

Ingebjørg Guttvik og Ingvild Lamøy

## ***Bacteroides fragilis*: metoder for å skille mellom divisjon I (*cfiA* negativ) og divisjon II (*cfiA* positiv)**

Bacheloroppgave i Bioingeniør

Veileder: Kine Husteli Kristiansen

Medveileder: Hege Snøsen, Kjersti Haugum, Emilie Tungseth Bruun,  
Amira Ayadi Nilsen og Kjersti Wik Larssen

Mai 2023



Ingebjørg Guttvik og Ingvild Lamøy

***Bacteroides fragilis*: metoder for å skille mellom divisjon I (*cfiA* negativ) og divisjon II (*cfiA* positiv)**

Bacheloroppgave i Bioingeniør

Veileder: Kine Husteli Kristiansen

Medveileder: Hege Snøsen, Kjersti Haugum, Emilie Tungseth Bruun, Amira Ayadi Nilsen og Kjersti Wik Larssen

Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden





## **Forord**

Dette bachelorprosjektet er avslutningsoppgaven for bioingeniørutdanningen ved NTNU i Trondheim. Oppdragsgiver av prosjektet er avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital HF.

Vi ønsker å takke de faglige veilederne våre ved avdeling for medisinsk mikrobiologi, Hege Snøsen, Kjersti Haugum, Emilie Tungseth Bruun, Emira Ayadi Nilsen og Kjersti Wik Larssen, for å ha delt sin kompetanse innenfor fagfeltet, og for god oppfølging og veiledning både i det praktiske laboratoriearbeidet og det teoretiske gjennom hele bachelorperioden. Vi ønsker også å rette en stor takk til vår prosessveileder fra institutt for bioingeniørfag ved NTNU, Kine Husteli Kristiansen, for all hjelp og veiledning gjennom hele skriveprosessen, med raske svar og gode tilbakemeldinger.

Trondheim, 20.mai 2023

## Sammendrag

*Bacteroides fragilis* er en viktig del av normalfloraen i tarmen, men er også den vanligste isolerte anaerobe bakterien fra mono- og polymikrobielle infeksjoner av gastrointestinal opprinnelse. *B. fragilis* har evne til å utvikle resistens mot ulike antibiotika.

*B. fragilis* er delt i to divisjoner, divisjon I (*cfiA* negativ) og divisjon II (*cfiA*-positiv). *B. fragilis* divisjon II har økt kapasitet til å oppnå karbapenemresistens gjennom aktivering av genet *cfiA*, som koder for metalloβ-laktamase. Karbapenemresistens grunnet *cfiA*-genet er avhengig av insersjonssekvenser (IS-elementer) oppstrøms fra *cfiA*-genet.

På grunn av den økende forekomsten av multiresistente *B. fragilis* er det viktig å finne en metode som kan identifisere *B. fragilis* med *cfiA*-genet, for å kunne følge med på spredning av resistente bakteriestammer og begrense spredningen av divisjon II. Målet med prosjektet er å skille divisjon I og divisjon II. For å gjøre dette sammenlignes to metoder for å finne ut hvilken metode som er best egnet, MALDI-TOF MS med subtypingsprogram eller realtime-PCR.

Gjennom prosjektet er det optimalisert en real-time PCR for deteksjon av *cfiA*-genet til *B. fragilis*. Stammer av *B. fragilis* med divisjon I og divisjon II ble analysert med den optimaliserte PCR metoden og MALDI-TOF MS subtyping. Stammene ble resistenstestet med minimal inhibitory concentration (MIC) for å se hvilken meropenem MIC *cfiA* positive stammer hadde. I tillegg ble to av stammene identifisert som divisjon II sekvensert med Oxford nanopore sekvensering, for å teste om bakteriestammene hadde IS-elementer oppstrøms for *cfiA*-genet.

Gjennom ulike forsøk og optimaliseringstrinn viser resultatene i prosjektet at begge metoder kan benyttes til differensiering av divisjonene. Gjennom resistenstesting ble det også vist at alle *cfiA*-positive *B. fragilis* stammer var resistente for meropenem og alle *CfiA*-negative stammer var sensitive for meropenem.

Det ble konkludert at MALDI-TOF MS med subtyping program er den mest egnede metoden å benytte seg av for deteksjon av *cfiA*-genet til *B. fragilis*. Da *cfiA*-genet ikke alltid fører til resistens, bør resistensbestemmelse også utføres på alle klinisk viktige *B. fragilis* isolat.

## Summary

*Bacteroides fragilis* is the most common isolated anaerobic bacteria from poly- and monomicrobial infections of gastrointestinal origin. The bacteria have the ability to develop resistance to different antibiotics.

*B. fragilis* is divided into two divisions, division I (*cfiA* negative) and division II (*cfiA* positive). *B. fragilis* division II has an increased capacity to develop carbapenem resistance through activation of the gene *cfiA*, which codes for metallo-beta-lactamase. Carbapenem resistance due to the *cfiA*-gene is dependent on insertion sequence (IS-elements) upstream of the *cfiA*-gene.

Due to the increasing occurrence of multiresistant *B. fragilis* it is important to find a method that can identify *B. fragilis* with the *cfiA* gene, to be able to monitor the development and avoid unnecessary development of carbapenem resistance. The aim of the project is to separate Division I and Division II. To do this, methods are compared to find out which one is most suitable, MALDI-TOF MS with subtyping program or real-time PCR.

Through the project a real-time PCR method has been optimized for the detection of the *cfiA*-gene of *B. fragilis*. Strains of *B. fragilis* of division I and division II were analyzed using the optimized PCR method and MALDI-TOF MS with subtyping program. The strains were tested for resistance with minimal inhibitory concentration (MIC) to investigate whether *cfiA*-positive strains were also meropenem resistant. In addition, two of the strains identified as division II were sequenced with oxford nanopore sequencing, to test whether the bacterial strains had IS-elements upstream of the *cfiA*-gene.

Through various trials and optimization steps, the results in the project show that both methods had good accuracy, both methods can therefore be used to differentiate the divisions. Through resistance testing, it was also shown that all *cfiA*-positive *B. fragilis* strains were resistant to meropenem, and all *cfiA*-negative strains were sensitive to meropenem.

It was concluded that MALDI-TOF MS with subtyping program is the best method to use for the detection of the *cfiA*-gene of *B. fragilis*. As the *cfiA*-gene does not always lead to resistance, resistance testing should also be carried out on all clinically important *B. fragilis* strains.



## Innholdsfortegnelse

<b>Bacteroides fragilis: metoder for å skille mellom divisjon I (cfiA-negativ) og divisjon II (cfiA-positiv) .....</b>	<b>i</b>
<i>Forord</i> .....	<i>i</i>
<i>Sammendrag</i> .....	<i>ii</i>
<i>Summary</i> .....	<i>iii</i>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Bacteroides fragilis</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Polymerase chain reaction</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 BioAnalyzer</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6 Resistensbestemmelse for karbapenemaser i B. fragilis</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 Oxford nanopore sekvensering</b> .....	<b>10</b>
<b>1.8 Problemstilling</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Materialer og metode</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Reagenser, kontroller og utstyr</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Prøvemateriale</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Real-time PCR</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4 BioAnalyzer</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 MALDI-TOF-MS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6 Screeningmetode for karbapenemresistens</b> .....	<b>20</b>
<b>2.7 Oxford Nanopore sekvensering</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Resultater</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Uprøving av primere og probe</b> .....	<b>22</b>
<b>3.6 Analysering av St. Olavs prøver med ukjent divisjon med optimalisert PCR metode</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7 MALDI-TOF</b> .....	<b>27</b>
<b>3.10 Sammenstilling av resultater fra MALDI-TOF MS, PCR og fenotypisk resistensbestemmelse</b> .....	<b>29</b>
<b>3.11 Oxford Nanopore sekvensering</b> .....	<b>31</b>
<b>4. Diskusjon</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Optimalisering av PCR metode</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 MALDI-TOF MS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3 Fordeler og ulemper på metodene</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4 Resistensbestemmelse for karbapenemaser i B. fragilis</b> .....	<b>35</b>
<b>4.5 Oxford Nanopore sekvensering</b> .....	<b>36</b>
<b>5. Konklusjon</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Referanser</b> .....	<b>38</b>
<b>7. Vedlegg</b> .....	<b>41</b>

## 1. Innledning

Målet med dette prosjektet er å undersøke hvilken metode som er den best egnede i laboratoriet for å detektere *cfiA*-genet til *Bacteroides fragilis* divisjon II. *B. fragilis* divisjon II stammer har økt kapasitet for å oppnå karbapenemresistens gjennom kromosomal aktivering av *cfiA*-gen. Metodene som benyttes er Polymerase chain reaction (PCR) og Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (1,2).

### 1.1 *Bacteroides fragilis*

*Bacteroides fragilis* er en gram negativ, obligat anaerob stavbakterie. Obligat anaerobe bakterier lever uten oksygen og kan ikke nyttiggjøre seg av oksygen i sin metabolisme da de mangler respirasjonskjeden. De skaffer energi fra glykolysen, der elektronene fra glykolysen blir benyttet til fermentering av karbohydrater. Anaerobe bakterier mangler enzymene som normalt vil uskadeliggjøre toksiske komponenter i oksygen, og de vil dermed ikke vokse i nærvær av oksygen. Noen arter kan likevel tåle noe oksygen, så selv om *B. fragilis* er obligat anaerob, er den til en viss grad være aerotolerant (3).

*B. fragilis* tilhører normalfloraen i tarm. Den er en opportunistisk patogen, som normalt ikke forårsaker sykdom, men kan gi infeksjoner dersom den normale bakteriefloraen forstyrres, immunforsvaret nedsettes eller dersom bakterien forlater mage-tarm kanalen. Infeksjoner ses ofte etter operasjon eller traume som fører til at tarmbarrieren brytes. Bakterien er mest kjent for å danne infeksjoner og abscesser i nedre del av bukhulen, *B. fragilis* er det vanligste isolerte anaerobe patogener ved mono- og polymikrobielle infeksjoner utgått fra tarm, samt anaerobe tilfeller av bakterieemi. Bakterieemi er en tilstand hvor bakterier kommer over i blodbanen, og kan føre til sepsis som er en alvorlig og livstruende infeksjonstilstand (4).

*B. fragilis* har en rekke virulensfaktorer og er den mest virulente arten i slekten *Bacteroides*. Den har pilus, hårlignende utløpere, som gir bakterien evnen til å adhere og etablere seg i vertens vev. En polysakkaridkapsel, lipopolysakkarid (LPS) og en rekke enzymer beskytter den mot kroppens immunforsvar. Kapselen til *B. fragilis* initierer abscess dannelse, som er en unik immunrespons i verten. (2,5).

DNA-DNA hybridiseringseksperimenter har vist to homologe DNA-grupper av *B. fragilis*. Dette har ført til at *B. fragilis*-stammer er delt inn i to ulike divisjoner, divisjon I og divisjon II (6). Homologi betyr overenstemmende. Divisjonenes DNA-sekvenser har stor sekvenslikhet

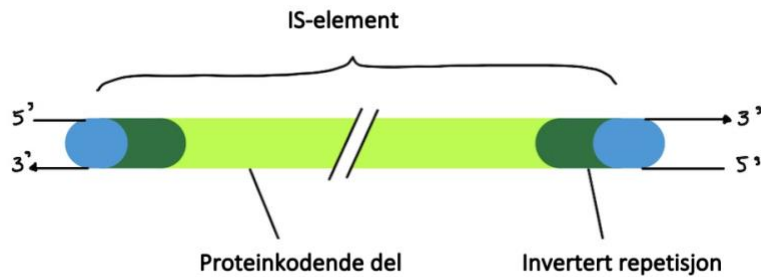
og vist å være avledet fra samme evolusjonære opphav. DNAet inneholder gener som koder for de samme egenskapene, som gjør at divisjonene har betydelige likheter mellom seg. To DNA sekvenser er homologe dersom de er over 30% identiske over hele sekvenslengden (7). Divisjon I og divisjon II er vist å ha en DNA-slektskap på 65-70% (6). DNA-slektskap på mindre enn 70% anses normalt for terskelen for å skille bakterielle arter (8).

### 1.2 *B. fragilis* resistens

*B. fragilis* er ivoende resistente mot penicillin, ampicillin og cefalosporiner, og kan i tillegg ha ervervede resistensmekanismer mot en rekke ulike antibiotikaklasser som tetracycliner, klindamycin og betalaktam – betalaktamaseinhibitor kombinasjoner. Karbapenemer, som er den siste generasjonen av betalaktamantibiotika, sammen med metronidazole og piperacillin-tazobactam er blant de foretrukne midlene i behandling av *B. fragilis* infeksjoner.

Multiresistente *B. fragilis* stammer, inklusive resistens mot metronidazol er rapportert og vanskeliggjør behandlingen av *B. fragilis* infeksjoner betydelig (9).

Betalaktamase er en gruppe enzymer som inaktiverer effekten av ett eller flere ulike klasser av betalaktamantibiotika ved å bryte ned betalaktamringen, og bakterien blir dermed resistent mot denne typen antibiotika den aktuelle betalaktamase bryter ned (10). Betalaktamase-genet er ansett å være tilstede hos alle *B. fragilis* (4). Alle *B. fragilis* stammer i divisjon I er vist å ha genet *cepA* som koder for cefalosporinase, mens *B. fragilis* stammer i divisjon II har *cfiA*-genet, også kjent som *ccrA*, som koder for metallobetalaktamase (8). Uttrykk av *cepA*-genet fører til resistens mot de fleste cefalosporiner, men ikke karbapenemer. Uttrykk av *cfiA*-genet gir resistens mot alle betalaktamantibiotika inkludert karbapenemer (9). For at *cfiA*-genet skal uttrykkes er insersjons elementer (IS-elementer) oppstrøms fra genet nødvendig, for å fungere som en promoter. Genet er vanligvis ikke uttrykt uten IS-element. IS-elementer, vist i figur 1, er små segmenter av dobbeltrådet DNA, også kalt «hoppegener», som kan flytte seg fra ett område i genomet til ett annet (8). Tilstedeværelse av *cfiA*-gen i kromosomet til *B. fragilis*-stammer forekommer mye hyppigere enn karbapenemresistens (11).



Figur 1: IS-element, små segment av dobbeltrådet DNA, også kalt «hoppegener» som kan flytte seg fra ett område i genomet til et annet. Kan inneholde for eksempel promotorer eller resistensgener, og kan føre til endret genuttrykk (12).

Det er blitt sett en økning i tilfeller av karbapenem resistente *B. fragilis* stammer blant annet i Danmark, hvor en betydelig mengde isolater viser redusert følsomhet for blant annet meropenem og en økning i forekomst av stammer med *cfiA*-gen over tid (1). På grunn av den økende forekomsten av resistens hos stammer av *B. fragilis* er det viktig å etablere en metode for å undersøke om bakterien har *cfiA*-genet som ledd i lokal resistensovervåking på St. Olav.

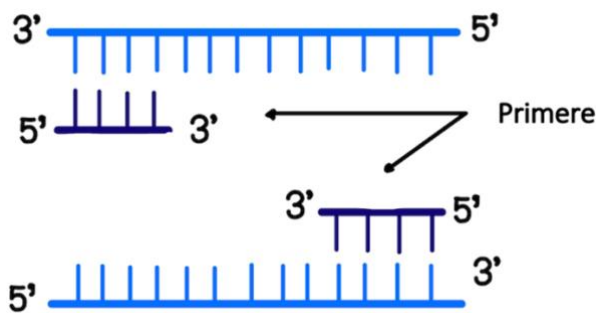
### 1.3 Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode for amplifikasjon av DNA. Metoden kan produsere store mengder av en bestemt DNA-sekvens fra en kompleks blanding av DNA på kort tid og krever lite utgangsmateriale (13).

Det første steget til en PCR-analyse er DNA-ekstraksjon for å frigjøre DNAet man ønsker å analysere. *B. fragilis* er en gram negativ bakterie, og man kan derfor benytte kokelysring til frigjøring av DNA. Kokelysring er en ekstraksjonsmetode som foregår ved hjelp av varmebehandling av en bakteriekoloni (14). Til PCR trenger man ikke lange sekvenser med intakt DNA, og som oftest trenger man heller ikke helt rent DNA, kokelysring vil resultere i et lysat med alle cellerester til stede.

PCR krever enkelte komponenter for at amplifikasjonen skal fungere. PCR metoden benytter derfor en reaksjonsmik, som inneholder optimale konsentrasjoner av  $MgCl_2$ , nukleotider (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polymerase, stabilisatorer, primere og probe.

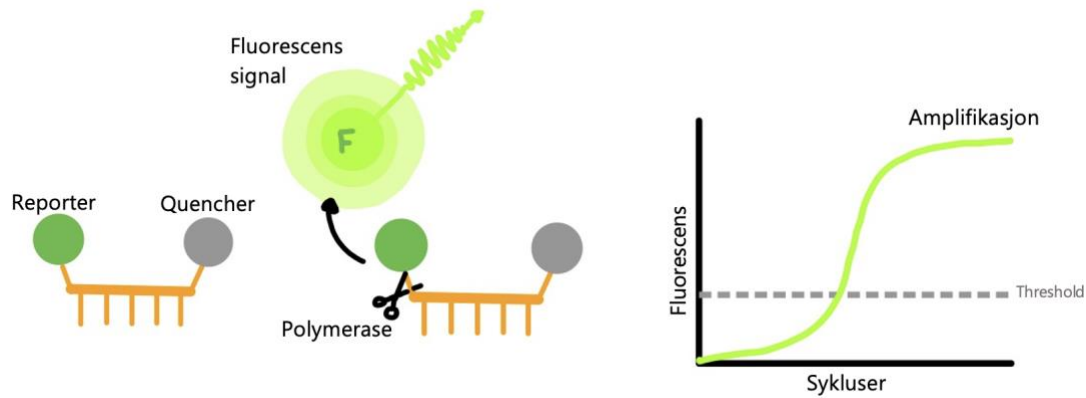
For å starte PCR reaksjonen trenger metoden en primer. En primer er en kort, syntetisk nukleotidsekvens. Primere gjør det mulig å amplifisere bestemte områder i et større DNA-molekyl, ved å binde seg til spesifikke komplementære sekvenser i templat DNA. Disse fungerer dermed som utgangspunkt for amplifikasjonen og leder polymerasen til den spesifikke DNA-sekvensen som man ønsker å amplifiseres. Primere blir ofte designet basert på DNA-sekvensen av interesse, derfor kan man for det meste kun benytte PCR til å klonere DNA-sekvenser som er kjent på forhånd. PCR reaksjonen trenger to primere, en forward-primer og en revers primer. Forward primeren vil binde seg til 3'enden av ønsket DNA-sekvens og gå i retning 5' enden (figur 2). Revers primeren går i motsatt retning, fra 5' til 3' (15,16).



Figur 2: Primere gjør det mulig å amplifisere bestemte områder i et større DNA-molekyl, da de binder seg til komplementære sekvenser på hver sin side av sekvensen (13).

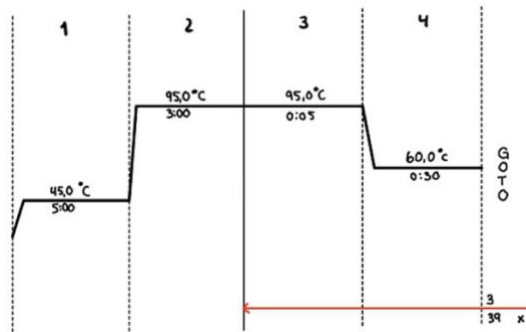
Prober benyttes til å detektere amplifisert PCR produkt. Disse gjør det mulig for PCR å overvåke reaksjonen i sanntid, dette kalles real-time PCR. Proben som benyttes i dette prosjektet er TaqMan-probe. TaqMan-probe er en spesifikk probe som sammen med primere definerer sekvensen man ønsker å kopiere. Proben som velges er spesifikk og ligger mellom de to spesifikke primerne på DNA-sekvensen man ønsker å amplifisere. Proben er merket i begge ender med fluoriserende reporter fargestoff i 5'enden, i dette tilfellet FAM 6, og en quencher i 3'enden (figur 3).

Under PCR reaksjonen vil TaqMan-proben hybridisere til komplementært enkelttrådet-DNA i PCR produktet. Så lenge proben er intakt vil den gi lite fluorescens, da quencher hemmer reporterer. Under PCR reaksjonen vil TaqMan-proben kuttes av DNA-polymerasen, reporterer vil ikke lenger være hemmet av quencher og det vil utvikles økende fluorescens. Under hele amplifiseringsprosessen vil emisjonen av lys øke eksponentielt for hver syklus, vist i figur 3. Utviklingen av fluorescens måles i real-time instrumentet for hver syklus (17).



Figur 3: TaqMan probe. TaqMan probe er en spesifikk probe som gjør det mulig å overvåke PCR reaksjonen i sanntid. Proben er en kort sekvens merket i begge ender. Fluoriserende reporter i 5`enden og en quencher i 3`enden. Proben vil binde seg til komplementært enkeltrådet DNA under PCR reaksjonen. Så lenge proben er intakt vil den gi lite fluorescens da quencher hemmer reporter. Under PCR reaksjonen og syntetisering av ny DNA tråd, vil TaqMan proben kuttes av DNA polymerase. Reporter vil ikke være hemmet av quencher og fluorescensen vil øke. Under amplifisering vil fluorescensen øke eksponentielt for hver syklus og måles (17).

PCR består av ulike trinn som gjentas i sykluser (figur 4). Templat for PCR kan være DNA, da kan metoden benyttes til å oppnå enten en full genomisk klon av hele genomet eller bestemte gensekvenser. PCR reaksjonen starter med denaturering av templat DNA ved høy temperatur, 94-95°C. Hydrogenbindinger i DNA brytes, DNA tvinnes opp og man får enkelttrådet DNA. Videre foregår primer annealing. Da vil primerne for metoden binde seg til de stedene på templat DNA-tråden som har den komplementære sekvensen. I dette trinnet senkes temperaturen til mellom 50-65°C, avhengig av smeltepunktet til primerne som benyttes. Til slutt skjer polymerisering og DNA syntese. I dette trinnet vil polymerasen danne en ny DNA-tråd ut fra primere med templat DNA som mal. I hver syklus vil nysyntetisert DNA fungere som templat og på denne måten vil mengden DNA i prøven øke eksponentielt med antall sykluser (18). Resultatet vil måles i Ct-verdier. En Ct-verdi er det antall sykluser som kreves for å detektere et fluorescens signal over bakgrunnssignalet (19).



Figur 4: PCR program Perfecta2-stepTm60, en to stegs PCR metode. Aktivering av UNG ved 45 grader i 5 minutter, varmeaktivering av DNA-polymerase foregår ved 95 °C. Videre denaturering av DNA ved 95 grader i 5 sekunder og en kombinert annealing/syntetisering ved 60 °C, gjentatt i 40 sykluser. Dette programmet benyttes under prosjektet for å amplifisere ønsket DNA sekvens til deteksjon. Figur hentet fra PCR instrument.

Optimalisering av PCR metoden er viktig for å sikre at den er så sensitiv som nødvendig og er spesifikk for sekvensen av interesse. I dette prosjektet ble det testet primerkonsentrasjon, temperaturgradient, effektivitet og spesifisitet.

Primere testes for å sikre at de binder seg til ønsket målsekvens. Ulike konsentrasjoner av primere testes for å finne konsentrasjonene som gir best amplifikasjon. Lave konsentrasjoner vil kunne føre til falskt negativt resultat, fordi det ikke dannes nok PCR produkt til deteksjon. Høye konsentrasjoner vil kunne gi feilkilder som uspesifikke bindinger. Høyere konsentrasjoner vil også være mer kostbar enn lavere konsentrasjoner.

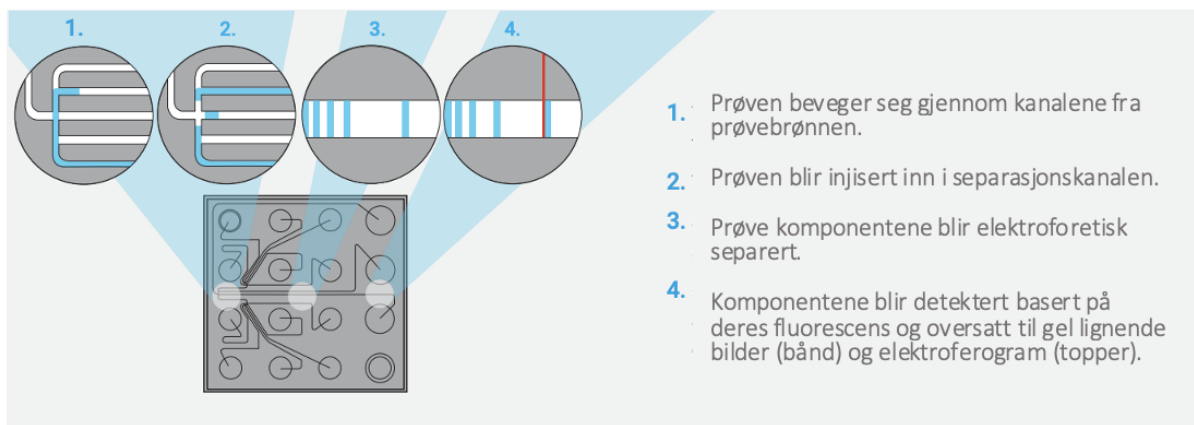
Temperaturgradient testes for å bestemme gunstig annealing temperatur. Det er viktig å finne en temperatur som fungerer til begge primere, da de benyttes i samme reaksjonen ved lik temperatur. For lav temperatur vil kunne forårsake uspesifikke bindinger og vil derfor kunne gi feilaktige svar. En for høy temperatur vil kunne endre effektiviteten. Dette vil resultere i mangel på, eller dårlig amplifikasjon

Effektivitet er et mål på PCR metodens evne til å amplifisere DNA. Teoretisk sett ønskes en nøyaktig dobling av DNA i hver syklus, effektiviteten vil da være på nært 100% og reaksjonen vil være spesifikk og presis. Effektiviteten kan beregnes som en faktor av en standardkurve. For å teste effektiviteten analyseres en 10-folds fortynningsrekke med paralleller. De gjennomsnittlige Ct-verdiene til hver fortynning benyttes til å lage en standardkurve. I teorien ønskes en differanse mellom Ct-verdiene på -3,3, men aksepteres mellom -3,1 og -3,6, da det kan variere mellom ulike laboratorium. En differanse på -3,3 vil gi en effektivitet på 100%. Effektiviteten skal helst være på mellom 90-110%.

Spesifisitet undersøkes for å sikre at metoden vi benytter kun detekterer målsekvensen av interesse. Spesifisitet undersøkes ved å analysere en rekke ulike bakteriearter, for å se om man får et positivt resultat nå noe annet enn *cfiA* positiv *B. fragilis* (20).

#### 1.4 BioAnalyzer

BioAnalyzer (Agilent 2100) er et instrument som gjør kapillærelektroforese av DNA-fragmenter. DNA er et negativt ladet og kan derfor separeres over et elektrisk felt. DNA fragmentene vil separeres etter størrelse og mengde. Analysen innebærer et instrument, databehandlingsprogram, reagenser og en mikrofluidisk chip for DNA-analyse. Chipen består av prøvebrønner. Prøve og reagenser pipetteres i prøvebrønner og chipen analyseres i instrument som angitt i figur 5. I dette prosjektet benyttet som en kontroll og visualisering av PCR produkt etter analyse (21).

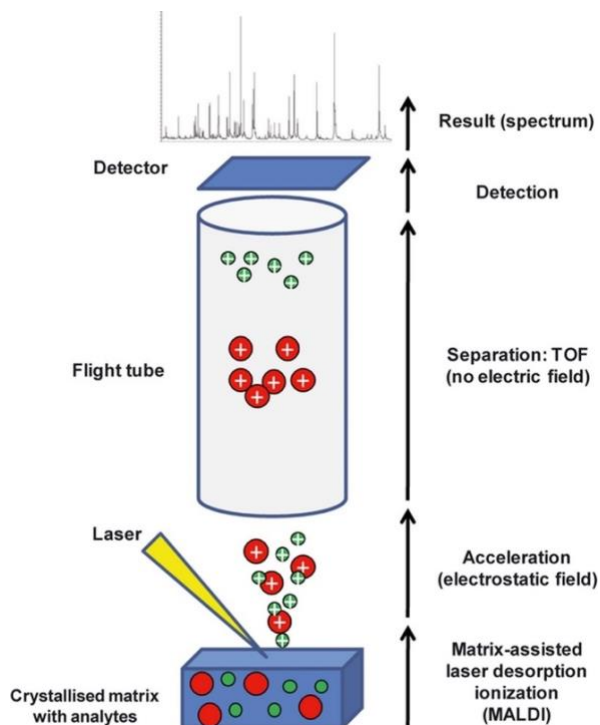


Figur 5: Prøvegang i BioAnalyzer chip. En elektroforese metode som analyserer DNA fragmenter ved å separere de etter størrelse og mengde. Dette vil visualisere mengden basepar og om det er dannet rene PCR produkt ved hjelp av en gel (21).



## 1.5 MALDI TOF MS

MALDI-TOF MS er en metode som benytter massespektrometri til å avdekke en mikrobes unike proteinspekter på få minutter. Mikroorganismens proteiner fragmenteres og ioniseres ved hjelp av en laser. Det benyttes en matriks, som er en UV-absorberende svak organisk syre, som stabiliserer ionene under ionisering (22). Ionene blir deretter akselerert i et magnetisk felt, og massespektret detekterer proteinfragmentene (frie ioner). Fragmenter med minst molekylmasse vil bevege seg raskest gjennom magnetfeltet og detekteres først, og større ioner til slutt. Tiden ionene bruker gjennom magnetfeltet kalles time of flight (TOF), vist i figur 6. Ved å måle tiden partiklene bruker gjennom det magnetiske feltet, kan instrumentet beregne størrelsen på partikkelen. Instrumentet genererer spekter av det ribosomale proteinmønsteret til mikroben MALDI-TOF MS er koblet sammen med MBT Compass programvare, et identifikasjonssystem som vil gi en identifikasjon av mikroorganismen ved å sammenligne resultatet med en database av kjente mikroorganismers proteinspekter.



Figur 6: Bakterier blir avsatt på prøveplaten og tilsatt matrix. Matrix hjelper til å bryte ned bakterien før deteksjon. Laseren bestråler prøveplaten, og bryter ned mikroorganismen til flere partikler og ioner som går gjennom et magnetisk felt. Ionene akselerer ulikt basert på masse, slik at de kan separeres ut ifra størrelse på ionene. De mindre ionene vil vandre raskere, og vil detekteres først. De større ionene vandrer gjennom deteksjonen senere. Dette blir satt sammen til et massespekter som er unikt for mikroorganismen, og mikroorganisme i prøven kan derfor detekteres i løpet av minutter. Figur hentet fra (23).

Det er også utviklet et subtypingsprogram for MALDI-TOF MS som kan integreres med Compass software. Systemet muliggjør å identifisere subtyper av enkelte mikrober, inkludert *B. fragilis* som har *cfiA*-genet. *CfiA* positive *B. fragilis* kan differensieres fra *cfiA* negative ved et forutsigbart skifte i massespekter mønsteret (24). Spesifikke topper i de bakterielle massespektrene har blitt identifisert som spesifikke markører. Det er utviklet dedikerte algoritmer for deteksjon av disse toppene. Dette har muliggjort rask identifikasjon av resistente stammer samtidig som standard arts identifikasjon (25).

Tolkning av resultater til MALDI-TOF MS baserer seg på en score som blir utgitt av instrumentet vist i tabell 1. Dersom instrumentet gir en score >2 vil subtypeprogrammet automatisk detektere subtype av den identifiserte mikroben.

*Tabell 1: Vurdering av resultatet på MALDI-TOF MS benyttes ved at instrumentet utgir en score på hvor sikkert resultatet er. Resultatet er godkjent hvis det er en score >2. Instrumentet vil også utgi fargekoder som er forklarende til om resultatet er godkjent eller ikke. Grønn fargekode er godkjent resultat, gul fargekode er godkjent om det finnes annen informasjon som for eksempel cellemorfologi, cellevegg, enkle fenotypiske reaksjoner, agglutinasjon osv. Eventuelt må de fire første foreslåtte identifikasjonene på en spot vise samme species.*

Score	Kategori	Vurdering	Fargekode
2,300 – 3,000	+++	Identifikasjon på sikkert species nivå	Grønn
2,000 – 2,299	++	Identifikasjon på species nivå	Grønn
1,700 – 1,999	+	Identifikasjon på genus nivå	Gul
0,000 – 1,699	0	Ingen sikker identifikasjon	Rød

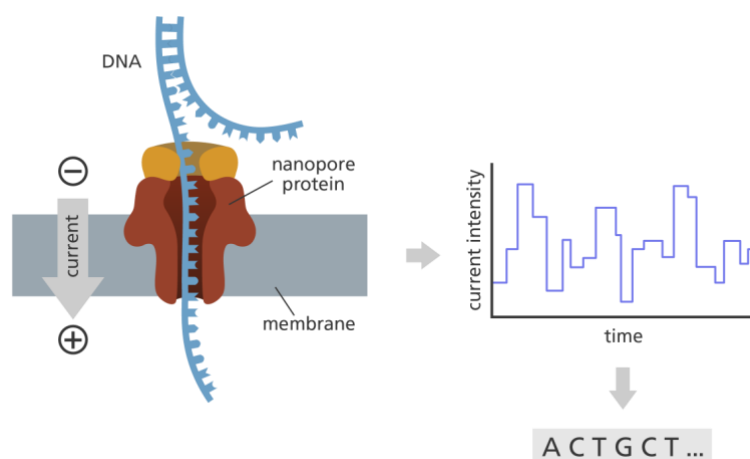
### 1.6 Resistensbestemmelse for meropenem

Resistensbestemmelse med fenotypisk metode benyttes på kliniske isolater for å påvise karbapenemresistens, og kan gjøres på ulike måter, vanligst er lappedifusjon eller bestemmelse av minimal inhibitory concentration/minste hemmende konsentrasjon (MIC). MIC er definert som den laveste antibiotika konsentrasjonen som fullstendig hemmer vekst av mikroben etter en standardisert inkubasjon. MIC kan bestemmes med ulike metoder som mikrobuljongfortynning eller agar gradient fortynning. I denne oppgaven ble det benyttet meropenem agar gradient MIC (Liofilmchem), som er en papirstrips impregnert med en fast konsentrasjonsgradient av antibiotika (26).

Følsomhetskategorisering tolkes i henhold til NordicAST sine kliniske brytningspunkter for *Bacteroides species*. Bakteriestammer deles inn i sensitiv (S), intermediær (I) og resistent (R) for ulike antibiotika (27), der sensitiv betyr at mikroben anses som følsom for standard dose av medikamentet, og med høy sannsynlighet for vellykket behandling. Når mikroben kategoriseres som intermediær følsom er den følsom ved økt eksponering. Det vil si høy sannsynlighet for vellykket behandling dersom man øker dosering av medikamentet eller man oppnår økt konsentrasjon på infeksjonsstedet. Kategorisering som resistent vil si at det er høy sannsynlighet for terapivikt selv ved økt dosering av medikamentet. Eksponering er en funksjon av hvordan administrasjonsform, dosering, doseringsintervall, infusjonstid, samt fordeling og utskillelse av det antimikrobielle middelet vil påvirke mikroben som forårsaker infeksjonen på infeksjonsstedet (28).

### 1.7 Oxford nanopore sekvensering

Neste generasjons sekvensering (NGS) er massiv parallell sekvensering av DNA og RNA. Oxford nanopore sekvensering er en type RNA/DNA sekvenseringsteknologi som benytter en flowcelle med en kunstig membran bestående av mange små porer, nanoporer. Hver pore har en egen elektrode koblet til en sensor, som måler den elektriske strømmen som flyter gjennom. En spenning over membranen tiltrekker seg negativt ladede DNA-molekyler og tvinger de gjennom poren. Fordi de fire basene i DNA har forskjellige former og størrelser, fører de til ulike strømvariasjoner når de passerer gjennom. Denne strømvariasjonen måles og settes sammen til bestemte sekvenser ved hjelp av algoritmer i sanntid (29). Vist i figur 7.



Figur 7: Nanopore sekvensering. DNA molekyler dras gjennom en nanopore med sensor, som måler unik strømendring. Målt strømendring oversettes og settes sammen i sekvenser ved hjelp av algoritmer (30).

### **1.8 Problemstilling**

Ved dette prosjektet skal det testes og sammenlignes realtime-PCR og MALDI-TOF for deteksjon av *cfiA* genet i *B. fragilis* divisjon II, for å vurdere hvilken metode som er mest egnet til å skille mellom *B. fragilis* divisjon I og divisjon II og dermed detektere meropenem-resistente *B. fragilis* stammer.

«Vil MALDI-TOF MS eller PCR være den mest gunstige metoden til å detektere *cfiA* positive *B. Fragilis*?»

## 2. Materialer og metode

### 2.1 Reagenser, kontroller og utstyr

Instrumenter som ble benyttet i dette prosjektet er vist i tabell 2.

Tabell 2: Utstyr brukt til PCR og MALDI-TOF MS.

Metode	Instrument	Leverandør
PCR	CFX C1000 Thermal Cycler	Biorad
MALDI-TOF MS	MALDI Biotyper Sirius med subtypingsprogram	Bruker Daltonics GmbH & Co
BioAnalyzer	Agilent 2100 BioAnalyzer System	Agilent Technologies
Kokelysering	Eppendorf ThermoMixer C	Eppendorf

Oversikt over reagenser og kontroller for metodene er vist i tabell 3. Denne omfatter både PCR og MALDI-TOF MS.

Tabell 3: Ulike reagenser og kontroller benyttet til PCR og MALDI-TOF MS.

Navn	Produsent	Benyttes til	Metode
PerfeCTa Multiplex qPCR supermiv	Quenta Bio	Reagens	PCR
Molecular Grade Water (MGW)	BIOSCIENCES	Negativ kontroll og fortynning	PCR
KRES-6		Positiv kontroll	PCR
HCCA Matrix	Bruker Daltonics GmbH & Co	Reagens	MALDI-TOF MS
Bacterial Test Standard, E. coli DH5 $\alpha$ ,	Bruker Daltonics GmbH & Co	Positiv kontroll	MALDI-TOF MS

Primere og probe er hentet fra (26) og vist i tabell 4. PCR-produkt med hjelp av disse primerne og probe skal ha en lengde på 77 basepar.

Tabell 4: Primere og probe med base-sekvens benyttet i PCR for å detektere *cfiA*-gen til *Bacteriodes fragilis*.

Primer/Probe	Base-sekvens	Produsent
TaqMan probe	5'- FAM-AGTATCACCCA ACTCT-MGB-3'	TermoFicher Scientific
Forward primer	5'-AGAAAAGCGTAAAAATATCCGATGA-3'	TIB MOLBIOL
Revers primer	5'- CGGCGAGGGGATACATAAGTGTAC-3'	TIB MOLBIOL

Bakteriene ble dyrket på Fastidious Anaerobe agar (FAA) med hesteblood og Brucella-agar. FAA er et rikt, ikke selektivt medium med hemin og vitamin K som vekstfaktorer, denne brukes til dyrkning av anaerobe bakteriestammer. Brucella-agar er en næringsrik agar som inneholder 5% hesteblood, hemin og vitamin K. Denne benyttes ved resistenstesting av anaerobe bakterier.

Bakteriestammene og MIC-test ble inkubert i anaerob atmosfære ved 35 grader i omtrent 24 timer.

## 2.2 Prøvemateriale

Det ble benyttet 20 isolat av *B. fragilis* (tabell 5), inkludert 12 isolat fra avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hvor inndeling i divisjon I/II ikke er kjent. Det ble også brukt 5 *B. fragilis* isolat tilhørende divisjon II fra nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotika resistens (K-res) ved universitetssykehuset Nord-Norge (UNN) i Tromsø. Bakteriestammene er oppbevart i -80°C. Prosjektet innbefatter også 3 kontrollstammer med kjent divisjon I, som kommer fra Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) og American Type Culture Collection (ATCC). Alle bakteriestammene er vist i tabell 5. STO-10 ble funnet to plasser i arkivet og ble derfor behandlet som to prøver skilt ut ifra posisjonen i fryserarkivet. Underveis i prosjektet er KRES-6 brukt som positiv kontroll.

Tabell 5: Oversikt over bakteriestammer benyttet i dette prosjektet.

Stamme ID	Kommet fra	Subtyping	Benyttet som
KRES-1	K-res	<i>cfiA</i> pos	Prøve
KRES-2	K-res	<i>cfiA</i> pos	Prøve
KRES-3	K-res	<i>cfiA</i> pos	Prøve
KRES-5	K-res	<i>cfiA</i> pos	Prøve
KRES-6	K-res	<i>cfiA</i> pos	Pos kontroll
STO-1	AMM	Ukjent	Prøve
STO-2	AMM	Ukjent	Prøve
STO-3	AMM	Ukjent	Prøve
STO-4	AMM	Ukjent	Prøve
STO-5	AMM	Ukjent	Prøve
STO-6	AMM	Ukjent	Prøve
STO-7	AMM	Ukjent	Prøve
STO-8	AMM	Ukjent	Prøve
STO-9	AMM	Ukjent	Prøve
STO-10 B3	AMM	Ukjent	Prøve
STO-10 A5	AMM	Ukjent	Prøve
STO-11	AMM	Ukjent	Prøve
STO-12	AMM	Ukjent	Prøve
ATCC 43858	ATCC	<i>cfiA</i> neg	Prøve
ATCC 25285	ATCC	<i>cfiA</i> neg	Prøve
CCUG 4856	CCUG	<i>cfiA</i> neg	Neg kontroll

### 2.3 Real-time PCR

Det ble optimalisert en PCR-metode for deteksjon av *cfiA* genet i *B. fragilis*, basert på primere og probe fra en Dansk studie på antibiotikaresistens hos *B. fragilis* (26).

DNA til PCR analyse ble ekstrahert med kokelysering ved 95°C i 15 minutter.

### 2.3.1 Utprøving av primer

Som første del av PCR optimalisering er det viktig å undersøke om primere og probe fungerer som de skal. Forut for prosjektet ble primere undersøkt bioinformatisk med primer blast av faglig veileder ved AMM (31).

Det ble utført et forsøk med ufortynnet kokelysat av K-res stammer, deretter fortynnet 1:10 og 1:100. Årsaken til fortynning av prøvemateriale er at man ønsker å oppnå en Ct-verdi på rundt 25 for positiv kontroll. Dette området er mellom et sterkt og et svakt område, det vil derfor være tilstrekkelig med templat og en sikker positiv prøve. PCR ble utført med betingelser hos AMM som vist i tabell 6. Det ble benyttet en probe-konsentrasjon på 200 nM i alle forsøk. Det ble benyttet et prøvevolum på 20 µl, hvor 5 µl består av prøve og 15 µl består av reaksjonsmix. Reaksjonsmix består av primer, probe, perfecta mix og vann.

Tabell 6: Tabellen viser hvordan utprøving av primer og probe ble utført.

Betingelser ved første utprøving	
Primerkonsentrasjon	300 nM
Probekonsentrasjon	200 nM
Program	Perfecta2-stepTm60
Prøvemateriale	6 KRES stammer
Fortynninger	Ufortynnet, 1:10 og 1:100

### 2.3.2 Primer optimalisering

For å optimalisere konsentrasjonen til primere testes ulike konsentrasjoner av primerne med DNA fra en kontrollprøve med kjent *cfiA*-gen. I dette prosjektet ble kokelysat fra KRES-6 fortynnet 1:100 brukt som positiv kontroll. Analysen ble gjennomført med 2 step real-time PCR med en annealingtemperatur på 60 °C. Både forward og revers primer ble testet med 4 ulike konsentrasjoner som resulterte i 16 mikser (tabell 7), for å se om primerne har lik binding til målsekvensen. Det kan være en primer som skaper en sterkere binding enn den andre, og den kan derfor dominere reaksjonen. Det ble valgt ut konsentrasjonene 1000, 900, 600 og 500 nM i forsøket. I publikasjonen (26) primere er hentet fra er det benyttet en konsentrasjon på 1000nM, men det er ønskelig å benytte en lavere konsentrasjon.

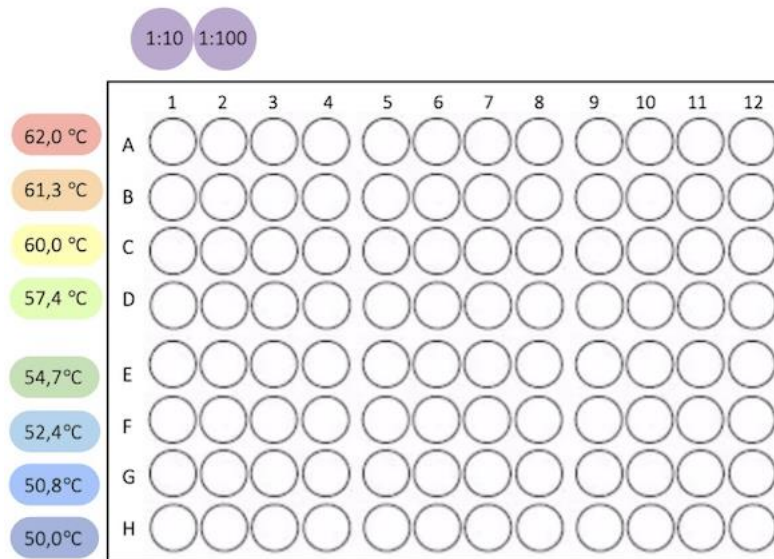


Tabell 7: For å undersøke hvilken primerkonsentrasjon som er optimal, vil det benyttes konsentrasjonene 1000, 900, 600 og 500nM. Disse konsentrasjonene undersøkes både med lik og ulik konsentrasjon på forward og revers primer for å se om det er ulik bindingsstyrke på dem. De ulike kombinasjonene av primere som ble testet i forsøket er vist i denne tabellen.

ID	Forward konsentrasjon i nM	Revers konsentrasjon i nM
Miks 1	1000	1000
Miks 2	1000	900
Miks 3	1000	600
Miks 4	1000	500
Miks 5	900	1000
Miks 6	900	900
Miks 7	900	600
Miks 8	900	500
Miks 9	600	1000
Miks 10	600	900
Miks 11	600	600
Miks 12	600	500
Miks 13	500	1000
Miks 14	500	900
Miks 15	500	600
Miks 16	500	500

### 2.3.3 Temperatur gradient

For å kunne bestemme optimal annealingtemperatur for PCR-metoden, ble ulike temperaturer testet ut vha. en temperaturgradient. Det ble benyttet et forhåndslaget program fra instrumentet som heter Gradient50-62 Perfecta 2-step. Programmet analyserer prøvene ved 8 temperaturer mellom 50-62°C vist i figur 8. I forsøket ble det benyttet kokelysat fra KRES-6, fortynnet 1:10 og 1:100. Primerkonsentrasjon var 600 nM og probekonsentrasjonen var 200nM.



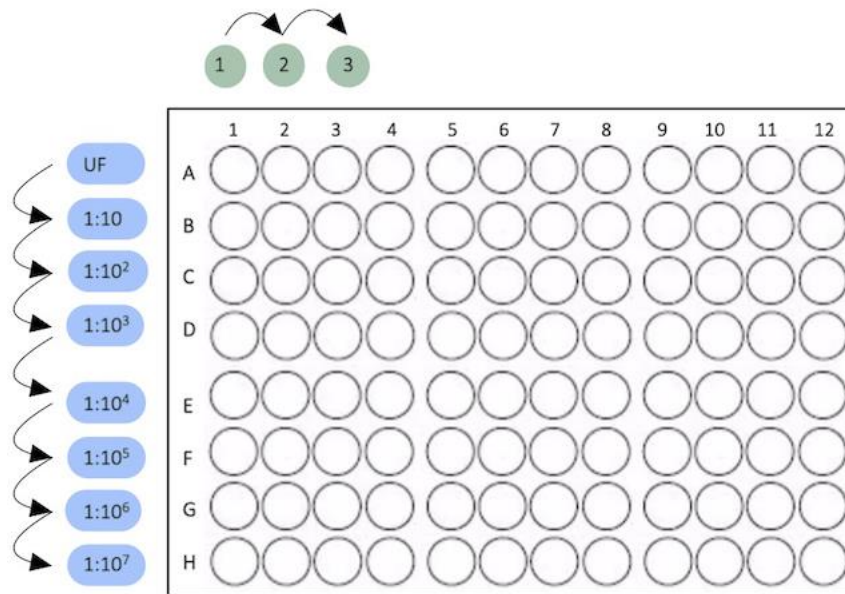
Figur 8: PCR oppsett for temperatur gradient analyse. Benytter stamme KRES-6, som i dette prosjektet brukes som positiv kontroll. Fortynning 1:10 pipetteres i rad 1 og 1:100 i rad 2, sammen med mastermix med forholdet 5+15. Temperaturen endres nedstrøms i platen, og prøven vil bli analysert på ulike temperaturer (32).

### 2.3.4 Effektivitet

Effektiviteten av PCR-analysen ble undersøkt for å måle metodens evne til å amplifisere DNA. Ideelt ønsker man en dobling av PCR-produkt for hver syklus. Det ble dannet en standardkurve fra bakteriekulturen KRES-6 i syv fortynninger, fra ufortynnet til fortynning 1:10<sup>6</sup> med tre paralleller av hver fortynning vist i figur 9. Undersøkelse av effektivitet ble utført både med en primerkonsentrasjon på 600nM og 1000nM, og programmet Perfecta2-stepTm 60 ble benyttet på instrumentet.

Formel 1: Effektivitetsberegning

$$\text{Effektivitet} = 10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} - 1$$



Figur 9: PCR oppsett for effektivitetsanalyse. Benytter KRES-6 i sju forfynninger. Ufortynnet prøve fortynnes 1:10, dette gjentas for hver brønn slik at siste forfynning blir 1:10<sup>7</sup>. Prøvene analyseres og PCR instrumentet beregner en standardkurve (32).

### 2.3.5 Spesifisitet

Utprøving av metodens spesifisitet ble utført ved å benytte et generelt bakteriepanel fra ulike arter, vist i tabell 8. Spesifisitet utføres for å se om primere og probe vil binde seg til andre bakteriesekvenser ved tilfeller at det ikke er renkultur av *B. fragilis*. Primerkonsentrasjon brukt i undersøkelsen var 1000 nM og probekonsentrasjon var 200 nM. Programmet som ble benyttet var Perfecta2-stepTm60. Som positiv kontroll ble KRES-6 fortynnet 1:100 benyttet.

Tabell 8: Oversikt over 19 ulike bakteriearter som ble benyttet til spesifisitet undersøkelse av PCR metode til *B. fragilis*. Dette ble benyttet for å se om primere og probe reagerer uspesifikt og derfor skaper falskt positivt resultat.

Generelt bakteriepanel Art	Stamme nummer
<i>S. aureus</i>	CCUG 15915
<i>S. pyogenes</i>	CCUG 33061
<i>S. agalactica</i>	CCUG 4208
<i>H. influenzae</i>	CCUG 33775
<i>C. albicans</i>	CCUG 32723
<i>S. pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>E. coli</i>	CCUG 37382
<i>K. pneumoniae</i>	CCUG 56233
<i>E. cloacae</i>	CCUG 6323T
<i>P. aeruginosa</i>	CCUG 17619
<i>E. faecalis</i>	CCUG 9997
<i>S. anginosus</i>	CCUG 223
<i>S. epidermidis</i>	CCUG 2318
<i>N. meningitidis</i>	CCUG 23101
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177
<i>L. pneumophila</i>	CCUG 33058
<i>Bacillus cereus</i>	CCUG 36925
<i>Clostridium perfringens</i>	CCUG 1795T
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CCUG 9994T

## 2.4 BioAnalyzer

Agilent 2100 BioAnalyzer ble benyttet for å kontrollere PCR produkt ved å visualiseres etter størrelse og mengde. PCR produktet skal bestå av 77 basepar, derfor kan man kontrollere at baselengde stemmer, og at det ikke er uspesifikke bindinger til stede i prøven. BioAnalyzer benytter seg av en rekke reagenser vist i tabell 9, alle er levert av Agilent Technologies.

Tabell 9: Reagenser og utstyr benyttet til Agilent 2100 Bioanalyser for å visualisere PCR produkt.

Utstyr og reagens til bioanalyser:
DNA Chip 7500 kit
DNA 7500 Ladder
DNA 7500 Markers
DNA dye Concentrate
DNA 7500 Gel Matrix

## 2.5 MALDI-TOF-MS

For identifikasjon ble alle *B. fragilis*-isolatene analysert med MALDI-TOF-MS med subtypingsprogram. Det ble benyttet «direkte transfer» til MALDI-TOF MS, noe som innebærer å høste en enkelt koloni fra renkultur av *B. fragilis* direkte fra agarskål uten annen forbehandling. Kolonien ble fordelt på to prøveposisjoner på en prøveplate før den ble dekt med matriks. Det er viktig at koloniene som høstes til identifikasjon på MALDI-TOF MS er mellom 24-48t gamle. Til hvert oppsett ble det benyttet en positiv kontroll, Bacterial Test Standard som er en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Negativ kontroll består av kun matrix.

## 2.6 Resistensbestemmelse for meropenem

Det ble utført resistensbestemmelse for meropenem med agar gradient MIC-test (Liofilmchem). Dette ble gjennomført for å kontrollere om stammene som er *cfiA* positiv er meropenem resistent og at *cfiA* negative stammer er sensitiv for meropenem. Ferske kolonier av *B. fragilis* fra FAA-agar ble brukt til å lage 1 McFarland suspensjon i Mueller Hilton-buljong som ble spredt ut på brucella agar. Agar-skålene ble inkubert i anaerob atmosfære ved 35 grader i 24 timer.

Ved følsomhetskategorisering benyttes NordicAst sine kliniske brytningspunkter for *Bacteroides species*. Alle *Bacteroides* stammer med meropenem MIC > 1 mg/L kategoriseres som resistente, mens stammer med MIC verdi  $\leq$  1 mg/L kategoriseres som følsomme (27).

MIC-verdi ble avlest visuelt av to ulike avlesere og rundet opp til nærmeste hele fortykningstrinn (mg/L).

## 2.7 Oxford Nanopore sekvensering

Oxford Nanopore sekvensering benyttes for å se på hele genomet til *B. fragilis* divisjon II. Dette er for å kunne se om teorien stemmer i henhold til IS-elementer oppstrøms for *cfiA*-genet, som kan føre til meropenem-resistens. Til dette forsøket ble det valgt to *B. fragilis* stammer av divisjon II (*cfiA* positiv). En prøve med relativt lav MIC, KRES-6, og en med høy MIC, STO-9.

Sekvenseringen ble utført av faglig veileder på avdelingen som benyttet seg av utstyret vist i tabell 10.

Tabell 10: Utstyr til Oxford Nanopore sekvensering.

Utstyr for sekvensering	
Leverandør	Oxford Nanopore Technologies
Instrument	MinION
Protokoll	Rapid Sequencing SQK-RAD004
Reagens Kit	Rapid Sequencing Kit SQK RAD004

Bioinformatiske verktøy benyttet for å finne resultatet er vist i tabell 11.

Tabell 11: Bioinformatiske verktøy og bruksområdet til Oxford Nanopore sekvensering.

Program	Bruksområde
Gruppy	Basecalling
Flye	Long-read assembly
Circlator	Sirkularisering og flytting av startkodon
Racon	Polishing av assemblyet
Prokka	Annotering

### 3. Resultater

#### 3.1 Utprøving av primere og probe

Primere ble testet for å sikre at de binder seg til ønsket målsekvens, *cfiA*-genet til *B. fragilis* divisjon II. Utprøving av primere ble utført med betingelser vanligvis benyttet ved AMM, vist i tabell 6. Det ble benyttet kokelysat av de 5 KRES-stammene med kjent divisjon II. Disse ble testet både ufortynnet og fortynnet 1:10 og 1:100. To kontroll-stammer med kjent divisjon I ble også brukt.

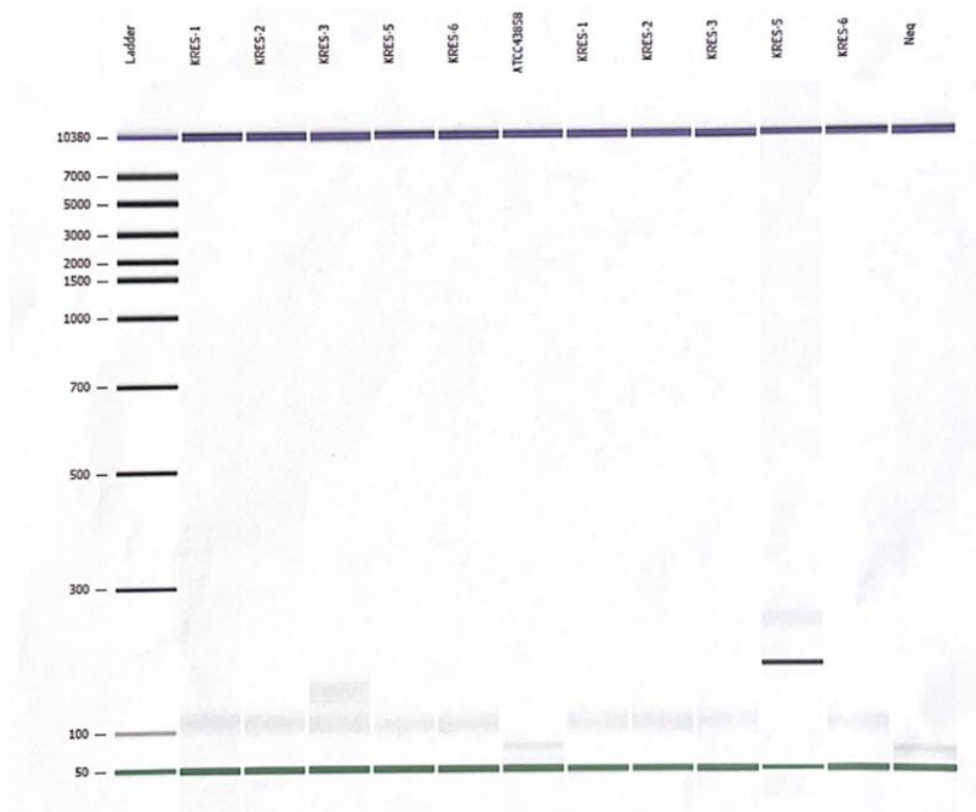
Resultater for utprøving av primere er vist i tabell 12. Alle kontroller ble godkjent i dette forsøket. Under bioinformatisk undersøkelse ble det vist at primer- og probesekvensen samsvarer med *cfiA*-genet, dette ble utført av faglig veileder.

Tabell 12: PCR resultat fra prøver benyttet under utprøving av primere og probe

Prøve ID	Antall	PCR resultat
KRES 1-5 ( <i>cfiA</i> +)	5	Positiv
ATCC 43858 ( <i>cfiA</i> -)	1	Negativ
CCUG 4856 ( <i>cfiA</i> -)	1	Negativ
MGW	1	Negativ

Ved fortytning på 1:10 ble Ct-verdiene rundt 18-20 og ved 1:100 ble Ct-verdiene 22-25. Derfor ble det bestemt at alle prøver skal fortyttnes 1:100, da dette gir Ct-verdier mellom lavt og høyt område.

For å undersøke at primerne ikke har bundet seg uspesifikt og sikre at vi har fått en god amplifikasjon, ble PCR-produkt analysert på BioAnalyzer (figur 10). På 8 av 12 prøver ble det ingen uspesifikke bånd, kun et bånd for hvert PCR-produkt. Båndene var derimot for svake, dette gjorde det ikke mulig å fastslå om produktet hadde riktig basepar størrelse på 77 basepar. Negative kontroller fikk begge et svakt bånd. 2 av 12 prøver ga et uspesifikt resultat. Svake bånd indikerer at det ikke er amplifisert nok PCR produkt og det må optimaliseres primer konsentrasjoner.



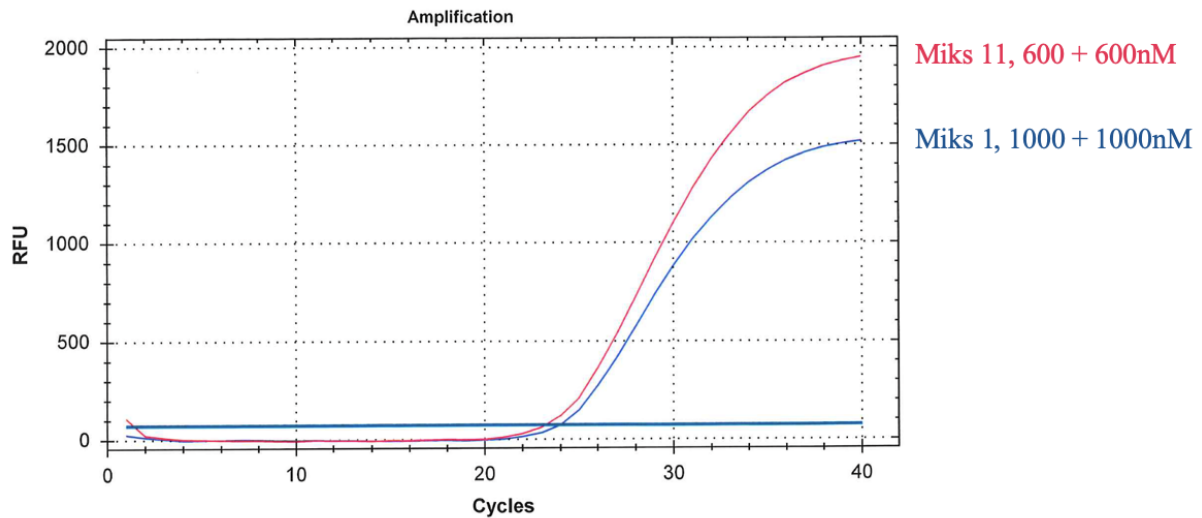
Figur 10: Resultater fra BioAnalyser under utprøving av primere. 8 av 12 prøver hadde for svake bånd, dette gjorde det ikke mulig å fastslå om PCR produktet hadde riktig basepar størrelse på 77 basepar.

### 3.2 Optimalisering av primerkonsentrasjon

Ulike konsentrasjoner av primere ble testet å finne ut hvilken konsentrasjon som gir best binding av primere.

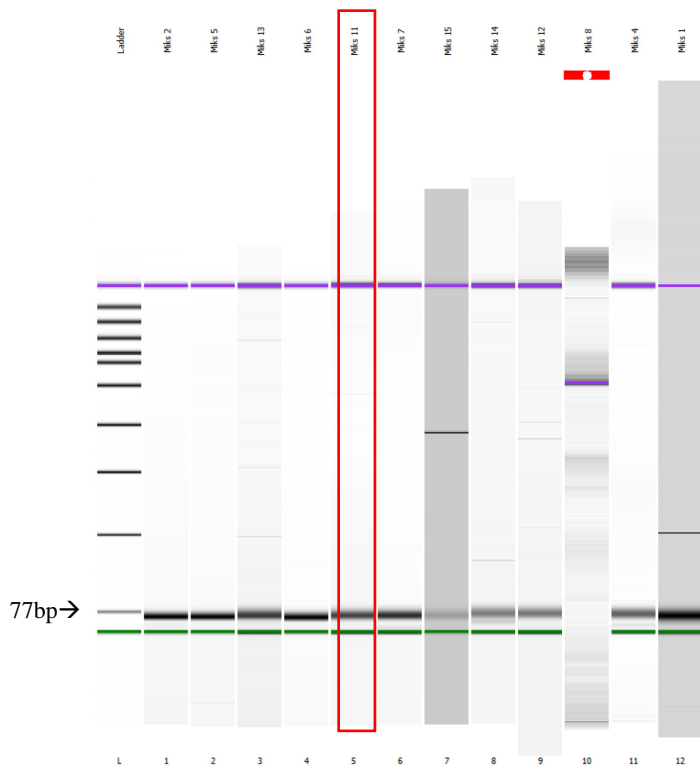
Undersøkelse av primerkonsentrasjoner med real-time PCR ble utført med mikser av ulik konsentrasjon på forward og revers primer, som vist i tabell 7. PCR-analyse av forward og revers primer ga fin amplifikasjonskurve og ønsket Ct-verdi ved alle primerkonsentrasjoner, to av konsentrasjonene er vist i figur 11.





Figur 11: PCR kurver fra optimalisering av primerkonsentrasjon. Figuren viser en kurve for primerkonsentrasjonen 600 + 600 nM (Mix 11) og en kurve for 1000 + 1000 nM (Mix 1). Kurvene viser at 600 + 600 nM har en bedre eksponentiell vekst og mer korrekt form, det blir derfor benyttet denne konsentrasjonen videre.

Ut ifra PCR-kurver ble et utvalg av PCR-produkt analysert på BioAnalyzer, resultater vist i figur 12. 9 av 12 prøver viser sterke spesifikke bånd, med en lengde på omtrent 77 basepar. 3 av 12 resultater viser uspesifikke PCR produkt, bånd med annen baseparstørrelse. Ut ifra resultater på BioAnalyzer og PCR ble det valgt en konsentrasjon på 600 + 600 nM på forward og revers primer basert på en kombinasjon av gelbilde som viser kun et sterkt bånd på 77 basepar og fin PCR-kurve.



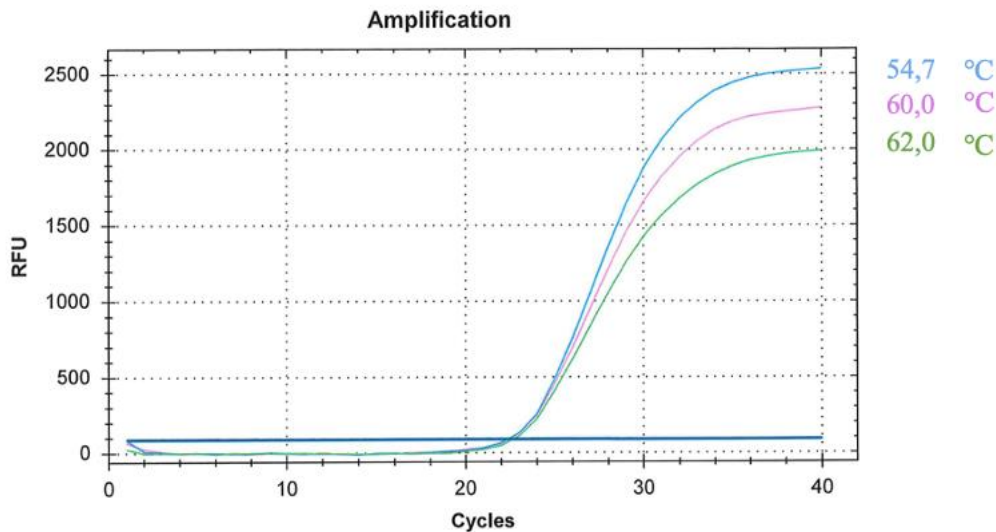
Figur 12: Analyseresultat fra BioAnalyser på et utvalg mikser under optimalisering av primerkonsentrasjon, med en positiv kontrollstamme (KRES-6). Ut ifra resultatene ble det valgt en konsentrasjon på 600 + 600nM (Miks 11).

### 3.3 Optimalisering av annealingtemperatur

Temperaturgradient ble testet for å bestemme gunstig annealing temperatur. Forward og revers primer har ulik optimal annealing temperatur. Derfor er det viktig å finne en bestemt temperatur hvor begge primere fungerer optimalt.

Det ble utført temperaturgradientanalyse på åtte ulike annealing-temperaturer fra 62 til 50°C. Prøvemateriale som ble benyttet var 1:10 og 1:100 fortykning av KRES-6.

Basert på resultatene fra analysen ble annealingtemperatur på 60°C valgt som den gunstige annealingstemperaturen. Grunnen til dette er at PCR-kurvene viser god amplifikasjon (figur 13). BioAnalyser resultat av PCR-produktet viser et sterkt bånd på 77 basepar, noe som indikerer et spesifikt PCR produkt.



Figur 13: PCR kurver fra optimalisering av annealingtemperatur. Kurvene viser at det blir lik Ct-verdi på hver annealingtemperatur. Ved bedømming av kurvene viser 62 °C en dårligere amplifikasjon enn de andre temperaturene. Basert på resultat fra PCR-kurve ble 60 °C benyttet videre da denne gir god amplifikasjon, og er en høyere temperatur som vil forhindre uspesifikke bindinger.

### 3.4 Effektivitet

Effektivitet testes som et mål på PCR metodens evne til å amplifisere DNA.

For å undersøke effektiviteten til PCR metoden ble det gjennomført forsøk med primerkonsentrasjonene 600nM og 1000nM. Det ble analysert en 10-folds fortynningsrekke, av kokelysat av KRES-6, fra ufortynnet til en fortykning på  $1:10^7$ , med 3 paralleller av hver fortykning.

Første effektivitetsanalyse ble gjennomført med primerkonsentrasjonen 600nM. Effektiviteten ved denne konsentrasjonen ble ikke innenfor gitte krav, da slope ble utenfor -3,1 - -3,6 og effektiviteten ble utenfor 90-110%. En ny effektivitetsanalyse ble derfor gjennomført med en konsentrasjon på 1000nM. En primerkonsentrasjon på 1000nM viser en effektivitet på 94,6% og slope på -3,5 som er innenfor de aksepterte grensene for effektivitet.

Primerkonsentrasjonen 1000 nM ble derfor valgt å benytte denne konsentrasjonen videre i prosjektet. Resultater fra effektivitetsanalyse er vist i tabell 13.

Tabell 13: Effektivitetsanalyse med primerkonsentrasjon på 600nM og 1000nM.

	600nM	1000nM
Effektivitet	87,7%	94,6%
Slope	-3,658	-3,458

### 3.5 Spesifisitet

Spesifisitet undersøkes for å sikre at metoden som benyttes kun detekterer *cfiA*-genet.

Spesifisitet undersøkes ved å analysere en rekke ulike bakteriearter, for å se om de binder seg uspesifikt. Bakteriearter benyttet i forsøket er vist i tabell 8.

Spesifisitet analysen viser at primere og probe ikke binder til noen andre av bakteriestammene som ble testet. Dette forteller at analysen er spesifikk for *cfiA*-genet til *B. fragilis*.

### 3.6 Analysering av St. Olavs prøver med ukjent divisjon med optimalisert PCR metode

Etter PCR metoden ble optimalisert ble de 12 *B. fragilis* isolatene med ukjent divisjon analysert, for å sammenligne resultatene med resultater fra MALDI-TOF MS (tabell 15).

Dette forsøket ble utført med optimalisert PCR metode, med en primerkonsentrasjon på 1000nM, probekonsentrasjon på 200nM og programmet Perfecta2-stepTm60.

Ved analysering av prøvene ble 6 av 12 prøver positive for *cfiA*-gen (divisjon II), og 6 av 12 prøver ble negative for *cfiA*-gen (divisjon I). Kontroller ble godkjent.

### 3.7 MALDI-TOF

Alle bakteriestammene benyttet i prosjektet ble analysert på MALDI-TOF MS, for å undersøke om MALDI-TOF MS sitt subtypingsprogram klarer å skille *cfiA*-positive *B. fragilis* fra de som er *cfiA*-negative.

En koloni fra renkultur av hver stamme spres på to prøveposisjoner, dekkes med matrix og analyseres. I forsøket ble det benyttet 5 stammer med kjent divisjon II og 3 stammer med kjent divisjon I. Det ble også benyttet 12 stammer med ukjent divisjon.

Resultatene fra analyse med MALDI-TOF MS sitt subtypingprogram viste at de 5 stammene med kjent divisjon II ble klassifisert som *cfiA*-positiv. De 3 stammene med kjent divisjon I ble klassifisert som *cfiA* negativ. Av de 12 stammene med ukjent divisjon ble 6 av 12 detektert som positiv for *cfiA*, og 6 av 12 ble *cfiA* negativ (tabell 15). Alle bakteriestammene fikk en score >2. Alle kontroller ble godkjent ved bruk av MALDI-TOF MS

### 3.8 Resistensbestemmelse for meropenem

Fenotypisk resistensbestemmelse ble gjennomført med meropenem agar gradient MIC for å kontrollere om stammene som er *cfiA* positiv også er fenotypisk meropenem resistente. Om bakterien er karbapenemresistent er avhengig av om *cfiA*-genet er uttrykt eller ikke. Derfor er det viktig å resistensbestemme *B. fragilis* stammer (9).

Det benyttes en 1 McFarland suspensjon av *B. fragilis* stammer under 24t gamle, i Mueller Hilton buljong, som spres på Brucella agar før det inkuberes i 35 °C i 24 timer før visuell avlesning av MIC-verdi.

Det ble utført resistensbestemmelse på 20 ulike bakteriestammer. De 11 bakteriestammene som ble identifisert genotypisk *cfiA*-positiv, ble resistente med en MIC-verdi mellom 4-32 mg/L. De 9 stammene som ble bestemt genotypisk *cfiA*-negativ ble sensitive med MIC-verdier mellom 0,094-0,5 mg/L.

#### 3.8.1 Utvidet undersøkelse av STO-9

Under MIC-test av STO-9 ble det oppdaget en enkeltstående bakteriekoloni som var innenfor diffusjonssonen. En hemningssone er sonen hvor mikroben påvirkes av antibiotika, slik at de ikke vokser inntil stripsen. Grunnet stor forskjell i avlest MIC verdi på enkeltstående koloni inne i hemningssonen og resterende bakteriekolonier på brucella-agaren, ble kolonien analysert på nytt på MALDI-TOF MS. Resultatet viser at bakteriekoloniene av STO-9 som var følsomme for meropenem var *cfiA* negativ, og resistent bakteriekoloni var *cfiA*-positiv. Hver av disse koloniene ble derfor spredt på nytt, og det ble utført en ny MIC-test for å undersøke forskjellen på den resistente bakteriekolonien og de følsomme bakteriekoloniene på agaren. Forskjellen på disse viste at den resistente bakteriekolonien hadde en diffusjonssone på 6 mg/L, og den følsomme bakteriekolonien hadde en diffusjonssone på 0,125 mg/L. Ved undersøkelse på MALDI-TOF MS og PCR viste begge resultatene at den resistente bakteriekolonien var *cfiA*-positiv og den følsomme bakteriekolonien var *cfiA*-negativ. Resultater vist i tabell 14.

Tabell 14: Undersøkelse av resistente og følsomme kolonier av STO-9.

Prøve ID	MALDI-TOF MS	Score MALDI-TOF MS	Hemningszone agar gradient MIC (mg/L)	Resistensbestemmelse	PCR
STO-9 resistent koloni	<i>cfiA</i> -pos	>2	6	R	<i>cfiA</i> -pos
STO-9 følsomme kolonier	<i>cfiA</i> -neg	>2	0,125	S	<i>cfiA</i> -neg

### 3.10 Sammenstilling av resultater fra MALDI-TOF MS, PCR og fenotypisk resistensbestemmelse

For å kunne sammenligne om resultatene funnet på MALDI-TOF MS korresponderer med resultatene på PCR og resultat av fenotypisk resistens ble dette sammensatt til tabell 15.

Her ser man at de bakteriestammene som MALDI-TOF MS klassifiserer som *cfiA*-positive samsvarer med de bakteriestammene som får et positivt resultat på realtime-PCR. Alle *cfiA* positive stammer er også resistente mot meropenem med MIC > 1,0 mg/L.

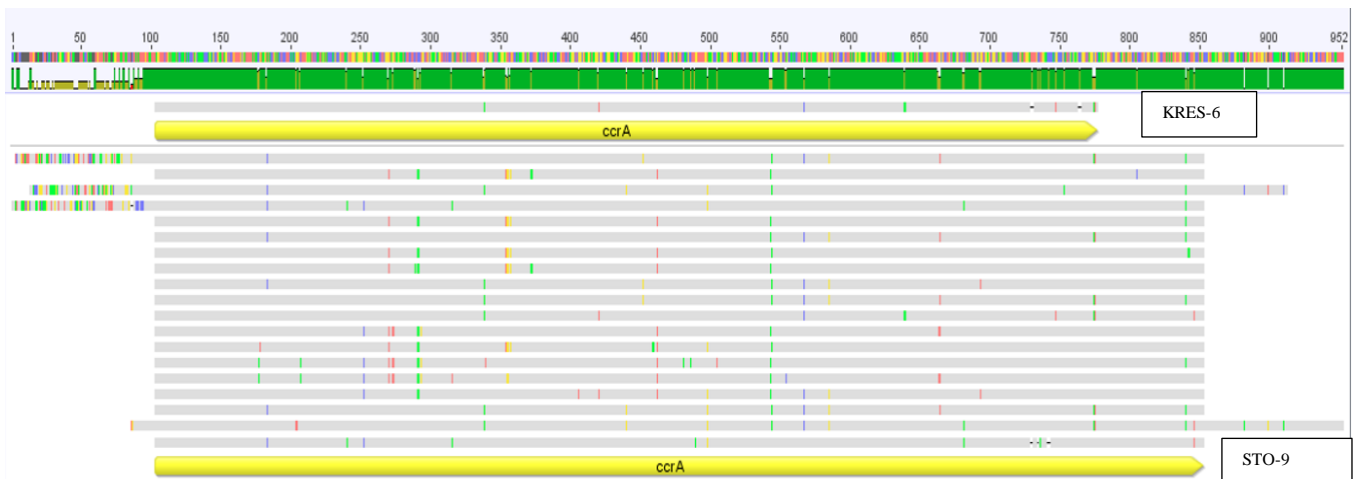
Tabell 15: En sammenstilling av alle resultatene funnet underveis i prosjektet. Denne viser MALDI-TOF, MIC og PCR resultater.

Prøve ID	MALDI-TOF MS Art	MALDI-TOF MS Subtyping	Resistens- bestemmelse	PCR
KRES-1	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
KRES-2	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
KRES-3	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
KRES-5	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
KRES-6	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
ATCC 43858	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
CCUG 4856	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-1	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-2	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-3	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-4	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-5	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-6	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-7	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-8	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-9	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-9 MIC	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-10 pos B3	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-10 pos A5	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
STO-11	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg
STO-12	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> pos	R	<i>cfiA</i> pos
ATCC 25285	<i>B. fragilis</i>	<i>cfiA</i> neg	S	<i>cfiA</i> neg

### 3.11 Oxford Nanopore sekvensering

Oxford Nanopore sekvensering ble utført for å undersøke hele genomet til STO-9 og KRES-6, og derfra kunne se etter *cfiA*-genet og IS-elementer. Sekvenseringen ble utført av faglig veileder.

Ved tolkning av resultater ble det funnet et *cfiA*-gen hos både STO-9 og KRES-6 (figur 14). *CfiA*-genene til bakteriestammene ble vurdert mot andre kjente *cfiA*-gen vist i figur 14. Det ble funnet et IS-element hos STO-9, dette heter IS8f9. Det ble ikke funnet et IS-element på KRES-6.



Figur 14: Alignment av *cfiA*-genet (*ccrA*) til KRES-6 og STO-9 med andre kjente *cfiA*-gener.



## 4. Diskusjon

Økningen av meropenemresistens hos *B. fragilis* er en bekymring internasjonalt. I dette prosjektet har vi vurdert to ulike metoder for påvisning av markør for meropenemresistens (*cfiA* gen med PCR og MALDI-TOF MS) og sammenstilt resultatene fra disse med resultat av fenotypisk resistens (MIC verdi).

### 4.1 Optimalisering av PCR metode

Optimaliseringen av PCR metoden startet med utprøving av primere og probe med betingelser fra AMM. Resultatet fra PCR og bioinformatikk viste at primere og probe binder seg spesifikt til *cfiA*-genet til *B. fragilis*. PCR-kurvene viste en god amplifikasjon. Ut ifra forsøk med ulike fortyngninger av KRES isolat, ble det konkludert med at alle prøvene bør fortynnes 1:100.

Dette er på grunn av at ufortynnet prøvemateriale gir veldig lave Ct-verdier, og det er ønskelig å ha en høyere Ct-verdi. Ved lave Ct-verdier er det mye templat til stede i prøven, og primere og probe blir brukt opp tidlig i prosessen. Ønsker derfor å oppnå en høyere Ct-verdi (24-25) hvor prøven ikke er for sterk eller for svak.

Probekonsentrasjon som ble brukt er en konsentrasjon på 200nM. Denne ble ikke endret da analyseresultatet viste et godt fluorescens-signal på alle prøvene analysert med PCR-metoden.

Resultater fra BioAnalyser med PCR-produkt fra utprøving av primere og probe, viste for svake bånd til å fastslå antall basepar. Dette indikerte at det var en liten mengde PCR-produkt til stede. Det ble derfor antatt at metoden krevde en høyere konsentrasjon av primere for en bedre amplifisering. Hos enkelte av prøvene på BioAnalyser under første utprøving viste resultatene to eller flere bånd på prøveresultatet. På grunn av at det var kun et par av disse prøvene, ble det antatt med at det hadde skjedd en feil under analyse. Prøvene ble ikke analysert på nytt da BioAnalyser er en tidkrevende og dyr metode. Det ble derfor bestemt ut ifra de prøveresultatene som ble godkjent, at primere var spesifikke og bandt godt til målsekvens.

Ved primer optimalisering ble det ikke store forskjellene i Ct-verdier ved de ulike konsentrasjonene. PCR-kurvene viste små forskjeller, men alle viser en god amplifikasjon. 12 av PCR-produktene ble valgt til å analysers på BioAnalyser. Resultat fra BioAnalyser viste ikke store forskjeller på mengde PCR produkt, men noen av resultatene ble ikke godkjent, grunnet feilmelding eller uspesifikke bindinger. Dette kan være på grunn av feil i

prøveopparbeidelsen, dårlig pipettering eller kontaminering av brønnen. På grunn av at de fleste brønnene viste gode resultater, og at BioAnalyzer er en tidkrevende og dyr analyse, ble det derfor ikke utført et nytt forsøk. Dermed ble ikke alle konsentrasjonene analysert på BioAnalyzer. Det ønskes en lavest mulig primerkonsentrasjon for å unngå uspesifikke bindinger, det ble derfor valgt å benytte laveste godkjente konsentrasjon på 600nM videre i prosjektet.

Ved undersøkelse av ulike annealing temperaturer viste både Ct-verdier og PCR-kurver at alle temperaturene ga et relativt likt resultat. BioAnalyzer resultat viser at alle de ulike annealingtemperaturene ga sterke, spesifikke bånd på omtrent 77 basepar. Resultatet viser dermed at alle temperaturer i prinsippet kan benyttes.

Det ble valgt en annealing temperatur på 60°C. 60°C er en høy temperatur som kan forhindre uspesifikke bindinger. I tillegg er 60°C en standardisert temperatur for PCR metoder på laboratoriet, og analysen kan derfor benyttes sammen med andre analyser slik at arbeidsflyten går raskere.

Effektivitetsanalysen ble utført med to forsøk. Første forsøk ble gjennomført med en primerkonsentrasjon på 600nM, dette ga ikke god nok effektivitet. Dette ble antatt å skyldes en for lav primerkonsentrasjon (20). Det ble dermed gjennomført en andre effektivitetsanalyse med en primerkonsentrasjon på 1000nM. Dette resulterte i bedre effektivitet, med verdier innenfor gitte krav. PCR metoden med en primerkonsentrasjon på 1000nM har dermed en god evne til å amplifisere *cfiA*-genet. Dette samsvarer med metode benyttet i artikkelen hvor primere og probe er hentet fra (26). 1000nM regnes som en høy primerkonsentrasjon, noe som fører til høyere kostnader og øker risikoen for uspesifikke bindinger mellom primerne.

Spesifisitetsanalysen ble utført med et vidt spekter av ulike bakteriearter. Etter analysen ble det konkludert med at metoden er spesifikk for *cfiA*-genet, da primere og probe ikke binder seg uspesifikt. Sannsynligheten for uspesifikke bindinger reduseres da det brukes kokelysat av renkultur av *B. fragilis*. En spesifikk metode vil føre til mindre risiko for feilaktige prøvesvar, noe som er viktig for å kunne gi pålitelige prøvesvar til pasienten.

Etter optimalisering av PCR ble det konkludert med at metoden fungerte best med en primerkonsentrasjon på 1000nM og en annealing temperatur på 60°C. Probe konsentrasjon på 200nM ble ikke endret. Dette samsvarer med artikkelen primere og probe er hentet fra (26).

#### 4.2 MALDI-TOF MS

Ved testing av subtypingsprogrammet til MALDI-TOF MS ble det funnet en subtype hos alle bakteriestammene som ble benyttet i dette prosjektet. Dette viser at subtypingsprogrammet kan detektere *cfiA*-positive og *cfiA*-negative isolater av *B. fragilis*, som også andre har demonstrert (24). MALDI-TOF MS er en enkel metode å benytte seg av, med svar på analysen fra oppvekstkultur på få minutter. Subtypingsprogrammet krever ingen ekstra opplæring av ansatte. Bruk av MALDI-TOF MS vil gi svar til rekvirenten raskere enn både fenotypisk resistenstesting og påvisning av *cfiA* gen med PCR kan, og kan bidra til raskere optimal behandling av pasienter med alvorlig infeksjon.

Det ble observert i et tilfelle så ville ikke subtypingsprogrammet gi et resultat på subtype, selv om identifikasjonen ga en score >2. Det er forsøkt å undersøke dette problemet hos leverandør, men det er ikke kommet et svar på hvorfor dette problemet kan forekomme. Problemet kan omgås ved å sjekke resultat manuelt der det vil fremgå om det er divisjon I eller II, men dette vil kreve oppmerksomhet og prosedyrer for dette i laboratoriet.

#### 4.3 Fordeler og ulemper på metodene

1000nM brukt i PCR-metoden er en høy primerkonsentrasjon, den standardiserte primerkonsentrasjonen på laboratoriet er 300nM. En høy konsentrasjon av primere øker muligheten for uspesifikke bindinger. Ved høyere konsentrasjoner av primere, er det større sannsynlighet for primer dimere. Primer dimer er et biprodukt i en PCR-reaksjon, disse kan forekomme når primere binder seg til hverandre, dette vil gi korte uspesifikke fragmenter som kan gi feilaktige prøvesvar. Primernes evne til å danne primer dimere kan derimot sjekkes, både mot hverandre og seg selv, for å kunne forhindre dette ved valg av primere. En annen ulempe med høyere primerkonsentrasjoner er høyere kostnader på primere, da høye konsentrasjoner fører til større bruk av ressurser (33). MALDI-TOF MS har en lavere kostnad med tanke på reagenser og utstyr.

I dette prosjektet krever PCR-metoden forbehandling av prøvematerialet med kokelysering. Med MALDI-TOF MS høstes en enkelt koloni direkte fra agarskål. Prøveopparbeidelsen for

PCR er manuell, med tillaging av reaksjonsmiks, fortykning og pipettering av prøver. Det krever derfor både tid og opplæring av personell. Når opparbeidelsen er gjennomført krever amplifiseringen på instrumentet omtrent en time. Analyse med MALDI-TOF MS tar kun et par minutter, metoden er avhengig av kolonier under 24t gamle og en god prøveoppbeidelse for å få en score >2. PCR metoden er en mer tidkrevende og mindre effektiv analyse enn MALDI-TOF MS.

#### 4.4 Påvisning av meropenemresistens hos *B. fragilis*

Resistensbestemmelsen viste i dette prosjektet en sammenheng mellom *cfiA*-positive *B. fragilis* og meropenem resistens. Alle *cfiA*-positive stammer var resistente mot meropenem. Disse resultatene understreker viktigheten av å kunne skille divisjon I og divisjon II av *B. fragilis*, slik at karbapenemresistens kan overvåkes og tiltak kan iverksettes. Økt utbredelse av karbapenemresistens vil begrense behandlingsmuligheter i fremtiden. Studier har vist at økt forekomst av resistens gir økt sykkelighet, dødelighet og behandlingkostnader (34).

Det ble oppdaget en enkeltstående koloni, som var innenfor diffusjonssonen under MIC-test av STO-9. Denne ble klassifisert som *cfiA*-positiv, mens de resterende bakteriekoloniene ble klassifisert som *cfiA*-negativ. Dette kan skyldes en blandingskultur av de to divisjonene. Blandingskultur kan være en utfordring under deteksjon av *cfiA*-genet, dette er på grunn av at under prøveoppbeidelse benyttes en enkel koloni til identifikasjon, og kan gi misvisende resultat. Det samme gjelder for PCR påvisning av resistensgener, der man som regel benytter enkeltkoloni til DNA ekstraksjon. Her har fenotypisk resistenstesting en fordel ved at man benytter en oppslemming av flere kolonier for følsomhetsbestemmelsen, og i dette tilfellet da oppdaget at prøvematerialet inneholdt både en meropenem sensitiv og en meropenem resistent stamme.

Det er beskrevet at det er større sannsynlighet for karbapenem resistens ved tilstedeværelse av *cfiA*-gen, men tilstedeværelse av *cfiA* gen behøver ikke å føre til resistens (9). Flere studier har vist mye høyere forekomst av *cfiA* gen enn fenotypisk resistens (24). Ved diskrepans i resultater mellom fenotypisk resistens og resultat fra MALDI TOF MS bør supplerende undersøkelser med *cfiA* PCR og eventuelt helgenomsekvensering utføres, i tillegg til retesting av isolatet med MIC og MALDI TOF.

Det kan være viktig å kontrollere resistensutviklingen til *B. fragilis* over tid. Med metoder på plass for deteksjon av *cfiA*-genet (divisjon II), har St. Olavs et godt grunnlag for en større overvåkning av karbapenemresistens, som kan bidra til å bremse videre spredning av karbapenemresistens hos *B. fragilis* ved at hensiktsmessige smittevernstiltak kan iverksettes ved behov.

#### **4.5 Oxford Nanopore sekvensering**

Oxford Nanopore sekvenseringen resulterte i funn av *cfiA*-gen til både KRES-6 og STO-9. For at *cfiA*-genet skal føre til resistens mot meropenem antibiotika, trenger det ofte å uttrykkes av IS-element oppstrøms for genet (2). IS-element ble funnet hos STO-9, som er den bakterien med lavest MIC-verdi av disse to. Dette samsvarer med teorien, men hos KRES-6 som har høyeste MIC-verdien ble det ikke funnet IS-element. IS-elementet kan være en annen plass i genomet som ikke ble oppdaget under denne undersøkelsen. Grunnet manglende tid på prosjektet ble ikke dette undersøkt nærmere, men dette kan arbeides med videre.

## 5. Konklusjon

Begge metodene benyttet i prosjektet er egnet til å påvise *cfiA*-genet som er en karakteristika ved *B. fragilis* divisjon II. MALDI-TOF MS er den raskeste og rimeligste metoden, og vil være egnet til daglig bruk på laboratoriet. PCR metoden kan brukes i utvalgte tilfeller der fenotype og genotype ikke stemmer overens eller i studiesammenheng. Med disse metodene på plass har AMM etablert metodikk som gjør nærmere overvåkning av meropenemresistens hos *B. fragilis* mulig.

## 6. Referanser

1. High rates of reduced susceptibility in the *Bacteroides fragilis* group isolated from blood cultures – The first national survey in Denmark | Elsevier Enhanced Reader [Internett]. [sitert 26. mars 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0924857913001799?token=3D2C21E23F9D5A8D836BAD87EDC31B16CE8B29D898A3CE2608AFAC46316B56AAC5C2476FCB7F183536E9EC9748981F16&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230326115831>
2. Cordovana M, Kostrzewa M, SÓki J, Witt E, Ambretti S, Pranada AB. *Bacteroides fragilis*: A whole MALDI-based workflow from identification to confirmation of carbapenemase production for routine laboratories. *Anaerobe*. desember 2018;54:246–53.
3. Noor A, Khetarpal S. *Anaerobic Infections. I: StatPearls* [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [sitert 11. april 2023]. Tilgjengelig på:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482349/>
4. Patrick S. A tale of two habitats: *Bacteroides fragilis*, a lethal pathogen and resident in the human gastrointestinal microbiome. *Microbiology (Reading)*. april 2022;168(4).
5. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. oktober 2007;20(4):593–621.
6. JOHNSON JL. Taxonomy of the *Bacteroides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1978;28(2):245–56.
7. Pearson WR. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr Protoc Bioinformatics*. juni 2013;0 3:10.1002/0471250953.bi0301s42.
8. Gutacker M, Valsangiacomo C, Piffaretti JC. Identification of two genetic groups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis: distribution of antibiotic resistance (*cfiA*, *cepA*) and enterotoxin (*bft*) encoding genes The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AF197508–AF197534. *Microbiology*. 2000;146(5):1241–54.
9. Carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis*: A review of molecular mechanisms | Elsevier Enhanced Reader [Internett]. [sitert 14. mars 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S107599642200097X?token=700455F3425F7B1BE58BD7BFD236FA48E587842A8083607AABEECC76E1E5D2314700AE4AC0B80255BCA96C84DD23E6FF&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230314125309>
10. Liabø V. betalaktam-antibiotika. I: *Store medisinske leksikon* [Internett]. 2023 [sitert 10. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/betalaktam-antibiotika>

11. Nagy E. Anaerobic Infections. *Drugs*. 1. mai 2010;70(7):841–58.
12. Mahillon J, Chandler M. Insertion Sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*. september 1998;62(3):725–74.
13. Fossum S, Dissen E. PCR – polymerasekjedereaksjon. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 13. april 2023]. Tilgjengelig på: [https://sml.sn.no/PCR\\_-\\_polymerasekjedereaksjon](https://sml.sn.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon)
14. Elise Størvold Damås. EQS Bakteriekultur, forbehandling og ekstraksjon til PCR. 2023.
15. Bruce Albert, Karen Hopkin, Alexander D. Johnson, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, mfl. *Essential cell biology*. 5. utg. New York: W.W. Norton & company, Inc; 2019.
16. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *Genome Res*. 12. januar 1993;3(3):S30–7.
17. Why TaqMan Assay Design is Important - NO [Internett]. [sitert 13. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/why-taqman-assay-design-important.html>
18. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. september 2021;49(5):800–12.
19. Al Bayat S, Mundodan J, Hasnain S, Sallam M, Khogali H, Ali D, mfl. Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? *J Infect Public Health*. september 2021;14(9):1201–5.
20. Sigmaaldrich. PCR Assay Optimization and Validation. I: Sigmaaldrich [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/assay-optimization-and-validation#introduction>
21. Secure Experimental Success. Agilent 2100 Bioanalyzer system.
22. maldi-tof-ms---en-mikrobiologisk-revolusjon.pdf [Internett]. [sitert 16. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/60793ec04a424d0db82a087c485c90e7/maldi-tof-ms---en-mikrobiologisk-revolusjon.pdf>
23. cloverbio\_webadmin. Using of MALDI-TOF in hospitals [Internett]. Clover Bioanalytical Software. 2019 [sitert 2. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://cloverbiosoft.com/using-of-maldi-tof-in-hospitals/>
24. Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (cfiA-



negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol.* november 2011;60(Pt 11):1584–90.

25. Cordovana M, Pranada AB, Ambretti S, Kostrzewa M. MALDI-TOF bacterial subtyping to detect antibiotic resistance. *Clinical Mass Spectrometry.* 1. september 2019;14:3–8.

26. Ferløv-Schwensen SA, Sydenham TV, Hansen KCM, Hoegh SV, Justesen US. Prevalence of antimicrobial resistance and the cfiA resistance gene in Danish *Bacteroides fragilis* group isolates since 1973. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1. oktober 2017;50(4):552–6.

27. Brytpunktstabeller [Internett]. [sitert 14. april 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://www.nordicast.org/brytpunktstabeller>

28. eucast: New S, I and R definitions [Internett]. [sitert 18. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://www.eucast.org/newsiandr>

29. Oxford Nanopore Technologies [Internett]. [sitert 4. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://nanoporetech.com/>

30. What is Oxford Nanopore Technology (ONT) sequencing? [Internett]. @yourgenome · Science website. [sitert 4. mai 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-oxford-nanopore-technology-ont-sequencing/>

31. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internett]. [sitert 18. mai 2023].  
Tilgjengelig på: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

32. Ingebjørg Guttvik, Ingvild Lamøy. Figur laget selv. 2023.

33. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, mfl. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 15. august 1997;25(16):3235–41.

34. Folkehelseinstituttet. Antibiotikaresistens [Internett]. 2018 [sitert 12. mai 2023].  
Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/medisiner/antibiotika-og-resistens/om-antibiotikaresistens/>

## 7. Vedlegg

Vedlegg 1: Resultattabell fra MALDI-TOF MS for alle stammer benyttet i forsøket	42
Vedlegg 2: Utprøving av primere, PCR resultater	43
Vedlegg 3: Utprøving av primere, BioAnalyzer	44
Vedlegg 4: Optimalisering av primerkonsentrasjon, PCR resultater	45
Vedlegg 5: Optimalisering av primerkonsentrasjoner, resultater fra BioAnalyzer	46
Vedlegg 6: Optimalisering av annealingtemperatur, PCR resultater	47
Vedlegg 7: Optimalisering av annealingtemperatur, resultater fra BioAnalyzer	49
Vedlegg 8: Effektivitet 600 + 600nM, PCR resultater	50
Vedlegg 9: Effektivitet 1000 + 1000nM, PCR resultater	52
Vedlegg 10: Spesifisitet, PCR resultater	54
Vedlegg 11: PCR resultater på STO prøver	55
Vedlegg 12: Resultater fra fenotypisk resistensbestemmelse av <i>B. fragilis</i> -stammer	56

**Vedlegg 1: Resultattabell fra MALDI-TOF MS for alle stammer benyttet i forsøket**

Prøve ID	MALDI-TOF MS	Score første posisjon	Score andre posisjon
Pos kontroll	Escherichia coli	2.13	
KRES-1	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.16	2.20
KRES-2	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.18	2.41
KRES-3	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.10	2.03
KRES-5	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.24	2.12
KRES-6	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.28	2.30
ATCC 43858	<i>Bacteroides fragilis, cfiA neg</i>	2.39	2.45
CCUG 4856	<i>Bacteroides fragilis, cfiA neg</i>	2.51	2.39
STO-1	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.37	2.50
STO-2	<i>Bacteroides fragilis, cfiA pos</i>	2.20	2.28
STO-3	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA pos</i>	2.48	2.38
STO-4	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA pos</i>	2.25	2.38
STO-5	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.40	2.44
STO-6	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.44	2.45
STO-7	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.34	2.35
STO-8	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.48	2.45
STO-9	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.37	2.46
STO-10 pos. B3	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA pos</i>	2.31	2.08
STO-10 pos. A5	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA pos</i>	2.20	2.38
STO-11	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.46	2.39
STO-12	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA pos</i>	2.32	2.23
ATCC 25285	<i>Bacteriodes fragilis, cfiA neg</i>	2.42	2.27

## Vedlegg 2: PCR resultater fra utprøving av primere

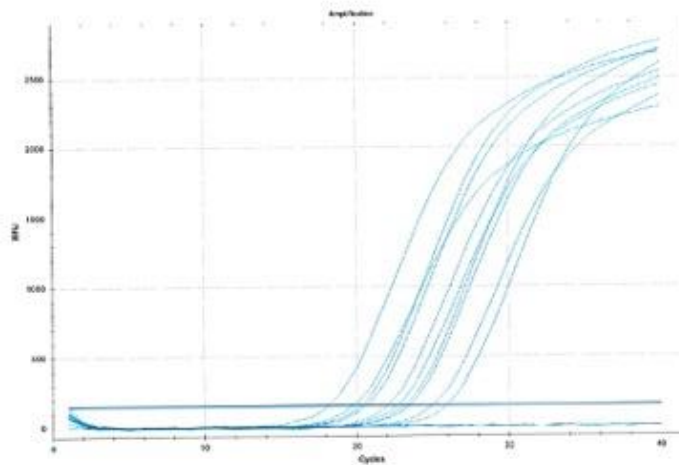
B.fragilis PCR 2 24.03.23.pcrd

Page 1 of 1

BIO-RAD

## B.fragilis PCR 2 24.03.23.pcrd

24.03.2023 13:06



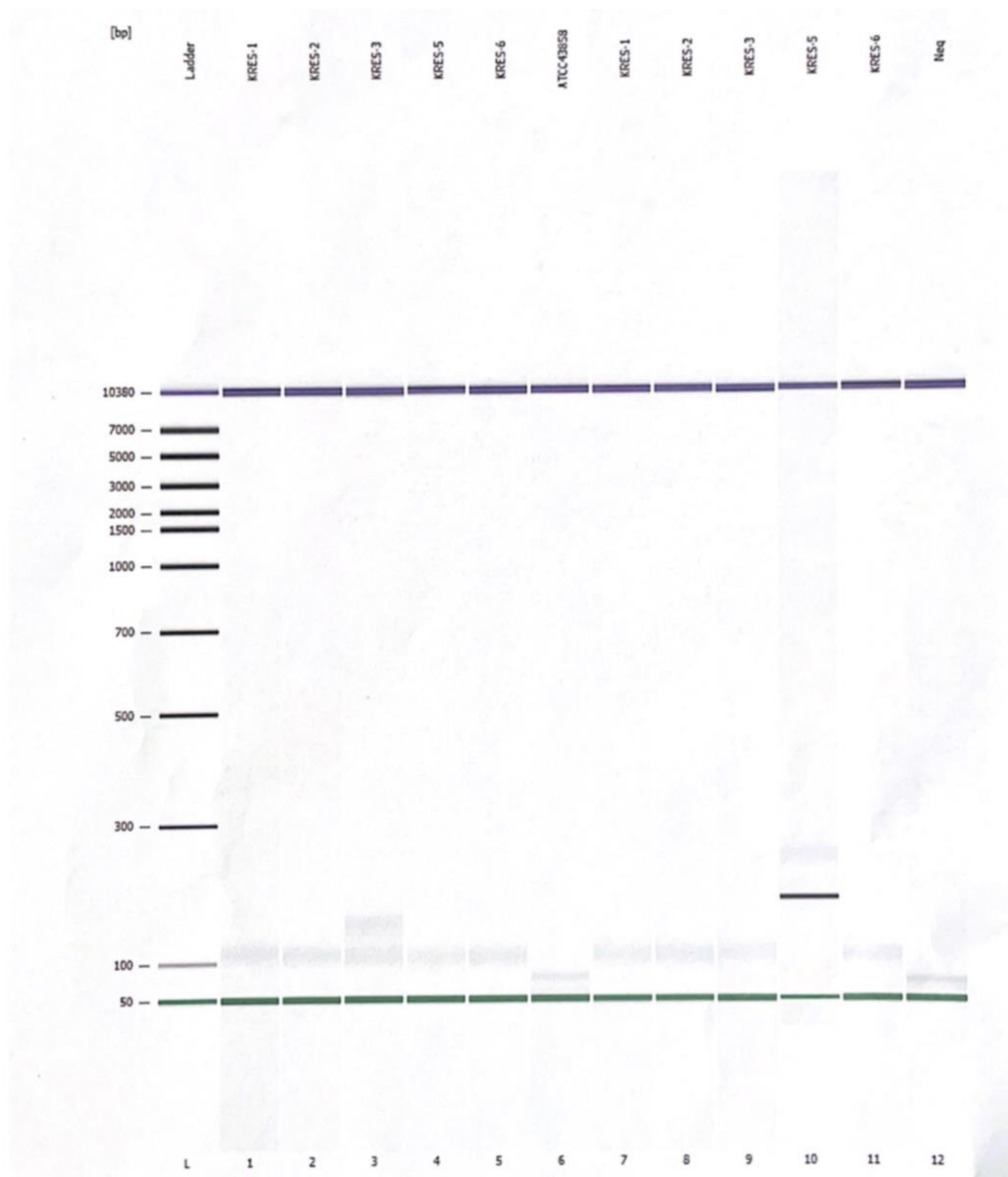
## Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	KRES-1 1:10	19,74	19,74	0,000
B01	FAM		Unkn	KRES-2 1:10	22,05	22,05	0,000
C01	FAM		Unkn	KRES-3 1:10	18,16	18,16	0,000
D01	FAM		Unkn	KRES-5 1:10	20,57	20,57	0,000
E01	FAM		Pos Ctrl	KRES-6 1:10	20,25	20,25	0,000
F01	FAM		Unkn	ATCC 43858 1:10	N/A	0,00	0,000
G01	FAM		Unkn	KRES-1 1:100	23,14	23,14	0,000
H01	FAM		Unkn	KRES-2 1:100	25,90	25,90	0,000
A02	FAM		Unkn	KRES-3 1:100	22,65	22,65	0,000
B02	FAM		Unkn	KRES-5 1:100	25,01	25,01	0,000
C02	FAM		Unkn	KRES-6 1:100	23,42	23,42	0,000
D02	FAM		Unkn	ATCC 43858 1:100	N/A	0,00	0,000
E02	FAM		Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000

mhtml:file://C:\ProgramData\Bio-Rad\CFX\Temp\B.fragilis PCR 2 24.03.23.mht

24.03.2023

**Vedlegg 3: Utprøving av primere, resultater fra BioAnalyzer**

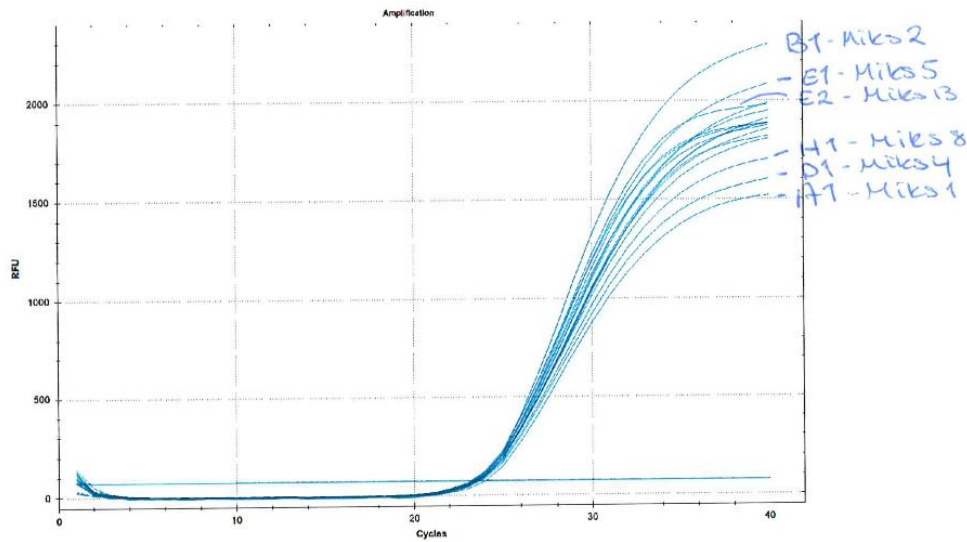


## Vedlegg 4: Optimalisering av primerkonsentrasjon, PCR resultater



## B. fragilis primer opt 28.03.23.pcrd

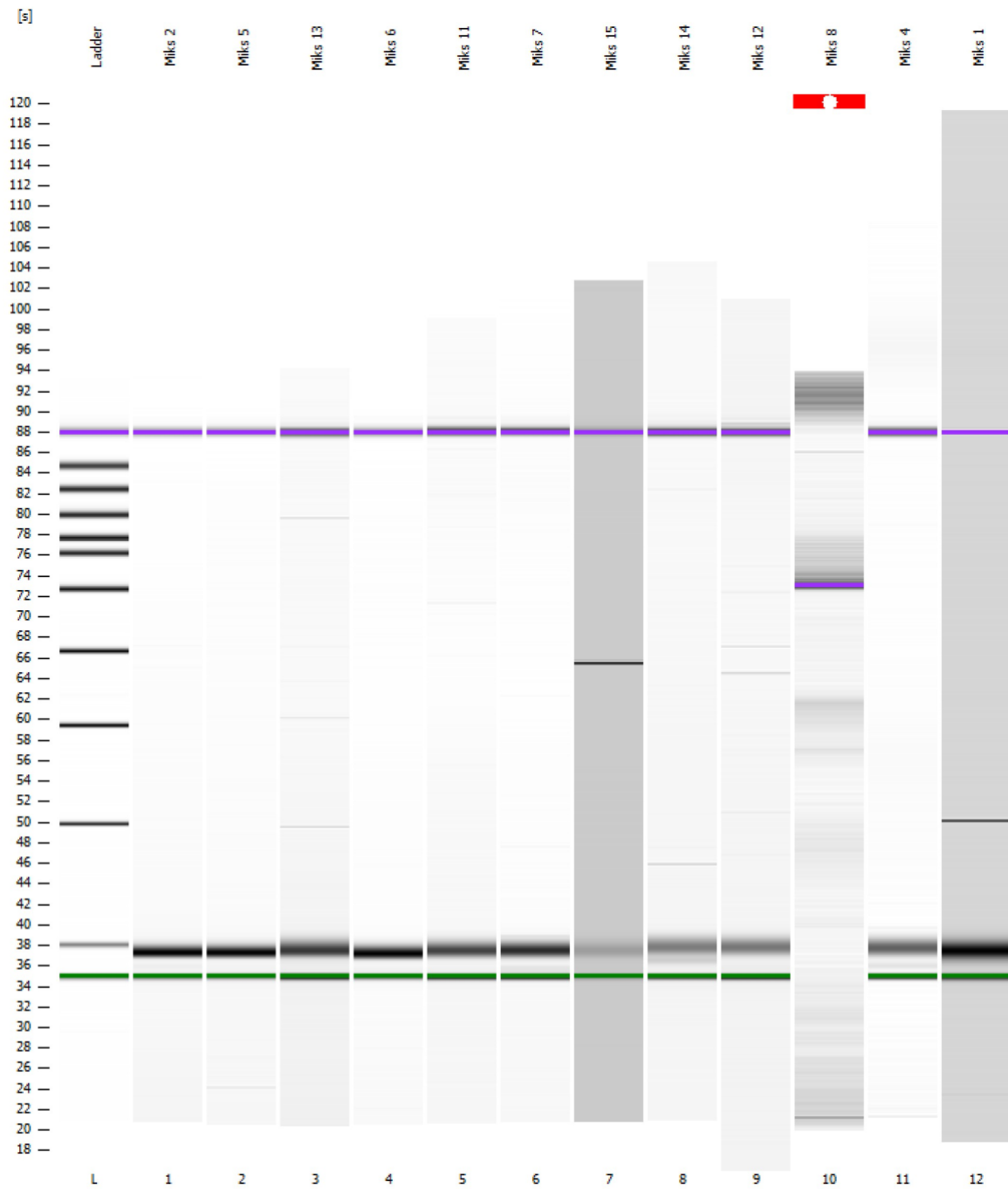
28.03.2023 15:08



### Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	Miks 1	23,99	23,99	0,000
B01	FAM		Unkn	Miks 2	23,48	23,48	0,000
C01	FAM		Unkn	Miks 3	23,60	23,60	0,000
D01	FAM		Unkn	Miks 4	23,66	23,66	0,000
E01	FAM		Unkn	Miks 5	23,44	23,44	0,000
F01	FAM		Unkn	Miks 6	23,52	23,52	0,000
G01	FAM		Unkn	Miks 7	23,52	23,52	0,000
H01	FAM		Unkn	Miks 8	23,55	23,55	0,000
A02	FAM		Unkn	Miks 9	23,46	23,46	0,000
B02	FAM		Unkn	Miks 10	23,40	23,40	0,000
C02	FAM		Unkn	Miks 11	23,22	23,22	0,000
D02	FAM		Unkn	Miks 12	23,34	23,34	0,000
E02	FAM		Unkn	Miks 13	23,17	23,17	0,000
F02	FAM		Unkn	Miks 14	23,30	23,30	0,000
G02	FAM		Unkn	Miks 15	23,19	23,19	0,000
H02	FAM		Unkn	Miks 16	23,38	23,38	0,000

**Vedlegg 5: Optimalisering av primerkonsentrasjoner, resultater fra BioAnalyzer**



## Vedlegg 6: Optimalisering av annealingtemperatur, PCR resultater

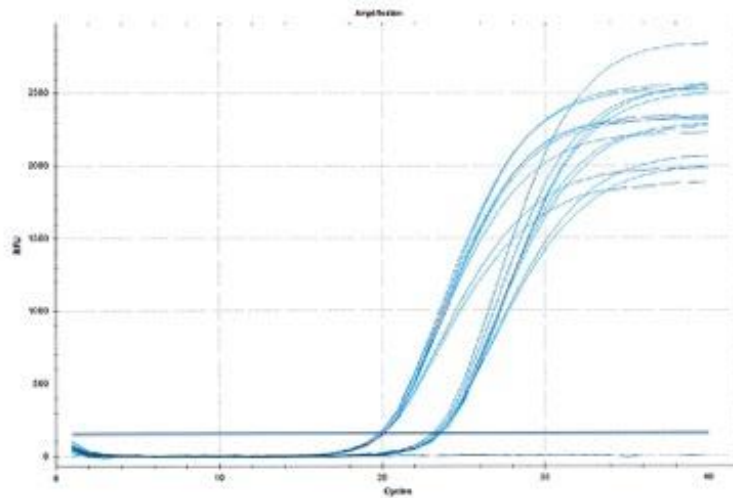
B.fragilis PCR gradient 29.03.23.pcrd

Page 1 of 1



### B.fragilis PCR gradient 29.03.23.pcrd

29.03.2023 14:12



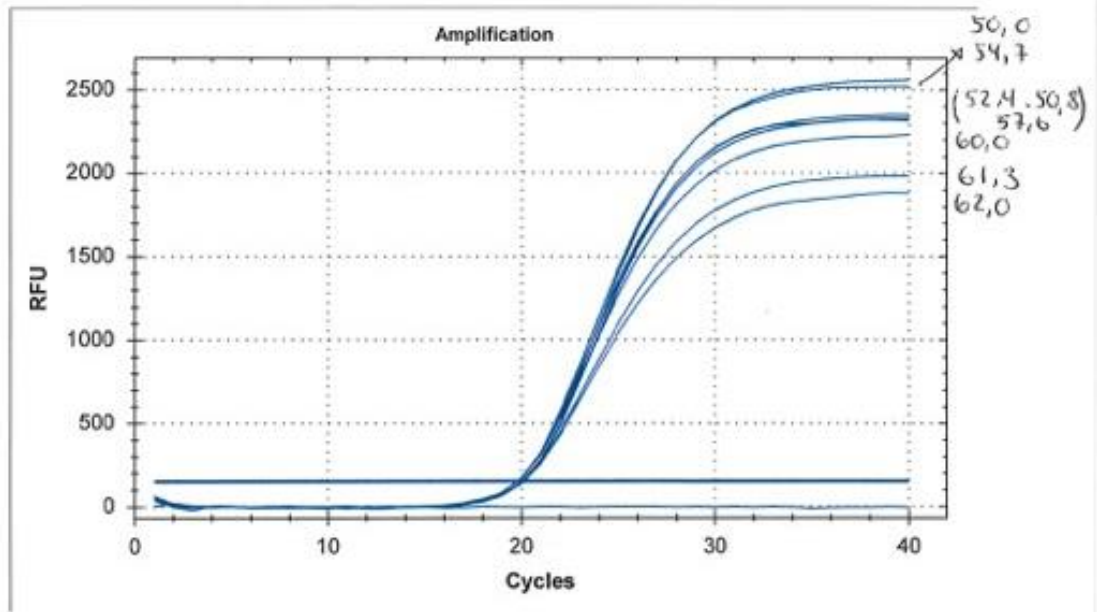
#### Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Set Point
A01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	20,11	20,11	0,000	62,0	
B01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	20,08	20,08	0,000	61,3	
C01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	19,78	19,78	0,000	60,0	
D01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	19,84	19,84	0,000	57,6	
E01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	19,78	19,78	0,000	54,7	
F01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	20,07	20,07	0,000	52,4	
G01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	20,06	20,06	0,000	50,8	
H01	FAM	Unkn	1:10 KRES-6	20,06	20,06	0,000	50,0	
A02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,34	23,34	0,000	62,0	
B02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,38	23,38	0,000	61,3	
C02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,19	23,19	0,000	60,0	
D02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,06	23,06	0,000	57,6	
E02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,15	23,15	0,000	54,7	
F02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,53	23,53	0,000	52,4	
G02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,56	23,56	0,000	50,8	
H02	FAM	Unkn	1:100 KRES-6	23,41	23,41	0,000	50,0	
A03	FAM	Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000	62,0	

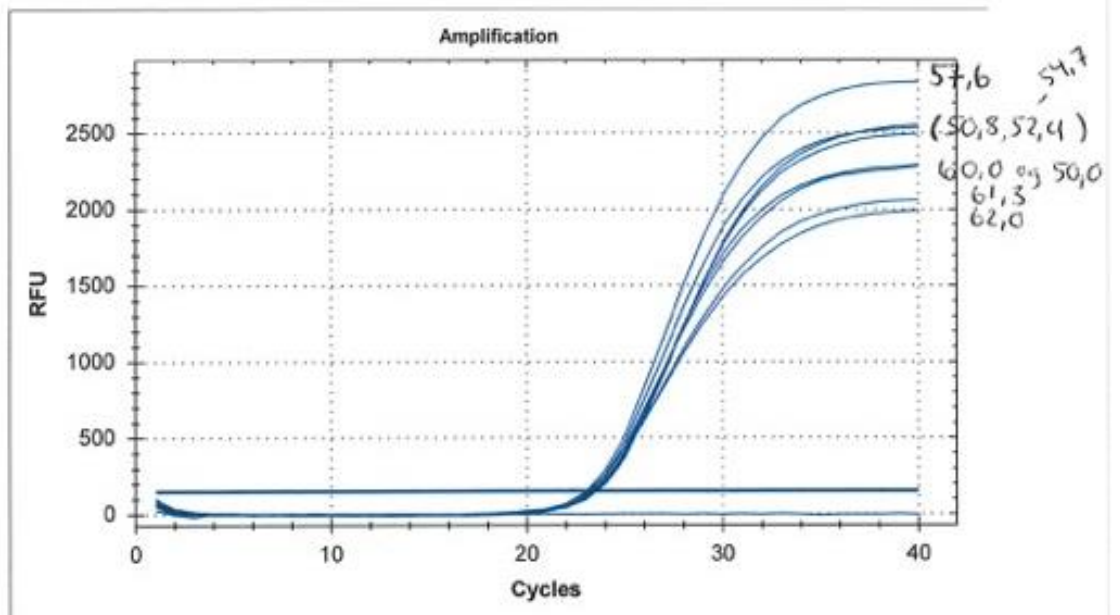
mhtml:file://C:\ProgramData\Bio-Rad\CFX\Temp\B.fragilis PCR gradient 29.03.23.mht 29.03.2023



1:10 fortytning gradient



1:100 fortytning Gradient



### Vedlegg 7: Optimalisering av annealingtemperatur, resultater fra BioAnalyzer

B.frag annealing\_DNA 7500\_2023-03-29\_001.xad

Page 1 of 4

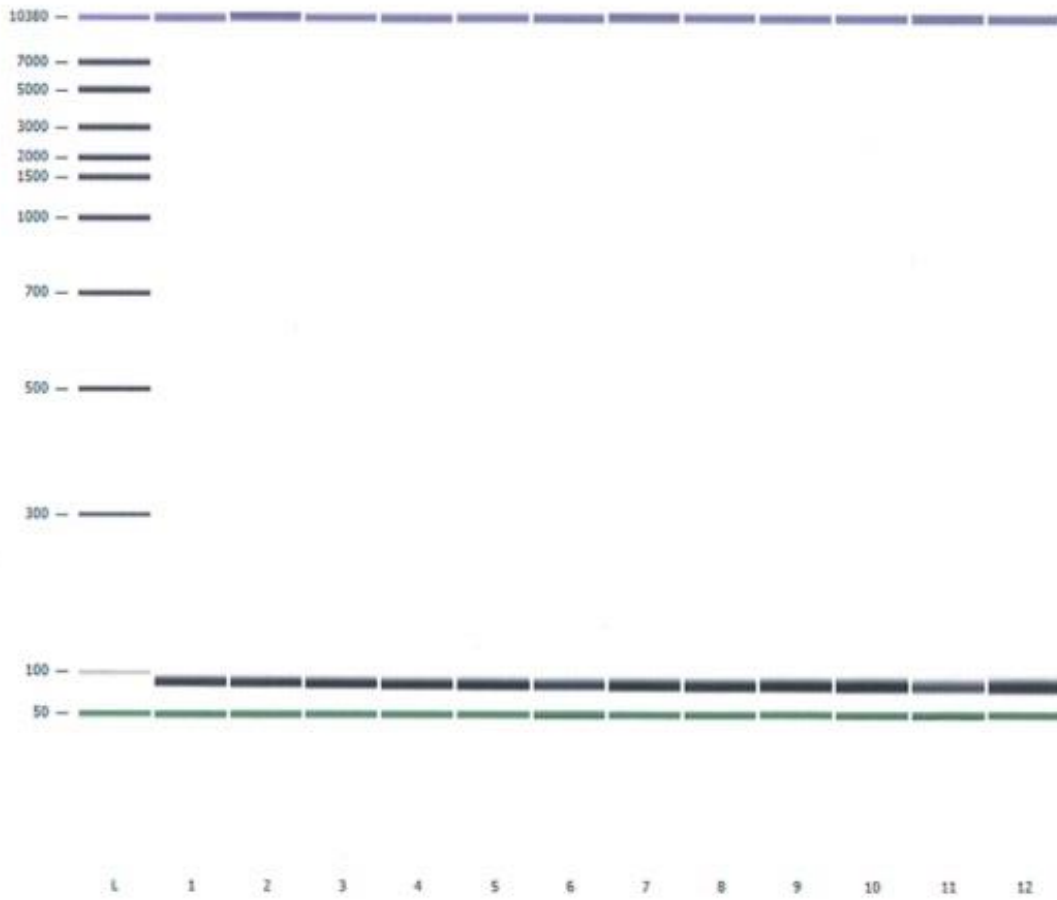
Assay Class: DNA 7500  
Data Path: C:\...gills bachelor\B.frag annealing DNA 7500 2023-03-29 001.xad

Created: 29.03.2023 15:30:06  
Modified: 29.03.2023 16:04:10

**Gel Image**

(bp)	Ladder	1:10 60,0	1:10 57,6	1:10 54,7	1:10 52,4	1:10 50,8	1:10 50,0	1:100 60,0	1:100 57,6	1:100 54,7	1:100 52,4	1:100 50,8	1:100 50,0
------	--------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

*Primer F . 600 nM  
R — 11 —*



**Vedlegg 8: Effektivitet 600 + 600nM, PCR resultater**

B.fragilis PCR Effektivitet 31.03.23.pcrd

Page 1 of 2



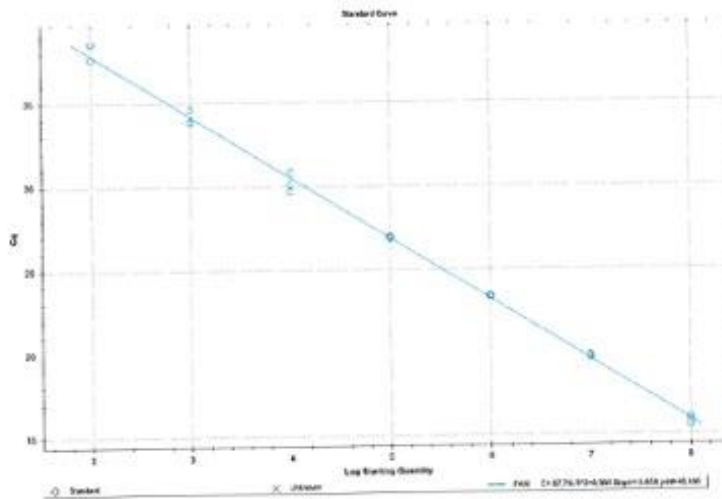
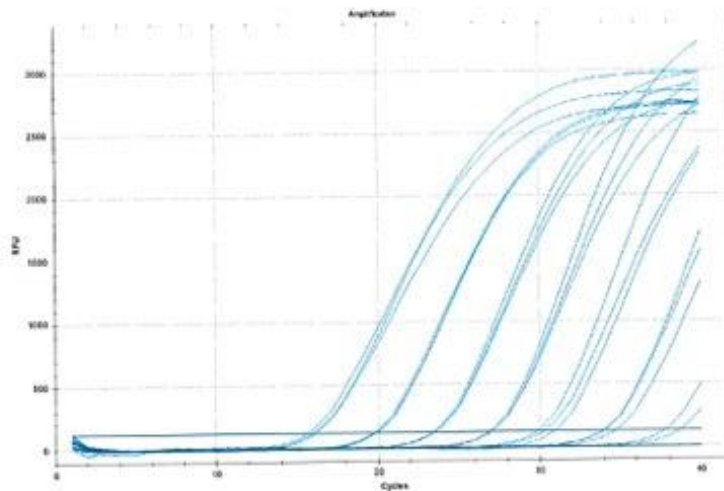
**B.fragilis PCR Effektivitet 31.03.23.pcrd**

31.03.2023 10:28

600 + 600

60°C

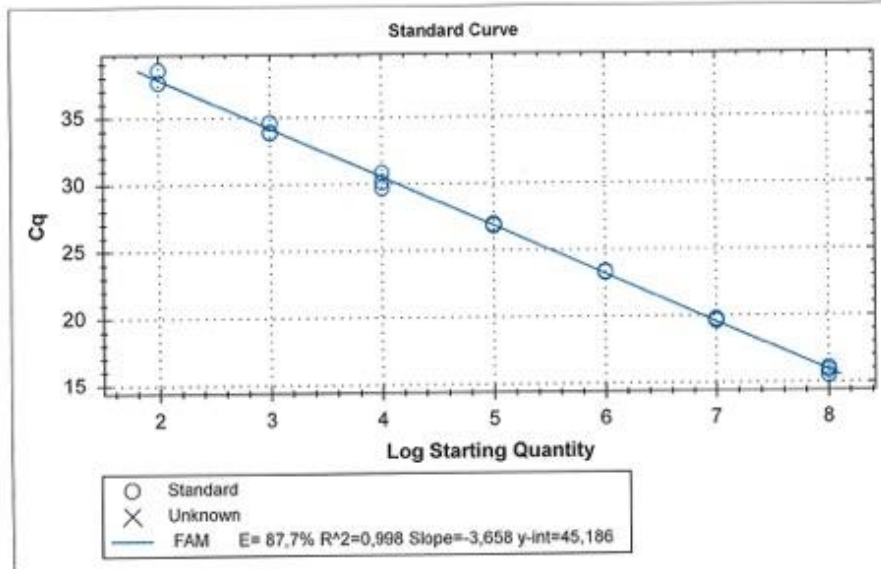
Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq	Cq Std.	Starting	Log Starting	SQ Mean	SQ Std.
------	-------	--------	---------	--------	----	----	---------	----------	--------------	---------	---------

mhtml:file://C:\ProgramData\Bio-Rad\CFX\Temp\B.fragilis PCR Effektivitet 31.03.2... 31.03.2023



B.fragilis PCR Effektivitet 31.03.23.pcrd

Page 2 of 2

					Mean	Dev	Quantity (SQ)	Quantity		Dev
A01	FAM	Std-1	UF	15,87	15,81	0,264	1,000E+08	8,000	1,00E+08	0,00E+00
A02	FAM	Std-1	UF	15,53	15,81	0,264	1,000E+08	8,000	1,00E+08	0,00E+00
A03	FAM	Std-1	UF	16,04	15,81	0,264	1,000E+08	8,000	1,00E+08	0,00E+00
A04	FAM	Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00
B01	FAM	Std-2	1:10	19,63	19,72	0,084	1,000E+07	7,000	1,00E+07	0,00E+00
B02	FAM	Std-2	1:10	19,75	19,72	0,084	1,000E+07	7,000	1,00E+07	0,00E+00
B03	FAM	Std-2	1:10	19,79	19,72	0,084	1,000E+07	7,000	1,00E+07	0,00E+00
C01	FAM	Std-3	1:10 2	23,38	23,36	0,033	1,000E+06	6,000	1,00E+06	0,00E+00
C02	FAM	Std-3	1:10 2	23,39	23,36	0,033	1,000E+06	6,000	1,00E+06	0,00E+00
C03	FAM	Std-3	1:10 2	23,33	23,36	0,033	1,000E+06	6,000	1,00E+06	0,00E+00
D01	FAM	Std-4	1:10 3	26,96	26,93	0,059	1,000E+05	5,000	1,00E+05	0,00E+00
D02	FAM	Std-4	1:10 3	26,86	26,93	0,059	1,000E+05	5,000	1,00E+05	0,00E+00
D03	FAM	Std-4	1:10 3	26,97	26,93	0,059	1,000E+05	5,000	1,00E+05	0,00E+00
E01	FAM	Std-5	1:10 4	30,15	30,24	0,570	1,000E+04	4,000	1,00E+04	0,00E+00
E02	FAM	Std-5	1:10 4	30,85	30,24	0,570	1,000E+04	4,000	1,00E+04	0,00E+00
E03	FAM	Std-5	1:10 4	29,72	30,24	0,570	1,000E+04	4,000	1,00E+04	0,00E+00
F01	FAM	Std-6	1:10 5	33,95	34,16	0,409	1,000E+03	3,000	1,00E+03	0,00E+00
F02	FAM	Std-6	1:10 5	34,63	34,16	0,409	1,000E+03	3,000	1,00E+03	0,00E+00
F03	FAM	Std-6	1:10 5	33,89	34,16	0,409	1,000E+03	3,000	1,00E+03	0,00E+00
G01	FAM	Std-7	1:10 6	37,67	38,12	0,640	1,000E+02	2,000	1,00E+02	0,00E+00
G02	FAM	Std-7	1:10 6	38,57	38,12	0,640	1,000E+02	2,000	1,00E+02	0,00E+00
G03	FAM	Std-7	1:10 6	N/A	0,00	0,000	1,000E+02	2,000	0,00E+00	0,00E+00
H01	FAM	Std-8	1:10 7	N/A	0,00	0,000	1,000E+01	1,000	0,00E+00	0,00E+00
H02	FAM	Std-8	1:10 7	N/A	0,00	0,000	1,000E+01	1,000	0,00E+00	0,00E+00
H03	FAM	Std-8	1:10 7	N/A	0,00	0,000	1,000E+01	1,000	0,00E+00	0,00E+00

**Vedlegg 9: Effektivitet 1000 + 1000nM, PCR resultater**

B.fragilis PCR Effektivitet 1000+1000 31.03.23.pcrd

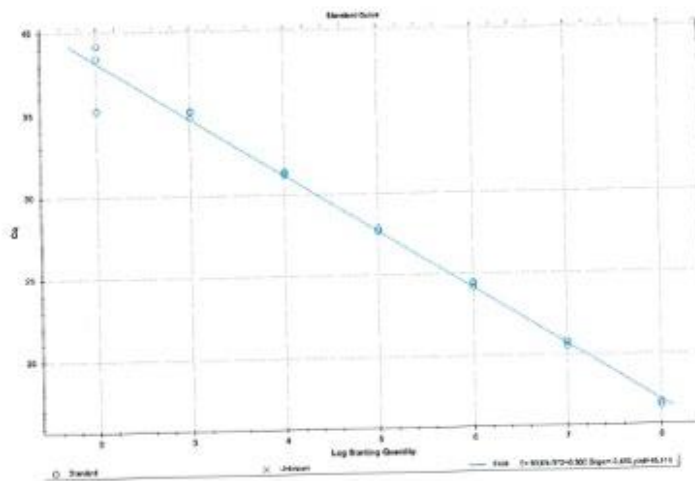
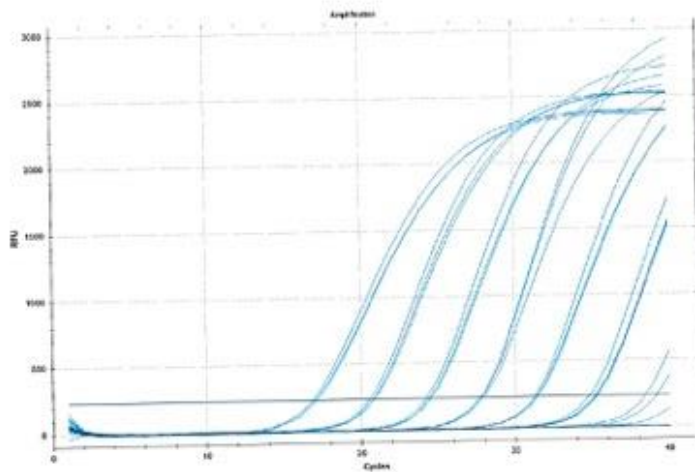
Page 1 of 2



**B.fragilis PCR Effektivitet 1000+1000  
31.03.23.pcrd**

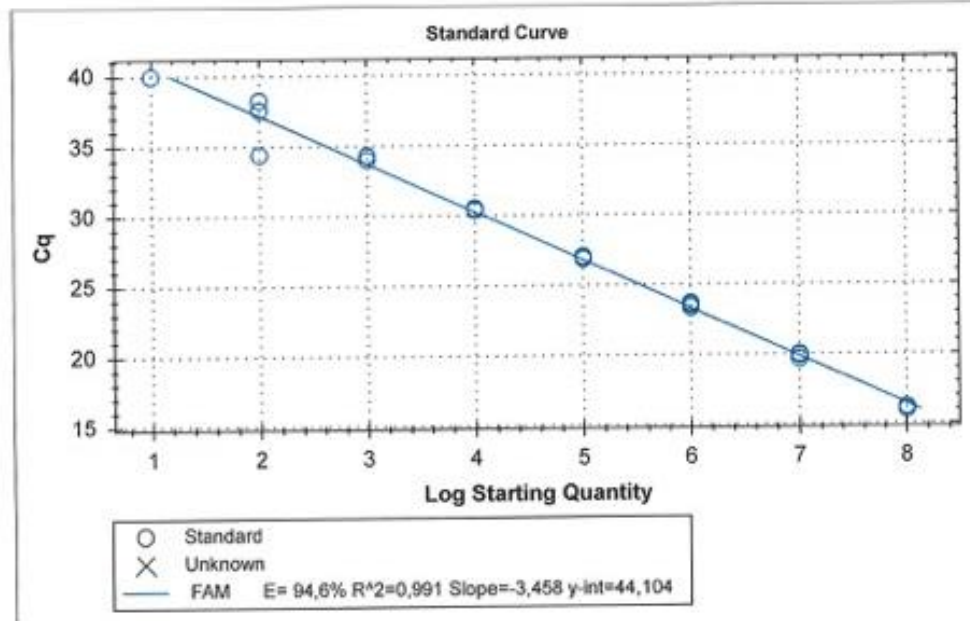
31.03.2023 13:18

**Quantification**



**Quantification Data**

mhtml:file://C:\ProgramData\Bio-Rad\CFX\Temp\B.fragilis PCR Effektivitet 1000+1... 31.03.2023



Well	Floor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev
A01	FAM		Std-1	UF	16,99	16,97	0,137	1,000E+08	8,000	1,00E+08	0,00E+00
A02	FAM		Std-1	UF	17,09	16,97	0,137	1,000E+08	8,000	1,00E+08	0,00E+00
A03	FAM		Std-1	UF	16,82	16,97	0,137	1,000E+08	8,000	1,00E+08	0,00E+00
A04	FAM		Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00
B01	FAM		Std-2	1:10	20,86	20,71	0,171	1,000E+07	7,000	1,00E+07	0,00E+00
B02	FAM		Std-2	1:10	20,76	20,71	0,171	1,000E+07	7,000	1,00E+07	0,00E+00
B03	FAM		Std-2	1:10	20,52	20,71	0,171	1,000E+07	7,000	1,00E+07	0,00E+00
C01	FAM		Std-3	1:10 2	24,51	24,37	0,150	1,000E+06	6,000	1,00E+06	0,00E+00
C02	FAM		Std-3	1:10 2	24,40	24,37	0,150	1,000E+06	6,000	1,00E+06	0,00E+00
C03	FAM		Std-3	1:10 2	24,21	24,37	0,150	1,000E+06	6,000	1,00E+06	0,00E+00
D01	FAM		Std-4	1:10 3	27,88	27,78	0,092	1,000E+05	5,000	1,00E+05	0,00E+00
D02	FAM		Std-4	1:10 3	27,71	27,78	0,092	1,000E+05	5,000	1,00E+05	0,00E+00
D03	FAM		Std-4	1:10 3	27,74	27,78	0,092	1,000E+05	5,000	1,00E+05	0,00E+00
E01	FAM		Std-5	1:10 4	31,39	31,31	0,091	1,000E+04	4,000	1,00E+04	0,00E+00
E02	FAM		Std-5	1:10 4	31,34	31,31	0,091	1,000E+04	4,000	1,00E+04	0,00E+00
E03	FAM		Std-5	1:10 4	31,21	31,31	0,091	1,000E+04	4,000	1,00E+04	0,00E+00
F01	FAM		Std-6	1:10 5	35,20	35,06	0,227	1,000E+03	3,000	1,00E+03	0,00E+00
F02	FAM		Std-6	1:10 5	35,17	35,06	0,227	1,000E+03	3,000	1,00E+03	0,00E+00
F03	FAM		Std-6	1:10 5	34,79	35,06	0,227	1,000E+03	3,000	1,00E+03	0,00E+00
G01	FAM		Std-7	1:10 6	35,26	37,62	2,077	1,000E+02	2,000	1,00E+02	0,00E+00
G02	FAM		Std-7	1:10 6	39,18	37,62	2,077	1,000E+02	2,000	1,00E+02	0,00E+00
G03	FAM		Std-7	1:10 6	38,42	37,62	2,077	1,000E+02	2,000	1,00E+02	0,00E+00
H01	FAM		Std-8	1:10 7	N/A	0,00	0,000	1,000E+01	1,000	0,00E+00	0,00E+00
H02	FAM		Std-8	1:10 7	N/A	0,00	0,000	1,000E+01	1,000	0,00E+00	0,00E+00
H03	FAM		Std-8	1:10 7	N/A	0,00	0,000	1,000E+01	1,000	0,00E+00	0,00E+00

**Vedlegg 10: Spesifisitet, PCR resultater**

Generelt bakteriepanel Art	Ct-verdi
<i>S. aureus</i>	0,00
<i>S. pyogenes</i>	0,00
<i>S. agalactica</i>	0,00
<i>H. influenzae</i>	0,00
<i>C. albicans</i>	0,00
<i>S. pneumoniae</i>	0,00
<i>E. coli</i>	0,00
<i>K. pneumoniae</i>	0,00
<i>E. cloacae</i>	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	0,00
<i>E. faecalis</i>	0,00
<i>S. anginosus</i>	0,00
<i>S. epidermidis</i>	0,00
<i>N. meningitidis</i>	0,00
<i>M. tuberculosis</i>	0,00
<i>L. pneumophila</i>	0,00
<i>Bacillus cereus</i>	0,00
<i>Clostridium perfringens</i>	0,00
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	0,00
KRES-6	23,44
Neg Ctrl	0,00

Vedlegg 11: PCR resultater på STO prøver

B.fragilis STO 13.04.23.pcrd

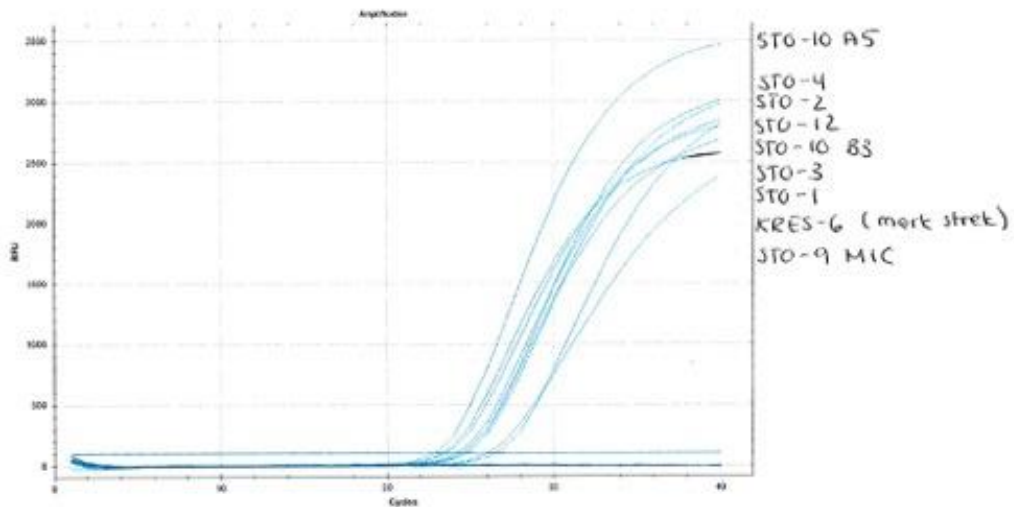
Page 1 of 1

1000 F + 1000 R



B.fragilis STO 13.04.23.pcrd

13.04.2023 11:26



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	STO-1	24,30	24,30	0,000
B01	FAM		Unkn	STO-2	24,70	24,70	0,000
C01	FAM		Unkn	STO-3	26,41	26,41	0,000
D01	FAM		Unkn	STO-4	24,52	24,52	0,000
E01	FAM		Unkn	STO-5	N/A	0,00	0,000
F01	FAM		Unkn	STO-6	N/A	0,00	0,000
G01	FAM		Unkn	STO-7	N/A	0,00	0,000
H01	FAM		Unkn	STO-8	N/A	0,00	0,000
A02	FAM		Unkn	STO-9 MIC	25,98	25,98	0,000
B02	FAM		Unkn	STO-9	N/A	0,00	0,000
C02	FAM		Unkn	STO-10 B3	23,39	23,39	0,000
D02	FAM		Unkn	STO-10 A5	22,73	22,73	0,000
E02	FAM		Unkn	STO-11	N/A	0,00	0,000
F02	FAM		Unkn	STO-12	24,11	24,11	0,000
G02	FAM		Unkn	ATCC25285	N/A	0,00	0,000
H02	FAM	Neg Ctrl			N/A	0,00	0,000
A03	FAM		Unkn	KRES-6	23,27	23,27	0,000



**Vedlegg 12: Resultater fra fenotypisk resistensbestemmelse av *B. fragilis*-stammer**

Prøve ID	Sone diameter	S-I-R
KRES-1	32	R
KRES-2	>32	R
KRES-3	8	R
KRES-5	4	R
KRES-6	>32	R
ATCC 43858	0,125	S
CCUG 4856	0,125	S
STO-1	>32	R
STO-2	32	R
STO-3	12	R
STO-4	32	R
STO-5	0,125	S
STO-6	0,125	S
STO-7	0,19	S
STO-8	0,125	S
STO-9	0,5	S
STO-10 pos. B3	8	R
STO-10 pos. A5	6	R
STO-11	0,094	S
STO-12	8	R
ATCC 25285	0,094	S

