

Kan
Providencia alcalifaciens
være en primærpatogen bakterie ved diaré hos hund?

Bacheloroppgave

Aud Kari Fauske og Marit Næve Hirsch
Bioingeniørutdanningen ved Høgskolen i Oslo, Kull 03
Norges veterinærhøgskole 2006

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Forord	3
Innledning	5
Materiale og metode	6
Stammebeskrivelse	6
Identifisering av stammene	7
Antibiotikaresistenstesting	7
Genotyping	8
Pulsfelt gel elektroforese (PFGE):	8
Randomisert amplifisert polymorf DNA-PCR (RAPD-PCR):	8
Plasmidisolering	9
Kado & Liu:	9
Quiagen Miniprep Kit:	9
Invasjonsstudier	10
Design 1:	10
Design 2:	10
Resultater	12
Identifisering av stammene	12
Antibiotikaresistenstesting	13
Genotyping	14
Pulsfelt gel elektroforese (PFGE):	14
RAPD-PCR:	15
Plasmidisolering	16
Kado & Liu:	16
Qiagen Miniprep Kit:	17
Invasjonsstudier	18
Design 1:	18
Design 2:	19
Drøfting	20
Konklusjon	24
Diskusjon av oppgaven	26
Litteraturliste	27
Vedlegg	29

Sammendrag

”Kan *Providencia alcalifaciens* være en primærpatogen bakterie ved diaré hos hund?”

Forfattere: Aud Kari Fauske og Marit Næve Hirsch. Veileder: Trine L’Abée-Lund.

Betydningen av *P.alcalifaciens* ved enteritter hos hund er omdiskutert. Bakteriologisk rutinelaboratorium ved Norges veterinærskole har høsten 2005 isolert *P. alcalifaciens* fra seks hunder som representerer fem forskjellige miljøer. Bakterien ble isolert i riklige mengder fra hunder med diaré.

Slektskap mellom de isolerte stammene og bakteriens evne til å invadere celler er blitt undersøkt i oppgaven. For å sammenlikne genotypen til stammene har vi utført Pulsfelt Gelelektroforese og RAPD-PCR. Tre av stammene viser samme DNA-båndmønster. For å isolere plasmid har vi brukt Kado & Lius plasmidisoleringsmetode og Quiagen Miniprep kit. Alle stammene hadde stort plasmid. To cellelinjer, HeLa og Vero, ble benyttet i celleinvasjonsstudene. Både kvantitative undersøkelser og visuell vurdering viser at *p.alcalifaciens* har evnen til å invadere celler.

Resultatet av dette studiet peker i den retning at *P. alcalifaciens* kan være en primærpatogen bakterie ved diaré hos hund.

Forord

Oppgaven vi har skrevet er et prosjekt for Norges veterinærhøgskole (NVH). Bakteriologisk rutinelaboratorium ved NVH har høsten 2005 isolert *Providencia alcalifaciens* fra seks hunder som representerer fem forskjellige miljøer. I tidligere publiserte artikler på området er det ikke gjort molekylære studier eller virulensstudier av bakterien. Vi har sett på eventuelle slektskap mellom de isolerte stammene. Dersom det er slektskap mellom stammene, det vil si at det er en klonal spredning av agens, kan dette styrke vektleggingen av *P. alcalifaciens* som en primærpatogen bakterie. I tillegg har vi studert bakteriens evne til å invadere celler, da dette er en viktig virulensfaktor hos tarmpatogener. Tilsvarende studier er tidligere gjort med stammer av *Providencia* arter som er isolert fra mennesker, og det har vist seg at det er stammevariasjoner med hensyn til evne til å invadere celler.

Målet er at våre resultater og erfaringer skal brukes videre i utvidede studier av temaet. Som problemstilling for vår oppgave har vi valgt:

”Kan Providencia alcalifaciens være en primærpatogen bakterie ved diaré hos hund?”

For å besvare problemstillingen best mulig har vi brukt flere metoder under arbeidet. Vi har vurdert hva som er blitt gjort før, både på stammer isolert fra hund og humane stammer. Valg av metoder er basert på tidligere studier av bakterien og hva vi har hatt tid, økonomi og kunnskap til. Hovedmetoden er Pulsfelt gelelektroforese (PFGE). Ulike stammer har ulikt antall og ulik lengde på DNA fragmentene som dannes etter spalting med restriksjonsenzym. Ved å sammenligne genotypen, DNA-mønsteret, kan man skille mellom ulike stammer. For å kunne diskutere PFGE-resultatene opp mot noe har vi også gjort en randomisert amplifisert polymorf DNA PCR (RAPD-PCR). Dette er en annen metode hvor det etter adskillelse på agarosegel på tilsvarende måte dannes karakteristiske båndmønstre som er spesifikke for en stamme. I noen artikler hevdes det at invasjonsegenskapen til bakterien er assosiert med store plasmid [1]. Vi har derfor isolert plasmid med to ulike metoder; Kado & Liu best egnet for isolering av store plasmid og Qiagen plasmid isoleringskit, best på isolering av små plasmid. Så vidt oss bekjent er det ikke tidligere gjort virulens testing av *P. alcalifaciens* av stammer isolert fra hund. Vi har derfor foretatt invasionsstudier av bakterien, der vi har sett på

bakteriens evne til å invadere celler. To cellelinjer ble brukt i vårt studie, HeLa-celler og Vero-celler. Invasjonsevnen er både vurdert visuelt i lysmikroskop og vi har målt antall intracellulære bakterier ved å telle bakteriekolonier etter utplating på LB-skåler. Vi har også utført antibiotikaresistenstesting på stammene og samlet inn sykehistorien i hvert enkelt tilfelle.

Først blir utvalget brukt i oppgaven presentert og kliniske opplysninger blir oppgitt. Deretter kommer en kort beskrivelse av metoden benyttet til agardiffusjon, genotyping, plasmidisolering og celleinvasivitetsforsøkene. Fullstendige prosedyrer er lagt med som vedlegg til oppgaven. Resultatene følger kronologisk i henhold til metodedelen. Resultatene blir belyst og drøftet. Oppgaven avsluttes med oppsummeringstabell og konklusjon.

Innledning

Betydningen av *P. alcalifaciens* ved entritter hos hund er omdiskutert. Noen forfattere mener *P. alcalifaciens* kan være en primærpatogen bakterie ved diarétilstander [2], andre mener det er snakk om en sekundær oppblomstring av arten når tarmfloraen er forstyrret av andre årsaker [3]. Det er lite litteratur på området og det som er publisert peker altså ikke i samme retning.

Tarmkanalen hos voksne hunder inneholder omkring 400 ulike arter bakterier, deriblant en del som kan være patogene. Kliniske tegn ved enteritt hos hund kan variere fra mild, selvbegrensende diaré til en potensielt dødelig akutt blodig diaré. Mange av bakteriene som blir regnet som enteropatoogene finnes også i normalfloraen, og det kan derfor være vanskelig å dokumentere at det forligger en bakteriell enteritt som følge av oppblomstring av en enteropatoogen bakterie. Ofte kan bakteriebildet man ser av hund med diaré og hund uten diaré være temmelig like hverandre, noe som gir mikrobiologene et vanskelig utgangspunkt for å stille den etiologiske diagnosen. Molekylære analyser basert på PCR, der man kan gå inn å lete etter kjente virulensfaktorer, kombinert opp mot klinikk, vil gi en sikrere diagnose. I enkelte tilfeller kan man i tillegg bruke serologiske assay for å lete etter toksiner [4].

De vanligste bakteriene som forårsaker enteritter hos hund, enteropatoogene bakterier, er: *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp., *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* og *Escherichia coli* [2].

Det er først i de senere år, fra 1996 og utover, at *P. alcalifaciens* er anerkjent som primærpatogen bakterie hos mennesket. Høsten 2005 ble det isolert uvanlig mange stammer av *P. alcalifaciens* fra hunder med diaré ved NVH. Fordi det finnes få publiserte studier av stammer isolert fra hund, er det behov for å finne ut mer om *P. alcalifaciens* betydning. Formålet med oppgaven er å se på slektskap mellom *P. alcalifaciens* isolert fra hunder med diaré og å se på bakteriens evne til å invadere celler. Påvisning av slektskap og funn av invasivitet vil styrke hypotesen om at *P. alcalifaciens* er en primærpatogen bakterie.

Materiale og metode

Stammebeskrivelse

Bakteriologisk rutinelaboratorium ved NVH har høsten 2005 isolert *P. alcalifaciens* fra seks hunder som representerer fem forskjellige miljøer. Fem av stammene er isolert i en relativt kort periode på bare 4 uker (Tabell 6). Positiv kontroll er *P. alcalifaciens* isolert fra menneske med entrutt etter opphold i utlandet. Negativ kontroll er *E. coli* isolert fra kalv med diaré. Stammene ble dyrket ved 37 grader i 5 % CO₂, på blodagar (5% storfe blod) eller Luria Bertani (LB) buljong dersom ikke annet er oppgitt. Oversikt over stammene og kliniske opplysninger er samlet i egen tabell (Tabell 1).

Tabell 1: Info om stammene

Journal nr	Opphav:	Rase	Kjønn	Født	Klinikk	Bakterie dyrkning
<i>Inkluderte hunder</i>						
703/05	Oslo	Border Terrier	Hann	2005	Blodig diaré	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i> og funn av <i>E. coli</i> og <i>Staphylococcus</i> sp.
730/05	Aurskog	Schæfer	Tispe	2002	Oppkast og diaré. Dehydrert.	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i> og funn av <i>E. coli</i> og, <i>Streptococcus</i> sp Gr. C
752/05	Oslo	Cairn terrier	Hann	2002	Blodig diaré i to døgn	Blandingsflora med rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i>
773/05	Dal	Blanding	Tispe	Ukjent (Valp)	Selvdød (akutt oppkast og diaré)	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i> og funn av <i>Clostridium perfringes</i>
793/05	Dal	Blanding	Tispe	Ukjent	Diaré, oppkast	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i> og funn av <i>E. coli</i> og <i>Enterococcus</i> sp.
922/05	Oslo	Shetland Sheepdog	Hann	1996	Blodig diaré. Temp 39°C	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i> og funn av <i>E.coli</i>
<i>Kontroller:</i>						

Journal nr	Opphav:	Rase	Kjønn	Født	Klinikk	Bakterie dyrkning
175/06	Oslo	Human	Mann	1974	Diaré, abdominal smerte	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i> og funn av <i>E. coli</i> og anarobianter
1067/03	Oslo	Kalv	Ukjent	(<3 d)	Diaré	Rikelig funn av <i>P. alcalifaciens</i>

Identifisering av stammene

For å identifisere stammene har vi brukt BBL[®] Enterotube[™]II (Roche).

Antibiotikaresistenstesting

Metoden som ble benyttet var agardiffusjonsmetode med Mueller Hinton agar, standard medium for antibiotikaresistens-undersøkelser, og Neo Sensitabs[™] (Rosco diagnostica, Taastrup, Danmark). Metoden og avlesning er utført i henhold til anbefalinger fra Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål i Norge (AFA) (Vedlegg 1).

Antibiotika brukt i sensitivitetsundersøkelsen var; Tetracyklin, Gentamicin, Amoxicillin + Klavulansyre, Ampicillin, Cephalexin (1. generasjons cephalosporin), Neomysin, Kloramfenikol, Cefotaxime (3. generasjons cephalosporin), Streptomycin, Enrofloxacin, Sulphonamides og Trimetoprim (Tabell 3).

Genotyping

Pulsfelt gel elektroforese (PFGE):

Agaroseplugger med DNA ble laget som beskrevet av Romesh K. Gautom [5].

Restriksjonsenzym som ble benyttet til kutting av DNA var *Sma*I. DNA fragmentene ble separert i 1,5 % agarosegel (SeaKem Gold Agarose, Cambrex) i 0,5 x Tris-boric acid-EDTA buffer. Kjøreforholdene var 6 V/cm, med pulsøkning fra 4 til 8 sekunder over 12 timer og deretter økning fra 8 til 50 sekunder over 10 timer [6]. Gelen ble farget i etidiumbromid og fotografert i UV-lys. (Vedlegg 2, Bilde 1)



Bilde 1: Agarosegel i pulsfelt elektroforesekar

Randomisert amplifisert polymorf DNA-PCR (RAPD-PCR):

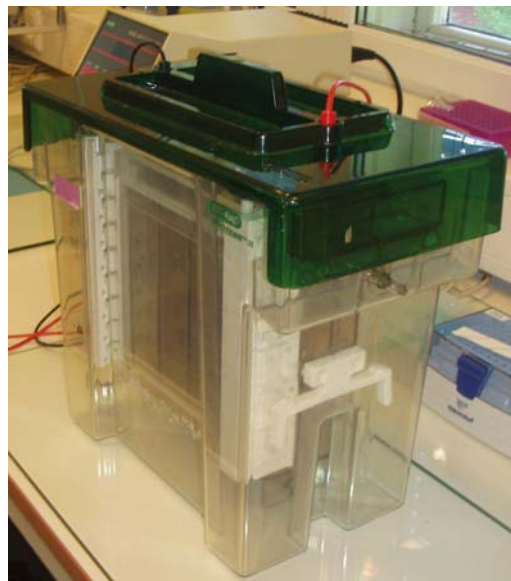
Primer som ble benyttet i PCR amplifikasjonen var 785 5'-CCGCAGCCAA-3' [7].

Amplifikasjonen ble gjort over 30 sykluser, hvor hver syklus bestod av denaturering ved 94°C i 1 min, annealing ved 36°C i 1 min og polymerisering ved 72°C i 2 min, og et avsluttende trinn med 72°C i 7 min [7]. PCR fragmentene ble separert i 1 % agarosegel (SeaKem GTG Agarose, Cambrex) med kjøreforholdene 90 V i 1 time. Agarosegelen ble deretter farget i etidiumbromid og fotografert i UV-lys (Vedlegg 3).

Plasmidisolering

Kado & Liu:

Plasmidisoleringen er utført som tidligere beskrevet av Kado & Liu [8]. Plasmider ble separert ved vertikal gelelektroforese. Separasjonen ble utført i 1 % agarosegel (SeaKem GTG Agarose, Cambrex) ved kjøreforholdene 100 V i 4,5 timer (Bilde 2). Gelen ble farget i etidiumbromid og tatt bilde av i UV-lys (Vedlegg 4).



Bilde 2: Vertikal gelelektroforese av plasmider isolert ved Kado & Liu plasmidisoleringsmetode

Quiagen Miniprep Kit:

Små plasmider ble isolert fra overnatt kulturer ved hjelp av QIAprep Miniprep Kit (Qiagen GmbH Tyskland, 2005). Plasmidene ble separert i 0,7 % agarosegel (SeaKem GTG Agarose, Cambrex) ved horisontal gelelektroforese ved 90 V i 1 time.

Invasjonsstudier

To cellelinjer, HeLa og Vero, ble benyttet (Vedlegg 6,7). To ulike design for invasjonstudier ble utført, og i begge designene ble HeLa-celler og Vero-celler brukt. *E. coli* DH5 er tatt med som negativ kontroll. Alle oppsett ble gjort i duplikat.

Design 1:

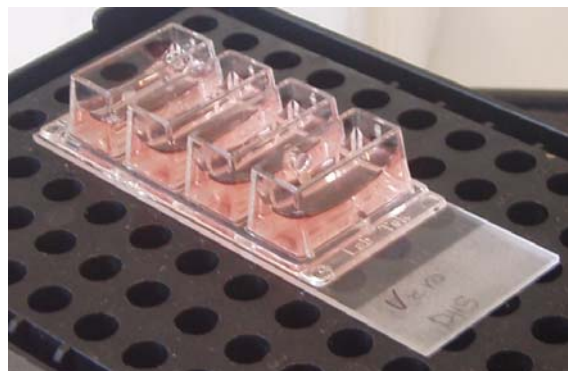
Invasjonsstudiene er tidligere beskrevet av Murata [6]. Cellene ble sådd ut i 24 brønners brett, ca 100.000 celler pr brønn. Brønnene ble tilsatt 10^6 og 10^3 cfu, deretter ble de vasket 3 x med PBS de Boer, og inkubert videre i cellemedium med 100 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin i 2 timer. Etter lysering med 0,1 % Triton X-100 ble antall cfu målt ved utplating på LB-skåler (Bilde 3, Vedlegg 5).



Bilde 3: 24 brønnersbrett

Design 2:

Invasjonsstudiet er tidligere beskrevet av Janda [9]. Celler ble sådd ut i objektglassbrønner, ca 50.000 celler pr brønn.



Bilde 4: Objektglassbrønner

Brønnene ble tilsatt 10^6 og 10^3 cfu og inkubert i 2 timer ved 37°C . Cellemediet ble så avpipettert og brønnene ble vasket med PBS de Boer. Cellene inkuberte videre i cellemedium med $100\ \mu\text{g/ml}$ gentamicin i 3,5 timer. Tilslutt ble cellene fiksert og farget med Dif.Quick. Invasjonsegenskapene ble studert i lysmikroskop ved 1000X forstørrelse (Bilde 4, Vedlegg 5).

Resultater

Identifisering av stammene

Stammene er isolert i et relativt kort tidsrom. Alle stammene oppfører seg likt på blod- og blåskål. Resultatet av Entrotube™ II viser at alle stammene er samme art, *P. alcalifaciens*, til tross for enkelte forskjeller i biokjemiske resultater (Tabell 2).

Tabell 2: Identifisering av stammene

Stamme	Blodskål	Blåskål	Entrotube II		Merknad
			Dato utført	Resultat	
703/05	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	120905	<i>P. alcalifaciens</i> 20604	Citrat -
730/05	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	200406	<i>P. alcalifaciens</i> 20605	Mannitol – Trehalose -
752/05	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	220905	<i>P. alcalifaciens</i> 20604	Citrat -
773/05	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	200406	<i>P. alcalifaciens</i> 20604	Citrat -
793/05	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	151005	<i>P. alcalifaciens</i> 40404 (60404)	Indol – Citrat -
922/05	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	111105	<i>P. alcalifaciens</i> 20604	Citrat -
<i>Kontroller:</i>					
175/06	Gråhvite, middels store kolonier, α -hemolyse	Små blå, god vekst.	230206	<i>P. alcalifaciens</i> 20205	Indol -
1067/03				<i>E. Coli</i>	F5

Antibiotikaresistenstesting

Stammene har omtrent samme resistensmønster og de er hovedsakelig sensitive eller intermediære. For ampicillin og klavulansyre er stammene enten intermediære eller resistente (Tabell 3).

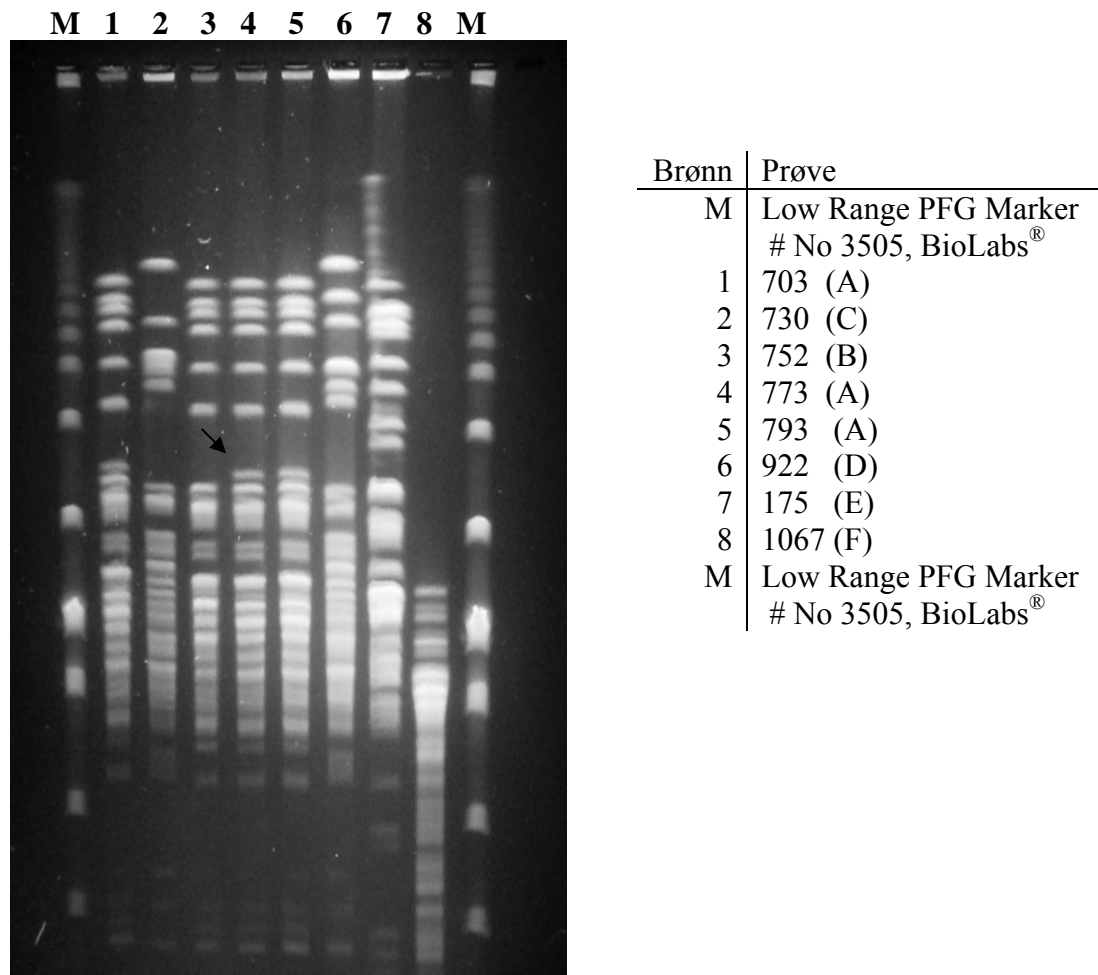
Tabell 3: Sensitivitetsundersøkelse

	Tetracyclin	Gentamicin	Amo + Klav.	Ampicillin	Cephalexin	Neomycin	Kloramfenikol	Cefotaxime	Trimetoprim	Enrofloxacin	Streptomycin	Sulphonamides
#703												
Diameter(mm)	30	32	16	30	28	32	>32	>32	>32	32	32	26
RIS	S	S	R	I	I		S	S	S			
#730												
Diameter(mm)	32	32	26	32	28	28	>32	>32	30	30	30	30
RIS	S	S	I	S	I		S		S			
#752												
Diameter(mm)	32	>32	14	30	26	32	>32	>32	32	32	30	28
RIS	S	S	R	I	I		S	S	S			
#773												
Diameter(mm)	32	>32	14	30	26	32	>32	>32	32	28	30	28
RIS	S	S	R	I	I		S	S	S			
#793												
Diameter(mm)	30	>32	14	30	26	32	>32	>32	32	32	32	26
RIS	S	S	R	I	I		S	S	S			
#922												
Diameter(mm)	30	32	14	30	28	30	32	>32	32	30	32	28
RIS	S	S	R	I	I		S	S	S			
#175												
Diameter(mm)	32	32	24	>32	28	32	32	>32	30	32	32	30
RIS	S	S	I	S	I		S	S	S			
#1067												
Diameter(mm)	0	32	26	0	22	30	30	>32	0	>32	20	0
RIS	R	S	I	R	I		S	S	R			

Genotyping

Pulsfelt gel elektroforese (PFGE):

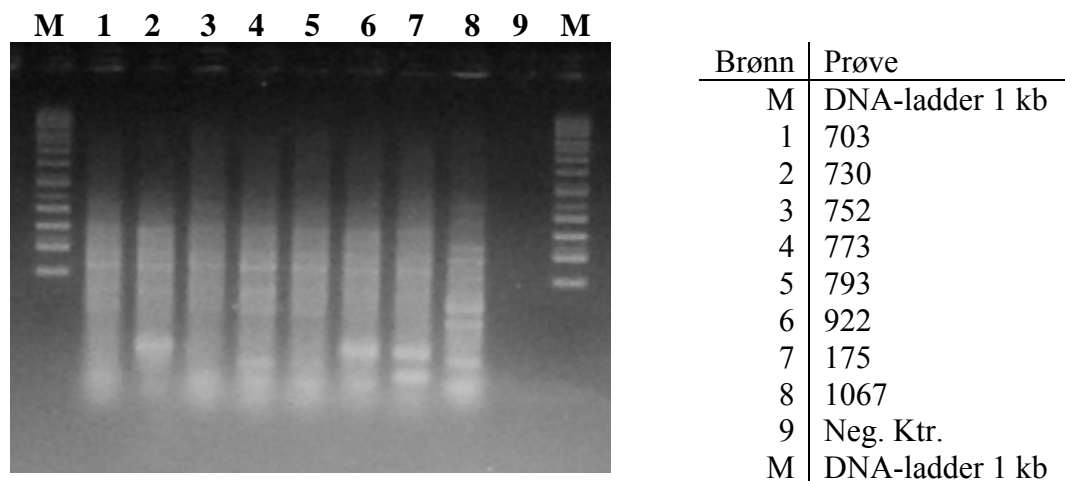
De seks *P. alcalifaciens* stammene fra hund ga 4 ulike båndmønstre: A, B, C og D. Tre av stammene har identisk mønster A, mens en av stammene har mønster B, som bare avviker med ett bånd. De resterende stammene med mønstrene C og D, og kontrollene med mønstrene E og F er vesentlig forskjellig fra mønster A og B. Båndmønstrene er angitt i parentes etter stamnummrene i Figur 1.



Figur 1: Pulsfelt gel elektroforese av genomisk DNA fra *P.alcalifaciens*. DNA fragmentene ble separert i 1,5 % agarosegel i 0,5 x Tris-boric acid-EDTA buffer. Kjøreforholdene var 6 V/cm, med pulsøkning fra 4 til 8 s over 12 timer, og deretter økning fra 8 til 50 s over 10 timer [5]. Båndmønstrene er angitt i parentes etter stamnummeret. Pilen indikerer båndet som skiller mellom mønster A og mønster B.

RAPD-PCR:

Bildet av gelen er av så dårlig kvalitet at det er vanskelig å trekke fram båndmønsteret til de ulike stammene. Man kan antyde at brønn 1, 4 og 5 er like, men det er veldig usikkert (Figur 2).

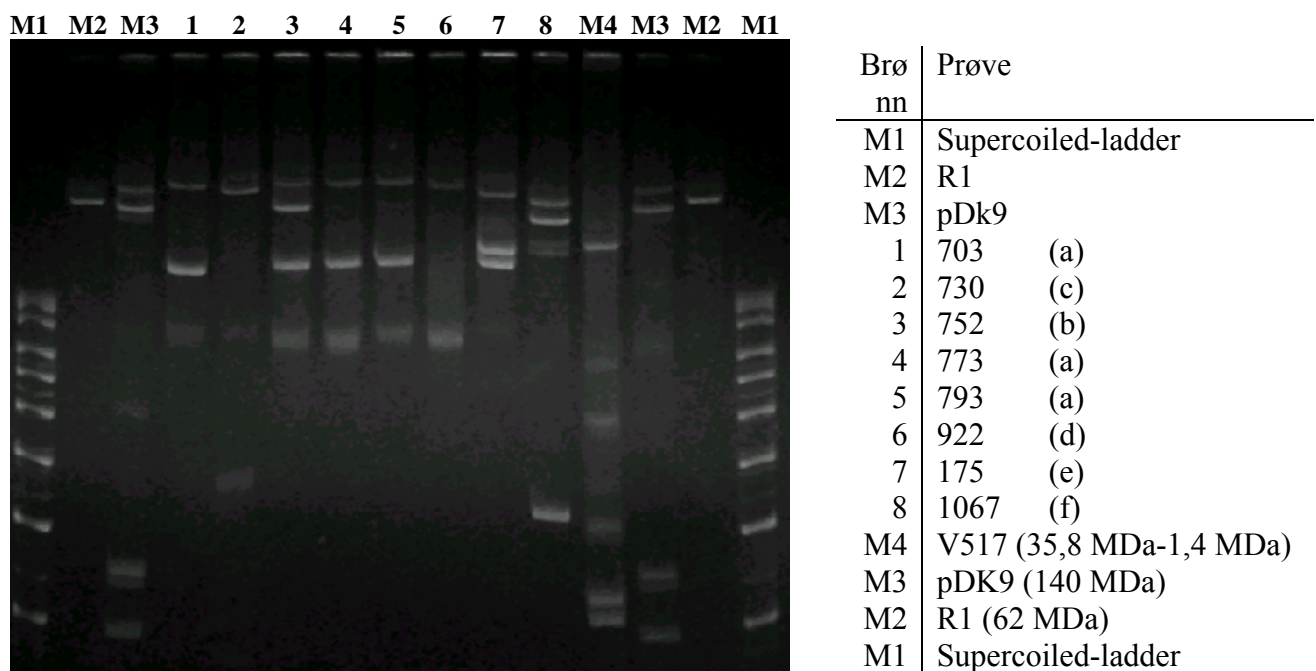


Figur 2: RAPD-PCR av genomisk DNA fra *P. alcalifaciens*. PCR ble utført med denaturering ved 94 °C i 1 min, annealing ved 36 °C i 1 min og polymerisering ved 72 °C i 2 min, totalt 30 sykluser. Avsluttes med 72 °C i 7 min. PCR fragmentene ble separert i 1 % agarosegel med kjøreforholdene 90 V i 1 time [7].

Plasmidisolering

Kado & Liu:

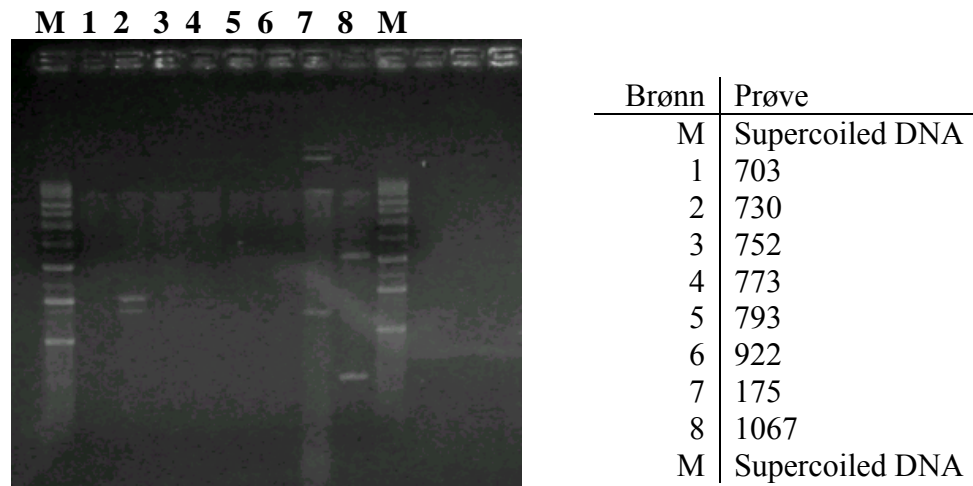
Alle stammene har stort plasmid. De seks *P. alcalifaciens* stammene fra hund gav 4 ulike båndmønstre: a, b, c og d. Tre av stammene har identisk mønster a. De resterende mønstrene b, c og d skilles fra a med enkelte plasmid. Kontrollenes mønster skiller seg vesentlig ut fra resten. Plasmidmønstrene er angitt i parentes etter stamnummerene i Figur 3.



Figur 2: Plasmidisoleringen er utført som tidligere beskrevet av Kado & Liu [8]. Plasmider ble separert ved vertikal gelelektroforese. Separasjonen ble utført på 1 % agarosegel ved kjøreforholdene 100 V i 4,5 timer. Plasmidmønstret er angitt i parentes etter stamnummerene.

Qiagen Miniprep Kit:

Stamme nr 2 og kontrollene har små plasmid. Det er imidlertid for få plasmider til å se på fellestrekk mellom stammene (Figur 4).

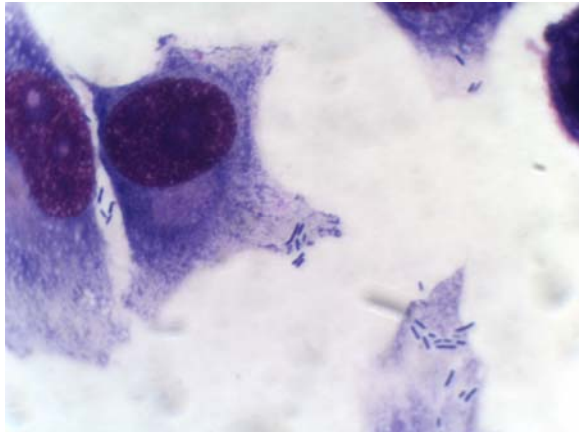


Figur 3: Små plasmider isolert ved hjelp av QIAprep Miniprep Kit. Plasmidene ble separert i 0,7 % agarosegel ved horisontal gelelektroforese ved 90 V i 1 time.

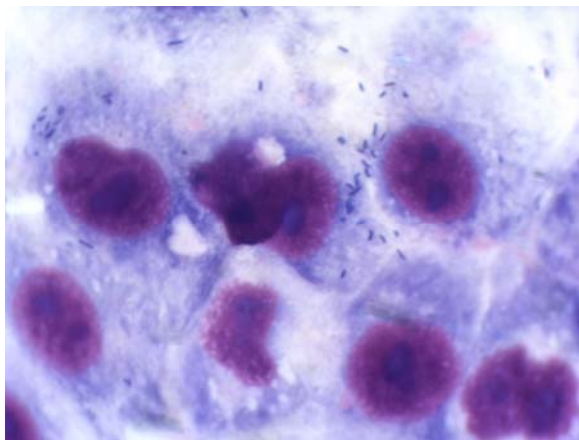
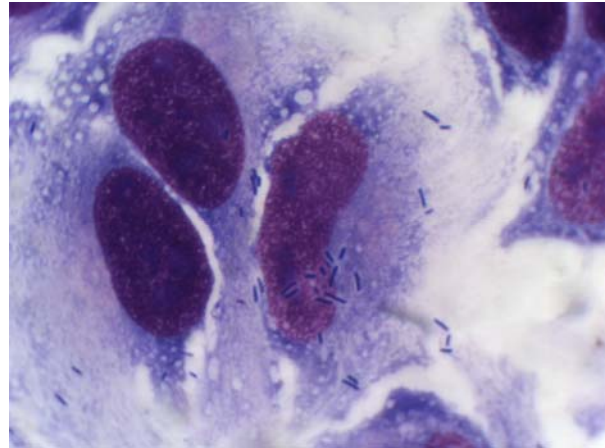
Invasjonsstudier

Design 1:

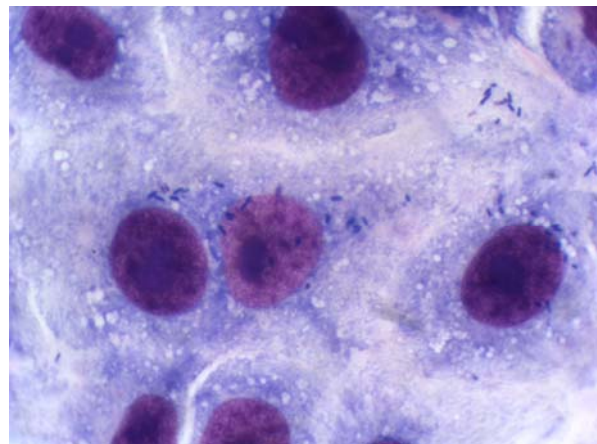
Alle stammene var invasive, men det var store individuelle forskjeller mellom stammene. Det fantes også bakterier som trolig lå ekstracellulært (Bilde 5 og 6, Tabell 4).



Bilde 5: Bakterieceller som har invadert HeLa-celler



Bilde 6: Bakterieceller som har invadert HeLa-celler



Tabell 4: Resultater av celleinvasjon vurdert ved visuell observasjon av intracellulære bakterier i lysmikroskop

Stamme	HeLa	Vero
703	Funn av mange enkeltbakterier intracellulært, enkelte bakterieklynger intracellulært.	Funn av enkeltbakterier intracellulært.
730	Ingen funn*	Noen funn av enkeltbakterier intracellulært.
752	Noen funn av enkeltbakterier intracellulært.	Funn av enkeltbakterier intracellulært, noen få bakterieklynger både intra- og ekstracellulært.
773	Ingen funn*	Noen funn av enkeltbakterier intracellulært.
793	Funn av enkeltbakterier intracellulært. Funn av celler som ser ut til å være ekstracellulært.	Noen funn av enkeltbakterier intracellulært
922	Funn av mange enkeltbakterier intracellulært. Enkelte bakterieklynger intracellulært. Funn av celler som ser ut til å være ekstracellulært.	Funn av mange enkeltbakterier intracellulært. Funn av celler som ser ut til å være ekstracellulært.
175	Ingen funn*	Ingen funn*
1067	Svært rikelig med bakterier som ser ut til å ligge både intra- og ekstracellulært.	Svært rikelig med bakterier som ser ut til å ligge både intra- og ekstracellulært. Noen synsfelt med bare bakterier, ingen celler.
DH5	Ingen funn*	Ingen funn*

* Bare utvalgte synsfelt ble studert i mikroskop, hele feltet ble altså ikke inspisert. Mulighet for uoppdagede funn er tilstede.

Design 2:

Ingen av stammene viste mer enn 1 % invasivitet. På grunn av sprik i duplikatene er det vanskelig å kommentere resultatene. Graderingen, vist i tabell 5, er basert på intern sammenlikning mellom stammene.

Tabell 5: Kvantitativt vurdering av invasivitet

	703	730	752	773	793	922	175	1067	DH5	Neg. ktr.
HeLa	-	+++	+	+	-	-	+	+	-	Ikke utført
Vero	+	+	+++	++	++	-	+	+	+	-

Drøfting

Enteritter hos dyr oppstår vanligvis når det er noe ekstraordinært; dyret er ungt eller gammelt, bor i kennel, har nedsatt immunforsvar, stresset, underernært, har en pågående sykdom, går på en antibiotikakur eller at dyret nylig har gjennomgått kirurgi.

Andre enteritter kan imidlertid oppstå hos ellers friske dyr etter for eksempel smitte med en patogen bakterie. Hos hund er det generelt manglende kunnskap om virulens og betydning ved flere enteropatoogene bakterier.

Det er to publikasjoner av *P. alcalifaciens* i tilknytning til enteritt hos hund. Möhr m.fl. fastslår at *P. alcalifaciens* er en enteroinvasiv bakterie og en primær bakteriell årsak til enteritt hos hund [2]. Tribe m.fl. tilbakeviser denne påstanden fra Möhr, og mener at *P. alcalifaciens* ikke skiller seg fra de andre bakteriene som har en tendens til å blomstre opp sekundært ved forstyrrelser av normalfloraen i tarmen. Tribe m. fl. mener altså at *P. alcalifaciens* ikke er en primær årsak, og viser også til funn av at *Campylobacter jejuni* var til stede i 27 % av tilfellene der *P. alcalifaciens* ble isolert [3]. Det er imidlertid i løpet av de siste 20 år ikke gjort noen molekylære studier av *P. alcalifaciens* isolert fra hunder med diaré, men kun identifisering og i tillegg en del histologiske tester og virustest av fæces [2].

Providencia alcalifaciens er anerkjent som en patogen bakterie som kan gi infeksjoner og diaré hos mennesker. Generelt er *Providencia* knyttet til begrepet *travellers diarrhea* [10] og anses også å kunne gi diaré hos barn i utviklingsland [11]. I Japan var det i november 1996 et stort utbrudd av matbåren infeksjon, der 270 av 610 mennesker som spiste mat fra samme kantine viste symptomer på gastroenteritt [6]. Mikrobiologiske undersøkelser pekte ut *P. alcalifaciens* som årsak til utbruddet, og pulsfeltstudier av stammer viste at de var samme klon [6]. Annen forskning på humane stammer, peker ut *Providencia rettgeri* som den mest patogene av *Providencia* artene (størst invasivitet på Caco-2 celler), selv om også *P. alcalifaciens* og *Providencia stuartii* kan gi diaré [10].

I vårt materiale inngår stammer isolert fra seks hunder, der to av hundene kommer fra samme kennel, mens resten av hundene ikke har noen kjent tilknytning til hverandre (Tabell 1). Stammene er isolert over en kort tidsperiode, noe som muligens kan antyde en liten

oppblomstring av *P. alcalifaciens* høsten 2005. I og med at *Providencia* koloniene blir blå på blåskål, i likhet med salmonella, er dette funn som alltid vil bli undersøkt videre i et diagnostisk laboratorium. Den økte forekomsten av *Providencia* isolert i laboratoriet høsten 2005 er derfor trolig reell og skyldes ikke økt oppmerksomhet med hensyn til *Providencia*.

Hos mennesker har *P. alcalifaciens* blitt akseptert som en patogen bakterie først de siste 10 årene. De første publikasjonene er publisert allerede i 1946 [12], men det er ikke gjort noen molekylære studier før i 1996 [13]. Etter dette er det gjort en del undersøkelser på humane stammer, som celleinvasivitet, plasmidisolering og genotyping, fra utbrudd [6] og fra stammer samlet inn over tid [13].

Vårt utvalg av *Providencia* stammer gjør det mulig både å studere om stammer fra samme miljø er like eller beslektet, og å studere likheten mellom stammer som er fra andre miljøer. Dersom *P. alcalifaciens* fra ulike miljøer er beslektet, kan dette tyde på at det likevel er en sammenheng mellom tilfellene, ved at hundene har blitt infisert fra felles smittekilde.

Ut fra pulsfelt, ser vi at tre stammer har samme båndmønster, mønster A, og en stamme med et båndmønster som er nesten identisk, mønster B (Figur 1). De andre stammene har bånd (C, D) som skiller seg vesentlig fra A og B, og vi kan derfor med sikkerhet si at stammene ikke tilhører samme klon. Vi kan allikevel verken bekrefte eller avkrefte om det er en sekundær oppblomstring av "hundens egen" *P. alcalifaciens*, eller om de isolerte *Providencia* stammene også i disse tilfellene er primærpatogene.

Nakazato m.fl. antyder en kobling mellom humane stammer og hundestammer når det gjelder *E. coli*, og at hunder, med eller uten diaré, kan være en smittekilde for typisk eller atypisk EPEC-infeksjon hos mennesker [14]. Vi kan ikke utelukke at tilsvarende kan være tilfelle med *Providencia* arter.

For å underbygge resultatene fra pulsfelt, ble det gjort RAPD-PCR. Dette resultatet er av dårlig kvalitet, så det er vanskelig å bruke det til å styrke eller svekke noen hypotese. Imidlertid ser det ut til at de fire stammene som lignet hverandre i pulsfeltmønster (mønster A og B), også lignet i mønster fra denne metoden (Tabell 2). De andre skiller seg klart fra disse fire stammene.

Tidligere studier av *P. alcalifaciens* og andre bakterier fra *Enterobacteriaceae*-familien peker på at invasjonsegenskapene til bakteriene er assosiert med store plasmid [1,15]. Resultatene våre fra Kado & Liu viser at samtlige av våre stammer hadde plasmider på >100kb.

Stammene våre har totalsett få plasmider og det er derfor vanskelig å bruke dette resultatet til å si noe om slektskap. Likevel har de fire stammene med stor grad av likhet i PFGE også samme plasmidmønster og dette svekker ikke hypotesen vår om slektskap. Resultatene våre fra QIAprep miniprep Kit viser at kun én av stammene har små plasmid, og dette er ikke blant de stammene som viser slektskap med hverandre.

Humane stammer av *P. alcalifaciens* har vist seg å være mer eller mindre invasiv på en rekke cellelinjer, bl.a. på Vero [9], Caco-2 [6] og HEp-2 [9] celler. Invasivitet til humane stammer på Caco-2 celler varierer fra 0,19 % til 5,36 % [9], der > 2 % anses som høyinvasivt. I en human undersøkelse er én stamme isolert fra hund inkludert som kontroll. Denne hundestammen er gradert som moderat invasiv, med funn av hyperinvaderte Hep-2 celler [9]. Celleinvasjonsstudiet vi utførte (Tabell 5) viser at ingen av stammene hadde en invasjon på >1 %. Det var individuelle forskjeller innenfor stammene, og vurderingen av invasivitet er derfor gjort som en relativ sammenligning mellom de seks stammene. Ut ifra kvantitativ måling av invasivitet kan vi se at de samme tre stammene som hadde mønster A på pulsfeltmetoden (Figur 1), var mest invasiv på Vero-cellene. Stammen som var nesten identisk på PFGE (mønster B), er også mest invasiv på Vero-cellene, men mer invasiv på HeLa-cellene enn de tre andre (Tabell 6). Dette styrker dermed PFGE-resultatet, og svekker ikke hypotesen om at *P. alcalifaciens* kan ha hatt en betydning som årsak til diaré i disse tilfellene.

Det finnes mange andre virulensfaktorer enn invasivitet. Toksinproduksjon er en vanlig virulensfaktor blant en del av bakteriene i *Enterobacteriaceae*-familien, deriblant hos en del *E. coli* varianter. Vi har ikke funnet studier som omhandler andre virulensfaktorer enn invasivitet hos *P. alcalifaciens*.

I tidligere undersøkelser [7] er det ikke funnet noe spesielt mønster ved resistensbestemmelse. Våre stammer oppførte seg svært likt ovenfor de ulike antibiotika, vi kan ikke se individuelle forskjeller.

I likhet med Möhr m. fl. [2], er *P. alcalifaciens* i vårt studie isolert i rikelig mengde fra alle hundene. Andre patogener som *Salmonella* og *Campylobacter* er ikke påvist fra noen av hundene. Hundene har hatt kraftige symptomer som har gjort eieren oppmerksom på sykdommen, flere hadde blodig diaré. Studien til Möhr er basert på et valpekull, der syv av valpene antagelig døde som følge av *P. alcalifaciens* utbrudd [2]. I vårt studie er det en valp som døde og vi kan ikke utelukke at *P. alcalifaciens* har forårsaket sykdomsforløpet som endte med død.

Konklusjon

Vi har i vårt studie gått videre med molekylære undersøkelser, noe som kun er gjort på humane stammer fra før. Gjennom PFGE har vi funnet tydelig likheter mellom fire av stammene, noe som vi har sett går igjen også i RAPD-PCR og Kado & Liu plasmidisolering. Stammene våre var alle invasive, men med store individuelle forskjeller. Alle stammene våre har plasmid på >100kb, men vi kan verken bekrefte eller avkrefte sammenhengen mellom store plasmid og egenskapen bakterien har til å invadere celler (Tabell 6).

Vi har funnet rikelig mengde *P. alcalifaciens* hos alle hundene som er med i studiet, og alle hadde kraftige symptomer med diaré. En av valpene døde som følge av diaré, og det er da naturlig å trekke en sammenheng mellom *P. alcalifaciens* dominans i den fekale floraen og sykdomsbildet som utspant seg. Stammen isolert fra valpen som døde er en av de fire stammene som vi har funnet likheter mellom. Ut i fra våre funn har vi derfor grunn til å tro at *P. alcalifaciens* kan være en primær årsak til diaré hos hund.

Tabell 6: Oppsummeringstabell

Journalnr.	703/05	730/05	752/05	773/05	793/05	922/05	175/06 human
<i>Bakgrunn</i>							
Alder ved sykdom	5 mnd	3 år	3 år	(selvdød)	Ukj.	9 år	31 år
Uke/år for isolasjon	37/05	37/05	38/05	39/05	40/05	45/05	8/06
<i>Klinikk</i>							
Diaré	Ja, blodig	Ja	Ja, blodig	Ja	Ja	Ja, blodig	Ja
Øvrige funn	Temp. 38,9°C	Temp. 38,8°C Oppkast	Temp. 38,9°C	Oppkast	Oppkast	Temp. 39,0°C	Abdominal smerte
Isolerte stammer:							
<i>P. alcalifaciens</i>	Meget rikelig	Meget rikelig	Meget rikelig	Meget rikelig	Rikelig	Rikelig	Rikelig
Resultater:							
PFGE	A	C	B	A	A	D	E
Stort plasmid > 100kb	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Invasivitet							
Visuelt	Ja, mest HeLa	Ja, kun Vero	Ja, mest Vero	Ja, kun Vero	Ja, både HeLa og Vero	Ja, både HeLa og Vero	Nei
Kvantitativt	Ja, mest Vero	Ja, mest HeLa	Ja, både HeLa og Vero	Ja, mest Vero	Ja, mest Vero	Ja, kun svakt HeLa	Ja, mest Vero

Diskusjon av oppgaven

Utførelsen av hovedmetoden PFGE og isolering av plasmider ved hjelp av Kado & Liu plasmidisoleringsmetode gikk veldig bra. Kvaliteten på bildet av gelen fra Quiagen Miniprep Kit og RADP-PCR er ikke optimal. RAPD-PCR ble gjort tre ganger, uten at det ga bedre resultat. Neste trinn er derfor å bytte primer, eventuelt med noen justeringer av kjøretemperatur, for å få et tydligere resultat. Celleinvasjonsstudiene burde vært repetert flere ganger i duplikat. I andre studier [] er celleinvasjonsstudiene utført tre ganger, med prøver i duplikat hver gang. På grunn av tidsrestriksjoner på oppgaven er ikke våre analyser blitt repetert så mange ganger som ønskelig. Forsøket skal gjenopptas til sommeren av ansatte ved rutinelaboratoriet ved NVH. Undersøkelser som allerede er utført skal repeteres og muligens skal man også utvide undersøkelsesreportoaret.

Litteraturliste

1. Magalhães Vera, Nilma C Leal, Vilma M Melo, Marise Sobreira, Marcelo Magalhães (1996). Invasion of HeLa cells by *Providencia alcalifaciens* presumably is plasmidencoded. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* vol. 91, 767-768.
2. Möhr A. J, J. van der Lugt, D. Josling, J.Picard, L.L. van der Merwe. (2002). Primary bacterial enteritis caused by *Providencia alcalifaciens* in three dogs. *The Veterinary Record*, January 12, 52-53.
3. Tribe GW, MJ Rood (2002). *Providencia alcalifaciens* in diarrhoeic dogs and cats. *The Veterinary Record*, vol 150, 386-387.
4. Marks Stanley L., Elisabeth J. Kather (2003): Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin Small Anim* 1029-1060, 33. PMID: 14552160
5. Gautom Romesh K (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, 2977-2980.
6. Murata Takeshi, Tetsuya Iida, Yoshitaka Shiomi, Kenichi Tagomori, Yukihiro Akeda, Itaru Yanagihara, Sotaro Mushiake, Fubito Ishiguro, Takeshi Honda (2001). A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 1050-1055.
7. Sobreira Marise, Nilma C.Leal, M. Magalhães, Beatriz E.C. Guth, Alzira M.P. Almeida (2001). Molecular analysis of clinical isolates of *Providencia alcalifaciens*. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 50, 29-34.
8. Kado C.I., S.T. Liu (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, Mars 145, 1365-1373.
9. Janda, Michael J., Sharon L. Abbott David Woodward, Shideh Khashe (1998). Invasion of HEp-2 and other eukaryotic cell lines by *Providenciae*: Further evidence supporting the role of *Providencia alcalifaciens* in bacterial gastroenteritis. *Current Microbiology*, vol 37, 159-165.
10. Yoh Myonsun, Junko Matsuyama, Motoki Ohnishi, Kazuhiro Takagi, Hirozane Miyagi, Kazuhiro Mori, Kwon-Sam Park, Takahiro Ono, Takeshi Honda (2005). Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, vol 54, 1077-1082.
11. Albert M.J., A.S.G. Faruque, Mahalanabis, D. (1998). Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1433-1435

12. Stuart C.A., Wheeler K.M., McGann V. (1946). Further studies on one anaerogenic paracolon organism. Type 29911. *Journal Bacteriol* 52, 431-438.
13. Guth, Beatriz E.C, E. Perrella (1996). Prevalence of invasive ability and other virulenceassociated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, vol 45, 459-462.
14. Nakazato G, C. Gyles, K. Ziebell, R. Keller, L.R. Trabulsi, T.A.T. Gomes, K. Irino, Wanderley Dias Da Silveira, A.F. Pestana De Castro (2004). Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E.coli* (EPEC). *Veterinary Microbiology* 101, 269-277
15. Silva R.M., Toledo M.R.F., Trabulsi L.R. (1982). Correlation of invasiveness with plasmid in enteroinvasive strains of *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases* 146, 706

Vedlegg

Vedlegg 1**Muller Hinton agar**

Metoden er beskrevet i : ”Metode-kompendiet 2001” av Anette Wold og Trine L’Abée-Lund

Formål:

Mediet er et standard medium for antibiotikaresistens-undersøkelser, f. eks agar diffusjonsmetode eller E-test.

Prinsipp:

Diameter på hemningssonen er korrelert med MIC verdien til bakterien, som angir konsentrasjonen av antibiotikumet som må til for å hemme vekst av bakterien. Ved å måle diameteren kan man avgjøre om bakterien er følsom, intermediaær eller resistent, ut i fra grenser som er bestemt på forhånd.

Utstyr:

Bomullssvabre

Tre rør med 4,5 ml fys.saltvann

MH skål

Neo sensitabs™ antibiotikalapper

Skjema for avlesning – AFAs anbefalinger

Utførelse:

Agardiffusjonsmetoden:

1. Plukk ca fem kolonier med en podeøse og løs kolonimaterialet i 4,5 ml saltvann (rør 1) til det har en tetthet som tilsvare McFarland standard 0,5. Tilsett evt mer kolonimateriale eller saltvann.
2. Fortynn ved å overføre 0,75 ml av innholdet i rør 1 til et nytt rør med 4,5 ml fys.saltvann (rør 2). Sug opp og ned med plastpipetten, og overfør 0,75 ml fra rør 2 til rør 3. Bland godt.
3. Dypp en bomullspensel (svaber-liknende) i saltvannsløsningen og press penselen mot kanten av røret for å bli kvitt overflødig væske. Penselen strykes over hele MH skåla i tre ulike retninger.
4. La skålen tørke en kort stund (prediffusjon). Dette tidsrommet må ikke vare lengre enn 30 minutter, helst bør skålene tørke i løpet av 5-15 minutter.
5. Legg på antibiotikalapper (disse må ikke flyttes etter at de har vært i kontakt med agaren).
6. La skålene stå ved romtemperatur i 5-10 minutter så tablettene får festet seg. Inkubér deretter ved 37 C° (ikke CO₂ atmosfære) i 18 timer med bunnen ned.
7. Etter inkubering avleses skålene i henhold til AFAs (arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål) retningslinjer.

Vedlegg 2**Pulsfelt gel elektroforese (PFGE)**

Metoden er beskrevet av Gautom, RK. *Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day*. Journal of clinical microbiology, Vol 35, p. 2977-2980

Prinsipp:

PFGE gjør det mulig å sammenlikne organismer ved deres molekylære genotype. Bakteriens DNA spaltes i fragmenter vha av et restriksjonsenzym. Restriksjonsenzymet produserer et begrenset antall, 10 til 20, høymolekulære restriksjonsfragmenter. Disse fragmentene blir så separert ved agarosegel elektroforese. For å oppnå best mulig separasjon av fragmentene brukes elektroforese der strømmene pulserer og skifter retning, der av navnet pulsfelt. Båndmønsteret som dannes er høyst spesifikt for stammer av ulike organismer. En får altså muligheten til å sammenlikne spesifikke stammer og eventuelt nøyaktig kunne knytte de opp mot sykdomsutbrudd.

Utstyr og løsninger til 10 prøver (som kjøres dobbelt):

Vannbad	To stk: 50 og 55°C (evt også 37°C)
Tesil	
Eppendorfrør	30 stk
2 ml rør med rund bunn	10 stk
50 ml rør	10 stk
Pluggformer à 10 plugg	2 stk
ESP buffer	15 ml
TE buffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8)	410 ml
TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA)	10 ml
Lysozym (10 mg/ml stockløsning)	100 µl
Proteinase K (20 mg/ml stockløsning)	50 µl
InCert agarose (FMC Bioproducts)	0.12 gram
SeaKem Gold agarose (FMC Bioproducts)	1.5 gram
<i>SmaI</i> enzym	50 µl (à 10 U/µl)
sdH ₂ O	100 ml
20 % SDS	70 µl
0.5 x TBE buffer	2.2 liter

Tillaging av agaroseplugg:

1. Sett på vannbad; 37°C, 50°C og 55°C.
2. Ca 175 ml (dersom 40 prøver: 500 ml) sdH₂O og ca 0,5 liter (dersom 40 prøver 2 liter) TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) settes til oppvarming i 50°C vannbad.
3. Ferske overnatt kulturer løses i 0.5 til 1 ml TE buffer (100mM Tris og 100mM EDTA). Ta rikelig med materiale, ca 10 kolonier.
4. 100 µl av celleduspensjonen overføres til 1.5 ml eppendorfrør. 10 µl Lysozym (10 mg/ml stockløsning) og 5 µl Proteinase K (20 mg/ml stockløsning) tilsettes og blandes godt ved å

pipettere opp og ned flere ganger. Dette gir sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml av både lysozym og proteinase K.

5. Bakteriesuspensjonen inkuberes ved 37°C i 10 til 15 minutter.
6. 1.2 % InCert agarose (FMC BioProducts) løses i vann (nok til 40 prøver: 0.12 gram agarose i 10 ml vann, vanskelig å tillage mindre volum) og tempereres i vannbad ved 55°C.
7. 7 µl 20 % SDS og 140 µl 1.2 % agarose tilsettes hver bakteriesuspensjon, og denne bakterie-agarose blandingen overføres umiddelbart til pluggformer (to former pr prøve).
8. Pluggene settes til kjøling ved 4°C i ca 5 til 10 minutter.
9. Pluggene overføres til 2 ml rør med rund bunn som inneholder 1.5 ml ESP buffer.
10. Inkuber pluggene i vannbad ved 55°C i 2 timer.
11. Overfør pluggene til 50 ml rør med 8-10 ml forvarmet (50°C) sterilt, destillert vann, og inkuber videre ved 50°C med forsiktig risting i 10 min. Bruk en tesil for å fange opp pluggene.
12. Vask pluggene ved 50°C fire ganger à 15 minutter i 8-10 ml forvarmet (50°C) TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8).
13. Pluggene avkjøles til romtemperatur 1 ml TE.
14. Pluggene kan lagres i 3 til 4 uker ved 4°C.

Restriksjonsenzymkutting:

15. Skjær 1 mm tykke skiver av pluggene ved hjelp av et dekkglass, og overfør disse til eppendorfrør med 5 µl *SmaI* (10 U/µl gir 50 U totalt) i til sammen 100 µl 1× restriksjonsenzymbuffer (til 20 prøver: bland først 1785 µl sdH₂O og 210 µl 10 x buffer. Overfør 95 µl av dette til eppendorfrør. Tilsett 5 µl enzym i hvert rør etterpå for å forsikre en jevn mengde enzym i hvert rør).
16. Inkuber rørene ved 25 °C med forsiktig risting i varmeskap eller i vannbad i 3 timer.

Støping av agarosegel:

17. 1 % SeaKem Gold agarose (FMC BioProducts) løses i 0.5 x TBE buffer:
 - a. Lite gelkar: 1 g agarose, 100 ml 0.5 M TBE
 - b. Stort gelkar: 1.5 g agarose, 150 ml 0.5 M TBE
18. Pluggskivene plasseres på kammen (på "baksiden" av tennene) og festes med en dråpe flytende agarose.
19. Gelkaret skrues sammen – de to løse sidekantene og en mørk underlagsplate monteres sammen med bunnen og de to fastmonterte sidekantene.
20. Etter avkjøling av pluggskivene plasseres kammen i gelkaret (med pluggene foran og tennene bak) og resten av agarosen helles forsiktig på. Avkjøles.

Kjøring av gel:

21. 2 liter 0.5 x TBE tilsettes i karet.
22. Slinger til og fra pumpe og kjøleaggregat monteres (en slange foran og en slange bak på bufferkaret..
23. Powersupply og pumpen skrues på. La bufferen pumpes rundt i slangene slik at all luften erstattes av væske.
24. Start kjøleaggregatet, innstilling 14°C.
25. La apparatet kjøre ca 15 minutter slik at bufferen blir tilstrekkelig avkjølt.
26. Kammen fjernes fra gelkaret, det samme gjør de de to påskrudde kantene og bunnen. Gelen med den mørke underlagsplaten plasseres i elektroforesekaret.
27. Start selve elektroforesen;

-
- a. Gradient 6 V/cm
 - b. Blokk 1:
 - Innstill initial switch time på 4 s
 - Final switch time settes til 8 s
 - Tid innstilles til 12 timer
 - c. Blokk 2:
 - Innstill initial switch time på 8 s
 - Final switch time settes til 50 s
 - Tid innstilles til 10 timer
 - d. Sjekk at blokk 3 står på 0 timer.

Farging av gel:

28. Hvis du skal fotografere gelen på Lindern – ta med et avfargningskar ned til Mattrygghet slik at du får fraktet gelen opp til Lindern igjen.
29. Slå av kjøleaggregatet (viktig å gjøre dette først).
30. Slå av pumpen.
31. Overfør gelen til EtBr fargebad. La farge ca 30 minutter.
32. Demonter fremre slange til bufferkaret og skru på pumpen slik at væsken som er i slangen pumpes inn i bufferkaret.
33. Monter vaskeslange (ligger i øverste skuff til venstre for bufferkaret) og la bufferen renne ut i en bøtte (står under benken for bufferkaret).
34. Demonter vaskeslangen og monter fremre slange til kjøleaggregatet igjen.
35. Hell på 2 liter destillert vann.
36. Slå på pumpen og la vannet kjøre noen minutter gjennom slangene slik at de renses for buffer.
37. Demonter slangen til pumpen, monter vaskeslangen igjen, og la vannet renne ut av bufferkaret og ned i en bøtte.
38. Vær nøye med å få ut alt vannet av bufferkaret (må gjerne løftes litt).
39. La lokket til bufferkaret stå halvåpent slik at siste rest av vann får fordampe.
40. Legg gelen til avfarging i destillert vann. Ca 20 min.
41. Fotografer gelen under UV-lys.

Vedlegg 3**RAPD-PCR****Prinsipp:**

Dette er en PCR basert metode som er enkel og rask å utføre. Man gjør en ribotyping basert på påvisning av polymorfisme ved hybridisering med en 16S-23SrDNA primer. Ved bruk av korte nukleotidsekvenser på ca 10 basepar (DNA amplifiserings primere) som hybridiserer flere steder i bakteriens genom, vil man med PCR få amplifisert multiple DNA-fragmenter med varierende størrelse. Etter atskillelse på agarosegel dannes et karakteristisk båndmønster som er spesifikt for en stamme.

Primer: RAPD 785 (5'-CCGCAGCCAA-3')

Components	Volume (µl)
10 x buffer	5,0
dNTP (10 mM)	2,0
Primer (10 pmol/µl)	4,0
Dynazyme	0,4
Total-DNA	1,0
dH ₂ O	37,6
Totalt	50,0

Denat:	94°C	3 min
---------------	------	-------

Denat:	94°C	1 min.
Annealing	36°C	1 min.
Ext.:	72°C	2 min.
Antall cykler	30	
Ext:	72°C	7 min
Hold:	4°C	

Plasmidanalyse etter Kado & Liu

Metoden er beskrevet av Georg Kapperud, 29. Oktober 1987

Prinsipp:

Metoden brukes til deteksjon og isolasjon av plasmider med varierende størrelse (2,6 -350 megadalton). Alkaliske natrium ved forhøyede temperaturer denaturerer kromosomalt DNA. Kovalent stengt sirkulært DNA (plasmider) slipper ut av cellen pga denatureringen. Proteiner og cellerester blir fjernet av ekstraksjoner med fenol-kloroform. Det igjenværende ekstraktet (plasmid) kan brukes direkte i en agarosegel elektroforese.

Referanse: Kado & Liu, 1981. J. Bacteriol. 145 (3): 1365-1373.

Utførelse:

1. Dyrk bakterier i 5 ml Luria buljong i Stuart-rør. Rørene inkuberes på roller drum ved 37°C natten over. Skrukorken på Stuart-rørene festes løst og tapes for å oppnå god aerering.
2. Sentrifuger 1,5 ml bakteriekultur i et Eppendorf-rør i 1 minutt i Microfuge ved full hastighet. Fjern mest mulig av supernatanten med pasteurpipette. La lokket på Eppendorf-førene være åpent.
3. Resuspender bakteriepelleten i 200 ul kald TEA-buffer (oppbevares i kjøleskap) ved å suge opp og ned i automatpipetten. Unngå å la det skumme.
4. Tilsett 400 ul (2 volum) løsning 5 (oppbevares i romtemperatur). Juster pH på løsning 5 nøyaktig til 12,55 med 1 N NaOH like før bruk. Bland ved å snu røret opp ned 5 ganger og inkuber prøvene i vannbad ved 55 °C i en time.
5. Tilsett 400 ul (1/2 volum) fenol og 300 ul (1/2 volum) kloroform. Bland godt og sentrifuger i 3 minutter.
6. Pipetter vannfasen over i et nytt rør.
7. Dersom slimklysen i mellomstaket mellom vannfasen og fenol-fasen utgjør så stor del av det totale volum over fenolen at det er vanskelig å få pipettert av 50-100 ul, utfør følgende prosedyre: Pipetter av hele vannfasen inkludert slimklysen. Gjenta fenol-kloroform-ekstraksjonen. Pipetter av vannfasen på nytt uten å få med materiale fra mellomfasen. Sentrifuger om nødvendig vannfasen en gang til for å fjerne eventuelt materiale som fulgte med fra mellomfasen.
8. Utfør vertikal elektroforese i 1 % agarose ved 100 V i 4,5 timer. Appliser 50 ul i hver brønn.

Vertikal gelelektroforese:

Montering av glassplater:

- Glassplatene må vaskes godt, også med etanol.
 - Montér glassplatene med grå spacere mellom
 - Den største glassplaten bakerst
 - Den minste (med frosting) fremst. Frostingen skal være innover mot gelen og den delen uten frosting skal peke oppover.
- Husk å skru til skruene på hver side slik at gelen ikke renner ut (gjelder både klemmene som holder glassplatene på plass og stativet som holder alt vertikalt).

Støping av gel:

- Lag ca 100 ml 1% agarose (1 gram, 100 ml 1xTAE) .
- Hell på temperert agarose (ca 55 grader):
 - For varm agarose kan føre til at glasset sprekker
 - For kald agarose kan føre til at gelen stivner før den har flytt utover
- Hell agarosen nesten helt opp til kanten av glassplatene
- Sett inn kammen (brønnformer) på skrå for ikke å få luftbobler under kammen. Vær rask med å plassere kammen etter at gelen er helt på.

Klargjøring av prøvene:

- Bruk ca 50 µl plasmidprep og ca 10 µl stopmix til hver brønn. Bland dette i eppendorfrør før applisering. Husk å pipettere forsiktig så ikke plasmidene blir ødelagt.
- Appliser prøvene i brønnene i midten av gelen.

Kjøreforhold:

- 100V i 4.5 timer. 1xTAE buffer helles på øverst. Det går med ca 2-3 liter til en kjøring.
- Blåfargen i stopmixen vil kjøre ut av gelen, det er helt normalt.
- Følg med at det er buffer i øverste karet hele tiden. I praksis sjekkes dette etter en halv time og deretter etter ca 2 timer.
- Etterfyll gjerne TAE øverst etter ca 2 timer. Dette gjøres ved å ta av lokket, helle på buffer øverst, sette lokket på igjen og kjøre videre.

Farging:

- Farges i etidiumbromid bad i ca 15 minutter Fargingen må foregå i mørket. EtBr degraderer DNA dersom lys kommer til.
- Avfarging i 15 min.
- Se på gel i UV-lys og ta bilde.

Celleinvasjonsforsøkene:

Studerer bakteriens evne til å invadere celler på to måter. I design 1 blir det kvantitativt målt antall intracellulære bakterier ved å telle bakteriekolonier etter utplating på LB-skåler. I design 2 vurderes invasjonsevnen visuelt i lysmikroskop ved 1000 x forstørrelse.

Måling av invasivitet, design 1 (Murata et al):

1. Celler sås ut i 24 brønners brett, ca 100.000 celler pr brønn.
2. La vokse over natt i MEM-medium tilsatt 10 % fekalt kalveserum, 1% L-glutamin og 1% penicillin/streptomycin
3. Tell antall celler umiddelbart før forsøket begynner.
4. Fortynn overnattbakteriekulturene og så ut til LB-skåler.
5. Bytt til cellemedium uten antibiotika.
6. Tilsett bakterier i to fortyninger til cellene.
 - a. 10^6 cfu/brønn i duplikat
 - b. 10^3 cfu/brønn i duplikat
7. Inkuber i 3 timer ved 37 grader i 5 % CO₂.
8. Vask cellene 2 ganger i PBS de Boer.
9. Inkuber i 1 time i cellekulturmediet med 100 µl/ml gentamicin
10. Vask cellene 3 x med PBS de Boer.
11. Lyser cellene med 0,1 % Triton-X 100 i PBS i 20 min ved romtemperatur med risting.
12. Fortynn innholdet i brønnene i fys. NaCl og så ut på LB-skåler.
13. Inkuber skålene over natt ved 37 °C.
14. Tell kolonier og før inn i eget skjema.

Visuell vurdering av invasivitet, design 2 (Janda et al):

1. Celler sås ut i objektglassbrønner, ca 50.000 celler pr brønn
2. La vokse over natt i MEM-medium tilsatt 10 % fekalt kalveserum, 1% L-glutamin og 1% penicillin/streptomycin
3. Fortynn overnattkulturene og så ut til LB-skåler.
4. Bytt til antibiotikafritt medium
5. Tilsett bakterier til cellene
 - a. 10^6 cfu/brønn i duplikat
 - b. 10^3 cfu/brønn i duplikat
6. Inkuber 2 timer ved 37 °C
7. Pipetter av cellemediet
8. Vask 3 ganger med PBS de Boer (750 µl pr gang pr brønn)
9. Inkuber med cellekulturmedium med 100 µg/ml gentamicin i 3,5 timer
10. Fikser og farg cellene med Dif.Quick
11. Studer cellene i mikroskop i 1000x forstørrelse.

HeLa celler fra DMSZ**HELA**

Cell line:	HELA
Cell type:	human cervix carcinoma
DSMZ no.:	ACC 57
Origin:	established from the epitheloid cervix carcinoma of a 31-year-old black woman in 1951; later diagnosis changed to adenocarcinoma; first aneuploid, continuously cultured human cell line
References:	Scherer et al., J Exp Med 97: 695 (1953), PubMed ID 13052828 Gey et al., Cancer Res 12: 264 (1952),
Depositor:	obtained from ATCC (CCL 2), Rockville, Maryland, USA

DSMZ Cell Culture Data

Morphology:	epithelial-like cells growing in monolayers
Medium:	90% MEM (with Earle's salts) + 10% FBS + 2 mM L-glutamine + non-essential amino acids (cells also grow well in 90-95% RPMI 1640 + 5-10% FBS)
Subculture:	split confluent culture 1:4 to 1:6 every 3-5 days using trypsin/EDTA; cells reach confluence quickly; seed out at ca. $1-2 \times 10^6$ cells/80 cm ²
Incubation:	at 37 °C with 5% CO ₂
Doubling time:	ca. 48 hours
Harvest:	cell harvest of ca. $5-15 \times 10^6$ cells/175 cm ²
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 2×10^6 cells/ampoule

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	cytokeratin +, cytokeratin-7 +, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 +, cytokeratin-18 +, desmin -, endothel -, GFAP -, HMB-45 -, neurofilament -, vimentin +
Fingerprint:	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species:	confirmed as human with IEF of G6PD, MDH, NP
Cytogenetics:	human hypertriploid/hypotetraploid karyotype with 15% polyploidy - 82(77-84)<4n>XXX, -X, -2, -3, -4, +5, +5, +5, +5, -7, -8, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21, -22, +mar - der(1)t(1;3)(p11;q11), add(2)(q37), del(3)(q13), der(3)t(3;5)(q11;q11), i(5p)x4, del(6)(q15), der(9)t(1;9)(p11;p11), add(12)(q23), i(15q), der(19)t(13;19)(q22;p13)x1-2, add(21)(p11), del(?22)(q12)
Molec. Genetics:	
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -

Vero celler**VERO-B4**

Cell line:	VERO-B4
Cell type:	African green monkey kidney
DSMZ no.:	ACC 33
Origin:	established from the kidney of a normal adult African green monkey in Japan in 1962; cells are susceptible to a number of viruses; used in virus replication studies and plaque assays, and as indicator cell line for mycoplasma testing
References:	Yasumuta et al., Nippon Rinsho 21: 1209 (1963),
Depositor:	Dr. H. W. L. Ziegler-Heitbrock, Institute of Immunology, Munich, Germany

DSMZ Cell Culture Data

Morphology:	adherent-elongated, fibroblast-like cells in monolayers
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% FBS
Subculture:	split confluent cultures 1:3 to 1:10 using trypsin/EDTA; seed out at ca. 0.5-1.0 x 10 ⁶ cells/80 cm ²
Incubation:	at 37 °C with 5% CO ₂
Doubling time:	ca. 25 hours
Harvest:	cell harvest of ca. 10 x 10 ⁶ cells/80 cm ²
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 1-2 x 10 ⁶ cells/ampoule

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	
Fingerprint:	unique Hinf I-(gtg) ₅ DNA profile
Species:	confirmed as monkey with IEF of AST, LDH, NP
Cytogenetics:	simian rearranged flat-moded hypodiploid karyotype with 12% polypoidy - 54(48-61)<2n>X - VERO-B4 markers present
Molec.	
Genetics:	
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HIV -, HTLV-I/II -