



Sammendrag

L. monocytogenes er en patogen bakterie som har en 20-30% dødelighetsrate hos mennesker med nedsatt immunforsvar og er spesielt farlig for gravide kvinne da den kan skape svangerskapsproblemer. For å unngå dette må utbrudd kunne spores raskt til kilden slik at det kan kontrolleres. Foremålet med denne oppgaven var å undersøke om overgangsområdet mellom *comK*-genet og profagen i *comK*-genet kunne brukes til å subtype *L. monocytogenes* isolater innad i MLVA profiler. Videre var hensikten å undersøke om profag i *comK* genot kunne påvirke *L. monocytogenes* fenotypisk og om det var noe sammenheng mellom overgangsområdene og persistens eller type produksjon anlegget isolatet ble isolert fra.

Resultatene viste at overgangsområdene mellom *comK* og profagen hadde marginalt høyere resolusjon enn MLVA. I tillegg til å kunne skille mellom alle MLVA profilene greide denne formen for fagtyping å skille ut ett produksjonsanlegg innad i en MLVA profil. Profagen i *comK* viste seg ikke å kunne påvirke fenotypen til *L. monocytogenes*. Det var heller ingen sammenheng mellom overgangsområdene og persistens eller hvorvidt anlegget arbeidet med laks eller kjøtt.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	i
1. Introduksjon	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1.1. <i>L. monocytogenes</i> i matindustrien.....	1
1.2. Bakteriofager	2
1.2.1. Bakteriofager i <i>L. monocytogenes</i>	3
1.3. <i>L. monocytogenes</i> typingsmetoder	5
1.3.1. Serotyping.....	5
1.3.2. MLVA	5
1.3.3. MLST	6
1.3.4. Andre typingsmetoder	6
1.4. Mål for oppgaven	7
2. Materialer og metode	8
2.1. <i>L. monocytogenes</i> isolater og dyrkingsbetingelser	8
2.2. Medier	9
2.3. PCR, primere og gel elektroforese.....	10
2.3.1. Polymerase chain reaction (PCR)	10
2.3.2. Primere	11
2.3.3. Agarose gel elektroforese.....	12
2.4. Sanger sekvensering og sekvensanalyse	13
2.5. Isolering av fag.....	14
2.6. Isolering av stammer kurert for fag i <i>comK</i> -genet	15
2.7. Innsetting av fag i <i>L. monocytogenes</i>	15
2.8. DNA isolering fra fag.....	16
2.9. Effekt av profag på vekst under ulike forhold	16
3. Resultater	18
3.1. Karakterisering av profag i <i>comK</i> -genet hos <i>L. monocytogenes</i>	18

3.2	Isolering av infeksj�se fag og infisering av stammer uten profag i <i>comK</i> med temperate fag ...	22
3.2.1	Isolering av infeksj�se bakteriofag	22
3.2.2	Infisering av isolater med nye fag	24
3.2.3	Finne <i>L. monocytogenes</i> stammer med integrert profag i <i>comK</i>	28
3.3	Ny informasjon fra helgenomsekvenser	29
3.3.1.	Forekomst av fag i fagisolatene.....	31
3.3.2.	Forekomst av profag i <i>comK</i> i MLVA profil J.....	31
3.3.3.	Bekreftede stamme 5377-f5378.....	33
3.4.	Vekst under ulike betingelser for <i>L. monocytogenes</i>	35
4.	Diskusjon	36
4.1.	Forekomst av profag i stammer fra forskjellige kilder	36
4.2.	Egner fag-sekvenser seg for typing av stammer?	37
4.3.	Fagflora.....	38
4.4.	Primere som ikke er komplement�re.....	38
4.5.	Infisering av stammer uten profag med fag.....	39
4.6.	Er det noen effekt av fagbytte.....	40
5.	Konklusjon og forslag til videre arbeid.....	41
6.	Referanser	42

1. Introduksjon

1.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes er en patogen intracellulær bakterieart i rekken *Firmicutes*. Bakterien er en av to patogene *Listeria* arter hvorav den andre er *Listeria ivanovii* [1]. *L. monocytogenes* er Gram-positiv, stavformet og kan vokse enkeltvis eller i korte kjeder. Den er fakultativt anaerob, oksidase negativ, katalase positiv og produserer ikke sporer. Ekstracellulært er den bevegelig ved 30 °C og lavere ved hjelp av flageller, men ved 37 °C blir transkripsjonen av genet som koder for flagellin nedregulert og bakterien mister bevegeligheten [2]. *L. monocytogenes* kan vokse i temperaturer helt ned til 0,4 °C og opp til 45 °C og ved pH mellom 4 og 9,6 [3]. Den har blitt observert i alt fra mat, jord, planter, fabrikker som produserer mat, tarmene til ca. 10% av mennesker og i mange dyr [23]. Denne evnen til å overleve i de fleste miljøer gjør at bakterien er veldig vanskelig å kontrollere.

L. monocytogenes er sykdoms-fremkallende og forårsaker den dødelige sykdommen listeriose som kan føre til en rekke symptomer blant annet hjernehinnebetennelse og mage- og tarmkatarr. Sykdommen er veldig sjelden i Norge med 10 til 50 tilfeller årlig fra 2000 til 2012 [9]. I 2007 var det et utbrudd av listeriose hvor 21 personer ble rammet og fem av disse døde [9]. Listeriose rammer hovedsakelig eldre, små barn, gravide og de som har nedsatt immunforsvar. I denne gruppen mennesker er dødeligheten til listeriose 20 – 30% [10]. Hos gravide kvinner kan listeriose føre til abort, dødfødsler, prematur fødsel eller neonatal infeksjon. De mest aktuelle smittekilene er bearbeidet mat som blir kjølelagret og kan spises uten varmebehandling for eksempel kokt kjøttpålegg, røkt fisk og myk ost [9]. *L. monocytogenes* har en variabel inkubasjons periode på alt fra 1 dag til mer enn 90 dager som kan gjøre det vanskeligere å spore kilden til infeksjonen [8].

1.1.1. *L. monocytogenes* i matindustrien

Siden *L. monocytogenes* hovedsakelig blir overført til mennesker via spiseklar mat er det et stort press på matindustrien for å unngå kontaminering i mat. Bakterien kan introduseres til produksjonsanlegget gjennom kontaminerte råvarer, smittede dyr eller transportutstyr [41]. Den vanligste måten å oppbevare spiseklar mat over lengre perioder er

kjølelagring, men siden *L. monocytogenes* kan vokse i kalde miljøer er det ikke en pålitelig metode. Siden varmebehandling i sammenheng med produksjon av spiseklar mat sannsynligvis dreper bakterien er kontaminering fra utstyr etter produksjon en større bekymring [42].

L. monocytogenes stammer isolert fra produksjonsanlegg blir ofte kategorisert som enten sporadiske eller persistente. Det finnes ikke en standard definisjon på ordet persistent [43], men det kan bli beskrevet som en stamme som er isolert fra samme anlegg flere ganger over tid. En sporadisk stamme har derimot kun blitt isolert en gang. Hva som gjør en stamme persistent har det blitt forsket mye og noen forslag er høyere resistens mot desinfeksjonsmidler f. eks benzalkoniumklorid [44], biofilm formering [45] og bedre evne til å feste seg til overflater [45]. Studier relatert til dette er derimot uklare og det er enda ikke noen sterke bevis som kan forklare persistens [46]. Carpentier og Cerf [43] mener persistens ikke kommer av noen spesielle egenskaper til *L. monocytogenes*, men er et resultat av at bakterien koloniserer steder som er vanskelige å vaske eller desinfisere nøye f. eks små sprekker i utstyret. Dette kan resultere i at *L. monocytogenes* forblir i anlegget i flere år.

1.2. Bakteriofager

Bakteriofager, eller bare "fag", er en type virus som er den minste organismen som kan bli definert som levende og selv det er en pågående debatt [6]. De er en parasitt for bakterier og er avhengig av dem til forsyning av energi og ressurser siden bakteriofager ikke har noen form for metabolisme selv. De er de mest tallrike organismene på jorden da det er i hvertfall ti ganger flere av dem enn det er bakterier [5]. Bakteriofager består blant annet av en proteinkappe som inneholder den genetiske koden for fagen og en hale som binder seg til bakteriecellen den skal infisere. Den genetiske koden kan være enkel- eller dobbeltrådet DNA eller RNA. Bakteriofager blir hovedsakelig delt i to grupper, lytiske eller temperate fag. Lytiske fag vil starte å produsere nye fag så fort det har infisert en bakterie. Dette vil føre til at bakterien lyserer og slipper ut alle fagene som vil videre infisere andre bakterier og syklusen fortsetter. Temperate fag kan også gjøre dette, men de kan i tillegg integrere seg i bakteriens kromosom og forbli der til noe initierer den lytiske prosessen. Forskjellige arter av bakteriofag har sine respektive sekvenser de integrerer i kalt attB. Stress, f. eks skade på DNA, kan initiere den lytiske prosessen i temperate fag og kan bli oppnådd ved å utsette

bakterien for UV-lys eller mitomycin C som da skader genomet til verten [11]. Fordelen for fagen med å forbli i kromosomet til den infiserte bakterien er at når bakterien skal foreta celledeling kopierer den opp DNAet sitt og det integrerte fag DNAet i tillegg. Slik kan en bakteriofag bli replikert uten å drepe vertbakterien [30].

For mennesker kan bakteriofager både være positive og negative. I alle industrier som avhenger av fermentering ved hjelp av bakterier kan en infeksjon av bakteriofager ødelegge produktet. Bakteriofager kan også påvirke virulensen til sykdomsfremkallende bakterier på hovedsakelig to måter; generell transduksjon er en prosess hvor istedenfor at fag-DNA blir pakket inn i en proteinkappe så blir vert-DNA pakket inn. Hvis en slik fag-partikkel finner en passende vert kan DNAet bli integrert i kromosomet gjennom homolog rekombinasjon. Hvis det integrerte genetiske materialet inneholdt gener som påvirker virulens så kan disse bli uttrykt i den nye verten. Den andre måten er gjennom lysogen konversjon. Dette skjer når temperate fag forandrer på virulensen til bakterieverten etter integrering. Noen eksempler er *Vibrio cholerae* som kun er patogen etter at genet for kolera-toksinen blir introdusert av fagen CTXφ og giften til *Corynebacterium diphtheriae*, som forårsaker difteri, er kodet i genene til en fag [31][32].

Genomet til ulike arter av bakteriofag er veldig variert, såpass mye at fag som infiserer forskjellige verter ofte ikke har mye sekvenslikhet [12]. Når en sammenlikner bakteriofager som infiserer samme vert kan en se at mye av sekvensen er like, men rekkefølgen på moduler av gener kan variere [12] [13].

Siden bakteriofager kan drepe bakterier er det naturlig at de blir brukt til nettopp det. I de siste to tiårene har interessen for bakteriofager blusset opp, mye på grunn av økningen i antibiotikaresistens blant patogene bakterier. Håpet er å supplere konvensjonelle antibiotika, som kan ha negative effekter på pasienter, med bakteriofager som kan lages for å spesifikt infisere og drepe en type celle. Bakteriofag-baserte produkter er allerede kommersialisert for bruk i agrikultur og mat[5].

1.2.1. Bakteriofager i *L. monocytogenes*

Alle kjente *Listeria* bakteriofag tilhører ordenen *Caudovirales* som er virus med hale og dobbeltrådet DNA [5]. Denne ordenen er delt inn i familiene *Podoviridae*, *Siphoviridae* og *Myoviridae* og kun virus fra de første to familiene har blitt funnet i *Listeria*. Rundt 500 bakteriofager som er

Listeria spesifikke har blitt oppdaget, men kun et fåtall har blitt karakterisert på genomnivå [5]. Noen eksempler på karakteriserte fag er oppsummert i Tabell 1.

Tabell 1. Generell karakteristikk av *L. monocytogenes* bakteriofager

Bakteriofag	Virus familie	Genomstørrelse (bp)	<i>attB</i> bindesete	Vert serogruppe	Referanse
B054	<i>Myoviridae</i>	48 172	<i>EF-Ts</i>	5, 6	14, 16, 4
B025	<i>Siphoviridae</i>	42 653	Arg-TCT	5, 6	14, 17, 4
PSA	<i>Siphoviridae</i>	37 618	tRNA ^{Arg}	4	15, 18, 4
A500	<i>Siphoviridae</i>	38 867	Lys-CCT	4	14, 17, 4
A118	<i>Siphoviridae</i>	40 834	<i>comK</i>	1/2	16, 19, 4
A006	<i>Siphoviridae</i>	38 124	Arg-CCG	1/2	14, 16, 4

Tabellen er en modifisert versjon fra [4]

Mesteparten av de dokumenterte *Listeria* bakteriofagene er temperate fag som kan integrere seg inn i bakteriegenomet [5]. Flere *Listeria* stammer inneholder også monosiner som produserer defekte profag som ikke kan infisere nye bakterier, men som fortsatt kan lysere verten [21]. De temperate fagene i *Listeria* viser seg å være noenlunde spesifikke og infiserer kun en liten andel av stammer. En grunn til dette er homoimmunitet som er resistens til spesifikke bakteriofager på grunn proteiner som hemmer fagens evne til å infisere bakterien. Disse proteinene er kodet for i genomet til en profag som allerede er integrert i det samme *attB* bindesetet [5].

Hvordan temperate profag påvirker fenotypen til *L. monocytogenes* er det ikke mye data på [5]. I en studie av Rabinovich et al. [22] viser de at profag integrert i *L. monocytogenes comK* genet forhindrer cellen i å unnsnippe fra makrofag fagosom. De viser at i denne situasjonen kan profagen bli fjernet gjennom intracellulær vekst. Dette rekonstruerer *comK* genet og setter igang en prosess som gjør at bakterien til slutt kan rømme fra fagosomet [22]. En annen studie [7] viser at *L. monocytogenes* isolert fra kjøtt-prosesserings anlegg, med en profag i *comK* genet, har høyere resistens og større celletetthet enn de uten profag. Desverre fant de ikke ut av hvordan bakgrunnsmekanismene for dette fungerte.

1.3.L. *monocytogenes* typingsmetoder

Siden *L. monocytogenes* er en patogen bakterie er det veldig viktig å kunne spore kilden til en stamme hvis et utbrudd skulle skje. Av den grunn har flere typings-metoder blitt utviklet. Genomet til *L. monocytogenes* er en av de mest konserverte genomene som er observert [20] og derfor gir ofte ikke vanlige typingsmetoder høy nok resolusjon til å kunne skille mellom ulike isolater.

1.3.1. Serotyping

Serotyping av *L. monocytogenes* er den mest konvensjonelle typingmetoden. Metoden er basert på komposisjonen av somatiske (O) og flagell (H) antigener som er proteiner på overflaten av celleveggen. Det finnes ihvertfall 12 serotyper av *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, og 7 [26]. Av disse er 4b, 1/2a og 1/2b serotypene ansvarlig for 98% av alle dokumenterte tilfeller av human listeriose. Nettopp på grunn av at nesten alle tilfeller av listeriose kommer av kun tre serotyper er det ikke en veldig bra måte å spore kilden til et utbrudd.

1.3.2. MLVA

Bakterier har flere loci med et variabelt antall repetitive sekvenser kalt VNTR [34]. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis, forkortet til MLVA, er en typingsmetode som baserer seg på størrelsen av de repetisjonene i bakteriegenomet. I et MLVA assay blir det valgt ut et antall VNTR og disse blir PCR amplifisert. Deretter bestemmer man størrelsen av VNTR gjennom en sekvenseringsmaskin og tildeler hver VNTR et tall basert på det kalkulerte antallet av repetisjoner i VNTR. Til slutt ender man opp med en tallkombinasjon f. eks 14-0-7-1-1-3-6-2 som blir kalt MLVA-profilen [37]. I arter med høy genomisk diversitet kan en oppnå en meningsfull resolusjon med seks til åtte VNTR, men arter som er mer konserverte kan kreve opp til [35]. Denne typingsmetoden blir brukt til å epidemiologisk sporing av patogene bakterier fordi den er billig og enkel å utføre og har høy resolusjon i mange bakteriearter [36].

En ulempe med MLVA-typing er at den er basert på størrelsen på PCR produktet av de repetitive områdene. Dette betyr at resultatene fra MLVA-typing utført på et laboratorium ikke

nødvendigvis kan sammenliknes med resultatene fra et annet laboratorium hvis de har forskjellig utstyr eller bare forskjellige konfigurasjoner på samme utstyr.

1.3.3. MLST

Multilocus sequence typing er en typingsmetode som karakteriserer alleler i housekeeping-gener [38]. Dette er gener som er nødvendige for grunnleggende cellulære funksjoner. MLST er en relativt simpel typingsmetode. Et sett med housekeeping-gener fra et genom blir sekvensert og sekvensene blir brukt til å sammenligne de samme genene fra andre genomer. Denne metoden har en fordel av å være basert på sekvens så MLST profiler kan sammenliknes mellom laboratorier over hele verden ved å dele sekvensen. En ulempe med denne typingsmetoden sammenliknet med MLVA er at den er dyrere og tar lengere tid å utføre [36].

En lignende typingsmetode er multi-virulence-locus sequence typing (MVLST) som sekvenserer virulens-gener isteden for housekeeping-gener. Det har vist seg å ha en høyere resolusjon enn MLST i *L. monocytogenes* [39].

1.3.4. Andre typingsmetoder

Som nevnt er *L. monocytogenes* veldig konservert og av den grunn kan det være vanskelig å subtype arten. Av den grunn har det vært foreslått å type gjennom profagene i bakterien siden de er mye mer varierte og kan gi en mer spesifikk inndeling. En slik typingsmetode har blitt argumentert for av Verghese et al. [7]. De foreslår en modell hvor det defektive *comK* genet til *L. monocytogenes* kan bli tenkt på som et "rapid adaptation island" altså et loci hvor rekombinasjon skjer ofte og gjør bakterien fortere tilpasser seg til omgivelsene [7]. De foreslår også at overgangsområder mellom *comK*-genet i *L. monocytogenes* og en profag som er insatt i det genet blir brukt til subtyping av *L. monocytogenes*.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) er en type elektroforese som separerer store DNA molekyler som er vanskelig å separere med standard DNA elektroforese. Standard DNA gel elektroforese separerer fragmenter opp til ca. 50 kb, mens PFGE skiller fragmenter opp til 10 Mb. I PFGE endrer man strømretning periodesvis slik at man får en korrekt migrering av

de store DNA molekylene. PFGE er et verdifullt verktøy for å differensiere mellom forskjellige stammer av *Listeria Monocytogenes*.

1.4.Mål for oppgaven

De tre målene for denne oppgaven er:

1. Å forsøke å infisere et *L. monocytogenes* isolat uten fag i *comK* med en profag fra et annet isolat eller å kurere et isolat for profagen i sitt *comK* gen. Deretter bruke de isolatene til å undersøke om profag i *comK* kan påvirke fenotypen til *L. monocytogenes*.
2. Finne ut av om overgangsområdene mellom *comK* og profagen i *comK* kan brukes til subtyping av *L. monocytogenes*.
3. Se om fagflora har noe sammenheng med hvorvidt et isolat er persistent eller sporadisk eller om det er isolert fra et kjøttarbeidende anlegg eller laksrelatert anlegg

2. Materialer og metode

2.1. *L. monocytogenes* isolater og dyrkingsbetingelser

L. monocytogenes isolatene som ble brukt i denne oppgaven har blitt isolert av forskere på NOFIMA fra produksjonsmiljøet i ulike matbedrifter og blir oppbevart ved -80°C. Disse isolatene var på forhånd typet med Multiple Locus Variable tandem-repeats Analysis (MLVA)(Lindsted et al. 2008) og blitt karakterisert som persistente eller sporadiske. Mesteparten av isolatene ble også serotypet og ble enten 1/2a eller IIc. All informasjon om isolatene er angitt i Tabell 2.

Fryserør ble laget av alle *L. monocytogenes* isolatene for lagring på -20°C. 800 µl overnatt kultur ble blandet med 200 µl 85% glycerol i eppendorf rør. All arbeid med *L. monocytogenes* ble utført på patogenlaboratoriet (P3 lab).

Tabell 2. *L. monocytogenes* stammene som har blitt benyttet i denne oppgaven.

Isolat nr.	MLVA profil	MLVA navn	Type matproduksjon	Kilde	Før/Under produksjon	Anlegg	Persistent/Sporadisk
4536	6-11-15-18-6	A	Kjøtt	Miljø	F.p.	1	P
4545	6-11-15-18-6	A	Kjøtt	Miljø	F.p.	2	P
4565	8-8-17-21-6	C	Kjøtt	Miljø	F.p.	1	S
4627	6-9-14-16-6	F	Kjøtt	Miljø	F.p.	3	S
5378	6-9-19-10-6	G	Kjøtt		U.p.	4	S
3638	7-7-10-10-6	I	Ost			5	P
3886	7-7-10-10-6	I	Laks	Miljø	F.p.	6	P
3992	7-7-10-10-6	I	Laks	Utstyr	F.p.	7	
3995	7-7-10-10-6	I	Laks	Miljø	F.p.	7	P
4588	7-7-10-10-6	I	Laks	Miljø	F.p.	6	P
4712	7-7-10-10-6	I	Kjøtt	Sliceravfall	U.p.	3	P
4991	7-7-10-10-6	I	Kjøtt	Miljø	F.p.	4	P
5366	7-7-10-10-6	I	Kjøtt	Miljø		8	P
5367	7-7-10-10-6	I	Kjøtt	Miljø		8	P
5376	7-7-10-10-6	I	Kjøtt		F.p.	4	
NLII_45	7-7-10-10-6	I	Kjøtt	Miljø	F.p.	4	P
3921	6-9-18-16-6	J	Laks	Miljø	U.p.	6	P
3933	6-9-18-16-6	J	Laks	Miljø	U.p.	9	P
3949	6-9-18-16-6	J	Laks	Miljø	F.p.	6	P
4077	6-9-18-16-6	J	Laks	Miljø	F.p.	6	P
4245	6-9-18-16-6	J	Laks	Utstyr		6	P
4254	6-9-18-16-6	J	Laks	Utstyr		6	P
4993	6-9-18-16-6	J	Kjøtt		U.p.	4	P

5369	6-9-18-16-6	J	Kjøtt	Miljø		8	P
5374	6-9-18-16-6	J	Kjøtt	Miljø	F.p.	10	P
5377	6-9-18-16-6	J	Kjøtt	Produkt-kontaktflate	F.p.	4	
5631	6-9-18-16-6	J	Kjøtt			8	
5632	6-9-18-16-6	J	Kjøtt		F.p.	10	
5630	6-9-18-10-6	K	Kjøtt		U.p.	2	S
3853	6-8-14-18-6	L	Laks	Utstyr	F.p.	11	P
3870	6-8-14-18-6	L	Laks	Utstyr	U.p.	11	P
4385	6-8-14-18-6	L	Laks	Utstyr	F.p.	7	P
4574	6-8-14-18-6	L	Laks		F.p.	11	
4595	6-8-14-18-6	L	Laks	Råvare		6	P
4792	6-8-14-18-6	L	Laks	Miljø	F.p.	7	
5182	6-8-14-18-6	L	Laks	Råvare		6	
3860	6-10-5-16-6	M	Laks	Utstyr	F.p.	11	P
3858	6-7-14-10-6	N	Laks	Miljø	F.p.	11	P
3923	6-7-14-10-6	N	Laks	Utstyr	U.p.	6	P
5375	6-7-14-10-6	N	Kjøtt		U.p.	12	
5634	6-7-14-10-6	N	Kjøtt		F.p.	3	
3901	5-8-14-10-6	O	Laks	Miljø	F.p.	6	S

-Hver unike MLVA profil har fått et «arbeids» navn i form av en bokstav.

-F.p. og U.p. står henholdsvis for «før produksjon» og «under produksjon». Dette er når isolatene ble isolert fra anleggene.

-Hvert tall i «Anlegg» kolonnen representerer et anlegg.

-P og S står for persistent og sporadisk

2.2. Medier

BHI medium

BHI medium ble brukt i alle forsøkene til dyrking av *L. monocytogenes*. 37g BHI pulver fra OXOID blandes med 1 L destilert vann og autoklaveres i 20 minutter på 121°C.

37g BHI pulver inneholder 12,5g brain infusion solids, 5g beef heart infusion solids, 10g proteose pepton, 2g glukose, 5g natriumklorid og 2,5g di-natrium fosfat.

BHI medium med NaCl

BHI-mediet med NaCl ble brukt i forsøkene i kapittel 2.10. Det ble laget 200ml vanlig BHI medium med tilsatt 19g NaCl for å oppnå 10% NaCl medium. Deretter ble det autoklavert på 121°C i 20 min.

BHI medium med CaCl₂

BHI-mediet med CaCl₂ ble brukt i forsøkene i kapittel 2.6., 2.7. og 2.8. Det ble laget

vanlig BHI-medium og så ble det tilsatt CaCl_2 til en konsentrasjon på 10 mM og deretter ble det autoklavert i 20 min på 121°C .

BHI agar

BHI agar ble laget med «Brain heart infusion agar» pulver fra OXOID. 47g av pulveret blandes med 1L destilert vann og autoklaveres i 20 minutter på 121°C . Deretter ble det helt over i petriskåler på en sterilbenk og når det stivnet ble lagret på 4°C .

47g agar-pulver inneholder 12,5g brain infusion solids, 5g beef heart infusion solids, 10g proteose peptone, 2g glukose, 5g natrium klorid, 2,5g di-natrium fosfat og 10g agarose.

BHI agar med CaCl_2

BHI agar med CaCl_2 ble brukt i forsøkene i kapittel 2.6., 2.7. og 2.8. Det ble laget vanlig BHI agar og så tilsatt CaCl_2 til en konsentrasjon på 10 mM. Det ble så autoklavert i 20 min på 121°C og helt over i petriskåler på en sterilbenk. De ble lagret på 4°C .

2.3. PCR, primere og gel elektroforese

2.3.1. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR er en prosess som blir brukt til å amplifisere en del av et genom. Hvilken del av genomet som blir amplifisert avhenger av hvilke primere som blir brukt i prosessen. Dette er et nødvendig steg for å kunne finne ut av størrelsen på et DNA fragment og for å kunne sekvensere DNA.

Startet med å stryke *L. monocytogenes* stammer på nye BHI skåler siden man trenger ferske kolonier for å kunne kjøre PCR direkte på koloniene. Disse ble inkubert over natten på 37°C . Ved bruk av en pipettespiss overfører man litt materiale fra en enkeltkoloni til en brønn på en PCR plate ved å bare røre kolonien med spissen så «smøre» det rundt på bunnen av brønnen. Den samme kolonien blir overført til tre brønner, en til hvert primersett for fragmentene A, B og C (Figur 1), og så satt i mikrobølgeovnen i ett minutt for å lysere bakteriene. Hver reaksjon består av:

25 μl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix

2 μl primer 1, 10 μM

2 µl primer 2, 10 µM
21µl RNase-fritt dH₂O

Dette ble kjørt i PCR maskinen (Veriti 96 Well Thermal Cycler fra Applied Biosystems) med følgende program:

1 omgang:
15 min – 95°C

40 omganger:
30 sec – 94°C
90 sec – 60°C
90 sec – 72°C

1 omgang:
10 min – 72°C

Hvis PCR prosessen skulle stå på over natten ble programmet satt til å holde produktet på 4°C etter endt prosess.

2.3.2. Primere

Primere er korte oligonukleotider som bestemmer hvor DNA polymerasen i en PCR reaksjon skal begynne. For at de skal binde best mulig til templatet må de være helt komplementære til 3' enden av sekvensen som skal bli amplifisert. Primerene som er brukt i denne oppgaven er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Primere som er brukt i denne oppgaven.

Primernavn	Primersekvens (5' til 3')	Bindesete attB	Referanse
Primer C	AACGCTTTGACGAGCGAATA	Profag i <i>comK</i>	[7]
Arev	GACTTGCAAATTACCATGTGCT	<i>comK</i>	[7]
Afwd	TCTTCGTTATTTGGAAGCAT	<i>comK</i>	[7]
Primer B	TTGCTAAATAATTTGGTAGTGTGT	Profag i <i>comK</i>	[7]

B-Arg-TCT	GCAATGAATCGCAATTGGTCA	tRNA-Arg ^{TCT}	Denne oppgaven
C-Arg-TCT	ATAAGCCCATTGACAACGCG	tRNA-Arg ^{TCT}	Denne oppgaven
B-Arg-CCG	TGGCTTGACATGGGATTGTATT	tRNA-Arg ^{CCG}	Denne oppgaven
C-Arg-CCG	GCGAGGTTATGACGTGAGAATA	tRNA-Arg ^{CCG}	Denne oppgaven
J-comK-L	CGTCCAAGTCCTGCGATTTT	Profag i <i>comK</i> i MLVA J profil	Denne oppgaven
J-comK-R	AGTTTGCGAAAAGTGC GGAT	Profag i <i>comK</i> i MLVA J profil	Denne oppgaven
cat oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA- ATTGGCGCATTGATAGAGA	<i>cat</i>	[47]
cat oR	TTGTGAGCGGATAACAATTC- AGATTGACGATTCTGCTTTTG	<i>cat</i>	[47]
dapE oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA- CGACTAATGGGCATGAAGAACAAG	<i>dapE</i>	[47]
dapE oR	TTGTGAGCGGATAACAATTC- ATCGAACTATGGGCATTTTACC	<i>dapE</i>	[47]
Seq primer oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA		
Seq primer oR	TTGTGAGCGGATAACAATTC		

Seq primer oF og oR blir brukt til sekvensering av PCR produktene til *cat* og *dapE* primerne

Primerene ble designet med programmet Primer3 versjon 4.0.0 [27][28]. I designprosessen ble det tatt hensyn til at primerene kun var komplementære til ett sted på genomet og at primerene ikke dannet hårnålstruktur. Det ble også tatt hensyn til at primerpar ikke ville binde seg til hverandre og at bindingstemperaturen til et par var relativt lik.

2.3.3. Agarose gel elektroforese

Agarose gel elektroforese er en metode som blir brukt til å finne ut av størrelsen, og til en viss grad hvor stor konsentrasjon produktet fra en PCR reaksjon er. Det blir laget en

agarose gel som har små brønner i seg og blir satt inn i et elektroforese-kammeret. PCR produktet blir blandet med en «loading buffer», som blant annet inneholder etidiumbromid, og blir pipettert over til disse brønnene. Små DNA fragmenter går fortere gjennom gelen enn store fragmenter så de vil bli adskilt basert på størrelse. En molekylvektstandard med DNA fragmenter av kjente størrelser blir tilsatt en av brønnene for å kunne estimere hvor store fragmentene er. Når prosessen er ferdig blir gelen tatt bilde av under UV lys som får etidiumbromid, som har festet seg til DNAet, til å lyse opp.

I denne oppgave ble det kun brukt 1% agarose geler. For å lage det ble det blandet 60ml TBA buffer med 0,6g agarose (BioRad Certified Molecular Biology Agarose) og 6 µl GelRed i en kolbe. Dette ble da kjørt i mikrobølgeovn til agarosen smeltet, rundt 3-4 min. Etter oppvarmingen ble alt sammen helt over i en form som har en kam med 20 tagger. Etter at det stivner tar man ut kammen og det blir igjen en gel med 20 brønner. 5µl av PCR resultatet ble blandet med 1µl Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye og pipettert over i en brønn. I tillegg fylles en brønn med 10µl av en passende molekylvektstandard. Alle gelene i denne oppgaven ble kjørt på 90V i rundt 40 – 50 min med molekylvektstandarder Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, ready-to-use.

2.4. Sanger sekvensering og sekvensanalyse

Sanger sekvensering er basert på at dideoksynukleosid trifosfat (ddNTP) hindrer videre syntetisering av DNA [40]. Hver av de fire ddNTP basene er markert med hver sin fluoreserende farge. Når en sekvensering pågår vil den stoppe på tilfeldige steder. Dette vil lage fragmenter av forskjellige størrelser og den siste nukleotiden vil være en fluoreserende ddNTP. Alle fragmentene går gjennom en elektroforese prosess som gjør at det minste fragmentet kommer først og det største sist og en sekvenseringsmaskin leser av fargen på ddNTPen i stigende rekkefølge

Alle sekvenseringene gjort i denne oppgaven ble gjort på PCR produkter fra enkeltkolonier. Før selve sekvenseringen ble PCR produktene behandlet med Exo SAP-IT (Exo SAP-IT PCR Product clean up-Affymetrix # 78201) som fjerner rester av nukleotider og primere så de ikke interfererer med de senere reaksjonene. 2µl med 5x fortynnet Exo SAP-IT

ble blandet med 5µl PCR produkt i et PCR brett. Dette ble kjørt i en Veriti 96 Well Thermal Cycler fra Applied Biosystems med programmet 37°C i 30min og så 80°C i 15min.

Etter at Exo SAP-IT programmet ble ferdig kjørt ble pre-sekvenseringsproduktene klargjort for sekvenserings PCRen. Til dette ble det benyttet et sekvenseringsbrett (MicroAmp Optical 96 well reaction plate, Life Technologies). Hver stamme ble sekvensert to ganger, en med forover primer og en med revers. En mastermix ble laget for hver primer og inneholdt: 1,5 µl Big Dye Buffer 5x, 1,0 µl Big Dye v 1.1 (#4337450 Life Technologies), 1,0 µl sekvenseringsprimer 3,2 µM og 5,5 µl H₂O per reaksjon. Big Dye v 1.1 inneholder dNTPer og ddNTPer. Til slutt ble det tilsatt 1 µl pre-sekvenseringsprodukt til hver brønn og så kjørt i PCR maskinen. Programmet for sekvenserings-PCR var 25 sykluser med 96°C i 15 sek > 60°C i 4 min.

Når sekvenserings-PCRen ble ferdig ble hele brettet spunnet ned i 1 min ved 1000 rpm som en forberedelse for felling. En mastermix ble laget av 10 µl X-terminator og 45 µl SAM-løsning (#4376487 Life Technologies) per prøve. 55 µl ble tilsatt i hver brønn med sekvenserings-PCR produkt og så forseglet med strips. Hele platen ble satt på en vortex-mikser i romtemperatur i 30min ved 1500 rpm og deretter spunnet ned igjen ved 2500 rpm i 2 min. Platen ble så forseglet med en septa-matte og satt inn i sekvenseringsmaskinen (ABI 3130xl Genetic Analyser, Applied Biosystems). Sekvensene ble analysert i programmet CLC Main Workbench 7.5.

2.5. Isolering av fag

For å isolere fag fra bakterier måtte de bli indusert fra lysogen til lytisk tilstand. Dette ble gjort ved hjelp av mitomycin C som er et mer potent induserende middel enn UV bestråling [29]. Lysogene *L. monocytogenes* ble først strøket ut på BHI agar og så inkubert i et døgn ved 37°C deretter ble en enkeltkoloni plukket og brukt til å innokulere et rør med 5ml BHI medium. Rørene ble dyrket i et døgn ved 37°C med risting. Denne overnattekulturen ble fortynnet 1:100 i BHI-CaCl₂ medium og inkubert ved 37°C i 30 min med risting. CaCl₂ ble tilsatt mediet fordi det resulterer i høyere antall plakk og et større antall fag-partikkler [17]. Til slutt ble det tilsatt mitomycin C til en konsentrasjon på 0,4 µl/ml for å indusere lytisk syklus og OD600 ble målt hvert 20. minutt til det ble observert synkende OD. Det optimale

tidspunktet for å høste fag er når en nedgang i OD blir målt [11], så når OD går ned betyr det at raten av lysis er større enn vekstraten og indikerer at det er mange fag i supernatanten. Det ble også brukt en kontroll uten tilsatt mitomycin C for å observere når mitomycinen induerte lysis og for å få en generell vekstkurve. Når det optimale tidspunktet ble nådd ble forsøket stoppet og kulturene sentrifugert på 3000xg i 12 min. Supernatanten ble sugd vekk og filtrert gjennom en membran med 0,22 µM porestørrelse for å fjerne bakteriene. Prøvene med isolert bakteriofag ble lagret ved 4°C.

2.6. Isolering av stammer kurert for fag i *comK*-genet

Når det ble observert en nedgang i OD og før kulturene ble sentrifugert som beskrevet i 2.6. ble det platet ut en 10^{-5} og en 10^{-7} fortynning av kulturene. Disse ble satt til inkubering overnatt på 37 °C . Det ble kjørt PCR på koloniene med primere for fragment B for å se om de hadde blitt kurert av fagen i *comK*-genet.

2.7. Innsetting av fag i *L. monocytogenes*

L. monocytogenes stammer som ikke har fag i *comK* ble strøket ut på BHI agar og inkubert i ett døgn på 37°C. Enkeltkolonier ble plukket ut og innokulert til rør med 5ml BHI medium. Disse ble inkubert i et døgn på 37°C med risting. Fortynninger av de isolerte fagene ble laget med 0,9% NaCl til 10^{-2} og 10^{-4} og overnattkulturene ble fortynnet 1:10 i BHI-CaCl₂ medium. Det ble også forberedt et reagensrør med ca 4ml flytende soft agar, til hver prøve, som ble satt i et vannbad på 50°C. For hver prøve med hver fortynning ble det blandet 100 µl fagløsning med 300 µl overnattkultur. Listex™ P100 (ebi-1855, Microcos Food Safety) ble brukt som kontroll på at metoden fungerte. Blandingene ble pipetert over til et av rørene med soft agar, rullet røret mellom hendene i 2-3 sek for å blande det sammen og så helt over på en BHI-CaCl₂ agar skål. Etter at agaren hadde stivnet ble skålene inkubert opp ned på 30°C og så undersøkt for plakk i de neste dagene. For å få isolert lysogene stammer ble det pirket borti plakkene med en pødeøse og strøket ut på BHI agar plater og innkubert over natt på 37°C. Koloniene ble undersøkt for inkorporasjon av profag i *comK*-genet med PCR som beskrevet i kapittel 2.3. med primere for B fragmentet.

2.8. DNA isolering fra fag

For å isolere DNA fra prøver med bakteriofag ble det benyttet DNeasy Blood and Tissue Kit fra QIAGEN. Utstyret er egentlig ment for preparering av DNA fra bakterier, dyrevev, blood og insekter så det ble modifisert for å fungere for fag. 120 µl 20mg/ml proteinase K, 1,5 ml Buffer AL (QIAGEN) og 85 µl 0,5M EDTA ble tilsatt til 500 µl fag isolat og inkubert på 56 °C i en time. Dette lyserer fagene og gjør DNAet tilgjengelig. Etter lyseringen ble det tilsatt 1 ml 96% etanol og prøven ble overført til en DNeasy Mini spin column (QIAGEN) som er i et 2 ml samlerør. Dette ble sentrifugert i 1 min på 8000 rpm. Væsken og samlerøret ble kastet og spin columnen ble lagt i et nytt rør. 500 µl Buffer AW1 (QIAGEN) ble lagt til og det ble sentrifugert i 1 min på 8000 rpm igjen. Væsken og røret ble kastet, et nytt ble brukt, og 500 µl Buffer AW2 (QIAGEN) ble tilsatt. Det ble sentrifugert i 3 min på 14000 rpm. Røret med væsken ble kastet og spin columnen ble lagt i et vanlig eppendor rør. 100 µl Buffer AE (QIAGEN) ble tilsatt og alt ble sentrifugert i 1 min på 8000 rpm etter at Buffer AE fikk stå i ett minutt først for å binde seg til DNAet på membranen. Væsken i eppendorfrøret ble brukt på nytt og sentrifugert om igjen for å øke mengden DNA.

PCR ble kjørt på de isolerte DNA prøvene med primere designet for bakteriofagene (kapittel 2.3.2) og PCR produktene ble sekvensert som beskrevet i kapittel 2.3. og 2.5. Istedenfor at PCR ble utført på bakteriekolonier som beskrevet i kapittel 2.3 ble det brukt 1 µl isolert DNA.

2.9. Effekt av profag på vekst under ulike forhold

For å se hvilken effekt profag har på vekst av *L. monocytogenes* blir noen bakterieisolater inkubert under ulike betingelser. Det ble først laget en overnatt kultur av de utvalgte stammene som, basert på erfaringen til ingeniørene ved NOFIMA, gir en konsentrasjon på ca $1 \cdot 10^9$ CFU/ml. Testene ble utført i reagensrør med overnatt kulturen fortynnet til $1 \cdot 10^5$ CFU/ml. Betingelsene det ble testet for er vist i Tabell 4.

Tabell 4. Oversikt over testede vekstbetingelser.

	Bruksløsning	Testbetingelser og konsentrasjoner
pH	-	4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5
Temperatur	-	4, 12, 20, 30, 37, 45 °C
NaCl	10 %	2, 4, 6, 8, 10 %
Bensalkoniumklorid	5 mg/ml	2, 4, 6, 8, 10 µg/ml
Erytromycin	5 mg/ml	2, 4, 8, 16, 32 µg/ml
Kloramfenikol	5 mg/ml	2, 4, 8, 16, 32 µg/ml
Streptomycin	20 mg/ml	8, 16, 32, 64, 128 µg/ml
Penicillin G	250 µg/ml	0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 µg/ml
Fusidinsyre	2,5 mg/ml	0,5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml

Løsningene med NaCl og sure pH verdier, som nevnt i Tabell 2, ble tillaget med BHI medium før autoklaving. Resten av stoffene som ble testet ble direkte tilsatt til rørene med BHI medium rett før bakteriekulturen ble satt til. Siden volumet av disse stoffene var veldig små, 1 µl – 40 µl, ble det ikke tatt hensyn til konsentrasjons- eller volumforandringer i rørene. Alle kulturene ble satt til inkubasjon på 37°C bortsett fra de som skulle testes ved ulike temperaturer og stod i syv dager.

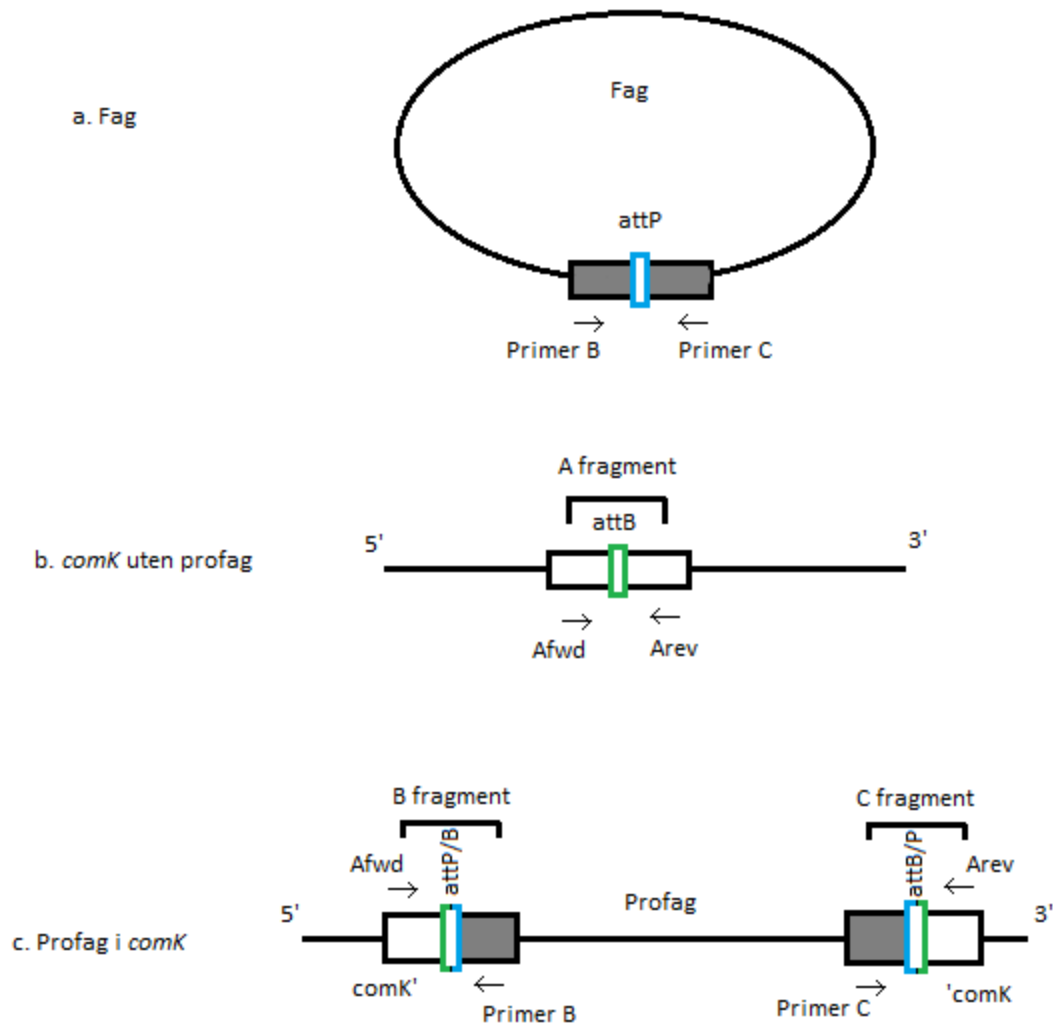
3. Resultater

3.1. Karakterisering av profag i *comK*-genet hos *L. monocytogenes*

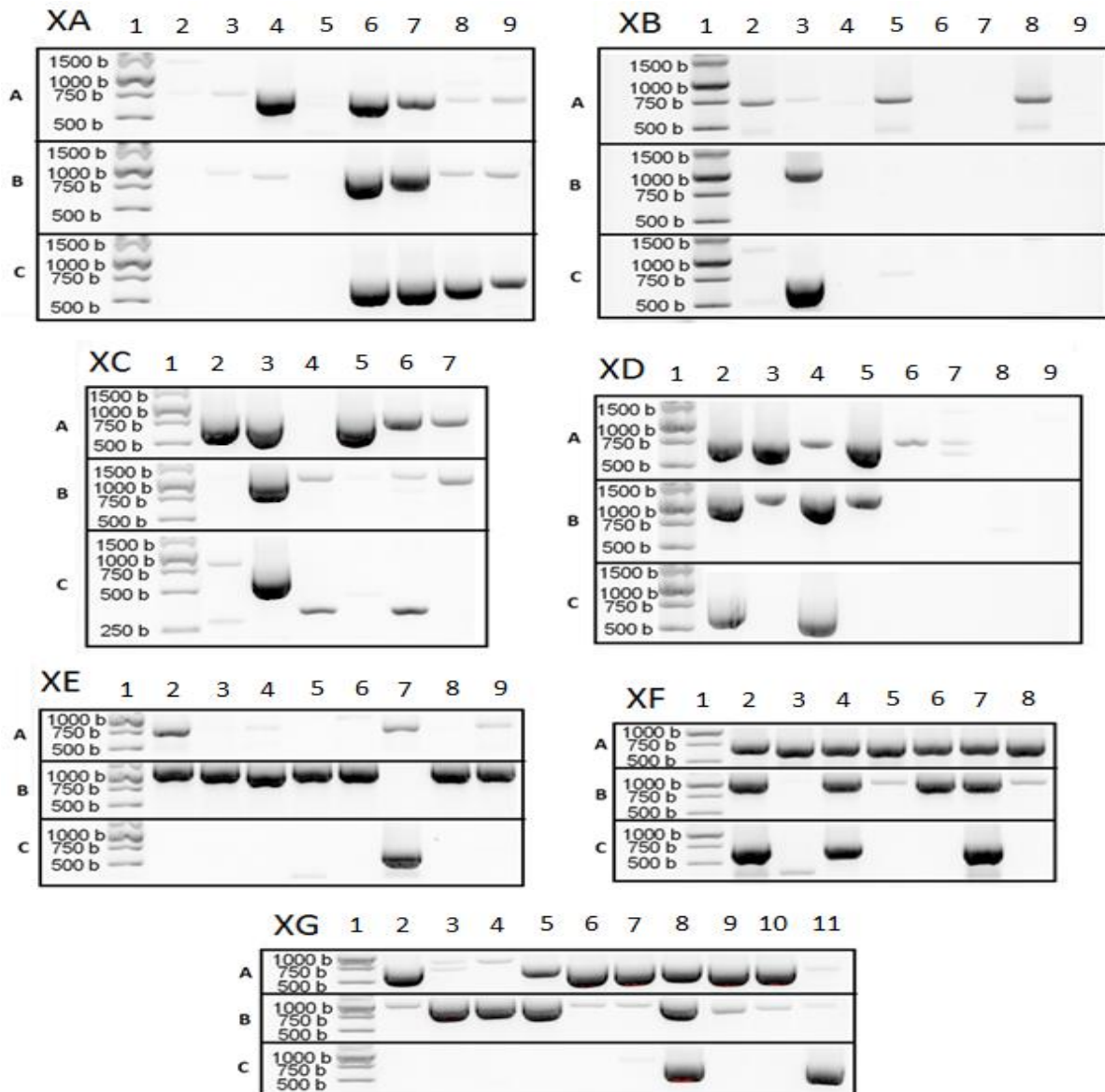
Hensikten med denne oppgaven var å undersøke forekomst og sekvens av profag i *comK*-genet i et panel av *L. monocytogenes* isolater isolert fra forskjellige laks- og kjøttproduksjonsanlegg. Grunnen til dette var, blant annet, for å bruke profag i *comK* i senere forsøk med infeksjon med fag og for å undersøke om overgangsområdene (Figur 1) mellom *comK*-genet og profagen kan brukes til å skille mellom isolater av samme MLVA type. En annen grunn til at overgangsområdene ble sekvensert er for å se om det er noe forskjeller mellom isolatene fra laks og de som er fra kjøttbedrifter i tillegg til å se om det er noe forskjell mellom persistente og sporadiske stammer. En liste over de 42 *L. monocytogenes* isolatene som ble undersøkt finnes i Tabell 2.

For å finne ut av hvilke av de 42 *L. monocytogenes* isolatene har fag i *comK*-genet ble det foretatt PCR med primere for A, B og C fragment (Tabell 3, Figur 1) som beskrevet i kapittel 2.3. Primerene som er brukt i PCR-reaksjonen for å bestemme om et isolat har profag i *comK*-genet er fra artikkelen til Verghese et al. 2011 [7] og var designet av dem for å amplifisere overgangsområdet mellom *comK* og profagen som er insatt i *comK*. A fragmentet er det ubrutte *comK*-genet på ca. 700bp, B fragmentet er ca. 900bp av den ene enden av *comK* med fag og C fragmentet, på rundt 700bp, er den andre enden med fag (Figur 2). En stamme med B, C eller begge fragmentene antas å ha fag i genet mens et A fragment tilsier at den ikke har det. Resultatene er oppsummert i Tabell 5. Selve sekvensene til de forskjellige typene kan en se i vedlegget.

Alle positive PCR produkter ble sekvensert som beskrevet i materialer og metode 2.4. og analysert i programmet CLC Main Workbench 7 (CLC bio). Sekvensene som var identiske fikk en sekvenstype-betegnelse (f. eks A5). De PCR produktene som fikk svake bånd på agarose-gelen gav som oftest ikke noe brukbar sekvens.



Figur 1. a: Bilde av fagen som infiserer *L. monocytogenes* og legger seg i *comK*-genet. Pilene viser hvilken retning primerne intierer DNA polymerasen i og hvor de binder seg. b: Viser *comK* i *L. monocytogenes* med *attB* setet og hvor primerne binder seg. Dette primerparet er grensene til fragmentet «A». c: *comK* med profag. Overgangen nedstrøms for profagen mellom *comK* og fag er C fragment mens overgangen oppstrøms er B fragment.



Figur 2. Gelbilder for PCR som viser om stammene har fragmentene A, B eller C i genomet sitt. Dette ble brukt til å bestemme om stammen har fag i *comK*-genet eller ikke. Noen stammer har blitt testet flere ganger på grunn av usikkerhet. Forklaring på hvilket isolat som er tilsatt i hvilken brønn er vist i Tabell 5. Standarden som er brukt i første rad på hvert bilde er Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Tabell 5. Forekomst av profag i *comK* hos ulike *L. monocytogenes* isolater.

Isolat nr.	MLVA	A PCR (sek-type)	B PCR (sek-type)	C PCR (sek-type)	Gelbilde
4536	A	+ (A5)	(+) (IS)	-	XF rad 5
4545	A	+ (A5)	(+) (IS)	-	XF rad 8
4565	C	+ (A5)	+ (B7)	+ (C2)	XF rad 4
4627	F	+ (A4)	(+) (IS)	-	XG rad 2
5378	G	+ (A2)	+ (B8)	+ (C1)	XF rad 2
3638	I	+ (A1)	+ (IS)	-	XD rad 5
3886	I	(+) (A1)	+ (B4)	+ (IS)	XD rad 4
3992	I	+ (A1)	-	-	XB rad 8
3995	I	+/+ (A1)	-/-	-/-	XC rad 2 / XB rad 2
4588	I	+/-	+/+ (B4)	+/+ (C4)	XC rad 3 / XB rad 3
4712	I	+/+ (A1)	-/-	-/-	XC rad 5 / XB rad 5
4991	I	+ (A1)	+ (B4)	-	XD rad 3
5366	I	+ (A1)	+ (B4)	+ (C4)	XD rad 2
5367	I	+ (A1)	+ (B4)	+ (C4)	XA rad 6
5376	I	+ (IS)	+ (B4)	+ (C4)	XA rad 7
NLII_45	I	+ (A1)	-	-	XF rad 3
3921	J	(+)/-	(+)/-	-/-	XC rad 6 / XB rad 6
3933	J	(+)/-	(+)/-	-/-	XC rad 7 / XB rad 7
3949	J	-/-	(+)/-/(+)	-/-/+	XC rad 4 / XB rad 4 / XA rad 8
4077	J	-/(+)	-/(+)	-/+	XB rad 9 / XA rad 9
4245	J	-	-	-	XD rad 9
4254	J	-	-	-	XD rad 8
4993	J	-	-	-	XD rad 7
5369	J	(+)	-	-	XD rad 6
5374	J	-	-	-	XA rad 2
5377	J	-	-	-	XA rad 3
5631	J	+	-	-	XA rad 4
5632	J	-	-	-	XA rad 5
5630	K	+ (A2)	+ (B3)	-	XF rad 6
3853	L	-/-	+/+ (B1)	-/-	XE rad 8 / XG rad 3
3870	L	-	+ (B1)	-	XE rad 4
4385	L	+/- (A3)	+/+ (B2)	-/-	XG rad 5 / XE rad 9
4574	L	-	+ (B1)	-	XE rad 3
4595	L	-/-	+/+ (B1)	-/-	XG rad 4 / XE rad 6
4792	L	+ (A3)	+ (B2)	-	XE rad 2
5182	L	-	+ (B1)	-	XE rad 5
3860	M	+ (A5)	-	-	XG rad 6
3858	N	+ (A2)	-	-	XG rad 7
3923	N	+ (A2)	+ (B6)	+ (C3)	XG rad 8
5375	N	+ (A2)	-	-	XG rad 9
5634	N	+ (A2)	-	-	XG rad 10
3901	O	-/(+) (A2)	-/-	+/+ (C5)	XG rad 11 / XE rad 7
EGDe	-	+ (A6)	+ (B5)	+ (C1)	

+ indikerer positivt PCR produkt, - indikerer negativt PCR produkt.

Flere markeringer, f. eks +/-, indikerer at PCR for det fragmentet ble utført flere ganger.

(+) indikerer et svakt bånd på agarose-gelen.

(IS) betyr at det ble forsøkt å sekvensere fragmentet men sekvensen ble utydelig.

A1 - A6 indikerer unike sekvenstyper for A fragmentet, B1 – B8 for B fragmentet og C1 – C5 for C fragmentet.

Kolonnen "Gelbilde" viser til det spesifikke PCR resultatet på Figur 2.

EGDe ble brukt som en referansestamme og ble hentet fra genomdatabasen på NCBI.

Det ble funnet 5, 7 og 5 ulike sekvenstyper for henholdsvis A, B og C fragment. Med unntak av MLVA profil L der det ble funnet 2 sekvenstyper for B fragmentet blant isolatene, var det ikke variasjon i sekvens for fragmenter fra isolater med samme MLVA profil. Det er heller ingen variasjon i sekvenstyper imellom laks og kjøtt innad i MLVA profil I som er en av tre profiler med isolater fra begge produksjonstypene. I MLVA profil N er det kun ett isolat som har fag i *comK* og i MLVA profil J har hele 9 av 12 isolater negative PCR produkter på alle tre fragmenter. I MLVA profil L er alle C fragmenter negative til tross for at alle B fragmenter er positive.

3.2 Isolering av infeksjose fag og infisering av stammer uten profag i *comK* med temperate fag

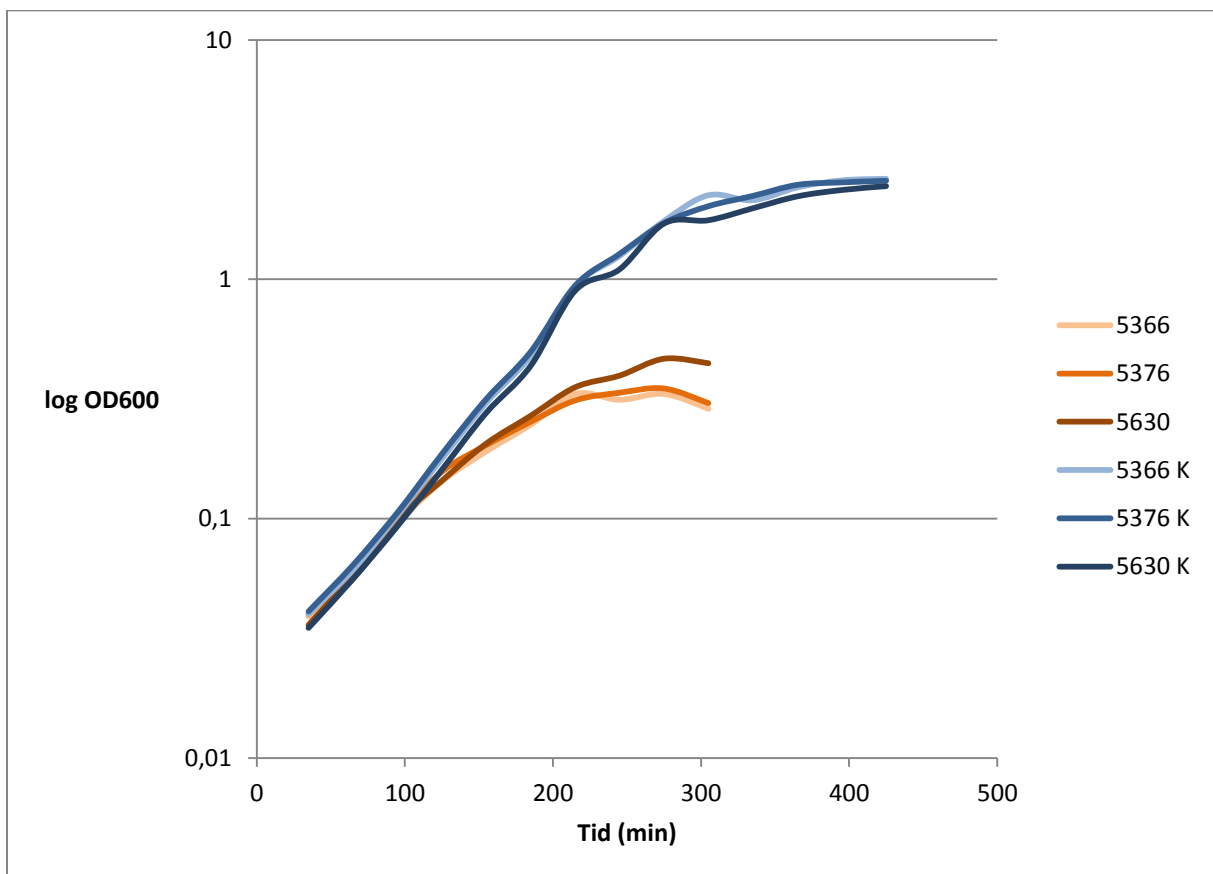
Et av foremålene med oppgaven er å se om temperate bakteriofager i *comK* genet kan påvirke fenotypen til verten den infiserer. For å kunne observere det blir det forsøkt å infisere et *L. monocytogenes* isolat som ikke har profag integrert i *comK* genet med en fag som er isolert fra et annet *L. monocytogenes* isolat som har profag i det genet. Det blir også forsøkt å kurere et *L. monocytogenes* isolat for profagen i *comK* genet.

Senere vil det bli gjort tester for å se om det er noen fenotypiske forskjeller mellom et *L. monocytogenes* isolat med profag i *comK* genet og det samme isolatet uten fag i *comK*.

3.2.1 Isolering av infeksjose bakteriofag

For å kunne infisere *L. monocytogenes* bakterier med profag må fagene først bli isolert fra andre *L. monocytogenes* isolater. Siden disse fagene er temperate må de bli indusert til lytisk syklus for å gå ut av bakteriegenomet. Mitomycin C er et middel som skader DNA og dermed induserer denne syklusen [16].

L. monocytogenes isolatene 5366, 5376 og 5360 ble valgt ut til å donere fag som senere blir brukt til å infisere andre isolater. Grunnen til at disse ble valgt er fordi de er en persistent, en sporadisk og et udefinert isolat og det ble bekreftet med PCR at de har et B og/eller C fragment som tilsier at disse stammene har fag integrert i *comK* (Tabell 5). Det var ikke kjent, på det tidspunktet forsøket ble utført, at noen av isolatene kan ha inneholdt flere profag enn det i *comK*.

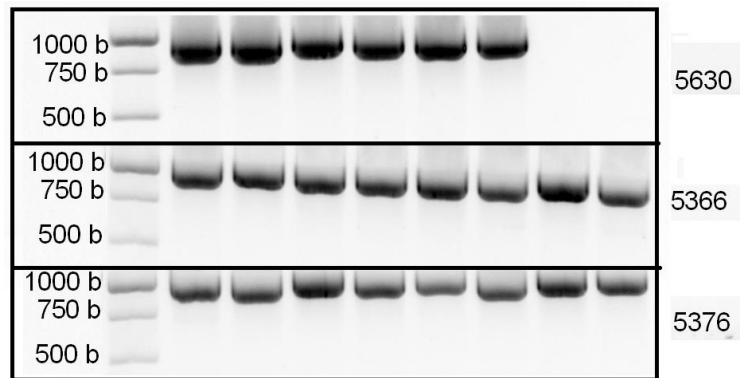


Figur 3. Vekstkurve for stammene 5366, 5376 og 5360 ved 37°C med 0,4 µg/ml Mitomycin C og kontroll uten Mitomycin C (K). OD ble målt hvert 20. minutt.

OD600 ble målt i et spektrofotometer hvert 20. minutt i løpet av inkubering for å finne den optimale tiden å høste fagene (Figur 3). Det ble observert en nedgang i OD først etter 300 minutter og fagene ble høstet ved filtrering som forklart i 2.5. Alle senere høstinger av fag fra andre stammer ble gjort etter 5 timer inkubering med risting ved 37°C med 0,4 µg/ml Mitomycin C.

Donor stammene ble testet for å se om noen av dem hadde mistet sitt fag iløpet av isoleringsprosessen. Siden målet er å undersøke effekt av profag i *comK* på fenotypen til *L. monocytogenes* er det nødvendig å ha et isolat med profaget integrert i *comK* og det samme isolatet uten profaget for undersøke effekten så nøyaktig som mulig. Om det blir oppnådd via å kurere et infisert isolat eller å infisere et isolat uten profag i *comK* er ikke viktig.

Like før fagene ble isolert ble det strøket ut en skål med hver av de tre donorene 5630, 5366, 5376, etter indusering med Mitomycin C, og ble testet med PCR for B fragmentet. Resultatet er vist i Figur 4.



Figur 4. Gelbilde av PCR for B fragment av donor stammene etter inkubasjon med mitomycinC. 5366 har samme størrelse på alle fragmentene, men bildet ble tatt skjevt. 5630 hadde kun seks kolonier. Standarden som er brukt i rad 1 er Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder.

En kan se fra Figur 5 at alle koloniene fra de tre stammene fortsatt har et profag i *comK*-genet. Det ble altså ikke vellykket å isolere et isolat som hadde mistet profagen i *comK*.

3.2.2 Infisering av isolater med nye fag

For å senere kunne undersøke om profag har noen effekt på fenotypen til *L. monocytogenes* blir det forsøkt å infisere et isolat uten fag i *comK* med en fag fra et annet isolat.

De isolerte fagene ble brukt til å infisere utvalgte stammer uten fag i *comK* med en soft agar plaque assay som forklart i kapittel 2.7. og resultatene er vist i Tabell 6. I assayet vil

bakteriestammen fort gro over hele skålen og vil produsere plakk som er små klare prikker hvor det ikke er bakterievekst på soft agar skålene. Dette betyr at fagene har infisert bakterien, gått i lytisk fase og lysert verten.

Tabell 6. Oversikt over optak av fag (plakk) i *L. monocytogenes* stammer.

		Fag (donor-stammer)					
		5366-I	5376-I	5630-K	3923-N	5378-G	Listex
«Mottaker» stammer	4536-A	+/+	-	-	-	+/+	+/-
	4545-A	+/+	+/+	-	-	+/+	+/-
	NLII_45-I	-	-	-	-	-	-
	3949-J	-/+	-	-	+/+	+/+	-/-
	5377-J	+/+	+/+	-	-	+/+	+/+
	5634-N	-	-	-	-	-	-
	4627-F	-	-	-	-	-	+
	3860-M	+/+	+/+	-	-	-	+/+

Bokstaven bak isolat-nr er MLVA profil.

+ betyr at stamme-fag kombinasjonen dannet plakk på agarskålen, - betyr at de ikke gjorde det.

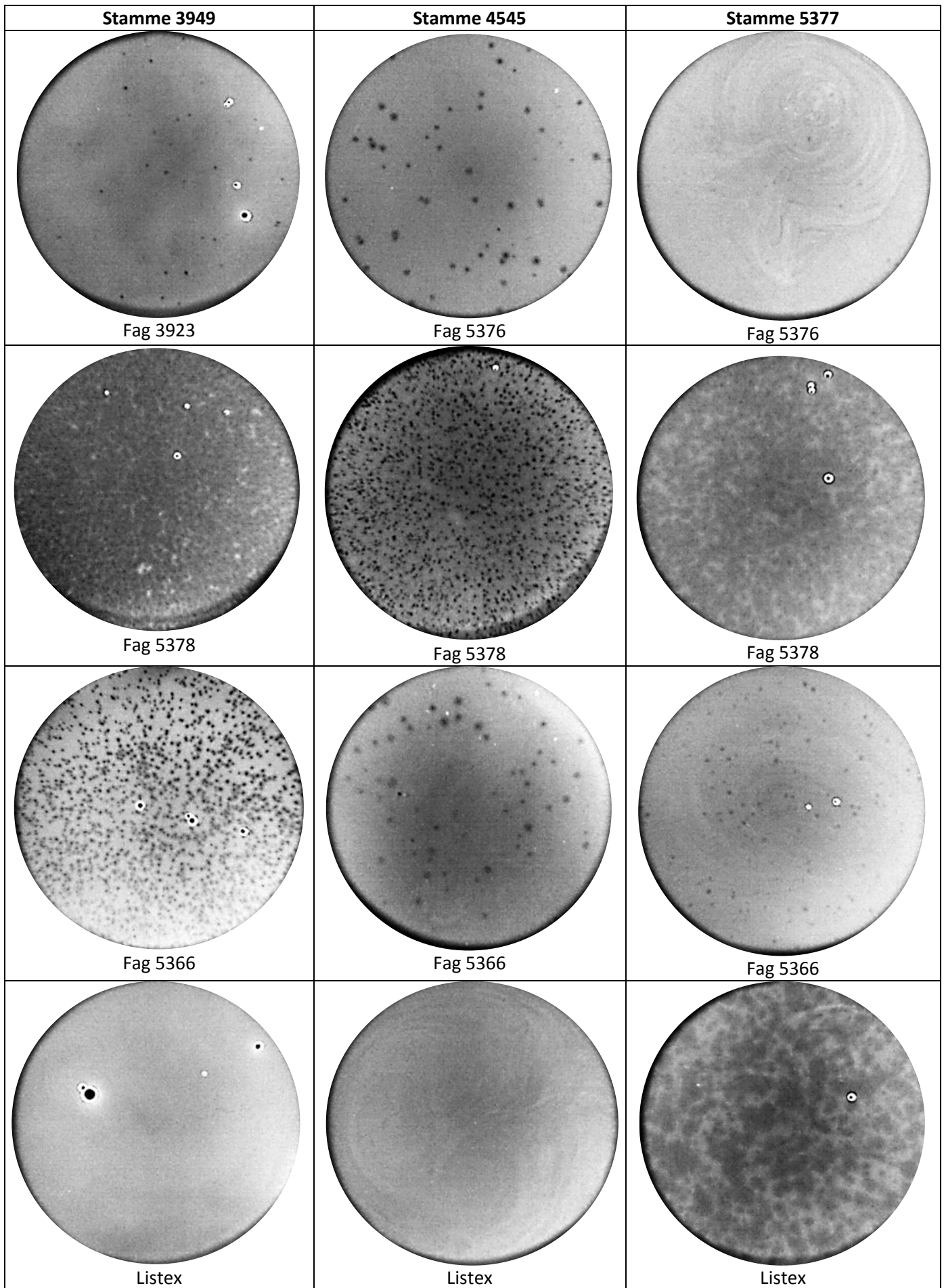
To markeringer indikerer at assayet ble utført to ganger med den samme kombinasjonen.

13 av 30 kombinasjoner, ikke inkludert Listex, som ble testet ga plakk på skålene. Fag fra isolat 5630 dannet ikke plakk med noen isolater den ble testet med mens isolat 5378 dannet plakk med alle. Listex induserte lysis og i 5 av 8 isolater vist i Tabell 6 og 13 av 13 isolater som ikke er vist.

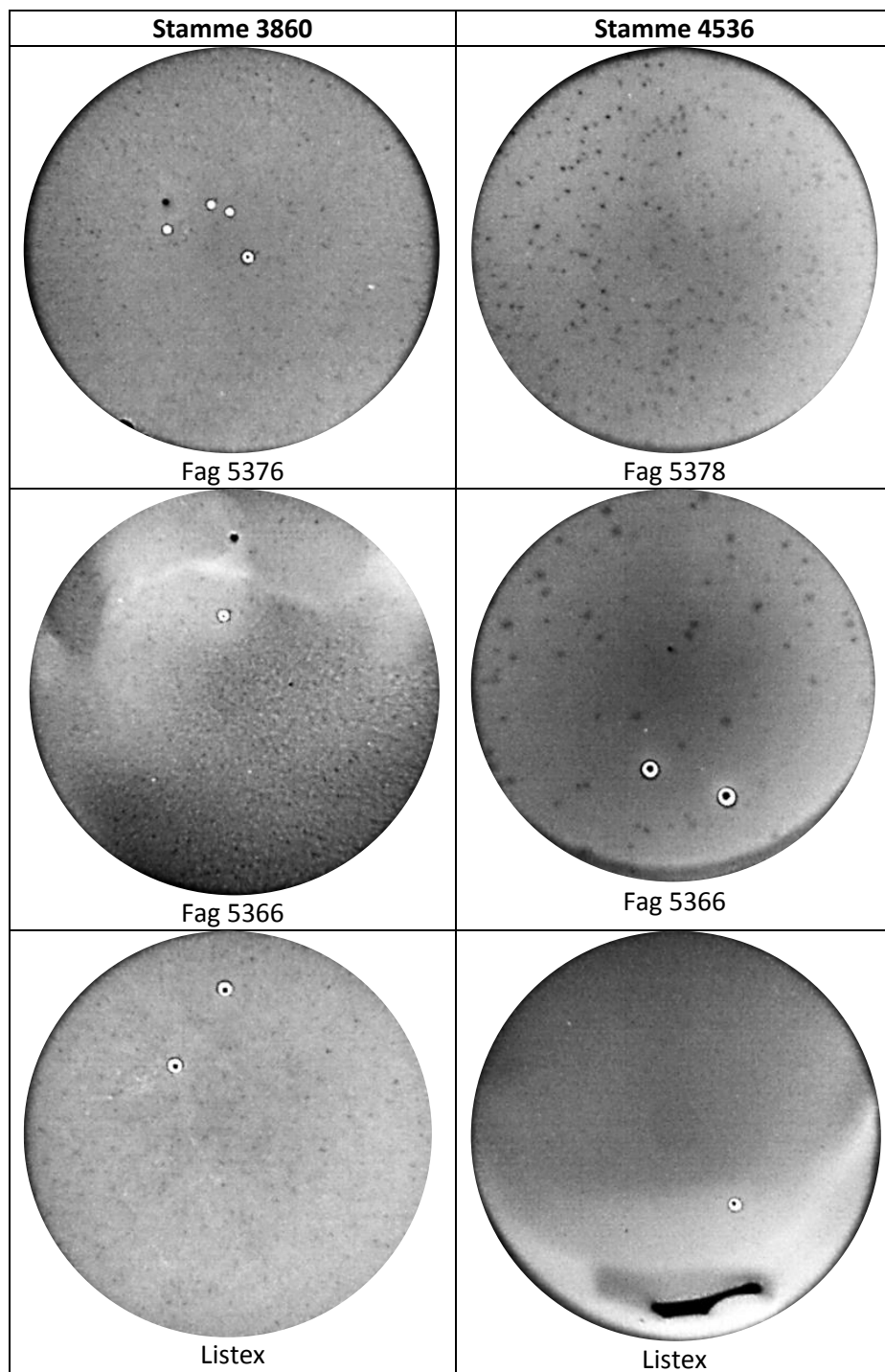
Siden mitomycin C virker på flere bakteriofager kan hver fagsuspensjon inneholde flere fag enn kun den fra *comK*. Dermed kan det bety at noen av plakkene kan være på grunn av andre fag.

I tillegg til isolatene i Tabell 6 ble også fire isolater fra MLVA profil I og tre isolater fra profil N testet mot fagene isolert fra sine respektive profiler. Alle disse ble forsøkene gav negative resultater, noe som indikerte at isolatene ikke lot seg infisere med fagene som ble brukt.

En tidsserie av assayet som viser når plakkene ble synlige er vist i vedlegget.



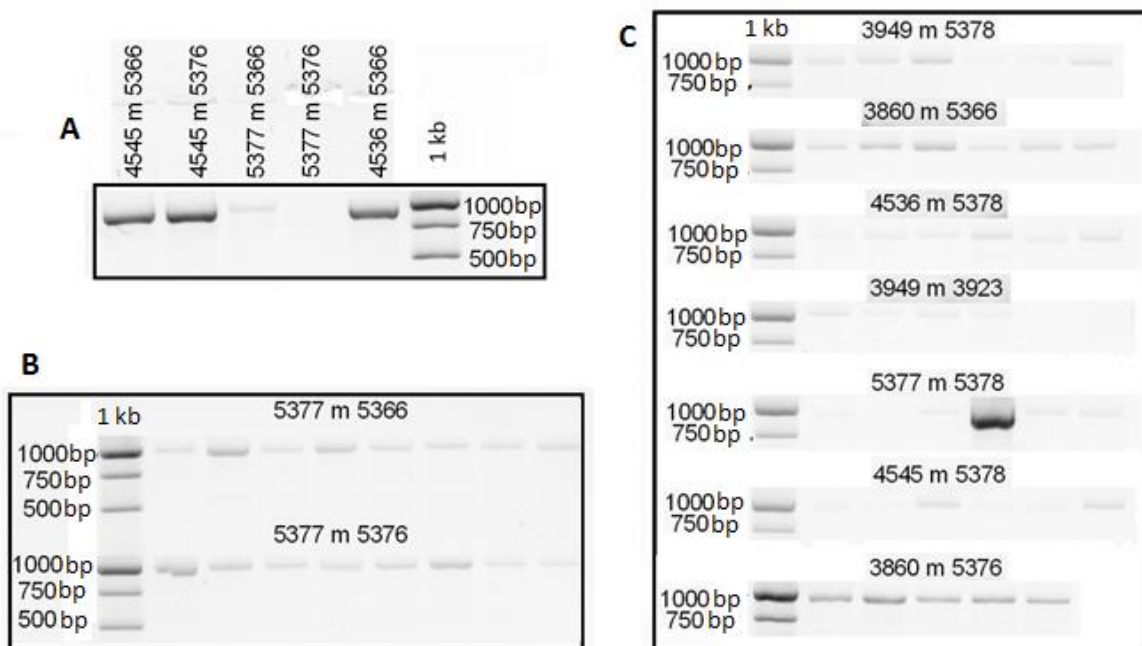
Figur 5. Bilder av skåler med tre *L. monocytogenes* stammer inkubert med fire fag isolert fra andre stammer. Disse er tatt etter 3 dager inkubering på 30°C. De svarte prikkene er plakk mens de hvite ringene er luftbobler i agarmediet.



Figur 6. Fortsettelse av Figur 5. Disse to stammene ble testet med tre fag isolater.

3.2.3. Finne *L. monocytogenes* stammer med integrert profag i *comK*

For å teste om noen av kombinasjonene som dannet plakk hadde fått et fag integrert i *comK* ble en plakk fra hver bakterie/bakteriofag kombinasjon ble strøket ut på skål og satt til 30°C inkubering over natten som beskrevet i kapittel 2.7. Det ble utført PCR på koloniene fra hver kombinasjon med primere for B fragmentet som beskrevet i materialer og metoder 2.3.

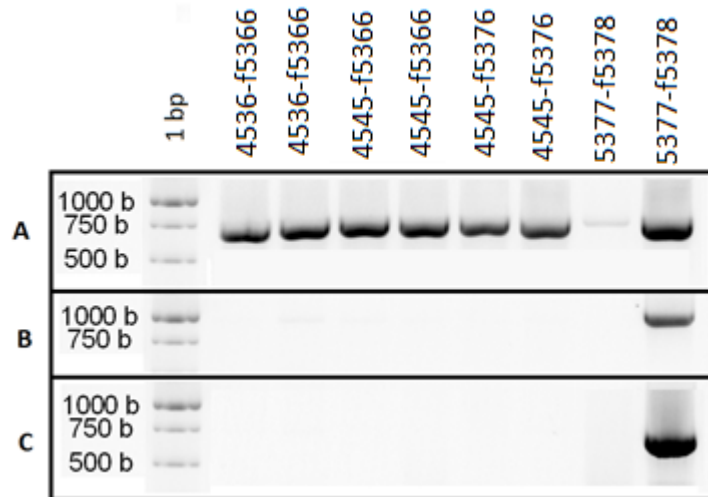


Figur 7. Gelbilder av PCR produktene for B fragmentet fra de *L. monocytogenes* bakterie/bakteriofag kombinasjonene som produserte plakk. 4545 m 5366 betyr at *L. monocytogenes* isolat 4545 ble inkubert med fag isolert fra 5366. A: Det ble kun utført PCR på én koloni fra hver stamme/fag kombinasjon. B: På grunn av negativt PCR produkt i 5377 m 5366 og 5377 m 5376 ble flere kolonier testet fra de to kombinasjonene. C: Seks kolonier fra hver kombinasjon ble testet for B fragment unntatt 3860 m 5376 som bare fikk fem kolonier på BHI skålen.

For 4 av 12 kombinasjoner så gav PCR reaksjonen et produkt av den forventede størrelse (Figur 7), noe som indikerer at fagen som ble brukt for å infisere isolaten hadde blitt integrert i *comK attB* setet.

Resultatene i Figur 7 tilsier at isolat 4545 har fått en profag i *comK* fra isolat 5366 og en fra 5376, isolat 4536 har fått profag fra 5366 og isolat 5377 har fått en profag fra isolat 5378. Disse nye stammene blir kalt 4545-f5366, 4545-f5376, 4536-f5366 og 5377-f5378.

Før det neste steget i oppgaven skulle bli tatt, å teste påvirkningen av profag i *comK* mot fenotypen til *L. monocytogenes*, ble det bestemt at de nye stammene burde bli dobbelsjekket for å være sikre på at infiseringen var vellykket. Det ble utført en PCR for A, B og C fragment på de nylig infiserte stammene i henhold til kapittel 2.3.



Figur 8. De fire stammene som så langt så ut til å ha fått insatt et fag i *comK* genet ble testet på nytt fra frozen stocks som hadde blitt lagret. To paralleller ble testet fra hver stamme for alle tre fragmentene.

Figur 8 tilsier at de tidligere resultatene i Figur 7 kan ha vært falske siden en kan se at 4536-f5366, 4545-f5366 og 4545-f5376 ikke har et PCR produkt for B eller C fragmentene. Det ble utført en PCR til med samme resultat (data ikke vist).

Konklusjonen så langt er at det er kun stamme 5377-f5378 som skal testes for effekt av profag under ulike forhold.

3.3 Ny informasjon fra helgenomsekvenser

Etter at de foregående forsøkene var gjennomført ble helgenomsekvenser av en del av isolatene som er benyttet i oppgaven utført av forskere på NOFIMA. Ved å søke gjennom genomsekvensene var det mulig å finne ut av om stammene som hadde donert fag hadde flere profag i genomet. Dette kunne forklare at noen fag/isolat kombinasjoner lagde plakk (Tabell 6), men ikke fikk fag integrert i *comK*. Det kan også forklare hvorfor MLVA profil J fikk negative PCR produkter og MLVA profil L ikke fikk noen PCR produkter på fragment C til tross

for positive PCR produkter på fragment B. Helgenomsekvensene ble analysert i CLC Main Workbench 7.5. Tabell 7 viser isolatene som ble helgenomsekvensert.

Tabell 7. Liste over *L. monocytogenes* isolatene som ble helgenomsekvensert og hvilke profag som ble funnet i dem.

MF nr	MLVA	Mottaker/ donor	Type matproduksjon	Anlegg	Persistent /sporadisk	Fag i comK	Fag i Arg- CCG	Fag i Arg- TCT
4536	A	Mottaker	Kjøtt	1	P	-	-	+
4545	A	Mottaker	Kjøtt	2	P	-	-	+
4565	C	Donor	Kjøtt	1	S	+	-	-
5378	G	Donor	Kjøtt	4	S	+	-	-
3638	I		Ost	5	P	-	+	+
3995	I		Laks	7	P	-	+	-
5366	I	Donor	Kjøtt	8	P	+	-	+
5376	I	Donor	Kjøtt	4		+	+	+
NLII_45	I	Mottaker	Kjøtt	4	P	-	-	-
3949	J	Mottaker	Laks	6	P	+	-	-
4245	J		Laks	6	P	+	-	+
5369	J		Kjøtt	8	P	+	-	+
5377	J	Mottaker	Kjøtt	4		+	-	+
5630	K	Donor	Kjøtt	2	S	+	-	-
3853	L	Donor	Laks	11	P	+	-	-
4792	L	Donor	Laks	7		+	-	-
5634	N	Mottaker	Laks	3		-	+	+

Det ble også sjekket for fag i to kjente attB i tillegg (Lys-CTT og EF-Ts), men ingen av de helgenomsekvenserte isolatene hadde forekomst av profag der.

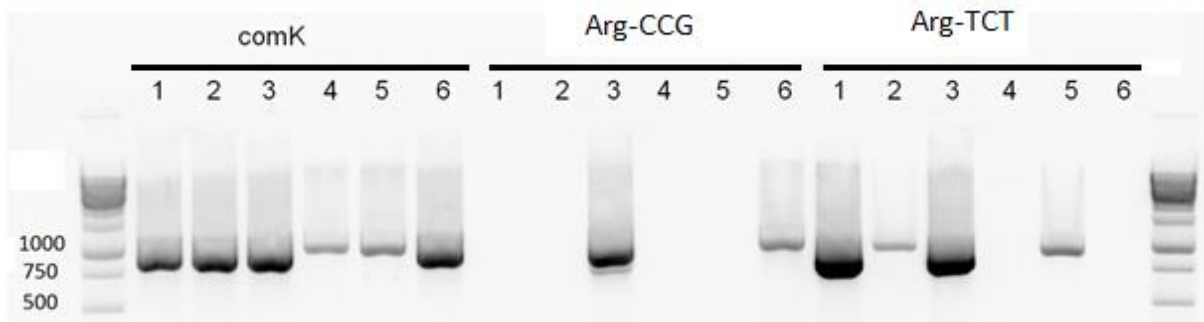
Det er tydelig at flere av donor isolatene hadde flere profag i genomet enn kun den i *comK*. I Tabell 7 kan en se at isolatene kan ihvertfall ha opp til to andre profag i tillegg til den i *comK*.

Fra Tabell 7 kan en se at alle de helgenomsekvenserte sporadiske isolatene kun har profag i *comK*, men flere persistente isolater har også kun profag i *comK*.

En kan se i Tabell 7 at isolatene i MLVA profil J alle har fag i *comK* som er det motsatte av tidligere resultater (Tabell 5).

3.3.1. Forekomst av fag i fagisolatene

Siden mitomycin C inducerer lytisk syklus for alle fag er det mulig at det er andre profag i *L. monocytogenes* stammene enn kun den som er fra *comK*. Etter å ha sett gjennom helgenomsekvensene for de donorene som har en helgenomsekvens ble det oppdaget at donorene kunne ha opp til to andre fag i genomet i tillegg til den i *comK*. For å undersøke hvilke profag som ble isolert under forsøk 3.2.1 ble det laget primere som tilsvarer det som er vist i Figur 1a, men for profag integrert i Arg-CCG og Arg-TCT. Isolering av DNA fra fagsuspensjonene ble utført som forklart i kapittel 2.8. og PCR ble utført som forklart i kapittel 2.3.

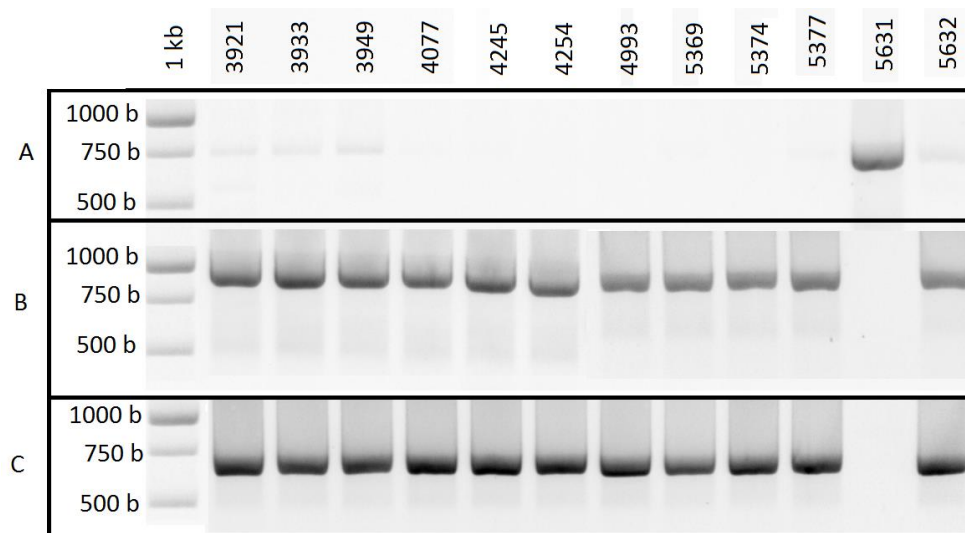


Figur 9. Gelbilde av PCR produktet med primerne Primer B og Primer C, B- Arg-CCG + C-Arg-CCg og B-Arg-TCT + C-Arg-TCT. 1 = 5366, 2 = 5378, 3 = 5376, 4 = 5630, 5 = 3853, 6 = 3923. Standarden som er brukt i rad 1 og 20 er Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Resultatene viser at de fleste fagisolatene har to forskjellige fag, mens isolat 3 (5376) har tre fag og isolat 4 (5630) kun har ett. Disse andre fagene kan ha produsert noen av plakkene på soft agar assayet.

3.3.2. Forekomst av profag i *comK* i MLVA profil J

Primerene fra Verghese et al. 2011 fungerte godt for mesteparten av isolatene som er brukt i denne oppgaven med unntak av de med MLVA profil J. Det ble først antatt at profil J bare ikke hadde fag i *comK*, men da fire J stammer ble helgenomsekvensert viste det seg at de alle fire hadde fag. Etter å ha sett på sekvensen ble det oppdaget at primerene til Verghese et al. 2011 ikke var komplementære til DNA sekvensen i profagen i *comK* i MLVA profil J isolatene. Det ble derfor designet nye primere til å passe spesifikt til dem.



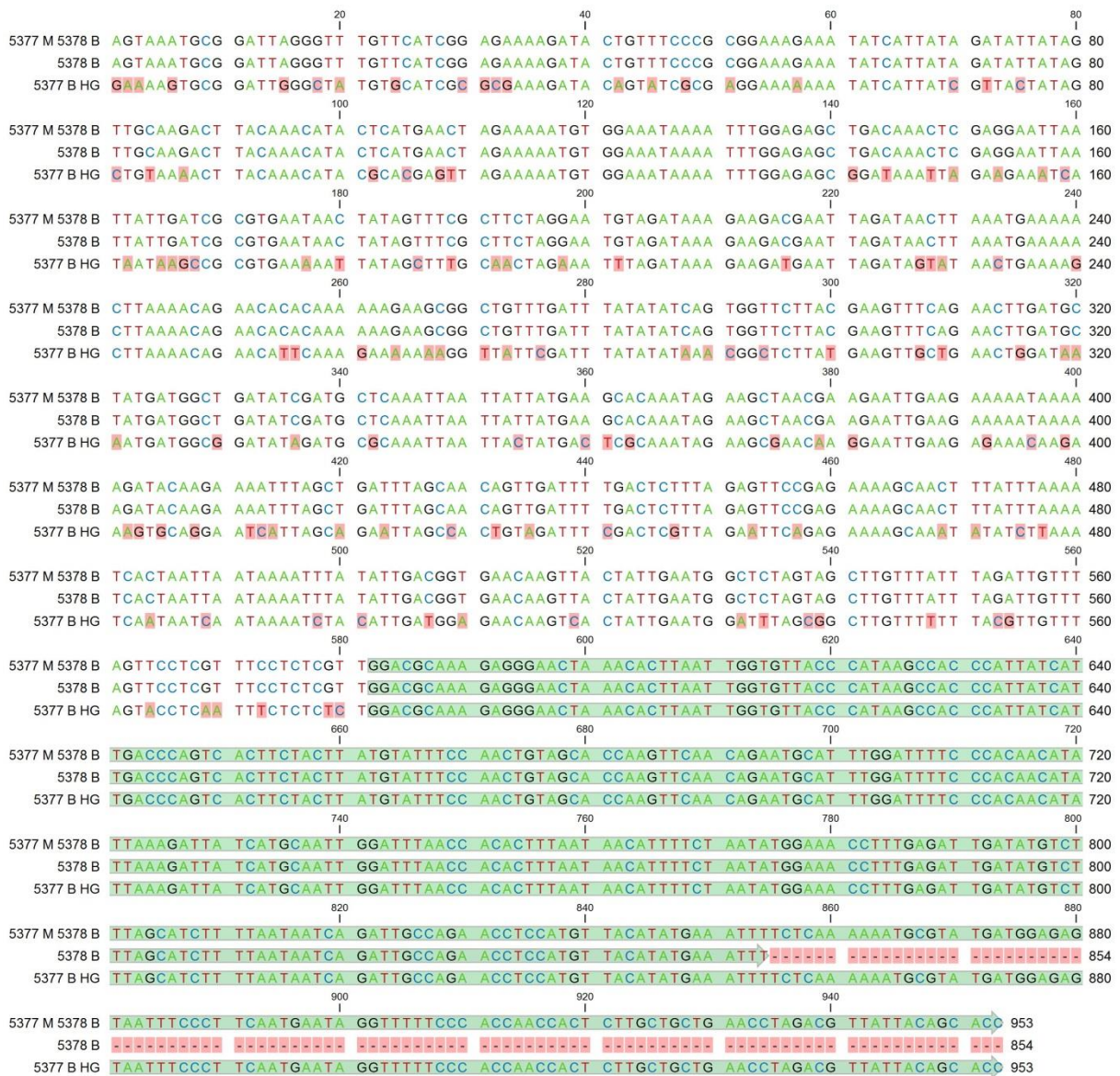
Figur 10. Gel av PCR produktet til A, B og C fragmentene til stammene med MLVA profil J. Primerne for A fragment er JF down fwd og JF up rev, B fragment er JF down fwd og J comK R og C fragment er J comK L og JF up rev. Standarden som er brukt i rad 1 er Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Som en kan se på figur 4 viser det seg at kun *L. monocytogenes* isolat 5631 ikke har profag i *comK* mens resten av de undersøkte isolatene med MLVA profil J har det.

3.3.3. Bekrefte stamme 5377-f5378

Både helgenomsekvenseringen (Tabell 7) og PCR av MLVA profil J med nye passende primere (Figur 10) tyder på at isolat 5377 hadde profag i *comK* alikevel. Dermed må det bekreftes at profagen i 5377-f5378 er fra isolat 5378 og det må bekreftes at kromosomet i 5377-f5378 er isolat 5377.

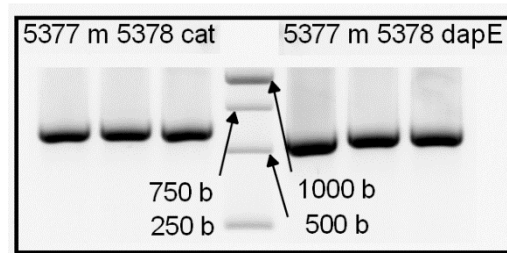
For å bekrefte at profagen som er i 5377-f5378 stammen er fra isolat 5378 ble 5377-f5378 gensekvensert for B fragmentet og sammenliknet B fragmentene til 5377 og 5378.



Figur 11. B sekvensen til 5377, 5378 og 5377-f5378. Det som er markert med grønn er *comK* genot mens resten er fagen, det som er markert rødt er forskjeller mellom sekvensene. 5377 sekvensen er fra helgenomsekvensen (HG).

Resultatene, som vist i Figur 11, bekrefter at fagen i 5377-f5378 er fra 5378 siden det ikke er noen forskjeller mellom de to sekvensene i fagdelen av sekvensen.

Takket være helgenomsekvenseringen kjenner vi til MLST profilene til isolatene 5377 og 5378. Dermed vet vi at *cat* og *dapE* genene skal være forskjellige i de to isolatene. Derfor ble det kjørt PCR for å amplifisere disse to genene som vist i kapittel 2.3. og produktet ble sekvensert som vist i 2.4. Dette er for å påvise at kromosomet i 5377-f5378 er 5377.



Figur 12. Gelbilde av PCR produktet (3 paralleller) til *cat* og *dapE* genene til 5377-f5378. Standarden som er brukt i rad 4 er Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder.

PCR produktene ble sekvensert og sammenliknet med de samme genene i helgenomsekvensene til 5377 og 5378.

```

5378 cat  GCCAGTATTT TTCATTTCGTG 20
5377 cat  GCCAGTATTC TTCATTTCGTG 20
5377m5378 cat  GCCAGTATTC TTCATTTCGTG 20
  
```

Figur 13. 20 nt av *cat* genene til 5378, 5377 og 5377-f5378. Den ene nukleotiden som er markert med rødt er den eneste forskjellen i genene mellom 5377 og 5378.

```

5377m5378 dapE  ACACGGTATT GAGTCCGAAA AGGTACAATA CGACGTAGAC AGAGCCAGCC 50
5378 dapE      ACATGGTATT GAGTCCGAAA AGGTACAATA CGACGTAGAC AGAGCTAGCC 50
5377 dapE      ACACGGTATT GAGTCCGAAA AGGTACAATA CGACGTAGAC AGAGCCAGCC 50
  
```

Figur 14. Sammenlikning av 50 nt av *dapE* genene til 5378, 5377 og 5377-f5378. De to nukleotidene som er merket med rødt er der *dapE* genene er forskjellige for de to stammene 5377 og 5378.

Resultatene som vist i figur 13 og 14 viser at *cat* og *dapE* genene har samme alleler i 5377 og 5377-f5378. Sammen med resultatene i Figur 11 viser dette at isolat 5377 har byttet ut sin opprinnelige *comK* profag med fagen fra stamme 5378.

3.4. Vekst under ulike betingelser for *L. monocytogenes*

For å se om 5377 isolatet har blitt fenotypisk påvirket av å ha en annen profag i *comK*-genet ble det utført tester på vekst under ulike stressbetingelser på stammene 5377, 5378, 5377-f5378 og 5634. 5364 ble tatt med som kontroll siden det er det eneste isolatet i dette forsøket uten fag i *comK*. Isolatene ble inkubert i en uke som forklart i kapittel 2.9. Betingelsene isolatene skal utsettes for er vist i Tabell 4.

Tabell 8. Viser ved hvilken verdi vekst ble inhibert.

1 uke inkubering	5377	5378	5377-f5378	5634
NaCl (%)	10	10	10	10
pH	4,5	4,5	4,5	4,5
Bensalkoniumklorid (ppm)	Alle	Alle	Alle	Alle
Temp (°C)	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen
Erytromycin (µg/ml)	Alle	Alle	Alle	Alle
Streptomycin (µg/ml)	32	128	64	64
Kloramfenikol (µg/ml)	8	8	8	8
Penicillin G (µg/ml)	1	2	1	2
Fusidinsyre (µg/ml)	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen

Alle: Alle testede verdier inhiberte vekst av isolatet.

Ingen: Ingen testede verdier inhiberte vekst av isolatet.

Resultatene viser at *L. monocytogenes* isolat 5378 har høyere resistens mot streptomycin enn 5377 og at 5377-f5378 har en resistens verdi som er imellom dem.

For å bekrefte resultatet ble testen for de tre isolatene 5377, 5378 og 5377-f5378 utført på nytt med mindre intervaller av streptomycin konsentrasjon.

Tabell 9. Viser den laveste konsentrasjonen som har inhibert vekst til *L. monocytogenes* isolatene.

MIC etter 1 uke innkubering	5377	5378	5377-f5378
Streptomycin (µg/ml)	48	80	48

Den nye inhiberingstesten viser at isolat 5377 og 5377-f5378 har lik resistens mens 5378 fortsatt har betydelig høyere resistens enn dem begge (Tabell 9).

4. Diskusjon

4.1. Forekomst av profag i stammer fra forskjellige kilder

Det aller første som ble gjort for denne oppgaven var å bestemme hvilke av de 42 utvalgte *L. monocytogenes* isolatene hadde profag i *comK*-genet. Dette ble gjort ved å amplifisere A, B og C fragmentene (Figur 1) med PCR og så kjøre produktet på gelelektroforese. De stammene som fikk et sterkt bånd på gelelektroforesen på enten B eller C fragment blir ansett som infisert av profag i *comK*-genet. Resultatene sett i Tabell 5 viser at 18 av de 42 *L. monocytogenes* stammene har dette profaget.

Det ble først antatt, i starten av arbeidet med denne oppgaven, at et *L. monocytogenes* isolat enten ville få et produkt på fragment A eller et produkt på fragment B og C, men ikke både og. Resultatene mine (Tabell 5) viser at for flere isolater fikk jeg positivt produkt for alle tre fragmentene. Det kan indikere at i en koloni med *L. monocytogenes* stammer så har noen bakterier profag i *comK* mens andre har ikke. Rabinovich et al. [22] oppdaget at noen bakterier i stasjonær fase tvinger profagen i *comK* ut av kromosomet og kolonien blir en miks av bakterier med profag og bakterier uten profag i en likevekt. Dette kan forklare de isolatene som fikk PCR produkt på A, B og C fragment. En annen forklaring kan være at et av isolatene med profag i *comK* har kontaminert et uten profag. Dette vil resultere i positivt PCR resultat for alle fragmentene.

PCR produktene ble senere sekvensert og inndelt i sekvenstyper. Sekvenstypene korrelerer helt med MLVA profilen til stammene, med unntak av stammene i profil L hvor to stammer, 4385 og 4792 har en sekvenstype (B2) som er forskjellig fra resten av stammene i den samme profilen (B1). Hvis en sammenlikner Tabell 2 og Tabell 5 kan en se at de to stammene som har sekvenstype B2 kommer fra samme anlegg. Dette støtter Verghese et al. sin modell om bruk av overgangsområder mellom *comK* og profag i *comK* til subtyping av *L. monocytogenes*.

MLVA profilene O, M, K og G og profilene A, C og M har forholdsvis de samme sekvenstype A2 og A5 på A fragmentet. Det betyr at de har samme sekvens i dette området av *comK*. Dette er ikke uventet med tanke på hvor konservert genomet til *L. monocytogenes* er [20].

Det ser ikke ut til at det er noe sammenheng mellom overgangsområder mellom *comK* og profag i *comK* og hvilken type kjøtt anlegget arbeider med (Tabell 2 og Tabell 5). Siden det kun er MLVA profil I som har isolater fra hver type kjøttproduksjon (4 laks og 6 kjøtt) og som har blitt sekvensert mener jeg det ikke er statistisk betydelig til å kunne konkludere noe. Det kan godt hende at det er mulig å skille mellom produksjonstypene med overgangsområdene i *comK* i en annen MLVA profil, men det går ikke an å trekke den konklusjonen med resultatene fra denne oppgaven.

Det er også vanskelig å trekke noen konklusjoner om forskjeller mellom presistente og sporadiske stammer siden kun fire av de 42 stammene som er brukt i oppgaven er definert som sporadiske: 4565, 4627, 5378 og 5630. De er også de eneste eksemplarene av hver sin MLVA profil C, F, G og K så det er ikke mulig å sammenligne de innad i en MLVA profil.

4.2. Egner fag-sekvenser seg for typing av stammer?

Genomet til temperate profag i *L. monocytogenes* har en mye høyere rate av forandring enn genomet til selve bakteriestammen [7]. Dette kan en observere av sekvenstypene i Tabell 5 i resultatene. Det er noen MLVA profiler som har identiske A fragmenter (G, K, N, O) dvs hele den delen av *comK* genet er likt, mens det er ingen B eller C fragmenter som er like i forskjellige MLVA profiler. Dermed er overgangsområdene i hvertfall egnet til å skille mellom MLVA profiler.

Som nevnt har to *L. monocytogenes* stammer i MLVA profil L forskjellig B fragment fra de andre fem stammene og de kommer fra samme anlegg. Dette betyr at sekvensen i overgangsområdet i dette tilfellet ikke bare egnet seg til å skille mellom MLVA profiler, men også til å skille ut to stammer innad i en profil som kom fra et spesifikt anlegg (Tabell 2 og Tabell 5). Riktignok kunne ikke B eller C fragmentene skille ut de to andre anleggene i L profilen eller mellom anlegg innad i andre MLVA profiler. Det kan tenkes at det er mulig å gjøre dette ved å sekvensere en større andel av profagen i fragmentene eller fragmenter som er mer utsatt for polymorfisme.

4.3. Fagflora

Resultatene mine tilsier at det ikke er noe sammenheng mellom fagflora og hva slags kjøtt produksjonsanlegget bearbeider. Resultatene i Tabell 7 viser at flere kjøtt og laks isolater har den samme fagfloraen. To isolater, 3949 og 4245, isolert fra samme anlegg som bearbeider laks kan en se har forskjellig fagflora. Det virker derfor heller ikke som om fagflora er relatert til hvilket anlegg isolatene er isolert fra. Størst sammenheng i fagflora ser det ut til å være med MLVA profil. I profil J har tre av fire isolater lik fagflora selv om to er fra kjøttanlegg og to er fra laksanlegg.

Når det gjelder persistens kan en se at alle de tre sporadiske isolatene som ble helgenomsekvensert (Tabell 7) kun har profag i *comK*-genet. Det er ikke et stort nok antall isolater til å kunne si om det er et mønster der. I hvertfall når det er flere persistente isolater som også bare har profag i *comK*.

4.4. Primere som ikke er komplementære

Oppsummeringen av PCR resultatene i Tabell 5 viser at alle stammene i MLVA profil J verken har profag i *comK*-genet eller et *comK* gen i det hele tatt. Etter å ha sett gjennom helgensomsekvensene oppdaget jeg at primerne som blir brukt for amplifisering av B og C fragmentene ikke er komplementære for profagen i *comK* i MLVA J profilen. Det er sannsynlig at denne profilen da har en forskjellig profag i *comK* genet og dermed vil ikke primerne binde seg. Det ble laget nye primere, J-comK-L og J-comK-R, som er spesifikke for profagen i MLVA profil J for å erstatte Primer C og Primer B. De nye primerne ble brukt sammen med de to i *comK*-genet for å lage nye PCR produkter for alle fragmentene av alle *L. monocytogenes* stammene i MLVA J profilen. I resultatene (Figur 10) kommer det tydelig frem at nesten alle *L. monocytogenes* stammene i MLVA profil J har profag i *comK* siden de alle fikk bånd med den forventede størrelsen på B og C fragmentet. Den eneste stammen som ikke fikk bånd på B og C, men fikk på A fragmentet er 5361 som indikerer at den ikke har profag i *comK* genet. Dette stemmer med resultatene i Tabell 5 hvor 5631 var den eneste stammen i profilen som fikk et klart produkt på A fragmentet.

MLVA profil L hadde noe av det samme problemet da PCR produktet for alle B fragmentene var positive mens alle C fragmentene var negative (Tabell 5). En gjennomgang

av helgenomsekvensene for de to isolatene fra L profilen (3853 og 4792) viste at Primer C ikke var komplementær for profagen i *comK* i den profilen. Dermed fikk jeg aldri noe C fragment. Jeg bestemte at det ikke var nødvendig å lage primere til denne profilen også siden positive B fragmenter bekrefter tilstedeværelsen av profag i *comK*-genet.

4.5. Infisering av stammer uten profag med fag

For å isolere fagpartikler fra *L. monocytogenes* så måtte de induseres til lytisk syklus. Dette er vanligst å gjøre med UV stråling eller med mitomycin C og jeg valgte mitomycin C fordi det er lettere og mer effektivt [48].

Resultatene i Tabell 6 viser at 17 av 30 kombinasjoner mellom fagisolat og *L. monocytogenes* isolat resulterte i plakk. Det vil si at i nesten halvparten av kombinasjonene greide ikke fagpartiklene å drepe bakteriene. Resultatene viser også at det ikke er noen sammenheng mellom MLVA profilen fagen ble isolert fra og MLVA profilen til bakterien som blir infisert (Tabell 6).

Mengde plakk på soft agar assayet (Figur 5 og 6) ser ut til å variere basert på både hvilken stamme fagene ble isolert fra og hvilken stamme som blir infisert. Fagsuspensjon 5378 produserer mye plakk i kombinasjon med stamme 3949, 4545 og 5378, men relativt få med stamme 4536. Suspensjon 5366 produserer mye plakk med stamme 3949, veldig få og forholdsvis store plakk med 4545 og 4536 og få, små med 3860 og 5377. Dette kan være på grunn av at mottaker stammene har profag i noen av setene (*comK*, Arg-CCG, Arg-TCT) og dermed har homoimmunitet mot en lignende eller relatert fag [5].

Listex påstår at produktet deres er vil drep 100% av en sensitive *L. monocytogenes* stamme den kommer i kontakt med [49]. I dette forsøket ble 3 av 21 stammer ikke påvirket av Listex i det hele tatt og de som ble påvirket ble aldri utryddet 100% (Figur 5 og Figur 6). Listex løsningen som ble brukt hadde derimot gått over et år ut på dato i henhold til datomarkeringen på flaska.

Etter at flere av *L. monocytogenes* stammene ble helgenomsekvensert ble det innsett at mange stammer har mer enn en profag i genomet. Det ble designet nye primere for å amplifisere området rundt attP som vist i det første bildet "A. Fag" i Figur 1 i materialer og metode for å se hvilke fag suspensjonen inneholdt. Resultatene i figur 7 viser at fire av fag-

suspensjonene har to fag, en har tre fag og en har ett. Noen av båndene er svake, det kan være fordi det er relativt få fag i suspensjonen, eller så kan det være fordi primerne er usepsifikke i de stammene.

Interessant at fag-suspensjon 5630 kun har ett svakt bånd i *comK* (Figur 7) og den lagde ikke plakk med noen mottaker stamme som ble testet (Tabell 2). Det kan indikere at mesteparten av plakkene på soft agarskålene har blitt dannet på grunn av en annen fag enn den i *comK*-genet.

4.6. Er det noen effekt av fagbytte

Resultatene i forsøket for vekst under ulike betingelser viste først en økning i streptomycin resistens i 5377-f5378 i forhold til 5377, men en ny test viste ingen økning. 5378 er mer resistent mot streptomycin enn 5377, 5377-f5378 og 5634. 5378 og 5634 er mer resistente mot penicillin G enn 5377 og 5377-f5378. Utenom de to forskjellene er alle verdiene helt like for alle fire *L. monocytogenes* isolatene.

5. Konklusjon og forslag til videre arbeid

For å teste konsepter som persistente og sporadiske *L. monocytogenes* opp mot hvilken type kjøtt produksjonsanlegget arbeider med så trengs det mange flere isolater og større variasjon enn 4 sporadiske av 42 isolater for å kunne få et statistisk relevant resultat.

Typing av *L. monocytogenes* isolater gjennom overgangsområder har vist seg i denne oppgaven å være marginalt bedre enn konvensjonell MLVA typing. I og med at det viste seg å være mulig å skille ut et produksjonsanlegg gjennom B fragmentet så indikerer det at den typingsmetoden har høyere resolusjon enn MLVA. Med flere isolater eller større fragmenter er det ikke umulig at det blir en mer brukt metode enn MLVA.

På en annen side blir helgenomsekvensering blir stadig billigere og kjappere og datakraft stiger eksponensielt hvert år så vil det ikke ta lang tid til nesten alle andre typingsmetoder blir unødvendige. Helgenomsekvensering har fordelen med at det

6. Referanser

1. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, et al. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(1):136-138. doi:10.3201/eid1601.091155.
2. Gründling A, Burrack LS, Bouwer HGA, Higgins DE. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(33):12318-12323. doi:10.1073/pnas.0404924101.
3. Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*. 2010;11:120. doi:10.1186/1471-2164-11-120.
4. Dorscht J, Klumpp J, Biemann R, et al. Comparative Genome Analysis of *Listeria* Bacteriophages Reveals Extensive Mosaicism, Programmed Translational Frameshifting, and a Novel Prophage Insertion Site . *Journal of Bacteriology*. 2009;191(23):7206-7215. doi:10.1128/JB.01041-09.
5. Hagens S, Loessner MJ. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:159. doi:10.3389/fmicb.2014.00159.
6. Forterre P. Defining Life: The Virus Viewpoint. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 2010;40(2):151-160. doi:10.1007/s11084-010-9194-1.
7. Verghese B, Lok M, Wen J, et al. *comK* Prophage Junction Fragments as Markers for *Listeria monocytogenes* Genotypes Unique to Individual Meat and Poultry Processing Plants and a Model for Rapid Niche-Specific Adaptation, Biofilm Formation, and Persistence . *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(10):3279-3292. doi:10.1128/AEM.00546-11.
8. Gillespie IA, McLauchlin J, Grant KA, et al. Changing Pattern of Human Listeriosis, England and Wales, 2001–2004. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12(9):1361-1366. doi:10.3201/eid1209.051657
9. Andersen FW, Lange H, Nygård K, Vold L, Wester AL, Kapperud G. Årsrapport Næringsmiddelbårne infeksjoner i 2012. Nasjonalt folkehelseinstitutt Mai 2013.
10. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(3):584-640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
11. Raya RR, Hebert EM. (2009). Isolation of phage via induction of lysogens. *Methods Mol. Biol*. 501:23–32. .10.1007/978-1-60327-164-6_3
12. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their Genomes. *Current opinion in virology*. 2011;1(4):298-303. doi:10.1016/j.coviro.2011.06.009.
13. Pope WH, Bowman CA, Russell DA, et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. Kolter R, ed. *eLife*. 2015;4:e06416. doi:10.7554/eLife.06416.
14. Zink R, Loessner MJ. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(1):296-302.
15. Zimmer, M., E. Sattelberger, R. B. Inman, R. Calendar, M. J. Loessner. Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed + 1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol. Microbiol*. 2003;50:303-317. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03684.x
16. Loessner MJ. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(3):882-884.
17. Loessner MJ, Busse M. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(6):1912-1918.)
18. Loessner MJ, Estela LA, Zink R, Scherer S. Taxonomical Classification of 20 Newly Isolated *Listeria* Bacteriophages by Electron Microscopy and Protein Analysis. *Intervirology* 1994;37:31-35 DOI:10.1159/000150353

19. **Loessner MJ, Inman RB, Lauer P, and Calendar R.** 2000. Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol. Microbiol.* 35:324-340. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01720.x
20. Novichkov PS, Wolf YI, Dubchak I, Koonin EV. Trends in Prokaryotic Evolution Revealed by Comparison of Closely Related Bacterial and Archaeal Genomes . *Journal of Bacteriology.* 2009;191(1):65-73. doi:10.1128/JB.01237-08.
21. Zink R, Loessner MJ, Scherer S. (1995) Characterization of cryptic prophages (monocins) in *Listeria* and sequence analysis of a holin/endolysin gene. *Microbiology.* 1995 Oct;141 (Pt 10):2577-84.
22. Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Nir-Paz R, Herskovits AA. Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell.* 2012 Aug 17;150(4):792-802. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.036.
23. Gray MJ, Freitag NE, Boor KJ. How the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde . *Infection and Immunity.* 2006;74(5):2505-2512. doi:10.1128/IAI.74.5.2505-2512.2006.
24. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42(8):3819-3822. doi:10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.
25. Nadon CA, Trees E, Ng LK, Moller NE, Reimer A, Maxwell N, et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. 2013 Euro Surveill 18: pii = 20565 doi:10.2807/1560-7917.es2013.18.35.20565)
26. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol.* 2006 Jun;55(Pt 6):645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0
27. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115
28. Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91
29. Loessner MJ, Goepl S, Busse M. Comparative inducibility of bacteriophage in naturally lysogenic and lysogenized strains of *Listeria* spp. by U.V. light and Mitomycin C. *Lett Appl Microbiol.* 1991;12:196–9.
30. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüssow H. (2003). Prophage Genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), 238–276. doi:10.1128/MMBR.67.2.238-276.2003
31. Freeman VJ. (1951). STUDIES ON THE VIRULENCE OF BACTERIOPHAGE-INFECTED STRAINS OF CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE. *Journal of Bacteriology*, 61(6), 675–688.
32. Mekalanos JJ, Waldor MK. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996 Jun 28;272(5270):1910-4
33. Borezee, E., Msadek, T., Durant, L., & Berche, P. (2000). Identification in *Listeria monocytogenes* of MecA, a Homologue of the *Bacillus subtilis* Competence Regulatory Protein. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5931–5934
34. van Belkum A. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. (1999) *Cell Mol Life Sci.* 1999 Nov 30;56(9-10):729-34.
35. Vergnaud G, Pourcel C. (2009). Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *Methods Mol Biol.* 2009;551:141-58.
36. Chenal-Francois, V., Diancourt, L., Cantinelli, T., Passet, V., Tran-Hykes, C., Bracq-Dieye, H., ... Brisse, S. (2013). Optimized Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Assay and Its Complementarity with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing for *Listeria monocytogenes* Clone Identification and Surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1868–1880. doi:10.1128/JCM.00606-13
37. MLVA Homepage <http://www.mlva.net/default.asp>.

38. Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... 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*, 95(6), 3140–3145.
39. Zhang, W., Jayarao, B. M., & Knabel, S. J. (2004). Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 913–920. doi:10.1128/AEM.70.2.913-920.2004
40. 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*, 74(12), 5463–5467.
41. Doyle, M. P. & Beuchat, L. R. (2007). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press. 1038 s.: s. 14, s. 457-492
42. Lappi, V. R., J. Thimothe, K. K. Nightingale, K. Gall, V. N. Scott, and M. Wiedmann. 2004. Longitudinal studies on *Listeria* in smoked fish plants: impact of intervention strategies on contamination patterns. *J. Food Prot.* 67:2500–2514.
43. Carpentier, B., Cerf, O. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. (2011). *Int J Food Microbiol*, 145 (1): 1-8.
44. Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Korkeala, H., 2003. Adaptive and crossadaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* 82, 265–272.
45. Lundén, J.M., Miettinen, M.K., Autio, T.J., Korkeala, H.J., 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection* 63, 1204–1207.
46. Larsen, M. H., Dalmasso, M., Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., ... & Jordan, K. (2014). Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44, 92-109.
47. Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., de la Fuente, L., & Vázquez, J. A. (2003). Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 757–762. doi:10.1128/JCM.41.2.757-762.2003
48. Loessner M. J., Goeppl S., Busse M. 1991. Comparative inducibility of bacteriophage in naturally lysogenic and lysogenized strains of *Listeria* spp. by u.v. light and mitomycin C. *Lett. Appl. Microbiol.* 12:196–199
49. Microeos Food Safety hjemmesiden <http://www.micreosfoodsafety.com/images/PDS-LXP100-0607%20E.pdf>



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no