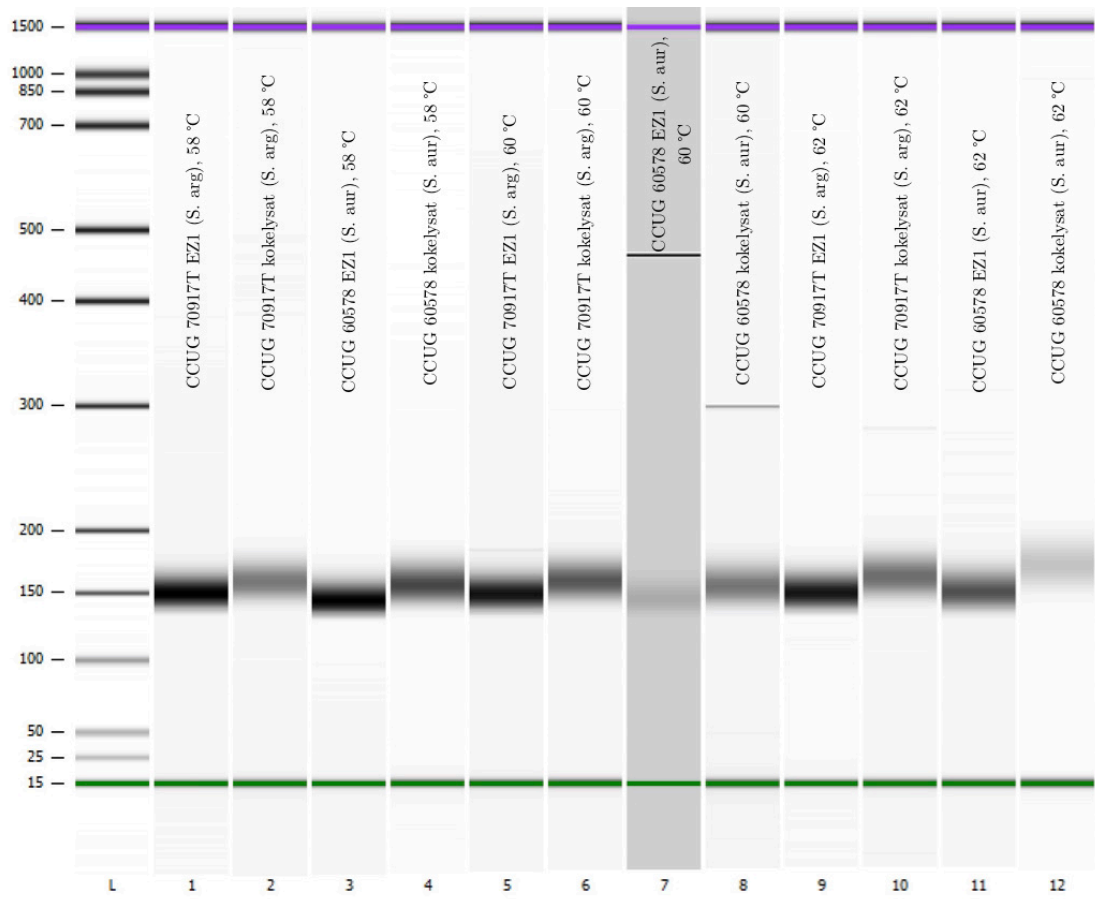
### *yhfT*

Amplifikasjonsplottet (Figur 3.1) viser tydelige sigmoide kurver, og at primerne og proben har bundet spesifikt til prøvene med *S. argenteus*.



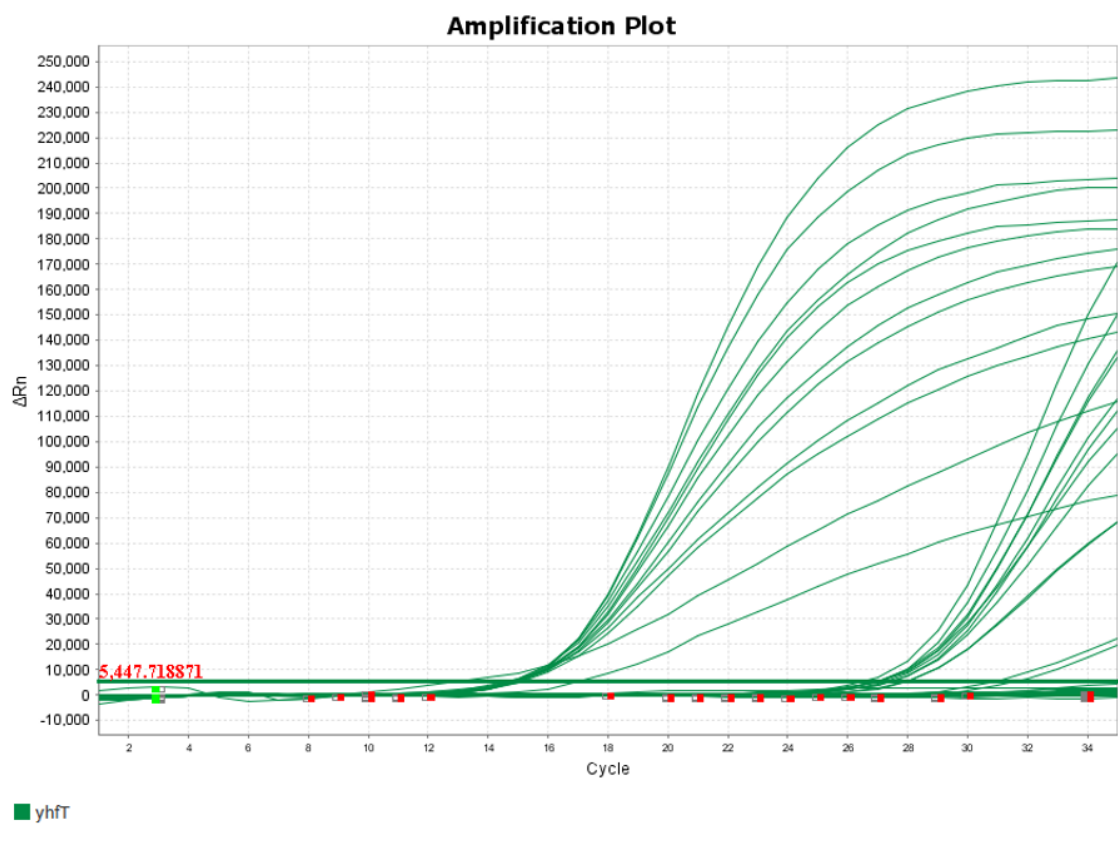
**Figur 3.1:** Amplifikasjonsplott for *yhfT*-genet av prøve CCUG 70917T (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*) ved temperatur 54-64 °C.

PCR-produktet til målgenet *yhfT* har en lengde på 142 bp. Resultatet fra kapillærelektroforese viser detekterte bånd med båndlengde på omtrent 142 bp i samtlige brønner, som vist i Figur 3.2.



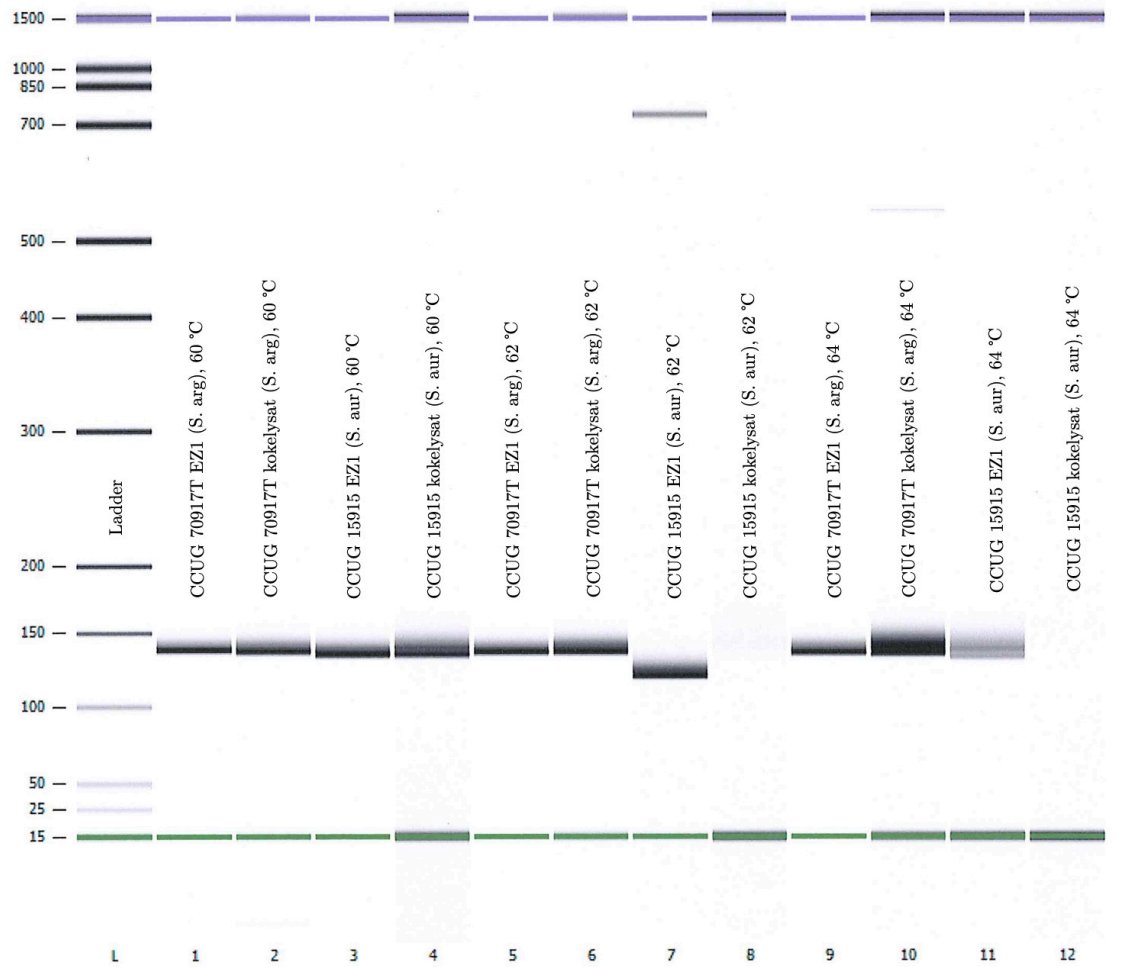
**Figur 3.2:** Resultatet av kapillærelektroforese for PCR-produkt av målgen *yhfT* fra prøve CCUG 70917T (*S. arg.*) og CCUG 60578 (*S. aur.*).

Amplifikasjonsplottet for målgenen *yhfT* ved 60-70 °C viste at den sigmoide kurveformen avtok ved temperaturer over 64 °C (Figur 3.3).



**Figur 3.3:** Amplifikasjonsplott for *yhfT*-genet av prøve CCUG 70917T (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*) ved temperatur 60-70 °C.

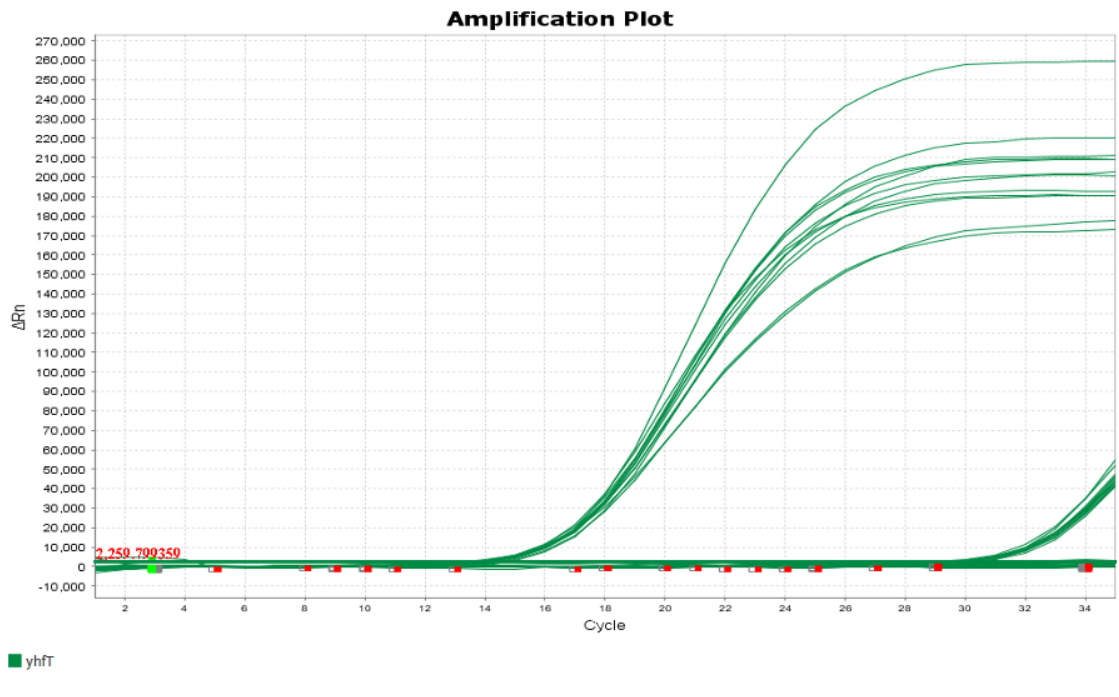
Resultatet fra kapillærelektroforese på PCR-produktene til målgenen *yhfT* ved høyere temperaturer viste også detekterte bånd med båndlengde på omtrent 142 bp. Det ble detektert bånd i tilnærmet alle brønner, med unntak av kokelysat for *S. aureus* ved de høyeste temperaturene. Gelen viste at primerne hadde bundet til *S. aureus*, men båndene ble svakere ved økende temperatur.



**Figur 3.4:** Resultater av kapillærelektroforese for PCR-produkt av målgen *yhfT* ved temperatur 60-70 °C fra prøve CCUG 70917T (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*).

### *yhfT* med ny forward primer

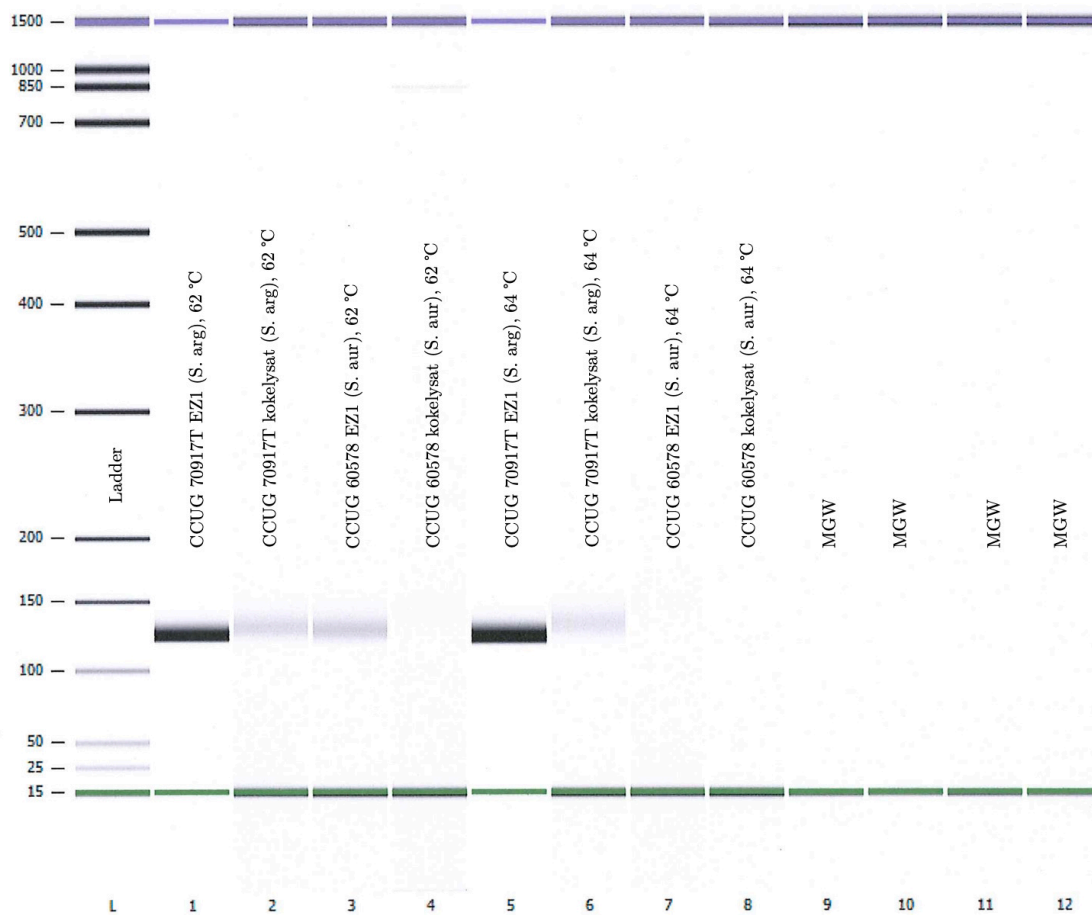
Figur 3.5 viser amplifikasjonsplottet fra qPCR-analysen på målgenet *yhfT*, med ny forward primer (yhfT2-F). Amplifikasjonsplottet viste tydelige sigmoide kurver av eluat og lysat, og at det var detekterbar amplifikasjon av prøve CCUG 70917T (*S. arg*).



**Figur 3.5:** Amplifikasjonsplott for *yhfT*-genet av prøve CCUG 70917T (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*) med primer yhfT2-F ved 54-64 °C

PCR-produktet til *yhfT* med ny forward primer har en lengde på 127 bp. Resultatene fra kapillærelektroforesen viste detekterte bånd med båndlengde på omtrent 127 bp i brønnene for prøvene av *S. argenteus* og *S. aureus*. Båndene for kokelysat ble svakere enn EZ1-eluatene grunnet degradering av DNA etter lagring. Båndene i brønnene for *S. aureus* avtok ved økende temperatur og forsvant fullstendig ved 64 °C, noe som illustreres godt i Figur 3.6.

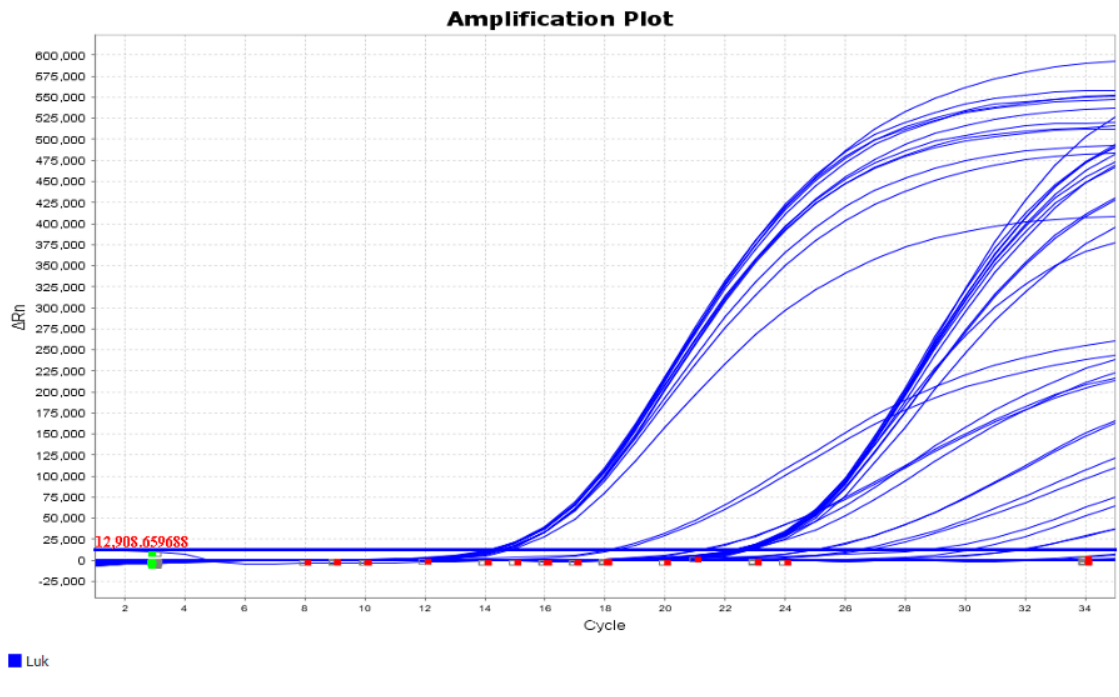




**Figur 3.6:** Resultater av kapillærelektroforese for *yhfT* med primer yhfT2-F ved 62 °C og 64 °C i PCR-produkter fra prøve CCUG 70917T (*S. argenteus*) og CCUG 60578 (*S. aureus*).

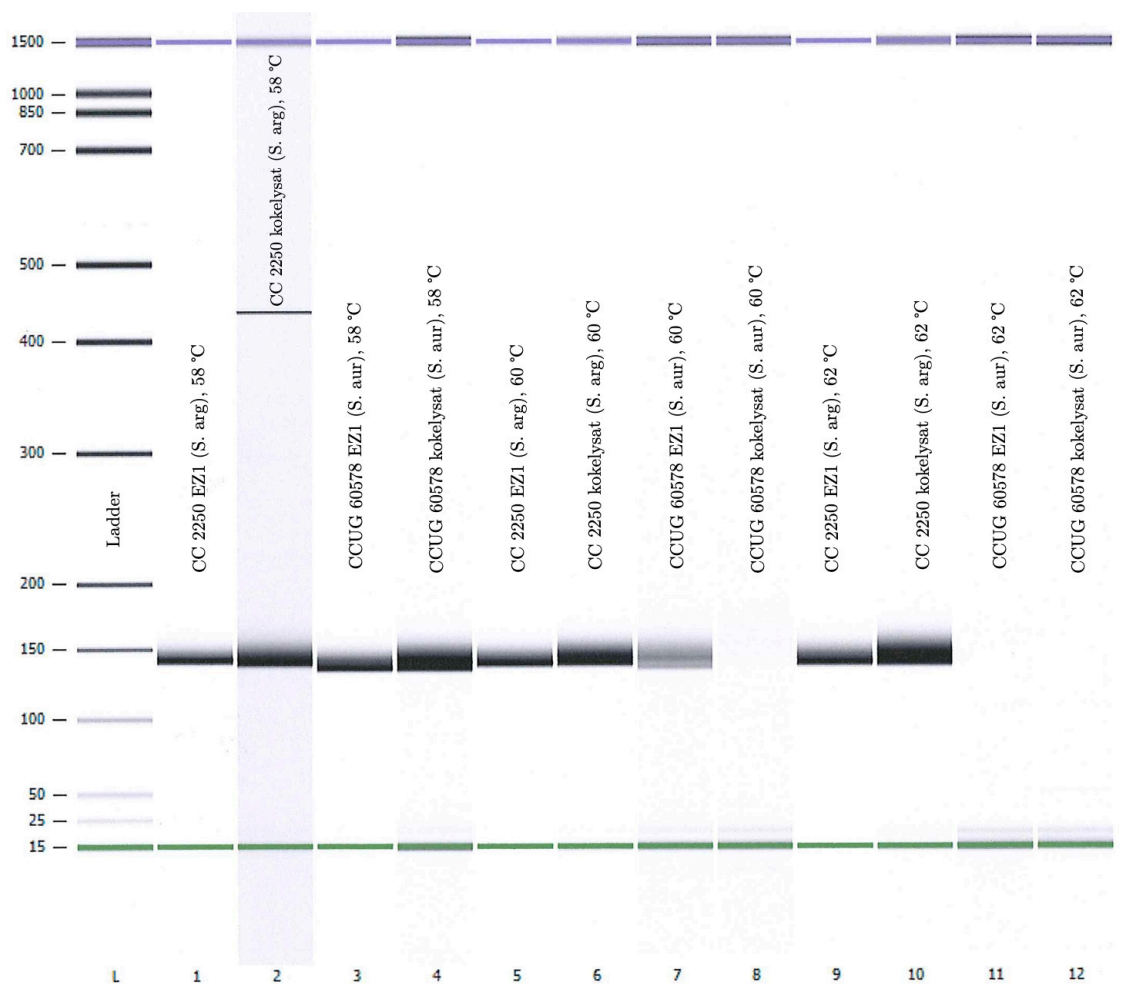
**lukD**

Figur 3.7 viser amplifikasjonsplottet fra qPCR-analysen på målgen *lukD*. Amplifikasjonsplottet viste at primere og prober har bundet seg til både prøver med *S. aureus* og *S. argenteus*. Prøvene med *S. aureus* ble detektert av qPCR-metoden, men kunne ses som flate og mindre sigmoide kurver.



**Figur 3.7:** Amplifikasjonsplott for *lukD*-genet. Plottet viser detekterbar amplifikasjon av både CC 2250 (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*).

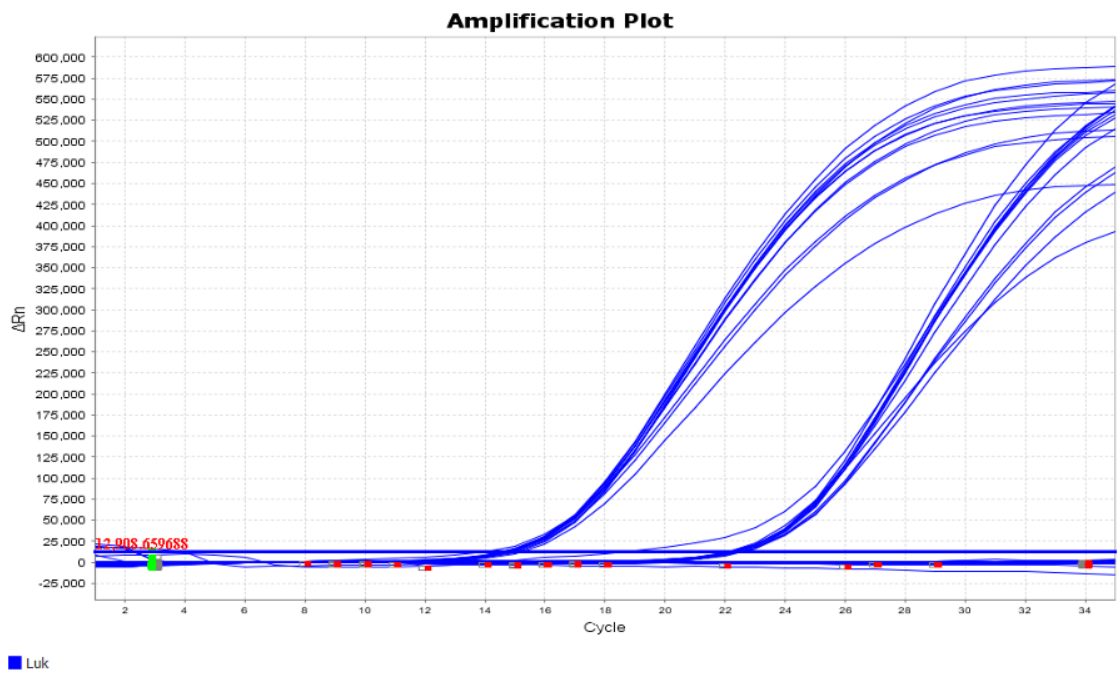
PCR-produktet for genet *lukD* har en lengde på 149 bp. Resultatet fra kapillærelektforese, vist i Figur 3.8, detekterte bånd med båndlengde på omtrent 149 bp i samtlige brønner med unntak av brønn åtte, elleve og tolv.



**Figur 3.8:** Resultater av kapillærelektroforese PCR-produkter for *lukD* fra prøve CC 2250 (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*).

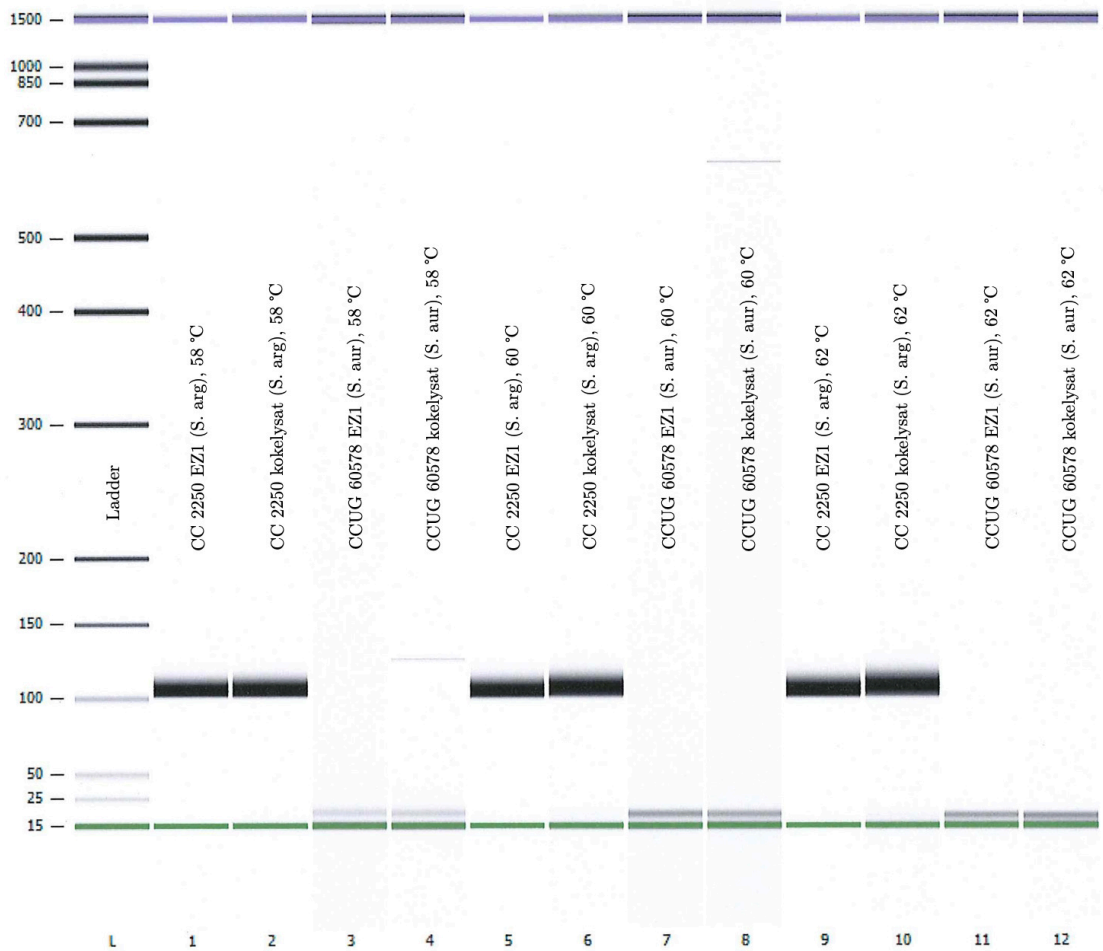
### *lukE*

Figur 3.9 viser amplifikasjonsplottet fra qPCR-analyse på målgen *lukE*. Resultatene viste detekterbar amplifikasjon av prøve CC 2250 (*S. argenteus*).



**Figur 3.9:** Amplifikasjonsplott for *lukE*-genet av prøve CC 2250 (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*) ved temperatur 54-64 °C.

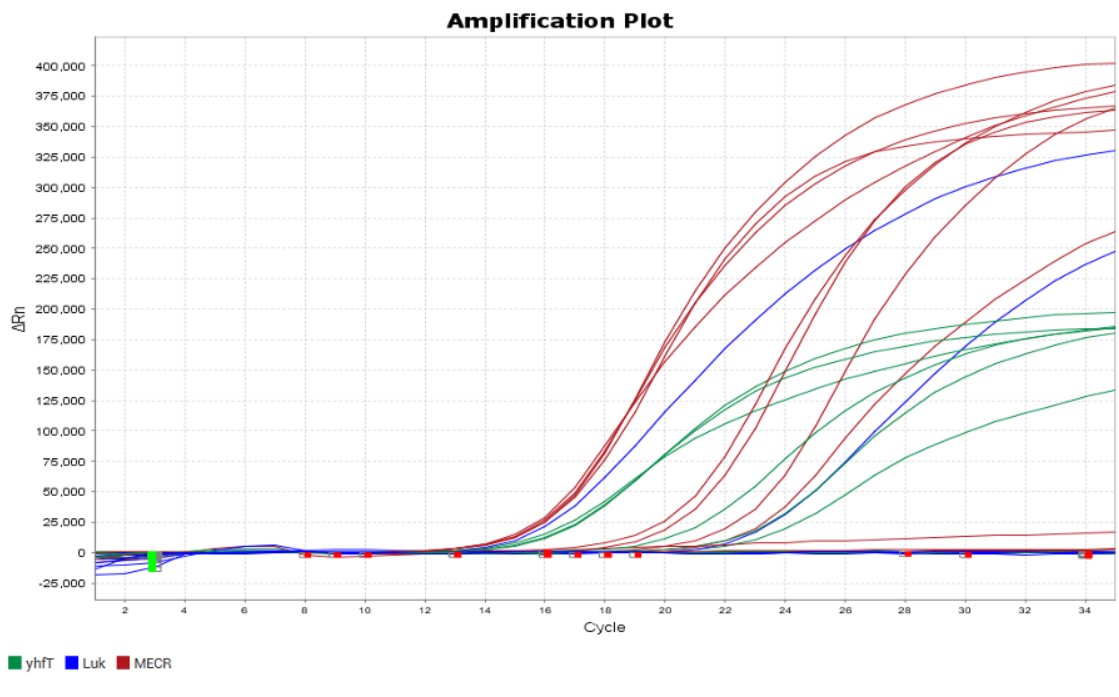
PCR-produktet for genen *lukE* har en lengde på 103 bp. Resultatet fra kapillærelektroforesen viste tydelige bånd med båndlengde på omtrent 103 bp i brønnene for prøver med *S. argenteus*, og ingen bånd i brønnene for prøver med *S. aureus*. Dette understøttes av resultatet fra qPCR. Båndene er vist i Figur 3.10.



**Figur 3.10:** Resultater av kapillærelektroforese av PCR-produkter for *luke* fra prøve CC 2250 (*S. arg*) og CCUG 60578 (*S. aur*).

### 3.3 Multiplex qPCR

Multiplex qPCR-metoden ble satt opp på alle prøvene vist i Tabell 2.1. Hybridisering- og polymeriseringstemperatur ble satt til 62 °C basert på resultater fra singleplex qPCR. Figur 3.11 nedenfor viser resultatet fra amplifikasjonen av målgenene *yhfT*, *luke* og *mecA* med multiplex qPCR. Negativ kontroll (MGW) viste ingen amplifikasjon på noen av målgenene etter sammenslåing til multiplex.



**Figur 3.11:** Amplifikasjonsplott for multiplex qPCR på målgenene *yhfT* (grønn), *lukE* (blå), og *mecA* (rød).

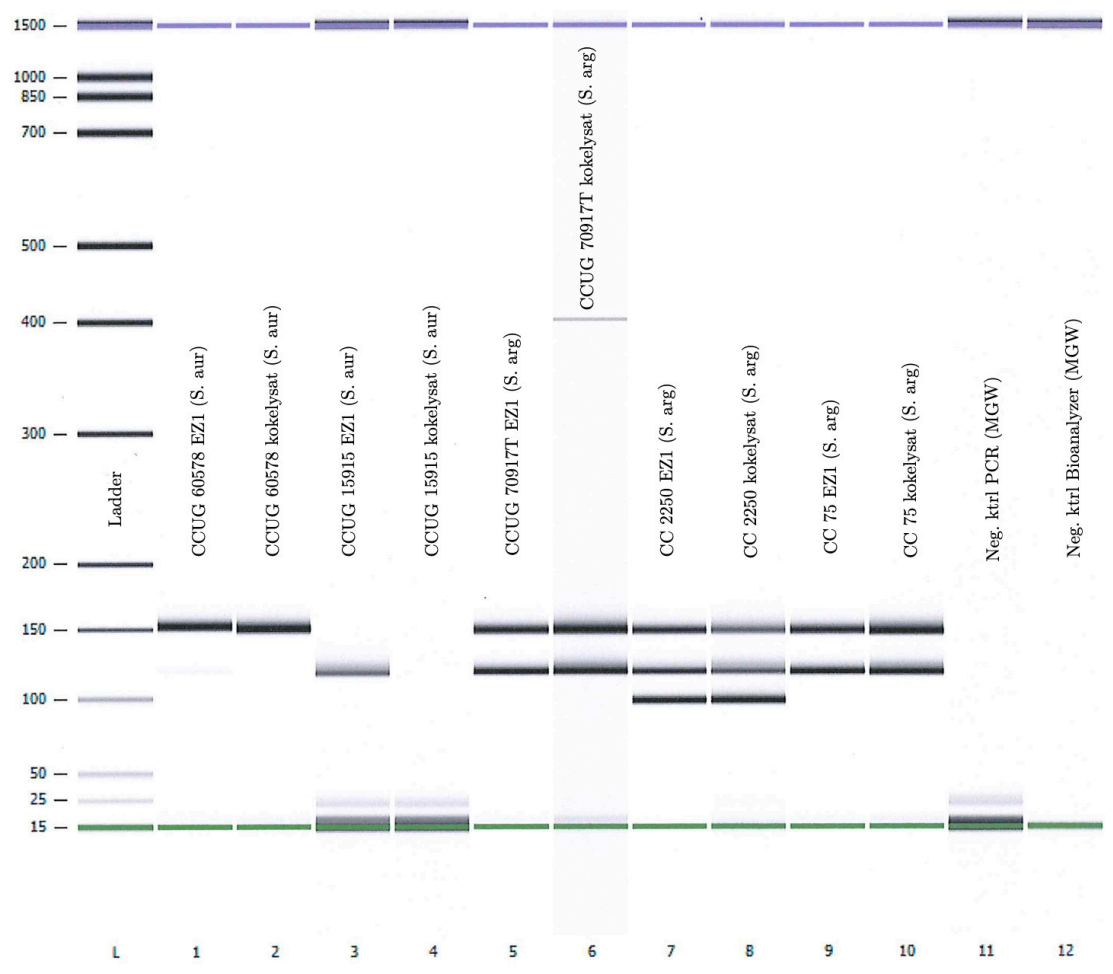
Amplifikasjonsplottet for multiplex qPCR-metoden ga ulik amplifikasjon på ulike gener på bakteriestammene, og resultatet samsvarte med resultater fra tidligere helgenomsekvensering. Resultatet fra multiplex qPCR og beregning av gjennomsnittlig Ct-verdi er vist i Tabell 3.2. Gjennomsnittet ble beregnet av Ct-verdier for kokelysat og EZ1-eluat.

**Tabell 3.2:** Oversikt over resultater på multiplex qPCR, samt gjennomsnittlig Ct-verdi av kokelysat og EZ1-eluat

Stamme	Resultat fra multiplex PCR	Gjennomsnittlig Ct-verdi	
<i>S. aureus</i> CCUG 15915	<i>mecA</i>	Negativ	-
	<i>lukE</i>	Negativ	-
	<i>yhfT</i>	Negativ	-
<i>S. aureus</i> CCUG 60578	<i>mecA</i>	<b>Positiv</b>	17.89
	<i>lukE</i>	Negativ	-
	<i>yhfT</i>	Negativ	-
<i>S. argenteus</i> CCUG 70917T	<i>mecA</i>	<b>Positiv</b>	18.87
	<i>lukE</i>	Negativ	-
	<i>yhfT</i>	<b>Positiv</b>	19.20
<i>S. argenteus</i> CC 75	<i>mecA</i>	<b>Positiv</b>	17.58
	<i>lukE</i>	Negativ	-
	<i>yhfT</i>	<b>Positiv</b>	18.03
<i>S. argenteus</i> CC 2250	<i>mecA</i>	<b>Positiv</b>	19.20
	<i>lukE</i>	<b>Positiv</b>	19.52
	<i>yhfT</i>	<b>Positiv</b>	19.43

Ut fra resultatet i Figur 3.11 fikk alle målgenene amplifikasjon og tydelige sigmoide kurver. Målgen *yhfT* hadde lavere  $\Delta R_n$  sammenlignet med de to andre målgenene.

Resultatene fra kapillærelektroforen ga tydelige bånd i brønnene for prøvene som var positive for de ulike genene. Båndene vises i Figur 3.12. Resultatet viste at det ble dannet bånd med båndlengde som samsvarte med forventet fragmentlengdene. Det ble ikke dannet sekundærstrukturer eller primer dimer av betydning.



2100 Expert (B.02.08.SI648)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 07.04.2021 14:45:04

**Figur 3.12:** Resultat av kapillærelektroforese på PCR-produkt fra multiplex qPCR ved 62 °C. PCR-produktene har ulik lengde der *yhfT* har en lengde på 127 bp, *lukE* på 103 bp og *mecA* på 155 bp.

## 3.4 Effektivitet- og sensitivitetstesting

### Effektivitet singleplex qPCR

Resultatene av effektivitetstesting gjenspeiler hvor godt qPCR-metoden amplifiserer ønskede gensekvenser. Et eksempel på hvordan beregningene ble gjort i Excel vises i Figur 3.13 for målgen *yhfT* med primer *yhfT2-F* på EZ1-eluat. Beregningene ble gjort tilsvarende på alle målgenene både på singleplex og multiplex qPCR. Rådata og beregninger er lagt ved i vedlegg B. Resultatene for singleplex qPCR vises i Tabell 3.3 og for multiplex qPCR i Tabell 3.4.

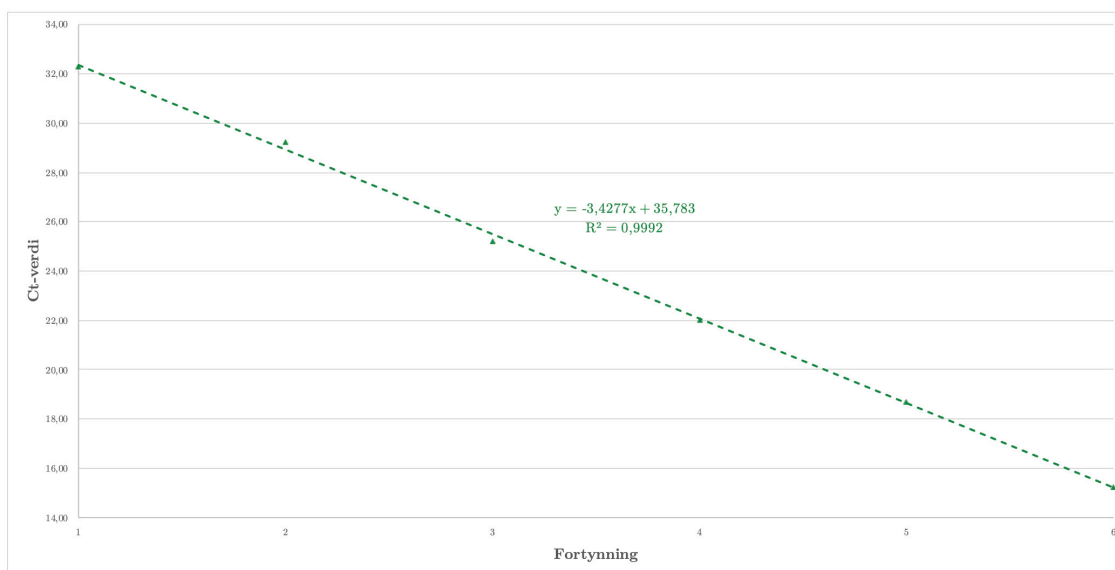


**Tabell 3.3:** Resultater fra effektivitetsberegning av singleplex qPCR på *yhfT* og *lukE* ved hybridisering- og polymeriseringstemperatur på 62 °C

Stamme	Gen	Ekstraksjon	Effektivitet (%)
<i>S. argenteus</i> CC 2250	<i>yhfT</i>	EZ1-eluat	95.77
		Kokelysat	104.23
	<i>lukE</i>	EZ1-eluat	95.96
		Kokelysat	96.10

Som det fremkommer i Tabell 3.3 hadde singleplex-metoden en effektivitet med kokelysat og EZ1-eluat mellom 95-105% for begge målgenene. Determinasjonskoeffisienten,  $R^2$ , ble 0.9992 både for *yhfT* og *lukE*. Standardavvikene ble beregnet, og som vist i Figur 3.13 ble disse svært lave. Stigningstallet ble 3.43. Resultatene viste at punktene lå godt sentrert om trendlinjene for både *yhfT* og *lukE*.

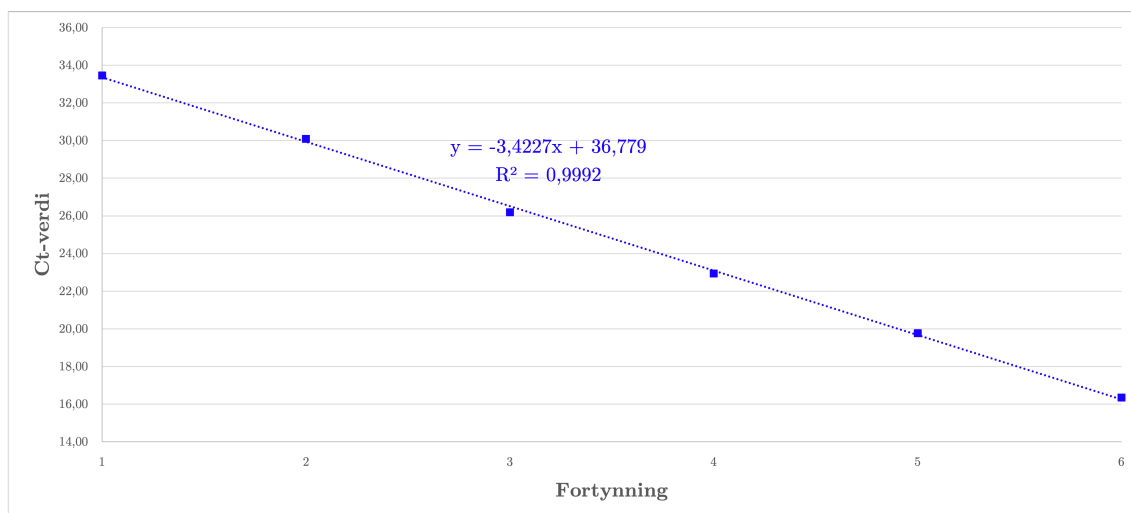
Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
<i>S. argenteus</i> CC 2250, EZ1	7,12E+00	0,1	1,00E-01	6	15,067	15,444	15,244	15,25	0,19	95,77 %	4710000
	7,12E-01	0,01	1,00E-02	5	18,699	18,566	18,852	18,71	0,14		471000
	7,12E-02	0,001	1,00E-03	4	22,054	22,081	21,939	22,02	0,08		47100
	7,12E-03	0,0001	1,00E-04	3	25,310	25,143	25,209	25,22	0,08		4710
	7,12E-04	0,00001	1,00E-05	2	29,160	29,085	29,390	29,21	0,16		471
	7,12E-05	0,000001	1,00E-06	1	32,252	32,435	32,221	32,30	0,12		47,1



**Figur 3.13:** Eksempel på beregning av effektivitet i Excel på prøve CC 2250 (*S. arg*) ved 62 °C, målgen *yhfT*, EZ1-eluat.

Standardkurven for målgen *lukE* ved singleplex qPCR vises i Figur 3.14. Som det fremkommer i vedlegg B var de beregnede standardavvikene for *lukE* også svært lave. Stigningstallet ble beregnet til 3.42.





**Figur 3.14:** Effektivitetsberegning for CC 2250 (*S. arg*) ved 62 °C, målgene *lukE*, EZ1-eluat.

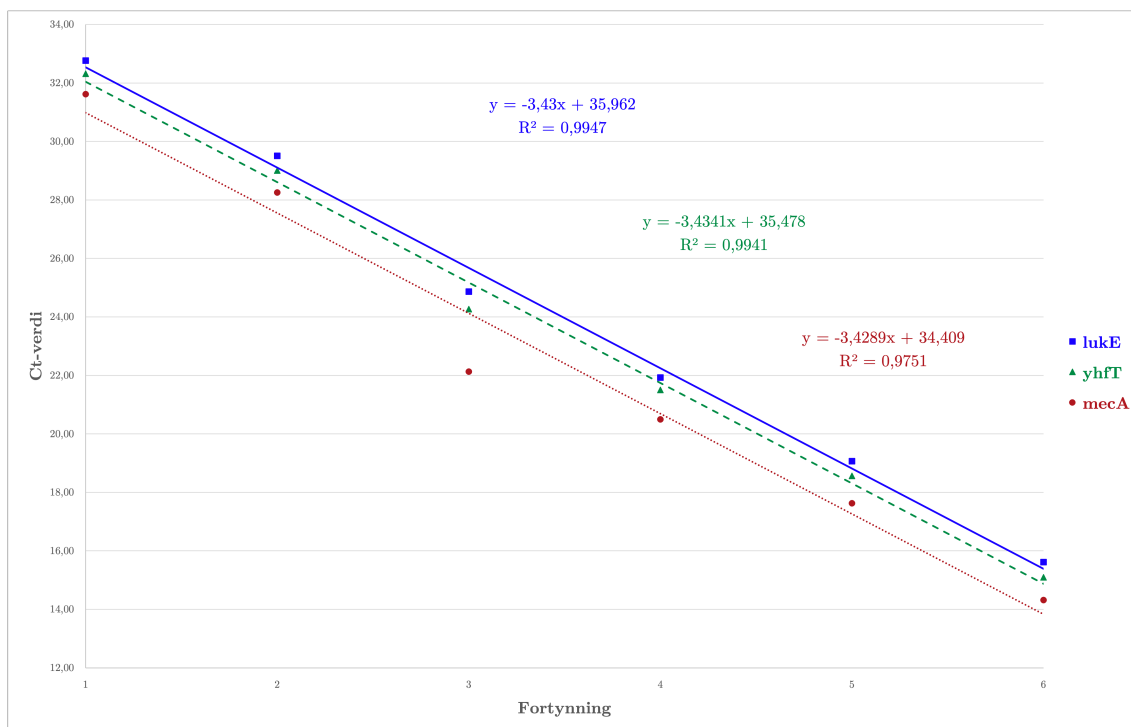
### Effektivitet multiplex qPCR

Som det fremkommer i Tabell 3.4 har multiplex-metoden en effektivitet med kokelysat mellom 100.7-106.0% og EZ1-eluat mellom 95.5-95.7%.

**Tabell 3.4:** Resultater fra effektivitetsberegning av multiplex qPCR ved hybridisering- og polymeriseringstemperatur på 62 °C

Stamme	Gen	Ekstraksjon	Effektivitet (%)
<i>S. argenteus</i> CC 2250	<i>yhfT</i>	EZ1-eluat	95.52
		Kokelysat	106.03
	<i>lukE</i>	EZ1-eluat	95.68
		Kokelysat	102.02
	<i>mecA</i>	EZ1-eluat	95.71
		Kokelysat	100.71

Standardkurvene samlet for alle målgene i effektivitetsberegningen vises i Figur 3.15. Samtlige kurver hadde en  $R^2 > 0.95$ , og et stigningstall nært 3.33. Standardavvikene på de ulike målgene viste liten variasjon mellom replikatene i hver fortynning. Figur 3.15 viser at fortynning nummer tre hadde et avvik i alle standardkurvene. Resultatene og beregning av standardavvik er lagt ved i vedlegg B.



**Figur 3.15:** Effektivitetsberegning for multiplex qPCR på målgenene *lukE*, *mecA*, *yhfT*, EZ1-eluat. Utført på stamme CC 2250 (*S. arg*).

### Sensitivitet

Tabell 3.5 viser resultatene av målingene for prøve CC 2250 (*S. argenteus*) på kokelysat og EZ1-eluat. Denne målingen ble gjort på nytt for å måle konsentrasjon av DNA i den ufortynnede prøven av kokelysat.

**Tabell 3.5:** Målt mengde DNA i standardløsninger, kontrollmateriale, kokelysat (ufortynnet) og EZ1-eluat (fortynning 1:10) på prøve CC 2250 (*S. arg*)

Resultater av DNA måling, EZ1-eluat	
Prøvemateriale	Målt mengde DNA (ng/ $\mu$ L)
Standard 1	38.86
Standard 2	22894.97
Kontrollprøve	11.40
<i>S. argenteus</i> CC 2250 ( $10^1$ )	7.12
Resultater av DNA måling, kokelysat	
Prøvemateriale	Målt mengde DNA (ng/ $\mu$ L)
Standard 1	54.86
Standard 2	23798.97
Kontrollprøve	10.50
<i>S. argenteus</i> CC 2250 ( $10^0$ )	1.30

Den høyeste detekterbare fortynningen ble beregnet og resultatet fremkommer i Tabell 3.6. Beregningen ga det laveste bakteriecelletallet som fortsatt gir amplifikasjon. Resultatene viste at qPCR detekterer alle målgenene på kokelysat

ned til  $10^{-4}$  fortynning, mens i EZ1-eluatene detekteres målgenene ned til mindre enn  $10^{-6}$  fortynning, som tilsvarer henholdsvis et celletall på 86 og 47 bakterieceller.

**Tabell 3.6:** Laveste bakterietall for deteksjon ved kokelysat og eluat fra EZ1. Fortynningsrekken for kokelysat ble laget fra ufortynnet lysat, mens fortynningsrekken for eluat ble laget fra 1:10 fortynning

Fortynning	Kokelysat		EZ1 Eluat	
	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Bakterietall	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Bakterietall
7	$1.3 \cdot 10^0$	860000	–	–
6	$1.3 \cdot 10^{-1}$	86000	$7.12 \cdot 10^{-1}$	4710000
5	$1.3 \cdot 10^{-2}$	8600	$7.12 \cdot 10^{-2}$	471000
4	$1.3 \cdot 10^{-3}$	860	$7.12 \cdot 10^{-3}$	47100
3	$1.3 \cdot 10^{-4}$	<b>86</b>	$7.12 \cdot 10^{-4}$	4710
2	$1.3 \cdot 10^{-5}$	N/A	$7.12 \cdot 10^{-5}$	471
1	$1.3 \cdot 10^{-6}$	N/A	$7.12 \cdot 10^{-6}$	<b>47.1</b>

### 3.5 Validering av qPCR metode

Resultatet fra multiplex qPCR-analyse på 40 utvalgte bakteriestammer vises i Tabell 3.7. Resultatene samsvarer med resultatene fra tidligere helgenomsekvensering av bakterieisolatene. Rådata er lagt ved i vedlegg C.

**Tabell 3.7:** Resultater fra validering av multiplex qPCR på 40 utvalgte bakteriestammer

Bakterie	EZ1-eluat		Bakterie	Kokelysat	
	Isolat	Amplifisert målgen		Isolat	Amplifisert målgen
<i>S. argenteus</i>	t15218	<i>mecA, yhfT</i>	<i>S. argenteus</i>	t19056	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t12782	<i>mecA, yhfT</i>		t17057	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t15221	<i>mecA, yhfT</i>		t17987	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t6675	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t6947	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t16808	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t10900	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t16149	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t16376	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t14475	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t7960	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
	t12708	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t15443	<i>mecA, yhfT</i>
	t16726	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t9791	<i>mecA, yhfT</i>
	t6188	<i>mecA, lukE, yhfT</i>		t5078	<i>mecA, lukE, yhfT</i>
<i>S. aureus</i>	t019	<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i>	t002	<i>mecA</i>
	t105	<i>mecA</i>		t127	<i>mecA</i>
	t1476	<i>mecA</i>		t008	<i>mecA</i>
	t690	<i>mecA</i>		t304	<i>mecA</i>
	t355	<i>mecA</i>		t223	<i>mecA</i>
	t148	<i>mecA</i>		t034	<i>mecA</i>
	t024	<i>mecA</i>		t437	<i>mecA</i>
	t044	<i>mecA</i>		t021	<i>mecA</i>
	t688	<i>mecA</i>		t005	<i>mecA</i>
	t657	<i>mecA</i>		t701	<i>mecA</i>

## 4. Diskusjon

Litteratursøket gjennomført som en del av dette prosjektet tyder på at det ikke eksisterer etablerte qPCR metoder for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus* ved bruk av artsspesifikt målgen. Denne metodeutviklingen er derfor trolig verdens første artsspesifikke multiplex qPCR for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus*.

Hensikten med denne oppgaven var metodeetablering og -validering, hvor metoden effektivt skulle skille mellom meticillinresistente *S. argenteus* og MRSA. Instrumentet MALDI-TOF fra Bruker Daltonics har et identifikasjonsspekter for *S. argenteus* i sin database, men dette spekteret er for likt *S. aureus*. Dette resulterer i en usikker score, og det kan derfor ikke med sikkerhet konstanteres hvilken art som er identifisert. Dermed er det kun helgenomsekvensering som per i dag gir sikker artsbestemmelse av *S. argenteus*. På bakgrunn av dette var det hensiktsmessig å utarbeide en ny qPCR-metode for å kunne artsbestemme meticillinresistente *S. argenteus*. qPCR-metoden ble optimalisert med utgangspunkt i den allerede etablerte og utprøvde metoden for MRSA med *mecA* som ett av målgenene (vedlegg D). I diskusjonskapittelet vil det først bli diskutert de to ekstraksjonsmetodene, deretter spesifisiteten til de ulike primersettene. Etter dette vil optimalisering av metoden diskuteres, samt effektivitets- og sensitivitetstesting. Til slutt blir multiplex qPCR-metodens validitet og spesifitet diskutert.

### 4.1 Vurdering av ekstraksjonsmetodene

I dette prosjektet ble det testet ut to forskjellige ekstraksjonsmetoder; kokelysering og automatisk enzymatisk ekstraksjon med EZ1. Ved referanselaboratoriet for MRSA benyttes normalt kokelysering. Denne metoden er mindre kostbar, ressurs- og tidkrevende enn automatisk ekstraksjon. Automatisk ekstraksjon gir derimot et renere og mer stabilt produkt, og egner seg derfor godt til metodeutvikling og validering. Begge ekstraksjonsmetodene ble testet ut gjennom hele metodeetableringen for å kunne avgjøre om metodene egner seg til multiplex qPCR.

Resultatene viste at det ekstraheres en høyere konsentrasjon DNA ved automatisk enzymatisk ekstraksjon sammenlignet med kokelysering (Tabell 3.1). Dette understøttes av resultatene fra qPCR for samtlige analyser, der prøvene med kokelysat hadde en høyere Ct-verdi enn prøvene med eluat. Som beskrevet innledningsvis kreves det flere sykluser før DNA-amplifikasjonen når treshold og detekteres som positiv amplifikasjon når prøvematerialet har lavt innhold av DNA.

Resultatene fra kapillærelektroforese av kokelysat og eluat viste også en signifikant forskjell, eluat får sterkere bånd enn kokelysat. Dette er særlig tydelig ved de

høyeste temperaturene på analysene med temperaturgradient. Hybridiserings- og polymeriseringstemperatur for multiplex qPCR ble satt til en temperatur der kokelysat fortsatt ga tydelig amplifikasjon og markerte bånd i kapillærelektroforese (Figur 3.12).

Ut fra resultatene konkluderes det med at kokelysering var en god nok ekstraksjonsmetode, og qPCR-metoden ble validert for kokelysering. Denne metoden ble utarbeidet med hensyn til at referanselaboratoriet arbeider med bakterier og renkulturer. Bakteriekolonier har et høyt innhold av bakterieceller, dermed kan kokelysering benyttes i diagnostikken selv om kokelysering ekstraherer ut lavere konsentrasjon av DNA. Om det derimot skulle analyseres direkte på prøvemateriale med variabel konsentrasjon av bakterieceller, er kokelysering trolig ikke tilstrekkelig.

## 4.2 Vurdering av spesifisitet til primere og prober

Primernes og probenes evne til spesifikk binding ble undersøkt, samt evne til påvisning av ønskede målgener og hvor effektivt de skiller mellom meticillinresistente *S. argenteus* og MRSA. Dette ble først gjort som singleplex qPCR for å få et best mulig utgangspunkt før sammenslåing til multiplex qPCR. Det var ønskelig å analysere PCR-produktene på kapillærelektroforese for å kontrollere dannelse av primer dimer og dannelse av uspesifikke PCR-produkt. I tilfeller der kun primere og ikke probe bindes til templattråd, vil det dannes uspesifikke PCR-produkter uten fluorescerende signal.

Ved å ha flere målgen til stede i multiplex qPCR, kan fortrinnsmessig amplifikasjon av ett målgen over et annet forekomme. Dette fenomenet er nevnt i flere tidligere prosjekter (Baric og Dalla-Via 2004; Vremeră mfl. 2011). I disse prosjektene ble det observert at ved å benytte flere målgener oppsto det u hensiktsmessig interaksjon mellom primere og prober, og konkurranse om reagenser. Problemet ble løst ved å justere konsentrasjonene til primerne og probene. I dette prosjektet var det ikke problemer med fordelaktig amplifikasjon, og derfor ble ikke primer- eller probekonsentrasjoner endret. Primer- og probekonsentrasjoner på henholdsvis 12  $\mu\text{M}$  og 8  $\mu\text{M}$  ga gode og effektive amplifikasjonsresultater for samtlige målgen, uten at ett målgen ble preferert overfor et annet.

I dette prosjektet ble det benyttet qPCR SuperMix fra Quantabio. SuperMixeren er optimalisert til å benyttes i multiplex qPCR, og fungerte optimalt i denne metodeutviklingen. I en annen studie vektlegges det hvor viktig den relative konsentrasjonen av primere, buffer, magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) og *Taq* DNA polymerase er. Markoulatos mfl. beskriver ulike vanskeligheter ved etablering av multiplex qPCR, herunder dårligere sensitivitet, spesifisitet og fortrinnsmessig amplifikasjon av visse målgener (Markoulatos mfl. 2002). SuperMix fra Quantabio er en reaksjonsbuffer som inneholder blant annet  $\text{MgCl}_2$ , *Taq* DNA polymerase og andre stabilisatorer og ytelsesfremmede komponenter. Da denne fungerte optimalt i metodeutviklingen, var det ingen hensikt å endre på konsentrasjonene av de ulike komponentene i reaksjonsmiksen.

Resultatene fra qPCR på *yhfT* ga synlig amplifikasjon av prøver med *S. argenteus*. Dette tyder på at probene bindes spesifikt til sekvenser på *S. argenteus* og ikke til *S. aureus*. Som en kontroll på denne antagelsen, ble PCR-produktene analysert med kapillærelektroforese for å påvise eller utelukke uspesifikk priming. Resultatet av kapillærelektroforesen viste bånd i brønner for både *S. argenteus* og *S. aureus*, noe som betydde at yhfT-primene hadde bundet seg uspesifikt til sekvenser på *S. aureus*. Dette var ikke mulig å observere med kun qPCR-analyse, da proben ikke hadde bundet seg og dermed ikke ga synlig amplifikasjon av PCR-produktene til *S. aureus*. På bakgrunn av dette ble det avgjort å analysere en ny stamme av *S. aureus* ved høyere temperaturer. Dette ble gjort først og fremst for å utelukke tilfeldige feil og tilfeldig ervervelse av *yhfT* eller lignende gen i genomet til den første stammen av *S. aureus*. I tillegg var det ønskelig å teste ut hvordan primerne og proben fungerte ved høyere temperaturer. Også denne analysen ga kun synlig amplifikasjon av prøver med *S. argenteus*, men ved høyere temperaturer enn 64 °C var det en signifikant endring i kurvenes sigmoide form (Figur 3.3). Dette skyldes at temperaturen var for høy slik at for få primere og prober ble hybridisert til templatråden. Dette resulterte i lavere amplifikasjon. Dette kan ses i sammenheng med at primernes smeltetemperatur er 55 °C, og man kan derfor anslå at temperaturer over 64 °C er for høyt i forhold til smeltetemperaturen. Ut fra dette ble det konkludert med at primerne og proben for *yhfT* ikke fungerer godt ved temperaturer over 64 °C. Resultatet fra kapillærelektroforese viste også ved ny analyse flere uspesifikke bindinger av primerne til sekvenser på *S. aureus*. Dermed ble det konkludert med at det ikke var tilfeldig feil som forårsaket misprimingen, men at primerne ikke var gode nok til å benyttes videre.

Uspesifikk priming til *S. aureus* vil i utgangspunktet ikke føre til feilidentifikasjon, da proben ikke bindes uspesifikt og heller ikke gir synlig amplifikasjon. Det vil derimot føre til unødvendig bruk av reagenser og vil gi en lavere effektivitet. Da *yhfT* er det artspesifikke genet i metoden, er det essensielt at disse primerne effektivt og korrekt kan skille mellom *S. argenteus* og *S. aureus*. Selv om det trolig ikke ville ført til feilidentifikasjon, er det ikke ønskelig eller optimalt med uspesifikk binding av primere i etablering av en artsspesifikk multiplex qPCR. Det ble derfor besluttet at primerne for *yhfT* ikke var gode nok, og det ble bestilt opp ny forward primer til utprøving.

Tidligere primer (yhfT-F) og ny primer (yhfT2-F) ble kontrollert i programvaren Geneious Prime. Denne programvaren er et bioinformatisk verktøy for molekylærbiologi og sekvensanalyse. Der ble det observert at tidligere forward primer kun hadde to avvikende baser fra et gen i *S. aureus*. Dette genet, *VraA*, koder for en langkjedet fettsyre CoA-ligase. *VraA* har trolig lik funksjon hos *S. aureus* som *yhfT*-genet har hos *S. argenteus*. Da yhfT-F hadde svært lik sekvens som *VraA*-genet, ble den nye forward primeren (yhfT2-F) derfor flyttet. Dette resulterte i et kortere PCR-produkt og flere mismatches mellom sekvensen til *VraA*-genet og yhfT2-F. *VraA*-genet er beskrevet tidligere i et studie på *Scmec* type II-genet hos MRSA-stammer (Buntaran mfl. 2013). I denne studien ble det funnet at 70% av stammene som ble testet ut hadde *VraA*-genet. Dette indikerer at det er relativt vanlig for MRSA-stammer å ha denne genotypen. Probe og revers primer ble også sjekket i Geneious Prime, der en fant at både proben og revers

primer hadde flere ulike baser fra *VraA*-genet. Det var derfor ikke nødvendig å bestille opp ny probe eller revers primer.

yhfT2-F ble testet sammen med opprinnelig probe og revers primer ved ulike temperaturer. Resultatene fra qPCR viste spesifikk binding av probe i form av synlig amplifikasjon av prøver med *S. argenteus*. Resultatet fra kapillærelektroforese viste fremdeles uspesifikk binding av primere til *S. aureus* (Figur 3.6). Disse bindingene var derimot svakere enn ved tidligere primersett, i tillegg til at denne bindingen avtok i større grad ved økende temperaturer. Det var tydelig at to temperaturer var gunstige for dette primersettet; 62 °C og 64 °C. Ved disse temperaturene var de uspesifikke bindingene til *S. aureus* så svake eller fraværende at primersettet kunne benyttes i en multiplex metode.

yhfT2-F hadde en smeltetemperatur på 62 °C, som var høyere enn den tidligere forward primeren. Etter bytte til ny primer var differansen mellom yhfT2-F og yhfT-R 6.8 °C. Dette så ikke ut til å ha noen innvirkning på metoden, og det ble besluttet å godta dette avviket mellom  $T_m$  på forward og revers primer. En tidligere artikkel som omhandler feilsøking og optimalisering av PCR-metoder, slår fast at smeltetemperaturen mellom primere ikke bør være mer enn  $\pm 5$  °C (Lorenz 2012). For eventuell videre utvikling av denne metoden kan det vurderes om revers primer for *yhfT* bør endres slik at differansen mellom  $T_m$  ikke overstiger 5 °C. I tillegg kan det være hensiktsmessig å vurdere å flytte yhfT2-F ytterligere for å få flere avvikende baser.

LukD og LukE er et toksin bestående av to gener som koder for to proteiner. Disse to proteinene danner et poreformet cytotoksin. Fordi disse genene sammen utgjør et proteinprodukt, vil tilstedeværelsen av genet *lukD* indikere tilstedeværelsen av genet *lukE*. Basert på dette vil ikke valg av gen ha noen betydning på metodens spesifisitet. Primere og prober for både *lukD* og *lukE* ble bestilt for å undersøke om et av genene ville fungere bedre i etableringen av qPCR. Resultatene fra qPCR på målgen *lukD* viste amplifikasjon av både *S. argenteus* og *S. aureus*, hvilket betydde at både primere og prober hadde uspesifikk binding til *S. aureus*. Dette ble undersøkt av resultatene fra kapillærelektroforese, som ga bånd i brønner med *S. aureus*. Da *S. aureus* og *S. argenteus* er nært beslektet, kan trolig genet for *lukD* og/eller *lukE* ha blitt delt mellom artene. *luk*-genene koder for virulens og det er ikke usannsynlig at stammer av *S. aureus* kan ha ervervet dette genet. Denne antagelsen blir også understøttet av Khosravi mfl. i en artikkel som omhandler forekomsten av gener som koder for leukocidiner hos MRSA-stammer (Khosravi mfl. 2012). Denne artikkelen beskriver funn av flere MRSA-stammer som produserer bi-komponente toksiner som for eksempel LukD og LukE. Studien fant at forekomsten av *lukE/lukD*-gener i MRSA-stammer var 66.25%, og 33.3% for MSSA-stammer.

Resultatene fra qPCR på målgen *lukE* viste amplifikasjon av kun *S. argenteus*. Dette ble også bekreftet av resultatene fra kapillærelektroforese der det kun var bånd i brønnene for *S. argenteus*. Dette tilsier at både primere og prober har spesifikk binding. På bakgrunn av disse resultatene ble det avgjort at målgenet *lukE* skulle benyttes videre i multiplex qPCR-metoden.

### 4.3 Optimalisering av qPCR

Det var ønskelig å etablere en ny multiplex qPCR basert på den allerede etablerte qPCR-metoden for identifikasjon av MRSA. Da samme primersett for *mecA* skulle benyttes i etablering av ny metode for *S. argenteus*, hadde det vært fordelaktig å velge samme hybridiserings- og polymeriseringstemperatur som PCR-programmet for MRSA (vedlegg D). Årsaken til dette var at *mecA* er nøye utprøvd ved 60 °C og viser god spesifisitet og effektivitet ved denne temperaturen. I tillegg ville det vært praktisk og tidsbesparende med tanke på at det tillater analyse av begge multiplex qPCR i samme qPCR-program, men med ulik PCR-mix. De gjennomsnittlige Ct-verdiene var tilnærmet lik for både *mecA* og *lukE*, men ikke for *yhfT* (vedlegg A). Dette betyr at primersettene fungerte like godt på alle de ulike temperaturene, med unntak av *yhfT*. Resultatene viste at primerne til *yhfT* fungerte bedre ved høyere temperaturer. Dette skyldes at høyere temperaturer krever mer spesifikke bindinger. *yhfT* var den begrensende faktoren og krevde høyere temperatur enn 60 °C. Dermed var det ikke mulig å velge lik hybridiserings- og polymeriseringstemperatur som PCR-programmet for MRSA. Det var fremdeles ønskelig å velge en temperatur så nært 60 °C som mulig. Temperaturen ble derfor satt til 62 °C. Det vil grunnet VeriFlex-teknologien være mulig å lage et qPCR-program som kan analysere både MRSA og meticillinresistente *S. argenteus* samtidig. Dette gjøres ved å dele platen i to seksjoner, der den ene seksjonen analyseres ved 60 °C og den andre seksjonen analyseres ved 62 °C. Det må benyttes ulik PCR-mix med ønskede målgener i de to seksjonene.

Valideringen av multiplex qPCR-metoden viste at primerne og probene for de ulike målgenene fungerte godt sammen og viste god evne til påvisning av *S. argenteus*. I tillegg var metoden effektiv til å skille meticillinresistente *S. argenteus* fra MRSA.

Det ble identifisert at  $\Delta R_n$  for *yhfT* var lavere enn  $\Delta R_n$  for *lukE* og *mecA* (Figur 3.11). Dette skyldes at fargestoffet til yhfT-proben, VIC, har en lavere intensitet enn de andre fargestoffene, JUN og FAM. Til tross for lavere  $\Delta R_n$ , får målgenet tydelig amplifikasjon og fungerer godt til bruk i multiplex qPCR. Flere primere og prober til stede i reaksjonen ga økt konkurranse om reagenser, noe som førte til økt spesifisitet i bindingen av målgenet *yhfT* med primer yhfT2-F. Dette kommer tydelig fram fra kapillærelektroforese av multiplex qPCR der det ikke er noen binding av *yhfT* til prøver med *S. aureus* (Figur 3.12). Det ble heller ikke observert fortrinnsmessig amplifikasjon av et gen over et annet, et problem som ble beskrevet i en tidligere studie av Vremerä mfl. (Vremerä mfl. 2011).

Analysing med kapillærelektroforese kontrollerer dannelse av primer dimer, sekundærstrukturer eller andre uventede og uønskede bindinger. Dette var viktig å sjekke etter sammenslåing til multiplex for å kontrollere hvordan de ulike primerne og probene interagerer med hverandre. Resultatene viste at primerne og probene fungerte godt sammen, og både amplifikasjonsplott og kapillærelektroforese samsvarte med informasjon om bakteriestammene fra helgenomsekvensering.



## 4.4 Effektivitet og sensitivitet

Referanselaboratoriet for MRSA har satt egne krav til effektivitet for å kunne benytte PCR-metoder diagnostisk og har krav om å ligge innenfor 95-105% effektivitet. For å få flere punkter og dermed en mer troverdig standardkurve, ble det besluttet at kokelysatene skulle analyseres ufortynnet. Denne beslutningen ble tatt på grunnlag av at resultatene fra samtlige DNA-målinger viste at kokelysering ekstraherer en vesentlig lavere mengde DNA enn automatisk ekstraksjon.

Standardkurvene for *lukE* og *yhfT* i singleplex qPCR fikk begge  $R^2 = 0.9992$  og et stigningstall nært 3.33. Som beskrevet innledningsvis tilsvarer et stigningstall på 3.33 en effektivitet på 100%. Standardavvikene sier noe om spredningen mellom alle replikatene ved hver fortytning. Som vist i vedlegg B var standardavvikene lave, noe som indikerer liten spredning i datamaterialet og god presisjon. Determinasjonskoeffisienten som ble tilnærmet lik 1.0, indikerer god lineær sammenheng mellom alle punktene på standardkurvene. Dermed kunne stigningstallene brukes i beregning av effektivitet med høy sannsynlighet for et korrekt resultat. Resultatene av effektivitetsberegningene for singleplex i Tabell 3.3 viste at effektiviteten for *lukE* og *yhfT* lå innenfor 95-105%. Dette gjaldt både for kokelysat og EZ1-eluat og tilsier dermed god effektivitet. Basert på dette ble det vurdert at singleplex-metodene var effektive nok til å kunne slås sammen til en multiplex-metode.

Etter sammenslåing til multiplex qPCR var det ønskelig å vurdere om effektiviteten til hvert målgen fortsatt lå innenfor effektivitetskravet. Både *yhfT*, *lukE* og *mecA* hadde en  $R^2$  tilnærmet lik 1.0 og et stigningstall nært 3.33 (Figur 3.15). Dette betyr at målgenene i multiplex-metoden hadde god lineær sammenheng og god effektivitet. Dette understøttes ved at både kokelysat og EZ1-eluat for *lukE* og *mecA* var innenfor kravet for effektivitet. For målgenet *yhfT* var EZ1-eluat innenfor kravet for effektivitet, mens kokelysat hadde en effektivitet på 106%. Kokelysering er en ekstraksjonsmetode der sluttproduktet er mindre rent og har lavere konsentrasjon av DNA enn ved ekstrahering med EZ1. I og med at kokelysat ikke er like rent, kan det være cellerester i lysatet som inhiberer noe av PCR-reaksjonen. Dette er trolig årsaken til at effektiviteten her ble 106 %. De generelle effektivitetskravene er 90-110%, noe som betyr at denne metoden ligger godt innenfor dette kravet (McPherson og Moller 2007). Da effektiviteten havnet like utenfor kravet til referanselaboratoriet, og dette kun gjaldt kokelysatet på det ene målgenet, ble det vurdert at dette ikke ville påvirke den totale effektiviteten til multiplex-metoden<sup>1</sup>.

Den tredje fortytningen hos alle målgenene i multiplex hadde en avvikende verdi (Figur 3.15). Da disse resultatene kun gjaldt for denne ene brønnen, var årsaken sannsynligvis interferens eller dårlig blandet DNA i prøven. Dette har resultert i en høyere konsentrasjon av DNA som dermed ga en lavere Ct-verdi enn de andre replikatene. Standardavvikene for de ulike genene på denne fortytningen ble dermed også høyere. Resterende fortytninger har lave standardavvik, noe som indikerer god presisjon mellom replikatene. På grunnlag av dette ble resultatene

---

<sup>1</sup>Spesialbioingeniør TGR og molekylærbiolog CGÅ, referanselaboratorium for MRSA

fra tredje fortynning ansett som en tilfeldig feil, og ikke en analytisk feil i metoden.

Resultatet av sensitivitetstesting viste tilnærmet likt bakterietall med begge ekstraksjonsmetodene. Dette betyr at metodens sensitivitet er lik ved bruk av både kokelysat og eluat fra EZ1. Beregningene viste det må være 86 bakterieceller til stede i prøven ved bruk av kokelysering, og 47 bakterieceller til stede dersom EZ1-eluering benyttes (Tabell 3.6). Denne multiplex-metoden ble etablert til analysering av bakterieoppvekst. En bakteriekoloni inneholder omtrent én million bakterieceller og dermed er metodens sensitivitet svært god.

## 4.5 Validering av qPCR metode

Normalt sett ville man under etablering av ny qPCR-metode vurdert og validert metodens spesifisitet på flere ulike bakteriearter. I en tidligere studie av Al-Talib mfl. ble spesifisiteten til en multiplex PCR-metode for deteksjon av MRSA vurdert ved å benytte non-stafylokokkale stammer (Al-Talib mfl. 2009). I denne oppgaven ble ikke dette gjort da referanselaboratoriet for MRSA mottar renkulturer fra andre laboratorier i Norge. Mulige feilkilder kan være at prøvene som sendes til referanselaboratoriet ikke er renkultur, eller at det sendes prøver av feil bakterieart. Dette forhindres ved at alle prøver først analyseres på MALDI-TOF for utelukke andre arter. Ettersom MALDI-TOF ikke har god nok spesifisitet vil stammer av *S. argenteus* identifiseres som *S. aureus* med *S. argenteus* som et forslag. "Cut-off" grensen mellom disse to forslagene er ikke god nok til å kunne fastslå spesifikk art, og dermed er det nødvendig å benytte qPCR til korrekt identifisering.

I siste ledd av metodevalideringen ble 40 bakteriestammer med kjente gener analysert på multiplex qPCR. Disse prøvene ble valgt ut basert på de hyppigst forekommende *spa*-typene hos MRSA og genotyper blant *S. argenteus*. Dette sikret at metoden ble testet ut på et bredt utvalg av genotyper. Til tross for at det var et bredt utvalg, kunne det vært hensiktsmessig å teste ut metoden på flere bakteriestammer. Metoden ble heller ikke utprøvd på pasientmateriale. Dette vil si at et diagnostisk laboratorium trolig ikke kan benytte seg av denne metoden, da den ikke er utprøvd på non-stafylokokkale stammer. Resultatene fra analysene samsvarte med tidligere helgenomsekvensering, noe som betyr at denne metoden har en 100% spesifisitet basert på resultatene av de 40 utprøvede bakteriestammene. Dermed gir metoden korrekt amplifikasjon med både kokelysering og automatisk ekstraksjon, har høy spesifisitet rettet mot ulike genotyper av *S. argenteus* og effektivt skiller mellom meticillinresistente *S. argenteus* og MRSA.

## 5. Konklusjon

I dette bachelorprosjektet var hensikten å utvikle en artsspesifikk multiplex real-time PCR-metode for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus*, med mulighet til å benytte kokelysering og EZ1-eluering som ekstraksjonsmetoder. Bakgrunnen for etableringen av denne metoden var å redusere ressurs- og tidsbruk, samt kostnader ved å erstatte helgenomsekvensering med multiplex qPCR. I tillegg skulle metoden erstatte MALDI-TOF, da metoden ikke er tilstrekkelig for artsbestemmelse. Metoden ble vurdert og validert med hensyn til krav om effektivitet, sensitivitet og spesifisitet.

Fra arbeidet med denne oppgaven konkluderes det med at metodeutviklingen av verdens første artsspesifikke multiplex qPCR for deteksjon av meticillinresistente *S. argenteus* er suksessfull. Metoden ga et raskt, spesifikt og korrekt resultat basert på tilstedeværelse av det artsspesifikke genet *yhfT*, virulensgenet *lukE* og genet som koder for meticillinresistens, *mecA*. Metoden skal benyttes til diagnostikk ved referanselaboratoriet for MRSA ved AMM, og skal på denne måten erstatte helgenomsekvensering og MALDI-TOF. Metoden var velfungerende med både kokelysering og automatisk ekstraksjon med EZ1 Advanced XL (Qiagen). Begge ekstraksjonsmetodene lå innenfor effektivitets- og sensitivitetskravene. Denne metoden vil bidra til rask og effektiv identifikasjon, og sørge for god overvåkning av utviklingen av meticillinresistente *S. argenteus*.

# Bibliografi

- Agilent Technologies (2002). «User's Guide for Molecular Assays». I: Edition 02/02. URL: <https://bit.ly/3rzStc1>.
- (2006). «Agilent 2100 Bioanalyzer Expert User's Guide». I: URL: [http://www.ihb.ac.cn/fxcszx/fxcx\\_xgxz/201203/P020120322529861139260.pdf](http://www.ihb.ac.cn/fxcszx/fxcx_xgxz/201203/P020120322529861139260.pdf).
- Baric, Sanja og Josef Dalla-Via (2004). «A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay». I: *Journal of Microbiological Methods* 57.1, s. 135–145. ISSN: 01677012. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.12.009.
- Barzic, Andreea Irina og Silvia Ioan (2015). «Antibacterial Drugs — From Basic Concepts to Complex Therapeutic Mechanisms of Polymer Systems». I: *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. Red. av Varaprasad Bobbarala. IntechOpen. DOI: 10 . 5772 / 60755. URL: <https://doi.org/10.5772/60755>.
- Becker, K. mfl. (2019). «Implications of identifying the recently defined members of the *Staphylococcus aureus* complex *S. argenteus* and *S. schweitzeri*: a position paper of members of the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS)». I: *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 25.9. ISSN: 1469-0691. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.02.028.
- Berild, Dag og Jon Birger Haug (2008). *Fornuftig bruk av antibiotika i sykehus*. URL: <https://tidsskriftet.no/2008/10/tema-antibiotika-og-resistens/fornuftig-bruk-av-antibiotika-i-sykehus>.
- Best, D.H. og K.A. Roberts (2014). «In Vitro Amplification Techniques». I: *Pathobiology of Human Disease*. Elsevier. ISBN: 978-0-12-386457-4. DOI: 10 . 1016 / B978 - 0 - 12 - 386456 - 7 . 07702 - 9. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864567077029>.
- Bogestam, Katja mfl. (feb. 2018). «Introduction of a hydrolysis probe PCR assay for high-throughput screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the ability to include or exclude detection of *Staphylococcus argenteus*». I: *PLOS ONE* 13.2. Red. av Karsten Becker, e0192782. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0192782.
- Boom, R mfl. (1990). «Rapid and simple method for purification of nucleic acids.» I: *Journal of Clinical Microbiology* 28.3, s. 495–503. ISSN: 0095-1137, 1098-660X. DOI: 10.1128/JCM.28.3.495-503.1990.
- Buntaran, Latre mfl. (2013). «*Scmec* type II gene is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Jakarta, Indonesia». I: *BMC Research Notes* 6.1, s. 110. ISSN: 1756-0500. DOI: 10.1186/1756-0500-6-110.
- Butler, John M. (2012). *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Elsevier/Academic Press. ISBN: 978-0-12-374513-2.
- Coleman, W. B. og G. J. Tsongalis (2017). «Chapter 2 - Laboratory Approaches in Molecular Pathology—The Polymerase Chain Reaction». I: *Diagnostic Molecular Pathology*. Red. av William B. Coleman og Gregory J. Tsongalis. Academic Press.

- ISBN: 978-0-12-800886-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-800886-7.00002-9. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008867000029>.
- Eppendorf (2021). *How do I spend less time on PCR experiments and get results faster?* - Eppendorf. URL: <https://www.eppendorf.com/de-de/lab-academy/topics-methods-technology/amplification-pcr/how-do-i-spend-less-time-on-pcr-experiments-and-get-results-faster/>.
- Fetsch, Alexandra (2018). *Staphylococcus aureus*. Academic Press. ISBN: 978-0-12-809671-0.
- FHI (2019). *ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell*. URL: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>.
- (2021). *Nasjonale medisinsk-mikrobiologiske referansefunksjoner*. URL: <https://www.fhi.no/nettpub/veileder-for-mikrobiologiske-laboratorianalyser/referansefunksjoner/nasjonale-medisinsk-mikrobiologiske-referansefunksjoner/>.
- Fishovitz, Jennifer mfl. (2014). «Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Resistance by PBP2a in MRSA». I: *IUBMB Life* 66.8. ISSN: 15216543. DOI: 10.1002/iub.1289.
- Griffiths, Anthony J. F. mfl. (1999). *Modern genetic analysis*. 2. print. Freeman. ISBN: 978-0-7167-3118-4.
- Harvey, David (2016). «Analytical Chemistry 2.1». I: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. ISSN: 1618-2642, 1618-2650. DOI: 10.1007/s00216-010-4316-1. URL: [http://dpuadweb.depauw.edu/harvey\\_web/eTextProject/version\\_2.1.html](http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.1.html).
- Haugen, Inger Johanne (2020). «Konvensjonell PCR, Real-time PCR, prinsipp». I: Higgins, Judy mfl. (mai 2006). «Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes». I: *FEMS Microbiology Letters* 258.2, s. 290–296. ISSN: 03781097, 15746968. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00229.x.
- Kaden, René mfl. (2018). «Which methods are appropriate for the detection of *Staphylococcus argenteus* and is it worthwhile to distinguish *S. argenteus* from *S. aureus*?» I: *Infection and Drug Resistance* Volume 11. ISSN: 1178-6973. DOI: 10.2147/IDR.S179390.
- Khosravi, Azar Dokht, Hajar Hoveizavi og Zahra Farshadzadeh (2012). «The prevalence of genes encoding leukocidins in *Staphylococcus aureus* strains resistant and sensitive to methicillin isolated from burn patients in Taleghani hospital, Ahvaz, Iran». I: *Burns* 38.2, s. 247–251. ISSN: 03054179. DOI: 10.1016/j.burns.2011.08.002.
- Knights, Kathleen M. (2003). «Long-Chain-Fatty-Acid CoA Ligases: The Key to Fatty Acid Activation, Formation of Xenobiotic Acyl-CoA Thioesters and Lipophilic Xenobiotic Conjugates». I: *Immunology, Endocrine Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, s. 235–244. ISBN: 1875-6115.
- Lakhundi, Sahreena og Kunyan Zhang (2018). «Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology». I: *Clinical Microbiology Reviews* 31.4, e00020–18, /cmr/31/4/e00020–18.atom. ISSN: 0893-8512, 1098-6618. DOI: 10.1128/CMR.00020-18.

- Leegaard, Truls (2002). «Antibiotikaresistens i Norge». I: *Tidsskriftet - Den Norske Legeforening* 23. ISSN: 122: 2297. URL: <https://tidsskriftet.no/2002/09/doktoravhandling/antibiotikaresistens-i-norge>.
- Lorenz, Todd C. (2012). «Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies». I: *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 63, e3998. ISSN: 1940-087X. DOI: 10.3791/3998.
- Majiduddin, Fahd K., Isabel C. Materon og Timothy G. Palzkill (2002). «Molecular analysis of beta-lactamase structure and function». I: *International Journal of Medical Microbiology* 292.2. ISSN: 14384221. DOI: 10.1078/1438-4221-00198.
- Markoulatos, P., N. Siafakas og M. Moncany (2002). «Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach». I: *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16.1, s. 47–51. ISSN: 0887-8013, 1098-2825. DOI: 10.1002/jcla.2058.
- McPherson, Michael J og Simon Geir Moller (2007). *PCR, Second Edition*. Taylor Francis Group. ISBN: 978-0-203-00267-4. URL: <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4634416>.
- Morinaga, Naoko, Yuriko Kaihou og Masatoshi Noda (jan. 2003). «Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD with Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxin Family». I: *Microbiology and Immunology* 47.1, s. 81–90. ISSN: 03855600. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb02789.x.
- Murray, Patrick R. (2018). *Basic medical microbiology*. Elsevier. ISBN: 978-0-323-47676-8.
- Parker, Nina mfl. (2019). *Allied Health Microbiology*. Oregon State University. URL: <https://open.oregonstate.education/microbiology/>.
- PREMIER-Biosoft (2021). *PCR Primer Design Guidelines*. URL: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html).
- Schaechter, Moselio (2009). *Desk encyclopædia of microbiology*. 2. ed. Elsevier/AP. ISBN: 978-0-12-374980-2.
- Schøyen, Rolf (2004). *Mikroorganismer og sykdom: lærebok i mikrobiologi og infeksjonssykdommer for helsepersonell*. Gyldendal akademisk. ISBN: 978-82-05-28059-5.
- Simonsen, Gunnar Skov (2009). «Overvåking og forekomst av antibiotikaresistens i Norge». I: *Tidsskriftet - Den Norske Legeforening* 7. DOI: 10 . 4045. URL: <https://tidsskriftet.no/2009/03/oversiktsartikkel/overvaking-og-forekomst-av-antibiotikaresistens-i-norge>.
- Skoog, Douglas A. (2012). *Fundamentals of analytical chemistry*. 9th Ed. Cengage - Brooks/Cole. ISBN: 978-0-495-55828-6.
- Spaan, Andrés N., Jos A. G. van Strijp og Victor J. Torres (jul. 2017). «Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors». I: *Nature Reviews Microbiology* 15.7, s. 435–447. ISSN: 1740-1526, 1740-1534. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.27.
- St.Olavs (2019). *Årsrapport for MRSA referanselaboratorium 2019*. St. Olavs Hospital.
- (2020). *Nasjonalt referanselaboratorium MRSA*. URL: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/nasjonalt-referanselaboratorium-mrsa>.
- Staroscik, Andrew (2004). *dsDNA copy number calculator*. URL: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

- Steenbergen, Judith N. mfl. (2005). «Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections». I: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55.3. ISSN: 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkh546.
- Al-Talib, Hassanain mfl. (2009). «A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin». I: *BMC Microbiology* 9.1. ISSN: 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-9-113. URL: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-113>.
- Thaipadungpanit, Janjira mfl. (2015). «Clinical and Molecular Epidemiology of *Staphylococcus argenteus* Infections in Thailand». I: *Journal of Clinical Microbiology* 53. Red. av S. S. Richter. ISSN: 0095-1137, 1098-660X. DOI: 10.1128/JCM.03049-14.
- ThermoFischer (2015). «QuantStudio™ Design and Analysis Software (USER GUIDE)». I: Publication numer: MAN0010409. URL: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010409\\_QuantStudio\\_CLA\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010409_QuantStudio_CLA_UG.pdf).
- (2016). «Real-time PCR: understanding Ct». I: Application Note. URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>.
- ThermoFischerScientific (2021). *TaqMan MGB Probe*. URL: <https://bit.ly/3lYZ7Ye>.
- ThermoFischerScientific (2021). *Poor PCR Efficiency*. URL: <https://bit.ly/3dvJrYL>.
- Tong, Steven Y. C. mfl. (2015). «Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov.» I: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65.Pt<sub>1</sub>. ISSN: 1466-5026, 1466-5034. DOI: 10.1099/ij.s.0.062752-0.
- Tunnsjø, Hege Smith mfl. (2018). «Challenges in the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus argenteus* by routine diagnostics». I: *APMIS* 126.6, s. 533–537. ISSN: 09034641. DOI: 10.1111/apm.12843.
- UniProt (2021). *Putative long chain fatty acid-CoA ligase *VraA**. Accession number: Q7A769. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7A769>.
- Vremeră, Teodora mfl. (2011). «Optimization of triplex real time PCR for detecting *Staphylococcus aureus* *mecA*, *pvl* and *nuc* genes». I: *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology* 70.2, s. 69–73. ISSN: 1222-3891.
- Walsh, Christopher (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*. ASM Press. ISBN: 9781555812546.
- Walsh, Christopher og Timothy A. Wencewicz (2016). *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*. ASM Press. ISBN: 978-1-55581-930-9.
- WHO (2020). *Antibiotic resistance*. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- (u.d). *Antimicrobial resistance*. URL: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>.
- Wielders, C. L. C. mfl. (2002). «*mecA* Gene Is Widely Disseminated in *Staphylococcus aureus* Population». I: *Journal of Clinical Microbiology* 40.11. ISSN: 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.40.11.3970-3975.2002.
- Zhang, Dao-Feng mfl. (2016). «Identification of *Staphylococcus argenteus* in Eastern China based on a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene». I: *Future Microbiology* 11.9, s. 1113–1121. ISSN: 1746-0913, 1746-0921. DOI: 10.2217/fmb-2016-0017.

## Vedlegg

### A Vedlegg 1: Gjennomsnittlige Ct-verdier ved utprøving av hybridiserings- og polymeriseringstemperaturer

**Tabell 1:** Gjennomsnittlig Ct-verdi ved hver temperatur for CCUG 70917T (*S. arg*) kokelysat og eluat, analysert på målgenet *yhfT*

CCUG 70917T <i>S. argenteus</i>		
Temperatur (°C)	Ct middel EZ1	Ct middel kokelysat
54	14.875	21.934
56	15.485	20.360
58	15.083	22.104
60	15.191	19.806
62	14.866	21.898
64	15.500	22.284

**Tabell 2:** Gjennomsnittlig Ct-verdi for hver temperatur for CCUG 70917T (*S. arg*) kokelysat og eluat, analysert på målgenet *yhfT*

CCUG 70917T <i>S. argenteus</i>		
Temperatur (°C)	Ct middel EZ1	Ct middel kokelysat
60	15.037	26.873
62	14.462	27.069
64	14.792	27.426
66	15.022	27.277
68	15.032	27.984
70	15.177	31.279

**Tabell 3:** Gjennomsnittlig Ct-verdi ved hver temperatur for cc 2250 (*S. arg*) kokelysat og eluat, analysert på målgenet *lukE*

CC 2250 <i>S. argenteus</i>		
Temperatur (°C)	Ct middel EZ1	Ct middel kokelysat
54	15.092	22.589
56	14.802	22.433
58	14.656	22.226
60	14.840	22.331
62	14.435	20.832
64	15.099	22.558



**Tabell 4:** Gjennomsnittlig Ct-verdi ved hver temperatur for CCUG 70917T (*S. arg*) kokelysat og eluat, analysert på målgen *yhfT* med primer yhfT2-F

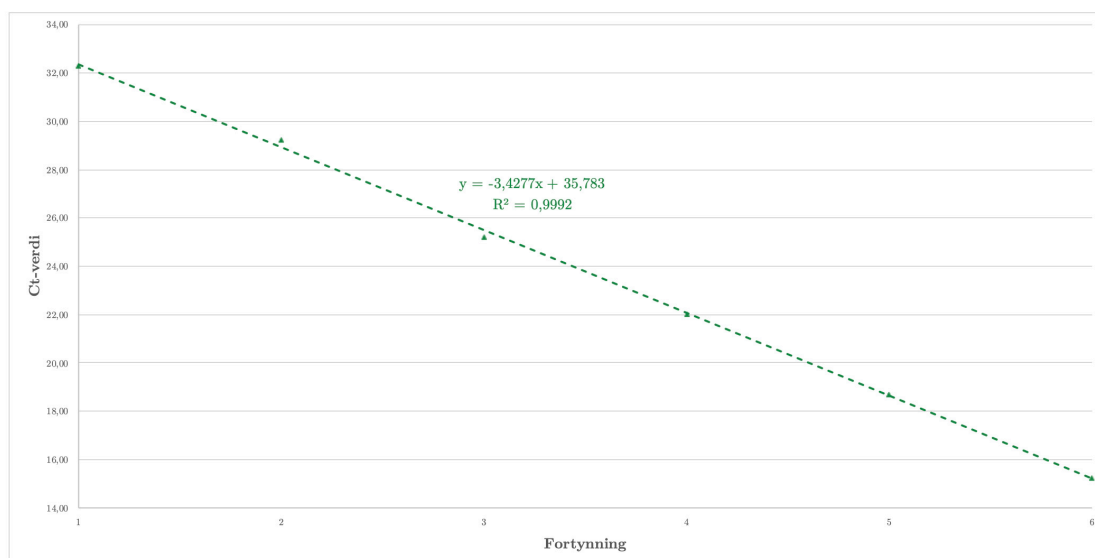
CCUG 70917T <i>S. argenteus</i>		
Temperatur (°C)	Ct middel EZ1	Ct middel kokelysat
54	14.248	30.185
56	14.040	29.621
58	13.662	30.233
60	13.664	29.158
62	14.342	29.807
64	13.843	29.654

## B Vedlegg 2: Beregninger Excel

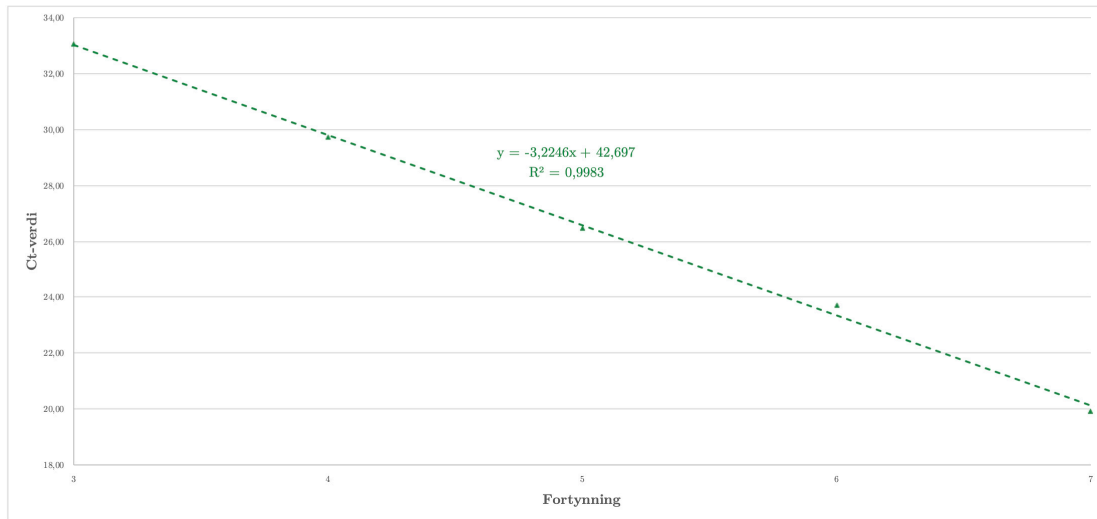
Effektivitet- og sensitivitetsberegninger gjort i Excel (Microsoft) på målgenene *yhfT* (grønn), *lukE* (blå) og *mecA* (rød). Replikater markert i rødt ble vurdert til å være unøyaktig og ble ekskludert i beregning av middelerverdi og standardavvik.

### Singleplex

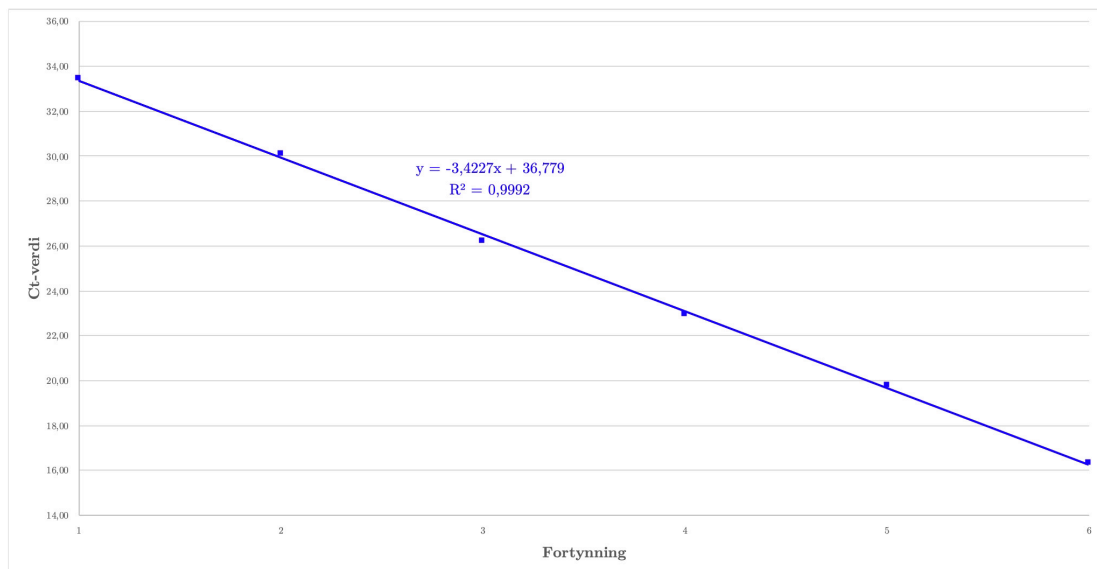
Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, EZ1	7,12E+00	0,1	1,00E-01	6	15,067	15,444	15,244	15,25	0,19	95,77 %	4710000
	7,12E-01	0,01	1,00E-02	5	18,699	18,566	18,852	18,71	0,14		471000
	7,12E-02	0,001	1,00E-03	4	22,054	22,081	21,939	22,02	0,08		47100
	7,12E-03	0,0001	1,00E-04	3	25,310	25,143	25,209	25,22	0,08		4710
	7,12E-04	0,00001	1,00E-05	2	29,160	29,085	29,390	29,21	0,16		471
	7,12E-05	0,000001	1,00E-06	1	32,252	32,435	32,221	32,30	0,12		47,1



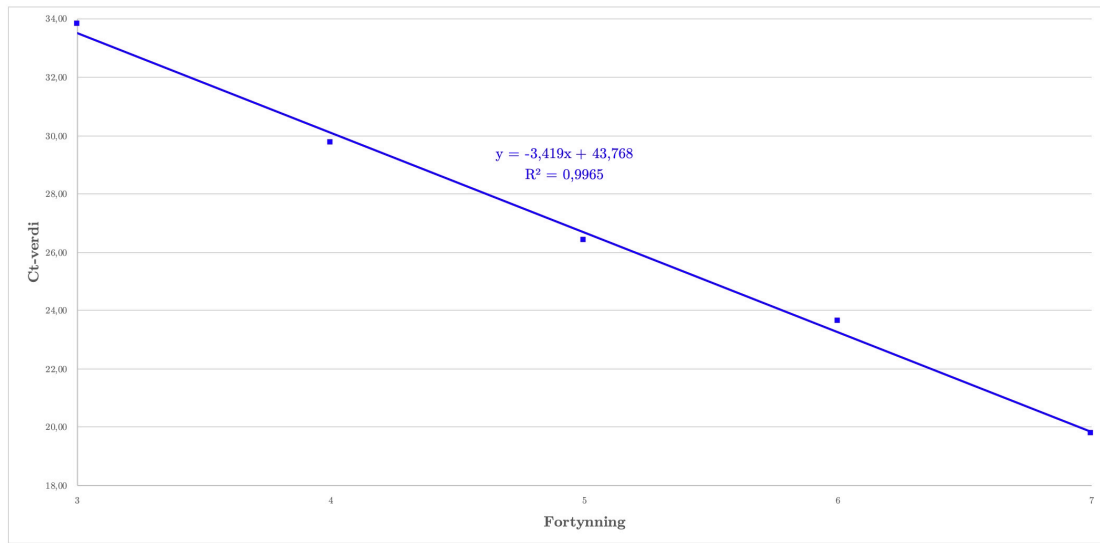
Stamme	Konsentrasjon (ng/µL)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, kokelysat	1,30E+00	1	1,00E+00	7	20,034	20,007	19,738	19,93	0,16	104,23 %	860000
	1,30E-01	0,1	1,00E-01	6	23,653	23,687	23,765	23,70	0,06		86000
	1,30E-02	0,01	1,00E-02	5	26,311	26,465	26,657	26,48	0,17		8600
	1,30E-03	0,001	1,00E-03	4	29,661	29,719	29,796	29,73	0,07		860
	1,30E-04	0,0001	1,00E-04	3	33,447	32,913	32,753	33,04	0,36		86
	1,30E-05	0,00001	1,00E-05	2	N/A	N/A	N/A	-	-		-
	1,30E-06	0,000001	1,00E-06	1	N/A	N/A	N/A	-	-		-



Stamme	Konsentrasjon (ng/µL)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, EZ1	7,12E+00	0,1	1,00E-01	6	16,463	16,312	16,261	16,35	0,11	95,96 %	4710000
	7,12E-01	0,01	1,00E-02	5	19,664	19,726	19,892	19,76	0,12		471000
	7,12E-02	0,001	1,00E-03	4	23,203	22,852	22,799	22,95	0,22		47100
	7,12E-03	0,0001	1,00E-04	3	26,329	26,06	26,194	26,19	0,13		4710
	7,12E-04	0,00001	1,00E-05	2	30,094	29,994	30,171	30,09	0,09		471
	7,12E-05	0,000001	1,00E-06	1	32,850	33,351	34,179	33,46	0,67		47,1

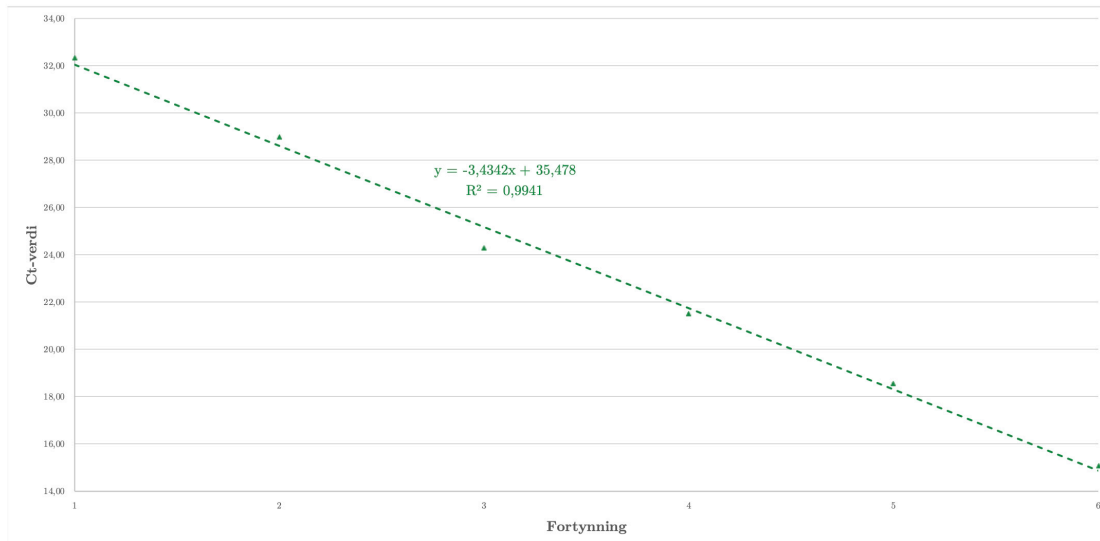


Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, kokelysat	1,30E+00	1	1,00E+00	7	19,743	19,745	19,822	19,77	0,05	96,10 %	860000
	1,30E-01	0,1	1,00E-01	6	23,575	23,538	23,768	23,63	0,12		86000
	1,30E-02	0,01	1,00E-02	5	26,515	26,249	26,484	26,42	0,15		8600
	1,30E-03	0,001	1,00E-03	4	29,739	29,566	29,948	29,75	0,19		860
	1,30E-04	0,0001	1,00E-04	3	34,025	33,863	33,521	33,80	0,26		86
	1,30E-05	0,00001	1,00E-05	2	N/A	N/A	N/A	-	-		-
	1,30E-06	0,000001	1,00E-06	1	N/A	N/A	N/A	-	-		-

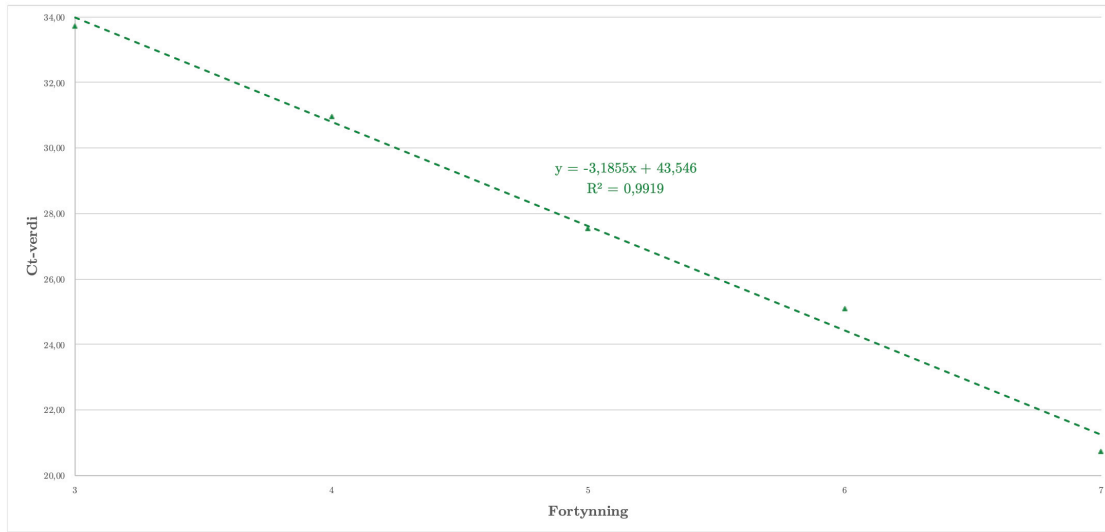


## Multiplex

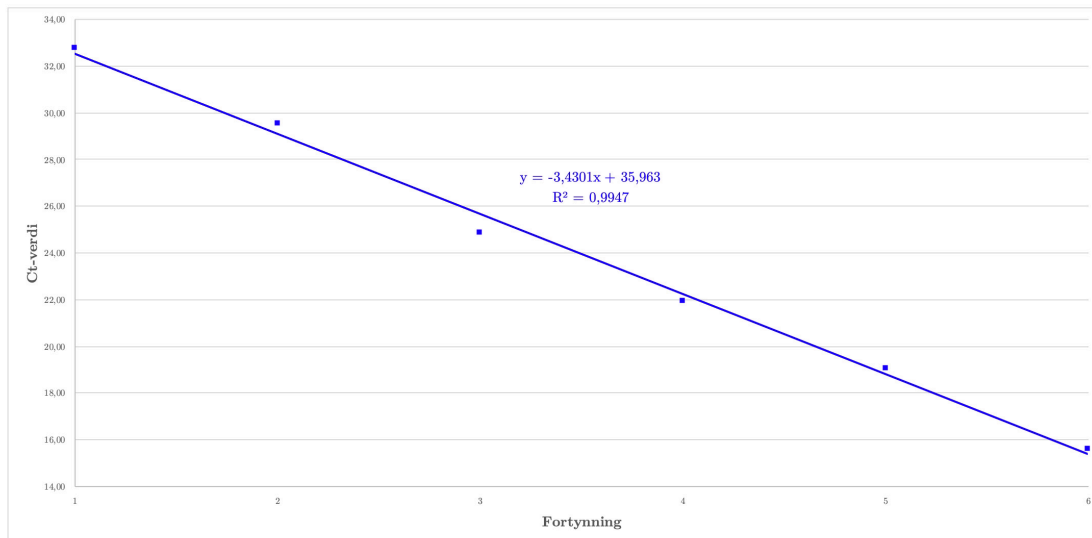
Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, EZ1	7,12E+00	0,1	1,00E-01	6	14,999	15,086	15,195	15,09	0,10	95,52 %	4710000
	7,12E-01	0,01	1,00E-02	5	18,508	19,860	18,623	18,57	0,08		471000
	7,12E-02	0,001	1,00E-03	4	21,583	21,466	21,457	21,50	0,07		47100
	7,12E-03	0,0001	1,00E-04	3	22,448	25,209	25,150	24,27	1,58		4710
	7,12E-04	0,00001	1,00E-05	2	29,175	28,988	28,852	29,01	0,16		471
	7,12E-05	0,000001	1,00E-06	1	32,067	32,151	32,728	32,32	0,36		47,1



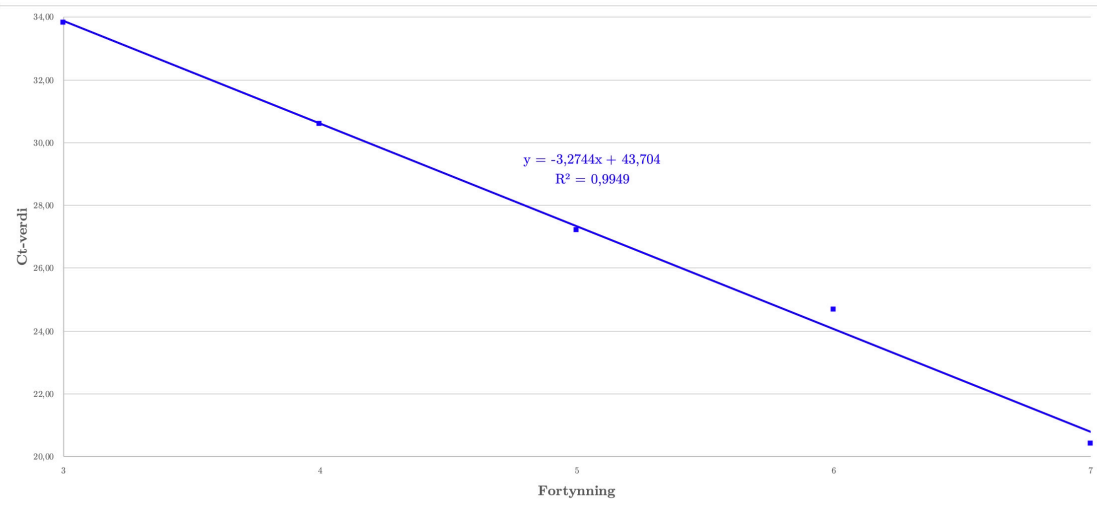
Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, kokelysat	1,30E+00	1	1,00E+00	7	20,514	20,753	20,930	20,73	0,21	106,03 %	860000
	1,30E-01	0,1	1,00E-01	6	25,089	24,932	25,307	25,11	0,19		86000
	1,30E-02	0,01	1,00E-02	5	27,421	27,724	27,492	27,55	0,16		8600
	1,30E-03	0,001	1,00E-03	4	30,901	30,973	31,055	30,98	0,08		860
	1,30E-04	0,0001	1,00E-04	3	33,630	33,702	33,847	33,73	0,11		86
	1,30E-05	0,00001	1,00E-05	2	N/A	N/A	N/A	-	-		-
	1,30E-06	0,000001	1,00E-06	1	N/A	N/A	N/A	-	-		-



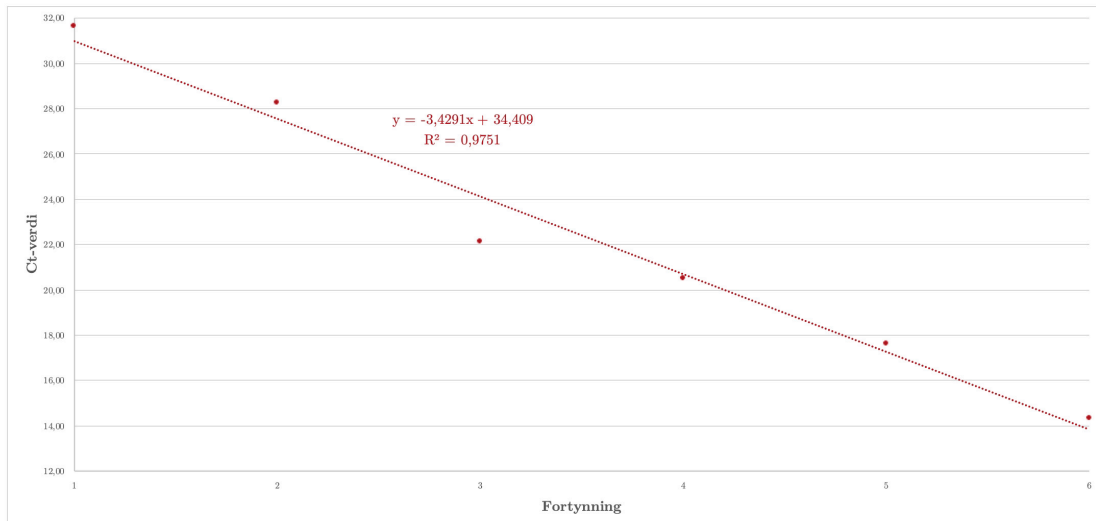
Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, EZ1	7,12E+00	0,1	1,00E-01	6	15,541	15,518	15,781	15,61	0,15	95,68 %	4710000
	7,12E-01	0,01	1,00E-02	5	19,063	17,873	19,067	19,07	0,00		471000
	7,12E-02	0,001	1,00E-03	4	22,032	21,472	22,266	21,92	0,41		47100
	7,12E-03	0,0001	1,00E-04	3	23,165	25,777	25,643	24,86	1,47		4710
	7,12E-04	0,00001	1,00E-05	2	29,534	29,533	29,470	29,51	0,04		471
	7,12E-05	0,000001	1,00E-06	1	32,678	33,016	32,610	32,77	0,22		47,1



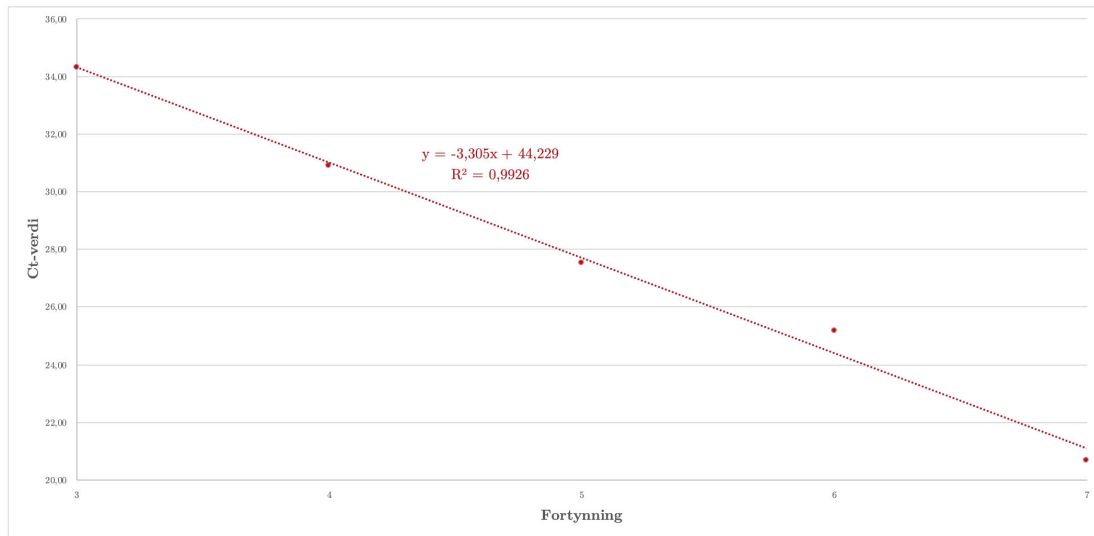
Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, kokelysat		1	1,00E+00	7	20,197	20,434	20,575	20,40	0,19	102,02 %	860000
	8,50E-02	0,1	1,00E-01	6	24,702	24,579	24,732	24,67	0,08		86000
	8,50E-03	0,01	1,00E-02	5	27,076	27,327	27,168	27,19	0,13		8600
	8,50E-04	0,001	1,00E-03	4	30,589	30,432	30,706	30,58	0,14		860
	8,50E-05	0,0001	1,00E-04	3	33,739	33,559	34,167	33,82	0,31		86
	8,50E-06	0,00001	1,00E-05	2	N/A	N/A	N/A	-	-		-
	8,50E-07	0,000001	1,00E-06	1	N/A	N/A	N/A	-	-		-



Stamme	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ L)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, EZ1	7,12E+00	0,1	1,00E-01	6	14,161	14,331	14,452	14,31	0,15	95,71 %	4710000
	7,12E-01	0,01	1,00E-02	5	17,630	12,821	17,628	17,63	0,00		471000
	7,12E-02	0,001	1,00E-03	4	20,594	20,276	20,620	20,50	0,19		47100
	7,12E-03	0,0001	1,00E-04	3	17,598	24,428	24,375	22,13	3,93		4710
	7,12E-04	0,00001	1,00E-05	2	28,340	28,238	28,191	28,26	0,08		471
	7,12E-05	0,000001	1,00E-06	1	31,887	31,365	31,591	31,61	0,26		47,1



Stamme	Konsentrasjon (ng/µL)	Fortynning desimal	Fortynning Eksp	Fortynning	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Gj.snitt	St.avvik	Effektivitet	Antall kopier
S. argenteus CC 2250, kokelysat	1,30E+00	1	1,00E+00	7	20,443	20,685	20,850	20,66	0,20	100,71 %	860000
	1,30E-01	0,1	1,00E-01	6	25,095	25,053	25,307	25,15	0,14		86000
	1,30E-02	0,01	1,00E-02	5	27,391	27,682	27,433	27,50	0,16		8600
	1,30E-03	0,001	1,00E-03	4	30,869	30,791	31,016	30,89	0,11		860
	1,30E-04	0,0001	1,00E-04	3	34,220	33,763	34,960	34,31	0,60		86
	1,30E-05	0,00001	1,00E-05	2	N/A	N/A	N/A	-	-		-
	1,30E-06	0,000001	1,00E-06	1	N/A	N/A	N/A	-	-		-



## C Vedlegg 3: Bakteriestammer til validering

EZ1-eluat				Kokelysat					
Bakterie	Isolat	Resultat fra multiplex PCR	Ct-verdi	Bakterie	Isolat	Resultat fra multiplex PCR	Ct-verdi		
<i>S. argenteus</i>	t15218	<i>mecA</i>	Positiv	15.25	<i>S. argenteus</i>	t19056	<i>mecA</i>	Positiv	17.82
		<i>lukE</i>	Negativ	-		<i>lukE</i>	Positiv	18.27	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.72		<i>yhjT</i>	Positiv	18.13	
	t12782	<i>mecA</i>	Positiv	15.05		t17057	<i>mecA</i>	Positiv	19.96
		<i>lukE</i>	Negativ	-		<i>lukE</i>	Positiv	20.25	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.48		<i>yhjT</i>	Positiv	20.15	
	t15221	<i>mecA</i>	Positiv	14.85		t17987	<i>mecA</i>	Positiv	20.14
		<i>lukE</i>	Negativ	-		<i>lukE</i>	Positiv	20.23	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.161		<i>yhjT</i>	Positiv	20.13	
	t6675	<i>mecA</i>	Positiv	14.82		t6947	<i>mecA</i>	Positiv	19.05
		<i>lukE</i>	Positiv	14.98		<i>lukE</i>	Positiv	19.37	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.09		<i>yhjT</i>	Positiv	18.95	
	t16808	<i>mecA</i>	Positiv	15.02		t10900	<i>mecA</i>	Positiv	21.57
		<i>lukE</i>	Positiv	14.96		<i>lukE</i>	Positiv	21.92	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.34		<i>yhjT</i>	Positiv	21.75	
	t16149	<i>mecA</i>	Positiv	15.02		t16376	<i>mecA</i>	Positiv	16.14
		<i>lukE</i>	Positiv	15.02		<i>lukE</i>	Positiv	16.63	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.28		<i>yhjT</i>	Positiv	16.45	
	t14475	<i>mecA</i>	Positiv	14.98		t7960	<i>mecA</i>	Positiv	16.79
		<i>lukE</i>	Positiv	14.94		<i>lukE</i>	Positiv	17.21	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.31		<i>yhjT</i>	Positiv	17.18	
	t12708	<i>mecA</i>	Positiv	15.28		t15443	<i>mecA</i>	Positiv	18.12
		<i>lukE</i>	Positiv	15.16		<i>lukE</i>	Negativ	-	
		<i>yhjT</i>	Positiv	15.43		<i>yhjT</i>	Positiv	18.32	
t16726	<i>mecA</i>	Positiv	14.89	t9791	<i>mecA</i>	Positiv	19.60		
	<i>lukE</i>	Positiv	14.92	<i>lukE</i>	Negativ	-			
	<i>yhjT</i>	Positiv	15.07	<i>yhjT</i>	Positiv	19.86			
t6188	<i>mecA</i>	Positiv	15.17	t5078	<i>mecA</i>	Positiv	16.03		
	<i>lukE</i>	Positiv	14.92	<i>lukE</i>	Positiv	16.73			
	<i>yhjT</i>	Positiv	15.57	<i>yhjT</i>	Positiv	16.82			
<i>S. aureus</i>	t019	<i>mecA</i>	Positiv	16.75	t002	<i>mecA</i>	Positiv	15.48	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t105	<i>mecA</i>	Positiv	15.61	t127	<i>mecA</i>	Positiv	14.30	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t1476	<i>mecA</i>	Positiv	16.51	t008	<i>mecA</i>	Positiv	19.43	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t690	<i>mecA</i>	Positiv	16.07	t304	<i>mecA</i>	Positiv	22.48	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t355	<i>mecA</i>	Positiv	16.89	t223	<i>mecA</i>	Positiv	17.03	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t148	<i>mecA</i>	Positiv	16.47	t034	<i>mecA</i>	Positiv	21.51	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t024	<i>mecA</i>	Positiv	15.82	t437	<i>mecA</i>	Positiv	22.60	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
	t044	<i>mecA</i>	Positiv	16.36	t021	<i>mecA</i>	Positiv	17.78	
		<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-		
		<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-		
t688	<i>mecA</i>	Positiv	16.51	t005	<i>mecA</i>	Positiv	16.38		
	<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-			
	<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-			
t657	<i>mecA</i>	Positiv	13.38	t701	<i>mecA</i>	Positiv	20.14		
	<i>lukE</i>	Negativ	-	<i>lukE</i>	Negativ	-			
	<i>yhjT</i>	Negativ	-	<i>yhjT</i>	Negativ	-			



# D Vedlegg 4: Prosedyre MRSA

Dokument «MRSA referanselab - Real-time tripleks spa, mecA og PVL», ID 39169 - EQS

## MRSA referanselab - Real-time tripleks spa, mecA og PVL

Forfatter: Allin Falkmo Hansen  
Godkjent av: Hege Enger

Gyldig fra: 22.05.2019  
Revisjonsfrist: 21.05.2021

Revisjon: 1.0  
ID: 39169

### Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre korrekt oppsett av real-time PCR for påvisning av *spa*, *mecA* og Panton - Valentine Leukocidine (*PVL*)-gen hos MRSA referansestammer.

### Ansvar

Prosedyren gjelder bioingeniører og andre som utfører real-time tripleks *spa*, *mecA* og *PVL* PCR ved MRSA referanselaboratorium.

### Arbeidsbeskrivelse

Undersøkelseskoder: SPAR, MECR, PVLR

Instrument: Applied Biosystems® QuantStudio® 5 Real-Time PCR (reg nr. 101024, rom nr. 232.05.031).

Utstyr: MicroAmp Optical brett (cat. no. N8010560)/8-tube strips (cat. no. 4316567) og optical cap strip (cat. no. 4323032). Bestilles gjennom SAP (fritekstanmodning). Finnes i skuff ved PCR-skap og hylle på rom nr. 232.05.029.

1,5 ml eppendorfrør (lagervare på rom nr.: 232.03.013).

#### Reagenser:

Perfecta Custom Multiplex qPCR SuperMix, UNG fra Quanta Biosciences. Leveres av VWR, bestilles gjennom SAP (SAP nr. 4012566, «PCR Mastermix QPCR multiplex 200R»). Kan lagres 1 år ved ca -20 °C. Finnes i fryser 05.029.01, rom nr. 232.05.029. Etter tining kan mastermixen lagres ved 2-8 °C opp til 6 måneder i kjøleskap 05.029.01, rom nr. 232.05.029. Skriv dato på røret ved tining. Gjentatte "frysetininger" er ikke anbefalt.

Molecular grade water (MGW, cat. 786-292, SAP nr. 4012569, bestilles gjennom SAP) finnes ferdig fordelt i rent kjøleskap (05.020A.10) på rom nr. 232.05.020A. MGW-flasker finnes på hylle på rom nr. 232.05.029

Bruksfortynning av primere: 12µM, fortynnes i MGW. Finnes i fryser 05.029.01 på rom nr. 232.05.029.

- PVL-F: 5'-TTACACAGTAAATATGAAGTGAAGTGA-3' (fra TIB Molbiol).
- PVL-R: 5'-AGCAAAAGCAATGCAATTGATG-3' (fra TIB Molbiol).
- MECA-F: 5'-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT-3' (fra TIB Molbiol).
- MECA-R: 5'-CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC-3' (fra TIB Molbiol).
- SPA-F: 5'-CAGCAAACCATGCAGATGCTA-3' (fra TIB Molbiol).
- SPA-R: 5'-CGCTAATGATAATCCACCAAATACA-3' (fra TIB Molbiol).

Bruksfortynning av TaqMan prober: 8µM, fortynnes i MGW. Finnes i fryser 05.029.01 på rom nr. 232.05.029.

- PVL-probe: 5'- AAGTGAAAGGACATAATTG-3', 5' FAM, 3' MGB-NFQ (fra Thermo Fisher Scientific).
- MECA-probe: 5'-TTCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCA-3', 5'JUN, 3' QSY (fra Thermo Fisher Scientific).
- SPA-probe: 5'-TCAAGCATTACCAGAAAC-3', 5' VIC, 3' MGB-NFQ (fra Thermo Fisher Scientific).

Stock-rør og bruksfortynninger av primere og prober lagres ved ca -20 °C i 05.029.04, rom nr.: 232.05.029. Unngå at proben(e) blir eksponert for mye lys. Gi beskjed til fagansvarlig bioingeniør eller spesialbioingeniør ved MRSA referanselaboratorium når det må bestilles nye primere og prober.

#### Kvalitetskontroller:

- Intern kvalitetskontroll er ekstrahert DNA fra MRSA CCUG 60578. Negativ kontroll er MGW.
- Ekstern kvalitetskontroll fra QCMD.

#### Tillaging av reaksjons-mix for tripleksreaksjon (per prøve):

10µl Perfecta Custom Multiplex qPCR SuperMix, UNG  
0,5µl *spa* F 12µM

**KOPI**  
Oppdateres ikke

Sign. AS Dato: 5/5-21

0,5µl spa R 12µM  
0,5µl spa probe 8µM  
0,5µl mecA F 12µM  
0,5µl mecA R 12µM  
0,5µl mecA probe 8µM  
0,5µl PVL F 12µM  
0,5µl PVL R 12µM  
0,5µl PVL probe 8µM  
3,5µl MGW  
Totalt: 18µl

Bland reaksjonsmix for tripleks spa, mecA og PVL i 1,5ml eppendorfrør for antallet prøver i oppsettet. Ved tillaging av reaksjonsmix bør det beregnes reaksjonsmix for antallet prøver i oppsettet pluss noen ekstra for å sikre nok reaksjonsmix til alle prøvene (for eksempel 2-3 ekstra prøver per 20 prøver).

#### Tillaging av intern kvalitetskontroll

Ekstrahert DNA fra stamme CCUG 60578 (ekstrahert på EZ1 etter EQS ID 38423) fortynnes i EB-buffer til bruksfortynning med CT-verdi 25 +/-2 og kontrolleres før bruk. Mengde på ca 8µl fordeles i små eppendorf-rør merket MRSA pos kontroll. Dato for tillaging påføres eske. Oppbevares i fryser nr. 05.020A.5, rom nr.: 232.05.020A.

Bruk skjema "kontroll-produksjon (skjema)" under relatert (EQS ID 20215). Settes i perm merket "Intern kvalitetskontroll MRSA" på MRSA-kontoret rom nr.: 232.03.070.

#### Fremgangsmåte

##### 1) Oppsett av PCR

- Lag arbeidsliste for PCR oppsett etter mal som finnes under «Relatert» og i mappe for «MRSA» under «Rutine-analyser». Skriv ut arbeidsliste for å ta med på lab. Legg prøvenumre også inn i mal for «Plate setup»: Legg først inn prøve-ID i «Plate setup mal». Lagre lista i .txt-format på Q:, i mappe «Arbeidslister» under mappe for MRSA.
- Reaksjonsmix for tripleks reaksjon tillages som beskrevet over og 18µl reaksjonsmix fordeles i hver brønn i PCR-brett på mix-rom 232.05.029. Benytte gjerne automatpipette for fordeling av reaksjons-mix. Sett på lokk på PCR brettet. NB! Husk å bruke flate optiske lokk. Runde lokk kan ødelegge PCR-instrumentet.
- PCR brett tas med til rom nr.: 232.05.020A for tilsetning av prøvemateriale. Tilsett 2µl ekstrahert DNA etter arbeidsliste. Bruk gjerne multi-automatpipette med for eksempel med programmet «2 µl» for tilsetning av prøvemateriale for å unngå feilpipetteringer.
- Tilsett 2µl negativ kontroll (MGW) og 2µl intern kvalitetskontroll (bruksfortynning) til separate brønner. Ev. rest av positiv kontroll kastes etter bruk.
- Sett på flate lokk til PCR-brettet.
- Sentrifuger kort ned PCR-brett (for eksempel sentrifuge reg.nr 41674, rom nr. 232.05.031).

##### 2) Ved PCR-instrumentet

- Dersom PC og/eller real-time instrumentet QuantStudio 5 er slått av, slås dette på. Slå på PC før QuantStudio 5 slås på. Logg inn på PC med bruker og passord som oppgitt ved instrumentet.
- Åpne programmet «QuantStudio Design & Analysis Software».
- Klikk «Open...» under «Open existing protocol». Finn PCR-programmet «MRSA.edt» i mappe for MRSA på Q:
- I første fane, «Properties», som kommer opp legg inn «MRSA» + dagens dato under «Name».
- Klikk «Next» to ganger til fanen «Plate» kommer frem. Velg da «File» -->«Import Plate Setup».
- Finn korrekt fil, klikk «Select» og deretter «Apply». Dersom plateoppsettet er korrekt lastet opp, gir programvaren meldingen «Imported Successfully».
- Legg inn negativ og positiv kontroll i plateoppsettet ved å velge korrekt brønnposisjon og skrive inn «negativ/positiv» kontroll under «Name».
- Marker deretter alle brønnene, og under «Passive Reference» velg «None».

- (valgfritt): Fjern alle ubrukte brønner fra PCR-oppsettet ved å markere disse, høyreklikke og trykke «clear».
- Klikk «Next» til «Run»-fanen kommer frem.
- Åpne skuff til PCR-instrumentet ved å trykke på symbol for å åpne/lukke skuff til PCR-instrumentet (øverst til høyre) på skjermen til instrumentet.
- Sett inn PCR-brettet.
- Lukk PCR-instrumentet ved å trykke igjen på symbol for å åpne/lukke skuff.
- Trykk «Start run» på PCen, og lagre kjøringen med navn «MRSA» + dagens dato i mappe for MRSA på Q:
- PCR-programmet tar ca. 1 time.

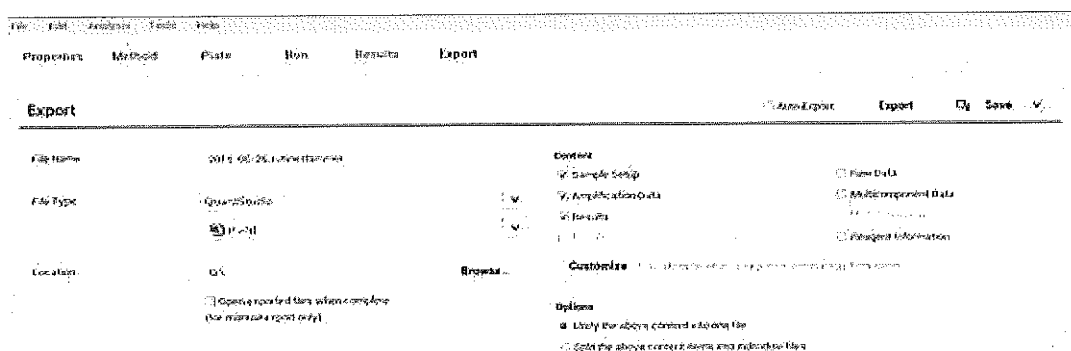
### Etter ferdig analysert PCR

Resultatene fra analyseoppsettet og PCR-kjøring lagres på Q: Dette gjøres under fanen «Export».

Sjekk alle PCR-kurver for å vurdere analyseoppsettet. Vær spesielt oppmerksom på prøver som er mecA og spa-negative, da alle MRSA skal være spa og mecA positive.

PCR-resultater kan registreres på arbeidsliste. PCR-kurver kan vurderes både i «log-view» eller i «linear view» der sistnevnte er vanligst. Instrumentet gjør en automatisk bestemmelse av Ct-terskelverdi (C<sub>t</sub>-threshold) og baselinje, men kan justeres dersom nødvendig. Endring av baselinje gjøres ved å trykke på «hjul»-symbolet ved «analyze». Under «Advanced Settings», velg posisjon for prøve som ønskes manuelt baselinjejustert, og fjern hake for «Use Ct Settings Defined for Target» og «Automatic Baseline». Velg deretter ønsket intervall for estimering av baselinje. Ct-terskelverdi kan endres ved å trykke på symbolet «øye» over amplifikasjonsplottet. Fjern hake som indikerer automatisk bestemt Ct. Trykk på plottet og flytt Ct-terskelverdi til ønsket nivå

Trykk «Save» for å lagre kjøringen på Q:. Dataene fra analyseoppsettet eksporteres i tillegg i .xlsx-format. Velg da «File type» til «.xlsx». Sjekk at det er haket av «Sample Setup», «Amplification Data» og «Results» under «Content» (dette er haket av ved «default», se bilde under). Velg «Location» til serveren Q: og mappe for MRSA. Trykk deretter på «Export» for å overføre dataene.



CT-verdi av intern kvalitetskontroll registreres på skjema i mappe «Intern kvalitetskontroll» på Q: i mappe for MRSA. Intern kvalitetskontroll av samme batch skal ha lik CT-verdi +/- 3. Enkeltstående avvik kan forekomme, men systematisk avvik og trend i avvikende resultater må årsak utredes.

Ferdig kjørt Brett med PCR-produkt kastes i gul sikkerhetsboks på romnr. 232.05.031.

### Vurdering/ besvaring/ opprydding

Dersom intern kvalitetskontroll og negativ kontroll er godkjent, kan resultatene lastes over til Tieto NSML.

Når resultatfila i .xlsx-format er overført til Q:, kan resultatene deretter overføres til Tieto NSML gjennom programmet NONLINE ML som åpnes via startmenyen.

Under «Svarsending fra PCR», klikk på «Send svar til NSML fra valgt PCR». Finn resultatfila på Q:. Velg «Åpne svarfila» for å starte automatisk overføring av svar. Overføringen kan ta litt tid, avhengig av antallet stammer som skal besvares (typisk 5-10 minutter).

MRSA besvares påfølgende måte:

MRSA:

- MEQR: Positiv
- SPAR: Positiv (Legg til «MRSA» under «mikrobe»)
- PVLR: Positiv/negativ

Alle MRSA stammer skal verifiseres som *spa* og *mecA*-positive. Dersom stammer bestemmes som *spa* negativ, skal konvensjonell PCR med alternative primere for *mecA* settes opp. Dersom stammer bestemmes som *mecA* negative, settes det opp resistensbestemmelse for å verifisere resistens mot cefoxitin (jmfør prosedyre for resistensbestemmelse, EQS ID 24027). Konvensjonell PCR for *mecC* (EQS ID 35501) kan også settes opp.

Vurder resultatene sammen med PCR-kurver. Resultatene kan alternativt vurderes ved kontroll av svarrapport. For vurdering av PCR-resultater, åpnes analyseoppsettet i «QuantStudio Design & Analysis Software» og resultater og PCR-kurvene sjekkes for hver prøve.

Verifisering av resultater kan gjøres for hver enkelt prøve, alternativt for alle prøver samlet. Dette gjøres i Tieto NSML ved å velge Avdeling --> Arbeidsliste mikro. Legg deretter inn arbeidslistekode «MRSA» og filtrer for «Foreløpig». Sjekk at prøvene som lastes inn er prøvene som skal verifiseres og godkjenn verifiseringen.

#### Merknader

Metoden kan ikke benyttes for bestemmelse av *PVL* status til *mecC*-stammer, og det anbefales derfor å benytte primere tilhørende konvensjonell tripleks *spa*, *mecA* og *PVL* for bestemmelse av *PVL* status hos disse stammene.

## Innledning

Meticillinresistente *S.aureus* (MRSA) er betegnelsen på stammer av bakterien *S.aureus* (gule stafylokokker) som har utviklet resistens mot betalaktam-antibiotika. MRSA referanselaboratorium mottar alle påviste MRSA i Norge, og konfirmerer dem med tripleks real-time PCR for *spa*, *mecA* og *PVL*.

*spa* - PCR påviser tilstedeværelse av *Staphylococcus protein A (spa)*-genet som koder for protein A hos *S.aureus* som dermed påviser at det er *S. aureus*. Størrelse PCR produkt: 101 bp.

*mecA* - PCR påviser tilstedeværelse av *mecA* genen, som gir resistens mot alle betalaktamantibiotika hos stafylokokker. Størrelse PCR produkt: 155 bp.

PVL - PCR påviser tilstedeværelse av Panton - Valentin Leukocidin (PVL) genet, som er et cytotoxin som enkelte S.aureus stammer produserer. PVL metoden detekterer *luk<sub>PVL</sub>SF*, dvs både «S» og «F» komponentene av PVL. Størrelse PCR produkt: 118 bp.

**Relaterte vedlegg:**

 Arbeidsliste