



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

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

Etablering av real-time PCR for påvisning av *mecC*
hos meticillinresistente *Staphylococcus aureus*
(MRSA)

Establishment of real-time PCR to detect *mecC*
among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
(MRSA)

Av / by

Lena Rosvoll Larsen & Celine Irén Håkonsen Kalmár

Trondheim, 2019

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gjennomført ved nasjonalt referanselaboratorium for MRSA ved avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital, i perioden 11. mars til 20. mai 2019. Bacheloroppgaven i bioingeniørfag, HBIO3001, er den avsluttende delen av bioingeniørutdanningen ved Institutt for bioingeniørfag, Fakultet for naturvitenskap, NTNU Trondheim.

Vi ønsker å takke vår fagansvarlige veileder Ailin Hansen som har hjulpet oss med laboratoriearbeidet og den teoretiske forståelsen rundt dette. I tillegg vil vi rette en takk mot overlege Hege Enger, prosessveileder Heidi Græsmann og bioingeniører ved referanselaboratoriet for MRSA for deres tid og veiledning.

Trondheim, 20. mai, Lena Rosvoll Larsen & Celine Kalmár.

Sammendrag

MRSA er gule stafylokokker, *Staphylococcus aureus*, som har utviklet resistens mot nesten alle β -laktamantibiotika, og skyldes ervervelse av *mecA*- eller *mecC*-genet. Formålet med denne bacheloroppgaven var å etablere en TaqMan real-time PCR-metode for deteksjon av *mecC* hos MRSA. Dette var ønskelig blant annet fordi dagens metode med konvensjonell PCR er tidkrevende. I tillegg påviser ikke den nåværende metoden *mecC*-genet i ekstern kvalitetskontroll fra Quality Control for Molecular Diagnostics.

Etableringen av real-time PCR for påvisning av *mecC* tok utgangspunkt i en tidligere publisert metode og ble optimalisert for bruk ved referanselaboratoriet. Metoden ble validert ved undersøkelse av sensitivitet, effektivitet og spesifisitet, både med og uten ROX som passiv referanse. I tillegg ble det undersøkt om metoden påviser *mecC* i den eksterne kvalitetskontrollen og om SYBR Green kan brukes som et alternativ til TaqMan.

Den optimaliserte real-time PCR-metoden har høy sensitivitet (copy number/antall bakterier: 27,8) og effektivitet (98,0 %). Real-time PCR-metoden viser god spesifisitet, da resultatene for alle de 52 bakterieisolatene i valideringspanelet samsvarer med konvensjonell PCR. Alle de 29 bakterieisolatene som fikk påvist *mecC*-genet ved real-time PCR var ved fenotypisk resistensbestemmelse resistente mot cefoxitin. Dette tyder på overensstemmelse mellom real-time PCR og fenotypisk resistensbestemmelse med cefoxitin. Den optimaliserte real-time PCR-metoden påviser *mecC*-genet i ekstern kvalitetskontroll. Real-time PCR-metode med ROX gir en bedre baselinjebestemmelse enn tilsvarende metode uten ROX.

Den optimaliserte real-time PCR-metoden er raskere å utføre enn den konvensjonelle PCR-metoden, og viser høy sensitivitet, effektivitet og spesifisitet. Dagens konvensjonelle PCR-metode for påvisning av *mecC* kan erstattes med TaqMan real-time PCR-metoden som er optimalisert i denne oppgaven.

Abstract

MRSA is *Staphylococcus aureus* which has developed resistance to almost all β -lactam antibiotics, and this is due to the acquisition of the *mecA* or *mecC* gene. This bachelor thesis aims to establish a TaqMan real-time PCR method for the detection of *mecC* in MRSA. This is desirable because the current method of conventional PCR is time consuming. In addition, the current method does not detect the *mecC* gene in external quality control from Quality Control for Molecular Diagnostics.

The establishment of real-time PCR method for *mecC* was based on a previously published method and was optimized for use at the reference laboratory. The optimized method was validated by examining sensitivity, efficiency and specificity, both with and without ROX as passive reference. In addition, it was examined whether the method detects *mecC* in the external quality control and whether SYBR Green can be used as an alternative to TaqMan.

The optimized real-time PCR method has high sensitivity (copy number: 27,8) and efficiency (98,0%). The real-time PCR method shows good specificity, as the result for all 52 bacterial isolates in the validation panel correspond to conventional PCR. All of the 29 bacterial isolates found to be *mecC* positive by real-time PCR were resistant to ceftazidime by phenotypic resistance determination. This indicates consistency between real-time PCR and phenotypic resistance determination with ceftazidime. The optimized real-time PCR method detects the *mecC* gene in external quality control. Real-time PCR method with ROX is considered to provide better baseline determination than an equivalent method without ROX.

The optimized real-time PCR method is faster to perform than the conventional PCR method, demonstrating high sensitivity, efficiency and specificity. The current conventional PCR method for detecting *mecC* can be replaced by the TaqMan real-time PCR method optimized in this thesis.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	i
Sammendrag	ii
Abstract.....	iii
Innholdsfortegnelse.....	iv
Forkortelser	1
1. Innledning	3
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.2 MRSA og resistens mot β -laktamantibiotika	3
1.3 Behandling av MRSA.....	4
1.4 Forebyggende tiltak mot MRSA i Norge.....	5
1.5 Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA.....	5
1.6 Hensikten med oppgaven.....	6
2. Materiale og metode	7
2.1 Fenotypisk resistensbestemmelse	7
2.2 Automatisk ekstraksjon av bakterielt DNA	8
2.3 Kokelysering.....	9
2.4 PCR for påvisning av <i>mecC</i>	9
2.5 Real-time PCR med TaqMan probe.....	13
2.5.1 Utprøving av real-time PCR for <i>mecC</i>	17
2.5.2 Bestemmelse av egnet annealing-temperatur.....	17
2.5.3 Valg av real-time PCR-program	18
2.5.4 Passiv referansekontroll med ROX.....	18
2.5.5 Sensitivitetstesting og effektivitetstesting.....	19
2.5.6 Spesifisitetstesting.....	20
2.5.7 Analysering av ekstern kvalitetskontroll	20
2.5.8 Real-time PCR med SYBR Green	20
3. Resultater	22
3.1 Fenotypisk resistensbestemmelse	22
3.2 Utprøving av real-time PCR for <i>mecC</i>	23
3.3 Bestemmelse av optimal annealing-temperatur	23
3.4 Valg av real-time PCR-program	23
3.5 Passiv referansekontroll med ROX.....	24
3.6 Sensitivitetstesting og effektivitetstesting.....	24

3.7 Spesifisitetstesting.....	24
3.8 Analysering av ekstern kvalitetskontroll	24
3.9 Real-time PCR med SYBR Green	24
4. Diskusjon	26
5. Konklusjon.....	29
6. Referanser	30
7. Vedlegg.....	32
7.1 Prosedyrer	32
Vedlegg 1 MRSA referanselab - Resistensbestemmelse	32
Vedlegg 2 MRSA referanselab – <i>MecC</i> fast PCR	35
Vedlegg 3 Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper	39
Vedlegg 4 EZ1 Advanced XL, ekstraksjon av bakterielt DNA, bruk og vedlikehold.....	45
7.2 Reagensvedlegg	57
Vedlegg 5 Reagensvedlegg for forward primer, revers primer og TaqMan probe brukt i real-time PCR-metoden.	57
7.3 Resultater	60
Vedlegg 6 Resultater fra fenotypisk bestemmelse.....	60
Vedlegg 7 Resultater fra utprøving av real-time PCR for påvisning av <i>mecC</i>	62
Vedlegg 8 Resultater fra bestemmelse av egnet annealing-temperatur	63
Vedlegg 9 Resultat fra valg av real-time PCR-program.....	65
Vedlegg 10 Resultater fra passiv referansekontroll med ROX.....	66
Vedlegg 11 Resultater fra sensitivitetstesting og effektivitetstesting	68
Vedlegg 12 Resultater fra spesifisitetstesting	72
Vedlegg 13 Resultater fra analysering av ekstern kvalitetskontroll	80
Vedlegg 14 Resultater fra real-time PCR-metode med SYBR Green	81

Forkortelser

AMM: Avdeling for medisinsk mikrobiologi

dNTP: Deoksynukleosid trifosfat

dsDNA: Double stranded DNA, dobbeltrådet DNA

EtBr: Etidiumbromid

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FRET: Fluorescens resonans energi transfer

MGW: Molecular grade water

MH: Mueller Hinton

MIC: Minimum inhibitory concentration, minste inhiberende konsentrasjon

MRSA: Meticillinresistente *Staphylococcus aureus*

MSSA: Meticillinsensitive *S. aureus*

NordicAST: Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

PBP: Penicillinbindende protein

PCR: Polymerase chain reaction, polymerase kjedereaksjon

PVL: Panton-Valentin leucocidin

QCMD: Quality Control for Molecular Diagnostics

RNase A: Ribonuclease A

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SCC*mec*: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*

Spa: *Staphylococcus* protein A-gen

UNG: Uracil N-glykosylase

UV-lys: Ultrafiolett lys

1. Innledning

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), gule stafylokokker, kan være en del av normalfloraen i hud og slimhinner hos mennesker (1, s. 171). 20-30 % av befolkningen er permanente bærere av bakterien (2). *S. aureus* kan overleve lenge på overflater på grunn av peptidoglykan-laget og mangel på ytre membran. Bakterien smitter fra person til person via direkte kontakt eller ved eksponering for kontaminerte gjenstander som sengetøy eller klær (1, s. 170). De fleste som får stafylokokkinfeksjoner har enten nedsatt immunforsvar eller hudsår (3).

Risikofaktorer for å få infeksjon med *S. aureus* er fremmedlegemer som proteser og kateter, kirurgi og bruk av antibiotika som undertrykker normalflora (1, s. 170). Luftsmitte, fjerndråpesmitte, med avstøtte hudceller kan forekomme (2).

Bakterien kan ved produksjon av toksiner eller direkte invasjon og ødeleggelse av vev føre til en rekke infeksjoner, blant annet hud- og sårinfeksjoner, matforgiftning, nosokomial pneumoni, toksisk sjokk syndrom, endokarditt, osteomyelitt og bakterieemi (1, s. 175, 4). *S. aureus* har ulike overflateproteiner som er viktige virulensfaktorer fordi de adherer til vertens vev (1, s. 172).

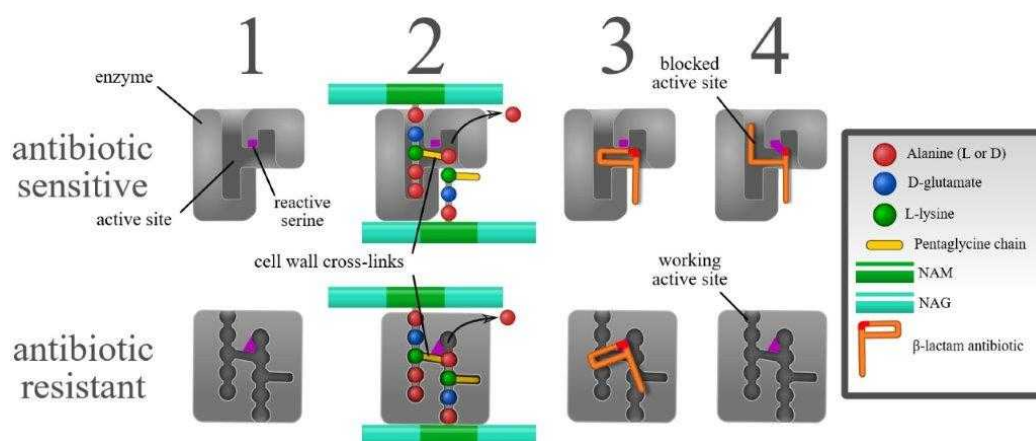
1.2 MRSA og resistens mot β -laktamantibiotika

Penicillin ble oppdaget i 1928, og allerede kort tid etter at antibiotikumet ble tatt i bruk i pasientbehandling ble det oppdaget resistensutvikling mot dette antibiotikumet (5). β -laktamasene er en viktig årsak til resistens mot penicilliner, ved at β -laktamase hydrolyserer β -laktamringen i β -laktamantibiotika (1, s. 181).

Det ble senere utviklet semisyntetiske penicilliner, blant annet meticillin, som ikke lar seg hydrolysere av β -laktamase (1, s. 181).. Meticillinresistens ble påvist tidlig på 1960-tallet, kun noen år etter introduksjon av dette β -laktamantibiotikumet i pasientbehandling (4).

β -laktamantibiotika virker ved å hemme celleveggsyntese. Penicillin, cefalosporiner, karbapenemer og monobaktamer, som er ulike β -laktamantibiotika, vil kunne binde til penicillin-bindende proteiner (PBP) i bakteriers cellevegg. Som en følge av dette vil transpeptidase hemmes, noe som hindrer tverrbinding av peptidoglykan. Dette fører til aktivering av autolysiner som bryter ned celleveggen og medfører bakteriedød (1, s. 162).

Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) er resistente mot nesten alle β -laktamantibiotika (1, s. 182), og skyldes ervervelse av *mecA*- eller *mecC*-genet som koder for et alternativt PBP, henholdsvis PBP2a og PBP2c. Disse nye proteinene, PBP2a og PBP2c, er enzymatisk aktive og vil kunne brukes til å bygge peptidoglykanlaget i celleveggen, men har lavere affinitet mot β -laktamantibiotika (1, s. 169). Dette er vist i figur 1, hvor de grå klossene forestiller PBP. *mecA*- og *mecC*-genene er lokalisert i kromosomkassetten Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). SCC*mec* er et mobilt genetisk element som det finnes 11 typer av (6).



Figur 1: Hvordan *mecA*- eller *mecC*, som koder for et alternativt PBP, medfører resistens mot nesten alle β -laktamantibiotika.¹

mecA-homologen *mecC*, tidligere kalt *mecA_{LGA251}*, ble for første gang beskrevet hos MRSA i 2011. *mecC* ble først funnet i stammer av *S. aureus* fra storfe. I ettertid ble genet funnet fra samme eller nært beslektede MRSA-stamme hos mennesker (6). MRSA som etablerer seg lett hos dyr kalles dyreassosiert MRSA. Som alle andre MRSA-varianter, kan også dyreassosiert MRSA smitte mellom mennesker og dyr (7).

1.3 Behandling av MRSA

MRSA kan gi de samme infeksjonene som meticillinsensitive *S. aureus* (MSSA), og kan på samme måte som MSSA forekomme som en asymptomatisk bærertilstand. Bakterienes patogenitet, virulens og spredningsevne kan variere blant både ulike MSSA- og MRSA-stammer (2). Forskjellen mellom infeksjoner med MSSA og MRSA er at resistens mot β -laktamantibiotika krever behandling med spesielle typer antibiotika. Medikamentene som kan

¹ Figur hentet fra: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c8/MecA_Resistance.svg

behandle MRSA har flere og mer alvorlige bivirkninger enn β -laktamantibiotika for både pasienter og miljøet (8). Behandling av MRSA er mindre effektiv og mer kostbar enn behandling av MSSA. Ved behandling av MRSA må man i tillegg benytte mer bredspektret antibiotika, noe som også kan bidra økt til resistensutvikling (3).

1.4 Forebyggende tiltak mot MRSA i Norge

Riktig bruk av antibiotika er det viktigste tiltaket for å få andelen av MRSA-infeksjoner så lav som mulig i befolkningen, men for å forhindre spredning av MRSA i norsk helsetjeneste er det også viktig å teste enkelte pasientgrupper og ansatte i helsetjenesten for MRSA (9). I motsetning til i de fleste andre land i Europa og USA, skyldes kun < 1 % av stafylokokkinfeksjoner i Norge MRSA (10). Alle som skal legges inn som pasient eller arbeide ved sykehus eller sykehjem i Norge, og som tidligere har fått påvist MRSA, hatt nær kontakt med MRSA-positive eller i løpet av de 12 siste månedene har vært utenfor Norden og der har vært innlagt ved helseinstitusjon, fått omfattende undersøkelse eller behandling i en helsetjeneste, jobbet som helsearbeider eller oppholdt seg i barnehjem eller flyktningeleir, testes for MRSA (11). Ved sykehus isoleres MRSA-pasienter for å unngå at MRSA skal kunne etablere seg i sykehusmiljøet. Av samme årsak saneres bærerskap hos ansatte og pasienter/beboere/brukere ved sykehus, sykehjem og hjemmesykepleie (12).

1.5 Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA

Nasjonalt referanselaboratorium for MRSA ble etablert ved avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) på St. Olavs hospital i 2005. Referanselaboratoriet har mottatt tilnærmet alle MRSA-isolater i Norge etter 2007. Isolatene sendes til referanselaboratoriet sammen med resultater fra resistensbestemmelse og rekvisisjon med kliniske opplysninger.

Referanselaboratoriet konfirmerer MRSA ved samtidig påvisning av *mecA/mecC* og *spa*-genet, og undersøker tilstedeværelse av Panton-Valentin leukocidin-genet (*PVL*) (8). *spa*-typing baseres på sekvenseringsanalyse av deler av et gen i x-regionen på *Staphylococcus* protein A-genet (*spa*). *PVL* er et cytotoxin som brukes som epidemiologisk markør, og tilstedeværelse av genet er assosiert med økt virulens (13). Referanselaboratoriet bidrar i kartlegging av forekomst og utbredelse av MRSA. Utvalgte stammer genotypes (*spa*-typing) og helgenomsekvenseres for utbruddsopklaring, smittesporing og epidemiologisk overvåkning. Alle mottatte stammer lagres ved i en stammebank for eventuell senere karakterisering (Vedlegg 1, 8).

1.6 Hensikten med oppgaven

Cefoxitin lappediffusjon benyttes ofte for påvisning av MRSA, ettersom det er tilnærmet 100 % samsvar mellom fenotypisk resistens for cefoxitin og tilstedeværelse av *mecA* eller *mecC* (2). Tilstedeværelse av *mecA* eller *mecC* benyttes som konfirmasjon av MRSA (1, s. 182). *mecC* har 70 % likhet med *mecA* i nukleotidsekvens, og vil dermed ikke påvises med PCR for *mecA* (Vedlegg 2). Utilstrekkelig testing kan dermed føre til at *mecC* feilaktig identifiseres som MSSA (6). *mecC* påvises med PCR spesifikk for *mecC*.

Denne oppgaven har som hensikt å etablere en TaqMan real-time PCR for påvisning av *mecC*-genet hos MRSA. Referanselaboratorium for MRSA benytter i dag en konvensjonell PCR til å påvise *mecC*. Denne metoden krever at det blir utført PCR med to ulike primersett i to separate oppsett. Dersom denne metoden erstattes med en metode som kun benytter ett primersett, vil arbeidet med pipettering i forkant av selve PCR-reaksjonen halveres. Ved dagens konvensjonelle metode må PCR-produkt påvises med gelelektroforese. Konvensjonell PCR er altså mer arbeidskrevende og tidkrevende enn en eventuell real-time PCR ville vært. En annen årsak til å etablere en ny metode er at konvensjonell PCR ikke klarer å påvise *mecC* i ekstern kvalitetskontroll fra Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD). Siden kvalitetskontrollen blir falsk negativ kan en ikke utelukke at også bakteriestammer fra pasienter blir falsk negative.

Hovedmålet med oppgaven er å etablere en TaqMan real-time PCR for deteksjon av *mecC* på Quanstudio 5.

2. Materiale og metode

I denne oppgaven ble 52 bakterieisolat fra stammebanken ved nasjonalt referanselaboratorium for MRSA benyttet i valideringen av TaqMan real-time PCR-metoden. Bakterieisolatene ble sådd ut på blodagar, og inkubert ved $35\pm 2^\circ\text{C}$ i vanlig atmosfære i 18 timer.

2.1 Fenotypisk resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse benyttes for å undersøke om bakterier er sensitive, intermediært følsomme eller resistente mot aktuelle antibiotika, og utføres rutinemessig ved hjelp av agardiffusjonsmetoden.

Prinsippet for agardiffusjonsmetoden går ut på at bakterier spres utover en Mueller Hinton (MH)-agarskål, før antibiotikatabletter plasseres på agarskålen. Antibiotikatablettene er tynne papirlapper med kjent konsentrasjon av et gitt antibiotikum. Antibiotikumet diffunderer ut i mediet, og det oppstår en gradient med avtagende konsentrasjon fra tablettene og utover. Dersom antibiotikumet hemmer vekst av bakterien, vil det observeres en bakteriefri sone rundt tablettene. I en gitt avstand fra tablettene blir konsentrasjonen så lav at bakterien ikke lenger finnes. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) har lagt en standardisert lappediffusjonsmetode for Europa. Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (NordicAST) har utviklet tilsvarende retningslinjer for Norden. En standardisert metode gjør at resultater mellom ulike laboratorier og ulike land kan sammenlignes. For å oppnå mest mulig riktig resultat er faktorer som agarens tykkelse, bakterietype og inokulatets tetthet viktige (Vedlegg 3).

Det ble utført fenotypisk resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode, antibiotikatabletter og minimum inhibitory concentration, minste inhiberende konsentrasjon, (MIC)-tester på de 29 bakteriestammene i valideringspanelet som referanselaboratoriet tidligere har påvist *mecC* hos, en *mecC*-negativ stamme og kontroll CCUG 15915.

1. Bakteriestammer ble plukket opp fra blodagar med renkultur og slemmet opp i sterilt 0,85 % saltvann til tettheten ble 0,5 McFarland. Suspensjonen ble homogenisert ved blanding. Tettheten ble målt med et densitometer (Montebello Diagnostics, Norge).
2. Til resistensbestemmelse av *Staphylococcus* species benyttes MH-agar. En bomullspensel ble dyppet ned i bakterieløsningen og deretter dratt tvers over skåla. Deretter ble skåla plassert på en inokulator/rotator (Montebello Diagnostics, Norge),

mens penselen ble dratt fra kanten til midten på agarskåla. Dette resulterte i en lang og sammenhengende spiral på agaren, noe som tilsier en jevn fordeling av bakterien.

Dette trinnet ble gjort innen 15 minutter etter trinn 1.

3. Antibiotikatabletter og MIC-stips ble lagt på inokulert agarskål innen 15 minutter. Tablettene ble lagt på med dispensere (Oxoid by Thermo Fisher Scientific, England). Bakteriestammene ble testet mot 12 antibiotika. Fordeling av antibiotikalapper i dispensere er vist i vedlegg 1. Det ble i tillegg satt opp MIC-test for cefoxitin og oxacillin på alle stammene.
4. Skålene ble innen 15 minutter inkubert ved $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ i 18 ± 2 timer i vanlig atmosfære.
5. Hemmingsonenes diameter ble vurdert mot sonegrenser utarbeidet av EUCAST (14).

2.2 Automatisk ekstraksjon av bakterielt DNA

EZ1 Advanced XL (Qiagen, Tyskland) er et ekstraksjonsinstrument som utfører automatisert ekstrahering av bakterielt DNA. Dette instrumentet gir DNA-produkt av god kvalitet med god holdbarhet i forhold til kokelysering. UV-lampen minimaliserer risikoen for kontaminering av overflaten i instrumentet, og slik unngås carryover fra ekstraksjon til ekstraksjon (15).

Instrumentet baseres på prinsippet om at DNA bindes til magnetiske partikler dekket med silika i nærvær av kaotropisk salt. En magnet binder til seg de magnetiske partiklene, og vil dermed kunne flytte DNA mellom ulike brønner med forskjellige vaskeløsninger. Etter endt vaskeprosess er ubundet materiale fjernet, og DNA overføres til egne eluatrør (Vedlegg 4).

Før ekstrahering på EZ1 frigjøres DNA fra bakteriene ved tilsetning av et lyseringsreagens (16). Tabell 1 viser hvilken buffer og hvilke enzym som ble brukt til å lysere bakteriene. DNA fra *mecA*- (CCUG 60578) og *mecC*-kontrollstamme (NCTC 13552) ble ekstrahert ved hjelp av dette lyseringstrinnet og EZ1 med DNA tissue kit.

Tabell 1: Tillaging av lyseringsreagens for frigjøring av bakterielt DNA.

Reagens	Volum (μL)
Tris- og EDTA-buffer (TE-buffer) (in house)	200
Proteinase K (Qiagen, Tyskland)	20

Lysostaphin (Qiagen, Tyskland)	10
--------------------------------	----

1. Prøverørene (EZ1 DNA Tissue kit) ble tilsatt TE-buffer, Proteinase K og Lysostaphin som vist i tabell 2.1.1. Grunnet prosedyreendring under prosjektperioden, ble en lysesingsmiks bestående av G2-buffer (180 µl) og lysostaphin (10 µl) benyttet for ekstraksjon av *mecC*-kontrollstammen (NCTC 13552) for bestemmelse av sensitivitet og effektivitet for metoden med ROX.
2. En 10⁻³-øse med bakteriekolonier fra blodagar ble slemmet oppi løsningen.
3. Bakteriesuspensjonene ble inkubert på varmeblokk Thermomixer comfort (Eppendorf, Tyskland) med 37°C i 15 minutter med risting for å aktivere enzymene, og deretter ved 65°C i 15 minutter med risting for å denaturere enzymene. Ved bruk av lysesingsmiks inneholdende G2-buffer, ble bakteriesuspensjonene inkubert i 37°C i 30 minutter med risting.
4. Bakterielysatene ble avkjølt til romtemperatur.
5. Bakterielysatene ble tilsatt ribonuclease A (RNase A) (4 µL) for å denaturere eventuell frigjort RNA.
6. EZ1 ble deretter benyttet for automatisert ekstraksjon av DNA. Ferdig eluat ble overført til elueringsrør av instrumentet.

2.3 Kokelysering

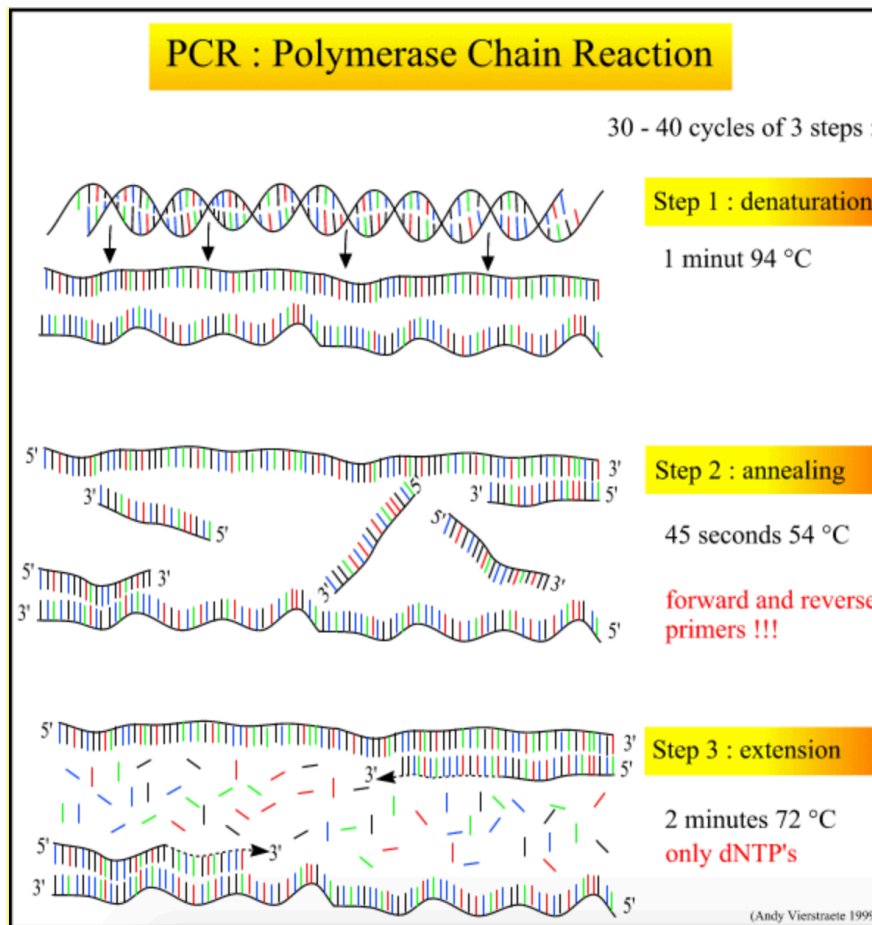
Det ble benyttet kokelysering for frigjøring av DNA fra stammene i valideringspanelet, da det er denne metoden som brukes i rutineanalysene hos MRSA referanselaboratorium.

1. MGW (200 µL) ble tilsatt i et 1,5 ml eppendorfrør.
2. 3-4 kolonier fra renspredding ble ristet i røret.
3. Rørene ble satt på varmeblokk Thermomixer comfort (Eppendorf, Tyskland) med risting (300 rpm) på 95°C i 15 minutter.
4. Rørene ble sentrifugert ved 14 500 rpm i 2 minutter.
5. 100 µL av supernatanten ble overført til 0,5 ml mikrorør.

2.4 PCR for påvisning av *mecC*

Polymerase chain reaction, polymerase kjedereaksjon (PCR), omfatter prinsipper som DNA-syntese og -replikasjon (17, kap. 1). PCR baseres på tre trinn hvor samme reaksjonssekvens

gjentas flere ganger, som vist i figur 2. PCR kombinert med gelelektroforese omtales heretter som konvensjonell PCR.



Figur 2: De tre trinnene en PCR-reaksjon baseres på.²

- Trinn 1 i syklusen er denaturering av double stranded DNA, dobbeltrådet DNA, (dsDNA) ved høy temperatur på rundt 95°C.
- Deretter senkes temperaturen slik at de to primerne, revers og forward, kan hybridisere til komplementære DNA-templat. Dette trinnet foregår vanligvis ved 50-65°C. Temperaturen er avhengig av smeltepunktet til primerene, som igjen er avhengig av sammensetning av basene.
- Under trinn 3 foregår polymeriseringen, og dette skjer ved 72°C. Dette er optimumtemperaturen for effektiv DNA-syntese ved hjelp av det termostabile enzymet DNA-polymerasen (17, kap. 2). DNA-polymerasen er avhengig av

² Figur hentet fra: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
15.05.19

deoksynukleosid trifosfat (dNTP) for å syntetisere DNA. For nyere real-time PCR-metoder som denne bacheloroppgaven tar for seg, er trinn 2 og trinn 3 slått sammen. Siden DNA-polymerasen er aktiv i temperaturer mellom 55-70°C, som også er annealing-temperatur for primere, har det vist seg å være hensiktsmessig å slå sammen trinn 2 og trinn 3. Dermed vil en nyere real-time PCR som baserer seg på to steg, og ikke de tradisjonelle tre stegene, ha en kortere analysetid (18).

Teoretisk er det en dobling av kopier hver PCR-syklus. Prosessen er sjeldent 100 % effektiv, og dermed kreves det 25-40 sykluser, avhengig av startkonsentrasjon, renhet og om betingelsene er optimaliserte, for å få dannet nok produkt (17, kap. 1).

Ved konvensjonell PCR påvises PCR-produkt ved gelelektroforese. Gelelektroforese kan separere DNA-fragmenter produsert under PCR, på bakgrunn av ulik størrelse. Gelene brukt i bacheloroppgaven inneholder etidiumbromid (EtBr), som er en aromatisk forbindelse med tilnærmet lik størrelse som et DNA-basepar. EtBr interkalierer baseparene i DNA-tråden (17, kap. 5). Agarosegelen påføres spenning fra en spenningskilde. DNA-fragmenter har ulik vandringshastighet, basert på fragmentenes størrelse, spenning, gel-tykkelse og bufferens pH. Det påsettes også en DNA-størrelsesmarkør på gelen, en «ladder». Laddereren inneholder kjente DNA-størrelsesfragmenter, og benyttes for å bestemme størrelsen på DNA-fragmenter i gelen. Bestråling med ultrafiolett lys (UV-lys) synliggjøres eventuelle DNA-fragment som bånd i gelen (17, kap. 5).

Nukleotidsekvensene til primerene brukt i konvensjonell PCR er fremstilt i tabell 2. Til påvisning av *mecC* ved konvensjonell PCR ble det brukt to primersett. Primersett I påviser både *mecA* og *mecC*, mens primersett II består av spesifikke primere for *mecC*. Et godkjent oppsett har positiv *mecA*- og *mecC*-kontroll med primersett I, og positiv *mecC*-kontroll med primersett II, samt at negative kontroller skal være negative.

Tabell 2: Nukleotidsekvensene til primerene brukt i konvensjonell PCR (Vedlegg 2).

Primersett	ID	Sekvens 5' til 3'
I	Forward primer: <i>mecCI-f</i>	TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA
	Revers primer: <i>mecCI-r</i>	CCTGAATC[W]GCTAATAATATTC

II	Forward primer: <i>mecCII-f</i>	GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC
	Revers primer: <i>mecCII-r</i>	GAAGATCTTTTCCGTTTTCAGC

Det ble utført konvensjonell PCR etterfulgt av gelelektroforese på alle 52 bakterielysatene i valideringspanelet. Til hver analyse ble det i tillegg analysert negativ kontroll (MGW), positiv *mecA*-kontroll (CCUG 60578) og positiv *mecC*-kontroll (NCTC 13552). Det ble lagd 1:100-fortynning av DNA-eluat fra *mecA*- og *mecC*-kontroll ved hjelp av tifoldsfortynning. Tillaging av reaksjonsmiks er fremstilt i tabell 3. Det ble lagd en reaksjonsmiks for primersett I og en reaksjonsmiks for primersett II.

Tabell 3: Tillaging av reaksjonsmiks til 1 prøve på konvensjonell PCR.

Reagens	Volum (µL)
MGW	3
Amplitaq Gold Fast M. Mix	5
Primer Forward (10 µL)	0,5
Primer Revers (10 µL)	0,5

1. Reaksjonsmiks ble pipettert i PCR-brett (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, USA).
2. DNA-eluat/lysat (1 µL) ble pipettert i PCR-brett.
3. PCR-brettet ble plassert i PCR-instrumentet Veriti 96 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, USA) og satt på programmet «Fast *mecA spa* PVL». Programmet er beskrevet i tabell 4.

Tabell 4: PCR-program «Fast *mecA spa* PVL».

PCR-betingelser	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Initiell denaturering	95°C	10 minutter	25
Denaturering	96°C	5 sekunder	
Annealing	55°C	5 sekunder	
DNA-syntese	68°C	25 sekunder	

Polymerisering	72°C	10 sekunder	
Hold	10°C		

Etter endt PCR-reaksjon på Veriti 96 Fast Thermal Cycler ble PCR-produktet påvist ved gelelektroforese.

4. Det ble pipettert sterilt vann (Aqua) (12µl i gel med 48 brønner, og 15 µL i gel med 12 brønner) og PCR-produkt/ladder (5 µL) over i brønner.
5. Umiddelbart etter tilsetningen ble agarosegelen satt på strømkilden E-base (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) i 20 minutter.
6. Bånd i agarosegelen ble visualisert med UV-lys på Gel Doc 2000 (Bio-Rad, USA).
Det ble tatt bilde av gelen med instrumentet.

2.5 Real-time PCR med TaqMan probe

Real-time PCR vil, i motsetning til konvensjonell PCR, måle PCR-produkt etter hver syklus. Mengden PCR-produkt måles ved hjelp av et fluorescenssignal, som produseres av en probe. Fluorescenssignalet er proporsjonalt til antall amplifiserte PCR-produkt. I denne oppgaven ble det benyttet en TaqMan probe. TaqMan proben har en fluorescerende 5' reporter, som er kovalent bundet til en quencher i 3'ende. I denne oppgaven ble FAM benyttet som reporter og BHQ1 som quencher. Så lenge TaqMan proben er intakt, enten fritt i løsning eller hybridisert til templattråden, vil quencheren absorbere fluorescensen fra reporteren. Dette fenomenet kalles fluorescens resonans energi transfer (FRET). FRET innebærer at energien fra emisjon produsert av reporteren overføres fra en høyere energitilstand til en lavere energitilstand, grunnet nærhet til quencheren. Så snart avstanden mellom de to øker og DNA-polymerasen etter hvert kløyver den kovalente bindingen mellom reporter og quencher, vil 5'-FAM-reporter produsere økt fluorescens, og gir et fluorescenssignal proporsjonalt med antallet amplikon som er produsert. Taq-polymerase er varmestabil og denatureres ikke ved 95°C (17, kap. 9).

En annen deteksjonsmulighet i real-time PCR er fluorescensforbindelsen SYBR Green. Denne fluorescensforbindelsen bindes kun til dobbeltrådet DNA, og kan derfor brukes til å vurdere produksjonen av dobbeltrådet amplikon-produkter. SYBR Green bundet til DNA gir mye kraftigere fluorescenssignal, enn SYBR Green fritt i løsning. Fluorescensforbindelsen er ikke spesifikk for en nukleotidsekvens, men vil bindes til ethvert dobbeltrådet DNA. Siden SYBR

Green bindes til både målsekvens og ikke-målsekvens, er det nødvendig med en smeltepunktsanalyse. Dette gjøres for å utelukke produksjon av eventuelle uspesifikke PCR-produkt. Smeltepunktsanalysen er i tillegg nødvendig for å være sikker på at det detekteres korrekt produkt (17, kap. 9).

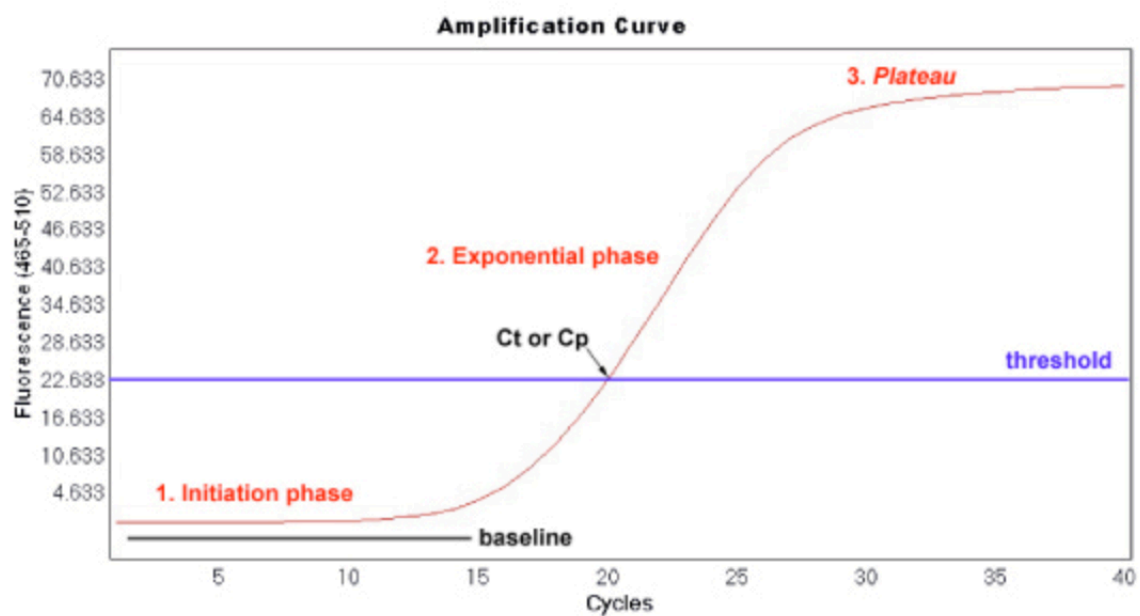
I real-time PCR-analyser i denne oppgaven ble det benyttet Perfecta Quanta bio Custom Multiplex Mastermix enzyme, som inneholder enzymet uracil N-glykosylase (UNG). PCR-produkter fra foregående PCR-analyser kan ofte være en kilde til kontaminasjon. dTTP vil i Multiplex Mastermix erstattes med dUTP, og når enzymet UNG aktiveres ved 45°C, vil enzymet fjerne uracil som er inkorporert i ethvert kontamineringsmolekyl og etterlate et åpent sete. Aktiveringstrinnet av DNA-polymerasen inaktiverer UNG-enzymet, og kontamineringsmolekyler ødelegges ved hydrolysering av fosfatgruppen festet til baksiden av det åpne base-setet. Under gjentakende sykluser vil kun målsekvensen amplifiseres, og ikke kontaminasjonsmolekyler fra tidligere reaksjoner. Dette trinnet er viktig i et diagnostisk laboratorium hvor det utføres rutine-amplifikasjon av identiske produkter. UNG minimaliserer risikoen for krysskontaminasjon og falske positive svar (17, 14, kap. 4).

ROX er et fluorescerende molekyl, og fungerer som en passiv bakgrunnsfarge.

Fluorescensmolekylet deltar ikke aktivt i PCR-reaksjonen, og fluorescensnivået endres ikke som et direkte resultat av amplifikasjonen underveis i real-time PCR reaksjonen. I et real-time PCR-system kan det være brønn-til-brønn-variasjoner, og dermed variasjoner i deteksjonen av signal. Slike variasjoner kan være ujevn bestråling, små variasjoner i optikken mellom brønnene, ulik grad av kondensering og pipetteringsfeil. Slik fungerer ROX som en intern referanse, ved at den stabiliserer svingninger i fluorescenssignalet under real-time PCR analyser. I tillegg bidrar ROX til at resultatene blir mer presise, ved at manuelle justeringer av baselinjen minimaliseres (18).

I denne oppgaven ble hovedsakelig instrumentets automatiske innstillinger for baselinjen benyttet. Baselinjen defineres som PCR-sykluser hvor reporterens fluorescenssignal akkumuleres, men fremdeles er under grensen for deteksjon av instrumentet. Terskelverdien fungerer som en grense mellom bakgrunnsstøy og amplifikasjonssignal. Den beregnes automatisk av instrumentet, men kan justeres manuelt dersom dette er nødvendig eller ønskelig. Cycle Treshold, syklus terskelverdi, (C_T)-verdien indikerer antall sykluser som trengs for å krysse terskelverdien. Det er altså ved C_T -verdien at er det amplifisert nok PCR-produkt til å gi et signifikant fluorescenssignal over baselinjen (17, kap. 2 og 9).

En teoretisk optimal PCR-kurve har tre faser, som illustrert i figur 3. Første fase omtales som initieringsfasen, og i denne fasen vil primerne forsøke å finne de komplementære sekvensene. Den neste fasen kalles den eksponentielle fasen, og omfatter en eksponentiell amplifikasjon av målgenet. Etter hvert som reaksjonen fremskrider vil DNA-polymerase være mindre effektiv, og det vil være mer PCR-produkt, enn tilgjengelige polymerase. Dermed vil ikke reaksjonen lenger ha en eksponentiell amplifikasjon, men oppnå en plata-effekt. Dette plata-området er av liten interesse ved beregning av effektivitet, da det er det lineære området som antas å ha en teoretisk amplifikasjonsdobling av produkt. Disse tre fasene gir en sigmoid kurveform, som ansees å være en optimal PCR-kurve (17, kap. 2 og 9).



Figur 3: Et eksempel på en optimal PCR kurve, hvor det kommer frem at en PCR-reaksjon består av tre ulike faser. De tre ulike fasene er henholdsvis initierings-fasen, eksponential-fasen og plata-fasen. C_T -verdien indikerer antall sykluser som trengs for å krysse terskelverdien.³

Nukleotidsekvensene for forward primer, revers primer og TaqMan probe for påvisning av *mecC* er fremstilt i tabell 5, og er hentet fra publikasjonen i artikkelen (6), og vedlegg 5. Real-

³ Figur hentet fra: Real-Time PCR Quantification Analysis [Internet]. [cited 2019 Apr 1]. Available from: <https://www.highveld.com/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>

time PCR brukes heretter om real-time PCR med TaqMan-probe, med mindre et annet fluorescensmolekyl er beskrevet i framgangsmåten.

Tabell 5: Nukleotidsekvensene til primerene og proben brukt i real-time PCR (6, Vedlegg 5).

ID	Sekvens 5' til 3'
<i>mecC</i> _F (forward primer)	AGATTTAAAGTAGTAGACGGCA
<i>mecC</i> _R (revers primer)	TTTCACCGATTCCCAAATCT
<i>mecC</i> _FAM (reporter)	TTTGCCCGCATTGCATTAGCATTAGGA

Av tørrstoff (TIB Molbiol, Tyskland) og MGW ble det lagd tre ulike stockløsninger (100 µM) av henholdsvis *mecC* forward primer, revers primer og probe. Fra stockløsningene ble det med MGW lagd bruksløsninger av *mecC* Primer Forward (12 µL), *mecC* Primer Revers (12 µL) og *mecC* Probe (8 µL).

I alle real-time PCR-analysene i denne oppgaven ble det benyttet negativ kontroll (MGW), positiv *mecA*-kontroll (CCUG 60578) og positiv *mecC*-kontroll (NCTC 13552). Det ble lagd 1:100-fortynning av DNA-eluat fra *mecA*- og *mecC*-kontroll ved hjelp av tifoldsfortynning.

Tabell 6 viser hvordan en reaksjonsmiks til 1 prøve for analysering med real-time PCR ble lagd.

Tabell 6: Tillaging av reaksjonsmiks til 1 prøve på real-time PCR.

Reagens	Volum (µL)
Perfecta Quanta bio Custom Multiplex Mastermix enzyme	10
MGW	6,5
<i>mecC</i> Primer Forward (12 µM)	0,5
<i>mecC</i> Primer Revers (12 µM)	0,5
<i>mecC</i> Probe (8 µM)	0,5
Totalt volum reaksjonssmiks	18
DNA-eluat/lysat	2

Totalt volum i brønn	20
-----------------------------	----

1. Det ble lagd reaksjonsmiks med enzym, MGW, primere og probe etter tabell 6.
2. Reaksjonsmiks ble pipettert over i PCR-brett MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientificleverandør, USA).
3. DNA-eluat/lysate ble tilsatt brønnene med reaksjonsmiks.
4. PCR-brettet ble plassert i Quantstudio 5 (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientificleverandør, USA). Hvilke instrumentinnstillinger som ble brukt er beskrevet i hvert enkelt tilfelle under.

2.5.1 Utprøving av real-time PCR for *mecC*

Det ble gjort et første forsøk på å påvise *mecC* med real-time PCR ved at positiv *mecA*-kontroll, positiv *mecC*-kontroll og negativ kontroll ble analysert på programmet som er fremstilt i tabell 7. Det ble analysert ufortynnede og fortynnede kontroller (1:10 og 1:100). Det ble tatt utgangspunkt i programmet beskrevet i artikkelen (6), og gjort modifikasjoner. I reaksjonsmiksen ble det brukt samme enzym som i rutineanalysene for *spa*, *mecC* og *PVL* på referanselaboratoriet. Det ble i tillegg satt inn et UNG-steg i starten av real-time PCR-programmet.

Tabell 7: Instrumentinnstillinger brukt ved første forsøk på å påvise *mecC* med real-time PCR.

Volum	UNG-steg	Taq-polymerase-aktivering	Denatureringsfasen	Annealing og polymerisering	Antall sykluser
20 µL	10 minutter, 45°C	5 minutter, 95°C	15 sekunder, 95°C	1 minutt, 58°C	40

2.5.2 Bestemmelse av egnet annealing-temperatur

For å bestemme egnet annealing-temperatur ble det analysert to paralleller av *mecC*-kontrollen ved ulike temperaturer. Det ble testet seks ulike annealing-temperaturer, 56, 57, 58, 59, 60 og 61°C. Instrumentinnstillingene er vist i tabell 7.

Resultatene fra denne real-time PCR-reaksjonen ble kontrollert ved at det ble utført gelelektroforese på PCR-materialet. Dette utføres for å undersøke om det dannes uspesifikke bånd og om primerdimere har oppstått. I tillegg ser en om båndene har riktig størrelse. Det ble også utført en visuell inspeksjon av real-time kurvene, for å se hvilken temperatur som ga lavest C_T -verdi, og for å vurdere av formen på kurvene.

2.5.3 Valg av real-time PCR-program

Metoden som ble brukt ved testing av annealing-temperatur er vist i tabell 7 og tok 1 time og 17 minutter. Som et tiltak i den tidsmessige justeringen ble antall sykluser redusert fra 40 til 35 sykluser, annealing-tiden ble endret fra 40 sekunder til 30 sekunder og denatureringsfasen ble kuttet fra 5 minutter til 3 minutter, som vist i tabell 8. Disse endringene kortet ned programmets tidsbruk til 57 minutter. Dette programmet omtales videre som optimalisert program, da det er optimalisert for bruk ved referanselaboratoriet for MRSA. I denne utprøvingen ble det utført test på tre paralleller av *mecC*-kontroll.

Tabell 8: Optimalisert TaqMan real-time PCR-metode for påvisning av *mecC*.

Volum	UNG-steg	Taq-polymerase-aktivering	Denatureringsfasen	Annealing og polymerisering	Antall sykluser
20 μ L	5 minutter, 45°C	3 minutter, 95°C	10 sekunder, 95°C	30 sekunder, 58°C	35

2.5.4 Passiv referansekontroll med ROX

Det ble undersøkt om ROX Reference Dye (Thermo Fisher Scientific, USA) som passiv referansekontroll kunne gi bedre bestemmelse av baselinje. Tillaging av reaksjonsmiks ble gjort på samme måte som vist i tabell 6, med unntak av at ROX i tillegg ble tilsatt i reaksjonsmiksen (0,5 μ L) og tilsvarende mengde MGW ble redusert fra miksen. Dette tilsvarer konsentrasjonsanbefalinger gitt av instrumentfabrikanten. Alle 52 bakterielysat ble analysert med real-time PCR-metode inneholdende ROX.

2.5.5 Sensitivitetstesting og effektivitetstesting

Effektivitetstesting utføres for å undersøke hvor god real-time PCR-metoden er og for å se hvor deteksjonsgrensen ligger. Det laveste copy number som er detektert, kan benyttes for å anslå metodens sensitivitet. Copy number forteller oss hvor mange bakterier med *mecC* som er tilstede i hver enkelt brønn. Det beregnes en differanse mellom C_T -verdiene, for de ulike parallellene. En differanse på 3,32 tilsvarer en effektivitet på 100 % (17, kap. 9). Optimalt skal effektiviteten være så nærme 100 % som mulig, og helst innenfor 95-105 %. En differanse på mer enn 3,32 indikerer en lavere effektivitet, og en differanse på mindre enn 3,32 indikerer en effektivitet på over 100 %. En effektivitet på over 100 % er teoretisk ikke mulig, og indikerer at metoden produserer mer produkt enn det den skal. Årsaken kan være at metoden detekterer andre uspesifikke produkter. Tilstedeværelse av PCR-inhibitorer i en eller flere av reagensene kan føre til en effektivitet høyere enn 110 %. Årsaker til inhibering kan være dårlig DNA- eller RNA-kvalitet eller høy templatkonsentrasjon (20).

Effektiviteten beregnes ut ifra formel (1). Stigningstallet tas fra effektivitetstestens standardkurve, hvor C_T -verdier er plottet langs y-aksen og log-verdier av copy number er plottet langs x-aksen.

$$\text{Effektivitet} = 10^{(-1/\text{stigning})-1} \quad (1)$$

Sensitivitet og effektivitet for real-time PCR-metoden med for påvisning av *mecC*, ble undersøkt ved en effektivitetstest uten ROX og en med ROX.

Som et ledd i sensitivitets- og effektivitetstesting ble DNA-konsentrasjon i ufortynnet *mecC*-kontroll målt med dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)

1. Det ble lagd en miks av Qubit dsDNA HS Buffer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) (199 μL per prøve) og fargestoffet (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) (1 μL per prøve). Buffer ble blandet før bruk og fargestoffet ble vortekset. Fargestoffet ble skjermet for lys.
2. Prøverør (Invitrogen Qubit assay tubes by Thermo Fisher Scientific, USA) til standarder ble tilsatt miks (190 μL) og standardløsning (10 μL). I internkontroll og prøve med ukjent konsentrasjon tilsettes miks (198 μL) og Standard 2/prøve (2 μL).
3. Standarder, internkontroll og prøver ble vortekset.
4. Fluorescensverdiene til standardene og konsentrasjonene til kontroll og prøve ble målt på Qubit 3 (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA).

Deretter ble *mecC*-eluat tifoldsfortynnet til det var sju fortynninger. Effektivitetstesten ble utført på ufortynnet prøve og fortynning 10^{-1} til 10^{-7} . Det ble satt opp real-time PCR med tre paralleller av hver av de ulike fortynningene, inkludert ufortynnet *mecC*-eluat. PCR-program er vist i tabell 8.

Som et ledd i sensitivitetstesting ble copy number funnet ved hjelp av en DNA-kalkulator på Internett (21). Målt DNA-konsentrasjon og lengde på templat i antall basepar ble lagt inn i kalkulatoren. Genomstørrelsen til *S. aureus* er 2,8 Mbp (22).

2.5.6 Spesifisitetstesting

Spesifisiteten til real-time PCR-metoden med ROX som referansekontroll ble undersøkt ved analysing av de 52 DNA-lysatene i valideringspanelet. Det ble benyttet samme PCR-program som tidligere beskrevet i tabell 8.

2.5.7 Analysering av ekstern kvalitetskontroll

Den konvensjonelle PCR-metoden for påvisning av *mecC* har hittil ikke klart å påvise *mecC*-gen i en ekstern kvalitetskontroll fra QCMD. Denne positive *mecC*-kontrollen ble undersøkt på real-time PCR som en del av valideringen av metoden.

2.5.8 Real-time PCR med SYBR Green

Det ble undersøkt om SYBR Green kan benyttes som et alternativt fluorescensmolekyl på real-time PCR-programmet, som er presentert i tabell 8. Det ble benyttet samme primere som i real-time PCR med TaqMan probe, og primerene er fremstilt i tabell 5. Tabell 9 viser hvordan en reaksjonsmiks til 1 prøve for analysing med SYBR Green real-time PCR ble lagd.

Tabell 9: Tillaging av reaksjonsmiks for SYBR Green-metoden.

Reagens	Volum (μL)
Perfecta SYBR Green FastMix (Quantabio by Thermo Fisher Scientific, USA)	10
Molecular Grade Water (MGW)	7,0
<i>mecC</i> Primer Forward Bruksløsning (12 μM)	0,5
<i>mecC</i> Primer Revers Bruksløsning (12 μM)	0,5

I undersøkelsen ble to *mecC*-positive stammer fra valideringspanelet analysert, samt *mecA*-kontroll, *mecC*-kontroll og negativ kontroll. Instrumentinnstillinger er vist i tabell 8, og tillaging av reaksjonsmiks er vist i tabell 9. Smeltepunktsanalyse ble utført ved å senke temperaturen til 45°C i 1 minutt, og deretter ble temperaturen økt til 95°C med 0,15°C per sekund.

3. Resultater

3.1 Fenotypisk resistensbestemmelse

Resistensbestemmelsen ble utført som beskrevet i kapittel 2.1. Grenseverdiene og resultatene til kontrollen brukt i resistensbestemmelsen er vist i tabell 10. Til resistensbestemmelse benyttes egen kontrollstamme, CCUG 15915.

Tabell 10: Grenseverdiene og resultatene til kontrollen, CCUG 15915, brukt i resistensbestemmelsen. Antibiotikaene markert med stjerne er β -laktamantibiotika.

	CLI (DA)	FUC (FD)	TMS (SXT)	TCY (TE)	FOX *	ERY (E)	CIP	LZD	CEFT* (CPT)	GEN (CN)	RIF (RD)	MUP	OX* mg/L	FOX *
Grense- verdi	23-29	26-32	26-32	23-31	24-30	23- 29	21- 27	21- 27	24-30	19- 25	30- 36	31- 37	>2 mg/L	>4 mg/L
Sone (mm)	29	28	28	23	25	26	24	24	25	28	36	36	0,25	3

Samtlige verdier er innenfor oppgitte grenseverdier for referanselaboratoriet ved St. Olavs hospital, med unntak av verdien for gentamicin.

Tabell 11. viser hvor mange av bakteriestammene som er sensitive og resistente for de aktuelle antibiotikaene. Resultatene fra fenotypisk resistensbestemmelse for hver enkelt bakterie-stamme er vist i vedlegg 6.

Tabell 11: Antall bakteriestammer i resistensbestemmelsen som er sensitive og resistente for de aktuelle antibiotikaene. Antibiotikaene markert med stjerne er β -laktamantibiotika.

	CLI (DA)	FUC (FD)	TMS (SXT)	TCY (TE)	FOX*	ERY (E)	CIP	LZD	CEFT (CPT)*	GEN (CN)	RIF (RD)	MUP	OX*	FOX*
Antall sensitive	30	29	30	30	1	30	30	30	24	30	30	30	27	-
Antall resistente	-	1	-	-	29	-	-	-	6	-	-	-	3	30

Alle de 29 bakteriestammene fra valideringspanelet som referanselaboratoriet tidlige har påvist *mecC* hos, er resistente mot cefoxitin (FOX), noe som indikerer at de er MRSA. Den *mecC*-negative bakteriestammen i resistensbestemmelsen var sensitiv ovenfor cefoxitin, noe som antyder at denne stammen ikke er MRSA.

3.2 Utprøving av real-time PCR for *mecC*

Første utprøving av real-time PCR ble utført som vist i kapittel 2.5 og 2.5.1. PCR-metoden påviste *mecC*-genet i både uforynnnet kontroll og begge de fortynnede kontrollene. Kurven fra utprøving av real-time PCR for påvisning av *mecC* er vist i vedlegg 7.

3.3 Bestemmelse av optimal annealing-temperatur

Bestemmelse av optimal annealing-temperatur ble gjort som beskrevet i kapittel 2.5 og 2.5.2. Tabell 12 viser gjennomsnittlig C_T -verdi for de ulike annealing-temperaturene. Kurvene fra bestemmelse av egnet annealing-temperatur og resultatene fra gelelektroforesen utført på PCR-produktene er vist i vedlegg 8. Gelelektroforese av real-time PCR-produkt viser kun ett tydelig bånd for hver brønn. Det har heller ikke oppstått biprodukter i form av primerdimere. Ved at båndene i brønnene sammenlignes med ladderer kommer det fram at gensekvensene er på rundt 100 basepar.

Tabell 12: Gjennomsnittlig C_T -verdi for de ulike annealing-temperaturene.

Annealing-temperatur (°C)	C_T -verdi
56	19,036
57	19,386
58	19,242
59	19,252
60	19,449
61	19,482

3.4 Valg av real-time PCR-program

Optimalisert real-time PCR-metode for påvisning av *mecC* er vist i tabell 8. Denne metoden påviste *mecC*-genet i *mecC*-kontrollen. Kurvene fra denne utprøvingen med kortere program er vist i vedlegg 9. Kurvene ble ikke påvirket av tidsjusteringene, og dermed ble dette optimaliserte real-time PCR-programmet benyttet i det resterende arbeidet i denne oppgaven.

3.5 Passiv referansekontroll med ROX

Real-time PCR for påvisning av *mecC* med ROX som passiv referansekontroll ble utført som beskrevet i kapittel 2.5 og 2.5.4. I vedlegg 10 er det vist et analyseresultat fra real-time PCR uten ROX, hvor to av de *mecC*-negative DNA-lysatene har fått kurver over terskelverdien. For disse to kurvene må baselinjen justeres manuelt. Vedlegget viser også de samme DNA-lysatene analysert med ROX. Her har alle *mecC*-negative lysat lagt seg under terskelverdien. Resultat fra resten av analysene med ROX er brukt til vurdering av real-time PCR-metodens spesifisitet og er presentert i kapittel 3.7.

3.6 Sensitivitetstesting og effektivitetstesting

Undersøkelse av real-time PCR-metodens sensitivitet og effektivitet ble utført som forklart i kapittel 2.5 og 2.5.5. Det laveste copy number som ble detektert uten ROX var 31,1. Med ROX ble 27,8 detektert som laveste copy number. Effektiviteten uten ROX ble beregnet til 96,1 %, mens effektiviteten med ROX ble beregnet til 98,0 %. Alle resultatene fra sensitivitets- og effektivitetstesting er vist i vedlegg 11.

3.7 Spesifisitetstesting

Spesifisitetstesting ble utført som vist i kapittel 2.5. og 2.5.6. Real-time PCR-metoden samsvarer med referanselaboratoriets tidligere resultater fra konvensjonell PCR for 52/52 bakterielysat, og viser dermed god spesifisitet. Det er heller ingen uoverensstemmelser mellom real-time PCR og konvensjonell PCR utført i denne oppgaven. For alle de 29 bakterielysatene i den fenotypiske resistensbestemmelsen er det samsvar mellom resistens mot cefoxitin og tilstedeværelse av *mecC*-genet i real-time PCR. Alle disse resultatene er vist i vedlegg 12.

3.8 Analysering av ekstern kvalitetskontroll

Analysering av ekstern kontroll ble utført som vist i kapittel 2.5. Det ble påvist *mecC*-gen i den eksterne *mecC*-kontrollen fra QCMD. Dette resultatet er også presentert i vedlegg 13.

3.9 Real-time PCR med SYBR Green

Real-time PCR med SYBR Green ble utført som vist i kapittel 2.5 og 2.5.8. SYBR Green som fluorescensmolekyl viste seg å gi positiv påvisning av *mecC*. Real-time PCR-kurvene og

smeltepunktsskurvene fra denne testen er vist i vedlegg 14. Bakterielysat 11 og 13 har i spesifisitetstestingen fått påvist *mecC*-gen, noe som også ble påvist i real-time PCR med SYBR Green. I smeltepunktsskurven sammenfaller toppunktet til lysat 11 og 13 med *mecC*-kontrollen, noe som igjen bekrefter at de er *mecC*-positive.

4. Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en real-time PCR-metode for *mecC*. Metoden ble validert ved undersøkelse av sensitivitet, effektivitet og spesifisitet, både med og uten ROX som passiv referanse. I tillegg ble det undersøkt om metoden påviser *mecC* i den eksterne kvalitetskontrollen og om SYBR Green kan brukes som et alternativ til TaqMan.

Siden alle annealing-temperaturene viste seg å være egnet, ble 58°C benyttet i videre analyser, da dette var anbefalt i artikkelen (6). C_T -verdiene avviker lite fra hverandre, og kurveformene samsvarer med det som teoretisk anses som optimalt. Kurvene ble heller ikke påvirket av tidsjusteringene. Fordelene med det optimaliserte real-time PCR-programmet er at det forenkler arbeidet på referanselaboratoriet, både fordi dette programmet ligner mest mulig på andre PCR-program, men også fordi det er tidsbesparende. For alle real-time PCR-analysene ble *mecA*-kontroll negativ, *mecC*-kontroll positiv og negativ kontroll negativ. Dermed godkjennes alle resultatene fra real-time PCR.

Resultatene fra spesifisitetstesting viser at den optimaliserte real-time PCR-metoden påviser *mecC* i samtlige *mecC*-positive bakterielysater. Metoden påviser ikke *mecC* i brønner hvor *mecC* ikke er tilstede, og real-time PCR-metoden viser dermed god spesifisitet.

De lave copy numberene som ble detektert tyder på god sensitivitet hos begge metodene. God sensitivitet er i denne metoden viktig for å unngå at MRSA feilaktig diagnostiseres som MSSA. De høye effektivitetene tyder på at den optimaliserte real-time PCR-metoden oppfyller ønskede krav til effektivitet. Sensitiviteten og effektiviteten var noe høyere for metoden med ROX, enn metoden uten ROX, men dette kan skyldes tilfeldige feil, da resultatene også gjenspeiler presisjon i forbindelse med manuell pipettering i forkant av real-time PCR. Andre tilfeldige feil som uspesifikke PCR-produkter og dårlig primerkvalitet kan også påvirke resultatene. Med tanke på sensitivitet og effektivitet kan begge metodene benyttes i videre analyser.

En ekstern kontroll kan si noe om analysekvaliteten, og kan brukes i sammenligning mellom ulike laboratorier. Real-time PCR-metoden påviser *mecC*-genet i kontrollen fra QCMD. *mecC*-kontrollen (NCTC 13552) har en lavere C_T -verdi enn den eksterne kontrollen. Dette indikerer at den eksterne kontrollen har en lavere DNA-konsentrasjon, og at dette kan være en av årsakene til at den konvensjonelle PCR-metoden ikke har påvist *mecC* i kontrollen. Real-time PCR-metoden er dermed mer sensitiv enn den konvensjonelle PCR-metoden. En mulig

årsak til ulik sensitivitet kan være bruken av ulike primere, da det trolig benyttes mer spesifikke primere i real-time PCR-metoden enn i den konvensjonelle PCR-metoden. Dette har ikke blitt undersøkt, men på bakgrunn av resultatene bør det vurderes å utføre en helgenomsekvensering av QCMD-prøven for å undersøke *mecC*-genet nærmere.

Norsk referanselaboratorium for MRSA mottok i 2017 2587 MRSA-isolater. NORM-rapporten viser til at det er varierende resistensresultat for de ulike antibiotikaene (23). Dette stemmer overens med resultatene i denne oppgaven. Av alle resistensresultatene referanselaboratoriet mottok dette året, var 41,1 % av stammene sensitive for all testet antibiotika, med unntak av β -laktamantibiotika (cefoxitin). NORM-rapporten rapporterer også om høy %-andel resistens funnet for antibiotikaene erytromycin, tetrasyklin og clindamycin, og lavest resistens for mupirocin, rifampicin og trimetoprim-sulfamethoxazole. I 2017 var ingen av MRSA stammene resistente mot linezolid (23).

De *mecC*-positive bakteriestammene i valideringspanelet viser høyest resistens mot β -laktamantibiotikaene ceftaroline og oxacillin, og 100% resistens mot cefoxitin. *mecC*-stammene i denne oppgaven har ikke resistens mot erytromycin, tetrasyklin og clindamycin. Bakteriestammene er sensitive for resterende antibiotika testet i denne oppgaven, og det var heller ingen av bakteriestammene som var resistente mot linezolid. Dette er forventet da vi sjeldent har linezolidresistente MRSA i Norge (24).

Real-time PCR uten ROX utført på 52 bakterielysat førte til at to baselinjer måtte justeres manuelt. Real-time PCR med ROX løste dette problemet, og ut ifra disse resultatene kan det anbefales å bruke metoden med ROX. Siden antall manuelle justeringer av baselinjen minimaliseres, blir resultatene mer presise. I tillegg vil svingninger i fluorescenssignalet stabiliseres, og faren for at negative bakterielysat besvares som falskt positive minimaliseres.

Instrumentene som benyttes ved real-time PCR bidrar til bedre sporbarhet og kvalitetssikring, enn konvensjonell PCR. Ved real-time PCR lagres data på et sikkert område, og slik kan analyseresultater sjekkes i ettertid. På referanselaboratoriet er det automatisk overføring av resultater til laboratorie-datasystem, slik at man slipper manuelle avlesninger og inntastinger ved besvaring. Det er også mulig å logge hvem som starter analysen og prosesserer dataene.

Resultatene fra real-time PCR med SYBR Green stemmer overens med resultatene fra TaqMan real-time PCR, noe som tilsier at SYBR Green kan brukes som alternativt fluorescensmolekyl for påvisning av *mecC*. Det er ønskelig å bruke TagMan probe, da bruk

av TaqMan prober medfører at proben må være spesifikk for målgenet. Dermed er det tre nukleotidsekvenser som må stemme før det dannes en amplifikasjonskurve. SYBR Green har ikke like stor spesifisitet som TaqMan proben, da SYBR Green ikke bindes spesifikt til nukleotidsekvensen men bindes til enhver dsDNA. Fordeler med SYBR Green er at forbindelsen er billig å produsere, enkel å bruke, temperaturstabil og den interfererer ikke med DNA-polymerase (17, kap. 9). Det er derimot nødvendig med et ekstra trinn i form av en smeltepunktsanalyse. Smeltekurvene til de *mecC*-positive PCR-produktene har et samlet toppunkt. Dette tyder på at det ikke er uspesifikke PCR-produkter tilstede. SYBR Green er altså et fluorescensmolekyl man kan benytte for å påvise *mecC* med denne real-time PCR-metoden.

Artikkelen foreslår også deteksjon av *mecA*, *PVL* og *nuc*, men dette ble ikke undersøkt i denne oppgaven. Det ansees som en mulighet å utvide det optimaliserte real-time PCR-programmet til å bli en multiplex-analyse. Dette vil gjøre det mulig å utføre flere ulike PCR-reaksjoner i en og samme reaksjon, noe som vil være enda et trinn i effektiviseringen av laboratoriearbeidet (6).

5. Konklusjon

Det er blitt optimalisert et real-time PCR-oppsett for *mecC* ut ifra en tidligere publikasjon. Det er en fordel å utføre analysen med ROX som passiv referanse, da den løser eventuell problematikk med baselinjekorreksjon. Metoden viser høy sensitivitet og effektivitet både med og uten ROX. Real-time PCR-metoden gir samme resultat som konvensjonell PCR, samt fenotypisk resistensbestemmelse, noe som viser til god spesifisitet. I motsetning til den konvensjonelle PCR-metoden, påviser real-time PCR *mecC* i ekstern kvalitetskontroll fra QCMD. Den nye metoden er også raskere å utføre enn den konvensjonelle PCR-metoden. Konklusjonen er dermed at dagens konvensjonelle PCR-metode for påvisning av *mecC* kan erstattes med TaqMan real-time PCR-metoden etablert i denne oppgaven.

6. Referanser

1. Murray PR. Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia; 2016.
2. Stafylokokkinfeksjoner (inkl. MRSA-infeksjoner) [Internet]. Folkehelseinstituttet. [cited 2019 Mar 11]. Available from: <http://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/stafylokokkinfeksjoner-inkl.-mrsa-i/>
3. Når sykepleiere får MRSA | Sykepleien [Internet]. [cited 2019 May 4]. Available from: <https://sykepleien.no/2016/09/nar-sykepleiere-far-mrsa>
4. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2011 Aug;11(8):595–603.
5. Antibiotika [Internet]. NHI.no. [cited 2019 May 8]. Available from: <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/diverse/antibiotika/>
6. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, et al. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecALGA251*. *Oxf Univ Press*. 2012 Jun 11;
7. MRSA | Mattilsynet [Internet]. [cited 2019 May 12]. Available from: https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/dyrehelse/smitte_mellom_dyr_og_mennesker/MRSA/
8. Nasjonalt referanselaboratorium MRSA [Internet]. St. Olavs hospital. [cited 2019 Apr 1]. Available from: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/nasjonalt-referanselaboratorium-mrsa>
9. MRSA, resistente bakterier [Internet]. NHI.no. [cited 2019 May 12]. Available from: <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/bakteriesykdommer/mrsa-resistente-bakterier/>
10. MRSA - forhåndsundersøkelse, infeksjon og sanering - Metodebok for indremedisinere, 2012 [Internet]. [cited 2019 May 19]. Available from: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/metodebok/infeksjonssykdommer/mrsa>
11. Generelt om MRSA [Internet]. Folkehelseinstituttet. [cited 2019 May 12]. Available from: <http://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/sporsmal-og-svar/generelt-om-mrsa/>
12. mrsa-veilederen.pdf [Internet]. [cited 2019 May 18]. Available from: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2009-og-eldre/mrsa-veilederen.pdf>
13. MRSA – et økende helseproblem [Internet]. Bioingeniøren. [cited 2019 Mar 11]. Available from: <http://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/2012/fagartikkel-mrsa--et-okende-helseproblem/>

14. EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Internet]. [cited 2019 May 19]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
15. EZ1_AdvanXL_lr2.pdf [Internet]. [cited 2019 May 15]. Available from: http://geneious.mx/catalogos/EZ1_AdvanXL_lr2.pdf
16. Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett.* 2007 May 21;29(7):985–94.
17. McPherson M, Møller S. PCR. Second Edition. Taylor & Francis Group; (THE BASICS).
18. rox_referencedye_man.pdf [Internet]. [cited 2019 Mar 25]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/rox_referencedye_man.pdf
19. Qiagen. Uracil-N-glycosylase. For use with QuantiTect PCR Kits to eliminate carryover of PCR products. Qiagen;
20. Poor PCR Efficiency - NO [Internet]. [cited 2019 May 19]. Available from: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>
21. dsDNA copy number calculator [Internet]. [cited 2019 Mar 19]. Available from: <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>
22. Staphylococcus aureus (ID 154) - Genome - NCBI [Internet]. [cited 2019 May 2]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Staphylococcus%20aureus\[Organism\]&cmd=DetailsSearch&fbclid=IwAR3KfJol8DqYE7hWNp3__glFmDtr_oRcjdzueIUM85OhKLP0V0QH1O9rZwc](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Staphylococcus%20aureus[Organism]&cmd=DetailsSearch&fbclid=IwAR3KfJol8DqYE7hWNp3__glFmDtr_oRcjdzueIUM85OhKLP0V0QH1O9rZwc)
23. Akselsen PE, Andersen CT, Blix HS, Caugant D, Elstrøm P, Enger H m.fl. NORM/NORM-VET 2017. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Available from: www.antibiotikaresistens.no
24. Linezolidresistent Staphylococcus aureus med overførbart resistens identifisert for første gang i Norge [Internet]. Universitetssykehuset Nord-Norge. [cited 2019 May 15]. Available from: <https://unn.no/fag-og-forskning/k-res/linezolidresistent-staphylococcus-aureus-med-overforbart-resistens-identifisert-for-forste-gang-i-norge>

7. Vedlegg

7.1 Prosedyrer

Vedlegg 1 MRSA referanselab - Resistensbestemmelse

MRSA referanselab - Resistensbestemmelse

MRSA referanselab - Resistensbestemmelse

Forfatter: Torgrim Wullum

Gyldig fra: 09.08.2018

Revisjon: 1.5

Godkjent av: Hege Enger, Vibeke Lystad

Revisjonsfrist: 08.08.2020

ID: 24027

KOPI
Sign.: *ARL* Dato: 13/5-19

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre at resistensbestemmelse av MRSA-stammer ved MRSA referanselab blir utført på en korrekt måte.

Prosedyren gjelder alle MRSA-stammer som mottas ved referansefunksjonen og hvor antibiotikaresistens skal undersøkes ved agardiffusjon med antibiotikalapper.

Ansvar

Prosedyren gjelder bioingeniører ved MRSA referansefunksjon som skal utføre resistensbestemmelse på MRSA-stammer som mottas fra andre laboratorier.

Arbeidsbeskrivelse

Reagenser/utstyr

Generelle reagenser og utstyr for resistensbestemmelse ved agardiffusjon er beskrevet i prosedyre [Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper](#)

Antibiotika

Antibiotikalappene appliseres vha. egne dispensere. Hver dispenser har rom for 6 patroner med antibiotikalapper. MRSA-stammene testes for 12 antibiotikum, og det benyttes derfor 2 dispensere. Antibiotikalappene er fordelt i dispenserne som vist i tabell 1. Samt sette opp MIC-test for Vancomycin på alle stammer.

I tillegg er det flere MIC-tester som benyttes ofte på MRSA referanselaboratorium: GRD (Glycopeptide Resistance Detection); teicoplanin/vancomycin, oxacillin, cefoxitin og linezolid.

Tabell 1: Fordeling av antibiotikalapper i dispensere.

"MRSA ref.lab. 1"			"MRSA ref.lab. 2"		
Antibiotikum	Kons. (µg)	Dispenserkode	Antibiotikum	Kons. (µg)	Dispenserkode
Cefoxitin	30	FOX	Ceftaroline	5	CPT
Erytromycin	15	ERY	Gentamycin	10	GEN
Clindamycin	2	CLI	Rifampicin	5	RIF
Fusidin	10	FUC	Mupirocin	200	MUP
Trim-Sulfa	25	TMS	Ciprofloxacin	5	CIP
Tetracyclin	30	TCY	Linezolid	10	LZD

Antibiotikalapper og MIC-strips oppbevares i rent kjøleskap på romnr.: 232.05.020A. Disse må tas ut av kjøleskap minimum 30 minutter før bruk for temperering.

Kontrollstamme

En kontrollstamme (CCUG 15915; meticillinsensitiv *S.aureus*) tas med i hvert oppsett. Utførelse og avlesning av resistensoppsett er den samme som for MRSA-stammene.

For GRD benyttes kontrollstamme CCUG 15915 som negativ kontroll og ATCC 700699 som positiv kontroll. Dette settes opp som kontroll når nytt lot-nr. taes i bruk.

Hvilke stammer skal resistenstestes

Referanselaboratoriet har som mål å ha resistensdata for alle innsendte MRSA-stammer (manglende data for enkelte antibiotika godtas). Innsenderlaboratoriene skal sende resistensdata sammen med stammene. Referanselaboratoriet utfører resistensbestemmelse ved disse kriteriene:

- Innsenderlaboratoriet ikke har sendt resistensdata.
- Mangelfull resistensdata (når mindre enn 9 antibiotikum er testet).
- Manglende data for cefoxitin eller ved angitt mm-sone 22 mm (i slike tilfeller settes på cefoxitin og oxacillin mix-test i tillegg).
- Manglende data eller resistente stammer for linezolid (MIC-test for linezolid settes opp hvis resistens).
- Blodkultur og invasive isolater. Settes MIC-test for GRD i tillegg.
- Ved prosjektsammenheng.
- Resistens settes opp på stammer som blir negative på mecA (og mecC) for å avkrefte om det er MRSA.

Utførelse

- Innsendte resistensdata legges inn i regneark for resistensdata. Legg inn alle prøvene i nummerrekkefølge. Dette gjøres med utgangspunkt i rekvisisjonene før de deles i prioriterte og ikke prioriterte prøver. Dette for å sikre at man får med prøver som evt ikke har innsendt resistensdata også.
- MRSA-stammene som skal resistenstestes føres inn i skjema for resistensoppsett (under fanen relatert). Hver stamme gis et fortløpende nummer i det aktuelle oppsettet, som forenkler merking av skåler og rør.
- Tre agar-skåler pr. stamme merkes med stammens ID i henhold til skjemaet. Kan med fordel også merkes med "A", "B" og "V", eller "I", "II", "III" for å skille mellom dispenserne og lette avlesningen.
- Resistensbestemmelsen utføres ved at stammen slemmes opp til 0,5 McFarland i saltvann til homogen blanding. Deretter svabbes skålene med bomullspinne vha en rotator. Antibiotikalappene legges på vha av dispenser, MIC-strip legges på vha pinsett. Se prosedyre [Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper](#) for detaljer.
- **Husk 15 minutters-regelen!**
Oppslemming → **15 (60) min** → swabbing → **15 min** → applisering → **15 min** → inkubering.
- GRD oppsett settes opp med MH-buljong på MH-skål med blod. Dersom lot-nr. er kontrollert ved mottak (testet med positiv og negativ kontroll) trenger man ikke ta med kontroller. Se egen prosedyre for oppsett og avlesning.
- Oppsett av resistens bør ikke gjøres før lunsj for å unngå for lang inkubering av skålene. Sett opp resistens etter lunsj, og ta skålene ut av inkubatoren neste morgen.

Avlesning

Resistensskålene avleses etter 16-20 timer inkubering, eller tas ut av inkubator og lagres i kjøleskap til de blir avlest.

Veksten på resistensskålene skal være jevn og konfluerende. Vær oppmerksom på vekst inne i sonen. Dette kan være uttrykk for resistent subpopulasjon (heteroresistens) eller blandingskultur (forurensning).

Hemmingssonen måles ved full inhibering av vekst slik det ses med det blotte øyet.

Sonens diameter måles ved hjelp av skyvelære, og avrundes ned til nærmeste hele millimeter. Skåla skal leses av fra baksiden, og mot mørk bakgrunn.

Resultat føres direkte inn i regneark (Excel) for resistensavlesning: I:\...MRSA\Resistens\Resistens MRSA (<År>).

Kontrollresultater føres inn i samme regneark, under arkfane "CCUG 15915".

I fane «Tabell» i regnearket finnes en grafisk fremstilling av fordelingen i resistens på de faste antibiotikaene.

Spesielle hensyn:

- Erytromycin/clindamycin: Studer sonen med tanke på "blunting" (MLS_B-resistens). Dette vises som en D-formet sone rundt clindamycin. Noter sonediameteren til clindamycin i regnearket (kan være S eller R), og sett verdi 1 i kolonnen for "blunting" (ICR).
- Trimetoprim-Sulfa: Overse svak vekst inntil lappen inne i sonen når denne har en tydelig rand.
- Linezolid: Undersøk med gjennomfallende lys (hold skåla opp mot lyset).
- Ved **uvanlige resistensfunn** må lappediffusjon gjentas, gjerne i triplikate og inkludert MIC-test dersom aktuelt.
- Ved **multiresistens** må det vurderes om stammen skal testes for antibiotikum som ikke inkluderes i rutinen (f.eks. vancomycin, daptomycin). **Konferer lege.**

Bestilling

Antibiotikalapper og MIC-strips bestilles på kort som finnes på romnr.: 232.03.070.

Avfall

Resistensskålene kastes i gul avfallsboks når alle stammene i oppsettet er avlest, og alle resultater er ført inn i regnearket. Blodskålene kan kastes hvis andre undersøkelser (genotyping) er besvart. Ta vare på blodskålene hvis det kan være aktuelt med utvidet resistenstesting.

[Tilbake til søk](#)

Relaterte dokumenter

 [Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper](#)

Vedlegg

 [Arbeidsliste for resistens](#)

Vedlegg 2 MRSA referanselab – *MecC* fast PCR

Dokument «MRSA referanselab - *MecC* fast PCR», ID 35501 - EQS

Page 1 of 4

MRSA referanselab - *MecC* fast PCR

Forfatter: Torgrim Wullum
Godkjent av: Hege Enger

Gyldig fra: 15.06.2018
Revisjonsfrist: 14.06.2020

Revisjon: 1.2
ID: 35501

KOPI
Sign.: *lll* Dato: 13/5-19

Hensikt og omfang

Prosedyren skal kvalitetssikre PCR-analysen for påvisning *mecC* gen hos MRSA som er negative på *mecA*-gen som koder for cefoxitin-resistens.

Grunnlagsinformasjon¹

Meticillin-resistens hos *S. aureus* skyldes hovedsakelig *mecA*-genet, og i sjeldne tilfeller *mecC*-genet (*mecA_{LGA251}*). *mecC*-genet er en variant av *mecA*, som har 70% likhet i nukleotidsekvens, og vil ikke påvises med PCR for *mecA*. I påvisning av *mecC* benyttes to ulike primersett. Primersett 1¹ påviser både *mecA* og *mecC* (gir samme fragmentlengde) mens primersett 2² er spesifikke primere for *mecC*. Begge PCR-ene kjøres for påvisning av *mecC*. Primersett 1 fungerer som en alternativ test på *mecA* slik at dersom denne er positiv, men primersett 2 er negativ vil resultatet være at prøven er *mecA* positiv. Av denne grunn brukes både *mecA* og *mecC* positiv kontroll.

PCR-produkt:

Primersett 1: **356 bp**

Primersett 2: **138 bp**

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Bioingeniører tilhørende fagfeltet.

Analysemateriale

DNA isolert fra *Staphylococcus aureus* – stammer som er cefoxitin-resistente og *mecA* negative

Kontroller

Negativ kontroll: MGW vann

Positiv kontroll I: *S. aureus* CCUG 60578 (*mecA*)

Positiv kontroll II: *S. aureus* CCUG 13552 (*mecC*)

Positiv kontroll spres hver uke av Substratlaboratoriet og kan hentes hver mandag.

Positiv kontroll II er ferdig ekstrahert og står i boks for kontroller i -80 graders fryser.

Utstyr

PCR-maskin:

- Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler.
Strips:
- Applied Biosystems. MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0.1 ml (Cat.no 4358293)
Lokk/strips:
- Applied Biosystems. MicroAmp®™ 8-cap Strips, (Part No. N8010535)

Reagenser

AmpliAq Gold® Fast PCR Master Mix, Applied Biosystems Cat.no 4390941 (2500 rxn), 4390939 (250 rxn)

Molecular Grade Water (MGW-vann), bestilles via SAP

Primersett bestilles fra BioNordika:

mecC primersett 1¹:

- Forward primer: *mecC*-f: 5'- TCACCAGGTCAAC[Y]CAAAA-3'
- Reverse primer: *mecC*-r: 5'- CCTGAATC[W]GCTAATAATATTC -3'

<http://eqsstolav/cgi-bin/document.pl?pid=stolav&DocumentID=35501&UnitID=62>

13.05.2019

mecC primersett 2²:

- Forward primer: *mecCII-f*: 5'- GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3'
- Reverse primer: *mecCII-r*: 5'- GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC-3'

Primere oppbevares i kjøleskap som tørrstoff, inntil de fortynnes med MGW-vann til en stockløsning på 100 mM. Denne løsningen oppbevares i fryser ved -20 °C. Stockløsningen fortynnes videre til 10 µM bruksløsning som skal brukes i PCR-reaksjonen. 50 µL av bruksløsningen fordeles i 1,5 mL mikrorør som oppbevares i fryser ved -20 °C. Tines ved behov og lagres i kjøleskap etter 1. gangs opptining.

Stockløsning = X nmol primer fortynnes i 10X MGW-vann til 100 mM.
Bruksløsning = Stockløsning fortynnet 1:10 med MGW-vann til 10mM

Eksempel stockløsning:

Tørrstoff primer = 85,9 nmol

(100 µM = 100 pmol/µL = 100 nmol/mL)

($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$)

85,9 nmol / x mL = 100 nmol / 1 mL

å x = 0,859 mL = 859 µL MGW-vann tilsettes tørrstoffet

Eksempel bruksløsning:

Tillaging av 0,5 mL

($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$)

100 µM * x mL = 10 µM * 0,5 mL

X mL = (10 µM * 0,5 mL) / 100 µM

X = 0,05 mL = 50 µL stockløsning som fortynnes i 450 µL MGW-vann

Pakningsvedlegg/ pdf-fil som mottas på mail etter bestilling av primere arkiveres i perm merket "Primere" på kontor 232.03.070 og kopi av pdf-fil legges i mappen "I:\Mikro\MRSA\Primere" med navn på primere og mottattdato.

Fremgangsmåte PCR

Arbeidsliste ligger under fanen Relatert.

Fyll ut arbeidsliste og skriv ut 2 eksemplarer, eventuelt ett eksemplar hvis det er mulighet for å hente arbeidslisten på skjerm på lab:

Ett til bruk i lab (eventuelt bruk skjerm) og ett til besvaring og arkivering.

Regneark for PCR mix og program med PCR betingelser ligger under fane Relatert.

PCR mix lages på 232.05.029 (renrom) i PCR-skap, med mulighet for UV – lys. Lag mix separat for de to ulike primersettene. Husk å beregne nok mix til negativ kontroll og to positivkontroller.

Lag PCR mix etter tabell i regneark, fordel i rør/strips/brett etter arbeidsliste og merk rør med analyse og dato.

Ta med rørene til lab 232.05.020A hvor DNA-isolat tilsettes til PCR mix i LAF-skap uten luftstrøm etter arbeidsliste.

PCR mix med DNA-isolat settes i PCR - maskin på instrumentrom 232.05.031

Velg program: " Fast spa-mecA-PVL" (Samme program som *mecA* PCR).

PCR-produkt tas med til ELFO-lab (232.05.030) og settes deretter opp på E-gel 2 % Agarose.
Resterende PCR-produkt settes i kjøleskap til prøver er ferdig besvart.

Oppsett på E-Gel Agarose

Analysemateriale

PCR-produkt fra *mecC*-PCR.

Utstyr:

E-Base® Power Supply fra Invitrogen
Multikanalpipette (12 kanaler) eller enkanalpipette.

Reagenser

- E-Gel 2 % Agarose, Invitrogen, Cat. no G5018-02. Oppbevares i romtemperatur på ELFO-lab.
- 1 kb DNA Ladder, Invitrogen, Cat. no 15615-016. Oppbevares i fryseskap ved ELFO-lab. Bruksfortynning 1:30. Fortynnet ladder fordeles i 0,2 mL mikrorør og merkes med dato, fortynning og initialer på oppbevaringsboksen og lagres i fryser. Etter optiming settes det i kjøleskap på ELFO-lab.
- MGW-vann. Oppbevares i kjøleskap på renrom.

Frengangsmåte

Egen prosedyre for E-gel Agarose ligger under fanen Relatert.

Oppsett foregår på ELFO-lab i avtrekksskap.

Fortynning av ladder og PCR - produkt:

Pipetter 15 µL MGW vann og 5 µL ladder / PCR produkt ved bruk av gel med 12 brønner, evt 10 µL MGW-vann og 5 µL ladder / PCR produkt ved bruk av gel med 48 brønner.

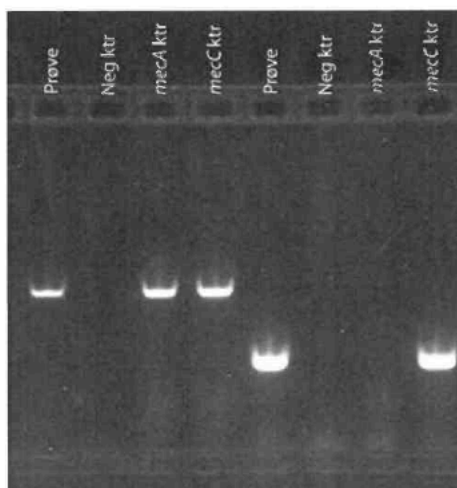
Tilsett fortynningen (20µl/15µL) i E-Gel brønnene etter arbeidsliste.

Sett på gelelektroforese umiddelbart etter tilsetning.

Ta bilde av agarosegelen ved hjelp av GelDoc. Egen prosedyre ligger under fanen Relatert.

Fest bildet til arbeidslisten og les av resultatet for den enkelte stammen. Svaret overføres til rekvisisjonen.

Tolkning av resultat



Brønn 1-4: Primersett 1

Brønn 5-8: Primersett 2

For at oppsettet skal være godkjent skal *mecA* og *mecC* kontroll være positive med primersett 1, og *mecC* kontroll positiv med primersett 2, samt begge negativ kontrollene være negative. Prøven er positiv på *mecC* dersom positiv på begge primersettene, eller positiv kun på primersett 2. Dersom prøven er positiv kun på primersett 1 er prøven *mecA* positiv. Ved negativt resultat på begge primersettene samt negativ på standard *mecA* PCR er prøven verken *mecA* eller *mecC* positiv.

Besvaring

Analysekode: **LGAR**

Positiv:

Svarkode: P

Negativ:

Svarkode: N

Referanser

1: García-Álvarez, L, Holden MT, Lindsay H, et al. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infect Dis*, 11(8), 595-603. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70126-8.

2: Stegger, M, Andersen, P.S, Kearns, A, et al. 2011. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LG251}*. *Clin Microbiol Infect*, 18(4), 395-400. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x.

Relaterte dokumenter

MRSA referanselab- Gel Doc 2000. Fotografering og lagring av etidiumfargede geler

MRSA referanselab - E-Gel Agarose / E-Gel with SYBR Safe

Vedlegg

Arbeidsliste MecC

Reaksjonsmikros og Program MecC

Vedlegg 3 Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper

Dokument «Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper», ID 8496 - E... Page 1 of 6

Resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode og Oxoid-lapper

Forfatter: Alexander Husby Albertsen, Toril Nordtømme
Godkjent av: Aleksandra Jakovljevic

Gyldig fra: 10.05.2019
Revisjonsfrist: 09.05.2021

Revisjon: 4.0
ID: 8496

KOPI
Sign: *AK* Dato: 13/5-19

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre at undersøkelsen av bakteriers følsomhet for forskjellige antibiotika blir utført på korrekt måte.

Prosedyren gjelder alle bakterieisolater som skal undersøkes med henblikk på antibiotikaresistens ved hjelp av agardiffusjon og Oxoid-lapper basert på EUCAST's resistensmetode.

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Prosedyren gjelder alle bioingeniører ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi som skal utføre resistensbestemmelse.

Reagenser/utstyr

Resistensagar

Det benyttes 2 typer medier til de ulike typer bakterier:

- Mueller Hinton agar (MH) benyttes til Enterobacterales, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. og *Enterococcus* spp.
- Mueller Hinton agar med defibrinert hesteblood og β -NAD (MF-F) benyttes til *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* gr A, B, Cog G, *Streptococcus viridans*gruppen, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp, *Aerococcus* spp, *Kingella kingae*, *Campylobacter jejuni* og *Campylobacter coli*.

Mediene produseres ved substratlaboratoriet i 9 cm petriskåler, og oppbevares ved +4-8 °C.

Resistenslapper fra Oxoid.

Resistenslappene består av tynne papirlapper innsatt med antimikrobielt middel (antibiotikum). Lappene er 6 mm i diameter og er kodet med medikamentkode og konsentrasjon for enkel identifisering. Lappene har lang holdbarhet ved riktige lagringsbetingelser og oppbevares ved +20 - +8 °C (lagres vanligvis på kjølerom 232.03.019).

Resistenslappene ligger i patroner som er uknuselige og fjærladet for enkel dispensering. Hver patron inneholder 50 lapper, som er pakket individuelt i folie sammen med tørkepute for å opprettholde lav luftfuktighet og dermed sikre lang holdbarhet.

Densitometer

Det benyttes densitometer som måler i området 0,3-5,0 McFarland. Densitometrene kalibreres 1 gang pr måned. Se prosedyre  DEN-1 densitometer, kalibrering.

Inokulator (rotator)

Semiautomatisk instrument med en konstant omdreiningshastighet for sirkulær spredning av biologiske produkter på petriskåler (9 eller 14 cm i diameter).

En bomullspinne dyppet i bakterieoppslemming dras først tvers over skåla. Deretter plasseres skåla på rotatoren og bomullspinnen dras fra midten til kanten eller fra kanten til midten på petriskåla: En lang, sammenhengende spiral gir en jevn fordeling av bakterien.

Dispensere

Et hjelpemiddel fra Oxoid til lapping av resistensskåler. Hver dispenser har plass for 6 rør med antibiotikalapper, slik at en enkelt kan lappe mange resistensskåler som skal ha samme antibiotikalapper.

Dispenserne har justerbar høyde for ulike agardybde som sikrer nøyaktig plassering av lappene. Dispenseren plasseres i en lufttett oppbevaringsboks med tørkepute når den ikke er i bruk.


Tørkeputene tørkes etter behov ved 55°C over natt. Signeres på eget skjema som henger ved dispenser.

Dersom lappene ikke faller ned som de skal, bør dispenserne rengjøres med sprit.

Skyvelær

Et måleverktøy som gir en nøyaktig avlesning av bakteriens hemningssone (mm).

Nitrocefin

Nitrocefin benyttes til å påvise betalaktamaseproduksjon hos en del bakterier. Se prosedyre  [Betalaktamasepåvisning](#).

Sjablonger

Et hjelpemiddel til avlesning av resistensoppsett, og som forenkler gjenkjennelsen av lappene.

Sjablongen består av folierte A4-ark med sonediameter for hvert antibiotikum som tilsvarer brytningspunktet for den aktuelle bakterien. I tillegg har sjablongen også opplysninger om diverse resistensmekanismer man må være oppmerksom på ved avlesning.

Millimetergrensene tilsvarer brytningspunkter anbefalt av NordicAST (se lenke under relatert).

Følsomheten oppgis:

- S = sensitiv
- I = intermediaær
- R = resistent

Aktuelle isolater

NordicAST har foreløpig utarbeidet sonegrenser for disse bakteriene:

- Enterobacterales
- *Pseudomonas* spp.
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Acinetobacter* spp.
- *Staphylococcus* spp.
- *Enterococcus* spp.
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus* gr A, B, C og G
- *Streptococcus viridans*gruppen.
- *Haemophilus influenzae*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Pasteurella multocida*
- *Listeria monocytogenes*
- *Aerococcus urinae* og *sanguinicola*
- *Kingella kingae*
- *Corynebacterium* spp (unntatt *C. diphtheriae*)
- *Campylobacter jejuni* og *Campylobacter coli*

Andre bakterier enn disse er derfor uaktuelle å resistensteste med lappediffusjon.

Resistensbestemmelse av f.eks *Bacillus* spp, difteroider staver og *Eikenella* må utføres med MIC-bestemmelse der behandling er indisert (konf. lege).

ATU

ATU (Areas of Technical Uncertainty) er definert fra EUCAST og er ment som en advarsel til laboratoriet om at tolkningen av testen er usikker i det aktuelle området. Dette gjelder både lappediffusjon og MIC. Diskuter gjerne med andre bioingeniører og leger for riktig beslutning. Se også eget skriv om dette i brytningspunktstabellen på [NordicAST](#).

Mulige tiltak dersom en havner innenfor ATU kan være å:

- Repetere testen
- Bruke en alternativ test (MIC testing eller genotypisk metode)
- Nedgradere følsomhetskategoriseringen.
- Inkludere informasjon om usikkerhet i svarrapporten.
- Ikke inkludere antibiotika i svarrapporten.

Mek at dette er kun veiledende tiltak. Hvert enkelt tilfelle behandles ut fra klinikk, prøvemateriale og alvorlighetsgrad (f.eks urinprøve vs blodkultur)

Bakterieart	Antibiotika	ATU sone
Enterobacterales	Piperacillin-tazobaktam	17-19 mm
	Ciprofloxacin (untatt Salmonella)	22-24 mm
Pseudomonas spp.	Piperacillin-tazobaktam	18-19 mm
	Ceftazidim-avibaktam	16-17 mm
Staphylococcus epidermidis	Cefoxitin	25-27 mm
H. influenzae (alle ATU gjelder kun ved positiv benzylpenicillin screening (<12mm) og betalaktamase negativ)	Ampicillin	16-19 mm
	Amoxicillin-klavulansyre	14-16 mm
	Piperacillin-tazobaktam	24-27 mm
	Cefotaxim	25-27 mm
	Ceftriaxon	31-33 mm
	Cefuroxim	25-27 mm

Utførelse

De fleste bakteriegrupper har faste pakker for hvilke antibiotika de testes mot og hvilken type resistensmedium de skal ha. Oversikt over dette ligger under "Skjema for resistensoppsett" og "Resistensbestemmelse av spesielle prøvematerialer og bakterieisolater" som ligger under relatert.

Stammene som skal testes må være renkultur. Resistensbestemmelse av blandingskultur er uakseptabelt pga mulig uoversiktlig interferens mellom ulike stammer. Renkultur må derfor etableres og stammene testes på nytt hver for seg. Det er viktig å studere sonen med tanke på innvekst i sonen. Slik innvekst kan være uttrykk for resistent subpopulasjon eller blandingskultur.

- Den aktuelle bakteriestammen føres opp på et resistensskjema med opplysninger om prøvenummer, bakterietype, andre relevante opplysninger og evt. hvilke antibiotika bakterien skal testes mot.

- Merk agarskålen med bakteriestammens prøvenummer (minimum de 3 siste sifrene på selve skålen og hele prøvenummeret på lokket) og hvilken bakterietype det er, evt. hvilke antibiotikalapper som skal legges på (skrives på lokket).
- Stammen plukkes fra ikke-selektive medier. Dersom selektive medier ikke kan unngås, bør det plukkes fra medier uten antibiotika.
- Stammen slemmes opp i sterilt 0,85 % saltvann - **tetthet 0,5 McFarland** (pneumokokker plukket fra sjokoladeskål: 1,0 McFarland) (måles med densitometer). Suspensjonen må være homogen, bland med pipette eller vortexmikser.
- Fjern overflødig væske fra bomullspinnen mot innsiden av røret (spesielt viktig for **Enterobacterales, Pseudomonas og Haemophilus. Gram positive kokker** bør svabbes med en litt våt pensel). Deretter svabbes agarskålen vha en rotator. Oppslemmingen bør ikke stå lenger enn 15 minutter (max 1 time) fra oppslemming til svabbing.
- Antibiotikalappene legges på inkulert agarskål innen 15 min. Legg på lappene ved hjelp av Oxoid's dispensere eller enkeltvis med Oxoid's single-disc-dispenser. Lappene må ikke flyttes etter at de har berørt agaren. Påse at hele lappen har god kontakt med agaroverflaten.
- Inkuber skålene innen 15 min. etter lapping i inkubatoren med lokket opp i stabler på opptil 7-8 skåler (bruk helst en tom skål i midten for å oppnå raskere fordeling av temperaturen). Skålene inkuberes ved $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ i 18 ± 2 timer. MH inkuberes i vanlig atmosfære, MH-F i atmosfære med 5 % CO₂.

Avlesning

Påse at riktig skål blir lest av mot riktig prøvenummer på resistensskjemaet.

Resistensskålene skal ha jevn konfluerende vekst slik at sonene lett kan avleses. Sonene måles ved full inhibering bedømt med det blotte øye. Dette gjelder for både bakteriostatiske og baktericide midler. Se for øvrig "Reading guide" fra EUCAST (se lenke under relatert).

Hemningssonens diameter avleses med skyvelær eller tilsvarende hjelpemiddel, mål evt radius og multipliser med 2. Hemningssonen avrundes til nærmeste hele mm.

For gjennomsiktede medier leses det av fra baksiden av skåla, **benytt mørk bakgrunn**.

Ved avlesning av skåler tilsatt blod, må man ta av lokket og lese fra oversiden av skåla. Linjal eller skyvelær holdes nær agaroverflaten og en siktet vinkelrett på grensene på begge sider av sonen en skal måle.

Det er viktig med god belysning.

For å vurdere om sonen er S, I, eller R, benyttes enten sjablongen tilhørende bakterietypen eller vedlegget "Brytningspunkter for aerobe bakterier".

Avlesning ved funn som krever spesiell oppmerksomhet:

Bakterieart	Antibiotika	Avlesning
<i>Proteus spp.</i>	Alle	Overse sverming.
Streptokokker	Alle	Avles vekstsone, ikke hemolysesone.
Alle bakterier	Trimetoprim Trim-sulfa	Overse svak vekst inntil lappen inne i sonen når denne har en tydelig rand.
Stafylokokker	Linezolid	Undersøk med gjennomfallende lys (hold skåla opp mot lyset).
Stafylokokker	Cefoxitin	Ved OXA: S. Noter mm-sone på resistensstripsen på isolater fra f.eks proteseinfeksjoner, fremmedlegemer, blodkulturer o.l. Dette gjelder også STKN der det ikke foreligger sikker ID på artsnivå.

Enterobacterales	Ampicillin	Overse svak vekst som kan opptre som en indre sone på enkelte batcher av MH-agar.
------------------	------------	---

Vurder også stammen med henblikk på diverse resistensmekanismer:

- **Betalaktamaseproduksjon** (se [Betalaktamasepåvisning](#)).
- **BLNAR** – "betalaktamase negative, ampicillin resistente" – hos *Haemophilus influenzae* (se [Betalaktamresistens hos Haemophilus influenzae](#).)
- **MLS_B-resistens**, induserbar resistens mellom erythromycin og clindamycin (se "MLS_B-resistens" under relatert).
- **ESBL** (se [ESBL hos Enterobacteriaceae](#), [ESBL flytskjema](#) og [ESBLkarba flytskjema \(Enterobacterales\)](#)).
- **MBL** (se [MBL-påvisning hos Pseudomonas aeruginosa](#)).
- **Aminoglykosidresistens** (se [Høygradig aminoglykosidresistens hos enterokokker og streptokokker](#))

Eventuelle agarskåler med spesielle problemstillinger (resistensmekanismer/urene isolater) leveres aktuell arbeidsstasjon sammen med resistenskjemaet.

Avfall

Avleste agarskåler oppbevares på kjølerom 232.03.015. 2 dager etter avlesning før de kastes i smitteavfall. Unntak er etter helg, skåler fra lørdag søndag bør ikke kastes før tirsdag.

Besvaring

Se vedlegg tilhørende de forskjellige resistensmekanismene, vedlegget "Huskeliste ved besvaring av resistenser" under relatert og prosedyrer for de respektive bakterieartene.

Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll utføres alle hverdager med referansestammer for å teste at antibiotikalapper og medier fungerer som de skal. Se [Intern kvalitetskontroll av resistensbestemmelse av bakterier](#).

Dokumentasjon

- [Kvalitetskontroll av resistensbestemmelse av bakterier \(AFA\)](#).
- [Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål og metoder for resistensbestemmelse \(AFA\)](#)
- Oxoid's brukermanual "Resistensbestemmelse med agardiffusjon" (2006).
- "Referensgruppen for antibiotikafrågor"
- NordicAST
- Pakningsvedlegg for densitometer og for rotator.

Grunnlagsinformasjon

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) har laget en standardisert lappediffusjonsmetode for Europa. Med felles metode vil en kunne sammenligne resultater mellom ulike laboratorier og land. Det er derfor viktig at prosedyrene følges nøye.

Prinsippet for agardiffusjonsmetoden går ut på at bakterien spres utover en agarskål, og på overflaten legges lapper som inneholder kjente konsentrasjoner av ulike antibiotika. Antibiotikaen vil diffundere ut i mediet og det vil oppstå en gradient med avtagende konsentrasjon fra tablettene og utover. Hvis antibiotikaen hemmer bakteriens vekst vil det oppstå en sone omkring tablettene uten bakterievekst – en hemningssone. I en viss avstand fra tablettene blir konsentrasjonen så lav at bakterien ikke hemmes lenger.

For å oppnå mest mulig korrekt resultat, er en rekke faktorer viktige, f.eks agarens tykkelse, bakterietetthet og inokulatets tetthet.

Bakterietettheten er en av de variabler som påvirker resultatene av resistensbestemmelser mest. For å få riktige og reproduerbare resultater må inokulum standardiseres. EUCAST's metode er en standardisert metode basert på prinsipper fra en rapport av International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing (1972) og erfaringer fra ekspertgrupper over hele verden. Metoden gir konfluerende vekst.

Avlesning av hemningssonens diameter vurderes mot sonegrenser (diameter) som er utarbeidet fra europeiske brytningspunkter og publisert av EUCAST/ NordicAST (Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, som er en metodekomite med representanter fra Danmark, Norge og Sverige, og arbeider med metodeutvikling og standardisering innen resistensbestemmelse).

Relaterte lenker

[NordicAST](#)

Sonegrenser og brytningspunkter

Vedlegg

[Huskeliste ved besvaring av resistenser](#)

[MLSB-resistens.](#)

[Oversikt over uvanlig R på ulike bakterier](#)

[Resistensbestemmelse av spesielle prøvematerialer og bakterieisolater.](#)

[Sjablonger](#)

[Skjema for antibiotikaoppsett](#)

[Tørkeputer signeringsskjema](#)

Vedlegg 4 EZ1 Advanced XL, ekstraksjon av bakterielt DNA, bruk og vedlikehold

Dokument «EZ1 Advanced XL, ekstraksjon av bakterielt DNA, bruk og vedlikehold», ID 38... Page 1 of 12

EZ1 Advanced XL, ekstraksjon av bakterielt DNA, bruk og vedlikehold

Forfatter: Sandra Swendgaard Halvorsen-Fredheim, Ailin Falkmo Hansen, Elisabeth Westerhus Gyldig fra: 26.06.2018 Revisjon: 1.0
Godkjent av: Hege Enger, Vibeke Lystad

Revisjonsfrist: 25.06.2020 ID: 38423

KOPI

Sign. ~~SDA~~ Dato: 13/5-19

Innledning

EZ1 kan benyttes for automatisert ekstraksjon av bakterielt DNA. DNA isoleres fra forbehandlede renkulturer (lysat) ved at DNA bindes til magnetiske partikler dekket med silika. En magnet separerer de magnetiske partiklene fra resterende prøvemateriale, og DNA bundet til de magnetiske kulene, flyttes mellom forskjellige brønner som inneholder ulike vaskeløsninger. Etter endt vaskeprosess, frigjøres DNA fra de magnetiske partiklene ved varmebehandling, og samles opp i et eget rør.

Hensikt og omfang

Proseduren skal sikre korrekt bruk av ekstraksjonsinstrumentet EZ1 Advanced XL for ekstraksjon av bakterielt DNA, og omfatter:

- Isoleringsprinsipp
- Bruk av instrumentet for ekstraksjon
- Avslutning
- Vedlikehold

Ansvar

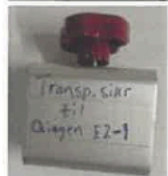
Bioingeniører og andre ved seksjon for medisin og FoU som skal ekstrahere bakterielt DNA ved bruk av EZ1 Advanced XL.

Utstyr

- EZ1 Advanced XL instrumentet er plassert på rom 232.05.020C.
- EZ1 DNA tissue kit Cat. No 953034 for ekstraksjon av bakterielt DNA (oppbevares på rom 232.05.020C).
- Protokollkort EZ1 Advanced XL DNA Bacteria Card v1.0 Cat. No 10677990 (oppbevares på rom 232.05.020C).
- Eppendorfrør er hyllevare på lager 232.03.013.
- Destillert vann er hyllevare på lager 232.05.013.
- Antibac desinfeksjon, overflate desinfeksjon 75 % etanolbasert er hyllevare på lager 232.05.013.
- Silikon, ligger i skuff under instrumentet på rom 232.05.020C.

Viktige komponenter i instrumentet:

Transportsikring:



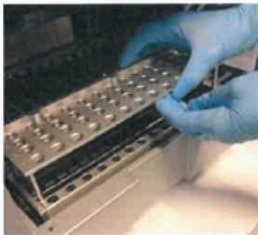
Hvis instrumentet skal flyttes på, må denne sikringen settes inn i instrumentet. Medisinsk teknisk avdeling skal vite hvor.

Reagenspatronstativ:



Dette er stativet til reagenspatronene.

Hullstativ:



Rør, pipettespissholdere og pipettespisser settes i dette stativet.

Arbeidsbeskrivelse

Ekstraksjonsinstrumenter ekstraherer mellom 1-14 prøver.

Forberedelse til ekstraksjon:

- Finn frem EZ1 DNA Tissue Kit som benyttes for ekstraksjon av bakterielt DNA.
- For hver prøve behøves:
 - Reagenspatron (Cartridge)
 - Eluatrør (Elution tube)
 - Pipettespissholder (Disposable Tip holder)
 - Pipettespiss (Disposable Filter-Tip)
 - Prøverør (Samle tube)
 - Protokollkort EZ1 Advanced XL DNA Bacteria Card v1.0

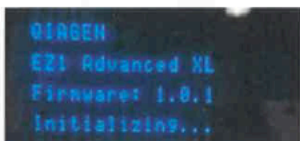
Lysisbufferen i reagenspatronene kan danne utfelling under lagring. Hvis dette skjer, sett reagenspatronene det gjelder i et varmeskap med 37 °C, til utfellingen har løst seg opp igjen.

Fremgangsmåte

1. **Før** instrumentet slås på, sett inn protokollkortet «Protokollkort EZ1 Advanced XL DNA Bacteria Card v1.0» eventuelt, sjekk om kortet allerede står i instrumentet.

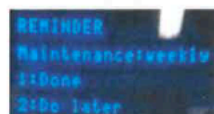


2. Slå på instrumentet med en knapp bak instrumentet på venstre side.
3. Følgende beskjed kommer opp på instrumentets display:



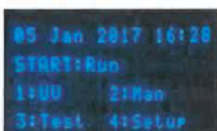
Beskjeden vil forsvinne når instrumentet er ferdig med initieringen.

4. Når det er tid for ukentlig vedlikehold vil instrumentet gi beskjed om det, ved at følgende melding kommer opp på displayet før hovedmenyen:



Trykk tallet 2 for «Do later» for å komme til startbildet.

5. Hovedmenyen vil komme frem:



6. Trykk «START»



for å starte forberedelsene til ekstraksjonen.

7. Følgende bilde kommer opp



og vil forsvinne etter kort tid.

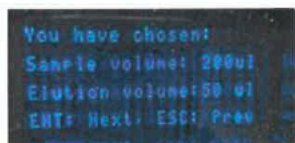


8. Det kommer et spørsmål om «Create report file». Trykk «ESC» for nei.

9. Instrumentets display viser «Select elution volume:»

9.1. Trykk tallet 1 for å velge 50µl.

10. Et bekreftelsesbilde kommer opp:



Trykk tasten «ENT» for å komme til neste bilde:



Instrumentets display viser «Load Cartridges»

10.1. Bruk hansker under videre arbeid.

10.2. Åpne døra forsiktig ved å skyve den opp.

10.3. Ta ut reagenspatronstativet ved å vippe det opp i bakkant og løft det ut på benken.



10.4. Reagenspatronene skal føres inn i et spor i stativet.

Når det er ført helt inn, må de trykkes ned til de klikker på plass.

10.5. Når alle reagenspatroner er satt i stativet, vend stativet 4 ganger for å få blandet opp reagensene.

10.6. Kakk stativet i bordet for å få samlet reagensene i bunnen av reagenspatronene igjen.

10.7. Sett stativet inn.

10.8. Trykk «ENT»

11. Instrumentets display viser «Load elution tubes (1,5ml) into first row»

11.1. Skru av korken.



11.2. Sett røret i posisjon 1 i hullstativet:

11.3. Trykk «ENT»

12. Instrumentets display viser «Load tip holders an tips into second row»

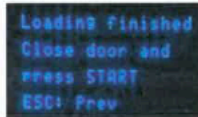
12.1. Sett pipettespissholderen i posisjon 2 og plasser pipettespissen i pipettespiss-holderen.

12.2. Trykk «ENT»

13. Instrumentets display viser «Load 2 ml tubes with sample into fourth row»

- 13.1. I et sikkerhetsskap, overfør 200µl lysat (forbehandlede renkultur av bakterier) til 2ml prøverør medfølgende kittet.
- 13.2. Plasser røret i posisjon 4 uten kork på.
- 13.3. Trykk «ENT»

14. Lukk døren forsiktig og trykk «START»,



- 14.1. Trykk «ESC» hvis det er aktuelt å se tidligere trinn i forberedelsesprosessen.
- 14.2. Ekstraksjonen tar 15 minutter uavhengig av antall prøver.
- 14.3. Instrumentet teller ned tiden det tar og ekstraherer. I tillegg forteller instrumentet hva det gjør til hvert tidspunkt.

15. Instrumentets display viser «Protocol finished»

- 15.1. trykk «ENT»

16. Så kommer følgende bilde opp:

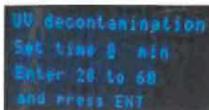


- 16.1. Hvis dette er dagens eneste eller siste ekstraksjon, trykk «ENT» for ja.
- 16.2. Skal instrumentet brukes flere ganger den dagen, trykk «ESC» for nei.

17. Følgende beskjed kommer opp «Remove eluates and consumables from the worktable»

- 17.1. Skriv på prøvenummer på korken. Se til at det er samme prøvenummer på korken som på røret.
- 17.2. Kast alt av avfall i en pose, for så å kaste det i en gul sikkerhetsboks.
- 17.3. Lukk døren.
- 17.4. Trykk «ENT»

18. Følgende bilde kommer opp:



```
UV decontamination
Set time 8 min
Enter 28 to 60
and press ENT
```

18.1. Trykk inn 60 min ved bruk av tallene under displayet.

18.2. Trykk «ENT»

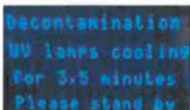
19. Følgende bilde kommer opp,



```
UV decontamination
Total time: 60min
Time left: 60min
```

Bildet viser valgte antall minutter UV lyset skal stå på, samt at det fortelle hvor lenge det er igjen til UV lyset slukker.

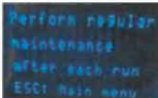
20. Når UV lyset slukker, vil følgende beskjed komme:



```
Decontamination
UV lamps cooling
for 3.5 minutes
Please stand by
```

På grunn av varmen fra UV lyset må instrumentet avkjøles før instrumentdøren kan åpnes, det er for operatørens egen sikkerhet. Bildet vil forsvinne etter nedkjølingen.

21. Når instrumentet har avkjølt seg, kommer følgende melding opp:



```
Perform regular
maintenance
after each run
ESC: Main menu
```

21.1. Trykk «ESC» for å komme tilbake til hovedmenyen.

21.2. Utfør regelmessig vedlikehold. Se under kapittelet «Vedlikehold» for fremgangsmåte.

21.3. Etter vedlikeholdet, gå tilbake til hovedmenyen og slå av instrumentet ved å trykke på knappen bak instrumentet på venstre side.

21.4. NBI protokollkortet må under ingen omstendigheter tas ut av instrumentet når instrumentet er påslått, da kortet kan kortslutte.

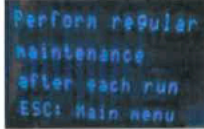
Det er mulig å sette på UV lys manuelt fra hovedmenyen. Trykk «1» og følg instruksene vist på instrumentets display.

Vedlikehold

EZ1 Advanced XL har innebygd klokke og kalender som kommer med påminnelser når det er tid for ukentlig og årlig vedlikehold.

Når daglig og ukentlig vedlikehold er utført, signer på sjekklisten ved instrumentet.

Regelmessig vedlikehold



Regelmessig vedlikehold består av å rengjøre «piercing unit» og er nødvendig etter hver ekstraksjonsrunde. Det er «piercing unit» som perforerer membranen på reagenspatronene. Under perforeringen kan reagens smitte over til «piercing unit» og føre til saltutfelling. Hvis dette ikke vaskes bort kan saltutfellingen overføres til de neste reagenspatronene som settes i instrumentet, og det kan få en uheldig virkning.

Det er kun nødvendig å rengjøre «piercing unit» som er brukt under ekstraksjonen.

Fremgangsmåte: rengjøring av «piercing unit».

- 05 Jan 2017 16:28
START:Run
1:00 2:Man
3:Test 4:Setup
1. Velg «Man» ved å trykke tallet «2».

- MANUAL OPERATION
1:Home 2:Return Tip
3:Clean 4:Resend
ESC:Back
2. Velg «Clean» ved å trykke tallet «3».

- MANUAL OPERATION
Clean piercing unit
START:Run
ESC:Back
3. Se til at instrumentdøren er lukket for så å trykke «START». Instrumentet vil senke ned «piercing unit» slik at de er tilgjengelig for rengjøring.

4. «Open door and clean piercing unit»



Åpne instrumentdøren og rengjør «piercing unit» med 70 % etanol etterfulgt av destilert vann. Bruk lofritt papir.

NB! «piercing unit» er veldig skarpe, det anbefales å bruke dobbelt sett med nitrilhansker.

5. Lukk instrumentdøren og trykk «ENT». «piercing unit» vil returneres til sin opprinnelige posisjon.

6. Trykk «ESC» for å returnere til hovedmenyen.
7. Slå av instrumentet.

Daglig vedlikehold

Daglig vedlikehold er kun nødvendig de dagene instrumentet er i bruk.

Hvis regelmessig vedlikehold ikke er utført, utfør det før daglig vedlikehold.

1. Rengjør arbeidsområdet og stativene i instrumentet med 70 % etanol.
2. Tørk o-ringene med lofritt papir.
3. Se etter om brettet i instrumentet er rent. Hvis det er nødvendig, rengjør det med 70 % etanol etterfulgt av destillert vann.
 - a. Slå av instrumentet.



- b. Ta ut hullstativet.



- c. Dytt rammen (se på bildet) bak mot bakveggen til instrumentet.

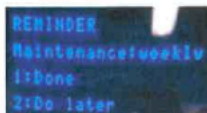


- d. Løft opp brettet fra bunnen av instrumentet etter brettets håndtak.



- e. Løft det helt ut for å rengjøre det. Brettet rengjøres med 70 % etanol etterfulgt av destillert vann. Bruk lofritt papir.
- f. Sett brettet på plass etter det er rengjort.
- i. Dra rammen mot deg til den.
 - ii. Sett hullstativet på plass.
 - iii. Lukk døren.

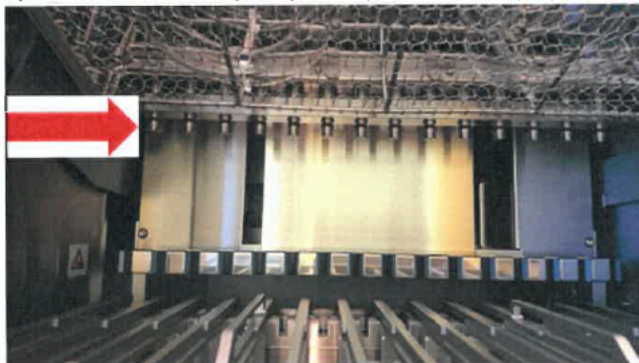
Ukentlig vedlikehold



Utfør daglig vedlikehold før ukentlig vedlikehold.

Ukentlig vedlikehold består av å smøre o-ringene. Dette er viktig for å vedlikeholde en god kontakt mellom pipettespiss-adapterne og pipettespissene og for å forhindre lekkasje fra pipettespissene.

1. Åpne instrumentdøren. Pipettespiss-adapterne vil være synlige.



2. Ta på hansker og ta litt silikon mellom tommelfinger og pekefinger. Smør silikonet rundt o-ringene.



3. Plasser en pipettespiss på pipettespiss-adapteren og roter spissen for å fordele silikonet jevnt rundt o-ringene.



4. O-ringene er ordentlig smurt hvis pipettespissen kan dyttes helt opp mot metallrammen. Det skal ikke være et mellomrom mellom metallrammen og pipettespissen.



5. Overflødig silikon tørkes av med lofritt papir.
6. Ved neste oppstart av instrumentet, trykk 1 for «Done» når påminnelsen om ukentlig vedlikehold kommer opp.

Årlig vedlikehold

REMINDER

Maintenance: Yearly

1: Done

2: Do later

Når vedlikeholdsmeldingen dukker opp, varsle fagansvarlig ved MRSA, seksjon for medisin og FoU. Eventuelt kontakt medisinsk teknisk avdeling. Årlig vedlikehold utføres av en QIAGEN Instrument Service Spesialist, men dette bestilles av Medisinsk teknisk avdeling.

- Trykk «2» på meldingen som dukker opp.

<http://eqsstolav/cgi-bin/document.pl?pid=stolav&DocumentID=38423&UnitID=62>

13.05.2019

- Instrumentet kan brukes som normalt frem til det årlige vedlikeholdet er utført.


Relaterte dokumenter

 Enzymbehandling av klinisk prøvemateriale og bakteriekultur før PCR.

 Qiagen EZ1 Advanced XL, verifisering av ekstraktor og DNA tissue kit med bakteriekort

7.2 Reagensvedlegg

Vedlegg 5 Reagensvedlegg for forward primer, revers primer og TaqMan probe brukt i real-time PCR-metoden.

<p>TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99 WWW.TIB-MOLBIOL.COM</p>			
<p>TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin</p>		<p>Orders, quotes dna@tib-molbiol.de</p> <p>Consultation design@tib-molbiol.de</p> <p>Troubleshooting service@tib-molbiol.de</p>	
<p>Dept. of Medical Microbiology St.Olavs Hospital LAB3VEST attn. Ailin Hansen Erling Skjalgssons gate 1 N-7030 Trondheim Norge</p>			
<p>Product Description no. 1929148</p>		<p>mecC-F</p>	
<p>TIB reference no : 019102876</p>		<p>22-mer 01.03.2019</p>	
<p>5' - AgATTTAAAgTAgTAgACggCA</p>			
<p><u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u></p>		<p>12,9 nmol / 12,9 µM</p>	
<p>Synthesis scale and purification :</p>		<p>Synthesis: 0,02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo</p>	
<p>5'-Modifications :</p>		<p>no</p>	
<p>Number of bases :</p>		<p>A : 9 G : 6 C : 2 T : 5 total 22</p>	
<p>Wobble bases and GC content :</p>		<p>Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 36,4 %</p>	
<p><u>Chemical properties and constant factors of the product :</u></p>			
<p>Molar extinction coefficient ϵ</p>		<p>264960 l / mol cm</p>	
<p>Molecular weight ammonium salt NH₄</p>		<p>7189,2 g / mol</p>	
<p>Molecular weight free acid :</p>		<p>6831,6 g / mol</p>	
<p>Picomoles per OD₂₆₀</p>		<p>3774,2 pmol / OD</p>	
<p>Micrograms per OD₂₆₀</p>		<p>27,1 µg / OD</p>	
<p><u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u></p>			
<p>Amount in optical units OD₂₆₀</p>		<p>3,4 OD</p>	
<p>Molar amount :</p>		<p>12,9 nmol</p>	
<p>Amount in µg mass units :</p>		<p>92,8 µg</p>	
<p><u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u></p>		<p>12,9 µM (pmol / µl)</p>	
<p>20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :</p>		<p>645 µl</p>	
<p>50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :</p>		<p>258 µl (To prepare stock solutions of</p>	
<p>100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :</p>		<p>129 µl different concentration)</p>	
<p><u>Mass concentration (for hybridization) :</u></p>			
<p>Concentration, if dissolved in 1 ml :</p>		<p>0,093 µg / µl</p>	
<p>Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :</p>		<p>1 : 186 dilution factor from a 1 ml solution</p>	
<p>To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :</p>		<p>928 µl</p>	
<p><u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u></p>			
		<p>50,0 °C</p>	
<p>Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)</p>		<p>46,5 °C</p>	
<p>Melting point GC/AT rule (ΔT = 2°C, G/C = 4°C)</p>		<p>60,0 °C</p>	
<p>Melting point G/C-content rule</p>		<p>51,7 °C</p>	
<p><u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u></p>			
<p>ΔG / ΔH / ΔS</p>		<p>-140,7 / -675,3 / -1793,8 kJ / mol</p>	
<p><u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u></p>			
<p>S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif. W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio</p>			
<p><input checked="" type="checkbox"/> We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.</p>			
<p><input checked="" type="checkbox"/> We accept VISA, Eurocard, Mastercard</p>			
<p>Gesellschaftsführer (CEO): Olfort Landt Handelsregister IHRB 93163 B Registergericht Berlin Charlottenburg</p>		<p>VAT-No.: DE 814 018 770 HS code: 2934 9990 / for Kis 3822 0000 DIAS no. 212820815 IDN: 020150331007 TIB No. 100-18162-22</p>	
		<p>Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10245 Berlin IBAN DE97 1008 0000 0565 4836 01</p>	

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Eresburgstraße 22-23 D 12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Ailin Hansen
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 1929149 **mecC-R**
 TIB reference no : 019102876 20 - mer 01.03.2019

5' - TTTCACCgATTCCCAAATCT

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

13,0 nmol / 13,0 µM

Synthesis: 0,02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo

no

A : 5 G : 1 C : 7 T : 7 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 40.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	196160 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	6310,6 g / mol
Molecular weight free acid :	5987,0 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	5097,9 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	32,2 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	2,6 OD
Molar amount :	13,0 nmol
Amount in µg mass units :	82,2 µg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	13,0 µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	651 µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	260 µl (To prepare stock solutions of
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	130 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,082 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 164 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	822 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	54,8 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	51,3 °C
Melting point G/C-content rule	56,0 °C
	50,2 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid.

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -145.5 / -639.2 / -1656.8 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio



We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin. We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsführer (CEO): Olbert Landt
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registeramt Berlin (Charlottenburg)

VAT-No.: DE 814 018 770 | HS code: 2934 9990 / for kits 8822 0000
 DUNS no. 312829815 | TIN 4260159380007 | EORI No. DE 8806085

Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE97 1008 0000 0505 3836 01
 SWIFT/BIC: COMDE33HAN33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH

Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany

Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99

WWW.TIB-MOLBIOL.COM



MOLBIOL

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology
St.Olavs Hospital
LAB3VEST
attn. Ailin Hansen
Erling Skjalgssons gate 1
N-7030 Trondheim
Norge

Orders, quotes
dna@tib-molbiol.de

Consultation
design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
service@tib-molbiol.de

Product Description no. 1929150 **mecC-probe**
TIB reference no : 019102876 27 - mer 01.03.2019

5' - 6FAM- TTTgCCCGCATTgCATTAgCATTAggA -- BHQ1

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

3,6 nmol / 3,6 µM

Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TMA 1.0 OD by

no

A : 6 G : 6 C : 6 T : 9 total 27

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 44.4 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ

Molecular weight ammonium salt NH₄

Molecular weight free acid :

Picomoles per OD₂₆₀

Micrograms per OD₂₆₀

281160 l / mol cm

8708,3 g / mol

8265,5 g / mol

3556,7 pmol / OD

31,0 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

Molar amount :

Amount in µg mass units :

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :

50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :

100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :

1,0 OD

3,6 nmol

31,0 µg

3,6 µM (pmol / µl)

178 µl

71 µl

36 µl (To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :

To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :

0,031 µg / µl

1 : 62 dilution factor from a 1 ml solution

310 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)

Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)

Melting point G/C-content rule

68,5 °C

65,0 °C

78,0 °C

60,7 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -218.8 / -924.1 / -2366.9 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.

W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio



We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin. We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsführer (CEO): Olbert Land
Handelsregister HRB 93163 B
Registergericht Berlin/Charlottenburg

VAT-No.: DE 814 018 770 | USt code: 2954 9990 / For kits 3822 0000
DUNS no. 312829815 | TIN 4260159380007 | EORI-No. DE 4806433

Commerzbank, Koppenstraße 93, D-10245 Berlin
IBAN DE37 1008 0000 0505 3836 01
SWIFT BIC: COBADE33

7.3 Resultater

Vedlegg 6 Resultater fra fenotypisk bestemmelse

Resultatene fra resistensbestemmelsen med agardiffusjonsmetode, antibiotikatabletter og MIC-tester er vist i tabell 13.

Tabell 13: Sonestørrelser (mm) som resultat av resistensbestemmelse med agardiffusjonsmetode, antibiotikatabletter og MIC-tester. Sonestørrelsene som er markert med grønt viser til at bakteriene er sensitive mot antibiotikumet. Der det er markert med rødt er bakteriene resistente mot aktuelt antibiotikum.

Stamme- nummer	CLI (DA)	FUC (FD)	TMS (SXT)	TCY (TE)	FOX	ERY (E)	CIP	LZD	CEFT (CPT)	GEN (CN)	RIF (RD)	MUP	OX	FOX
Kontroll CCUG 15915 (=ATCC 29213)	29	28	28	23	25	26	24	24	25	28	36	36	0,25	3
1	29	31	29	26	17	28	23	27	19	28	29	35	1,5	12
2	27	26	26	26	17	30	26	22	20	26	29	32	1,5	16
7	28	32	32	28	17	32	28	24	22	27	31	35	1,5	12
8	26	31	33	29	13	28	25	26	19	29	32	37	12	32
9	25	28	28	26	18	27	25	26	21	30	33	37	1,5	8
10	28	30	32	27	15	28	26	27	19	29	33	37	4	24
11	27	27	30	25	18	26	23	25	21	27	30	30	1	12
13	29	31	29	28	18	30	26	25	20	31	35	37	2	12
15	32	34	32	29	16	32	27	24	20	30	35	38	2	16
18	28	32	30	25	25	27	27	25	23	28	33	36	0,75	6
19	28	29	28	27	14	28	27	25	18	29	32	37	2	16
20	30	31	32	27	16	29	25	25	19	29	31	35	4	16

21	28	32	31	28	17	31	26	26	18	28	33	39	1,5	12
22	32	31	32	30	16	32	26	26	23	29	32	38	1	48
23	28	30	31	28	17	29	28	25	23	28	32	37	1,5	16
26	27	35	31	28	16	27	25	24	22	30	32	35	2	24
27	27	30	30	27	17	29	25	22	22	27	30	34	1	16
29	26	31	28	28	16	27	26	24	21	28	30	35	2	16
30	32	34	32	27	17	32	26	24	23	26	32	32	1	16
32	27	29	30	27	20	27	24	25	24	27	32	33	0,75	12
34	30	29	27	26	18	28	22	25	23	27	31	33	1	12
35	26	26	28	25	20	28	23	25	23	27	30	33	1	12
36	28	33	33	30	18	30	24	24	22	28	30	34	2	24
45	30	33	30	30	17	32	26	26	24	30	35	36	3	24
46	29	35	35	32	19	34	25	23	22	29	31	37	1,5	16
47	29	34	31	30	18	30	27	24	21	28	30	33	1,5	16
48	29	33	32	31	20	33	29	26	22	29	32	38	1,5	16
49	28	36	31	30	17	32	26	22	21	26	30	34	0,75	12
51	32	23	32	32	17	35	26	26	24	28	33	38	0,75	24
52	28	33	31	28	18	28	25	24	22	29	27	35	1	16

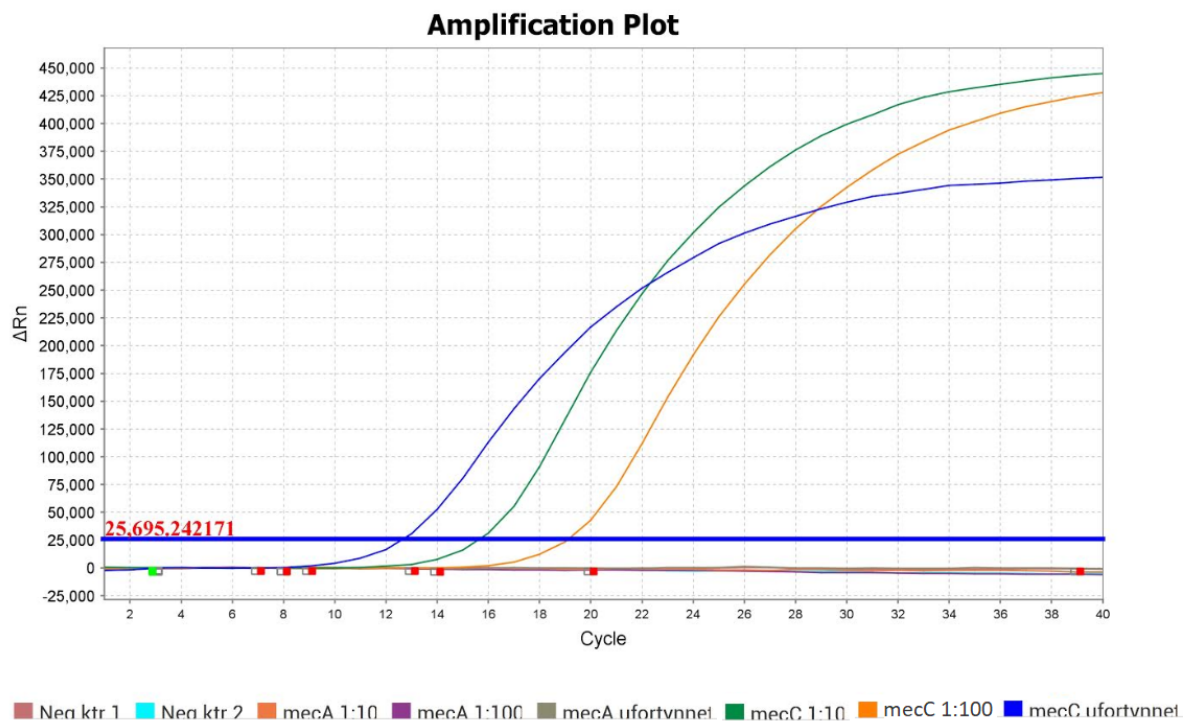
Prøve 22, 30, 34, 45, 46, 47, 48, 49 og 51 hadde sparsom vekst på skål A.

Prøve 34, 36 og 45 hadde sparsom vekst på skål B.

Prøve 13 og 36 hadde sparsom vekst på MIC-skål.

Vedlegg 7 Resultater fra utprøving av real-time PCR for påvisning av *mecC*

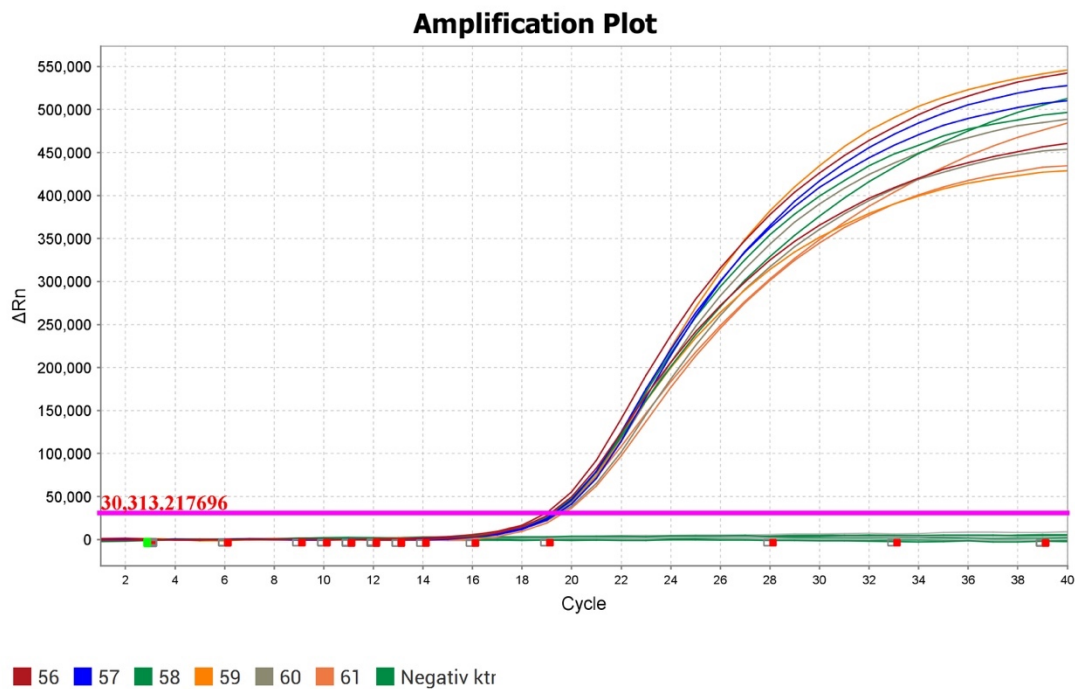
Kurvene fra første forsøk på å påvise *mecC* med real-time PCR er vist i figur 4.



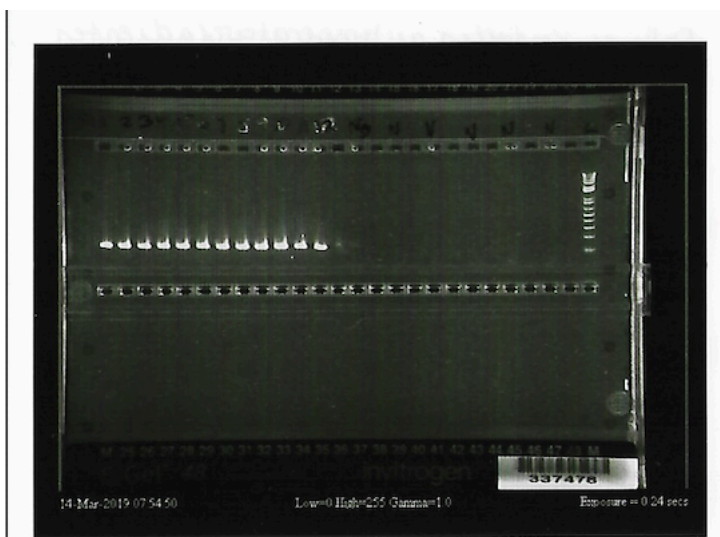
Figur 4: Kurvene fra første forsøk på å påvise *mecC* med real-time PCR.

Vedlegg 8 Resultater fra bestemmelse av egnet annealing-temperatur

Figur 5 viser kurvene fra testing av ulike annealing-temperaturer, og figur 6 viser resultatet fra kontroll av real-time PCR med gelelektroforese.



Figur 5: Kurvene fra testing av ulike annealing-temperaturer. De nummererte fargede rutene i figuren representerer ulike temperaturer som ble testet.



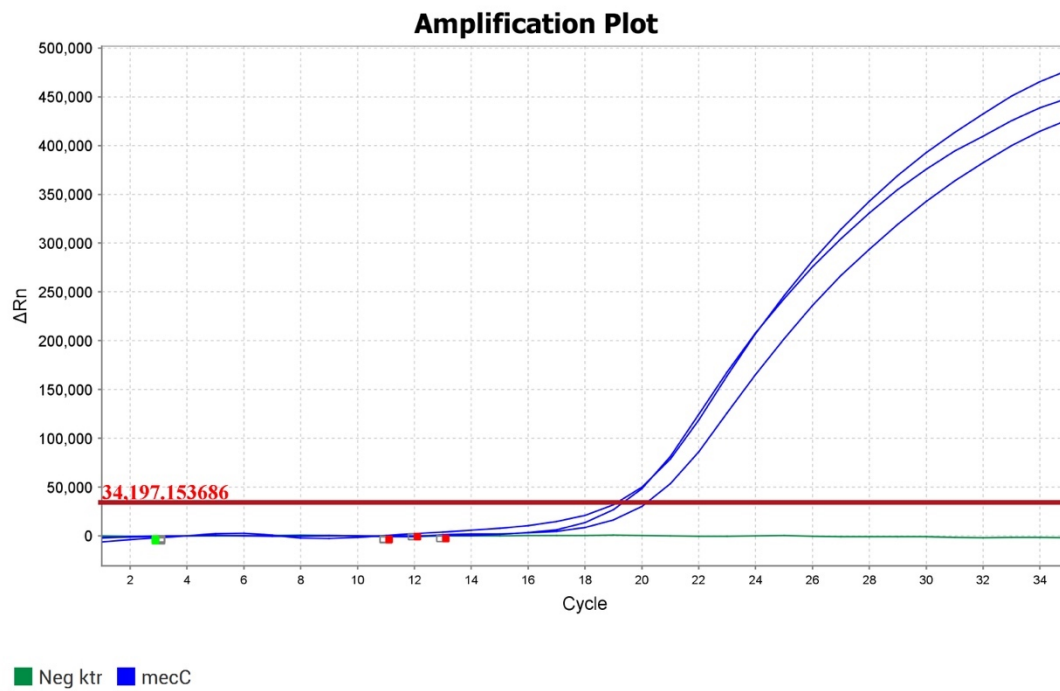
Figur 6: Resultat fra kontroll av real-time PCR med gelelektroforese.

Brønn 1 og 2 inneholder PCR-produkt fra 56°C, brønn 3 og 4 inneholder PCR-produkt fra

57°C, brønn 5 og 6 inneholder PCR-produkt fra 58°C, brønn 7 og 8 inneholder PCR-produkt fra 59°C, brønn 9 og 10 inneholder PCR-produkt fra 60 °C og brønn 11 og 12 inneholder PCR-produkt fra 61°C

Vedlegg 9 Resultat fra valg av real-time PCR-program

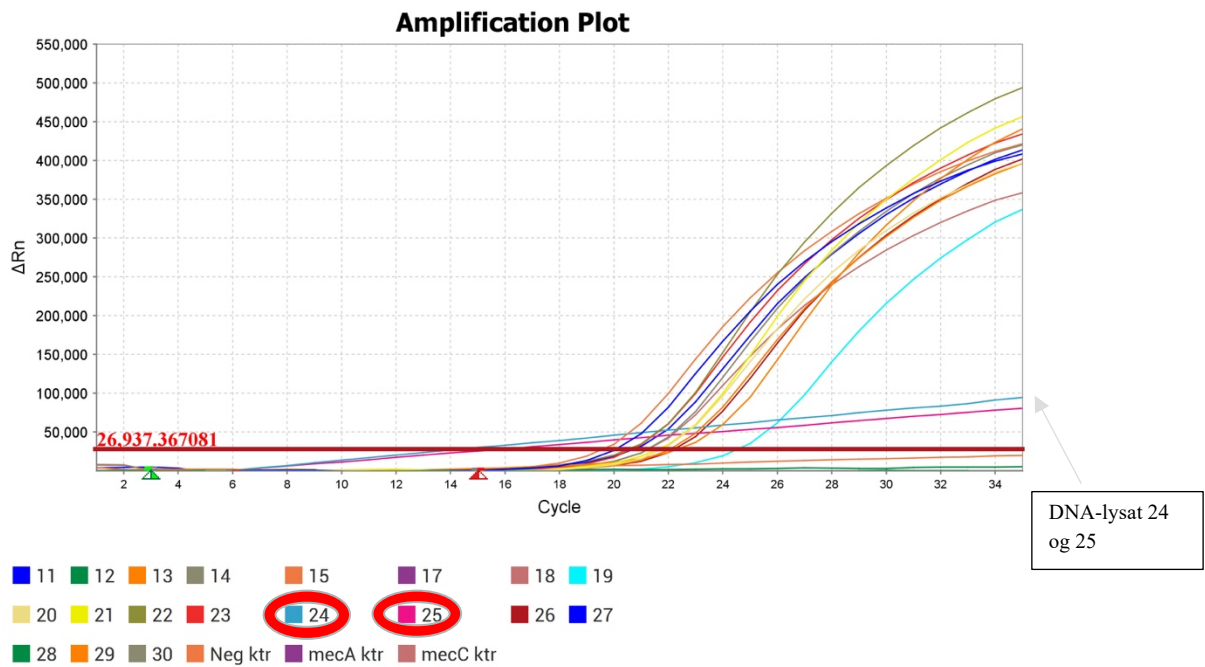
Figur 7 viser kurvene fra tidsmessige justeringer av real-time PCR-metode.



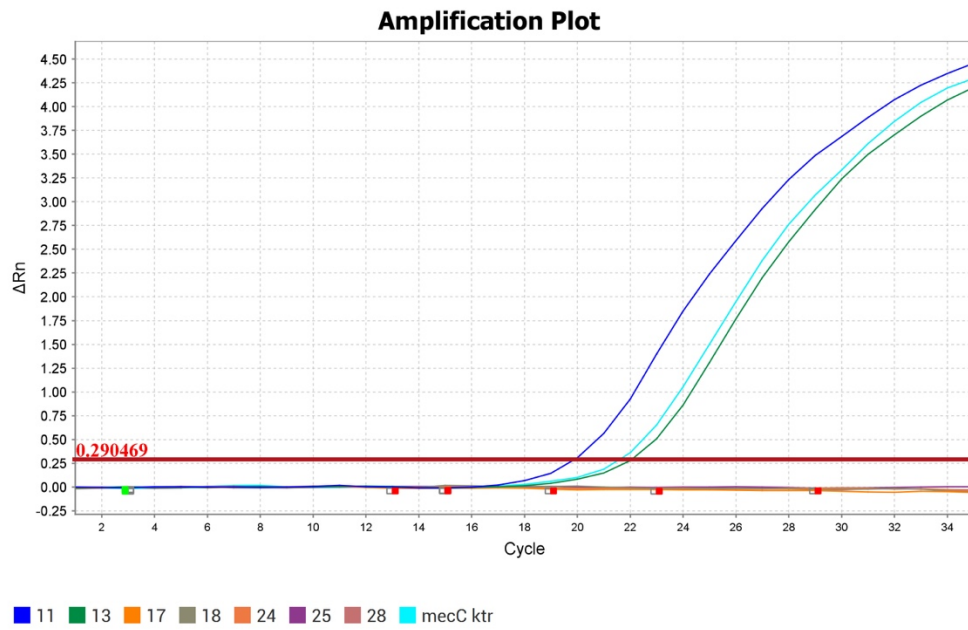
Figur 7: Kurvene fra tidsmessige justeringer av real-time PCR-metode.

Vedlegg 10 Resultater fra passiv referansekontroll med ROX

Figur 8 viser kurvene fra real-time PCR-program uten ROX, mens figur 9 viser kurvene fra real-time PCR-program med ROX, analysert på de samme bakterielysatsene.



Figur 8: Kurve fra real-time PCR-program uten ROX som referanse kontroll. DNA-lysat 24 og 25 viser en baselinje over terskelverdi, og det er dette resultatet som var utslagsgivende for videre testing med ROX.



Figur 9: Kurve fra real-time PCR-program med ROX som referanse kontroll. Kurvene for DNA-lysat 24 og 25 har i dette tilfellet lagt seg under terskelverdien.

Vedlegg 11 Resultater fra sensitivitetstesting og effektivitetstesting

Resultatene fra konsentrasjonsbestemmelsene er vist i tabell 14 og 16. Konsentrasjonen sier hovedsakelig noe om sensitiviteten for metoden, og er ikke nødvendig for å beregne effektiviteten. Konsentrasjonen er allikevel presentert, da konsentrasjonsbestemmelse ble utført som et ledd i denne effektivitetstesting.

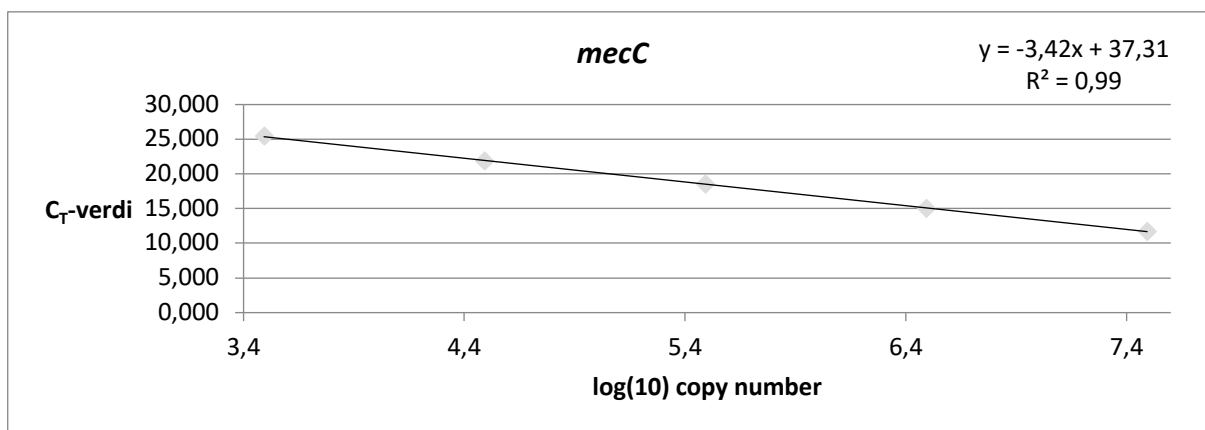
Tabell 15 og 17 viser de viktigste opplysningene, som ligger til grunn for beregning av effektiviteten. Laveste detekterte copy number er markert med oransje farge i tabell 15 og 17. C_T -SD er et beregnet standardavvik for parallellene, og sier noe om hvor like parallellene er.

Tabell 14: Konsentrasjon av *mecC*-kontroll brukt i effektivitetstest uten ROX

	Fluorescens-verdi	Konsentrasjon (ng/μL)
Standard 1	31,87	-
Standard 2	22597,74	-
Intern kontroll	-	10,7
Prøve (<i>mecC</i>-kontroll NCTC 13552)	-	47,0

Tabell 15: De viktigste opplysningene for beregning av effektivitet.

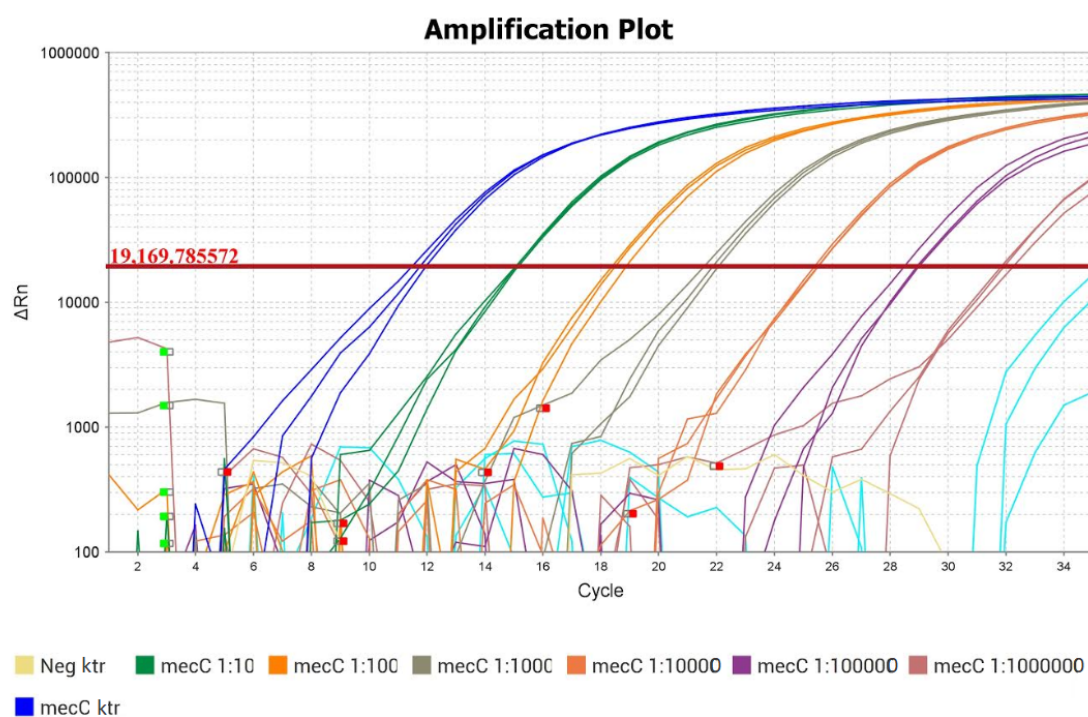
DNA-konsentrasjon (ng/μL)	Copy number	C_T -verdi	C_T -SD	C_T -differanse
4,7	31100000	11,710	0,250	3,360
0,47	3110000	15,070	0,058	3,493
0,047	311000	18,563	0,258	3,257
0,0047	31100	21,819	0,235	3,618
0,00047	3110	25,438	0,068	3,361
0,000047	311	28,799	0,284	3,173
0,0000047	31,1	31,972	0,177	-
0,00000047	3,11	-	-	-



Figur 10: Standardkurve fra effektivitetstesting.

Effektivitet = $10^{(-1/3,42)} - 1 = \underline{\underline{96,1\%}}$

(1)



Figur 11: Kurvene til parallellene av ulike fortyninger uten ROX i et logaritmisk plot.

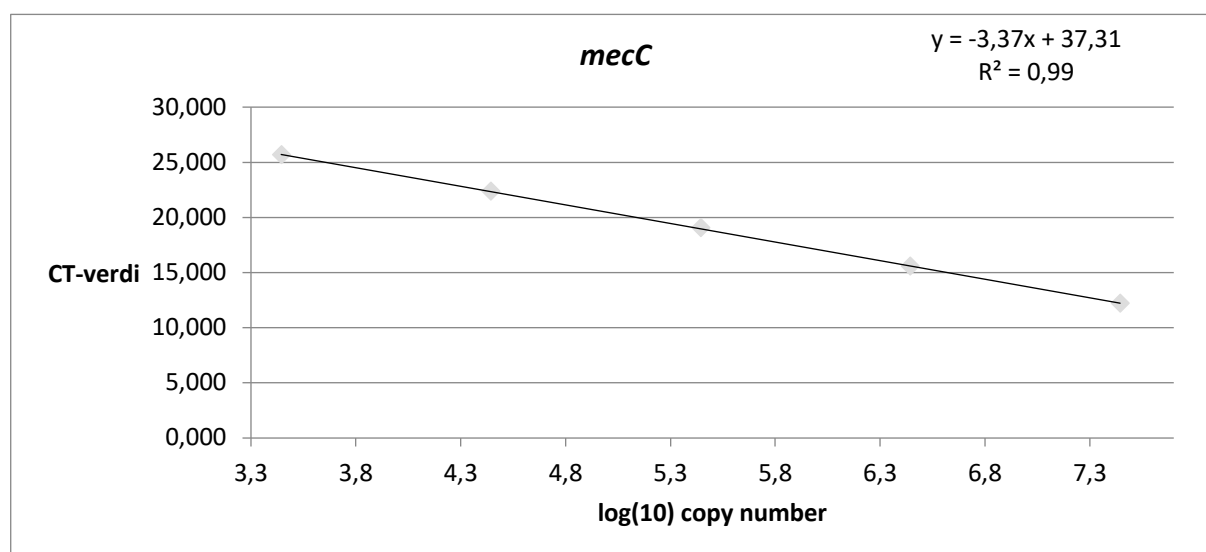
Tabell 16: Konsentrasjon av *mecC*-kontroll brukt ved effektivitetstesting med ROX.

	Fluorescens-verdi	Konsentrasjon (ng/ μ L)
Standard 1	45,08	-

Standard 2	20009,27	-
Intern kontroll	-	11,1
Prøve (<i>mecC</i>-kontroll NCTC 13552)	-	42,3

Tabell 17: De viktigste opplysningene for beregning av effektivitet med ROX.

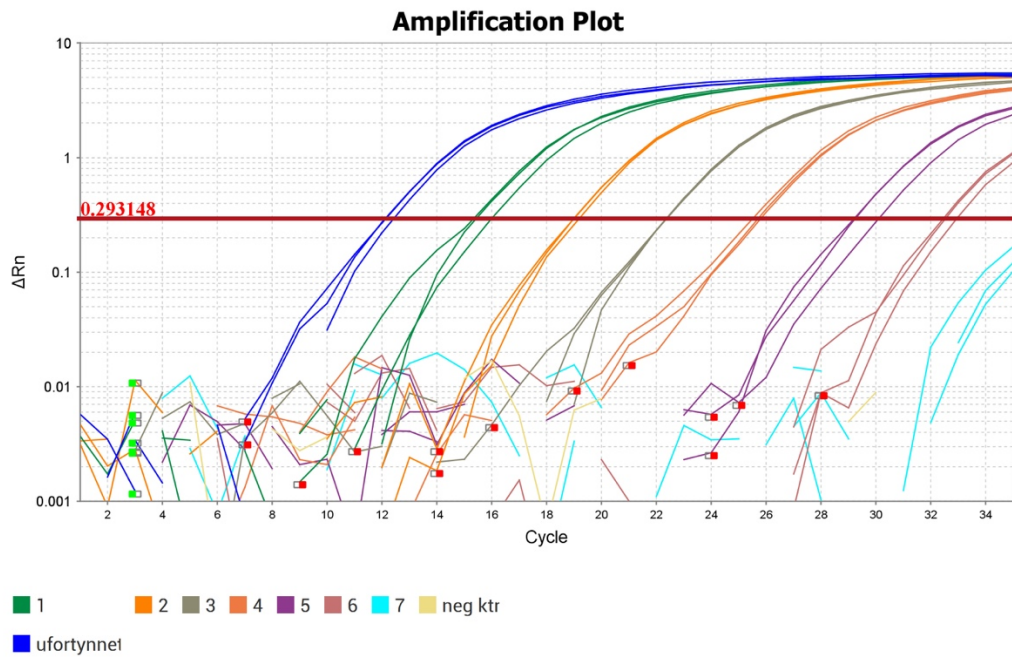
DNA-konsentrasjon (ng/μL)	Copy number	C _T -verdi	C _T -SD	C _T -differanse
4,2	27800000	12,199	0,173	3,382
0,42	2780000	15,582	0,367	3,453
0,042	278000	19,035	0,096	3,308
0,0042	27800	22,343	0,012	3,326
0,00042	2780	25,669	0,135	3,811
0,000042	278	29,480	0,509	3,078
0,0000042	27,8	32,559	0,284	-
0,00000042	2,78	-	-	-



Figur 12: Standardkurve fra effektivitetstest med ROX.

$$\text{Effektivitet} = 10^{(-1/3,37)} - 1 = \underline{\underline{98,0\%}}$$

(1)

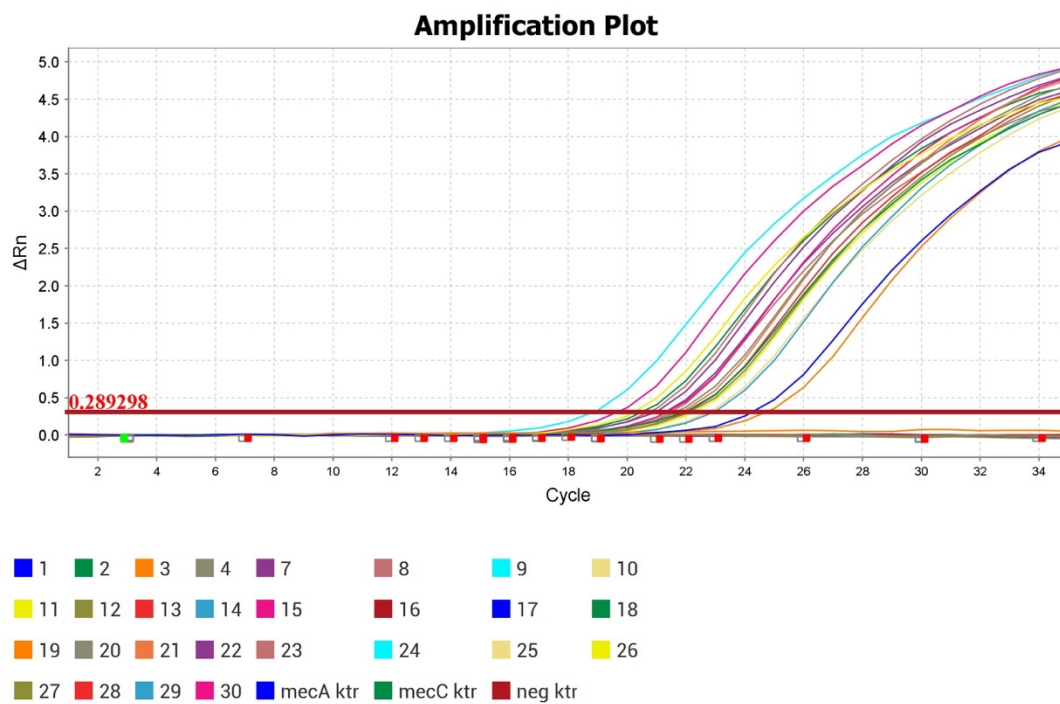


Figur 13: Kurvene til parallellene av ulike fortyninger med ROX i et logaritmisk plot.

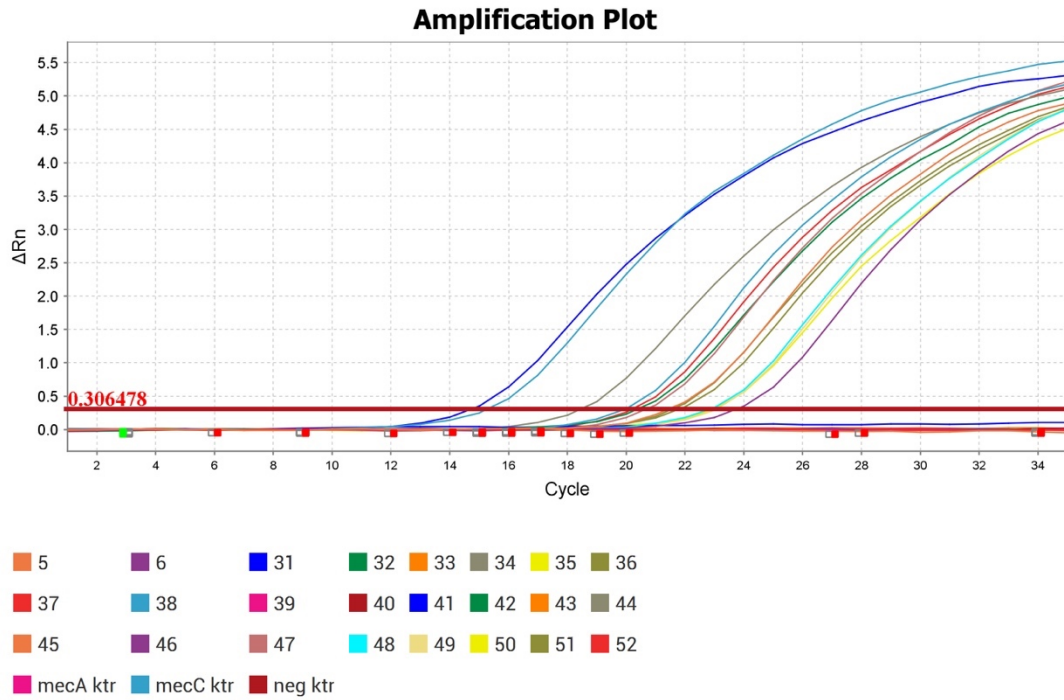
Vedlegg 12 Resultater fra spesifisitetstesting

Figur 14 og 15 viser kurvene real-time PCR-resultatene fra spesifisitetstesting. Figur 16-20 viser resultatene fra konvensjonell PCR, visualisert på agarosegel med gelelektroforese.

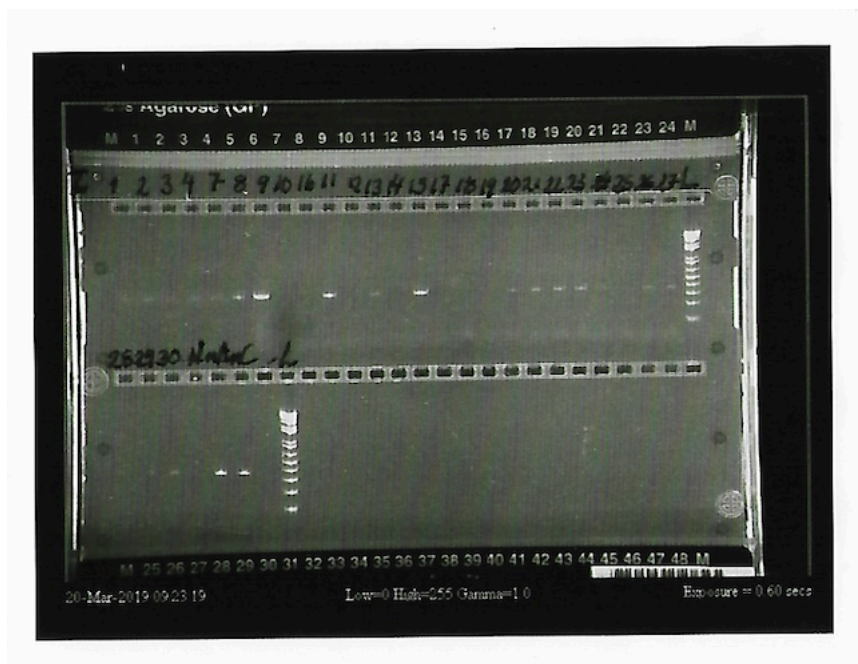
Tabell 18 viser resultatene fra hele spesifisitetstesting. Figur 21 viser kurven fra real-time PCR-analysen med ekstern kvalitetskontroll.



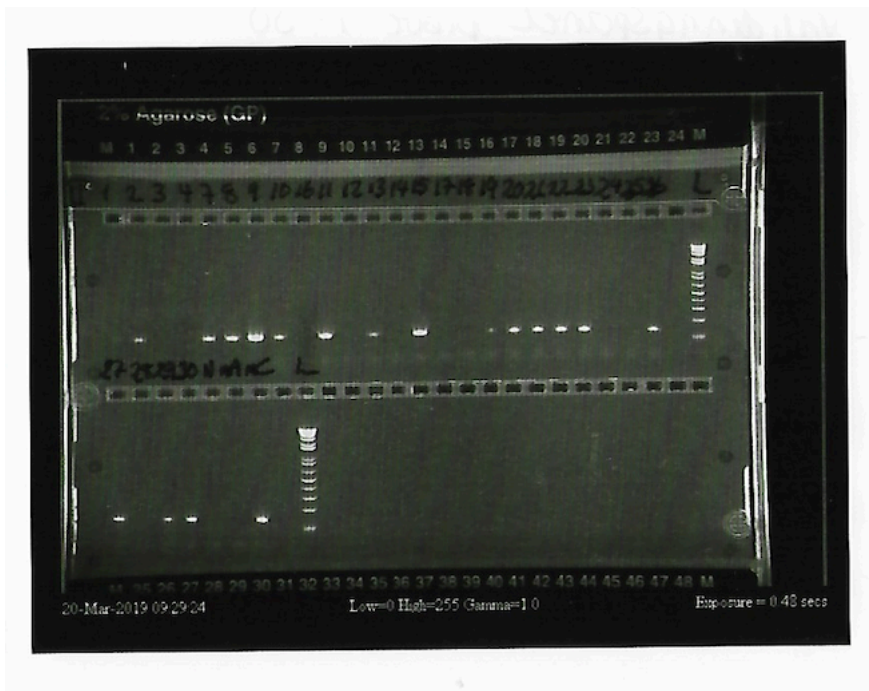
Figur 14: Kurvene for bakterielysat 1-30 (minus 5 og 6) fra valideringspanelet analysert med real-time PCR.



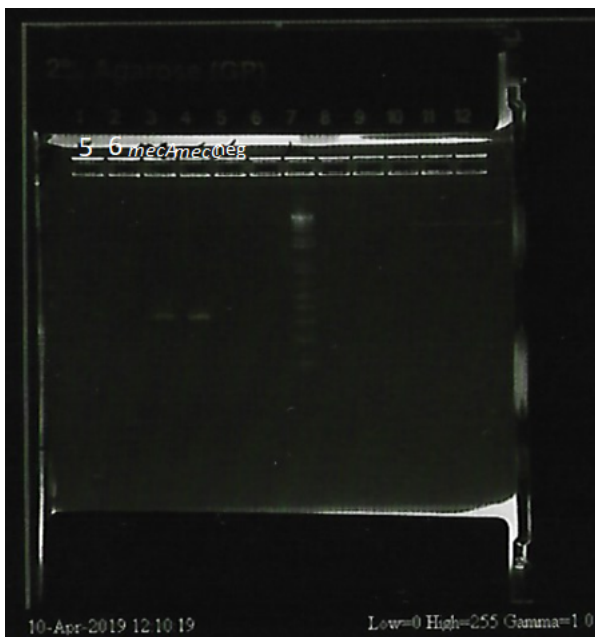
Figur 15: Kurvene for bakterielysat 5, 6 og 31-52 fra valideringspanelet analysert med real-time PCR.



Figur 16: Resultat fra konvensjonell PCR og gelelektroforese utført på bakteriestamme 1-30 med primersett I.



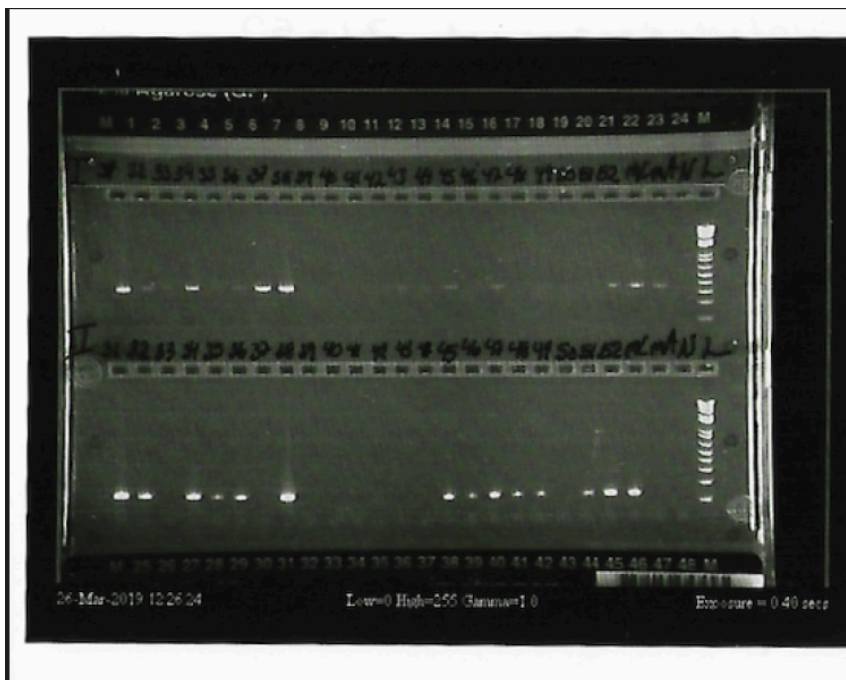
Figur 17: Resultat fra konvensjonell PCR og gelelektroforese utført på bakteriestamme 1-30 med primersett II.



Figur 18: Resultat fra konvensjonell PCR og gelelektroforese utført på bakteriestamme 5 og 6 med primersett I.



Figur 19: Resultat fra konvensjonell PCR og gelelektroforese utført på bakteriestamme 5 og 6 med primersett II.



Figur 20: Resultat fra konvensjonell PCR og gelelektroforese utført på bakteriestamme 31-53 med primersett I og II.

Tabell 18: Resultater fra konvensjonell PCR, real-time PCR og resistensbestemmelse utført på alle 52 isolat.

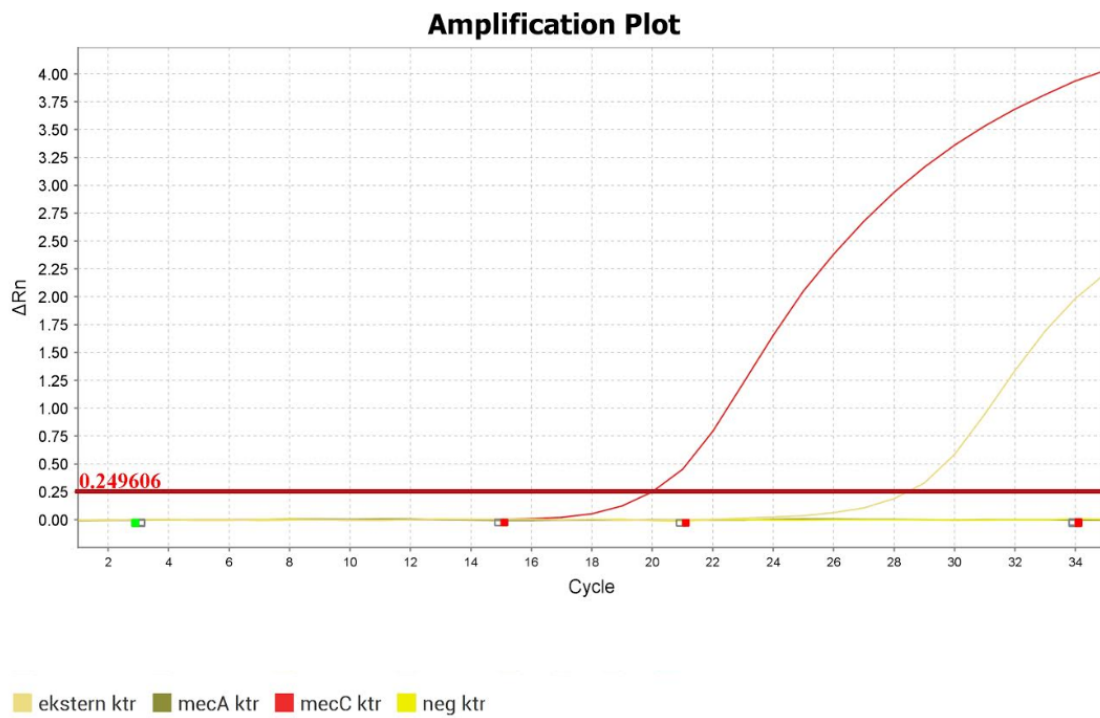
Stamme (isolert fra)	Referanselaboratoriets resultater konvensjonell PCR	Resultat konvensjonell PCR	Resultat real-time PCR (TaqMan)	Resultat resistensbestemmelse
1 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
2 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
3	Negativ	Negativ	Negativ	-
4	Negativ	Negativ	Negativ	-
5	Negativ	Negativ	Negativ	-
6	Negativ	Negativ	Negativ	-
7 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
8 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
9 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
10 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
11 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
12	Negativ	Negativ	Negativ	-
13 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
14	Negativ	Negativ	Negativ	-
15 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA

16	Negativ	Negativ	Negativ	-
17	Negativ	Negativ	Negativ	-
18 (human)	Negativ	Negativ	Negativ	Ikke MRSA
19 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
20 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
21 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
22 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
23 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
24	Negativ	Negativ	Negativ	-
25	Negativ	Negativ	Negativ	-
26 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
27 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
28	Negativ	Negativ	Negativ	-
29 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
30 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
31 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
32 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA

33	Negativ	Negativ	Negativ	-
34 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
35 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
36 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
37	Negativ	Negativ	Negativ	-
38 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
39	Negativ	Negativ	Negativ	-
40	Negativ	Negativ	Negativ	-
41	Negativ	Negativ	Negativ	-
42	Negativ	Negativ	Negativ	-
43	Negativ	Negativ	Negativ	-
44	Negativ	Negativ	Negativ	-
45 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
46 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
47 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
48 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
49 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
50	Negativ	Negativ	Negativ	-

51 (human)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA
52 (dyr)	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	MRSA

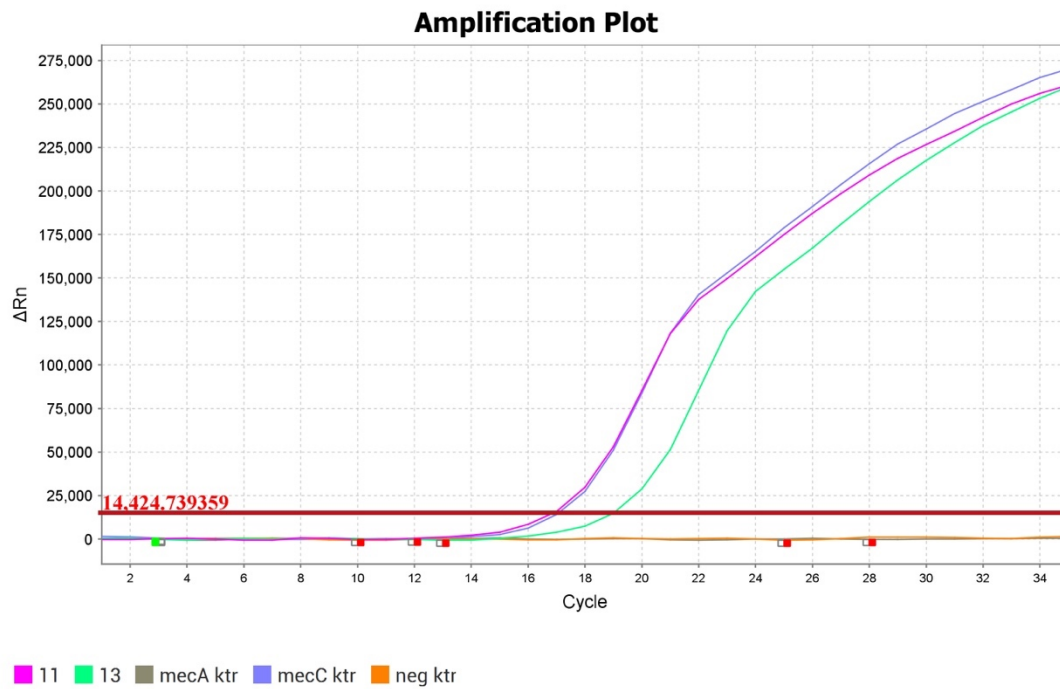
Vedlegg 13 Resultater fra analysing av ekstern kvalitetskontroll



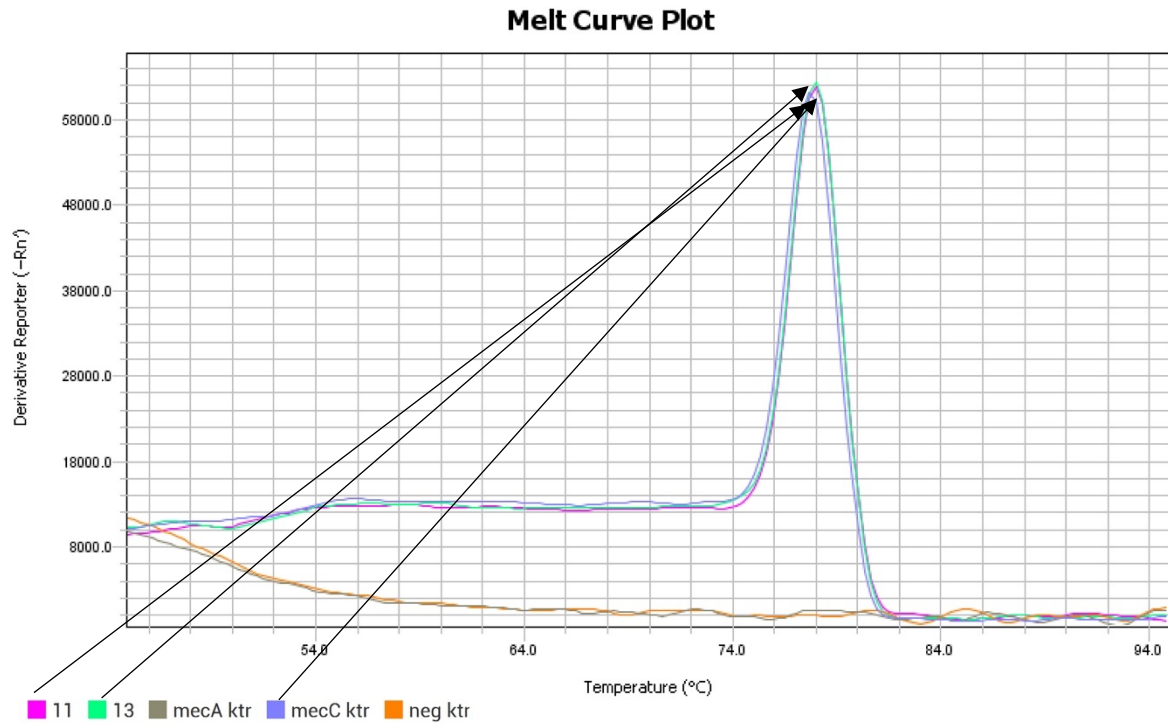
Figur 21: Kurven til analyse av ekstern *mecC*-kontroll fra QCMD.

Vedlegg 14 Resultater fra real-time PCR-metode med SYBR Green

Figur 22 viser kurvene fra real-time PCR-metode med SYBR Green. Smeltepunktskurvene er vist i figur 23.



Figur 22: Kurvene fra real-time PCR-metode med SYBR Green.



Figur 23: Smeltepunktskurve for real-time PCR-metode med SYBR Green. Bakterielysat 11 og 13, samt positiv *mecC*-kontroll har et samlet toppunkt i smeltepunktskurven.