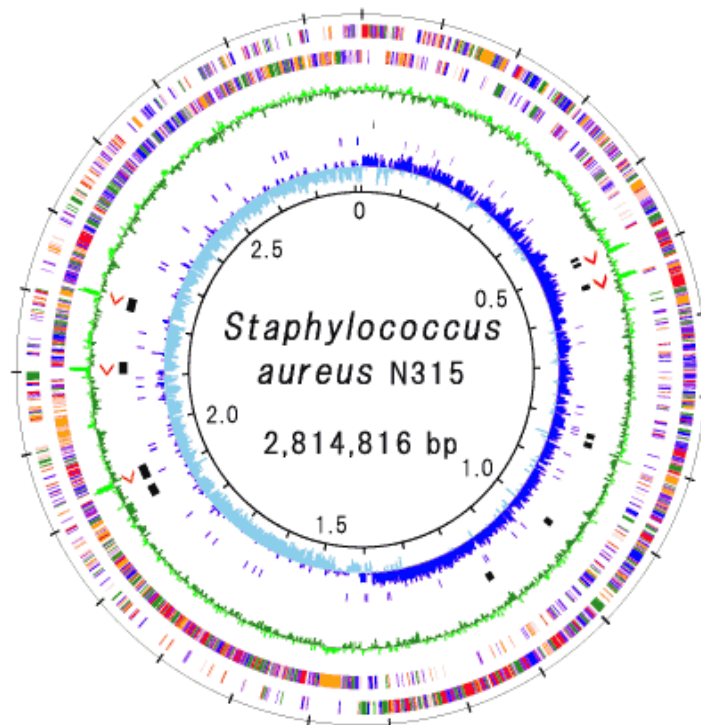


# PFGE og *spatyping* av meticillin resistente *Staphylococcus aureus*

Inger Karine Ambjørnsen



Masteroppgave: 60 studiepoeng  
Oppdragsgiver: as Telelab, Skien



Tittel:

# **PFGE og *spatyping* av meticillin resistente *Staphylococcus aureus***

Nøkkelord: MRSA, PFGE, *spatyping*

Forfattere/ Inger Karine Ambjørnsen

Studentnr.: 031167

Fagkode: 220911

Oppgavetype: Masteroppgave

Studiepoeng: 60

Studium: Natur-, helse- og miljøvern mastergradsstudium tilrettelagt for bioingeniører

Konfidensiell: Nei



---

## FORORD

Denne mastergradsoppgaven er tilknyttet Høgskolen i Telemark, avd. Bø, Institutt for natur-, helse- og miljøvern fag i samarbeid med as Telelab i Skien. Oppgaven er i hovedsak utført ved as Telelab i tidsrommet august 2004 til januar 2007, men en viktig andel av arbeidet med *spatyping* er utført ved Enhet for Medisinsk Genetikk ved Sykehuset Telemark i Skien. Faglige veiledere ved as Telelab har vært Avdelingsoverlege Dr. med. Yngvar Tveten og Cand. scient. Linda Strand.

Det er mange ved as Telelab som har bidratt på veien mot det endelige målet med denne oppgaven. Jeg ønsker å rette en stor takk til Avdelingsoverlege Dr. med. Yngvar Tveten og Cand. scient. Linda Strand for meget god veiledning og oppmuntring underveis, likeledes en stor takk til Avdelingsingeniør Anne Gry Allum for god opplæring og oppfølging med det praktiske laboratoriearbeidet. Jeg ønsker også å takke Dr. med. Andrew Jenkins for positive og konstruktive tilbakemeldinger i forbindelse med teori og praktisk arbeid. Jeg takker også alle ansatte ved as Telelab for et hyggelig og sosialt miljø som jeg har satt stor pris på.

Jeg ønsker også å takke alle ansatte ved Enhet for Medisinsk Genetikk ved Sykehuset Telemark, Skien som har lagt til rette for at jeg kunne utføre deler av oppgaven min der. En spesiell takk til enhetsleder Camilla Furu Skjelbred for god veiledning og hjelp.

Jeg takker også min arbeidsplass ved Høgskolen i Østfold for tilrettelegging av mine arbeidsoppgaver slik at det har vært praktisk mulig å gjennomføre dette masterstudiet.

Januar 2007

Inger Karine Ambjørnsen

---

## ABSTRACT

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is the most common genotypic method used for epidemiologic studies of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). This method was used in this work for typing a selection of 251 MRSA strains isolated in seven counties in Norway throughout the period July 2000–July 2005. The employed method is based on a Nordic protocol utilized earlier at as Telelab, but further improved for use in this work. In this study it has been shown that phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) can be eliminated from the procedure, and that sample preparation can be reduced to four days without loss of data quality.

234 of the 251 MRSA isolates included in this study could be typed. These 234 isolates were classified into 25 different PFGE classes. Eight of the pulsed field types detected in this material were identical or similar to eight international epidemic strains. These strains were also detected in a Norwegian study from 94-98. One of them has been dominating in this study, and this strain was identical to a European clone. In the north countries in Europe it is given the name DK E97-1. It is a community strain with *SCCmec* type IV, which codes only for methicillin resistance. These results indicate that the MRSA population in Norway has become more homogeneous compared to MRSA population before the year of 2000 at which time there was no dominant clone in Norway. One result from this study also indicates that the proportion of community MRSA infections has been increasing in the period after the year of 2000 in Norway.

A selection of the MRSA strains that were pulsed-field typed, was also *spa* typed. The repeat region of the *S. aureus* protein A (*spa*) gene in each of these strains was sequenced. The discriminatory power of the *spa* typing was less than the discriminatory power of the pulsed-field typing. The method of *spa* typing did not differentiate between isolates belonging to the pulsed-field type T1 that was closely related with one or two fragments difference in the pulsed-field pattern. These different strains were *spa* typed to be identical *spa* types. It is uncertain if the discriminatory power of *spa* typing is law for the remaining pulsed-field types in this study.

---

## SAMMENDRAG

Pulsfeltgelelektroforese (PFGE) er den mest vanlige typingsmetoden ved epidemiologiske undersøkelser av meticillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Pulsfelttypering er også benyttet i denne studien som innbefattet 251 isolater fra syv fylker i Norge fra perioden juli 2000 til juli 2005. Metoden i denne studien er videreutviklet fra en nordisk protokoll, som tidligere ble benyttet ved as Telelab. Analysetiden er redusert med en dag og bruken av et helseskadelig kjemikalie, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) er fjernet.

I denne studien lot 234 av disse 251 isolatene seg type, og de fordelte seg på 25 pulsfelttyper. Åtte av pulsfelttypene som ble detektert i dette materialet, var identiske eller hadde likheter til åtte internasjonale epidemiske stammer. Disse stammene ble også påvist i en norsk studie fra 94-98. I denne studien var det dominans av en, og denne stammen var identisk til en europeisk klon som i Norden har fått betegnelsen DK E97-1. Det er en community stamme med *SCCmec* type IV, og som er resistent bare mot meticillin. Andelen av MRSA infeksjoner som har oppstått utenfor sykehus, såkalte community stammer har vært økende etter år 2000. Dette tyder på at MRSA populasjonen i Norge er blitt mer homogen sammenlignet med situasjonen før 2000 da det ikke var noen dominante kloner i Norge.

Et utvalg av MRSA stammer som var blitt pulsfelttypet, ble også *spatypet*. Den repeterende regionen i protein A (*spa*) genet i hver av disse stammene ble sekvensert. Den diskriminerende styrken til *spatyping* ble lavere enn den diskriminerende styrken til pulsfelttypering i denne studien. *Spatyping* differensierte ikke mellom isolater som var nært beslektet med hverandre med en eller to bånders forskjell innen pulsfelttype T1. De ulike isolatene ble *spatypet* til å være identiske *spatyper*. Det er usikkert om den diskriminerende styrken til *spatyping* også er lavere enn pulsfelttypering for de resterende pulsfelttypene i denne studien.

---

# INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD

ABSTRACT

SAMMENDRAG

1.0 INNLEDNING .....	1
2.0 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	7
2.1 Definisjon og naturlig habitat.....	7
2.2 $\beta$ -laktamantibiotika.....	8
2.2.1 Penicillin resistens .....	8
2.2.2 Meticillin resistens .....	8
3.0 EPIDEMIOLOGISKE TYPINGSMETODER .....	14
3.1 Fenotyping.....	14
3.2 Genotyping .....	15
3.2.1 Pulsfelttyping .....	15
3.2.2 <i>Spatyping</i> .....	18
3.2.3 Multi Locus Sequence Typing .....	20
3.3 Krav til typingsmetoder.....	20
4.0 MATERIALE OG METODE .....	22
4.1 Materiale.....	22
4.1.1 Pulsfelttyping .....	22
4.1.2 <i>Spatyping</i> .....	23
4.2 Metode.....	23
4.2.1 Pulsfelttyping .....	23
4.2.2 <i>Spatyping</i> .....	26
5.0 RESULTATER .....	29
5.1 Pulsfelttyping .....	29
5.1.1 Videreutvikling av protokoll .....	30
5.1.2 Epidemiologiske forhold .....	32
5.1.3 Typingskrav ved pulsfelttyping.....	39
5.2 <i>Spatyping</i> .....	42
5.2.1 Tilpassing av metode for <i>spatyping</i> .....	42
5.2.2 <i>Spatyper</i> .....	46
5.2.3 Typingskrav ved <i>spatyping</i> .....	48
6.0 DISKUSJON .....	51
6.1 Pulsfelttyping .....	51
6.1.1 Optimalisering av pulsfelttyping .....	51
6.1.2 Epidemiologiske forhold .....	52
6.2 <i>Spatyping</i> .....	55
6.3 Typingskrav.....	56

---

7.0 KONKLUSJON .....	59
8.0 REFERANSELISTE: .....	61
VEDLEGG 1: Absorbansmålinger av ekstraherte DNA løsninger.....	66
VEDLEGG 2: Dendrogram av 241 MRSA isolater.....	67
VEDLEGG 3: Reagenser og løsninger til pulsfelotyping av <i>S. aureus</i> .....	71
VEDLEGG 4: Laboratorieutstyr til pulsfelotyping av <i>S. aureus</i> .....	73
VEDLEGG 5: Reagenser og løsninger til <i>spat</i> yping av <i>S. aureus</i> .....	75
VEDLEGG 6: Laboratorieutstyr til <i>spat</i> yping av <i>S. aureus</i> .....	77

## 1.0 INNLEDNING

*Staphylococcus aureus* er en viktig årsak til sårinfeksjoner, særlig i forbindelse med kirurgiske inngrep. Utstrakt bruk av penicillin i behandlingen av infeksjoner i sykehus førte til at penicillin resistente *S. aureus* oppstod på 1940 tallet i Storbritannia (Kirby 1945). I flere sykehus økte antall penicillinresistente stammer til ca. 60 % i løpet av noen få år (Barber et al. 1949), og på 1950 tallet var de fleste *S. aureus* innenfor sykehus penicillinresistente i Storbritannia. Derimot var *S. aureus* isolater utenfor sykehus i hovedtrekk følsomme for penicillin. Penicillin kunne derfor benyttes til behandling av stafylokokkinfeksjoner hos pasienter utenfor sykehus frem til tidlig på 1970 tallet. Etter 1970 forandret situasjonen seg. I tillegg til at 85-90% av sykehus stammene var resistente, økte forekomsten av penicillinresistente stafylokokker også utenfor sykehus. Det viste seg at andelen her steg til 65-70%, og denne andelen har fortsatt å øke. Tall fra 2001 og senere har vist at andelen av penicillinresistente stafylokokker er like høy både i og utenfor sykehus.

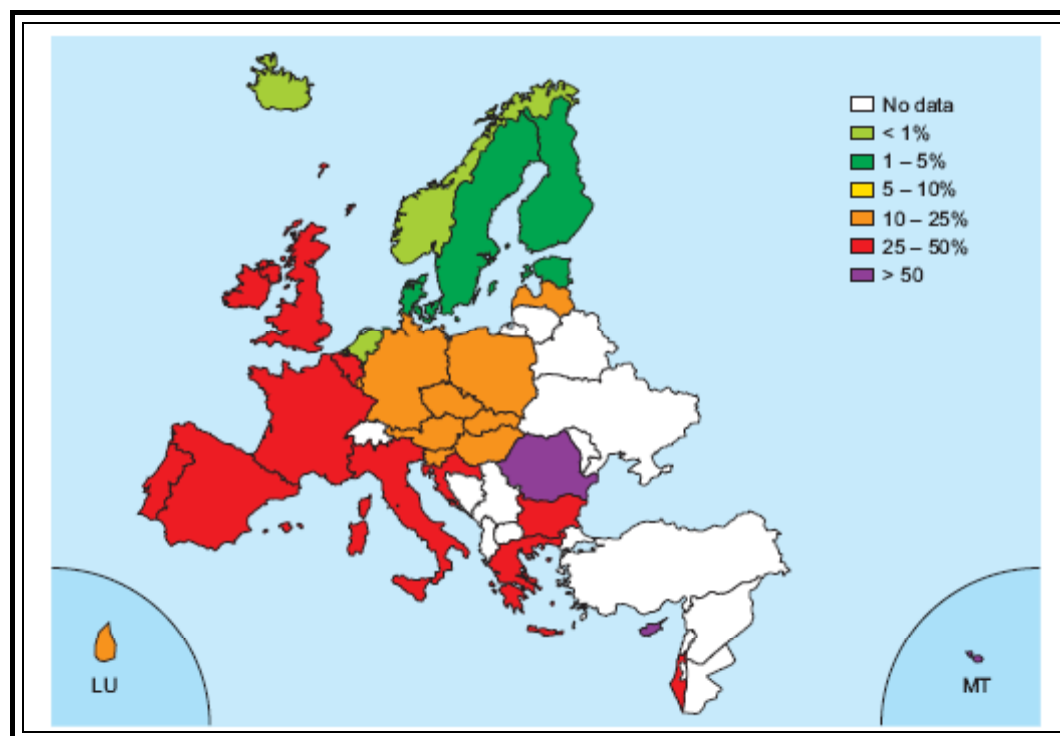
I 1959 kom antibiotikumet meticillin på markedet i Storbritannia. Det var det første betalaktamstabile penicillinet. Det ble opprinnelig kalt celbenine eller BRL-1241, og det var et semisyntetisk derivat av penicillin (Knox 1960; Pestel 1960). Det var forventet at dette midlet skulle løse problemet med penicillinresistente *S. aureus*. Slik ble det ikke, for rett etter



introduksjon av meticillin, dukket det opp meticillinresistente *S. aureus* (MRSA) stammer i Storbritannia (Jevons 1963). MRSA isolater ble snart oppdaget også i andre europeiske land, og videre fulgte USA, Japan og Australia.

I USA ble det første MRSA utbruddet meldt i 1968, noen år etter at MRSA dukket opp i Storbritannia (Barrett et al. 1968). I 1980 ble det registrert 4 % MRSA tilfeller i USA av National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS). Sent på 1990 tallet var denne andelen økt til 50 %. Innenfor enkelte sykehus var andelen av MRSA på opptil 80 % (Oliveira et al. 2002).

Når det gjelder MRSA i europeiske land er gjennomsnittstallet på 24 % med store forskjeller innen de ulike land. Det er lavest andel i Nord-Europa, litt høyere i Sentral-Europa og høyest i Syd-Europa, Storbritannia og Irland (Tiemersma et al. 2004). Oversikt over forekomst av MRSA isolater i Europa i 2005 er vist i figur 1.1 som er hentet fra European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) årsrapport 2005 (<http://www.rivm.nl/earss/>)

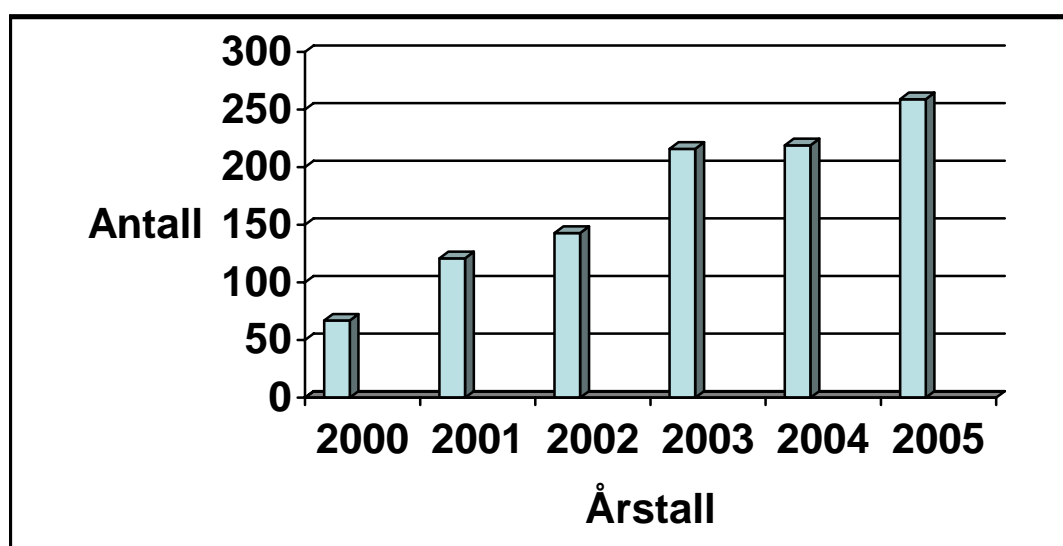


Figur 1.1: MRSA forekomst i Europa i år 2005 (EARSS årlige rapport fra 2005).

Som ved penicillin resistente *S. aureus* hvor det initialt var forskjell mellom isolater fra pasienter innlagt på sykehus og fra pasienter utenfor sykehus, er det også ulikheter mellom MRSA isolert fra pasienter på sykehus (H-MRSA) og MRSA isolert fra pasienter uten sykehuskontakt (C-MRSA). H-MRSA er oftest multiresistente, mens C-MRSA isolatene vanligvis kun er resistente mot meticillin. MRSA har blitt et betydelig helseproblem i mange land både i og utenfor sykehus (Hussain et al. 2001).

I 1995 ble den første MRSA infeksjonen meldt til Meldingssystemet for Infeksjons Sykdommer (MSIS) i Norge. Det har i de siste 15-20 årene bare blitt rapportert et fåtall MRSA utbrudd, og det med et begrenset antall involverte pasienter (Harboe et al. 2003). Selv om antall MRSA tilfeller i Norge er begrenset, har det allikevel vært en økning i de siste årene. I 2000 ble det innmeldt 67 tilfeller med MRSA infeksjoner til MSIS, og i 2005 var antallet steget til 259. Fra 1.7.2005 ble det meldingsplikt også for smittebærertilstand. Totalt antall for 2005 ble 465 tilfeller (<http://www.msis.no>). Oversikt over antall tilfeller fra år 2000-2005 er vist i figur 1.2.

### MRSA-infeksjoner meldt til MSIS i perioden 2000-2005



Figur 1.2: Antall MRSA-infeksjoner i Norge i perioden 2000-2005 (MSIS 2005).

Selv om det var relativt lite av MRSA tilfeller i Norge på 1990 tallet, var det interessant å sammenligne disse stammene i Norge med MRSA stammer ute i Europa og i Amerika. En pulsfeltstudie av 87 MRSA stammer i Norge fra perioden 1994-98, ble utført ved as Telelab, Skien (Tveten et al. 2003). Det ble benyttet en nordisk pulsfeltprotokoll som var utarbeidet i et samarbeidsprosjekt mellom mikrobiologiske laboratorier i Finland, Sverige, Danmark og Norge (Zinn et al. 2000). Ute i Europa var det spredning av noen få MRSA kloner på 1990 tallet, men i materialet fra Norge ble det funnet et mangfold av stammer. Det var altså en heterogen MRSA populasjon i Norge. I det norske materialet ble det påvist stammer med likhet til åtte internasjonale epidemiske kloner. Dette viste at det hadde vært innslag av internasjonale kloner i Norge, men ingen av disse hadde klart å etablere seg. 50 % av isolatene var fra pasienter utenfor sykehus. Denne studien viste også at norske MRSA stammer var i mindre grad multiresistente enn de amerikanske og europeiske epidemiske klonene, noe som kunne tyde på at en stor andel av stammene ikke hadde vært utsatt for et betydelig antibiotikapress. En viktig konklusjon i forbindelse med dette arbeidet var at MRSA situasjonen i Norge var annerledes enn situasjonen i de fleste andre land i Europa og Amerika.

as Telelab har fortsatt å samle MRSA isolater fra syv fylker i Norge etter 1998. Disse prøvene har ikke tidligere vært pulsfelttypet ved as Telelab. Det var nå av interesse å undersøke om den epidemiologiske situasjonen har endret seg i løpet av de siste årene. Denne studien tar dermed utgangspunkt i å pulsfelttype et utvalg av stammer fra tidsrommet juli 2000 til juli 2005 for blant annet å kartlegge om det fortsatt er en heterogen MRSA populasjon i Norge. Likeledes er det interessant å undersøke om forekomsten av internasjonale kloner har endret seg i forhold til det som ble påvist i studien fra 94-98. Videre skal det undersøkes om andelen av C-MRSA har steget etter år 2000 i tråd med utviklingen andre steder i verden (Chambers 2001).

Den nordiske pulsfeltprotokollen (Zinn et al. 2000) som ble benyttet i studien fra 94-98 skal ikke benyttes til denne studien. Det skal types etter en standardisert protokoll for pulsfelttyping som den Europeiske Union (EU) har utviklet (Murchan et al. 2003). Den har fått betegnelsen HARMONY-protokollen. PFGE er en tidskrevende metode, da analysetiden er beregnet til å ta fem arbeidsdager fra utsåing av bakteriene til ferdig resultat. Det er et mål for denne studien å få redusert tiden som går med til pluggpreparering, slik at den totale

tidsbruken blir redusert. Preparering av agarosepluggene ikke er standardisert i HARMONY-protokollen. I tillegg er det et mål å få eliminert bruken av en toksisk proteinasehemmer, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)  $C_7H_7FO_2S$ , som benyttes i forbindelse med vasking av agarosepluggene (Tenover et al. 1995). Forutsetningen for at en slik videreutviklet protokoll kan benyttes til denne pulsfeltstudien, er at den oppfyller de kravene som er satt til ethvert typingsystem i følge Maslow. Dette gjelder krav til typeevne, reproduserbarhet, diskriminerende styrke, stabilitet og egnethet (Maslow et al. 1993).

På et bestemt utvalg av MRSA isolatene skal det i tillegg benyttes *spatyping*. Det er en sekvenseringsbasert typingsmetode, hvor *spagenet* som koder for *S. aureus* protein A blir sekvensert. Resultatene fra disse to typingsmetodene skal sammenlignes. Det er forventet at disse to metodene ikke skal gruppere resultatene likt da det lenge har vært etablert den oppfatningen at *spatyping* er mindre diskriminerende enn pulsfelttyping (Tang et al. 2000; Shopsisin et al. 1999), men det er forventet at *spatyping* skal gi raskere resultater da dette er hevdet i enkelte studier (Hallin et al. 2006).

Mål for denne oppgaven blir dermed:

- Videreutvikle protokoll for pulsfelttyping
  - Redusere tidsbruk ved pluggpreparering
  - Fjerne bruk av helseskadelig kjemikalie ved vasking av pluggene
  - Kjøre pulsfeltgelelektroforese (PFGE) etter HARMONY- protokollen
- Undersøke epidemiologiske forhold angående MRSA stammer fra perioden juli 2000-juli 2005 ved hjelp av pulsfelttyping
  - Er det fortsatt en heterogen populasjon i Norge?
  - Forekomst av internasjonale stammer
  - Andel C-MRSA
  - Maslows typingskrav ved pulsfelttyping

- *Spatype* et utvalg av MRSA stammene fra perioden juli 2000- juli 2005
  - Tilpasse protokoll for *spatyping*
  - Maslows typingskrav ved *spatyping*
- Sammenligne resultater fra pulsfelt- og *spatyping*

Resultatene fra laboratoriearbeidet i denne studien, samt resultater og erfaringer fra andre tidligere epidemiologiske studier innhentet fra forskjellige artikler, vil danne grunnlaget for diskusjon og konklusjon til slutt i denne oppgaven.

## **2.0 STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

### **2.1 Definisjon og naturlig habitat**

*Staphylococcus aureus* er en gul stafylokokk som tilhører familien *Micrococcacea*. De er grampositive kokker som er koagulase og vanligvis katalase positive. De er ikke bevegelige og ikke sporedannende. Det er hevdet av Kloos i 1975 at de er følsomme for lysostaphin, men resistente for lysozym (Kloos et al. 1975). *S. aureus* finnes stort sett overalt i naturen, men de finnes i hovedsak på hud hvor de lever i symbiose med verten. 20-30% av voksne er bærere av gule stafylokokker uten at de har symptomer på infeksjon. Hvis huden skades, og de naturlige barrierene blir ødelagte, kan bakterien forårsake sykdom. Noen av de mest vanlige infeksjonene er furunkler, cellulitter, impetigo og post operative sårinfeksjoner, mens de mer alvorlige infeksjonene er septikemi, pneumoni, osteomyelitt, endokarditt og meningitt.

*S. aureus* er kjent for å være en hyppig årsak til sykehusinfeksjoner, og den vanligste smitteveien for *S. aureus* i sykehus er fra pasient til pasient via kontaminerte hender eller indirekte via kontaminerte gjenstander (direkte og indirekte kontaktsmitte) (Mortimer et al.

1966). I noen tilfeller vil også luftsmitte kunne spille en rolle, men betydningen av dette er vanskelig å avgjøre (Solberg 2000).

## 2.2 $\beta$ -laktamantibiotika

$\beta$ -laktamantibiotika er en gruppe antibiotika som kjennetegnes ved at de består av en  $\beta$ -laktamring som må være intakt for at antibakteriell effekt skal kunne oppnås.  $\beta$ -laktamantibiotika virker hemmende på bakterier ved at de binder seg til et transpeptidase enzym som kalles penicillin bindende protein (PBP). Dette enzymet finnes i bakteriens cellevegg, og det er med på å danne kryssbindinger i celleveggen som er nødvendig for celleveggens stabilitet og funksjon. Når  $\beta$ -laktamantibiotika binder seg til PBP i celleveggen, blir enzymene hemmet, og det blir ikke dannet kryssbindinger i celleveggen (Waxman et al. 1983). Stafylokokker produserer fire varianter av PBP. Det er tre med høy molekylær masse: PBP1, PBP2, PBP3 og en med lav molekylær masse som er PBP4, og det er kun den lavmolekulære PBP som er essensiell for bakteriecellen (Wyke et al. 1981).

### 2.2.1 Penicillin resistens

Etter at penicillin ble kommersielt tilgjengelig på markedet i 1944, begynte enkelte *S. aureus* stammer å produsere penicillinase ( $\beta$ -laktamase) som hydrolyserer betalaktamringen og hemmer dermed effekten av middelet (Kirby 1945).  $\beta$ -laktamase genet *blaZ* er ofte lokalisert på transposonene Tn552, Tn4002 eller Tn4201 som igjen er integrert i et plasmid (Rowland et al. 1989). Plasmidene er oftest av klasse II som kan påvises i mange ulike stafylokokk spesies (Archer et al. 1991). Mer enn 75 % av alle gule stafylokokker er i dag resistente mot penicillin på grunn av  $\beta$ -laktamase produksjon (<http://www.fhi.no>).

### 2.2.2 Meticillin resistens

I 1960 rapporterte Barber om kunstig induisert meticillin resistens (Barber et al. 1960), men det var Jevons som først beskrev naturlig forekomst av meticillin resistens i *S. aureus* (Jevons et al. 1963). Det som er årsaken til at enkelte *S. aureus* stammer er blitt resistente mot meticillin, er at de har ervervet et nytt gen, kalt *mecA*. Dette genet koder for et nytt PBP, som

benevnes PBP2a eller PBP2'.  $\beta$ -laktamantibiotika har nedsatt affinitet til enzymet PBP2a/PBP2' (Inglis et al. 1988). *MecA*gen produktet PBP2a virker som et surrogat enzym som overtar oppgaven med celleveggsyntese fra det normale PBP i stafylokokken, siden PBP blir hemmet av meticillin (de Lencastre et al. 1994).

Det er funnet fire forskjellige *mecA* genklasser i stafylokokker (Katayama et al. 2001; Hiramatsu et al. 2001). I tabell 2.1 er de fire forskjellige klassene satt opp. Det er klassene A, B og C som er påvist i gule stafylokokker, og klasse D som til nå bare er påvist i koagulase negative stafylokokker. Klasse A *mec*gen kompleks inneholder intakte kopier av *mecA*, *mecI*, *mecRI* og *IS431*. Genet *mecI* koder for en transkripsjonsrepressor, og *mecRI* koder for et signal transduksjons protein. *IS432* er virksom i forbindelse med deleksjon og innskudd av de regulatoriske genene (Kobayashi et al. 2001). *MecRI* registrerer også tilstedeværelsen av beta-laktamantibiotika i det ekstracellulære miljøet. De stammene som har *mecA* komplekset av klasse A er allikevel meticillin resistente for *mecI* er inaktivert ved blant annet mutasjoner (Katayama et al. 2001). I klassene B, C og D er hele *mecI* genet og deler av *mecRI* deletert (Katayama et al. 2001).

**Tabell 2.1 Forekomst av ulike *mec*gen klasser med regulatoriske gener**

<i>Mec</i> gen klasser	Regulatoriske gener
Klasse A	<i>IS431-mecI-mecRI-mecA-IS431</i>
Klasse B	<i>IS1272-<math>\Delta</math>mecRI-mecA-IS431</i>
Klasse C	<i>IS431-<math>\Delta</math>mecRI-mecA-IS431</i>
Klasse D	<i><math>\Delta</math>mecRI-mecA-IS431</i>

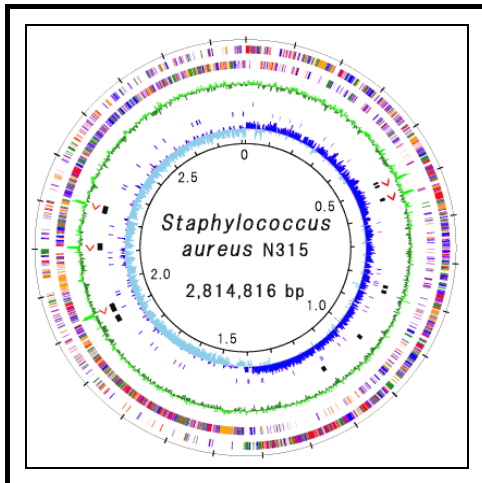
*MecA* genet i *S. aureus* er lokalisert på store (21-67 kb) mobile genetiske elementer som er innskutt i det kromosomale DNA hos bakterien. Disse mobile innskuddene har fått navnet staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) (Ito et al.1999; Katayama et al. 2000). De blir i enkelte sammenhenger kalt for resistenskassetter. Det mobile genetiske elementet består av *mec*gen komplekset som koder for meticillin resistens og *crr*gen komplekset som



koder for rekombinasene *ccrA*, *ccrB* eller *ccrC*, som er ansvarlige for mobiliteten til *SCC-mec* elementet. Disse rekombinasene er spesifikke cassette chromosome rekombinase gener (Katamaya et al. 2000). En hypotese er at *mec* og *ccr* genene ble brakt sammen i koagulase negative stafylokokk (CoNS) fra en ukjent kilde før genet ble transformert inn i *S. aureus* (Archer et al.1994).

Ved hjelp av rekombinasene integreres *SCCmec* inn i kromosomet på et sete kalt *attB<sub>scc</sub>* nær en åpen leseramme med ukjent funksjon, som har fått betegnelsen *orfX* (Hiramatsu et al. 2001; Ito et al 1999). Den er igjen lokalisert nær ved origin for replikering. Denne plasseringen av *SCCmec* kan ha strategiske fordeler da *S. aureus* har muligheten til raskt å oppta resistensgener fra andre bakterier. Lokalisert nær origin vil disse importerte resistensgenene ha en økt mulighet for å bli presentert i flere kopier ved DNA replikasjon og celledeling (Hiramatsu et al. 2001). I figur 2.1 er et genkart over *S. aureus* stamme N315 avbildet (Ito et al. 1999), og plasseringen av *SCCmec* er angitt med en pil.

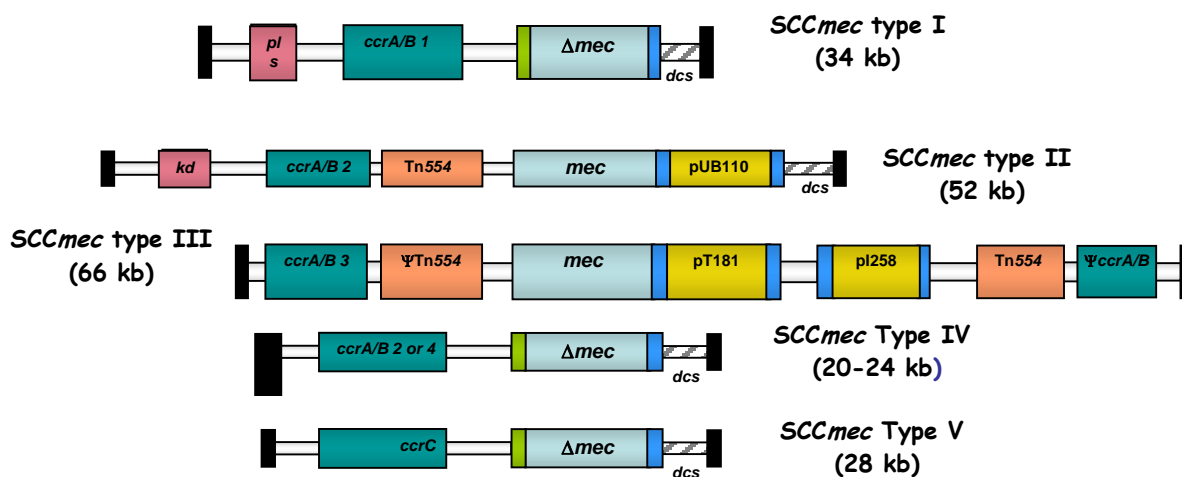
↓ *Sccmec*



**Figur 2.1:** *S. aureus* N315 hvor sete for inkorporering av *SCCmec* komplekset er angitt med en pil ovenfor figuren.

Det er til nå i 2006 påvist fem forskjellige varianter av *SCCmec* komplekset (Type I-V). Type I-III finnes vanligvis i H-MRSA isolater, mens type IV-V hyppigst påvises i C-MRSA isolater (Ito et al. 2001). Resistenskasettene varierer i størrelse og organisering. Ulike andre gener er også tilknyttet det genetiske elementet i de forskjellige variantene. I figur 2.2 er de fem typene av *SCCmec* komplekset illustrert.

## Ulike resistenskassetter (SCCmec)



Figur 2.2: Skjematisk figur av SCCmec typene I-V

Type I:	34 kb	SCCmec med $\Delta$ <i>mec</i> kompleks klasse B og <i>ccrA1</i> og <i>ccrB1</i> , <i>pls</i> gen, <i>dcs</i> "downstream constant segment"
Type II:	52 kb	SCCmec med <i>mec</i> kompleks klasse A og <i>ccrA2</i> og <i>ccrB2</i> , transposon Tn554, plasmid pUB110, <i>kd</i> operon, <i>dcs</i> "downstream constant segment"
Type III:	66 kb	SCCmec med <i>mec</i> kompleks klasse A og <i>ccrA3</i> og <i>ccrB3</i> og $\Psi$ <i>ccrA</i> og $\Psi$ <i>ccrB</i> , transposon Tn554 og $\Psi$ Tn554, plasmid pT181 og pUB110
Type IV:	20/24kb	SCCmec med $\Delta$ <i>mec</i> kompleks klasse B og <i>ccrA2</i> og <i>ccrB2</i> , eller <i>ccrA4</i> og <i>ccrB4</i> , <i>dcs</i> "downstream constant segment"
Type V:	28 kb	SCCmec med $\Delta$ <i>mec</i> kompleks klasse C og <i>ccrC</i> , <i>dcs</i> "downstream constant segment"

Type I SCCmec ble funnet blant de MRSA stammene som ble isolert tidlig på 1960 tallet i Storbritannia. Type I inneholder ikke andre resistens gener enn *mecA*, men har et *pls* gen som koder for et overflateprotein som reduserer adherens til og invasjon av vertscellen (Juuti et al. 2005). I tillegg har den et unikt område på 2 kb som kalles for "downstream constant segment" (*dcs*). *Dcs* ligger i området mellom *orfX* og *mecA* som betraktes som junkyard-regionen (J-region) og inneholder elementer som betraktes som ikke essensielle (Oliveira et al. 2000). Type I har en størrelse på 34 kb (Hiramatsu et al. 2001).

Type II *SCCmec* ble funnet i typiske H-MRSA isolater som dominerte på 1980 tallet. De ble blant annet påvist i Japan i 1982 og i USA i 1985. Type II har et plasmid pUB110 som innehar gener, som koder for resistens mot flere andre bakterielle midler enn meticillin. I dette plasmidet finnes det gener som koder for tobramycin og bleomycin resistens. I transposon Tn544 er det et gen som koder for erytromycin resistens. Denne *SCCmec* typen har et operon *kds* som er involvert i ATP-avhengig kalium transport over bakteriens cellemembran (Sugiura et al. 1992). I tillegg har denne varianten også et *dcs* område (Oliveira et al. 2000). Type II har en størrelse på 52 kb og er dermed litt større enn Type I (Hiramatsu et al. 2001).

Type III dominerte også på 1980 tallet. Denne typen ble påvist i Norge, Nederland, Tyskland, Østerrike, Portugal, Saudi-Arabia, Hong Kong og i Malaysia. Det inneholder to transposoner og to plasmider i tillegg til *mecA* genet. Transposonene er Tn544 som har et gen som koder for erytromycinresistens, og  $\Psi$ Tn544 som har et gen som koder for kadmium resistens. Plasmidene er p1258 som har gen som koder for kadmium resistens, og pT181 som har gen som koder for tetracyclin resistens (Hiramatsu et al. 2001). Type III er det største av resistenskasettene og er på 66 kb.

Type IV *SCCmec* består av en unik sammensetning av *mecA* kompleks klasse B og *ccrA2* og *ccrB2* eller *ccrA4* og *ccrB4* (Ma et al. 2002). Det inneholder ikke andre resistensgener enn *mecA* (Hiramatsu et al. 2001), men har et *dcs* område (Oliveira et al. 2000). *SCCmec* type IV er mest vanlig i C-MRSA isolater, men det har også i det senere blitt identifisert i isolater fra pasienter innlagt på sykehus. Det er 20-24kb stort og ble første gang beskrevet i Hellas i 1998.

Type V *SCCmec* med *mecA* kompleks klasse C og *ccrC* ble påvist i Australia i 2004 (O'Brien et al. 2005; Ito et al 2004). Denne typen inneholder ikke transposoner eller plasmider, men den har et *dcs* område. Type V har en størrelse på 28 kb og finnes også hyppigst i C-MRSA isolater.

Stabiliteten til *SCCmec* er variabel. Den er i første rekke avhengig av *SCCmec* type, antallet av innskutte sekvenser, genetisk bakgrunn og ytre forhold. De stammene som var på 1960 tallet var stabile, mens de multiresistente stammene på 1980 tallet mistet lettere *mec*

determinanten ved lagring (Wada et al. 1991). Stress forhold som UV-lys, lite ernæring eller høyere temperatur kan indusere delelesjoner i *mec* regionen i bakteriene som videre resulterer i følsomhet for meticillin (Inglis et al. 1990). Tap av meticillin resistens *in vivo* har blitt observert hos minst to pasienter med MRSA infeksjoner (Deplano et al. 2000).

## **3.0 EPIDEMIOLOGISKE TYPINGSMETODER**

I det siste århundret har mikrobiologien søkt etter raske og effektive metoder for å kunne skille mellom ulike *S. aureus* isolater. Differensiering av bakteriestammer er grunnlaget for epidemiologiske studier ved infeksjonssykdommer (Frenay et al. 1996). Ved epidemiske studier er det også behov for å identifisere en bakterieklon for å følge dens bevegelse innen en populasjon av verter. I forbindelse med utbrudd og forekomst av MRSA kloner, er det viktig å ha påvisningsmetoder som raskt detekterer slektskapsforhold mellom de ulike stammene. De opprinnelige metodene var fenotypiske, men moderne epidemiologi benytter nesten utelukkende genotypiske metoder.

### **3.1 Fenotyping**

Identifisering og karakterisering av MRSA stammer har i mange tiår blitt utført ved hjelp av fenotypiske metoder som videre har vært grunnlaget for epidemiologiske analyser. Fenotypiske metoder baserer seg på å identifisere stammer ved hjelp av produktet som et gen koder for. Det er mange ulike metoder innenfor fenotyping, men *S. aureus* stammer har tradisjonelt blitt differensiert ved hjelp av fagtyping (Blair et al. 1961).

Ved fagtyping undersøkes stammens følsomhet for enkelte bakterievirus (bakteriofager). Det er en internasjonal akseptert metode som har vært nyttig i utredning ved sykehusepidemier forårsaket av *S. aureus* (Vandenbroucke-Grauls et al. 1991), men da nærmere 30 % av dagens MRSA isolater ikke lar seg type med metoden, kan den ikke lenger forsvare sin plass som en egnet typingsmetode.

En annen fenotypingsmetode er å karakterisere bakteriekloner ved hjelp av antibiogrammer hvor en forsøker å knytte antibiotikafølsomhetsmønster til enkelte bakteriestammer.

Antibiogrammer er ustabile og lite egnet til annet enn å antyde slektskap, men en fordel med metoden er at den kan utføres i ordinære mikrobiologiske laboratorier.

## 3.2 Genotyping

I de tre siste tiårene har bruken av DNA teknologi økt innen mikrobiologiske laboratorier. Den første DNA-baserte teknikken som var knyttet opp mot epidemiologiske studier av *S. aureus* var analyse av plasmider. Metoden ble introdusert på midten av 1970 tallet (Meyers et al. 1976). Det finnes i dag en rekke metoder til å karakterisere et bakteriegenom på. De er basert på polymorfismer i DNA mønsteret og benytter kutting av bakteriegenomet med spesifikke endonukleaser eller oppformering av spesielle sekvenser. Pulsfelttyping (Schwartz og Cantor 1984), polymerase chain reaction (PCR) (Mullis et al. 1986), *spatyping* (Frenay et al. 1996) og multilocussekvenseringstype (Maiden et al. 1998) er eksempler på genotypiske typingsmetoder. De moderne genotypingsmetodene har høyere reproduserbarhet og høyere evne til å skille mellom ulike kloner enn de gamle fenotypiske systemene. Det har imidlertid vist seg at ikke alle genotypiske metoder diskriminerer likt. Dette kan resultere i påvisning av ulikt slektskapsforhold ved bruk av de forskjellige typingsmetodene.

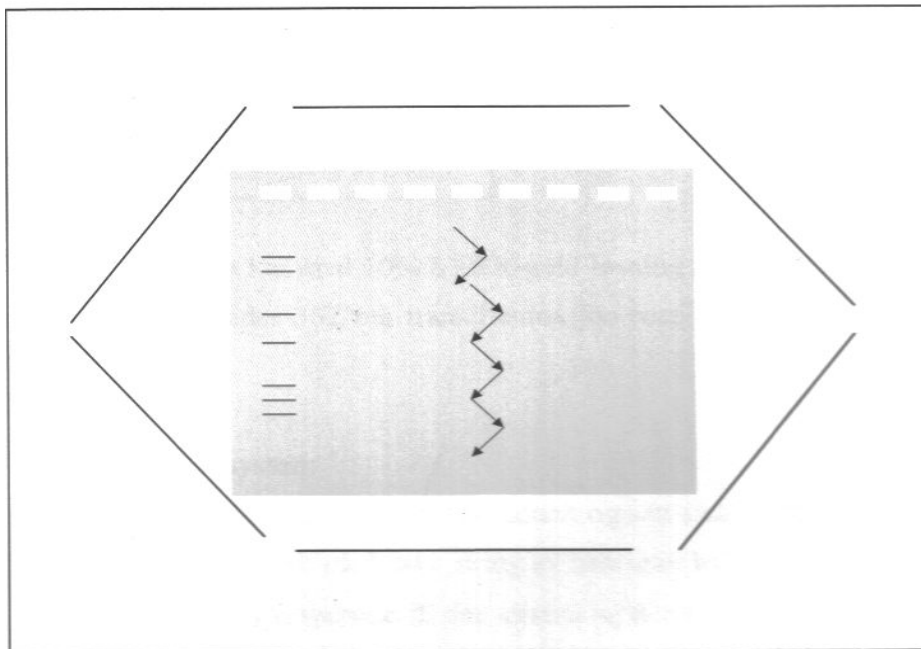
### 3.2.1 Pulsfelttyping.

Ved pulsfelttyping benyttes restriksjonsendonukleaser som kjenner igjen et fåtall spesifikke seter i bakteriegenomet. De fragmentene som blir dannet er store, og de blir kalt for makrorestriksjonsfragmenter. Disse fragmentene er for store til å bli separert ved vanlig elektroforese. Dette problemet ble løst ved at Schwartz og Cantor innførte pulsfelt

gelelektroforese (PFGE) i 1984 (Schwartz og Cantor 1984). I dag står PFGE sentralt i epidemiologiske studier av *S. aureus* som typingsmetode. Den er i tillegg til å være den mest brukte metoden for tiden også gullstandarden innenfor molekylære typingsmetoder (Tenover et al.1994).

### Prinsippet ved separering

Ved pulsfelttypering dannes det store fragmenter som ikke kan separeres ved vanlig gelelektroforese. Ved vanlig gelelektroforese vil store fragmenter med størrelse over 30-50 kb vandre med samme mobilitet, men ved pulsfeltgelelektroforese kan en derimot separere DNA fragmenter i størrelsesorden 10 kb til 800 kb (Birren et al 1989). En hovedforskjell mellom PFGE og ordinær elektroforese er at ved PFGE skifter spenningen retning etter forhåndsinnstilte vinkler og tidsintervaller, men ved ordinær gelelektroforese er retningen på spenningen konstant. Ved PFGE tvinges DNA molekylene til å endre retning, og før de kan vandre i ny retning må fragmentene reorientere seg i det nye feltet. De små DNA molekylene vil vandre raskere i den nye retningen da de større fragmentene reorienterer seg saktere, dermed blir det separering av de ulike fragmentstørrelsene. Dette prinsippet er illustrert i figur 3.1.



Figur 3.1: Illustrasjon av vandring av DNA fragmenter ved PFGE.

## Apparatur

Når det gjelder pulsfeltgelelektroforese utstyr, så finnes det mange forskjellige apparater på markedet. De fordeler seg på to hovedgrupper. Inndeling i hovedgrupper er basert på ulikheter når det gjelder påsatt spenning ved elektroforesekjøringen. Forskjellen gjelder både spenningens polaritet og vinkelen mellom spenningens retning og DNA fragmentene.

I den ene hovedgruppen skifter periodevis polariteten på elektrodene. På grunn av at DNA skifter 180° retning, bruker DNA en bestemt tid på å flytte seg bakover igjen før det går fremover igjen. Det enkleste utstyret i denne kategorien er designet for Field Inversion Gel elektroforese (FIGE) (Carle et al. 1986). Litt mer komplekst er utstyr kalt Zero Integrated Field Elektroforese (ZIFE) (Turmel 1993).

I den andre kategorien reorienteres DNA ved at retningen på spenningen forandres med en vinkel fra 96° til 120°, og fragmentene vandrer i sikksakk. Det hevdes at ved dette prinsippet kan en separere fragmenter over et større område, og i tillegg er separasjonen forholdsvis rask. Det er utviklet forskjellige typer instrumenter som benytter prinsippet med reorientering av DNA, og i denne oppgaven skal et instrument innen gruppen: Contour-clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) benyttes (Chu et al. 1986).

## HARMONY-protokollen

Mange forskjellige PFGE protokoller har blitt utviklet i ulike laboratorier i mange land, og det har tidligere vært vanskelig å sammenligne resultater fra forskjellige laboratorier. Flere studier som har sammenlignet PFGE mønstre, har konkludert med at det er et stort behov for å standardisere metoden for å forbedre reproduserbarheten mellom forskjellige laboratorier (Cookson et al. 1996; Murchan et al. 2003). Dette problemet tok den Europeiske Union tak i og nedsatte en gruppe kalt HARMONY typingsgruppen som fikk som mandat å harmonisere typemetoder for nosokomiale patogener. HARMONY typingsgruppen bestod opprinnelig av 12 laboratorier fra 10 land. Gruppen samarbeidet med ENEMITI (European Science Foundation Network for the Exchange of Microbial Typing Information) ledet av Dr. Kevin ved Towner of the Queens Medical Centre, Nottingham, England. Hovedmålet for denne gruppen var å samle europeiske epidemiske stammer og andre viktige MRSA stammer, for



deretter å utvikle en standardisert protokoll for PFGE typing av MRSA (Murchan et al. 2003). De standardiserte parametrene i HARMONY protokollen er listet opp i tabell 3.1.

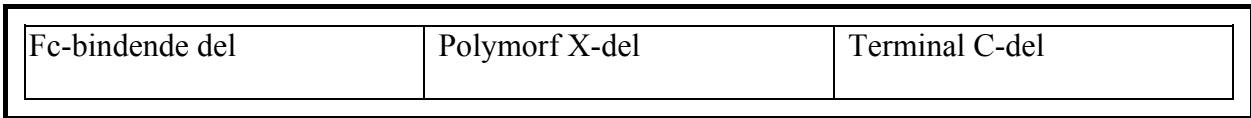
Tabell 3. 1: Standardiserte parametere i HARMONY protokollen.

Standardiserte parametere	Spesifikasjon
Gel	150 ml med 1 % agaroseløsning, i gelramme med målene 20 cm x 14 cm
Buffer	1700 ml 0,5X TBE
Temperatur	14 °C
Spenning	200V eller 6V/cm
Puls tid	5-15 sek. i 10 timer 15-60 sek. i 13 timer
Kjøretid	23 timer
Referanse standard	<i>S. aureus</i> NCTC 8325

### 3.2.2 Spatyping

Sammenligning av nukleotidsekvenser er den mest stringente metoden for å sammenligne slektskapsforhold mellom stammer. I midlertidig er det ikke praktisk mulig å sekvensere hele genomet, men det er effektivt å sekvensere et område som både har variable og konserverte gensekvenser. Ved *spatyping* av *S. aureus* benyttes sekvensering av et område i *spagenet*. Dette genet er på 2150 bp og koder for protein A som er en bestanddel av celleveggen hos *S. aureus*. *Spagenet* inneholder tre områder som henholdsvis koder for en Fc-bindende del, en polymorf X-del og en terminal C-del, som er nødvendig for binding til celleveggen (Schneewind et al. 1992). I figur 3.2 er det satt opp en skisse av *spagenet*. X-delen er den delen som blir benyttet til sekvensering ved *spatyping*. Den består av et variert antall repeterende enheter fra tre til 15 stykker. Det finnes i alt 34 forskjellige enheter som varierer litt i størrelse. Av de 34 ulike enhetene finnes det en med 21 bp, 31 forskjellige med 24 bp og to forskjellige med 27 bp (Tang et al. 2000). Forskjellen i X-regionen oppstår antagelig på

grunn av delesjon og duplikasjon av repeterende enheter eller punktmutasjoner. Den polymorfe X-regionen betegnes også som “Short Sequence Repeat” (SSR) regionen av protein A genet (Shopsin et al. 1999).



**Figur 3.2:** Skjematisk fremstilling av *spagenet* med Fc-bindende del, polymorf X-del og en terminal C-del.

Tidligere studier av blant annet Frenay har vist at X-regionen av *spagenet* er stabilt nok både *in vitro* og *in vivo* for å kunne brukes til typing av forskjellige MRSA stammer (Frenay et al. 1996). På hver side av X-regionen er det konserverte områder som gjør det gunstig å benytte primere for PCR amplifisering og PCR sekvensering. Et MRSA typing system basert på amplifisering og deretter sekvensering av *spagenet* ved hjelp av fluorescens DNA teknologi, har blitt utviklet og distribuert av firmaet Ridom GmbH, Tyskland.

### Prinsippet ved sekvensering

Bestemmelse av rekkefølgen av basene i DNA er en sentral teknikk i molekylærbiologi. To metoder er utviklet for dette formålet. Den ene metoden er utviklet av Maxham og Gilbert og den andre av Sanger. Sangers dideokseysekvenseringsmetode er en enzymatisk metode, og den er den mest brukte (Sanger 1977). Sangers metode skal benyttes i denne oppgaven. Ved denne metoden syntetiseres nye dattertråder ved hjelp av PCR (Mullis et al. 1986). Dattertråder skiller seg i lengde fra hverandre med et nukleotid. Avkortede dattertråder dannes ved å benytte dideoksyribonukleosidtrifosfat (ddNTP) i tillegg til deoksyribonukleosidtrifosfat (dNTP) i syntese reaksjonen.

Etter at det er blitt amplifisert avkortede dattertråder i forskjellige lengder, benyttes kapillærelektroforese for å separere fragmentene. Fragmentene separeres i tynne kapillærer som inneholder en flytende polymergel. En del sekvenseringsapparater er basert på at ddNTP molekylene er merket med fluoriserende farger som eksiteres av en laser og sender deretter ut lys med en distinkt farge. Ved hjelp av disse fargene detekteres rekkefølgen av nukleotidene i sekvensen.

### 3.2.3 Multi Locus Sequence Typing

Multi Locus Sequence Typing (MLST) er en sekvenseringsteknikk som er utviklet fra Multi Locus Enzym Elektroforese (MLEE) som er en fenotypisk metode. Ved MLST påvises allelene direkte ved nukleotid sekvensering. Denne metoden har blitt utviklet ved hjelp av *Neisseria meningitidis* som en modell spesies (Maiden et al. 1998). Den ble senere tatt i bruk til typing av *S. aureus* (Enright et al. 2000).

#### Prinsippet ved MLST

Ved MLST metoden blir allelene på hvert av de seks eller syv såkalte ”housekeeping” genene sekvenserte (Maiden et al. 1998). Housekeeping genene er de genene som koder for mange av de vitale proteinene i bakteriecellene. Fragmenter med størrelse på ca. 450 bp blir benyttet da de er tilstrekkelig for de fleste arter til å kunne påvise variasjon i nukleotidsekvensen, slik at forskjellige alleler blir detektert. For hvert genfragment vil hver unike sekvens være et unikt allel (Spratt 1999).

### 3.3 Krav til typingsmetoder

Maslow og kolleger satte i 1993 opp forskjellige kriterier som bør følges ved evaluering og valg av ethvert typingsystem. Disse kriteriene gjaldt typeevne, reproduserbarhet, diskriminerende styrke, stabilitet og egnethet (Maslow et al. 1993).

Typeevne refererer til evnen et system har til å gi tolkbare resultater av hvert isolat som blir analysert. Den er påvirket av både tekniske og biologiske faktorer.

Reproduserbarhet består også av tekniske og biologiske faktorer. Den tekniske reproduserbarheten er evnen til å påvise samme type på samme stamme ved forskjellige analyseoppsett eller ved uavhengige situasjoner. Den biologiske reproduserbarheten er evnen et system har til å kjenne igjen klonal slektskapsforhold til stammer som har utviklet seg fra en felles stamkilde.

Den diskriminerende styrken til et typingssystem refererer til sannsynligheten for at et typingssystem vil type to ubeslektede stammer til ulike typer. Ideelt sett skal hver ubeslektede stamme types til å være unik (Hunter 1990).

Stabilitet hos bakterieisolatene er også en viktig faktor ved typing. Fenotypisk og genotypisk variasjon kan forekomme ved oppbevaring og ved oppformering av stammer i laboratoriet (*in vitro* stabilitet). Over tid kan en stamme utvikle seg og resultere i grader av genetisk variasjon (*in vivo* stabilitet).

Når det gjelder en typingsmetodes egnethet går det på flere faktorer. En av faktorene er at metoden skal være rask å utføre for kvalifisert personell, og at den i tillegg skal være egnet for å bli utført på et standard utstyrt typingslaboratorium. Metoden må heller ikke være for kostbar når det gjelder reagenser og utstyr.

## **4.0 MATERIALE OG METODE**

### **4.1 Materiale**

#### **4.1.1 Pulsfelttyping**

Denne studien består av et utvalg av 251 MRSA stammer isolert fra forskjellige sykehus, sykehjem og primærhelsetjenesten i syv forskjellige fylker i Norge fra perioden juli 2000 til juli 2005. De syv fylkene er Hordaland, Rogaland, Vest Agder, Aust Agder, Telemark, Vestfold og Østfold. Materialet fra Telemark fylke er i en særstilling, da det er med en prøve fra alle pasienter i Telemark med MRSA i perioden juli 2000 – juli 2005. Fra de andre seks fylkene er materialet ikke komplett, på grunn av at det ikke er med en prøve fra alle pasienter med MRSA infeksjon i det aktuelle tidsrommet.

MRSA isolatene ble detektert ved påvisning av *mec* og *nuc* genene. Stammene ble isolert i det lokale laboratoriet før de ble videresendt til as Telelab, Skien. MRSA prøvene ble på nytt spredd på hestebloodskåler ved as Telelab og inkubert aerobt over natt ved 37 °C for deretter å bli nedfrosset i en brain-heart buljong med 10 % glyserol (G1345 Duchefa Biochemie,

---

Haarlem, Nederland). Stammene fra Telemark fylke ble konfirmerte som *S. aureus* med Monostaph agglutinasjonstest (Bionor, Skien, Norge) og med DNase test (Mast, Merseyside, Storbritannia). Enkelte av Telemark stammene viste sprikende resultater mellom disse to testene, men ved bruk av koagulase test (bioMerieux, Lyon, Frankrike) ble de konfirmerte som *S. aureus*.

Det er også med syv internasjonale epidemiske kloner. Disse er med som sammenligningsgrunnlag for eventuelt å finne like eller lignende pulsfelttyper i det norske materialet. De internasjonale klonene er: engelske E-MRSA 15 og E-MRSA 16 (Culture Collection of the University of Gutheburg, CCUG), spanske HPV 107, ungarske HUSA 304, portugisiske HDE 288, amerikanske (New York) og japanske BK 2464 og brasilianske HSJ 216 (Herminia de Lencastre, Lisboa, Portugal). Den europeiske stammen DK E97-1 (Smittskyddsinstitutet, Stockholm, Sverige) ble ikke pulsfelttypet i denne studien. Det totale materialet ble på til sammen 258 stammer.

### 4.1.2 *Spatyping*

Fra utvalget på 251 MRSA stammer ble 33 MRSA stammer *spatypet*. Isolatene ble valgt ut på bakgrunn av PFGE typingen. De 33 isolatene bestod av et isolat fra 20 ulike pulsfelttyper (T1-T20) og 13 isolater fra en pulsfelttype (T1). Hensikten med å *spatypet* et utvalg i denne studien var å undersøke om det kunne påvises forskjeller når det gjaldt typeevne, reproduserbarhet, diskriminerende styrke, stabilitet og egnethet for disse to typingsmetodene. I tillegg var det med fem prøver med kjent *spatypet*, disse skulle være med som kontrollmateriale ved *spatypingen* (Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co, Karlsruhe, Tyskland).

## 4.2 Metode

### 4.2.1 Pulsfelttyping

MRSA stammene som skulle pulsfelttypes ble sådd ut på nytt før den videre bearbeidelsen som bestod av tre hovedtrinn:

- Ekstrahering av DNA og pluggpreparering

- Pulsfeltgelelektroforese
- Databehandling

### Ekstrahering av DNA og pluggpreparering

De enkelte stammene ble så vidt tint opp før de ble spredd på hestebloodagar, deretter ble de inkubert aerobt over natt ved 37 °C. Seks til åtte kolonier ble slemmet opp i 5 ml 0,9 % natriumklorid løsning (6404 Merck, Darmstadt, Tyskland) med en konsentrasjon lik 3 Mc Farland. Bakteriesuspensjonen ble sentrifugert ved ca. 5400 g i 10 min. Pelleten ble resuspendert i 800 µl nylaget lyseringsbuffer, [PIV sakkarose buffer pH 8,0 (1M NaCl (6404 Merck), 10mM Tris-HCl (T-3253 Sigma, USA), 0,2 % sakkarose (7651 Merck)), 10 mg nylaget lysozym (L-6876 Sigma) og 6 U lysostaphin (L-4402 Sigma)]. Resuspendert bakterieløsning ble inkubert på is i 15 min. Like volum av cellesuspensjon og 1,5 % agaroseløsning (A-3054 Sigma) løst i PIV-buffer pH 8,0 [1 M NaCl (6404 Merck), 10 mM Tris-HCl (T-6791 Sigma), Saltsyre (264432 Norsk Medisinaldepot, Oslo, Norge)] ble blandet godt før 6-8 pluggere av hver stamme ble støpt i pluggformer (170-3713 BioRad, Hercules, California, USA). Pluggene ble inkubert ved 4 °C i minst 20 min. Pluggene ble deretter fjernet fra pluggformene ved hjelp av en steril øse (1 µl) og overført til 12 ml reagensglass med skrukork. Rørene ble tilsatt 3 ml lyseringsløsning [0,5 % N-lauroylsarcosine (L-9150 Sigma), 1,2 mg lysozym (L-6876 Sigma) i nylaget løsning, 1,125 U lysostaphin (L-4402 Sigma), 14 µg RNase (R-5503 Sigma) løst i Tris-CaCl<sub>2</sub>-glycerol løsning (10 mM Tris HCl (T-3253 Sigma), 25 mM CaCl<sub>2</sub> (2382 Merck), 50 % glycerol (G1345 Duchefa Biochemie))]. Pluggene ble deretter inkubert 1 time ved 37 °C på et roterende hjul ved 30 rpm.

Lyseringsbufferen, som pluggene lå i, ble fjernet forsiktig ved hjelp av en pasteurpipette. Pluggene ble deretter inkubert i 1 time ved 50 °C i 3 ml ESP buffer pH 8,0 [0,5M Titriplex II (8417 Merck), 1 % N-lauroylsarcosine (L-9150 Sigma), 3 mg proteinase K (V3021 Promega, Madison, USA)]. Pluggene ble deretter vasket/inkubert 5 ganger i 15 min. med 8 ml autoklavert vann. Ved vasking/inkubering ble rørene med pluggene plassert i et inkubatorskap innstilt på 55 °C.

---

Pluggene ble deretter oppbevart ved 4 °C i eppendorfrør med 0,5X TE buffer pH 8,0 [1 mM Tris (T1501 Duchefa, UK), 0,1 mM EDTA di-Natriumsalt salt 2H<sub>2</sub>O (S051423 Saveen, Malmø, Sverige), saltsyre (264432 Norsk Medisinaldepot)].

### **Pulsfeltgelelektroforese**

Med en steril skalpell ble en 2-4 mm gelbit kuttet av pluggen og overført til bunnen av et sterilt eppendorfrør. Gelbiten ble inkubert i 50 µl kutteløsning med 20 U restriksjonsenzym *SmaI* (R6121 Promega) i minst fire timer. Gelbiter fra prøvene og referansestamme *S. aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Cultures) ble deretter festet på en kam som ble støpt ned i en 1 % agarosegel (162-0137 Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) med størrelsesmålene 20,5 cm x 14 cm. Restriksjonsfragmentene ble separert ved pulsfeltgelelektroforese på apparatur Chef mapper™ (BioRad) med 2,2 l med 0,5X TBE buffer pH 8,0 [45 mM Tris base (T1501 Duchefa), 45 mM Borsyre (B0503 Duchefa), 1,00 mM EDTA di-natriumsalt (051423 Saveen)]. Elektroforese ble kjørt etter HARMONY-protokollen (Murchan et al. 2003) med unntak av at volumet av elektroforesebufferen var 2,2 l mot anbefalt 1,7 l i HARMONY-protokollen.

### **Fremkalling og databehandling**

Gelen ble farget med 40 µl SYBR-Gold (S-11494 Sigma) i 400 µl 0,5X TBE buffer pH 8,0 i 30 min. Fragmentene på gelen ble visualisert ved bruk av UV transluminator ved 302 nm, og fotografert med Polaroid 665 film med 40 sek. eksponeringstid. Fotografiet ble skannet og lagret som TIFF fil for senere å bli bearbeidet i dataprogrammet Gelcompare Analyze II program versjon 2.5 (Applied Maths, Austin, Texas, USA). Fragmentene i hver prøve ble markert som bånd i programvaren Gelcompare Analyze II. Båndene kunne settes automatisk eller manuelt. Det største båndet tilhørende referansestamme *S. aureus* NCTC 8325 var på 674 kb, og bånd som var større enn dette ble ekskluderte fra sammenligningen. Det samme gjaldt de bånd som var mindre enn referansestammens bånd på 36 kb, de ble også ekskluderte. De båndene som lå i størrelsesområdet fra og med 674 kb til og med 36 kb ble normaliserte i forhold til referansestammens bånd. Til cluster analyse ble dendrogram type UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) benyttet. Den ble utført på bakgrunn av likheter og forskjeller i båndmønstre ved å benytte aritmetisk gjennomsnitt basert på Dice likhetskoeffisient med en toleransegrense på 1 %.



---

### 4.2.2 Spatyping

For å kunne sekvensere *spagenet* i MRSA stammene og kontrollene var det gunstig å benytte MRSA celler som var i sen log fase eller i stasjonær fase som utgangsmateriale. Den videre bearbeidelsen bestod av fire hovedtrinn:

- Ekstrahering og rensing av genomisk DNA
- PCR for oppformering av X-region i *spagenet*
- PCR sekvensering av X-region i *spagenet*
- Databehandling

#### Ekstrahering og rensing av genomisk DNA

MRSA stammene ble dyrket aerobt på hestebloodskål over natt ved 37° C. Et sveip med bakterieceller samlet med 10 µl øse ble suspendert i 5 ml 0,9 % NaCl (6404 Merck). Deretter ble 1 ml av bakteriesuspensjonen overført til 1,5 ml autoklaverte eppendorfrør. Rørene ble sentrifugert ved 5400 g i 10 min. Pelleten ble resuspendert i 180 µl optimalisert lyseringsløsning [40 µg lysostaphin (L-4402 Sigma), 1 mg lysozym (L-6876 Sigma), 1,44 µM Tris HCl pH 8,0 (37180 Serva), 3,6 µM EDTA di-natrium salt (S051423 Saveen), 50 mM NaOH (6495 Merck), 1 % Triton X-100 (Merck 8603), H<sub>2</sub>O]. Deretter ble DNA ekstrahert ved bruk av QIAamp DNA Mini Kit (51304 Quiagen, Hilden, Tyskland) med protocol D: "Isolation of genomic DNA from Gram positive bacteria". De ekstraherte DNA løsningene ble målt fotometrisk ved ulike bølgelengder (BioPhotometer, Eppendorf, Tyskland). De løsningene som ble vurdert til ikke å inneholde for mye proteiner, karbohydrater og lignende, ble satt opp til videre bearbeidelse med PCR for oppformering av X-regionen i *spagenet*.

#### PCR for oppformering av X region i *spagenet*

PCR amplifisering av *spagenet* ble utført ved å tilsette 2 µl DNA løsning som templat til 48 µl mastermix [5 µl PCR buffer (M 190G Promega), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (A 351H Promega), 0,4 µl dNTP (Applied Biosystems, Warrington, UK), 1 pmol forward primer (spa-1113f: 5'-taaagaacgatccttcggtgagc-3') (MWG BIOTECH, Ebersberg, Tyskland), 1 pmol reverse primer (spa-1514r: 5'-cagcagtagtgcggttgctt-3') (MWG BIOTECH), 1,25 U Taq Polymerase (M1881

---

Promega) sterilt H<sub>2</sub>O]. Prøvene ble amplifisert ved bruk av GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, California, USA) i følge protokoll utarbeidet ved Ridom GmbH (Wurzburg, Tyskland): "DNA sequencing of the *spa* Gene" (Document version 1.1. June profil 2004). Deretter ble prøvene nedkjølt til 4 °C.

2 µl av PCR produktet ble tilsatt 8 µl Agarose Loading Dye (E-DYE) [0,04 % sakkarose (7651 Merck), 0,25 % bromfenolblått (8122 Merck) i H<sub>2</sub>O]. Deretter ble PCR produktene separert ved gelelektroforese med 2 % agarosegel (Agarose Molecular Biology Grade V 3121 Promega) med buffer 1X GRB buffer pH 8,6 [0,09 M Tris (T1501 Duchefa), 0,09 M Borsyre (B0503 Duchefa), 2,5 mM EDTA di-Natrium salt (S051423 Saveen)] Til markør ble BenchTop φ X174 DNA/HaeIII Markers (G7511 Promega) i størrelsesorden 72-1353 bp, benyttet.

PCR produktet ble rensert for overskudd av primere og nukleotider før sekvensering: 10 µl PCR produkt ble rensert i 50 µl buffer ved bruk av QIAquick PCR Purification Kit (28104 Qiagen). Prosedyre for bruk av mikrosentrifuge, versjon 07/2002 ble benyttet.

### **PCR sekvensering av X-region i *spagenet***

"Forward" og "reverse" syklus sekvenseringsmiksturer bestod av 2 µl fortynnet PCR produkt (1:5 med høyrenset autoklavert vann), 8 µl mastermix [BigDye ®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (4337449 Applied Biosystems, Foster City, California, USA)], 10 pmol primer (MWG BIOTECH), total volum 20 µl. Til kontroll ble det benyttet 8 µl mastermix, 0,8 µg templat pGEM-3Z(+) (21M13 Applied Biosystems, Foster City, California, USA) og 0,8 pmol forward Control Primer (Applied Biosystems), totalvolum 20 µl. Prøvene ble oppformert i Thermocycler (GeneAmp PCR system 9600 Perkin Elmer Biosystems), i følge protokoll: Ridom GmbH (Wurzburg, Tyskland): "DNA sequencing of the *spa* Gene" (Document version 1.1. June profil 2004). Deretter ble prøvene oppbevart ved 4 °C inntil rensing av overskudd av fargemerkede ddNTP'er. PCR sekvenseringsproduktene ble felt ut med følgende kjemikalier: EDTA pH 8,0 (8418 Merck), NaAcetat pH 5,2 (0626 Merck) og fersk rektifisert etanol (600068 Arcus, Oslo, Norge). Prøverøret med pellet ble pakket inn i aluminiumfolie for å beskytte mot lysstråler. Hvis prøven skulle analyseres innen 14 dager,

kunne den oppbevares ved 4 °C. Ved lengre tids oppbevaring ble prøvene frosset ned til -20 °C.

Før analysering av prøven med kapillærelektroforese, ble pelleten løst i 12 µl deionisert formamid (4311320 ABI-prism, Applied Biosystems), deretter ble den denatureert ved 95 °C i 5 min. Prøvene ble deretter spunnet ned ved en kort sentrifugering. Lokket på prøvekoppen ble klipt av, og et septum ble satt på hver prøve kopp. Prøvene ble oppbevart på is inntil de ble analysert ved bruk av kapillærelektroforese på analyseinstrumentet ABI Prism 310 automatiserte fluorescens sekvenser (Applied Biosystems-Perkin Elmer Biosystems). Elektroforese ble kjørt etter protokoll fra leverandør (Electrophoresis on the ABI PRISM 310 Geneti Analyzer, Appendix C).

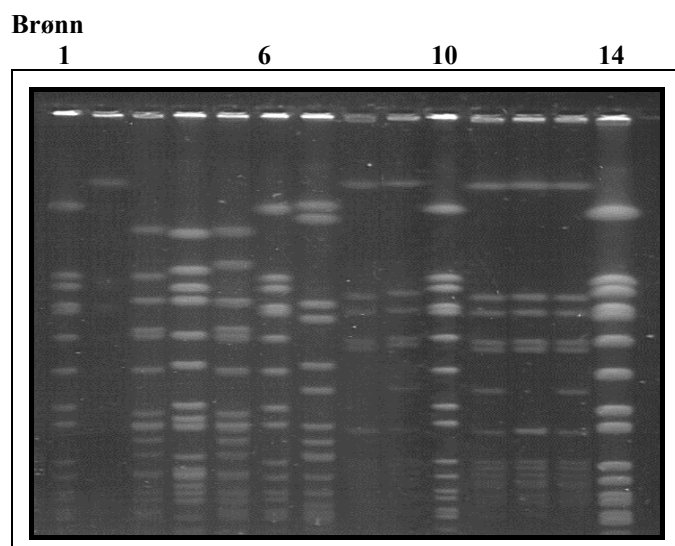
### **Dataanalyse**

Nukleotid sekvensen ble analysert ved å bruke RidomStaph Type dataprogram (Ridom GmbH, Würzburg, Tyskland). Analysering av nukleotidene og sekvensen foregikk både automatisk og manuelt. Dataprogrammet detekterte repeterende enheter, og sammenlignet antall og rekkefølgen av disse med antallet og rekkefølgen i kjente *spatyper* som var definerte i en database (<http://www.spaserver.ridom>).

## 5.0 RESULTATER

### 5.1 Pulsfelttyping

Pulsfelttyping av *S. aureus* ble tidligere utført ved as Telelab, Skien etter en protokoll som var bearbeidet etter en nordisk protokoll (Zinn et al. 2000). Pulsfelttyping etter denne protokollen tok totalt fem arbeidsdager, og den innbefattet bruk av det helseskadelige kjemikaliet PMSF ved vasking av pluggene. Gelbildet i bilde 5.1 viser resultatet fra pulsfelttyping etter denne tidligere protokollen. Resultatet er tilfredsstillende da det er skarpe og distinkte bånd på gelen både for pasientprøver og standard *S. aureus* NCTC 8325. Standarden er applisert i brønn 1, 6, 10 og 14 som angitt over gelbildet. I de resterende brønnene er det applisert MRSA isolater fra pasienter.



**Bilde 5.1: Pulsfelttyping etter den nordiske pulsfeltprotokollen. NCTC 8325 er applisert i brønn 1, 6, 10 og 14. I de resterende brønnene er MRSA isolater applisert.**

### 5.1.1 Videreutvikling av protokoll

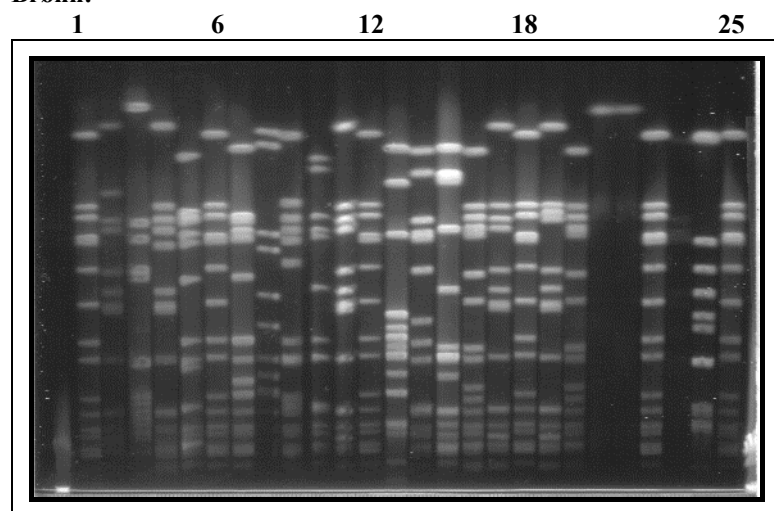
I denne studien var ett av delmålene å optimalisere metoden, det vil si å få redusert tiden som gikk med til pluggpreparering og i tillegg få fjernet bruken av kjemikaliet PMSF. Det ble utprøvd fire forskjellige forsøksprotokoller beregnet på 30 prøver. Disse forsøksprotokollene avvok fra opprinnelig protokoll på ett punkt av gangen. Disse punktene var:

- Redusering av lyseringstid fra to til en time med lysostaphin og lysozym ved 37 °C
- Redusering av inkuberingstid fra over natt til en time med proteinase K ved 55 °C
- Erstatte PMSF med vann ved vasking av pluggene
- Redusering av vasketid fra syv til to timer

Resultatet fra hver av de fire forskjellige forsøksprotokollene var tilfredsstillende. Dette resulterte i en ny protokoll hvor alle de fire forsøksprotokollene ble sammenfattet. Et resultat fra pulsfelttyping etter den nye protokollen er vist i bilde 5.2. I de fleste prøvene sees skarpe og distinkte bånd. Prøver som ble pulsfelttypet både med ny og gammel protokoll ble sammenlignet, og disse prøvene hadde identiske bånd ved sammenligningen i dataprogrammet Gelcompare Analyze II, versjon 2.5. I enkelte prøver var det forekomst av

svært svake bånd eller det var ingen bånd, noe som antagelig hadde sammenheng med at det var applisert lave konsentrasjoner av DNA.

**Brønn:**



**Bilde 5.2: Pulsfelttyping etter ny protokoll. *S. aureus* NCTC 8325 er applisert i brønn 1, 6, 12, 18 og 25. I de resterende brønnene er ulike MRSA isolater applisert.**

### **Konsentrasjon på agaroseløsning til pluggpreparering**

Under de forskjellige forsøkene med å utvikle ny protokoll, ble det erfart at agarosepluggene hadde en tendens til å bli mekanisk skadde når vaskevannet skulle avpipetteres. Det var i den nordiske protokollen benyttet 1 % agaroseløsning ved støping av pluggene. Det ble antatt at hvis pluggene hadde en høyere agarosekonsentrasjon, ville de ikke bli så lett skadde. Bruken av 1 %, 1,5 % og 2 % agaroseløsninger ble testet ut, og de viste alle tilfredsstillende resultater ved pulsfelttypingen. Den agarosekonsentrasjonen som ble valgt til videre pluggpreparering var 1,5 % løsning, fordi den i tillegg til å gi optimale resultater var best egnet i forhold til det praktiske laboratoriearbeidet.

### **Temperatur ved vasking av pluggene**

Det var i tillegg viktig ved vasking av pluggene at temperaturen på inkubatorskapet som pluggene ble plassert i, var innstilt på 55 °C. Det ble også forsøkt vasket med temperatur på 50 °C, men dette ga ikke brukbare resultater. Det var også en fordel at vaskevannet ble litt avkjølt før det ble fjernet, for da ble pluggene fastere i konsistensen og ble dermed ikke så lett mekanisk skadde.

---

### **Thiourea i elektroforesebuffer**

Ved enkelte pulsfeltgelelektroforese kjøringar ble DNA materialet i enkelte prøver degradert. Det oppstod såkalte "smears" i prøvene. Angående disse prøvene ble hele prosedyren gjentatt flere ganger uten at resultatet ble bedre. Det ble også prøvd ut om tilsetning av kjemikaliet thiourea i elektroforesebufferen ville hindre degradering av DNA. Dette hadde vist seg effektivt ved pulsfelttyping av *E.coli* (Silbert et al. 2003). To forskjellige konsentrasjoner av thiourea (kaliumtiocyanat) (T-7875 Sigma) på 1,8 mg/l og 10 mg/l ble tilsatt bufferen. Det viste seg at det fortsatt forekom degradering av enkelte prøver. Dette resulterte i at de resterende prøvene i denne studien, ble pulsfelttypet uten tilsetning av thiourea i elektroforesebufferen.

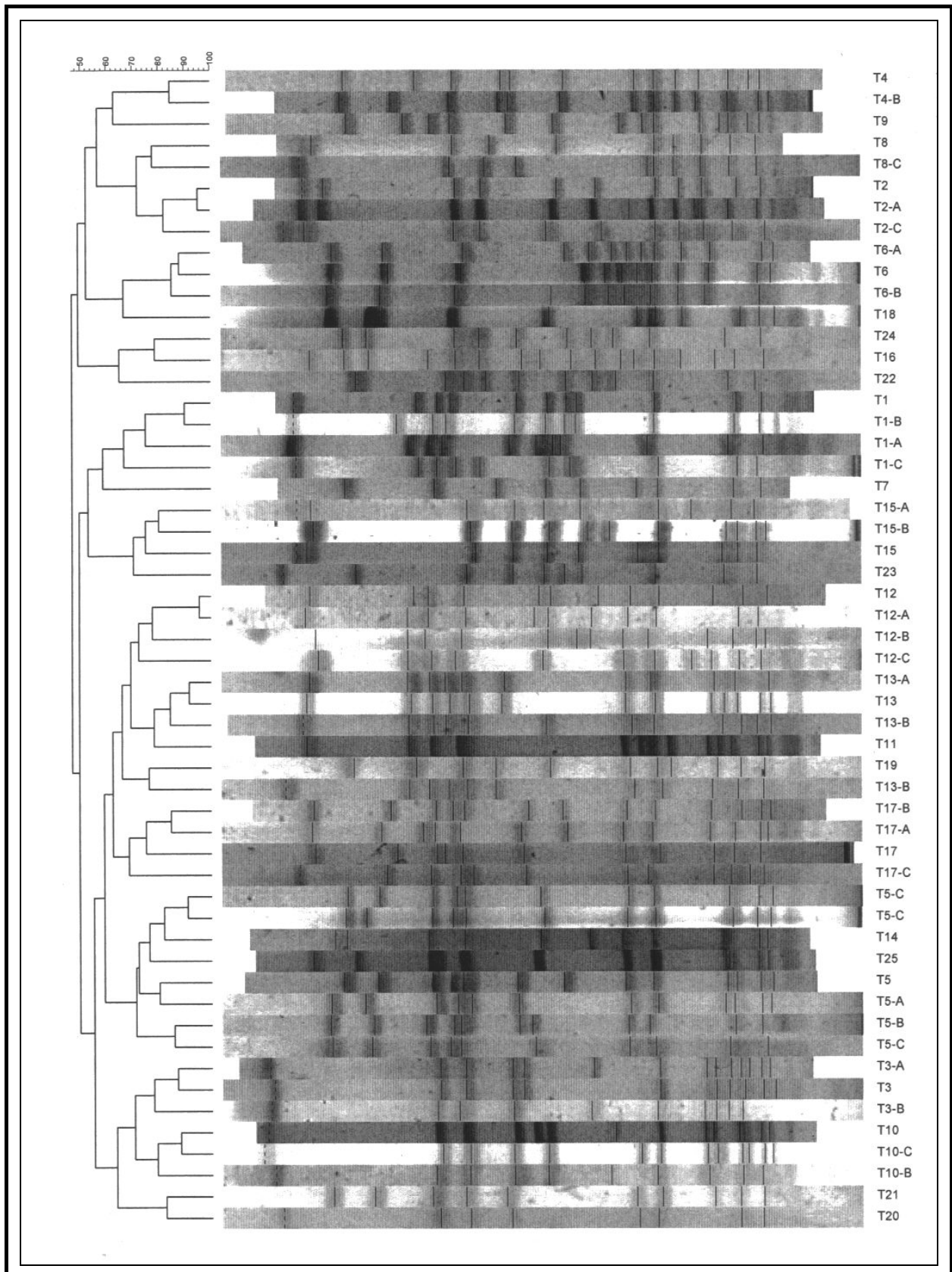
### **HARMONY protokollen**

Det var også en målsetning at pulsfeltgelelektroforesen skulle følge parametrene som var standardisert i HARMONY protokollen. Dette ble fulgt med ett unntak. Det ble benyttet 2,2 l elektroforesebuffer i stedet for 1,7 l som var standardisert i HARMONY-protokollen. 2,2 l var anbefalt å bruke av leverandøren til elektroforeseutstyret Chef mapper.

## **5.1.2 Epidemiologiske forhold**

### **MRSA pulsfelttyper og pulsfeltgrupper**

DNA fragmentene fra hver av prøvene som lot seg pulsfelttype, ble sammenstilt og sammenlignet med hensyn på likheter i dataprogrammet Gelcompare Analyze II. I tillegg til at de ble sammenlignet, ble de fordelt i pulsfelttyper og pulsfeltgrupper. Materialet ble inndelt i ulike pulsfelttyper ut fra kriteriet om at det måtte være mer enn tre bånders forskjell mellom de ulike isolatene for at de skal fordeles i ulike typer. Materialet ble fordelt på 25 ulike pulsfelttyper som ble kalt T1-T25. Den videre inndelingen i pulsfeltgrupper var etter følgende kriterier: ett bånders forskjell er pulsfeltgruppe A, to bånders forskjell er B og tre bånders forskjell er C. De som tilhører for eksempel pulsfeltgruppe T1-A bør ikke ha identiske bånd, men de har ett bånders forskjell fra pulsfelttype T1. I bilde 5.6 er det et dendrogram med isolater med ulike pulsfeltmønster. Skalaen til venstre i bildet viser likhet mellom de forskjellige pulsfeltmønsterene.



**Bilde 5.6: PFGE dendrogram med ulike pulsfelttyper og grupper. Cluster analyse ble utført ved aritmetisk gjennomsnitt (UPGMA) med Dice likhetskoeffisient med en toleransegrense på 1 %. Skalaen til venstre på dendrogrammet representerer likhet.**



### Pulsfeltyper i det totale materialet

De 234 MRSA isolatene som lot seg pulsfelttype, fordelte seg som tidligere beskrevet på 25 pulsfelttyper. Antall pulsfelttyper ble lavere i denne studien sammenlignet med resultatet fra studien fra 94-98 (Tveten et al. 2003), selv om materialet i denne studien var omtrent tre ganger så stort. Kriteriene for inndeling i pulsfelttyper og pulsfeltgrupper var den samme ved begge studiene. Fordelingen av de ulike isolatene på de ulike pulsfelttypene er satt opp i tabell 5.1. Når det gjelder de pulsfelttypene som består av 10 eller flere isolater, er forekomsten angitt i % i forhold til det totale antallet på 234.

**Tabell 5.1: Fordeling av 234 isolater på 25 pulsfelttyper.**

<b>Pulsfelttype</b>	<b>Antall</b>	<b>Andel</b>	<b>Pulsfelttype</b>	<b>Antall</b>	
T1	71	30%	T14	1	
T2	19	8%	T15	7	
T3	38	16%	T16	1	
T4	11	5%	T17	10	4%
T5	28	12%	T18	1	
T6	8		T19	1	
T7	1		T20	1	
T8	5		T21	1	
T9	1		T22	1	
T10	4		T23	1	
T11	1		T24	1	
T12	5		T25	1	
T13	15	6%			

### Pulsfeltyper i Telemark fylke

Det er valgt å se spesielt på resultatene fra Telemark fylke på grunn av at dette materialet var komplett, da det inneholdt et isolat fra alle MRSA pasienter i fylket i det aktuelle tidsrommet fra juli 2000-juli 2005. I denne studien er 85 isolater fra Telemark fylke pulsfeltypet, og disse fordelte seg på 15 pulsfeltyper. Det var 10 færre pulsfeltyper sammenlignet med det totale materialet. De pulsfeltypene som ikke ble påvist i Telemark var T12, T15, T16, T18, T19, T20, T21, T22, T23 og T24. I tabell 5.2 er de forskjellige pulsfeltypene satt opp med tilhørende antall av hver. For de pulsfeltypene som består av fem eller flere isolater, er forekomsten angitt i % i forhold til det totale materialet i Telemark fylke.

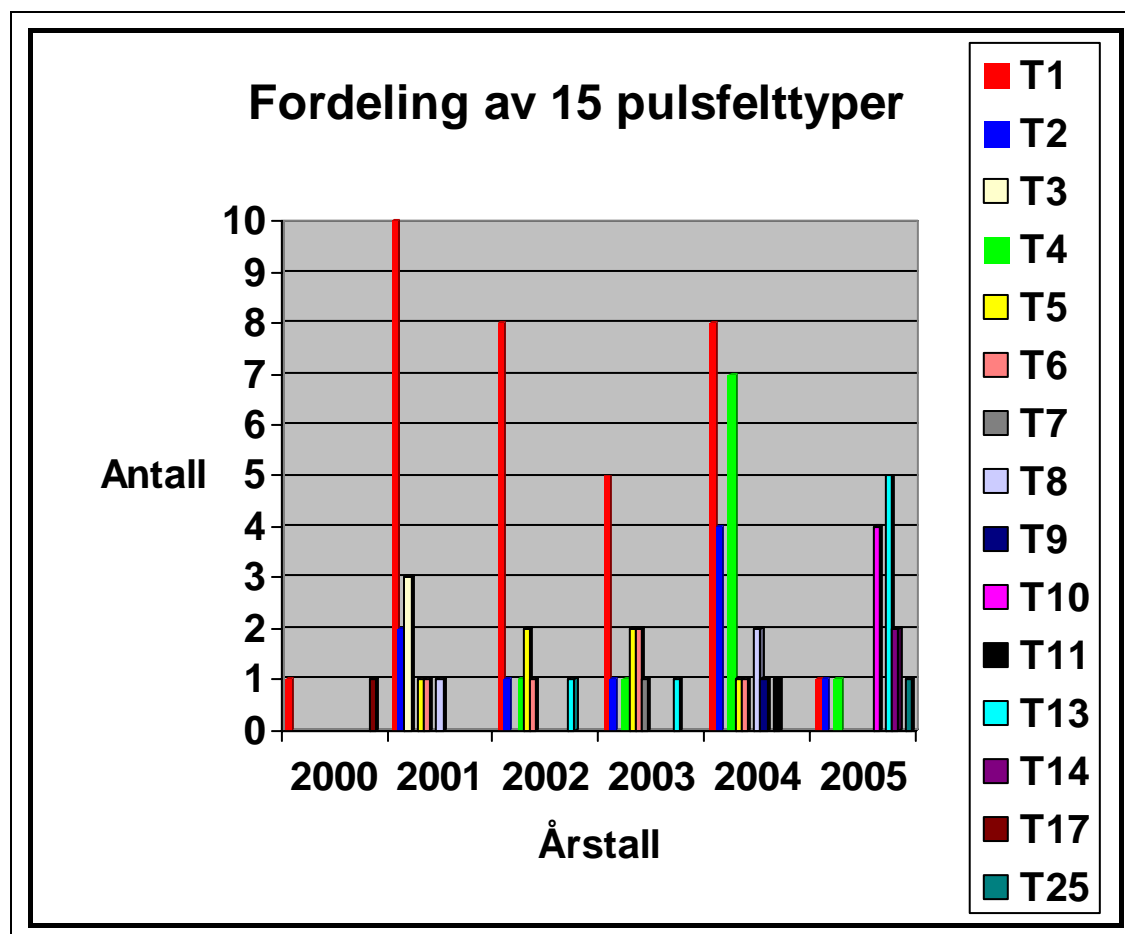
Tabell 5.2: 85 isolater fra Telemark fylke fordelt på 15 pulsfeltyper.

Pulsfeltype	Antall	Andel	Pulsfeltype	Antall	Andel
T1	32	38%	T9	1	
T2	9	11%	T10	4	
T3	3		T11	1	
T4	10	12%	T13	7	8%
T5	6	7%	T14	1	
T6	5	6%	T17	1	
T7	1		T25	1	
T8	3				

### Fordeling av pulsfeltyper i Telemark gjennom perioden på fem år

Det er også sett på fordelingen pr. år for de forskjellige pulsfeltypene i Telemark. Pulsfeltypen T1 dominerte fra 2001 til 2004 med en topp i 2001 på 10 isolater. I år 2005 kan det se ut til at denne er på retrett. T2 varierte noe gjennom hele perioden med en topp i 2004 med fire isolater. T4 forekom fra 2002 og ut perioden med en topp i 2004 med syv isolater. T5 ble påvist i perioden fra 2001 til 2004 med et lavt antall i hvert av de fire årene. I 2005 var det to nye pulsfeltyper som dominerte, og det var T10 med fire isolater og T13 med fem isolater.

De resterende pulsfelttypene varte bare i en kortere periode, eller de ble påvist kun som enkelt tilfeller. I figur 5.7 vises et histogram med fordelingen og antallet av hver av de 15 pulsfelttypene som ble påvist i perioden fra juli 2000 til juli 2005 i Telemark fylke.



Figur 5.7: Fordeling av 15 pulsfelttyper i Telemark fylke i perioden juli 2000 til juli 2005.

### Internasjonale kloner i det totale materialet

I det totale materialet påvises det åtte pulsfelttyper med likhet til åtte internasjonale epidemiske kloner. De internasjonale klonene er satt opp med internasjonale betegnelse, *SCCmec* type, MLST type og opprinnelse. Pulsfelttype T1 er identisk med den europeiske klonen DK E97-1 med opprinnelse i Libanon. Stammen DK E97-1 ble ikke pulsfelttypet i denne studien, men båndmønsteret til denne stammen er kjent (Smittskyddsinstituttet, Stockholm, Sverige). Videre viser pulsfelttype T5 tre bånders forskjell fra klonen BK 2464, som først ble detektert i New York og i Japan. Pulsfelttype T8 har to bånders forskjell fra E-MRSA 16 som har sin opprinnelse i England. Når det gjelder den brasilianske stammen HSJ

216 så har den ett bånd forskjell fra T11. HUSA 304 fra Ungarn har fire bånd forskjell fra T12. HDE 288 som er en pediatrik klon fra Portugal, har fire bånd forskjell fra T14. E-MRSA 15 som har sin opprinnelse i England er identisk med T15. HPV 107 også kalt for den iberianske eller arkaiske klonen som er fra Spania, har to bånd forskjell fra pulsfelttype T17. Disse åtte pulsfelttypene er satt opp i tabell 5.3 sammen med de åtte internasjonale klonene, og eventuell båndforskjell mellom dem er angitt i tabellen.

**Tabell 5.3** Oversikt over påviste pulsfelttyper som har likhet med internasjonale epidemiske kloner. De internasjonale klonene er oppgitt med internasjonal betegnelse, opprinnelse, *SCCmec*- og MLST type.

<b>Pulsfelttype med likhet til internasjonal klon</b>	<b>Båndforskjell mellom pulsfelttype og internasjonal klon</b>	<b>Betegnelse til internasjonal klon</b>	<b>Opprinnelse til internasjonal klon</b>	<b><i>SCCmec</i> type til internasjonal klon</b>	<b>MLST type til internasjonal klon</b>
T1	0	*DK E97-1 Common European Clon	Libanon	IV	80
T5	3	BK 2464	New York/Tokyo	II	5
T8	2	E-MRSA 16	England	II	36
T11	1	HSJ 216	Brasil	III	239
T12	4	HUSA 304	Ungarn	III	239
T14	4	HDE 288	Portugal	IV	5
T 15	0	E-MRSA 15	England	I	22
T17	2	HPV 107	Spania	I	247

\* Smittskyddsinstitutet, Stockholm, Sverige

### **Internasjonale kloner i Telemark fylke**

Når det gjaldt forekomst av pulsfelttyper i Telemark som hadde likhet med internasjonale epidemiske kloner, så var det seks stykker. Det var bare T1, som var identisk med DK E97-1, som kunne påvises gjennom hele perioden. T5 som hadde tre bånd forskjell fra BK 2464 ble påvist i perioden fra 2001 og ut 2004. Av pulsfelttyper med likhet til de internasjonale klonene E-MRSA 16, HSJ 216, HDE 288 og HPV 107 var det et eller to isolater av hver som

kunne påvises i en kortere periode. Til de epidemiske internasjonale klonene HUSA 304 og E-MRSA 15 ble det ikke påvist identiske eller lignende pulsfelttyper i materialet fra Telemark. I tabell 5.4 er disse pulsfelttypene satt opp med forekomst i de forskjellige årene.

**Tabell 5.4: Årsoversikt over påviste pulsfelttyper som har likhet med internasjonale kloner i materialet fra Telemark fylke i perioden juli 2000-juli 2005.**

<b>Pulsfelttype med likhet til internasjonal klon</b>	<b>Antall isolater</b>	<b>Påvist i år</b>	<b>Betegnelse på internasjonal klon</b>	<b>Opprinnelse til internasjonal klon</b>
T1	1	2000	DK E97-1	Libanon
	10	2001	Common	
	8	2002	European Clon	
	5	2003		
	8	2004		
	1	2005		
T5	1	2001	BK 2464	New York/Tokyo
	2	2002		
	2	2003		
	1	2004		
T8	1	2001	E-MRSA 16	England
	2	2004		
T11	1	2004	HSJ 216	Brasil
T14	2	2005	HDE 288	Portugal
T17	1	2000	HPV 107	Spania

---

### **C-MRSA isolater i det totale materialet**

For å beregne andelen av isolater fra pasienter innlagt på sykehjem eller sykehus ble opplysningene på remissene benyttet. Disse opplysningene var mangelfulle, så det er knyttet stor usikkerhet til beregningene. Det var oppgitt at 74 prøver var fra inneliggende pasienter. Det ble en prosentvis andel på 32 %, og ut fra dette ble 68 % av MRSA isolatene fra pasienter utenfor sykehus.

### **C-MRSA isolater i Telemark fylke**

Antall isolater som var fra pasienter innlagt på sykehus eller sykehjem i Telemark var oppgitt til å være 18 personer. Det ga en andel på 22 %. Til dette tallet var det også knyttet stor usikkerhet, da det var mangelfulle opplysninger på vedlagte remisser. Det vil si at andelen av MRSA stammer utenfor sykehus ble beregnet til 78 %, dette er en noe høyere andel enn for det totale materialet.

## **5.1.3 Typingskrav ved pulsfelttyping**

Maslow hevdet i 1993 at det må settes opp kriterier eller krav til enhver typingsmetode, og disse må evalueres (Maslow et al. 1993). Det er i denne studien beregnet eller evaluert fem typingskrav eller kriterier. Disse er typeevne, reproduserbarhet, diskriminerende styrke, stabilitet og egnethet.

### **Typeevne**

Når det gjelder typeevnen for pulsfelttyping så er den beregnet ut fra at det totalt ble identifisert restriksjonsmønstre til 241 av 258 isolater. Det vil si at 17 av 258 isolater ikke lot seg pulsfelttype ved gjentatte forsøk. Typeevnen i denne studien ble på 93 % for pulsfelttyping etter ny protokoll.

### **Reproduserbarhet**

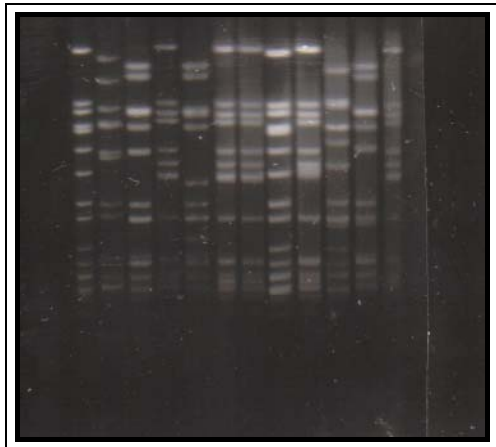
Både teknisk og biologisk reproduserbarhet ble testet ved å pulsfelttype standard *S. aureus* NCTC 8325 ved 12 ulike oppsett. Disse oppsettene var fordelt over flere måneder. Resultatet



med ulikt båndmønster hvor det var trebånds forskjell eller mer mellom de ulike klonene. Dette resultatet kan indikere at den diskriminerende styrken til den nye protokollen er høy.

### Stabilitet

Når det gjelder stabilitet var det satt et krav i denne studien at både pluggene og DNA skulle være intakt etter oppbevaring ved 4° C i 0,5X TE buffer med pH 8,0 i minst tre måneder. Det viste seg at pluggene var like hele og intakte etter tre måneder. Bilde 5.6 viser et gelbilde fra retesting etter tre måneder av pluggene med DNA materialet. Prøvene på denne gelen har skarpe og distinkte bånd, og båndmønstrene til de forskjellige isolatene ble identiske med de tidligere påviste. *In vitro* stabilitet vurderes dermed til å være tilfredstillende både når det gjelder pluggene og DNA materialet. Et annet aspekt ved stabilitet var om DNA i bakteriecellene forandret seg ved oppbevaring ved -80 °C. Flere stammer ble satt opp til retypering, og det viste seg også at *in vivo* stabilitet var tilfredstillende.



**Bilde 5.6: Retesting av 3 mnd gamle agarose-pluggene som var oppbevart ved 4°C i 0,5X TE buffer med pH 8,2.**

### Egnethet

Det er ønskelig at en typingsmetode skal være rask, enkel å utføre og rimelig i bruk. Pulsfelttypering er ikke en rask metode selv om analysetiden er blitt redusert med en dag i denne studien. I følge ny protokoll brukes det fire arbeidsdager fra utsåing av bakterier til ferdig resultat foreligger. Når det gjelder spørsmålet om egnethet så er den vurdert til å være det, forutsatt at laboratorier er utstyrt og at personell er opplært for dette formålet. Det er ikke



---

utført eksakte beregninger på utgifter i forbindelse med denne protokollen, men et overslag på utgifter til reagenser og utstyr tilsier at dette er en forholdsvis kostbar metode.

## 5.2 *Spatyping*

*Spatyping* ble også benyttet som typingsmetode på et utvalg av MRSA isolatene for å undersøke om det ble noen forskjell i resultatene fra pulsfelttyping og fra *spatyping*. I alt ble 33 MRSA isolater og fem spa-kontroller *spatypet*.

### 5.2.1 Tilpassing av metode for *spatyping*

#### Ekstrahering av DNA

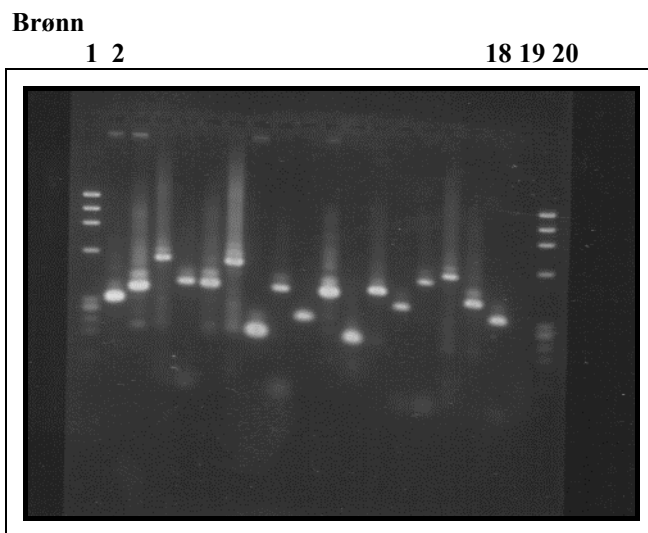
Ved *spatyping* ble DNA-materialet først ekstrahert ut av bakteriecellene. Til lysering av celleveggen hos *S. aureus*, som var det første trinnet i ekstraheringsprotokollen, ble det benyttet to forskjellige enzymer. Det er blitt hevdet at celleveggen i stafylokokker er resistente mot lysozym men ikke mot lysostaphin (Kloos et al. 1975). Det ble dermed først forsøkt å lysere celleveggen med bruk av bare lysostaphin, men dette ga ikke optimale resultater. Deretter ble lysozym i kombinasjon med lysostaphin utprøvd. Denne kombinasjonen ga bedre resultater. Til den videre ekstraheringen ble det benyttet et kommersielt kit. Etter ekstrahering ble hver løsning målt fotometrisk for å få et estimat på konsentrasjonen av DNA og for å få et estimat på renheten av løsningene. De prøvene som inneholdt proteiner, karbohydrater og annet organisk materiale ble forkastet, og prosedyren for ekstrahering ble gjentatt til det ble optimale DNA løsninger. Rene DNA løsninger var en forutsetning for videre amplifisering og sekvensering av X-regionen i *spagenet*. Verdiene fra absorbansmålingene er satt opp i en tabell i vedlegg 1.

#### PCR amplifisering

Til PCR amplifisering av X-regionen i *spagenet* ble tre forskjellige volumer av den ekstraherte DNA løsningen prøvd ut som templat i reaksjonsblandingen. Dette for å undersøke hvilket volum som ville være best egnet til amplifisering. Volumene som ble testet ut var 20 µl, 10 µl og 2 µl. PCR produktene ble vurdert visuelt ved hjelp av gelelektroforese i

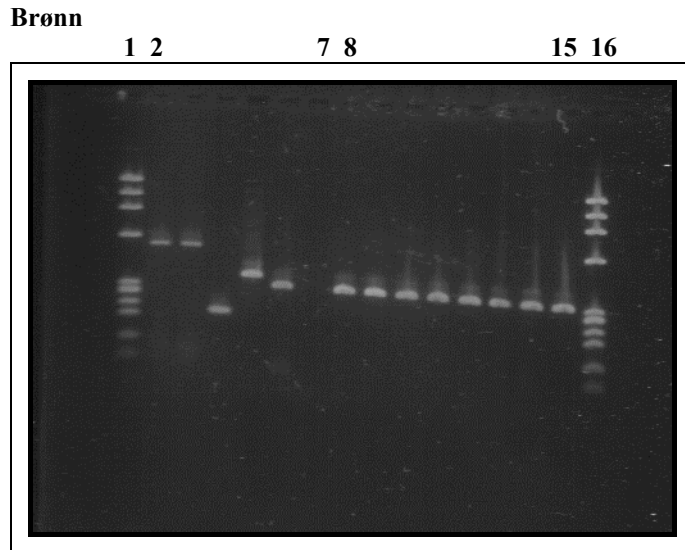
forhold til forekomst av uspesifikke bånd. Det optimale var at det skulle være ett skarpt bånd for hver prøve med MRSA som var applisert på gelen. Markøren som var BenchTop  $\phi$ X174 DNA/HaeIII skulle bestå av 10 bånd i størrelsesordenen fra 72 bp til 1363 bp. I negativ kontroll skulle det ikke være noe bånd på gelen, da det ikke var templat i denne prøven.

Resultatet fra gelelektroforesen med testkjøring med 20  $\mu$ l templat viste for mange uspesifikke bånd i de ulike prøvene på gelen. Det ble forkastet å benytte 20  $\mu$ l DNA-løsning til templat. Resultatet fra PCR amplifisering med 10  $\mu$ l templat vises i bilde 5.7. Ved denne PCR kjøringen ble det færre uspesifikke bånd sammenlignet med PCR kjøringer med 20  $\mu$ l templat, men det var også her for mange uspesifikke bånd til at prøvene kunne sekvenseres. Resultatet fra denne kjøringen ble også forkastet.



**Bilde 5.7:** PCR produkter med 10  $\mu$ l templat er applisert i brønn 2 til 18. Markør BenchTop  $\phi$ X174 DNA/HaeIII er applisert i brønn 1 og 20. I brønn 19 er negativ kontroll applisert.

I gelbildet i bilde 5.8 sees PCR produkter med 2  $\mu$ l templat i reaksjonsblandingen. På denne gelen er det færre uspesifikke bånd. Dette resulterte i at 2  $\mu$ l templat ble benyttet til de videre kjøringene. I brønn 7 er en negativ kontroll applisert.



**Bilde 5.8:** PCR produkter med 2  $\mu$ l templat er applisert i brønn 2 til 15. Markør BenchTop  $\phi$ X174 DNA/HaeIII er applisert i brønn 1 og 16. I brønn 7 er en negativ kontroll applisert.

### PCR sekvensering av *spagenet*

Det ble testet ut to forskjellige PCR sekvenseringsprotokoller. Den ene protokollen var den som vanligvis benyttes ved as Telelab ved sekvensering av *r16* genet. Den andre var en protokoll fra Ridom bioinformatics: "DNA Sequencing of the *spa*Gene", Document version 1.1, June 2004. Den sist nevnte amplifiseringsprotokollen ga best resultat i kombinasjon med 2  $\mu$ l templat volum med en konsentrasjon på 1/5 av PCR produktet fra amplifiseringen som er beskrevet i punkt 5.2.1. Dette gjaldt både når forward- eller reverse primer ble benyttet i reaksjonsblandingen. Disse vurderingene ble gjort etter dataanalyse av sekvensene i programmet Ridom StaphType sekvenserings analyseprogram.

### Data analyse

Etter separering av sekvensene ved hjelp av kapillærelektroforese, ble de analysert i dataprogrammet Ridom StaphType sekvenserings analyseprogram. I bilde 5.12 sees et skjermbilde fra Ridom StaphType programmet hvor deler av kromatogrammene til to komplementære sekvenser i X-regionen i et *spagen* vises.



Bilde 5.12: Et skjermbilde fra Ridom StaphType software med deler av kromatogrammene til to komplementære sekvenser i X-regionen et *spagen*.

Dataprogrammet identifiserte kjente og ukjente sekvenser, og de kjente repeterende enhetene ble merket med grønt som fargekode. Sekvenser som var mer eller mindre ukjente i forhold kjente sekvenser som var lagret i programmets database, ble merket med andre farger. Der hvor det var delvis overlapping av nukleotidene i sekvensene, kunne en analysere sekvensene manuelt og eventuelt angi rett base i forhold til kromatogrammene. Usikre baser ble angitt med IUPACs (International Union of Pure and Applied Chemistry) betegnelse for hvilken som helst nukleotid, bokstaven N. Ridom StaphType programmet ga *spatypen* ut ifra antallet og rekkefølgen av de repeterende enhetene, og *spatypen* ble benevnt med bokstaven t pluss et tresifret tall som for eksempel t044. Antallet av de ulike repeterende enhetene varierte mellom to og 15 enheter. Det var bare i enkelte prøver at en eller flere repeterende enheter ble repeterte. I *spatype* t044 hvor rekkefølgen av de repeterende enhetene var r07r23r12r34r34r33r34, ble enheten r34 repetert tre ganger.

### 5.2.2 *Spatyper*

Av de 20 pulsfelttypene som var klassifisert fra T1 til T20 var det fire prøver som var vanskelig å *spatype*. Ved behandling av sekvensene i dataprogrammet Ridom StaphType, så det ut til at sekvensene var for korte eller for lange i forhold til de sekvensene som var i databasen fra før. De fire prøvene dette gjaldt var pulsfelttypene T2, T13, T14 og T15. Disse fikk betegnelser som txAI, txAJ, txA og txAM. I fem av prøvene var det ikke mulig å påvise noen repeterende enheter på grunn av at toppene i kromatogrammene var svært lave. Disse ni prøvene ble forsøkt typet ved flere analyseoppsett. Dataprogrammet Ridom StaphType oppga også sannsynlige MLST typer for enkelte *spatyper*. Resultatet fra *spatyping* av pulsfelttypene T1-T20 er satt opp i tabell 5.6.

**Tabell 5.6: Resultatet fra *spatyping* av pulsfelttypene T1-T20. De er angitt med *spatype*, antall og rekkefølge av de repeterende enhetene i X-regionen i *spagenet*. Sannsynlig/e MLST type/r er angitt.**

Pulsfelttype	<i>Spatype</i>	Antall og rekkefølge av repeterende enheter i X-regionen i <i>spagenet</i>	Sannsynlig/e MLST type/r
T1	t044	7 repeterende enheter: r07r23r12r34r34r33r34	80
T2	txA1	4 repeterende enheter: r16r02r25r17	-
T3	t362	2 repeterende enheter: r09r34	-
T4	t168	10 repeterende enheter: r07r12r21r17r13r13r34r34r33r34	88
T5	t002	10 repeterende enheter: r26r23r17r34r17r20r17r12r7r16	5, 231
T6	t355	10 repeterende enheter: r07r56r12r17r16r16r33r31r57r12	-
T7	t067	9 repeterende enheter: r26r13r17r34r17r20r17r12r17	-
T8	t012	10 repeterende enheter: r15r12r16r02r16r02r25r17r24r24	30
T9	t991	3 repeterende enheter: r07r33r23	-
T10	t015	10 repeterende enheter: r08r16r02r16r34r13r17r34r16r34	45

T11	t008	10 repeterende enheter: r11r19r12r21r17r34r24r34r22r25	8,247, 250,254
T12	t037	7 repeterende enheter: r15r12r16r02r25r17r24	36,239, 240,241
T13 1 sekv.	txAM	9 repeterende enheter: r11r19r12r21r17r34r24r34r22	-
T14	txAJ	7 repeterende enheter: r26r23r17r34r17r12r17	-
T15	txAE	6 repeterende enheter: r23r31r29r17r25rxAD	-
T16	-	-	-
T17	t104	5 repeterende enheter: r11r10r34r22r25	-
T18	-	-	-
T19	-	-	-
T20		-	-

Det ble også *spatypet* et utvalg på 13 stammer fra pulsfelltype T1. Av disse 13 tilhørte 11 isolater pulsfelltype T1 fra forskjellige år fra 2001 og ut 2004, videre tilhørte et isolat pulsfeltgruppe T1-A og et isolat tilhørte pulsfeltgruppe T1-B. Resultatet viste at de ble typet til samme *spatype* t044 med syv repeterende enheter med unntak av to isolater, som ikke lot seg *spatype*. Dette resultatet viste at *spatyping* ikke differensierte mellom T1, T1-A og T1-B.

Resultatet fra *spatyping* av de fem spa-kontrollene er satt opp i tabell 5.5. De er satt opp med *spatype* og rekkefølge og antall på de repeterende enhetene i X-regionen. Dette resultatet stemte overens med det som ble oppgitt av leverandør Dr. Wilhelm Schwabe GmbH & Co, Tyskland. Dataprogrammet Ridom StaphType oppga også sannsynlig/e MLST type/r for disse kontrollene.

**Tabell 5.5: Resultatet fra *spatyping* av fem ulike spa-kontroller. De er angitt med *spatype*, antall og rekkefølge av de repeterende enhetene i X-regionen i *spagenet*. Sannsynlig/e MLST type/r er angitt.**

Spa-kontroll	<i>Spatype</i>	Antall og rekkefølge av repeterende enheter i X-regionen i <i>spagenet</i>	Sannsynlig/e MLST type/r
Spa - 1	t044	5 repeterende enheter: r07r23r12r34r34r33r34	80
Spa - 2	t004	9 repeterende enheter: r09r02r16r13r13r17r34r16r34	45
Spa - 3	t032	15 repeterende enheter: r23r23r13r23r31r29r17r31r29r17r25r17r25r16r18	22
Spa - 4	t001	10 repeterende enheter: r26r30r17r34r17r20r17r12r17r16	5, 222, 228
Spa - 5	t002	10 repeterende enheter: r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16	5, 231

### Sammenligning av PCR produkt og antall enheter i *spagenet*

Hvis en sammenligner størrelsen på PCR produktet etter amplifisering av X-regionen og hvor mange repeterende enheter som er påvist i *spagenet*, så skal dette stemme overens. Av prøvene og kontrollene var det PCR fragmentet til kontroll spa-3 som vandret kortest distanse ved gelelektroforesen. Det ble påvist at denne kontrollen hadde flest antall repeterende enheter. Resultatet fra gelelektroforesen og *spatyping*en var dermed samsvarende. Dette forholdet stemte også overens for andre prøver. Prøver som hadde høyest mobilitet på gelen, bestod av færrest repeterende enheter. Når det gjaldt pulsfelttypene T4, T5, T6, T8, T10 og T11 så hadde de like store PCR-produkter, men de ble ikke typet til identiske *spatyper*. Årsaken til dette var at både de repeterende enhetene og rekkefølgen av disse var ulike i de forskjellige prøvene.

### 5.2.3 Typingskrav ved *spatyping*

Når det gjelder *spatyping* og Maslows krav til en typingsmetode (Maslow et al. 1993), ble det først sett på typeevnen for metoden som var brukt i denne studien.

---

## Typeevne

Det ble til sammen satt opp 38 prøver til *spatyping*. Dette materialet bestod av 33 MRSA isolater og fem spa-kontroll. 28 av disse prøvene lot seg type, og det ga en typeevne på 74 %.

## Reproduserbarhet

For å teste på reproduserbarhet ble de fem ulike spa-kontrollene satt opp til *spatyping* i ulike kjøringene over tid. Ved de forskjellige kjøringene stemte resultatene overens, og de var identiske med de resultatene som var oppnådd på et annet laboratorium i følge opplysninger fra leverandøren av spa-kontrollene. Dette viser at både intra- og interlaboratorisk reproduserbarhet ble tilfredsstillende i denne studien.

## Diskriminerende styrke

Når det gjelder den diskriminerende styrke til *spatyping* så ble den evaluert ut fra typing av ett isolat fra pulsfelttypene T1-T20, samt et utvalg av forskjellige isolater tilhørende pulsfelttype T1 med undergruppene T1-A og T1-B. *Spatyping* diskriminerte likt med pulsfelttyping når det gjaldt pulsfelttypene T1-T20, men den skilte ikke mellom T1, T1-A og T1-B. Disse ble alle typet til lik *spatype*. Dette kan indikere at *spatyping* har lavere diskriminerende styrke sammenlignet med pulsfelttyping.

## Stabilitet

For å evaluere stabilitet ble det undersøkt på om ferdig preparerte prøver til kapillær-elektroforese var holdbare ved -20 ° C i flere uker. Det ble også testet på om DNA materialet i *spagenet* forandret seg ved at bakteriene ble oppbevart ved -80 ° over lengre tid. Det viste seg at de preparerte prøvene var stabile, likeledes at DNA materialet i de isolatene som ble undersøkt var stabilt når det gjaldt *spagenet*.

## Egnethet

Når det gjaldt egnethet, ble det kriteriet evaluert i forhold til om *spatyping* var en rask metode, om den var enkel å utføre og hvilke kostnader som var knyttet til denne metoden. *Spatyping* i denne studien tok fire arbeidsdager fra utsåing av bakterier til ferdig resultat, så



---

det var en relativt tidkrevende typingsmetode. Metoden bestod av mange manuelle tidkrevende trinn, og i tillegg måtte de forskjellige analysetrinnene utføres ved forskjellige laboratorier på grunn av at ikke alt laboratorieutstyr var tilgjengelig ved samme institusjon. Dette virker negativt inn på typingskravet om egnethet. Det er ikke utført eksakte beregninger på utgifter i forbindelse med denne metoden, men et overslag på utgifter til reagenser og utstyr tilsier at dette er en forholdsvis kostbar metode.

## **6.0 DISKUSJON**

### **6.1 Pulsfelotyping**

#### **6.1.1 Optimalisering av pulsfelotyping**

I forbindelse med infeksjonskontroll og epidemiologisk overvåking av MRSA er det viktig med rask og nøyaktig differensiering av isolatene. Av de forskjellige såkalte fingerprintingsmetodene er PFGE den mest brukte. Den har blitt anvendt for et bredt spekter av bakteriearter (Silbert et al. 2003). Metoden har også av mange blitt betraktet som en gylden standardmetode som andre teknikker burde sammenligne seg med (Tenover et al. 1994). En innvending mot metoden er at den er tidkrevende, og dette er også erfart i denne studien selv om analysetiden er redusert med en arbeidsdag. Redusert analysetid gir fordeler i forhold til smittesporing og overvåking av MRSA, slik at en raskere kan sette i gang tiltak for å bekjempe MRSA og spredning av den.

I forbindelse med optimalisering av protokollen for pulsfelotyping var det også et mål å få fjernet bruken av det helseskadelige kjemikaliet PMSF, som tidligere var benyttet ved as

---

Telelab. Det viste seg at PMSF kunne bli erstattet av rent vann, uten at kvaliteten på resultatene ble lavere. Det å redusere bruken av helseskadelige kjemikalier er i tråd med en overordnet målsetning i Norge om å få ekskludert bruken av helse- og miljøskadelige kjemikalier og erstatte dem med mer miljøvennlige produkter. Dette er i henhold til Systematisk Helse- Miljø- og Sikkerhetsarbeid (<http://www.arbeidstilsynet.no>).

### 6.1.2 Epidemiologiske forhold

Ved pulsfelttypering skulle båndmønstrene til de forskjellige isolatene danne grunnlaget for den videre inndeling i pulsfelttyper og pulsfeltgrupper. Isolater som har likt antall fragmenter og hvor de korresponderende fragmentene er av samme størrelse, blir definert som genetisk uskillbare i følge Tenover (Tenover et al 1995). Dette kriteriet ble også benyttet i denne studien.

I følge Tenover og kolleger vil de isolater som har en båndforskjell på ett til tre bånd fra utbruddsstammen være når beslektede og tilhøre samme pulsfelttype. En trebåndsforskjell vil kunne oppstå for eksempel ved en spontan mutasjon som danner et nytt kromosomalt restriksjonssete. Det opprinnelige fragmentet forsvinner og i tillegg dannes to nye mindre fragmenter (Tenover et al. 1995). Tenovers kriterier for å definere nært slektskap mellom isolater, ble benyttet i denne studien, slik at isolater med en båndforskjell på opptil tre bånd tilhører samme pulsfelttype, men de er fordelt i undertyper kalt grupper.

I denne studien ble isolater som hadde en båndforskjell på mer en tre bånd, definert som ubeslektede og ble fordelt i ulike pulsfelttyper. Tenover og kolleger mente at isolater var ubeslektede hvis det var en båndforskjell på syv bånd. Disse kriteriene er strenge, og de passer best ved mindre populasjoner og til studier som undersøker stammer fra en periode på mindre enn et år (Tenover et al. 1995). Hvis dette kriteriet om syv bånders forskjell skulle vært benyttet i denne studien som gikk over flere år, ville det antagelig ha blitt vanskelig å inndele i pulsfelttyper i denne studien.

Det er flere aspekter ved resultatene fra den epidemiologiske undersøkelsen i denne studien som er interessante. Det ene gjelder forekomst av antall ulike pulsfelttyper. I studien fra 94-98

---

viste det seg at de 87 isolatene, som var med i undersøkelsen, fordelte seg på 50 pulsfelttyper. I denne studien fra perioden juli 00- juli 05 fordelte 234 isolater seg på 25 pulsfelttyper. Kriteriene for inndeling var den samme i begge studiene. Det har dermed blitt påvist færre pulsfelttyper i denne studien, selv om antall MRSA isolater var omtrent tre ganger så høyt sammenlignet med antallet i studien fra 94-98. Ut fra dette resultatet kan det se ut til at norske MRSA isolatene i er blitt mer homogene i de siste årene sammenlignet med situasjonen på 90-tallet. En innvending mot dette utsagnet er at materialet i denne studien er skjevfordelt da ikke alle pasienter med MRSA fra denne perioden er representerte i materialet. Det kan i denne forbindelsen være nærliggende å tro at isolater i utbruddssammenheng har vært av mer interesse å få undersøkt, og er dermed videresendt til as Telelab for å bli analysert. Hvis denne antagelsen er riktig, vil det påvirke at populasjonen i denne studien er blitt mer homogen enn om materialet hadde vært komplett. Dette resulterer i at antall påviste pulsfelttyper i dette materialet antagelig er falsk for lavt.

Hvis en ser på materialet fra Telemark fylke som var komplett, er tendensen også her at det er mindre diversitet mellom de forskjellige MRSA isolatene, sammenlignet med studien fra 94-98 (Tveten et al. 2003). Dette kan også indikere at det har blitt større homogenitet blant norske stammer etter år 2000.

Innen de 25 forskjellige pulsfelttypene som dette materialet ble inndelt i, var det også forskjell på hvor stor homogenitet det var mellom de tilhørende isolatene. Når det gjaldt pulsfelttype T1, var det svært liten variasjon mellom de ulike isolatene. Derimot var det stor variasjon i båndmønstrene til isolatene som tilhørte pulsfelttype T5. Dette kan muligens tyde på at dette var en pulsfelttype hvor bakteriegenomet lettere og raskere har forandret seg sammenlignet med T1. En annen mulig forklaring er at disse T5 stammene etablerte seg for lenge siden og har forandret seg mye i perioden juli 2000-juli 2005 på grunn av flere genetiske hendelser som delesjoner, innskudd eller punktmutasjoner. En annen mulig forklaring er at T5 også kan ha utviklet seg ved spredning over et større geografisk område.

Selv om materialet er fordelt på ulike pulsfelttyper etter kriteriet om at det skulle være en båndforskjell på tre, så ligner enkelte pulsfelttyper mer på hverandre enn andre. Dette gjelder for eksempel pulsfelttypene T5 og T14. En forklaring på dette fenomenet kan være at det er to

---

ulike MRSA stammer hvor den ene har endret seg forholdsvis mye slik at den etter hvert har blitt blir mer lik den andre. En annen forklaring er at disse to egentlig tilhører en større klonal gruppe. Det er hevdet at pulsfelttyping som metode i epidemiologisk sammenheng differensierer for mye hvis stammene har spredd seg fra person til person over lengre tid (Tang et al. 2000). Det er hevdet av blant annet Tenover at pulsfelttyping har så høy diskriminerende styrke at den skille stammer som egentlig hører inn under en klonal linje ved et utbrudd som strekker seg over lang tid (Tenover et al. 1995). Årsaken til dette er at når en stamme sprer seg fra person til person, vil det underveis kunne oppstå endringer i stammens genetiske oppbygging, noe som igjen kan gi endringer i båndmønstrene. Dersom stammen sprer seg enda videre, vil stammens opprinnelige båndmønster kunne endre seg betydelig og pulsfelttyping som metode differensier for mye (Tang et al. 2000). Derimot når det gjelder epidemiologiske undersøkelser innenfor en begrenset tidsperiode, vil det være lite sannsynlig at bakterier som spres fra samme kilde har ulike båndmønstre da MRSA produserer stammer som er relativt stabile i flere måneder (Blanc et al 2001). Tidsaspektet er dermed viktig ved pulsfelttyping i epidemiologiske undersøkelser. Det har blitt hevdet at PFGE er en godt egnet typingsteknikk når det gjelder nylige utbrudd, men at den ikke er så godt egnet for studier av slektsskapsforhold mellom bakterier over lengre tidsperioder og over større geografiske områder (Enright et al. 2002).

Et annet fenomen angående T5 og T14 var at T5 hadde en båndforskjell på tre fra den internasjonale epidemiologiske stammen BK2464, og at T14 hadde en båndforskjell på fire fra den internasjonale stammen HDE288. Dette resultatet underbygger at T5 og T14 har store likheter angående båndmønster idet BK2464 har stor likhet til HDE288 med en båndforskjell på tre.

Når det gjelder de ulike pulsfelttypene så er de også ulike i forhold til i hvor lang periode de er blitt påviste. Det er flere stammer som bare har vart i en kortere periode, noe som kan tyde på at stammene har liten spredningsevne, eller at de tiltak som har blitt benyttet for å forhindre stammen i å spre seg, har vært vellykkede. De stammene som har vart i lengre perioder kan ha etablert seg hos friske bærere, men har sporadisk forårsaket infeksjon hos for eksempel personer med nedsatt immunforsvar. Enkelte MRSA stammer er også flinkere til å etablere seg og overleve i enkelte miljøer.

---

Når det gjelder de åtte internasjonale epidemiske stammer, så ble det påvist åtte pulsfelttyper med likhet til disse i denne studien. I studien fra 94-98 ble det også påvist pulsfelttyper med likhet til de samme internasjonale epidemiske klonene. En forandring etter år 2000 var at den pulsfelttypen som var identisk med den europeiske klonen DK E97-1 dominerte både i det totale materialet og i materialet fra Telemark fylke. Årsaken til at denne stammen dominerte kan ha sammenheng med at det var C-MRSA stamme. Det er oppstått den situasjonen at C-MRSA stammer etablerer seg lettere i miljøet nå, sammenlignet med situasjonen på 90-tallet. 17 av pulsfelttypene har ingen likhet med noen av de åtte epidemiske internasjonale klonene. Dette forholdet kan muligens forklares ut fra at det er et fenomen i Norden at det dukker opp MRSA kloner som er genetisk ulike og forskjellige fra andre regioner, og som antagelig inneholder *SCCmec* gener fra meticillin resistente koagulase negative stafylokokker (Hanssen et al. 2004).

Tidligere var MRSA et problem knyttet til sykehus og sykehjem, men etter hvert dukket det opp MRSA utenfor sykehus også. Ut fra resultatene i denne studien kan det se ut til at andelen av C-MRSA har økt etter år 2000 i Norge. C-MRSA isolatene utgjorde 50 % av materialet i studien fra 94-98 mot 69 % i denne studien. Dette tallet på 69 % kan være falskt for høyt eller lavt da materialet ikke var komplett, og opplysningene på remissene var mangelfulle. Tall fra MSIS viser også den tendensen at C-MRSA øker i Norge. I de siste årene har incidens til infeksjoner knyttet til C-MRSA også økt på verdensbasis (Chambers 2001; Hussain et al. 2001). Denne utviklingen har resultert i at C-MRSA har tilført en ny dimensjon til utviklingen av MRSA (Chambers 2001). En karakteristisk egenskap ved C-MRSA er at de ligner på de tidlige MRSA isolatene med et heterogent uttrykk av meticillin resistens.

## 6.2 Spatyping

Når det gjelder *spatyping* så var det et forholdsvis lite utvalg som ble typet i denne studien, og det resulterer i at det er vanskelig å trekke konklusjoner angående denne typingsmetoden. I dette materialet ble det detektert 15 ulike *spatyper*. I denne forbindelse kan det nevnes at det i databasen til Ridom SpaServer er samlet 2041 forskjellige *spatyper* pr. 17.1.07 (<http://spa.ridom.de/spatypes.shtml>).

---

### 6.3 Typingskrav

I denne oppgaven skulle også resultatene angående ulike typingskrav til typingsmetodene evalueres. Når det gjelder en typeevne på 94 % for pulsfelttyping, ble den lavere i denne studien sammenlignet med andre pulsfeltstudier. I en ekstern kvalitetskontroll hvor PFGE ble benyttet til å type MRSA var typeevnen 100 % (Deplano et al. 2006). I en studie av Rossney og kolleger i 2006 var typeevnen på 99 % (Rossney et al. 2006). Årsaken til at ikke alle isolatene lot seg pulsfelttype i denne studien, kan blant annet være at DNA ikke ble ekstrahert ut fra cellene, selv om det var synlig pellet i prøvene. En annen årsak til at enkelte isolater ikke lot seg pulsfelttype, kan være at DNA i disse prøvene ble degradert under elektroforesekjøringen. Selv om PFGE er kjent for å være svært effektiv i studier av bakterielle isolater, kan degradering av DNA forekomme, slik at typeevnen ikke alltid er 100 %. I forbindelse med enkelte studier hevdes det at tilsetning av thiourea forbedrer typeevnen til 100 % (Corkill et al. 2000). Årsaken til dette er at thiourea hemmer Tris-radikaler som degraderer DNA. I denne studien ble det prøvd med tilsetning av thiourea for å hindre degradering, men det viste seg at det ikke hadde noen positiv innvirkning på resultatet. De studiene som viser til gode resultater ved bruk av thiourea, der er andre bakteriearter enn *S. aureus* pulsfelttypet. I HARMONY protokollen som skulle benyttes i denne studien, er bruk av dette kjemikaliet ikke standardisert, og bruk av dette ville vært et avvik fra denne protokollen.

Typeevnen for *spatyping* ble i denne studien på 74 %. Sammenlignet med resultater fra andre studier, så ligger dette tallet lavere (Hallin et al. 2006). Det kan igjen ha flere forskjellige årsaker som for eksempel at sekvenseringsprotokollen ikke var optimal eller at sekvenseringsapparatet ikke var optimalt innstilt. En annen mulig årsak kan være at de forskjellige analysetrinnene foregikk ved forskjellige laboratorier i Telemark, og at dette hadde en negativ innvirkning på den totale analysegangen og resultatene.

Et annet typingskrav var reproduserbarhet som henviser til den evnen en teknikk har til å oppnå samme resultat ved gjentatte kjøring. Dag til dag variasjon kan ha innvirkning på reproduserbarheten, likeledes stabiliteten til DNA i bakteriene (Maslow et al. 1993). Stabiliteten til *SCCmec* er variabel da den i første rekke er avhengig av *SCCmec* type, antallet av innskutte sekvenser, andre resistens gener, den genetiske bakgrunnen og ytre forhold.

---

Ulike studier viser at PFGE er en typingsteknikk som produserer et restriksjonsmønster med en høy grad av reproduserbarhet (Murchan et al. 2003). Et viktig aspekt ved reproduserbarhet i epidemiologisk sammenheng er også at isolater som pulsfelttypes ved ulike laboratorier, bør kunne sammenlignes for å effektivisere smittesporing over landegrensene og kontinenter. I denne forbindelse er høy reproduserbarhet en forutsetning. Det at flere laboratorier tar i bruk den standardiserte HARMONY protokollen som er gjort i denne studien, er med på å forbedre den interlaboratoriske reproduserbarheten. I denne studien ble både den biologiske og tekniske reproduserbarheten målt til å være god. Dette resultatet kan tyde på at pulsfelttyping etter ny protokoll også resulterer i reproduserbare data, noe som er en forutsetning for å kunne benytte denne protokollen til videre pulsfelttyping.

Reproduserbarhet ved *spatyping* ble vurdert til å være svært bra da det lå på samme nivå som pulsfelttyping som er vurdert til å være gull standard innen molekylærbiologiske typingsmetoder (Silbert et al. 2003).

Diskriminerende styrke refererer til evnen en metode har til å differensiere mellom ubeslektede isolater (Maslow et al. 1993). PFGE er kjent for å være et verdifullt verktøy i forbindelse med utbrudd av *S. aureus* infeksjoner spesielt i sykehusmiljøer på grunn av sin høye diskriminerende styrke. I tidligere arbeider benyttet Chung og kolleger PFGE til å type undergrupper av MRSA som sirkulerte i Europa, Syd Amerika og USA før årtusenskiftet på grunn av dens høye diskriminerende styrke (Chung et al. 2000). I en annen studie ble den diskriminerende styrken satt lavere, der ble den satt til 96 % (Deplano et al. 2006). I denne studien fra juli 00-juli 05 ble den diskriminerende styrke beregnet til å være høy for pulsfelttyping etter ny protokoll. Denne verdien kan være falsk for høy da det er knyttet usikkerhetsmomenter ved analyse av båndmønsteret. Det er ikke alltid at like bånd representerer homologt genetisk materiale. I teorien kan et restriksjonsenzym kutte to ikke homologe genomer på en slik måte, at det blir dannet like fragmenter. Det er også påvist at PFGE har begrenset mulighet for å separere bånd med nær identisk størrelse. Disse faktorene virker negativt inn på den diskriminerende styrken for pulsfelttyping. Det at PFGE er en bildebasert teknikk hvor båndene som oftest settes manuelt, kan resultere i at båndene får en bias, og dette kan ha innvirkning på den diskriminerende styrken.



Når det gjaldt *spatyping* og diskriminerende styrke så var den lavere sammenlignet med pulsfelttyping. Dette var forventet da det er en consensus at PFGE er bedre enn *spatyping* når det gjelder diskriminerende styrke (Heym et al. 2002). Likeledes er det hevdet av Tang at den diskriminerende styrken av et enkelt gen vanligvis er begrenset og av samme årsak bør identiske genotyper bli klassifiserte som uskillbare og ikke som identiske (Tang et al. 2000). Den diskriminerende styrken ble blant annet målt ved å type et utvalg av isolater tilhørende pulsfelttype T1, som bestod av forholdsvis homogene isolater. *Spatyping* differensierte ikke disse isolatene. Det er nødvendigvis ikke negativt at *spatyping* ikke inndeler så mye som PFGE gjør. Når en studerer klonal spredning kan en metode som er for følsom for små forskjeller mellom stammer, være upraktisk fordi likhetene i grove trekk blir skjult av ulikheter i detaljene.

Tidsbruk er en viktig faktor ved vurdering av egnethet, den ble lik for pulsfelttyping og *spatyping*. Det er tidligere hevdet at *spatyping* er raskere, det har antagelig sammenheng med at andre studier har benyttet automatiserte metoder ved denne typingsmetoden (Hallin et al. 2006). Andre faktorer når det gjelder egnethet så er det en fordel at hele protokollen utføres på et laboratorium, noe som ikke var tilfelle med *spatyping* i denne studien.

## 7.0 KONKLUSJON

Valg av genotypingsmetode er avhengig av en rekke forhold, blant annet hvilket utstyr man har tilgjengelig, hvor raskt svar ønskes og behov for sammenligning med tidligere isolater og isolater fra andre institusjoner. Hvilke krav man setter til typeevne, reproduserbarhet, diskriminerende evne, stabilitet og egnethet, er også viktig ved valg av metode. Mange typingsmetoder er tilgjengelige for å differensiere *S. aureus* og ingen metode er overlegen under alle forhold. Det har vært en innvending mot pulsfelttyping at den har vært tidkrevende, men i denne studien er tidsbruken redusert med en dag. I den nye protokollen er i tillegg bruken av det helseskadelige kjemikaliet PMSF ved vasking av pluggene fjernet. Likeledes er pulsfeltgelelektroforesen kjørt etter HARMONY-protokollen. De tre målene angående videreutvikling av protokoll for pulsfelttyping er dermed oppnådd i denne studien.

Ut fra denne studien fra juli 2000-juli 2005 og opplysninger fra MSIS kan det konkluderes med at det er en økning av infeksjoner med MRSA i Norge. Det kan ha sammenheng med at nordmenn reiser mer utenlands og tar med seg MRSA isolater hjem. En annen utvikling er at det antagelig er større homogenitet blant norske MRSA stammer etter år 2000 sammenlignet med situasjonen på 1990-tallet. Det observeres en økende grad av klonalitet samtidig med at

---

norske helseinstitusjoner i økende grad taper kontrollen med MRSA. Tap av diversitet blant MRSA isolater, kan være en markør eller et varselsignal.

Når det gjelder forekomst av internasjonale epidemiske stammer, så påvises det pulsfelttyper med likhet til disse både i denne studien og i studien fra 94-98. En forandring er at en av disse internasjonale epidemiske stammene, som også er en C-MRSA stamme, dominerte i dette materialet.

Likeledes er det oppstått en situasjon med større spredning av MRSA stammer utenfor sykehus, MRSA infeksjoner er ikke lengre rene sykehusinfeksjoner. Økningen i antall C-MRSA isolater er en utfordring for de instanser som overvåker og behandler MRSA infeksjoner.

I et eventuelt fremtidig arbeid ville det vært ønskelig å kunne optimalisere prosedyren for *spatyping* slik at typeevnen ble forbedret. Hvis typeevnen ble forbedret, kan muligens *spatyping* være et alternativ til pulsfelttypering. Denne studien har også vist at deteksjon av den genetiske polymorfismen i X-regionen av *spagenet*, antagelig kunne bli brukt på lik linje med pulsfelttypering for å differensiere ulike pulsfelttypene, men *spatyping* differensierte ikke mellom pulsfeltgrupper som tilhørte pulsfelttype T1. Det hadde vært interessant å *spatyp* ulike isolater for eksempel innen pulsfelttype T5, hvor det var stor variasjon på båndmønstrene til de forskjellige isolatene. Dette for å undersøke om *spatyping* hadde hatt en større diskriminerende styrke ved typing av en annen pulsfelttype.

*Spatyping* har sin store fordel idet resultatene lettere kan overføres via internett sammenlignet med overføring av resultater fra pulsfelttypering. Det er enklere å etablere en database med resultater fra *spatyping*. Dette er viktig for både å oppdage utbrudd og å identifisere vellykkede epidemiologiske kloner med stor spredningsevne så raskt som mulig.

---

## 8.0 REFERANSELISTE:

- Archer, G.L. & Niemeyer, D.M. 1994, Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci, *Trends in microbiology*, vol. 2, no. 10, pp. 343-347.
- Archer, G.L. & Scott, J., 1991. Conjugative transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 35, no 12, pp. 2500-2504.
- Barber, M., Dutton, A.A., Beard, M.A., Elmes, P.C. & Williams, R. 1960, Reversal of antibiotic resistance in hospital staphylococcal infection, *British medical journal*, vol. 1, no. 5165, pp. 11-17.
- Barber, M., Hayhoe, F.G.J. & Whitehead, J.E.M. 1949, Penicillin-resistant staphylococcal infection in a maternity hospital, *Lancet*, vol. 2, no. 25 (Print), pp. 1120-1125.
- Barrett, F.F., McGehee, R.F., Jr & Finland, M. 1968, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations, *The New England journal of medicine*, vol. 279, no. 9, pp. 441-448.
- Birren, B.W., Lai, E., Hood, L. & Simon, M.I. 1989, Pulsed field gel electrophoresis techniques for separating 1- to 50-kilobase DNA fragments, *Analytical Biochemistry*, vol. 177, no. 2, pp. 282-286.
- Blair, E.B. 1961, Laboratory surveillance of hospital staphylococcal problems, *The Medical annals of the District of Columbia*, vol. 30, pp. 713-716.
- Blanc, D.S., Struelens, M.J., Deplano, A., De Ryck, R., Hauser, P.M., Petignat, C. & Francioli, P. 2001, Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*, vol. 39, no. 10, pp. 3442-3445.
- Carle, G.F., Frank, M. & Olson, M.V. 1986, Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field, *Science*, vol. 232, no. 4746, pp. 65-68.
- Chambers, H.F. 2001, The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*, *Emerging infectious diseases*, vol. 7, no. 2, pp. 178-182.
- Chu, G., Vollrath, D. & Davis, R.W. 1986, Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields, *Science*, vol. 234, no. 4783, pp. 1582-1585.
- Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Aires de Sousa, M., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sa-Leao, R., Santos Sanches, I., Song, J.H., Tassios, P.T., Villari, P. & Multilaboratory Project Collaborators 2000, Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains, *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, vol. 6, no. 3, pp. 189-198.
- Cookson, B.D., Aparicio, P., Deplano, A., Struelens, M., Goering, R. & Marples, R. 1996, Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of medical microbiology*, vol. 44, no. 3, pp. 179-184.
- Corkill, J.E., Graham, R., Hart, C.A. and Stubbs, S., 2000. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *Journal of clinical microbiology*, vol 38, no. 7, pp. 2791-2792.
- de Lencastre, H., Dejonge, B.L., Matthews, P.R. and Tomasz, A., 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 33, no. 1, pp. 7-24.

- 
- Deplano, A., De Mendonca, R., De Ryck, R. & Struelens, M.J. 2006, External quality assessment of molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates by a network of laboratories, *Journal of clinical microbiology*, vol. 44, no. 9, pp. 3236-3244.
- Deplano, A., Tassios, P.T., Glupczynski, Y., Godfroid, E. & Struelens, M.J. 2000, In vivo deletion of the methicillin resistance *mec* region from the chromosome of *Staphylococcus aureus* strains, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 46, no. 4, pp. 617-620.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. & Spratt, B.G. 2002, The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 11, pp. 7687-7692.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. & Spratt, B.G. 2000, Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*, vol. 38, no. 3, pp. 1008-1015.
- Frenay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandembroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J. & Mooi, F.R. 1996, Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 15, no. 1, pp. 60-64.
- Hallin, M., Deplano, A., Denis, O., De Mendonca, R., De Ryck, R. & Struelens, M.J. 2006, Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long term, nation-wide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections, *Journal of clinical microbiology*, .
- Hanssen, A.M., Kjeldsen, G. & Sollid, J.U. 2004, Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 1, pp. 285-296.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. & Ito, T. 2001, The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Trends in microbiology*, vol. 9, no. 10, pp. 486-493.
- Hunter, P.R. 1990, Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods, *Journal of clinical microbiology*, vol. 28, no. 9, pp. 1903-1905.
- Hussain, F.M., Boyle-Vavra, S. & Daum, R.S. 2001, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic, *The Pediatric infectious disease journal*, vol. 20, no. 8, pp. 763-767.
- Inglis, B., Matthews, P.R. & Stewart, P.R. 1990, Induced deletions within a cluster of resistance genes in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*, *Journal of general microbiology*, vol. 136, no. 11, pp. 2231-2239.
- Inglis, B., Matthews, P.R. & Stewart, P.R. 1988, The expression in *Staphylococcus aureus* of cloned DNA encoding methicillin resistance, *Journal of general microbiology*, vol. 134, no. 6, pp. 1465-1469.
- Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H. & Hiramatsu, K. 2004, Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 7, pp. 2637-2651.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C. & Hiramatsu, K. 2001, Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, no. 5, pp. 1323-1336.
- Ito, T., Katayama, Y. & Hiramatsu, K. 1999, Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, no. 6 (Print), pp. 1449-1458.
-

- 
- Jevons, M.P., Coe, A.W. & Parker, M.T. 1963, Methicillin resistance in staphylococci, *Lancet*, vol. 1, pp. 904-907.
- Juuti, K., Ibrahim, S., Virolainen-Julkunen, A., Vuopio-Varkila, J. & Kuusela, P. 2005, The *pls* gene found in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains is common in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri*, *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, no. 3, pp. 1415-1419.
- Katayama, Y., Ito, T. & Hiramatsu, K. 2001, Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, no. 7, pp. 1955-1963.
- Katayama, Y., Ito, T. & Hiramatsu, K. 2000, A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 6, pp. 1549-1555.
- Kirby, W.M. 1945, Properties of a penicillin inactivator extracted from penicillin-resistant staphylococci, *The Journal of clinical investigation*, vol. 24, no. 2, pp. 170-174.
- Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. 1975, Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species, *Journal of clinical microbiology*, vol. 1, no. 1 (Print), pp. 82-88.
- Knox, R. 1960, A new penicillin (BRL 1241) active against penicillin-resistant staphylococci, *British medical journal*, vol. 2, no. 5200, pp. 690-693.
- Kobayashi, N., Alam, M.M. and Urasawa, S., 2001. Genomic rearrangement of the *mec* regulator region mediated by insertion of IS431 in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, no.1, pp. 335-338.
- Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S. & Hiramatsu, K. 2002, Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, no. 4, pp. 1147-1152.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. & Spratt, B.G. 1998, Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 6, pp. 3140-3145.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E. & Arbeit, R.D. 1993, Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 17, no. 2, pp. 153-62; quiz 163-4.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. & Falkow, S. 1976, Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *Journal of Bacteriology*, vol. 127, no. 3, pp. 1529-1537.
- Mortimer, E.A., Jr, Wolinsky, E., Gonzaga, A.J. & Rammelkamp, C.H., Jr 1966, Role of airborne transmission in staphylococcal infections, *British medical journal*, vol. 1, no. 5483, pp. 319-322.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 51 Pt 1, pp. 263-273.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G. & Cookson, B. 2003, Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10

- 
- European laboratories and its application for tracing the spread of related strains, *Journal of clinical microbiology*, vol. 41, no. 4, pp. 1574-1585.
- O'Brien, F.G., Coombs, G.W., Pearson, J.C., Christiansen, K.J. & Grubb, W.B. 2005, Type V staphylococcal cassette chromosome mec in community staphylococci from Australia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 12, pp. 5129-5132.
- Oliveira, D.C., Wu, S.W. & de Lencastre, H. 2000, Genetic organization of the downstream region of the mecA element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 7 (Print), pp. 1906-1910.
- Pestel, M. 1960, A new penicillin electively active on staphylococci: BRL-1241 or Celbenine., *La Presse medicale*, vol. 68, pp. 2083-2084.
- Rossney, A.S., Lawrence, M.J., Morgan, P.M., Fitzgibbon, M.M., Shore, A., Coleman, D.C., Keane, C.T. & O'Connell, B. 2006, Epidemiological typing of MRSA isolates from blood cultures taken in Irish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (1999-2003), *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 25, no. 2, pp. 79-89.
- Rowland, S.J. & Dyke, K.G. 1989, Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552, *The EMBO journal*, vol. 8, no. 9, pp. 2761-2773.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467.
- Schneewind, O., Model, P. & Fischetti, V.A. 1992, Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall, *Cell*, vol. 70, no. 2, pp. 267-281.
- Schwartz, D.C. & Cantor, C.R. 1984, Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell*, vol. 37, no. 1, pp. 67-75.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. & Kreiswirth, B.N. 1999, Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains, *Journal of clinical microbiology*, vol. 37, no. 11, pp. 3556-3563.
- Silbert, S., Boyken, L., Hollis, R.J. & Pfaller, M.A. 2003, "Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea", *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 47, no. 4, pp. 619-621.
- Solberg, C.O. 2000, "Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention", *Scandinavian journal of infectious diseases*, vol. 32, no. 6 (Print), pp. 587-595.
- Spratt, B.G. 1999, Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet, *Current opinion in microbiology*, vol. 2, no. 3, pp. 312-316.
- Sugiura, A., Nakashima, K., Tanaka, K. & Mizuno, T. 1992, Clarification of the structural and functional features of the osmoregulated kdp operon of *Escherichia coli*, *Molecular microbiology*, vol. 6, no. 13, pp. 1769-1776.
- Tang, Y.W., Waddington, M.G., Smith, D.H., Manahan, J.M., Kohner, P.C., Highsmith, L.M., Li, H., Cockerill, F.R., 3rd, Thompson, R.L., Montgomery, S.O. & Persing, D.H. 2000, Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*, vol. 38, no. 4, pp. 1347-1351.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *Journal of clinical microbiology*, vol. 33, no. 9, pp. 2233-2239.
-

- 
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B. & Hollis, R. 1994, Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*, vol. 32, no. 2, pp. 407-415.
- Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L., Lyytikäinen, O., Degener, J.E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundman, H. & European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants 2004, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002, *Emerging infectious diseases*, vol. 10, no. 9, pp. 1627-1634.
- Turmel, C. & Noolandi, J. 1993, "Effect of one-dimensional pulsed-field gel electrophoresis on linear and circular DNA", *Electrophoresis*, vol. 14, no. 4 (Print), pp. 304-312.
- Tveten, Y., Jenkins, A., Allum, A.G., Kristiansen, B.E. & The Norwegian MRSA Study Group. 2003, Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Norway, *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 9, no. 8, pp. 886-892.
- Vandenbroucke-Grauls, C.M., Frenay, H.M., van Klingeren, B., Savelkoul, T.F. & Verhoef, J. 1991, Control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Dutch university hospital, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 10, no. 1, pp. 6-11.
- Wada, A., Katayama, Y., Hiramatsu, K. & Yokota, T. 1991, Southern hybridization analysis of the *mecA* deletion from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 176, no. 3, pp. 1319-1325.
- Waxman, D.J. & Strominger, J.L. 1983, Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 52, pp. 825-869.
- Wyke, A.W., Ward, J.B., Hayes, M.V. & Curtis, N.A. 1981, A role in vivo for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus*, *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 119, no. 2, pp. 389-393.
- Zinn CE Zinn CE, Salelinna S, Fusing V, Vuopio-Varkila J, Rosdahl VT, the Nordic MRSA Study Group. 2000, A multicenter study in Denmark, Finland, Sweden and Norway; reproducibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) typing by standardized pulsed-field gel electrophoresis [abstract 50]. In: International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Kolding Denmark 2000.

<http://arbeidstilsynet.no> lesedato 06.06.06

<http://www.fhi.no> lesedato 27.11.06

<http://www.msis.no> lesedato 27.11.06

<http://www.rivm.nl/earss/> lesedato 7.12.06

<http://spa.ridom.de/spatypes.shtml> lesedato 17.01.07

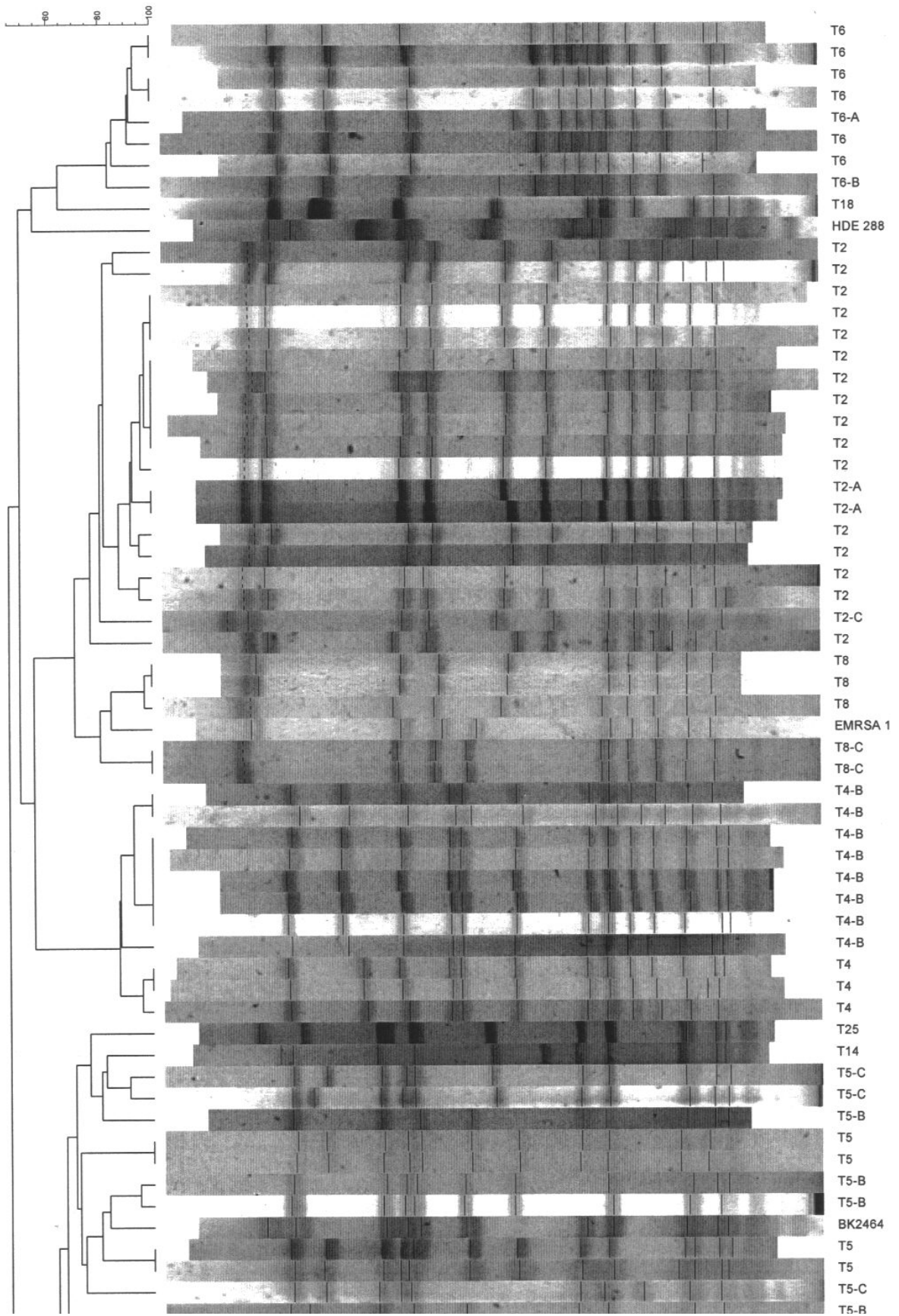
<http://www.spaserver.ridom> lesedato 12.12.06

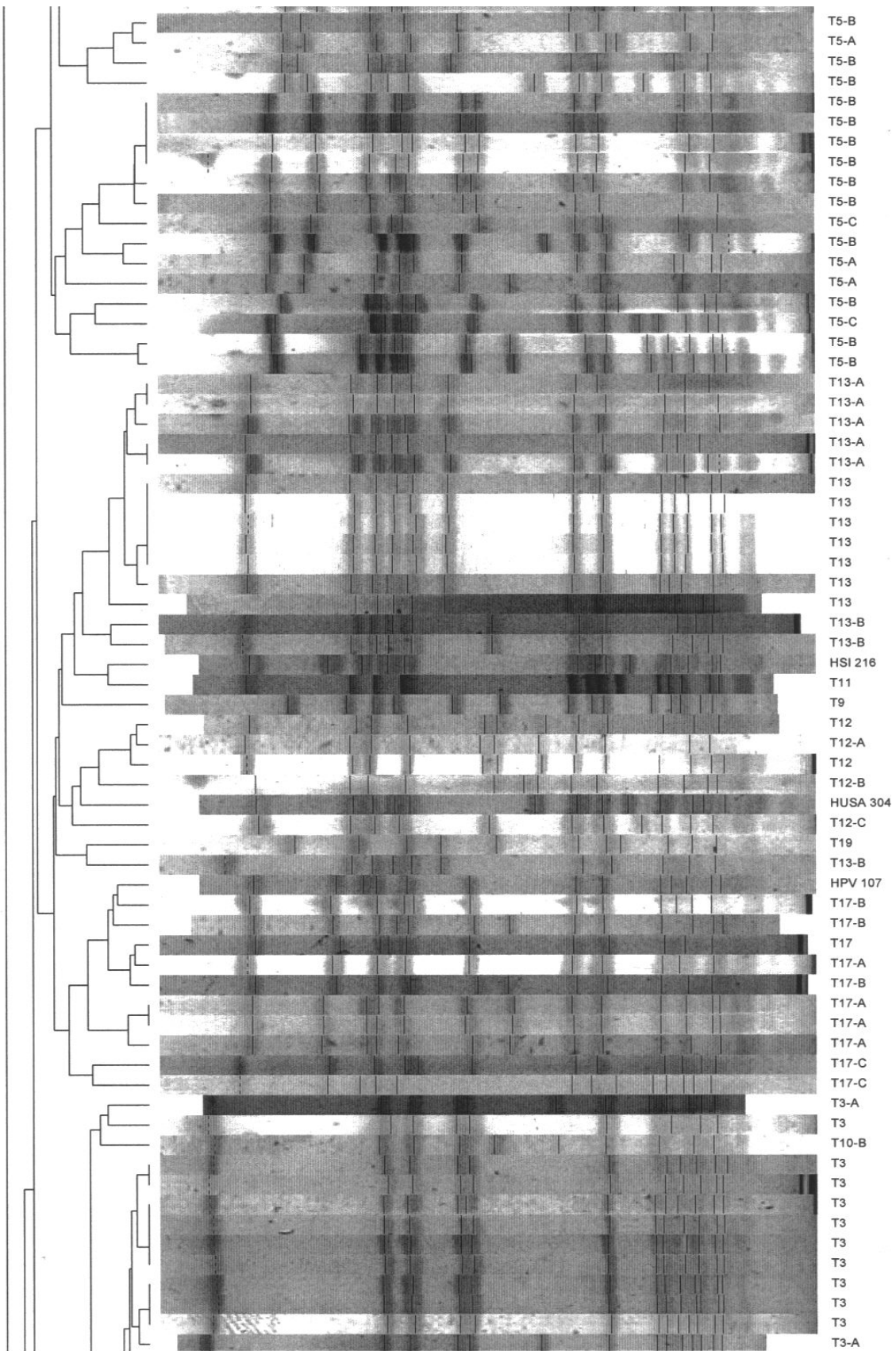


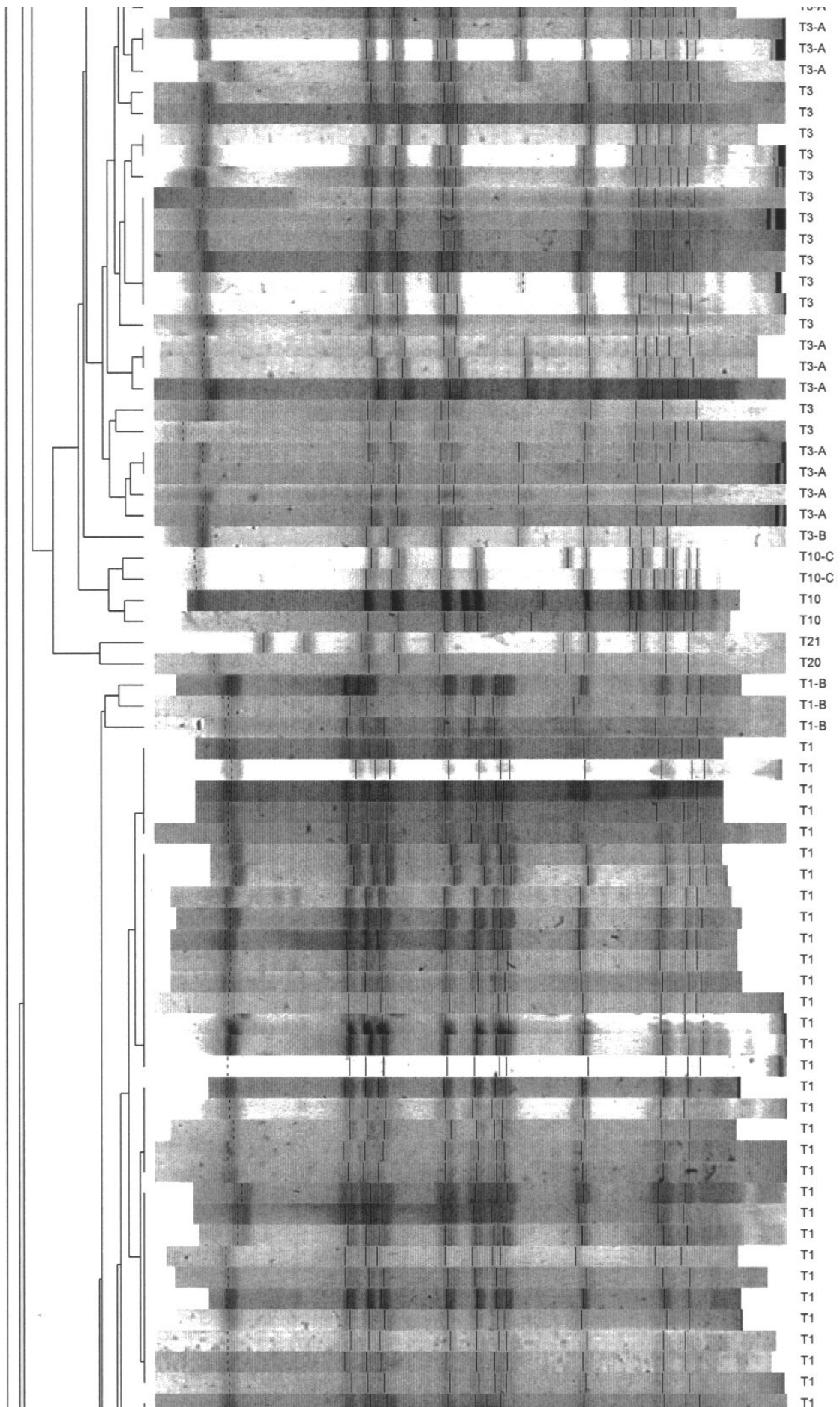
**VEDLEGG 1: Absorbansmålinger av ekstraherte DNA løsninger.**

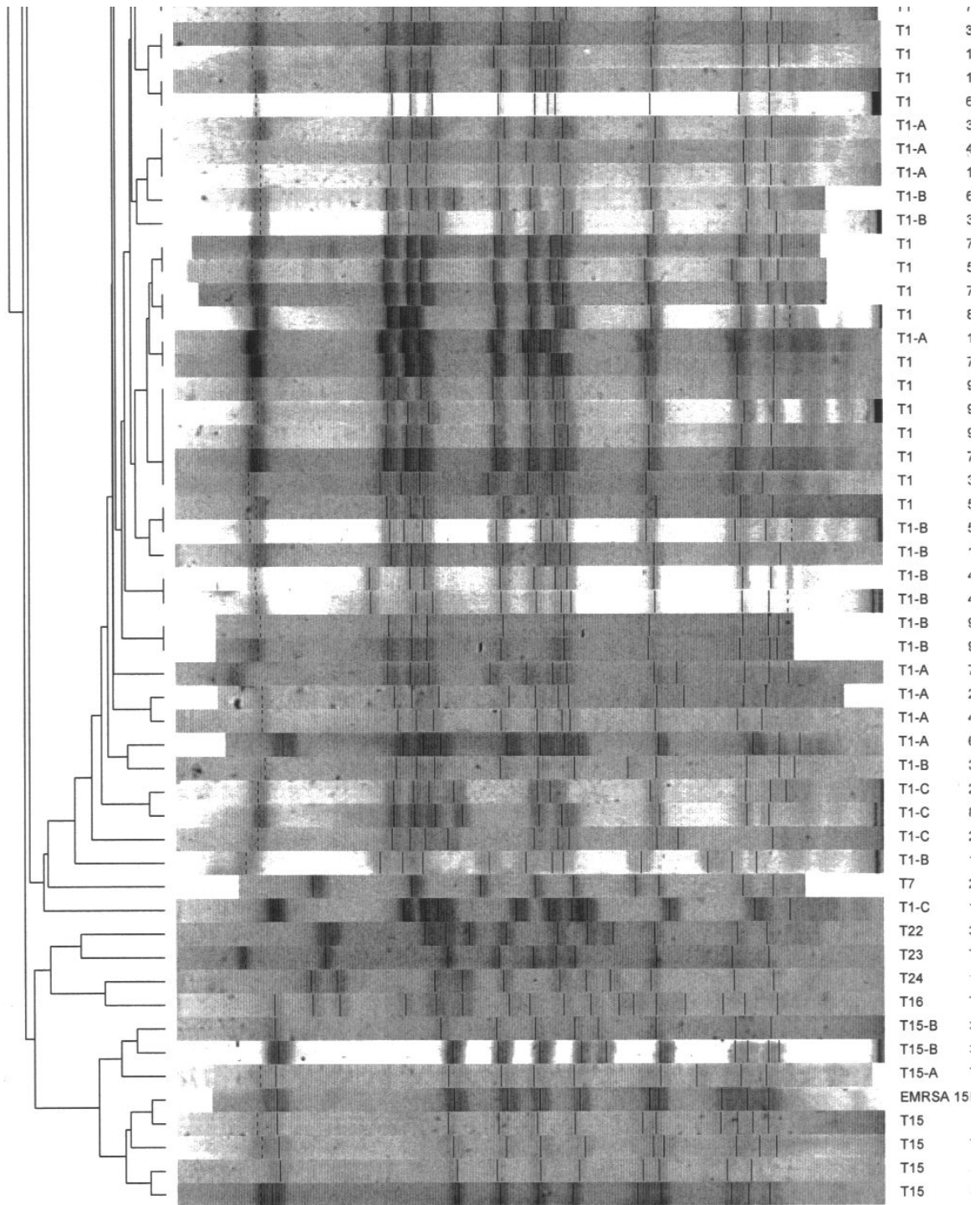
Prøve ID	Telelabnr- årstall	Kons. ng/µl	A260/ A280	A260/ A230	A230 karb	A260 DNA	A280 prot	A320 annet
spa-1	Kontroll-1	20,5	1,54	1,47	0,140	0,205	0,133	0,047
spa-2	Kontroll-2	24,4	1,67	1,53	0,159	0,244	0,146	0,038
spa-3	Kontroll-3	11,8	1,64	0,56	0,211	0,118	0,072	0,023
spa-4	Kontroll-4	18,1	1,57	1,16	0,156	0,181	0,116	0,050
spa-5	Kontroll-5	12,3	1,67	0,67	0,142	0,117	0,098	0,068
T1-01	60938-01	13,0	2,09	1,24	0,116	0,141	0,072	0,008
T1-01	54957-01	7,0	1,86	0,064	0,105	0,067	0,036	0,000
T1-02	31078-02	31,0	2,12	1,88	0,169	0,313	0,151	0,006
T1-03	102825-03	14,0	2,11	1,68	0,085	0,143	0,068	0,000
T1-04	33043-04	16,0	2,10	1,63	0,105	0,168	0,082	0,004
T1-04	98109-04	21,0	2,08	1,45	0,143	0,207	0,100	0,001
T1-04	70881-04	17,0	2,12	1,22	0,135	0,166	0,078	0,000
T1-04	92956-04	19,0	2,07	1,20	0,175	0,207	0,109	0,018
T1-A	84296-02	64,0	2,00	0,96	0,799	0,772	0,452	0,131
T1-B	11036-01	44,0	2,13	1,78	0,295	0,489	0,254	0,046
T2	88856-01	17,3	1,31	3,25	0,053	0,173	0,132	0,112
	68999-01	16,0	2,04	1,53	0,120	0,176	0,093	0,014
	67167-01	9,0	2,01	1,43	0,078	0,107	0,060	0,013
T3	43981-02	29,4	1,59	1,28	0,092	0,118	0,034	0,027
T4	75058-04	17,0	1,89	0,74	0,272	0,213	0,134	0,045
T5	43584-02	13,7	1,43	1,00	0,137	0,137	0,096	0,049
	67346-00	19,0	2,07	2,07	0,101	0,200	0,101	0,009
T6	87998-02	19,5	1,73	1,10	0,177	0,195	0,112	0,024
	87998-02	17,0	2,04	1,80	0,114	0,190	0,103	0,019
T7	21212-03/04	44,8	1,97	1,86	0,241	0,448	0,227	0,026
T8	95686-01	28,0	1,63	0,99	0,281	0,280	0,171	0,054
T9	78961-04	30,1	1,92	1,38	0,217	0,301	0,157	0,019
T10	21466-05	27,6	1,88	1,26	0,219	0,276	0,147	0,018
T11	128523-04	34,2	1,98	1,45	0,236	0,342	0,173	0,016
T12	201028977-01	44,6	1,62	1,17	0,382	0,446	0,275	0,102
T13	79281-03	12,0	1,34	0,99	0,121	0,120	0,090	0,048
	84741-00	26,0	2,03	1,69	0,185	0,291	0,159	0,031
	201015187-01	24,0	2,02	1,86	0,458	0,568	0,488	0,330
T14	20303-05	40,8	1,78	1,20	0,340	0,408	0,230	0,053
T15	83277-02	12,9	1,49	0,55	0,234	0,129	0,086	0,034
T16	77087-00	19,0	2,08	1,17	0,170	0,197	0,101	0,012
T16	77087-00	14,0	2,03	1,17	0,153	0,174	0,100	0,029
T17	67509-01	10,1	1,71	0,77	0,132	0,101	0,059	0,013
T18	62688-04	28,0	2,06	1,92	0,164	0,300	0,155	0,017
T19	103357-02	8,0	1,91	1,18	0,085	0,098	0,059	0,016
T20	201011-197- 01	19,0	2,02	1,71	0,127	0,208	0,110	0,014
Neg K		2,0	1,32	0,39	0,054	0,029	0,025	0,013

**VEDLEGG 2: Dendrogram av 241 MRSA isolater.**









**VEDLEGG 3: Reagenser og løsninger til pulsfelttyping av *S. aureus***

<b>Reagens/løsninger</b>	<b>Reagens</b>	<b>Leverandør/produkt nr.</b>
Suspensjonsløsning	Natriumklorid	Merck 6404
Lyseringsløsning	PIV-sucrose buffer pH 8,0: Natriumklorid Tris-HCl (Tris base) Saltsyre Sakkarose Lysozym Lysostaphin	Merck 6404 Serva 37180 Norsk Medisinaldepot 264432 Merck 7651 Sigma L-6876 Sigma L-4402
Agaroseløsning	Agarose PIV buffer pH 8,0: Natriumklorid Tris-HCl (Tris base) Saltsyre	Sigma A-3054 Merck 6404 Serva 37180 Norsk Medisinaldepot 264432
Lyseringsløsning	N-lauroylsarcosine, natriumsalt Grunnbuffer pH 8,0 Tris-HCl Titriplex I Deoxycholate natriumsalt Lysozym Lysostaphin Rnase Tris-CaCl <sub>2</sub> -glycerol løsning: Tris-HCl Calciumklorid Glyserol	Sigma L-9150 Sigma T-3253 Merck 8417 Sigma D-6750 Sigma L-6876 Sigma L-4402 Sigma R-5503 Sigma T-3253 Merck 2382 Duchefa Biochemie G1345
ESP buffer pH 8,0	Titriplex II N-lauroylsarcosine, natriumsalt Proteinase K	Merck 8417 Sigma L-9150 Promega V3021
TE buffer pH 8,0	Tris (hydroxymethylaminomethane) EDTA di-Natriumsalt salt 2 H <sub>2</sub> O Saltsyre	Duchefa T1501 Saveen S051423 Norsk Medisinaldepot 264432
TBE buffer pH 8,0	Tris (hydroxymethylaminomethan) Borsyre EDTA di-Natriumsalt Sterilt vann	Duchefa T1501 Duchefa B0503 Saveen S051423 Fresenius Kabi 883314
Restriksjonsløsning	Restriksjonsenzym <i>SmaI</i> Reaksjonsbuffer	Promega R-6121 Promega R-6121

---

	Bovint Serum Albumin	Promega R-396D
Agarose til gel	Pulsed Field Certified Agarose	BioRad 162-0137
Standard	<i>S. aureus</i> NCTC 8325	National Collection of Type Cultures
GRB buffer pH 8,6	Tris Borsyre EDTA di-Natrium salt	Duchefa T1501 Duchefa B0503 Saveen S051423
Fremkallingsfarge	SYBR®Gold	Sigma S-11494
Thiourea		Sigma T-7875
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride	Serva NO 32395

**VEDLEGG 4: Laboratorieutstyr til pulsfelttyping av *S. aureus***

<b>Utstyr</b>	<b>Leverandør</b>	<b>Produkt nr.</b>
Blodskåler	as Telelab	
Steril øse 10 µl	Sarstedt	1562.05
Glassrør 12mmx75mm	VWR	110618-1275
Plast sentrifugerør 10 ml	Nunc	348097
Sentrifuge	International Equipment Company	IECentra -M2
Pipettespisser: 0,5-10 µl 2-20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	VWR VWR VWR VWR	612-5780 612-5621 133700100 133700200 1337001000
Pluggformer	BioRad	170-3713
Plexiglass rør med skrukork 10 ml	Nunc	348097
Inkubatorskap	Bergman	Thermaks
Vippe	VWR	IKAAL001410
Målepipetter 10 ml	CLP	2356
Transferpipetter 3,5 ml	Sarstedt	86.1172
Cryorør	Nunc	377267
Microtube	VWR	525-0226
Apparatur Chef	BioRad	XA chiller



---

mapper <sup>TM</sup>		system
Fargekar	VWR	
Polaroid film	Instrument tjenesten	665 Polaroid
Oppbevaringsboks	Sarstedt	064.981
Hansker, nitril	VWR	130976-9
Hansker	VWR	112-1526
Sentrifugerør, polypropylen	Sarstedt	62.554.001

**VEDLEGG 5: Reagenser og løsninger til spatyping av *S. aureus***

<b>Reagens/løsninger</b>	<b>Reagens</b>	<b>Leverandør/produkt nr.</b>
Natriumklorid		Merck 6404
Ekstraheringskit	QIAamp DNA Min Kit	Quiagen 51306
Lyseringsløsning:	Lysostaphin Lysozym Tris-HCl (Tris base) Saltsyre EDTA di-Na salt Natriumhydroksyd Triton	Sigma L-4402 Sigma L-6876 Serva 37180 Norsk Medisinaldepot 264432 Saveen S051423 Merck 6495 Merck 8603
PCR mastermiks	10X Thermophilic DNA Poly buffer MgCl <sub>2</sub> dNTP F primer: spa-1113f R primer: spa-1514 PCR vann Taq Polymerase	Promega M190G Promega A315H Applied Biosystem MWG Biotech AG MWG Biotech AG Fresenius Kabi 883314 Promega M1881
Loading Dye	Sakkarose Bromfenolblått	Merck 7687 Merck 8122
Agarose til gel	Agarose	Promega V3121
Gel running buffer	TRIS Boric acid EDTA di-Na salt	Duchefa T1501 Duchefa B0503 Saveen S051423
Markør	BenchTopφX174DNA/HAEIII	Promega G7511
Fremkallingsfarge	SybrGold	Sigma S11494
Rensekit	QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen 28104-50
Sekvenseringskit	BigDye Terminator v1.1	Applied Biosystems Cycle Sequencing kit

---

		4337449
Fellingsreagenser	EDTA Natriumacetat	Merck 8418 Merck 0626
Etanol	Absolutt alkohol prima	Arcus 600068
Hi-Di formamid		ABI-prism 4311320

**VEDLEGG 6: Laboratorieutstyr til spatyping av *S. aureus***

<b>Utstyr</b>	<b>Leverandør</b>	<b>Produkt nr.</b>
Blodskåler	as Telelab	
Steril øse 10 µl	Sarstedt	1562.05
Microtube	VWR	525-0226
Sentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415
Vortekser	Heigar	
Varmeblokk	Labnet International	
Fotometer	Eppendorf BioPhotometer	
Kyvetter	Uvetter 2220-1600nm	Eppendorf 0030106.300
Pipettespisser: 0,5-10 µl 2-20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	VWR VWR VWR VWR VWR	612-5780 612-5621 133700100 133700200 1337001000
PCR rør 0,5 ml	VWR	AB-0350
Thermocycler	Perkin Elmer Biosystems GeneAmp	PCR System 9600
Gelapparat	Amersham Pharm. Biotech	Hofer HE99
Powersupply	Amersham Pharm. Biotech	Hofer T111
Vippe	VWR	
Fargekar	VWR	

---

ABI Prism 310 genetic analyser	Applied Biosystems	
PCR-rør til sekvensering ABI 9600	Applied Biosystems	N801-0533
Stripscaps ABI9600	Applied Biosystems	N801-0535
Septum til rør	Applied Biosystems	401956
Hansker	VWR	112-1526