

Voorselectie van VRE met behulp van Real-Time PCR

Onderzoek naar het opzetten van een Real-Time PCR voor de voorselectie van VRE monsters.

Afstudeerverslag

Jade Rebel



Voorselectie van VRE met gebruik van Real-Time PCR

Onderzoek naar het opzetten van een Real-Time PCR voor de voorselectie van VRE monsters.

Afstudeerverslag

Utrecht, 23 mei 2014

Auteur:	Jade Rebel
Studentennummer:	1570774
Opleiding:	Life Sciences (Hogeschool Utrecht)
Specialisatie:	Medische Microbiologie
Groep:	VL8M
Stagebegeleider:	Dr. J.G. Kusters (UMC Utrecht) Mevr. L. van Belzen (UMC Utrecht)
Schoolbegeleider:	Dhr. M. Pennings (Hogeschool Utrecht)
Studieloopbaan begeleider:	Dr. K. van Vliet (Hogeschool Utrecht)
Stageplaats:	Universitair Medisch Centrum Utrecht, afdeling Medische Microbiologie te Utrecht

Voorwoord

In de periode februari – juni 2014 heb ik mijn research stage gedaan op de afdeling Medische Microbiologie van het UMC. Het onderwerp was het opzetten van een voorselectie Real-Time PCR voor VRE monsters. Ik heb mijn research stage als zeer leerzaam ervaren. Ook heeft deze stage mij in staat gesteld om mijn theoretische kennis in de praktijk te kunnen raffineren. Daarbij heb ik ervaringen opgedaan betreffende het ontwikkelen van een Real-Time PCR voor de klinische diagnostiek.

Samenvatting

Vancomycine-resistente Enterococci zijn veroorzakers van ziekenhuisinfecties. Vanwege de hoge resistentie van deze Enterococci zijn ze slecht te behandelen. Bij een eventuele uitbraak zou dit tot zeer grote complicaties kunnen leiden. Het vaststellen van dragerschap op VRE's is een langdurig en arbeidsintensief proces. Het doel van dit onderzoek is om een Real-Time PCR opzetten voor de voorselectie van VRE monsters. Voor de Real-Time PCR zijn er primers en probes van St. Antoniusziekenhuis te Nieuwegein gebruikt. Omdat er in Nieuwegein met ander DNA isolatie materiaal en Real-Time PCR's wordt gewerkt is er gekeken of het bruikbaar kon worden gemaakt voor het UMC. Daarnaast zijn er ook UMC primers en probes ontwikkeld. Met behulp van de primers en probes zijn er met SYBR Green Real-Time PCR's maar ook met probe Real-Time PCR's veel data verkregen. Dit gaf veel informatie over hoe bruikbaar de primers en probes *vanA/B* Nieuwegein en UMC zijn. Uit de resultaten kwam naar voren dat de nieuw bedachte probe en reverse primer geen verbetering. De gevoeligheidstesten voor de diverse *vanA/B* Real-Time PCR's gaven uitsluitsel over de keuze voor de primers en probes. In de gevoeligheidstest voor *vanA*, bleek de *vanA* Nieuwegein het gevoeligste te zijn. Voor *vanB* was dit ook Nieuwegein. Geconcludeerd en aanbevolen wordt om de *vanA/B* Nieuwegein primer en probes te gaan gebruiken voor de klinische diagnostiek.

Abstract

Vancomycin-resistant Enterococci are causes of hospital acquired infections. Because of the high resistance of the Enterococci they are difficult to deal with. In case of a very large outbreak this could lead to complications. Identifying whether someone is a bearer of VRE's is a time-consuming and labor-intensive process. The aim of this project is to set up a Real Time PCR for the pre-selection of VRE samples. For the Real Time PCR primers and probes were received from St. Antonius hospital in Nieuwegein. Since Nieuwegein uses a different DNA isolation technique and Real-Time PCR protocol, it is necessary to determine whether their protocols would conform to the protocols applied at the UMC. In addition, UMC primers and probes have been developed. Using the primers and probes with SYBR Green and with probe real-time PCR's much data has been obtained. This gave a lot of insight on how useful the primers and probes *vanA/B* Nieuwegein and UMC are. The results showed that the newly developed probe and reverse primer gave no improvement. The results of the sensitivity test gave an indication about the choice for *vanA/B* primers and probes. In the sensitivity test for *vanA*, the *vanA* Nieuwegein turned out to be the most sensitive. This also applied to *vanB* Nieuwegein. It is inferred and recommended that the *vanA/B* Nieuwegein primer and probes are used for the Clinical Diagnostics.

Afkortingenlijst

- ADP: Adenosinedifosfaat
- ARE: Ampicilline-resistente Enterococcen
- ATP: Adenosinetrifosfaat
- DNA: Desoxyribonucleïnezuur
- ESBL: Extended-spectrum bèta-lactamase
- MRSA: Meticilline-resistente *Staphylococcus aureus*
- NAM: N-acetylglucosamine
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PhHV: Phocine herpesvirus
- Spp: Species pluralis
- SYBR Green: Synergy Brands Green
- UMCU: Universitair Medisch Centrum Utrecht
- UDP: Uridine diphosphate
- VRE: Vancomycine-resistente Enterococcen

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
Samenvatting.....	4
Abstract	5
Afkortingenlijst	6
1. Inleiding	9
1.2 Probleem- & Doelstelling	9
2. Enterococcen.....	10
2.1 Ziekenhuisinfecties	11
2.2 Vancomycine	12
2.3 Vancomycine-resistente Enterococcen.....	13
2.3.1 Vancomycine genen	13
3. Technische achtergrond	14
3.1 DNA isoleren.....	14
3.2 De klassieke Polymerase Chain Reaction	14
3.3 Real-Time PCR	14
3.4 SYBR Green.....	16
3.4.1 Smelt curve.....	16
3.5 TaqMan Probe	17
4. Materiaal & Methode.....	18
4.1 Stammen	18
4.2 Ontwerp primers & probes	18
4.2.1 Primers & Probes.....	18
4.3 DNA opzuiveren.....	19
4.4 Master mixen.....	20
4.5 Real-Time PCR	20
4.5.1 Golflengtes probes	21
5. Resultaten.....	22
5.1 VanA Real-Time PCR	22
5.1.1 Multiplex vanA/B.....	23
5.1.2 Verdunningsreeks vanA.....	23
5.2 VanB Real-Time PCR	24
5.2.1 SYBR Green vanB	24

5.2.2 Probe vanB	26
5.2.3 Multiplex vanA/B	26
5.2.4 Verbetering vanB Real-Time PCR	27
5.2.5 SYBR Green 23 circulerende stammen	27
5.2.6 Nieuwe probe vanB	28
5.2.7 Verdunningsreeks vanB	29
5.2.8 Verhoudingen primers	30
6. Conclusie	31
6.1 VanA	31
6.2 VanB	31
7. Discussie	32
7.1 Nieuwegein Real-Time PCR	32
7.2 Primers & probes	32
7.3 UMC Stammencollectie	32
7.4 Implementatie klinische diagnostiek	33
7.5 Aanbeveling	33
Literatuurlijst	34
Bijlage 1	35
Bijlage 2	40
Bijlage 3	41
Bijlage 4	42
Bijlage 5	45
Bijlage 6	47
Bijlage 7	48
Bijlage 8	50

1. Inleiding

Voor de opleiding Life Sciences van de Hogeschool Utrecht te Utrecht wordt er een afstudeerstage van vijf maanden in het vierde jaar gedaan. In dit semester kunnen 30 EC worden behaald of 860 studiebelastingsuren. Hierbij wordt er een afstudeeropdracht gemaakt over het onderzoek waar aan mee wordt gewerkt. Voor het afstuderen zijn doelstellingen geformuleerd die dienen te worden behaald. Eén van deze doelstellingen is het zelfstandig dan wel in teamverband onderzoek uitvoeren dat bijdraagt aan oplossen van een probleem of vraagstelling.

De afstudeeropdracht bij het Universitair Medisch Centrum Utrecht te Utrecht gaat over het opzetten van Real-Time PCR voor de voorselectie van VRE monsters.

1.2 Probleem- & Doelstelling

Vancomycine-resistente Enterococci (VRE) vormen een serieuze bedreiging voor ziekenhuispatiënten met een verzwakte afweer. Deze Enterococci kunnen goed in de omgeving overleven en er is dan ook een reële kans op een VRE uitbraak. Op de afdeling Medische Microbiologie in het UMC Utrecht wordt klinische diagnostiek uitgevoerd. Wanneer er een VRE uitbraak plaats vindt, komen er veel monsters binnen op het diagnostisch laboratorium, immers naast de patiënten zelf worden ook contact personen gescreend. Kweken kost meerdere dagen aan tijd waardoor de kans op verdere verspreiding aanzienlijk zal toenemen. Bovendien kost het ook veel arbeidstijd. Om verdere verspreiding door patiënten te voorkomen is als oplossing bedacht om een voorselectie uit te voeren op de monsters. Een Real-Time PCR zou uitkomst kunnen bieden doordat hiermee een efficiënte voorselectie te doen welke niet alleen sneller is dan de kweek maar ook minder werk vergt. Dit houdt in dat patiënten materiaal eerst moleculair word gescreend op de aanwezigheid van resistentie genen. Wanneer deze aanwezig zijn wordt de kweek uitgevoerd, waarbij uiteraard de Real-Time PCR negatieve monsters niet gekweekt hoeven te worden. Dit scheelt dan weer veel tijd en werk. Het plan is deze voorselectie in te voeren middels een Real-Time PCR.

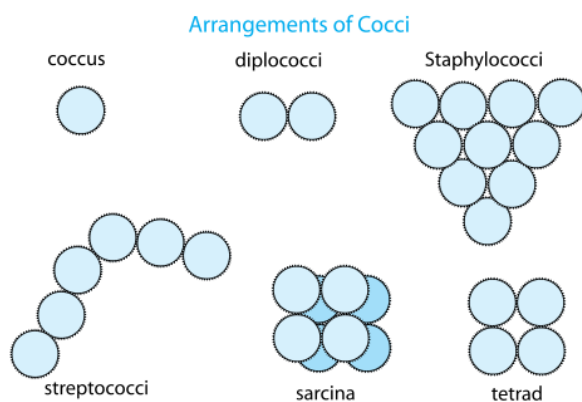
De doelstelling is als volgt te omschrijven; Een Real-Time PCR opzetten voor de voorselectie van VRE monsters.

2. Enterococcen

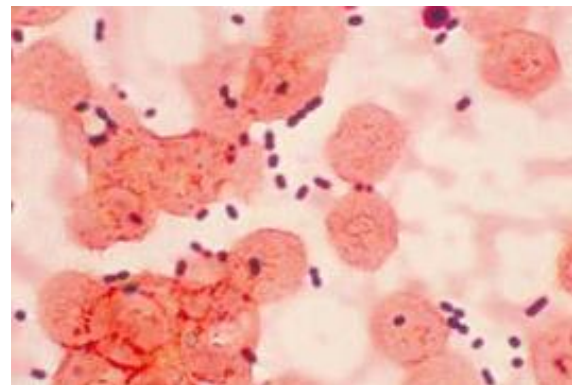
Enterococcen zijn voor het eerst beschreven in 1889. In 1933 werden de Enterococcen onder de Streptococcen geplaatst omdat zij het D-antigeen op de celwand hebben wat ook voorkomt in de celwand van Streptococ. Doormiddel van DNA technieken werd duidelijk dat het 16S gen, wat uniek is per bacterie genus, van de Enterococcen subtiel verschilt van de Streptococcen.¹ In 1984 werden Enterococcen definitief afgescheiden van de Streptococcen en kreeg het zijn eigen genus. Inmiddels vallen er 38 species onder dit genus.

Klinisch zijn er echter maar twee species relevant, *Enterococcus faecalis* en *Enterococcus faecium*. Uit de klinische praktijk blijkt dat 80 tot 90% van de klinische infecties een *E. faecalis* is. Deze soort is in de praktijk prominenter dan de *E. faecium* die een prevalentie heeft tussen de 5 en 15%.²

De Enterococcen zijn gram positieve kokken die in paren of korte ketens kunnen liggen (zie figuur 1 & 2).

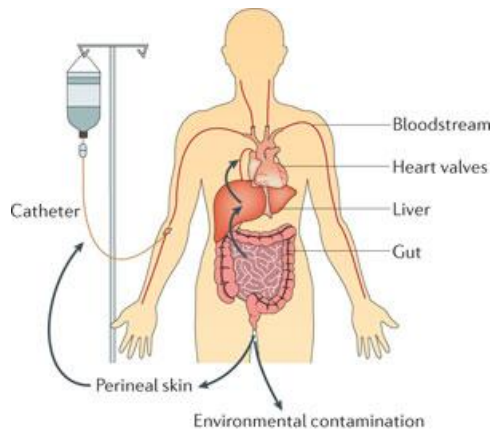


Figuur 1. Ordening kokken. Hier zijn de verschillende ordeningen van coccoïde bacteriën te zien.⁴



Figuur 2. Gram kleuring pneumonie monster. De Enterococcen zijn duidelijk zichtbaar als paarse kokken in paren en korte ketens.⁵

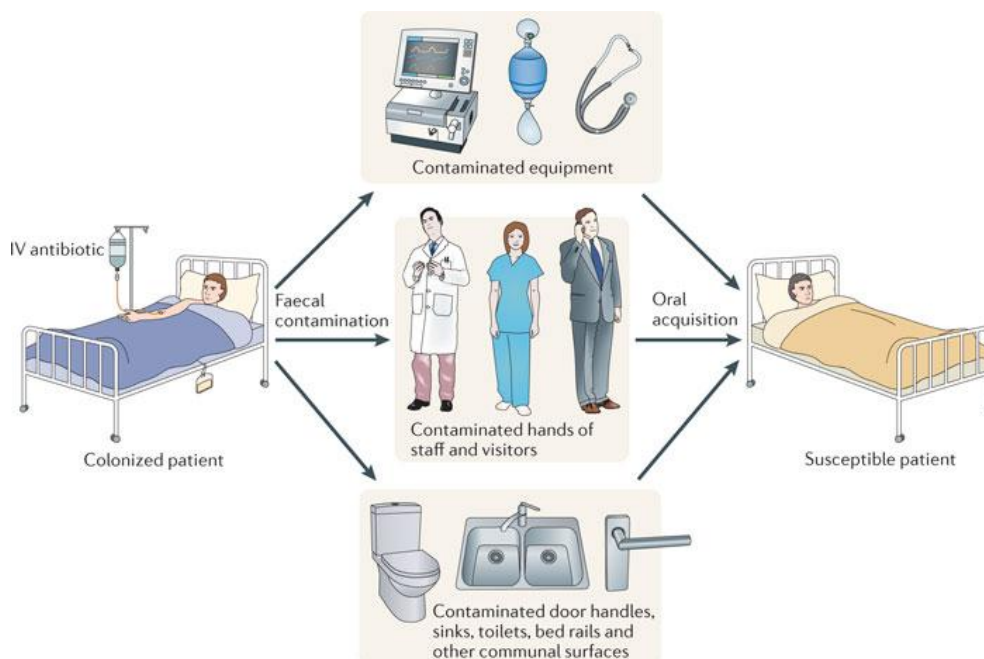
Ze kunnen zowel anaeroob als aeroob leven bij temperaturen tussen de 10°C en 45°C. Enterococcen komen meestal voor als commensaal in de darmen. Echter kunnen Enterococcen opportunistische infecties veroorzaken in de mens. Enterococcen zijn verantwoordelijk voor meerdere soorten infecties; urineweginfecties, wond infecties, bacteriëmie, neonatale infecties, eileiderontsteking en endocarditis.³ Zoals te zien is in figuur 3 zijn er vanuit de darmen meerdere wegen voor de Enterococcen om een infectie te veroorzaken.



Figuur 3. Routes Enterococcal infecties. Via de darmen kan het naar lever om uiteindelijk in de bloedstroom terecht te komen. Zo komt het in het hart terecht waar het endocarditis zou kunnen veroorzaken. Ook kan de patiënt via de feces een herinfectie verkrijgen, andere patiënten en omgeving contamineren zoals te zien is in figuur 4.⁶

2.1 Ziekenhuisinfecties

Mensen die in het ziekenhuis belanden kunnen te maken krijgen met een ziekenhuisinfectie. Ziekenhuisinfectie, ook wel nosocomiale infectie genoemd, is een infectie die wordt opgelopen in een ziekenhuisomgeving. Deze wordt verworven tijdens patiënten bezoek aan het ziekenhuis. Patiënten hebben een verminderde weerstand door een ziekte of na een operatie. Hierdoor kunnen zij sneller een infectie oplopen. Deze infecties kunnen ontstaan door kruisinfecties, dit door contact met andere mensen of gecontamineerde oppervlakten.⁷ In figuur 4 zijn meerdere wegen te zien waarop een gekoloniseerde patiënt een kwetsbare patiënt kan besmetten.

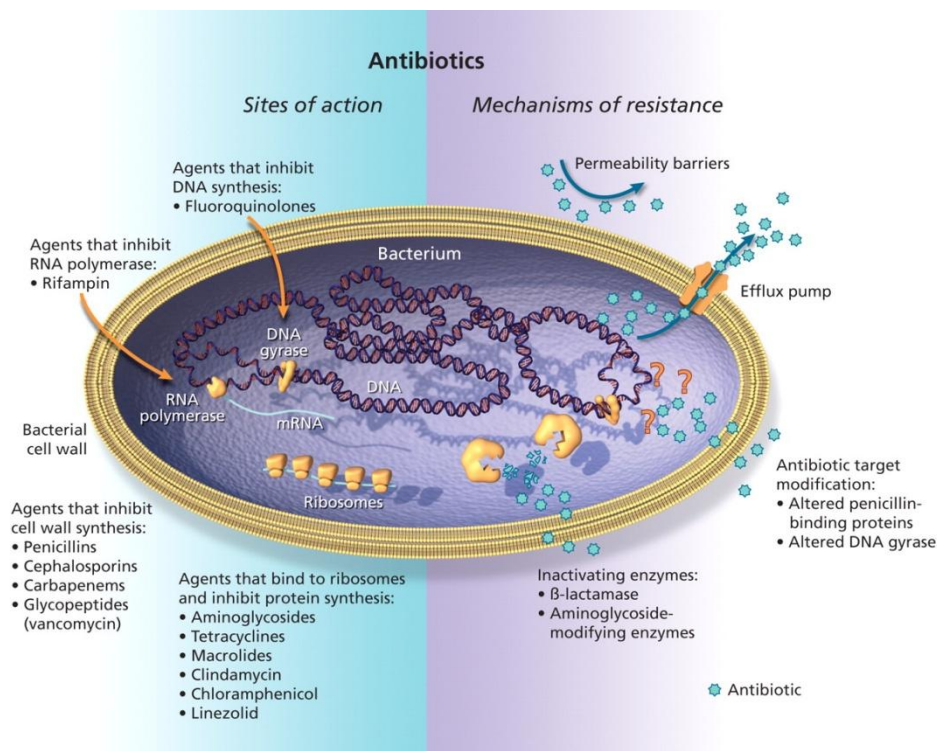


Figuur 4. Routes gekoloniseerde patiënt naar kwetsbare patiënt. Het kan via apparatuur, handen van personeel en/ of bezoekers en via gebruiksvoorwerpen waar meerdere mensen gebruik van maken zoals het toilet en deurkrukken.⁸

Ook kan er auto-infectie ontstaan waarbij de patiënt zichzelf infecteert met een bacterie. Bijvoorbeeld een darmbacterie die in de blaas terecht komt en een urineweginfectie veroorzaakt. Ongeveer 40% van de ziekenhuisinfecties zijn urineweginfecties. Maar ook postoperatieve pneumonie en sepsis komen voor.⁷ In de Nederlandse ziekenhuizen krijgt 5,5% van de opgenomen patiënten te maken met een ziekenhuisinfectie.⁹

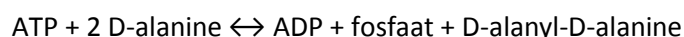
2.2 Vancomycine

Antibiotica kunnen op verschillende delen van een bacterie inwerken. In figuur 5 is te zien dat dat er verschillende aangrijpingspunten zijn voor de antibiotica soorten. Twee van de bekendste antibiotica mechanismen zijn inhibitie van eiwit synthese en verstoring van de celwand synthese om bacteriën te doden.

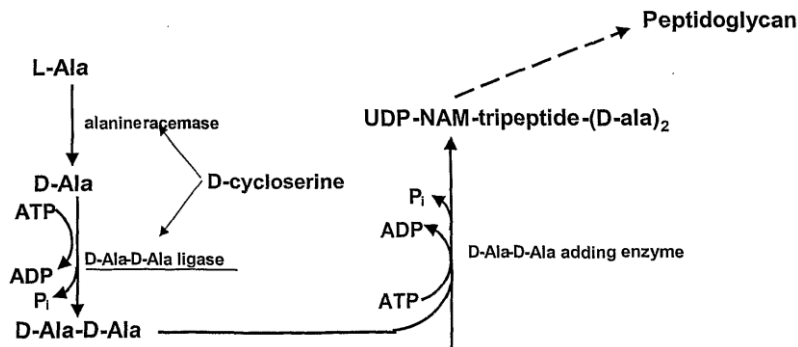


Figuur 5. Aangrijpingspunten en resistentie mechanisme antibiotica op bacteriën. Aan de linker kant van de bacterie zijn de verschillende basis gebieden te zien waarop antibiotica kunnen inwerken. Rechts zijn mechanismes te zien die worden gebruikt tegen antibiotica door de bacterie.¹¹

Vancomycine is een glycopetide die de celwand peptidoglycaan synthese verstoort in grampositieve bacteriën. Wanneer het peptidoglycaan wordt gesynthetiseerd worden twee moleculen van D-alanine samengevoegd door een ligase enzym. Dit gebeurt volgens deze reactievergelijking:



Aan de hand van figuur 6 wordt uitgelegd hoe de reactievergelijking van D-alanyl-D-alanine werkt.



Figuur 6. Schematische weergave van de synthese van peptidoglycaan. D-alanyl-D-alanine wordt toegevoegd aan UDP-NAM-tripeptide. Samen met enkele andere peptide wordt dit verankerd in de celwand waar het bijdraagt aan de sterkte van de celwand. Vancomycine kan binden op het D-ala-D-ala waardoor de structuur van de celwand wordt aangetast en bacterie zal overlijden.^{12,13}

2.3 Vancomycine-resistente Enterococcen

Er komen er wereldwijd steeds meer resistente bacteriën bij, vooral op plaatsen waar veel met antibiotica wordt gewerkt. Denk hierbij aan ziekenhuizen en de intensieve veehouderij. Recente voorbeelden zijn Meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Extended-spectrum bèta-lactamase (ESBL) vormende bacteriën en Vancomycine-resistente Enterococcen (VRE). De laatste groep zijn Enterococcen die resistent zijn tegen het antibioticum vancomycine. In het bijzonder zijn *E. faecalis* en *E. faecium* relevant als VRE's.¹⁰ *E. faecalis* en *E. faecium* zijn klinisch, zeker in ziekenhuizen, relevant zoals uitgelegd is in '2. Enterococcen'. Daarom wordt er voordat patiënten worden geopereerd preventief behandeld met antibiotica. Door de preventieve behandeling met antibiotica worden de natuurlijke flora van het lichaam aangetast. Resistente bacteriën die niet worden aangetast door de antibiotica kunnen infecties gaan veroorzaken. Immers de vele bacteriën zijn in competitie met elkaar bijvoorbeeld in de darmen.

Voordat de VRE's een grootschalig probleem werden waren er al Ampicilline-resistente Enterococcen (ARE), eind jaren '80.¹⁴ Echter is het zo dat Enterococcen van naturen al in meerdere mate resistent zijn tegen penicilline en ampicilline. Bij gebrek aan beter wordt er klinisch nog steeds gebruikt gemaakt van ampicilline, zeker bij Enterococcen infecties met een hoge resistentie patroon.¹⁵

2.3.1 Vancomycine genen

De Enterococcen hebben deze resistentie via horizontaal gen overdracht verkregen en ligt meestal op een plasmide. De belangrijkste genen zijn de *vanA* en *vanB*. Echter komen er ook *van* genen voor die in mindere mate een rol spelen in de resistentie tegen vancomycine. Waar deze vancomycine resistente genen vandaan komen is niet geheel duidelijk.¹⁶ Gedacht wordt dat vancomycine resistentie van de *Paenibacillus* spp. afkomt. Er zijn twee manieren om vancomycine resistentie te realiseren. De eerste manier is om D-alanyl-D-alanine, die gebruikt wordt voor het synthetiseren van de peptidoglycaan (figuur 6), te veranderen. Om D-alanyl-D-alanine aan te passen wordt 1 D-ala vervangen voor een D-lactate, dit zorgt voor een hoge resistentie. Op de plaats waar vancomycine bind aan D-ala-D-ala zitten 5 waterstofbruggen. Wanneer D-lac wordt vervangen voor een D-ala verandert de bindingsplaats, 1 van de 5 waterstofbruggen vervalt. Hierdoor heeft vancomycine 1000 maal minder affiniteit met de bindingsplaats op D-ala-D-lac. De tweede manier is om een 1 D-ala te vervangen door een D-ser, dit zorgt voor een lage resistentie. Het bindend uiteinde is vernietigd, vancomycine zal minder eenvoudig binden.^{17,18}

3. Technische achtergrond

In dit onderzoek is er met verschillende technieken gewerkt. Hieronder staan de theoretische achtergronden van de belangrijkste technieken.

3.1 DNA isoleren

De monsters dienen uit zuiver DNA te bestaan voor het gebruik van een Real-Time PCR. Het opzuiveren van DNA is gedaan via de MagNA Pure 96 van Roche. Samen met de MagNA Pure en de DNA and Viral NA Small Volume Kit wordt de isolatie en purificatie uitgevoerd. De DNA isolatie procedure is gebaseerd op het gebruik van Magnetic Glass Particles. Het is de bedoeling dat het vrijgekomen DNA bindt aan deze Magnetic Glass Particles. Na enkele was stappen is het DNA gezuiverd, vrij van residuen. Het opgezuiverde DNA kan dan worden gebruikt voor de Real-Time PCR.

3.2 De klassieke Polymerase Chain Reaction

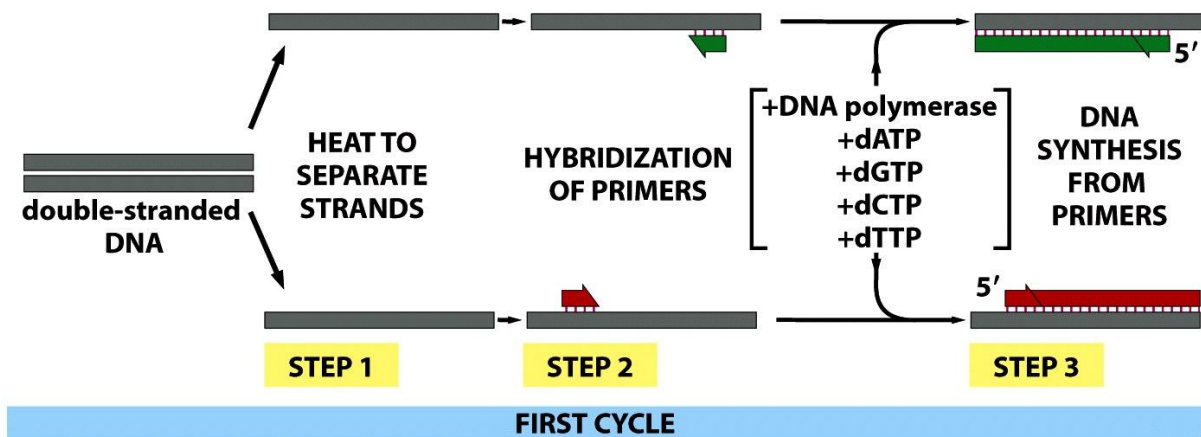
Het principe van de Polymerase Chain Reaction (PCR) berust op het amplificeren van een specifiek stukje DNA, de target sequentie. De target sequentie wordt een target-specifiek aantal cycli lang gekloneerd. Zo kan er bijvoorbeeld kan worden vastgesteld of het target DNA daadwerkelijk in het monster aanwezig is. Om dit te verwezenlijken zijn er twee oligonucleotide primers nodig die op een specifiek deel van de target sequentie binden, zie figuur 7. Daarbij is polymerase nodig om de primers te verlengen waardoor er dubbelstrengs DNA wordt gevormd. Het gevormde PCR product, of amplicon, wordt geelektroforeerd. Tijdens de elektroforese worden de fragmenten op grote gescheiden. Omdat de lengte van het target gen bekend is kan aan de hand van een marker bepaald worden of het target aanwezig is.

3.3 Real-Time PCR

Real-Time PCR berust op hetzelfde principe als de klassieke PCR. Real-Time PCR ook wel qPCR genoemd kan het geamplificeerde DNA al detecteren tijdens het kloneren. Het gevormde PCR product hoeft hierdoor niet meer geelektroforeerd te worden gezet voor detectie.

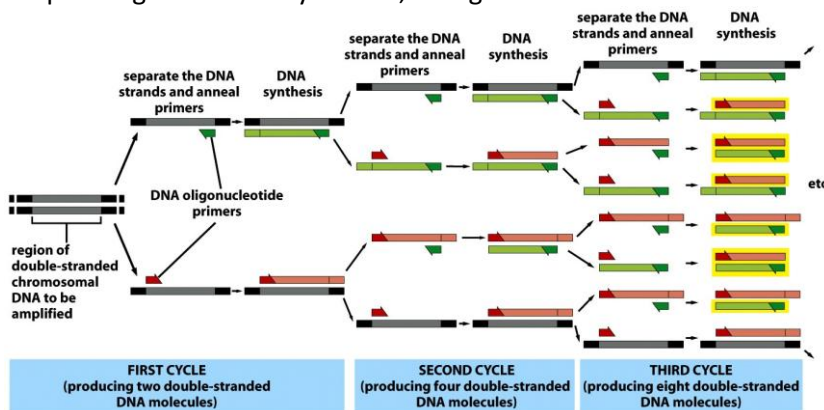
De reacties van een (Real-Time) PCR zijn opgedeeld in 3 verschillende fases zoals te zien is in figuur 7.

Denaturatie; Het aanwezige dubbelstrengs DNA wordt gescheiden (stap 1 in figuur 7). Annealing; De oligonucleotide primers aan het enkelstrengs DNA te binden. De primers vormen het startpunt voor de DNA polymerase (stap 2 in figuur 7). Extensie; DNA polymerase bindt aan de primers en wordt met behulp van dNTP's DNA gesynthetiseerd (stap 3 in figuur 7).



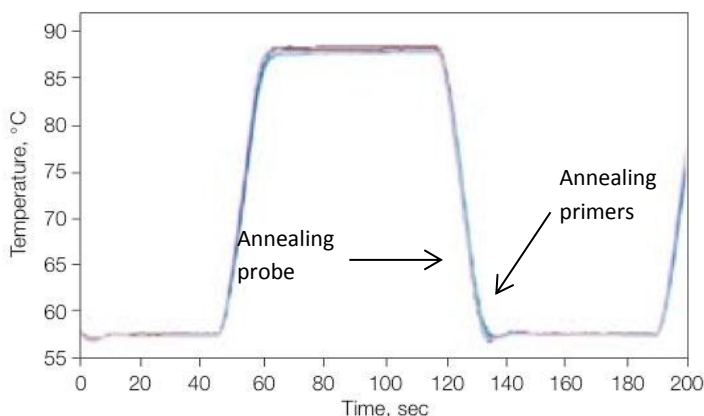
Figuur 7. PCR reactie. In dit figuur zijn de verschillende stappen van een PCR reactie weergegeven. Zie de tekst boven het figuur voor meer uitleg.¹⁹

Dit proces gaat 30 á 45 cycli door, zie figuur 8.



Figuur 8. De vermeerderingstappen van de PCR cycli. Hierin staan de eerste drie cycli van de PCR.¹⁹

Echter is er op het UMC gekozen voor een 2-staps Real-Time PCR. Dit houdt in dat de extensie stap wordt overgeslagen. Zoals te zien is in figuur 9 zal de probe een hogere temperatuur dan de primers. De probe moet eerder binden dan de primers omdat er dan kans bestaat dat het geamplificeerde stukje DNA dan geen signaal geeft. Voor de primers wordt de annealing temperatuur 60°C. De 2-staps Real-Time PCR is alleen mogelijk als het te amplificeren stuk DNA kleiner is dan 500 basenparen.

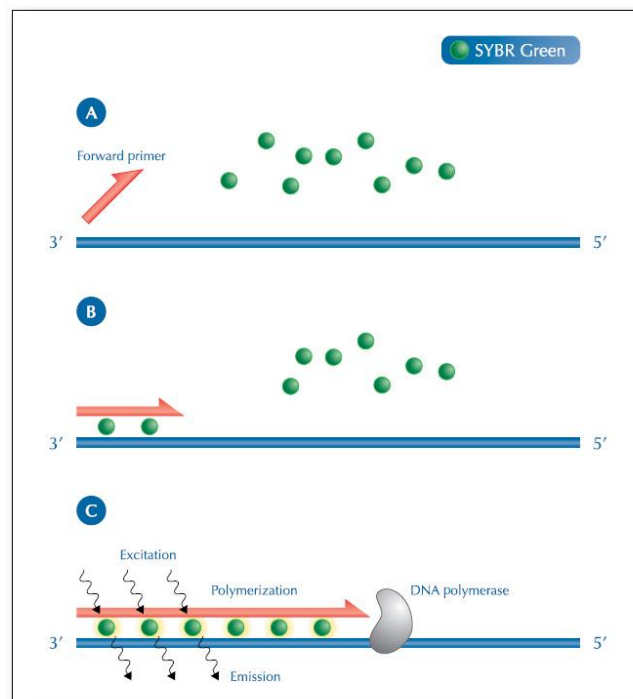


Figuur 9. 2-staps temperatuur cycli. Hierin is weer gegeven onder welke temperatuur de primes en probes binden in een 2-staps Real-Time PCR.²⁰

3.4 SYBR Green

Om een Real-Time PCR te kunnen visualiseren moet er een detecteerbare indicator aanwezig zijn. SYBR Green is een fluorescerende kleurstof die te detecteren is door de Real-Time PCR. De Real-Time PCR kan SYBR Green detecteren wanneer het bindt aan dubbelstrengs DNA. Bij de juiste golflengte van SYBR Green kan het gevormde dubbelstrengs DNA worden gemeten. SYBR Green werkt als volgt: In figuur 10A is het DNA gedenateerd in de denaturatie stap van de Real-Time PCR. Het SYBR Green is nog vrij aanwezig in de reactiemix. Vervolgens zullen in figuur 10B de primers binden aan het enkelstrengs DNA bij de annealing stap in de Real-Time PCR. In figuur 10C zal DNA polymerase binden aan de primers het DNA verlengen. Hierdoor zullen meerdere SYBR Green moleculen zich kunnen binden aan het dubbelstrengs DNA en het fluorescentie niveau zal hierdoor stijgen. Gevolg is dat hoe hoger de concentratie amplicon hoe hoger de fluorescentie.

SYBR Green is een simpele en goedkope manier om dubbelstrengs DNA in Real-Time PCR te detecteren. SYBR Green is niet in staat om alle specifieke producten te detecteren. Gevolg is dat SYBR Green zowel een signaal afgeeft bij het gewenste PCR product als bij niet specifieke producten en primerdimeren.



Figuur 10. Schematische weergave van een van SYBR Green PCR.²²

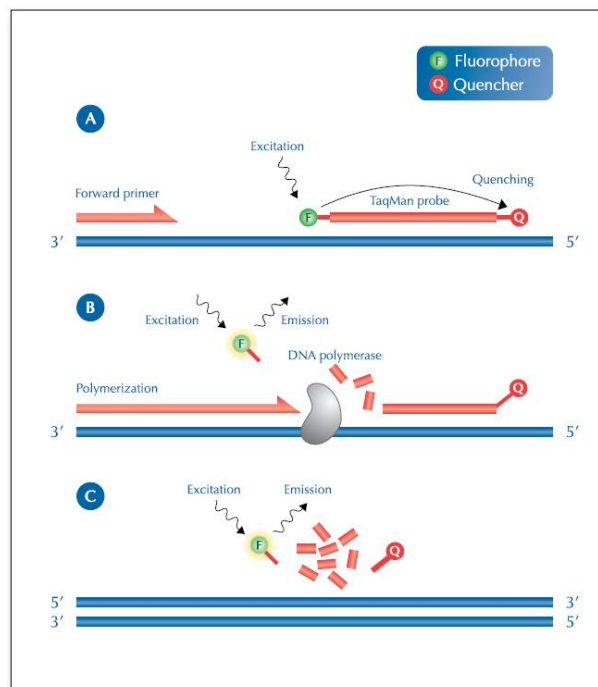
3.4.1 Smelt curve

Het gewenste PCR product, niet specifieke producten en primerdimeren zijn te onderscheiden doormiddel van een smelt curve, zie figuur 15B. De smelt curve analyse kan de Real-Time PCR uitvoeren aan het einde van het replicatie proces. Dit doet de Real-Time PCR door de temperatuur langzaam te verhogen naar 95°C. Hierdoor denatureert het gevormde amplicon, de SYBR Green zal ontbinden en zijn fluorescentie niveau dalen. Hoe hoger de temperatuur, des te lager de fluorescentie wordt. Deze meet de Real-Time PCR en plaatst dit overzichtelijk in een grafiek. De verandering in de hellingsgraad van de curve wordt gebruikt om de 1^e afgeleide van de smeltcurve te berekenen. In de grafiek van deze 1^e afgeleide zijn dan smelt pieken te zien. Wanneer er op verschillende temperaturen pieken liggen is er sprake van meerdere gevormde producten.²¹

3.5 TaqMan Probe

Er bestaat naast SYBR Green nog een detectiemethode voor de Real-Time PCR. Doormiddel van een probe, welke in tegenstelling tot SYBR Green zeer specifiek is maar ook duurder. Een probe bind bij een bepaalde temperatuur specifiek aan een vooraf geselecteerd stukje enkelstrengs DNA. De probe is gelabeld met fluorophore aan de 5'-kant en een quencher op de 3'-kant. De fluorophore is het fluorescentie label en zal wanneer aangestraald met de juiste golflengte licht uitzenden. Dit wordt echter tegengehouden door de quencher wanneer de TaqMan probe nog intact is.

De TagMan probe werkt als volgt: doormiddel van TaqMan polymerase bind de TaqMan probe aan het enkelstrengs DNA na denaturisatie. Ondanks dat de fluorophore wordt aangestraald is er geen emissie vanwege de quencher, zoals te zien is in figuur 11A. Omdat de fluorophore en quencher hydrofoob zijn 'binden' (staan) ze eigenlijk naar elkaar toe. In figuur 11B is te zien hoe het DNA polymerase het DNA verlengt en de TaqMan probe afbreekt. Hierdoor komt de fluorophore vrij te liggen en begint met licht emissie. Immers wordt de fluorophore niet meer onderdrukt omdat, de fluorophore en quencher van elkaar verwijderd raken. Na het afbreken van de probe door het polymerase kan er een nieuwe streng DNA aangebouwd door DNA polymerase, zie figuur 11C en wordt het DNA dubbelstrengs.



Figuur 11. Schematische weergave van een TaqMan probe PCR.²²

4. Materiaal & Methode

4.1 Stammen

Voor het onderzoek is er gebruikt gemaakt van twee stamcollecties. In bijlage 2 staan 23 stammen die circuleren binnen het UMC. De 23 circulerende monsters selectie is gebaseerd op 10 VRE monsters, 11 Enterococci monsters die niet vancomycine resistent zijn, 1 MRSA en 1 Hemolytische Streptococcus A (HSCA). De MRSA is gekozen vanwege de hoge resistentie tegen verschillende antibiotica. Omdat HSCA is zeer verwant is aan de Enterococci, is besloten om deze ook mee te nemen.

Bijlage 3 bevat een overzicht van de UMC stammen die in het UMC worden bewaard met verschillende multilocus sequence typing die over de hele wereld vandaan komen. In totaal zijn dit 38 monsters waarvan 2 negatief, 22 *vanA* positief en 13 *vanB* positief en 1 *vanA/B* positief.

4.2 Ontwerp primers & probes

Bij het opzetten van een Real-Time PCR wordt eerst gekeken naar primers en probes. Dit wordt in silico gedaan met internet sites en verschillende software programma's die kunnen helpen om de juiste primers en probes te selecteren. Het National Center for Biotechnology is een internet database die onder andere genomische informatie bevat. Hierin kan worden gezocht naar het *vanA/B* gen. Door dit te doen worden er sequenties gevonden van dit gen in meerdere organismen via deze database. Met een sequentie van *vanA/B* kan er worden gekeken naar een gunstige positie voor de primers en probes. De sequentie *vanA/B* kan worden geüpload in het softwareprogramma CloneManager 9. Dit programma is in staat om primers/probes zelf te zoeken op de gekozen sequentie onder van te voren bepaalde parameters zoals lengte, het gehalte GC's etc.. Zo kan er een voorspelling worden gedaan over de juistheid van deze primers en probes.

4.2.1 Primers & Probes

Het UMC is niet het eerste ziekenhuis om een voorselectie op de verdachte VRE monsters middels Real-Time PCR op te zetten. In het St. Antoniusziekenhuis te Nieuwegein is er al eerder VRE Real-Time PCR opgezet. In tabel 1 zijn de sequenties van de desbetreffende primers en probes opgenomen. In bijlage 1 is te zien hoe de sequentie alignments staan met de primers en probes van Nieuwegein en het UMC.

Tabel 1. Sequenties van vanA/B Nieuwegein en UMC primers/probes. Een overzicht van de primers en probes met labels die worden gebruikt voor de vanA/B Real-Time PCR in Nieuwegein en op het UMC.

Plaats	Gen	Positie	Sequentie
Nieuwegein	vanA	Forward primer	GCC GGA AAA AGG CTC TGA A
		Reverse primer	TCC TCG CTC CTC TGC TGA A
		Probe	6FAM-ACG CAG TTA TAA CCG TTC CCG CAG ACC-BHQ_2
	vanB	Forward primer	CGC AGC TTG CAT GGA CAA
		Reverse primer	GGC GAT GCC CGC ATT
		Probe	LC640-TCA CTG GCC TAC ATT C-BHQ_2
UMC	vanA	Forward primer	CTG CAA TAG AGA TAG CCG CT
		Reverse primer	CGC AAG GTT TTT CGC ACA
		Probe	6FAM-TTA TAC ATT GGA ATT ACG AAA TCT GGT GTA-BBQ
	vanB	Forward primer	GCC GAY AGT CTC CCC GCC ATA
		Reverse primer	CCA CAT CAA TAC GCC GTG
		Probe	Cyan500-GGA AAA CGC ATG GGC TGC TT-BBQ

De primers en probes van Nieuwegein zijn besteld bij de firma IDT en de primers en probes van UMC bij TIB MOLBIOL. De primers worden opgelost in H₂O, de hoeveelheid is aangegeven door de fabrikant.

4.3 DNA opzuiveren

Voordat het DNA op te zuiveren is via de MagNA Pure 96 van Roche moet het DNA eerst worden voorbereidt. Het voorbereiden is op verschillende manieren mogelijk. Door direct een bacterie stam van een bloedplaat te nemen en in een epje met 200 µl cobas buffer op te lossen of door uit een bouillon 100 µl in 100 µl cobas buffer te doen. Deze epjes worden dan ingevroren in de -80 vriezer. Alvorens de monsters de MagNA Pure ingaan worden ze eerst nog een kwartier verhit bij een temperatuur van 95°C in een hitteblok. Na het verhitten wordt 100 µl monster uit de epjes gehaald en in de Processing Cartridge gepipetteerd. Dit is een 96-wells plaat met een grotere diepte, zodat er meer volume in kan. Tevens wordt er bij de 100 µl monster, 10 µl PhHV gepipetteerd. De PhHV is de interne controle. Na het pipetteren kan de processing cartridge op de juiste plaats in de MagNA Pure worden gezet. Het figuur 11 geeft aan hoe de MagNA Pure geladen wordt, te zien in de laden A t/m E. Vervolgens zal het programma worden gestart om het DNA op te zuiveren. Dit gaat als volgt in zijn werk:

1. Alvorens de monsters in de MagNA Pure gaan worden ze, vanuit de vriezer, eerst een kwartier lang opgekookt.
2. In de MagNA Pure wordt er eerst het monster materiaal gelyseerd, hierdoor komt het DNA vrij te liggen.
3. De MGP worden erbij gepipetteerd. Onder invloed van isopropanol en een hoge zoutconcentratie bindt het DNA aan het oppervlakte van de MGP.
4. Met een magneet worden de MGP in de buizen gehouden en worden de residuen afgevoerd. Vervolgens zijn er nog enkele was stappen.
5. Na de was stappen blijft er gezuiverd DNA over. Door verhitting en een lagere zoutconcentratie wordt het DNA geëluëerd van de MGP.
6. Het losse DNA wordt in een 96-wells plaat gepipetteerd. De monsters kunnen dan worden bewaard in de vriezer.



Figuur 12. Een overzicht met de verschillende lade van de MagNA Pure 96. Hierin gaan de benodigheden voor de DNA opzuivering.

4.4 Master mixen

De master mixen die voor de diagnostiek worden gemaakt en gebruikt, worden via een vast schema gemaakt, te zien in tabel 2. Met dit schema zijn ook de master mixen voor de VRE Real-Time PCR gemaakt.

Tabel 2. Overzicht componenten Real-Time PCR. Overzicht van de componenten die nodig zijn voor de SYBR Green en de Probe Real-Time PCR's

Component	SYBR Green PCR (µl)	Probe PCR (µl)
Primer Fw	-	0,1
Primer Rev	-	0,1
Probe	-	0,025
H ₂ O	3,5	5,275
Probe Master	-	7,5
SYBR Green	7,5	-
Primer set*	2	-
Totaal	13	13

*Primer set bestaat uit 5 µl Fw primers + 5 µl Rev primers + 190 µl H₂O.

** Voor een multiplex geldt primer set X (5 µl +5 µl) + primer set Y(5 µl +5 µl) + 180 µl H₂O.

De componenten Probe Master, SYBR Green en de H₂O komt bij de firma Roche vandaan.

4.5 Real-Time PCR

De moleculaire diagnostiek van het UMC maakt gebruik van de LightCycler 480 Instrument II PCR van Roche. Deze Real-Time PCR is op een wells-plaat gebaseerde PCR die meerdere mono- en multiplex protocollen kan draaien. Na het maken van de master mixen en het opzuiveren van het DNA kan dit worden gepipetteerd in een 96-wells plaat van Roche. Per epje wordt er 13 µl mastermix en 2 µl opgezuiverd DNA gepipetteerd. Na het pipetteren van de mastermix en de monsters wordt de 96-wells plaat 1 minuut bij 1000 rpm afgedraaid. Vervolgens is de 96-wells plaat gereed voor de Real-Time PCR.

Op het UMC wordt er gewerkt met een 2-fase Real-Time PCR, de extensie stap wordt overgeslagen. Denaturatie gebeurt bij 95°C, 10 minuten lang. Voor de annealing gaat de temperatuur 1 minuut naar 60°C. Volgens weer na 95°C, 5 seconden. Dit gaat 45 cycli door. Wanneer er gebruik gemaakt wordt van de SYBR Green Real-Time PCR, wordt er aan het einde van de 45 cycli, een smeltcurve gemaakt. Nadat de laatste annealing heeft plaats gevonden bij 60°C wordt de temperatuur geleidelijk op gevoerd naar 97°C. Een probe Real-Time PCR bevat dit niet.

4.5.1 Golflengtes probes

Probes zijn gelabeld met de fluorophore die bij een bepaalde golflengte licht uitzenden. In tabel 3 staan de verschillende fluorophores van de probes van *vanA/B*. Daarbij in staan de verschillende excitaties en emissies van de betreffende fluorophores.

Tabel 3. De probe labels met excitatie en emissie. De verschillende fluorophores met de excitatie en emissie in Nm.

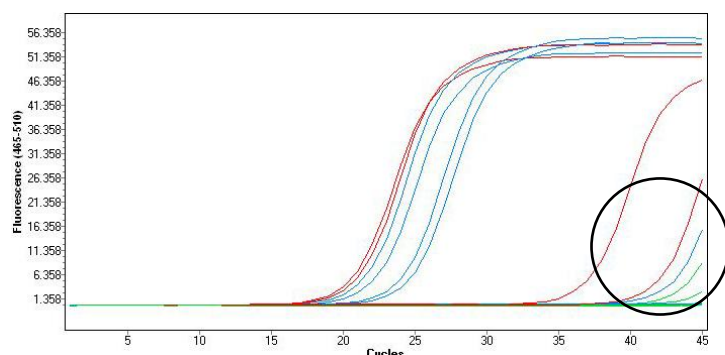
Probe	Fluorophore	Excitatie	Emissie
vanA Ng	6FAM	465	510
vanB Ng	LC640	533	640
vanA UMC	6FAM	465	510
vanB UMC	CYAN500	440	448

5. Resultaten

De resultaten zijn verdeeld in verschillende paragrafen specifiek voor het onderwerp. De paragrafen zijn zo verdeeld dat het een overzichtelijke opsomming is van de verschillende bezigheden.

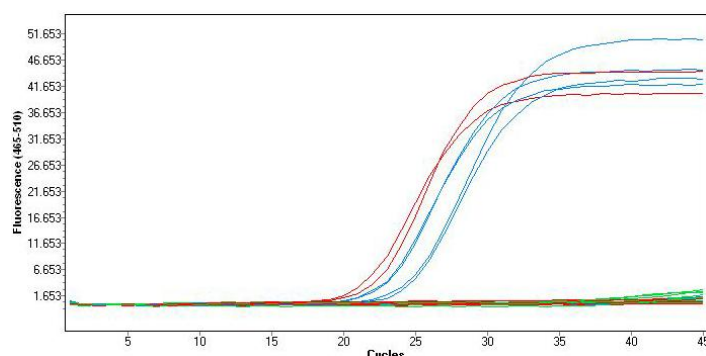
5.1 VanA Real-Time PCR

Voor *vanA* waren de resultaten vrij gemakkelijk te interpreteren. *VanA* is een redelijk uniek gen binnen de Enterococceen genus. De *vanA* Real-Time PCR's gaven dan ook veel goede resultaten na verschillende pilots. In eerste instantie is gewerkt met 23 circulerende monsters. De monsterselectie is gebaseerd op 10 VRE monsters, 11 Enterococceen monsters die niet vancomycine resistent zijn, 1 MRSA en 1 HSCA, zie bijlage 2. Deze 23 circulerende monsters zijn getest met SYBR Green en vervolgens met probes van *vanA* Nieuwegein en UMC. In figuur 13 staat een uitslag van een SYBR Green Real-Time PCR van *vanA* met de Nieuwegein primers. Deze uitslag is representatief voor alle *vanA* uitslagen met SYBR Green. In de cirkel in figuur 13 is de te zien dat ook na de 35 cycli er nog monsters op kwamen. Het zijn negatieve monsters die, uit latere bevindingen, gecontamineerd bleek te zijn.



Figuur 13. De amplificatiecurves van *vanA* met de Nieuwegein primers in een SYBR Green Real-Time PCR. De 6 opkomende lijnen voor 25 cycli in rood en blauw zijn de positief bevonden monsters. In de cirkel is te zien dat er nog 5 monsters opkwamen na 35 cycli, deze monsters zijn negatief.

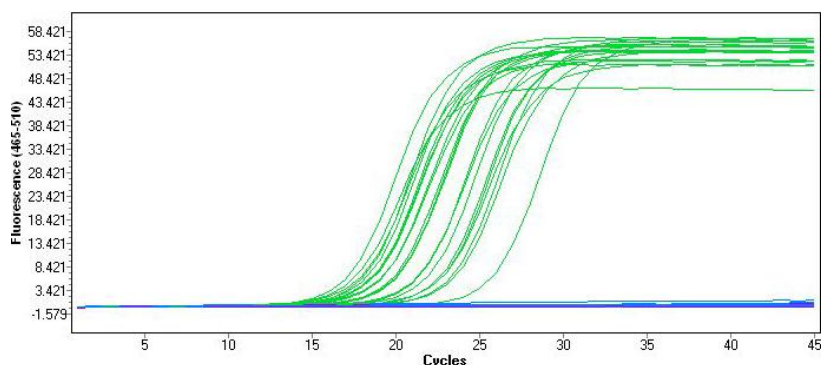
De *vanA* Real-Time PCR's met probes van zowel Nieuwegein als het UMC is ook zeer vergelijkbaar. Deze zijn ook gemeten met de 23 circulerende monsters die zijn gebruikt voor de SYBR Green. In figuur 14 is de *vanA* Nieuwegein met probe te zien.



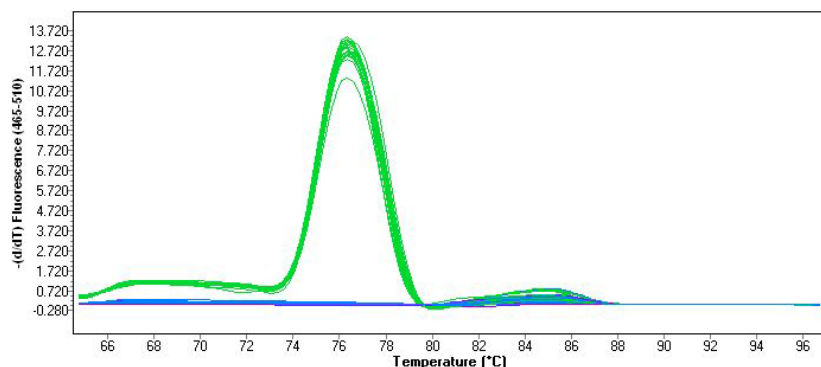
Figuur 14. De amplificatiecurve van *vanA* Nieuwegein met de probe. De 6 opkomende lijnen in rood en blauw zijn de positief bevonden monsters.

Om een beter beeld te krijgen betreffende de keuze voor een primer set, is er voor gekozen om alle primer sets te testen met de 38 UMC stammencollectie monsters. Zie bijlage 3 voor een overzicht

van deze monsters. In totaal zijn dit 38 monsters waarvan 2 negatief, 22 *vanA* positief en 13 *vanB* positief en 1 *vanA/B* positief. In eerste instantie zijn de *vanA* primers sets Nieuwegein en UMC getest met SYBR Green. De UMC Real-Time PCR kwam er zeer goed uit zoals te zien is in figuur 15A en 15B. De groenen lijnen zijn de positieve *vanA* monsters in figuur 15A en 15B en blauw zijn de negatieve monsters. Alle 22 monsters die positief waren voor *vanA* zijn in de UMC Real-Time PCR ook positief geworden. De temperatuur van de smeltcurve is 76,5°C voor alle 22 positieve monsters voor *vanA*.



Figuur 15A. De amplificatiecurve van *vanA* UMC. De groenen lijnen zijn *vanA*, *vanB* is blauw, negatieve monsters paars en de gele lijn *vanA/B* positief.



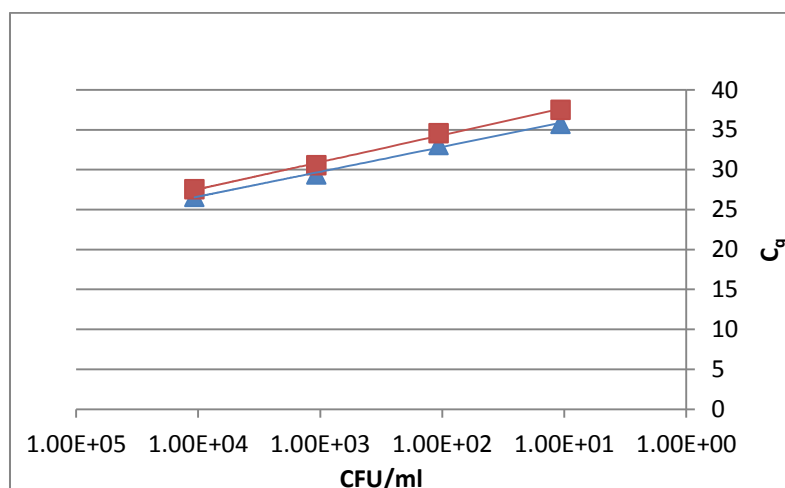
Figuur 15B. De smeltcurve van *vanA* UMC. De groenen lijnen zijn *vanA*, *vanB* is blauw, negatieve monsters paars en de gele lijn *vanA/B* positief. De temperatuur van de smeltcurve ligt bij 76,5°C.

5.1.1 Multiplex *vanA/B*

Na de eerste testen met de probes voor *vanA* en *vanB* is er besloten of een multiplex PCR mogelijk was. Zo kon er worden gezien of er nog eventuele problemen met dimeer vorming tussen de primers onderling werden gevonden. Voor de Real-Time PCR's zijn twee master mixen gemaakt met *vanA/B* Nieuwegein bij elkaar en *vanA/B* UMC. Uit de uitslagen van deze Real-Time PCR's bleken geen productvorming tussen de primers en probes te vormen. De resultaten van de *vanA* Real-Time PCR's staan in de bijlage 4.

5.1.2 Verdunningsreeks *vanA*

Om de gevoeligheid te testen is er een verdunningsreeks gemaakt van een positieve *vanA* stam. De werkwijze staat beschreven in de bijlage 5. In figuur 16 is te zien hoe de verdunningsreeks van de twee *vanA* Real-Time PCR's van Nieuwegein en UMC lopen. De *vanA* Nieuwegein is gemarkeerd met de blauwe driehoeken. Tussen elk punt zit ongeveer 3 C_q -waarden, dit houdt in dat een macht 10 verschil zit in de verdunning die wordt gebruikt. Voor de berekeningen van de verdunningsreeks, zie bijlage 6.



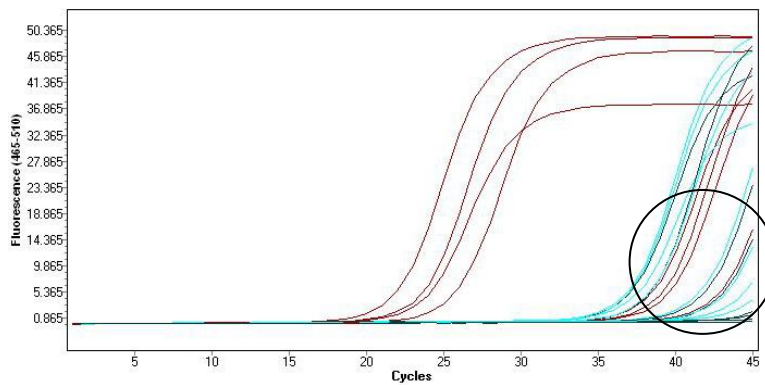
Figuur 16. De verdunningsreeks met vanA Nieuwegein en UMC. De rode blokken zijn vanA UMC en de blauwe driehoeken vanA Nieuwegein.

De kleinste hoeveelheid CFU/ml dat te detecteren valt in de *vanA* verdunningsreeks is 1,07 E+01 CFU/ml. De 1,07 E+01 CFU/ml hoort bij een C_q -waarden van 35,71 en 37,49. Beide zijn te hoog en daarom niet goed genoeg voor klinische diagnostiek. Maar bij de concentratie 1,07 E+04 CFU/ml zijn de C_q -waarden 26,59 en 27,53 schappelijk. De concentratie 1,07 E+04 CFU/ml staat gelijk aan 107333 bacteriën.

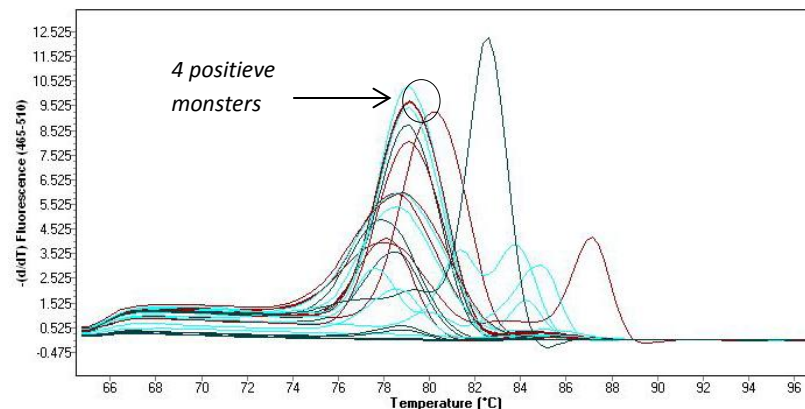
5.2 VanB Real-Time PCR

5.2.1 SYBR Green vanB

Het *vanB* gen is minder geconserveerd dan het *vanA* gen. Het *vanB* gen komt dan ook, met wat kleine verschillen in DNA, in meerdere bacteriën voor. De aanpak was voor het *vanB* gen was in het begin het zelfde als van het *vanA* gen. De *vanB* Nieuwegein en UMC zijn getest in een SYBR Green Real-Time PCR met de 23 circulerende monsters, zie bijlage 2. In figuur 17A en 17B staan representatieve voorbeelden van uitslagen van *vanB* met de Nieuwegein primers. Figuur 17A geeft de rode amplificatiecurve weer van de vier positieve *vanB* monsters. Dit komt overeen met de vier positieve monsters die geselecteerd waren in de 23 circulerende monsters. Het rondje in figuur 17A is te zien dat er nog veel monsters opkomen na de 35 cycli. In het figuur ernaast 17B, staat de smeltcurve. Het rondje geeft de vier positieve monsters aan. Drie liggen bij elkaar bij 79°C waarbij één monster meer naar rechts ligt. Dit komt overeen met één van de vier monsters die geremd is in de amplificatiecurve.

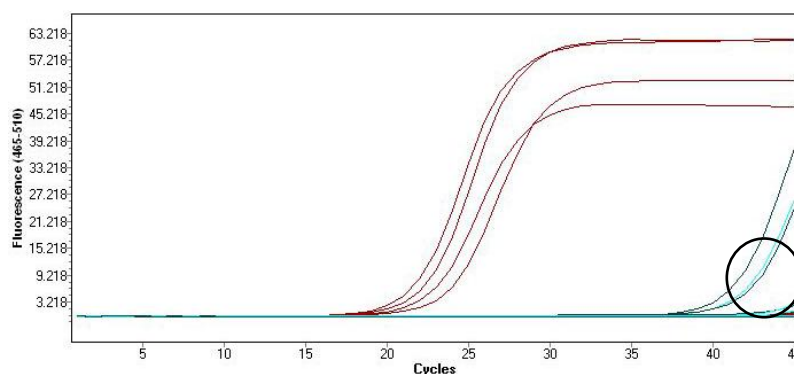


Figuur 17A. Amplificatiecurve van vanB met de Nieuwegein primers. De vier positieve opkomende monsters voor 25 cycli, zijn rood gekleurd. De monsters in de cirkel zijn allen negatief.

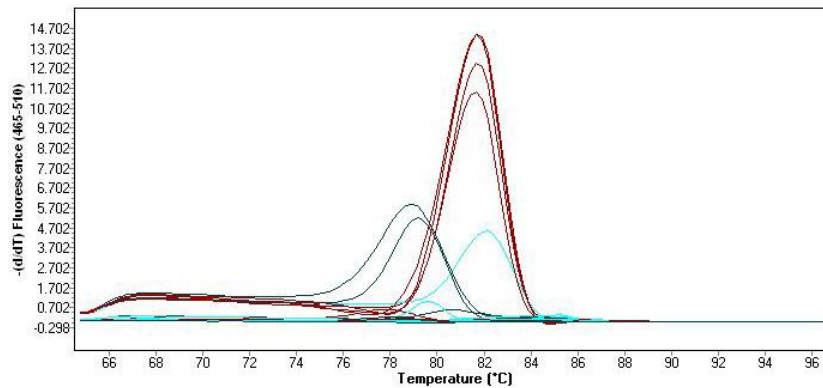


Figuur 17B. De smeltcurve van vanB met de Nieuwegein primers. De vier positieve monsters zijn aangegeven in de cirkel met de kleuren rood en licht blauw. De andere pieken zijn de monsters die omcirkelt zijn in figuur 17A.

De resultaten van *vanB* Nieuwegein waren niet optimaal. Echter bleek de *vanB* UMC betere resultaten te geven omdat er minder negatieve monsters opkwamen. In figuur 19 en 20 staan de resultaten van *vanB* UMC. Wat opvalt, is dat in figuur 18A in het rondje minder monsters (3 stuks) opkomen na 40 cycli in verhouding met de *vanB* Nieuwegein in figuur 17A. Ook de smeltcurve in figuur 18B zijn hier de vier positieve monsters uit de 23 getest monsters duidelijk zichtbaar in een piek bij 81,5°C. De overige piekjes zijn de monsters die na 40 cycli opkomen.



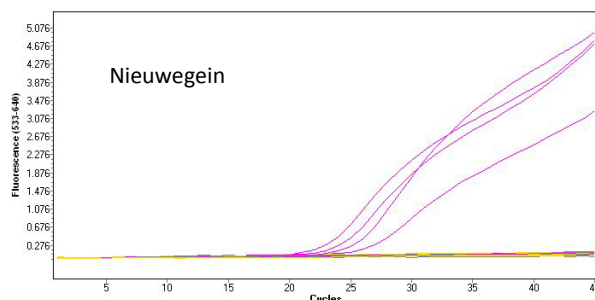
Figuur 18A. De amplificatiecurve van vanB met de UMC primers. De vier positieve opkomende monsters voor 25 cycli, zijn rood gekleurd. In de cirkel zijn 3 monsters weergegeven die negatief zijn.



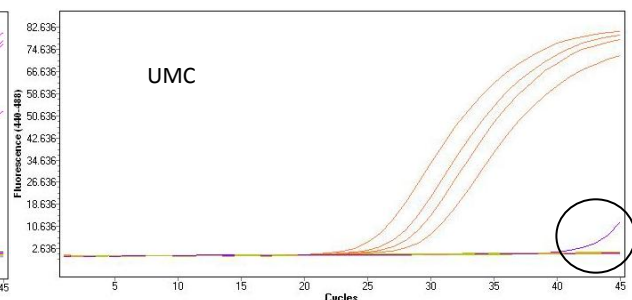
Figuur 18B. De smeltcurve van *vanB* met de UMC primers. De vier positieve opkomende monsters zijn rood gekleurd. De temperatuur ligt bij 81,5°C. De overige drie pieken in het figuur zijn de negatieve monsters die in figuur 18A omcirkelt zijn.

5.2.2 Probe vanB

Na de wisselende resultaten van de SYBR Green Real-Time PCR's van *vanB* met Nieuwegein en UMC is er besloten om te bekijken of de resultaten met de probe beter zouden zijn. De eerste probe Real-Time PCR is gedaan met de 23 circulerende monsters. De *vanB* Nieuwegein amplificatiecurve, figuur 19 zijn de 4 positieve monsters duidelijk zichtbaar. Echter lopen de curves niet in de karakteristieke S-curve. Daarentegen is in figuur 20, de amplificatiecurves van *vanB* UMC, de karakteristieke S-curve beter te herkennen. In de cirkel in figuur 20 is te zien hoe na 40 cycli nog een monster opkomt, dit bleek na onderzoek contaminatie te zijn.



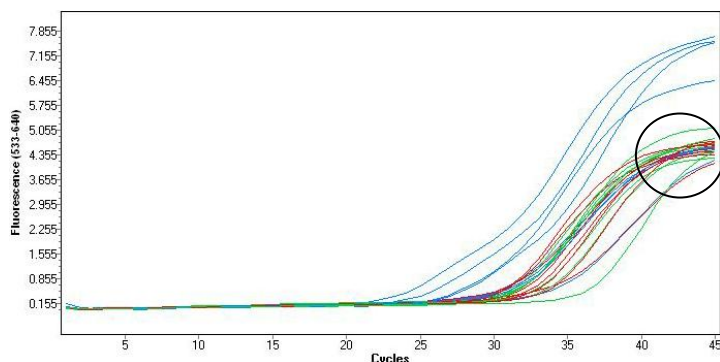
Figuur 19. De amplificatiecurves van *vanB* Nieuwegein. De vier paarse lijnen zijn positief. Wat opvalt, zijn dat de karakteristiek s-curve ontbreekt.



Figuur 20. De amplificatiecurve van *vanB* UMC. De vier oranje lijnen zijn positief, hier is wel een karakteristieke s-curve te zien. In de cirkel is een gecontamineerd monster te zien.

5.2.3 Multiplex vanA/B

Ondanks dat de resultaten met de probes niet helemaal bevredigend waren is toch gekeken of er een multiplex Real-Time PCR's met deze primers en probes mogelijk was. Zoals beschreven stond in het kopje multiplex *vanA/B* in het resultaten stuk van *vanA*, bleken er geen problemen te zijn tussen de primers en probes. Echter bleek dat de interne controle de zelfde excitatie en emissie had als de probe van *vanB* Nieuwegein, zoals te zien is in figuur 21 in de cirkel.



Figuur 21. De amplificatiecurve van vanB Nieuwegein. De vier blauwen lijnen zijn de positieve monsters. Zoals in de cirkel te zien is komt de interne controle op.

5.2.4 Verbetering vanB Real-Time PCR

Vanwege de slechtere uitslag van de *vanB* Nieuwegein, die uitgelegd staan in '5.2.1 SYBR Green vanB' en '5.2.2 probe vanB' is besloten om de *vanB* UMC te gaan optimaliseren. In bijlage 1, is de sequentie alignment te zien van *vanB* UMC. Hierin staan de primers en probe die origineel gebruikt zijn voor de Real-Time PCR. De originele reverse primer bevat op twee plaatsen een wobbelen. Twee wobbels in een primer is minder geschikt in verband met binding aan het enkelstrengs DNA. De reverse primer is acht basenparen opgeschoven naar de probe toe. Hierdoor kreeg de primer nu een annealing temperatuur van 60°C. Door de primer op te schuiven is er ook een wobbelen minder in de primer. Voor de verduidelijking is in tabel 4 de originele reverse primer en de nieuwer reverse primer onder elkaar gezet. De base W in de reverse primer new kan met A of T binden.

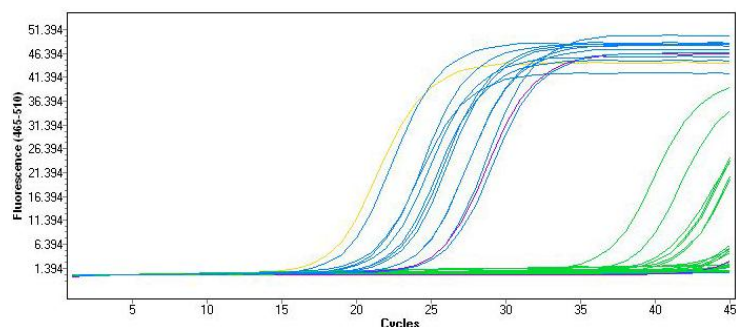
Tabel 4. De originele en vernieuwd reverse primer van vanB UMC. De W in de sequentie van de reverse primer new kan een A of T zijn.

Gen	Positie	Sequentie
<i>vanB</i>	Reverse primer	CCA CAT CAA TAC GCC GTG
	Reverse primer New	CAA TAC GCC GWG TTT CGT AT

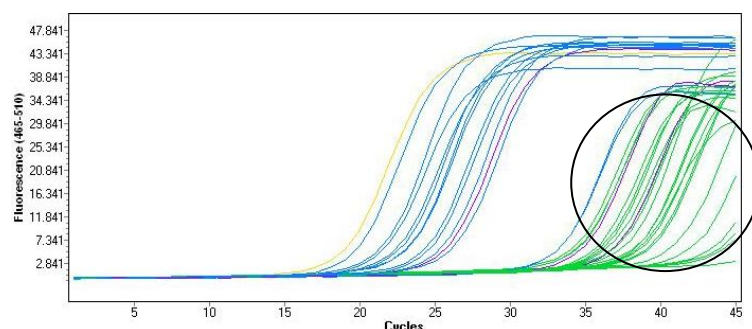
Met de reverse primer van *vanB* UMC is een SYBR Green Real-Time PCR uitgevoerd met de 23 circulerende monsters. De uitslag leek een exact op eerdere uitslagen van *vanB* UMC met SYBR Green.

5.2.5 SYBR Green 23 circulerende stammen

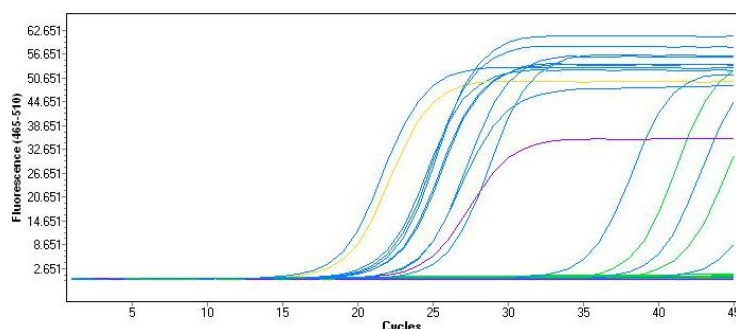
Om een beter beeld te krijgen betreffende de keuze voor een primer set, is er voor gekozen om alle primers sets te testen met de 38 UMC stammencollectie monsters. Zie bijlage 3 voor een overzicht van deze monsters. In totaal zijn dit 38 monsters waarvan 2 negatief, 22 *vanA* positief en 13 *vanB* positief en 1 *vanA/B* positief. In de figuren 22, 23 en 24 staan de amplificatiecurves van *vanB* Nieuwegein, UMC en de UMC met de reverse primer new. De groene lijnen zijn *vanA* positief, de blauwe lijnen positief voor *vanB*, paars negatief en geel het *vanA/B* monster. Wat opvalt, is dat in figuur 23, de amplificatiecurve van *vanB* UMC, is dat er zeer veel monster na 30 cycli als nog opkwamen. Dit staat in contrast met eerdere uitslagen van de UMC SYBR Green Real-Time PCR's. Beide UMC Real-Time PCR's hebben positieve *vanB* monsters die zeer laat pas opkomen, >30. Voor de klinische diagnostiek is dit niet aanvaardbaar. Voor alle drie de Real-Time PCR's kwam er een negatief monster op, de paarse lijn. Dit monster (E7350) zal worden besproken in de discussie.



Figuur 22. De amplificatiecurve van vanB Nieuwegein. De groene lijnen zijn vanA positief, de blauwe lijnen positief voor vanB, paars negatief en geel het vanA/B monster. De groene lijnen die na de 35 cycli opkomen zijn vanA monsters.



Figuur 23. De amplificatiecurve van vanB UMC. De groene lijnen zijn vanA positief, de blauwe lijnen positief voor vanB, paars negatief en geel het vanA/B monster. In de cirkel is te zien dat er zeer veel monsters opkomen.



Figuur 24. De amplificatiecurve van vanB UMC reverse primer new. De groene lijnen zijn vanA positief, de blauwe lijnen positief voor vanB, paars negatief en geel het vanA/B monster. Ook hier komen na de 35 cycli enkele groene en blauwe lijnen op.

5.2.6 Nieuwe probe vanB

Nadat de reverse primer van vanB UMC was getest was de volgende stap om de probe aan te passen. Deze voor vanB UMC bevat de wobbler K zodat deze kan binden aan een T maar ook aan een G. Daarmee zal de probe op meerdere sequentie alignments passen, zie bijlage 1. Tevens zijn er 2 basen aan de voorkant en 1 base aan de achterkant bijgekomen, zodat de temperatuur van 63°C naar 65°C gaat. In verband met het eerder moeten hechten van de probe in de 2-staps Real-Time PCR, zie figuur 9. In tabel 5 is te zien wat de sequentie van de originele en de nieuwe probe is.

Tabel 5. De originele probe met de vernieuwd probe voor vanB UMC. De originele probe heeft een Cyan500 fluorophore en de new probe een Alex532N fluorophore. De K in de new probe kan een T of een G zijn.

Gen	Naam	Sequentie
vanB	Originele probe	Cyan500-GGA AAA CGC ATG GGC TGC TT-BBQ
	New probe	Alex532N-TAG GAA AAC GCA TGG KCT GCT TG-BHQ

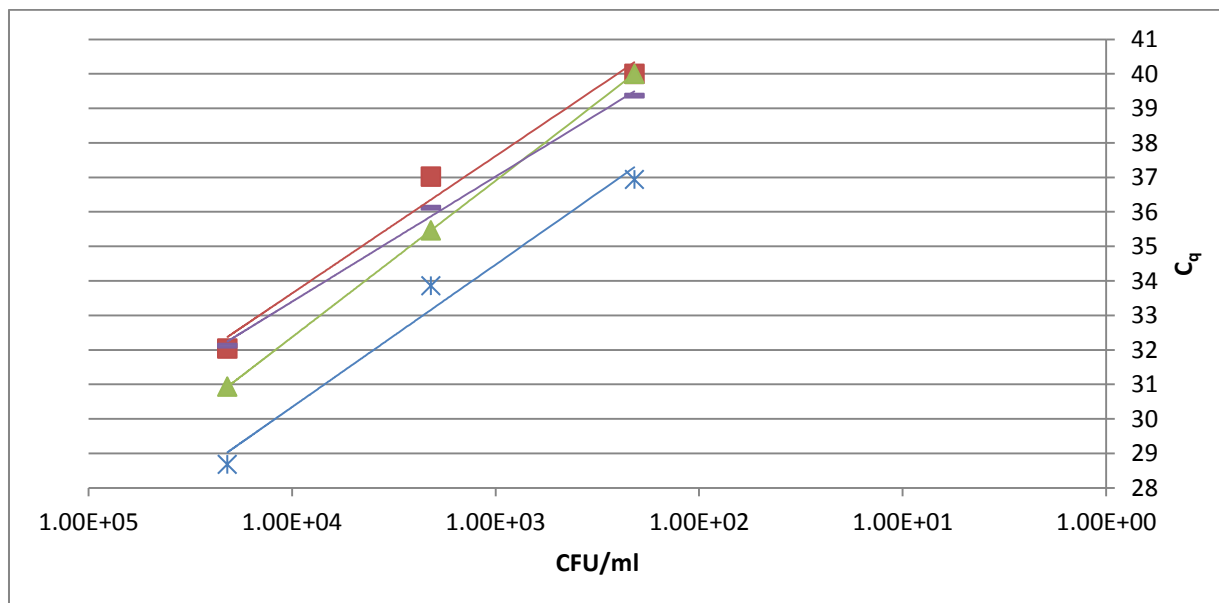
Met de nieuwe probe erbij waren er vier setjes vanB primers en probes mogelijk. Om dit te testen zijn de positieve vanB monsters uit de UMC stammencollectie gebruikt. De tabel 6 geeft de C_q-waarden weer van de vier setjes vanB primers en probes. Zoals te zien is, lijkt de Nieuwegein Real-Time PCR lager C_q-waarden te hebben. Ondanks de schuine amplificatiescurves in figuur 21 is de gevoeligheid hoger. De oranje arcering in de tabel geven de onverwachtse resultaten weer. De monsters E7492, E7347 en E7365 zijn vervolgens apart getest, resultaten zullen in de discussie worden besproken.

Tabel 6. C_q-waarden van de 4 setjes vanB primers en probes. De oranje arcering zijn onverwachte resultaten.

Monster	Van gen	Ng	UMC	UMC probe	UMC P+RP
E7401	vanB	27,54	30,49	30	30,46
E7403	vanB	24,68	27,25	26,8	27,26
E7408	vanB	27,88	35,41	-	-
E7424	vanB	23,61	26,12	25,91	26,41
E7426	vanB	26,4	29,13	29,18	29,02
E7461	vanB	23,65	26,95	26,71	26,83
E7491	vanB	23,71	27,3	27,2	27,54
E7492	vanB	-	-	-	-
E7838	vanB	23,54	26,77	26,98	26,85
E7935	vanB	23,25	39,52	40	-
E8029	vanB	26,49	29,55	29,09	29,54
E7402	vanA/B	21,28	23,61	23,66	23,95
E7350	neg	-	-	-	-
E7347	vanB	-	-	-	-
E7406	vanB	21,12	25,01	23,76	23,74
E7365	neg.	28,14	29,25	30,7	30,91

5.2.7 Verdunningsreeksen vanB

Om er zeker van te zijn dat de vanB Nieuwegein inderdaad gevoeliger was, is een gevoeligheid test gedaan op dezelfde manier als vanA. De werkwijze staat beschreven in de bijlage 5. In figuur 25 is te zien hoe de verdunningsreeks van de vier vanB Real-Time PCR's van Nieuwegein en UMC lopen. De Nieuwegein verdunningsreeks begint bij een lagere C_q-waarden, dit duidt op een hogere gevoeligheid. De drie UMC verdunningsreeksen liggen dicht bij elkaar en komen bij een hogere C_q-waarden op.

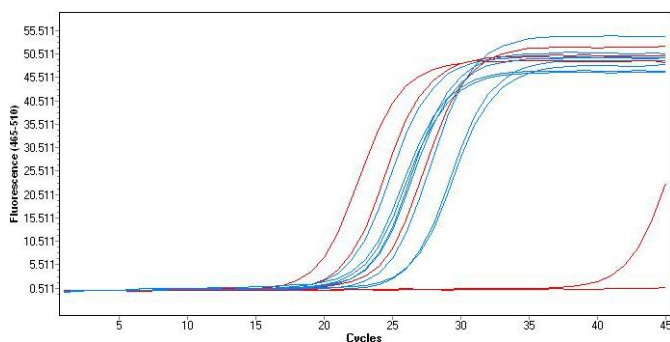


Figuur 25. De vier verdunningsreeks met vanB Nieuwegein en UMC. De blauwe kruizen zijn de vanB Nieuwegein uitslagen. De groene driehoeken zijn de vanB UMC new probe. De paarse strepen zijn de vanB new probe en reverse primer. De rode vierkanten zijn de vanB UMC.

De kleinste hoeveelheid bacterie dat te detecteren valt in de *vanB* verdunningsreeks is 207. Alleen de *vanB* Nieuwegein heeft een C_q -waarden onder de 30 cycli bij $2,08E+04$ CFU/ml, 28,68. Zie bijlage 7 voor de tabellen van de verdunningsreeks.

5.2.8 Verhoudingen primers

Voor het niet missen van monsters (fout negatief) is het belangrijk dat de Real-Time PCR specifiek genoeg is. Daarom is er gekozen om toch naar de *vanB* Nieuwegein te bekijken voor verbetering. Aangezien de amplificatiecurve in figuur 19 lineair is, is er remming en zijn de primers niet optimaal. Om te testen of dit kon worden verbeterd is er verhoudingstabel gemaakt, zie bijlage 8. De primers zouden in andere verhoudingen eventueel een beter resultaat kunnen geven. De Real-Time PCR's zijn uitgevoerd met SYBR Green en de positieve *vanB* monsters van de UMC stammencollectie. Eén van de vijf grafieken van de uitslagen staat in figuur 26, dit geeft de 1:1 verhouding weer tussen de forward en reverse primer. De andere vier grafieken zagen er exact het zelfde uit. Het lijkt dus geen verschil uit te maken of er meer forward of reverse primer in de mastermix zit.



Figuur 26. De amplificatiecurve van vanB Nieuwegein in een 1:1 verhouding van de primers. Alle positieve monsters zijn opgekomen in de blauwe/rode amplificatiecurves. De rode lijn die na de 40 cycli opkomt, is een bleek na onderzoek een negatief monster te zijn.

6. Conclusie

Het doel van dit onderzoek was om een Real-Time PCR op te zetten voor de voorselectie van VRE monsters. Om dit doel te bereiken is gekeken naar primers en probes voor *vanA/B*. In het St. Antoniusziekenhuis te Nieuwegein is er al een dergelijke Real-Time PCR opgezet. Ook zijn er in het UMC primers en probes gemaakt voor *vanA/B*. Beide primers en probes van Nieuwegein en UMC zijn getest. Buiten dat er werd gekeken welke primers en probes beter zouden zijn is er ook gekeken of werkt met de DNA isolatie en PCR apparatuur op het UMC.

6.1 VanA

De resultaten *vanA* Real-Time PCR's van Nieuwegein en UMC verschillen niet veel van elkaar. Pas bij de gevoeligheidstest met de verdunningsreeks was een verschil te bemerken. De verdunningsreeks van *vanA* Nieuwegein heeft een lager C_q -waarden 26,59 en is dus gevoeliger, zie figuur 16. Dit scheelt 1 C_q -waarden met de *vanA* UMC 27,53. Op basis daarvan kan worden geconcludeerd dat de *vanA* Nieuwegein gevoeliger en dus beter is dan *vanA* UMC.

6.2 VanB

De resultaten *vanB* Real-Time PCR's van Nieuwegein en UMC verschillen wel veel van elkaar, zie figuur 19 en 20. De verschillen zijn al merkbaar bij de eerste SYBR Green Real-Time PCR's. Waarbij *vanB* Nieuwegein veel meer achtergrond ruis produceert, zie figuur 17A. Met het testen van de probe erbij valt op dat *vanB* Nieuwegein geen s-curve vertoont in de amplificatiecurve, zie figuur 19. Ook de *vanB* UMC vertoont niet een perfecte s-curve maar is wel duidelijk aanwezig, zie figuur 20. Echter bleek wel dat *vanB* UMC niet alle monsters detecteren, ook niet met de new probe en reverse primer new. Uit de gevoeligheidstest is dan ook Nieuwegein gevoeliger, met de laagste C_q -waarden 28,68, zie figuur 25.

Geconcludeerd kan worden dat *vanA/B* Nieuwegein beter is dan de *vanA/B* UMC primer en probes.

7. Discussie

In dit onderzoek is gekeken of het mogelijk is om een voorselectie Real-Time PCR voor vancomycine-resistente Enterococci te implementeren in de diagnostiek.

7.1 Nieuwegein Real-Time PCR

De Nieuwegein Real-Time PCR wordt in verschillende laboratoria in Nederland gebruikt. Toch is er voor gekozen om Real-Time PCR uit Nieuwegein niet direct over te nemen. Omdat het UMC met andere DNA isolatie procedure en de Real-Time PCR's werkt is, naast het uittesten van de Nieuwegein primers en probes ook, een UMC primers en probes set bedacht.

7.2 Primers & probes

Beide van *vanA* primers en probes bleken het goed te doen. De zoektocht naar primers en probes voor *vanB* bleek vruchteloos te zijn, vandaar dat er door is gegaan met alleen de Nieuwegein en UMC primers en probes.

De UMC primers en probes waren al bedacht en in het UMC aanwezig. Van de firma TIB MOLBIOL zijn de UMC primers en probes. Echter komen de primers en probes van Nieuwegein bij de firma IDT vandaan. In de loop van het onderzoek zijn er nieuwe primers en een probe besteld bij IDT voor de UMC Real-Time PCR. IDT is getest naast de TIB MOLBIOL primers, dit maakte geen verschil.

Na uitgebreid te hebben gezocht naar het verbeteren van de *vanB* Real-Time PCR is er besloten om met de primers en probe van het UMC te kijken of die konden worden verbeterd. In eerste instantie is vanwege de kosten van een probe alleen een nieuwe reverse primer besteld. Deze is tweemaal getest waar beide keren geen signaal werd gedetecteerd. Na uitvoerig te hebben bekeken wat er onjuist kon zijn bleek de reverse primer niet omgedraaid en complementair te zijn. Daarna is direct een nieuwe reverse primer besteld met de juiste sequentie. In totaal kosten dit twee weken onderzoek tijd.

7.3 UMC Stammencollectie

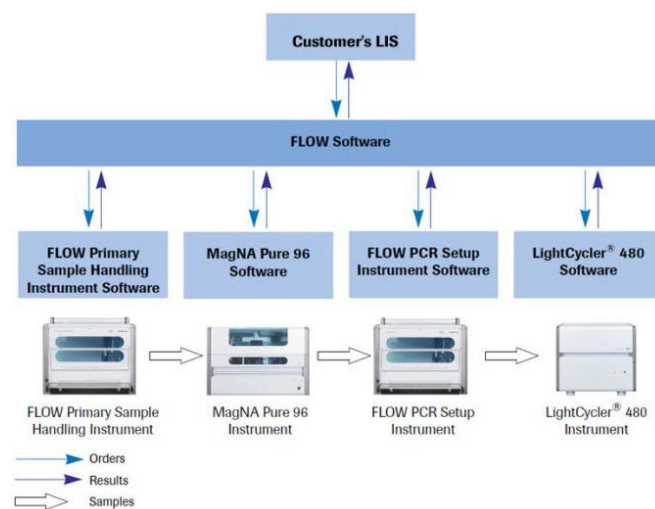
De UMC stammencollectie bevat 38 Enterococci stammen gegeven die konden worden gebruikt bij het ontwikkelen van de Real-Time PCR. Van deze 38 stammen waren er 22 *vanA*, 13 *vanB* positief, 2 negatief en 1 *vanA/B* positief. Echter bleek uit de verschillende Real-Time PCR uitslagen dat dit niet klopte. Om te beginnen met de Enterococ die *vanA/B* positief zou zijn, E7402. Uit alle Real-Time PCR's kwam naar voren dat dit niet het geval was voor *vanA*. Wel bleek dat *vanB* positief te zijn uit alle Real-Time PCR's.

Twee *vanB* stammen, E7492 en E7347 bleken niet vancomycine resistent te zijn in de Real-Time PCR's. Monster E7365 is een negatief monster dat *vanB* positief werd in de Real-Time PCR's. Om te kijken hoe dit kon gebeuren is er in eerste instantie een resistentie ingezet. De resistentie is gedaan op een Mueller Hinton agar, met een bacteriesuspensie van 0,5 McFarland en een vancomycine tablet. Deze manier van resistentie gaf geen uitsluitsel over de bacteriën. Om toch zekerheid te krijgen zijn de monsters de Phoenix van BD in gegaan. De Phoenix is een resistentie apparaat die automatisch de resistentie afleest. De uitslag gaf wel uitsluitsel over de monsters. *VanB* stammen

E7492 en E7347 zijn gevoelig voor vancomycine, dit komt overeen met de uitslag van de Real-Time PCR. E7365 is ook gevoelig, dit blijkt een wisseling van het monster te zijn geweest.

7.4 Implementatie klinische diagnostiek

Het is de bedoeling dat de VRE Real-Time PCR gaat worden gebruikt in de klinische diagnostiek. Voor de feces/parasieten Real-Time PCR wordt het systeem FLOW van Roche gebruikt. De volgende stap is om de VRE Real-Time PCR te implementeren op de FLOW. De FLOW is een end-to-end systeem. In figuur 27 is te zien hoe dit systeem werkt. In de FLOW Primary worden de monsters opgewerkt, het DNA wordt gezuiverd in de MagNA Pure, vervolgens gepipetteerd voor Real-Time PCR in de FLOW PCR Setup en als laatste gaan de monsters LightCycler 480, de Real-Time PCR.



Figuur 27. Het FLOW systeem van Roche. Hierin staan de apparaten weergegeven die samen het FLOW systeem van Roche zijn.²³

7.5 Aanbeveling

Aanbevolen wordt om de Nieuwegein primer en probes setjes te gebruiken voor vanA/B. Deze kwamen als beste uit het onderzoek naar voren.

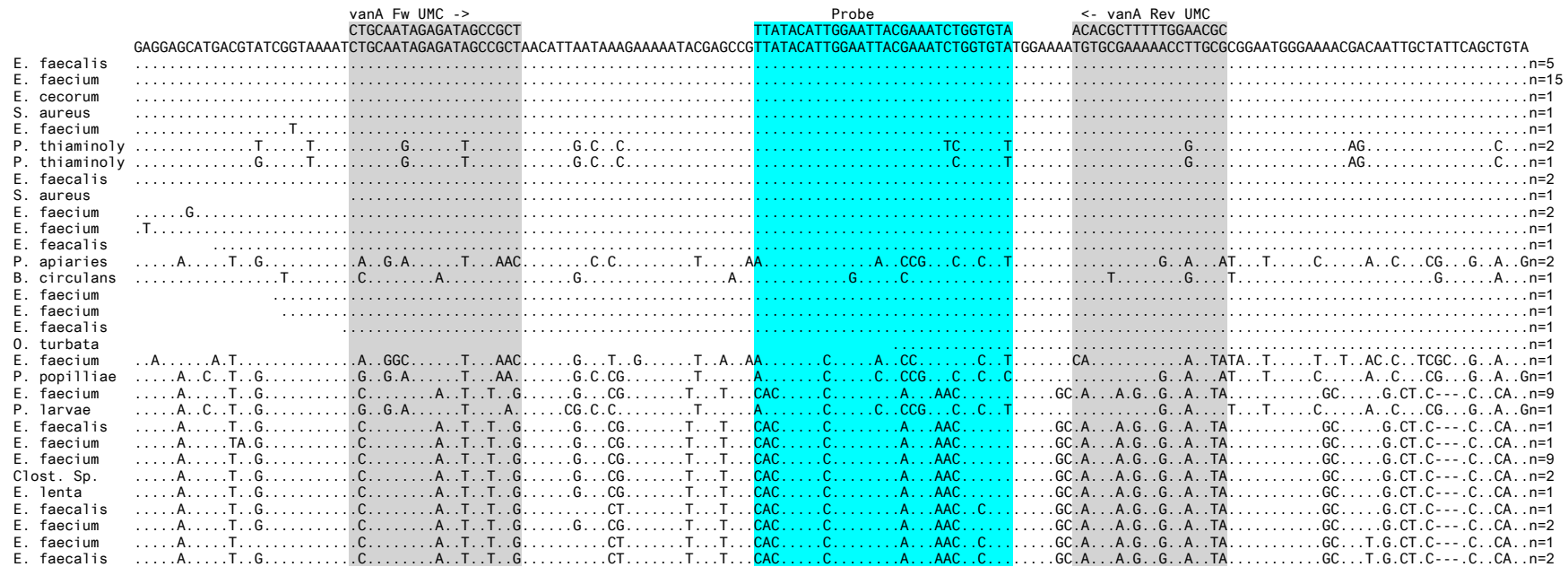
Literatuurlijst

1. Devriese, L.A., Pot, B., *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 1ste druk, Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, 1995, p. 327-328
2. Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C. G., *Vancomycin-Resistant Enterococci*, Clinical Microbiologie Reviews, 2000, p. 686
3. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., *Medical Microbiology*, 6de druk, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2009, p. 243
4. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b6/Arrangement_of_cocci_bacteria.svg/497px-Arrangement_of_cocci_bacteria.svg.png bezocht op 11-03-2014
5. <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=2899> bezocht op 11-03-2014
6. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n4/fig_tab/nrmicro2761_F1.html bezocht 18-03-2014
7. <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/aandoeningen/79379-ziekenhuisinfectie-betekenis-oorzaak-voorkomen.html> bezocht op 19-03-2014
8. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n4/fig_tab/nrmicro2761_F3.html bezocht op 20-03-2014
9. <http://www.rivm.nl/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:232918&versionid=&subobjectname=> bezocht op 20-03-2014
10. Thompson, J., *Enterokokken; toename van het aantal infecties en van antibioticumresistentie*, Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, 1996, 140, p. 130-3
11. <http://www.cmaj.ca/content/180/4/408/F3.large.jpg> bezocht op 21-03-2014
12. Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., *Vancomycin-Resistant Enterococci*, Clinical Microbiologie Reviews, 2000, p. 688
13. http://patentimages.storage.googleapis.com/WO2003001887A2/imgf000003_0001.png bezocht op 16-04-2014
14. Cercenado, E., García-Leoni, M. E., Rodeño, P., Rodríguez-Créixems, M., *Ampicillin-resistant enterococci*, April 1990, Journal of Clinical Microbiology, p. 829
15. Christopher, J., Louis, B., Cesar, A., *Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance*, February 6, 2014
16. Gold, H. S., *Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations*, Antimicrobial Resistance, 2001, p. 212
17. Arias, C. A., Murray, B. E., *The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance*, Nature Reviews, April 2012, Volume 10, p. 274
18. Roper, D.I., Huyton, T., Vagin, A., Dodson, G., The molecular basis of vancomycin resistance in clinically relevant Enterococci: Crystal structure of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA), York Structural Biology Laboratory, May 6, 2000
19. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, 5^{de} editie, 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, p. 545 figuur 5-45 a en b
20. http://www.biorad.com/webroot/web/images/lsr/products/amplification_pcr/product_overlay_content/global/lsr_rapid_arrival_temp.jpg bezocht op 20-05-2014
21. <http://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2014/01/20/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis> bezocht op 18-04-2014
22. <http://www.thermoscientificbio.com/applications/pcr-and-qpcr/introduction-to-qpcr/> bezocht op 17-04-2014
23. <http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/BrandOverviews/FLOW%20Overview/nsoftware.jpg> bezocht op 15-05-2014

Bijlage 1

	vanA Ng Fw ->	Probe	<- vanA Ng Rev	
	GCCGGAAAAAGGCTCTGAA	ACGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGACC	AAGTCGTCTCCTCGCTCCT	
	TCAGGCTGCAGTACGGAATCTTTCGTATTCATCAGGAAGTCGA	GCCGGAAAAAGGCTCTGAAACGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGACC	TTTCAGCAGAGGAGCGAGGACGGATACAGGAACGGCaaaaaaaTATATAAAGCGCTCGGCT	
E. faecium				n=33
E. cecorum				n=1
E. faecalis				n=11
E. faecalis	CC TT			n=1
S. aureus				n=2
S. haemoly				n=1
E. faecium		T		n=1
O. turbata			G	n=1
E. faecium				n=1
P. apiarius	C T	A	G G	n=2
B. circulans	A C		G G	n=1
P. thiaminoly	C T	A	G	n=1
P. thiaminoly	C T	A	G G T T	n=2
E. faecium	A AC T T	C T AC	A A G A A G	n=1
Uncultured	C	T	G G T	n=1
E. gallinarum				n=1
P. larvae	TTCA TTC C T T	C A ATC C A	C G TTTG A	n=1
P. popilliae	TTCA TTC C T T	A ATC A A	C G TTTG A	n=1
A. minutum	C AGCC T C C C	AA A T GA G T A	A C G TC A AAT G G	n=1
E. faecium	C AGCC T C C C	AA A T GA G T A	A C G TC A AAT G G	n=14
Clostr. sp.	C AGCC T C C C	AA A T GA G T A	A C G TC A AAT G G	n=2
E. faecium	C AGCC T C C C	AA A T GA G T A	A C G TC A AAT G G	n=2

Figuur 28. Sequentie alignment vanA Nieuwegein. De grijze balken zijn de primers en de blauwe balk de probe. Te zien is waar de primers en probes aan binden om de sequentie alignments.



Figuur 29. Sequentie alignment vanA UMC. De grijze balken zijn de primers en de blauwe balk de probe. Te zien is waar de primers en probes aan binden om de sequentie alignments.

	vanB Ng Fw ->	Probe	<- vanB Ng Rev	
	CGCAGCTTGCATGGACAA	TCACGGCCTACATTC	TTACGCCGTAGCGG	
	CTGTTTGAATTGCTGGTATCCCCTATGTAGGCTGCGATATTCAAAGCTCCG	CAGCTTGCATGGACAAATC	ACGGCCTACATTC	TACAAAAATGCGGCATCGCCGTCCCGAATT
E.faecalis				n=8
E.faecium				n=4
E.faecalis				n=1
E.faecium	G	T		n=2
E.faecium	T	G	T	n=25
E.faecium	T	G	T	n=5
E.faecalis	T	G	T	n=2
Clostridium sp.	T	G	T	n=7
E.faecium	T	G	T	n=2
Eggerthella lenta	T	G	T	n=1
Ruminococcus sp.	T	G	T	n=1
Clostridium sp.	T	G	T	n=1
Clostridium clos	T	G	T	n=1
Atopobium minutum	T	G	T	n=1
E.faecalis	T.A	C	G	n=1
S.bovis	T	G	T	n=1
E.faecalis		G	T	n=1
Paenibacillus api	T.A	C	C	n=1
Paenibacillus thi		C	G	n=1
E.faecalis		C	T	n=5
Paenibacillus thi		C	T	n=1
E.faecium		C	T	n=16
E.cecorum		C	T	n=1
S.aureus		C	T	n=1
E.faecalis		T	G	n=1
E.faecium	T.A	A	T	n=1
Paenibacillus thi		C	G	n=1
Paenibacillus api	T.A	C	C	n=1
Bacillus circulans	T	C	T	n=1
E.faecalis		C	T	n=1
Bacillus circulans		A	A	n=1
E.faecalis				n=1
E.faecium				n=1

Figuur 30. Sequentie alignment vanB Ng. De grijze balken zijn de primers en de blauwe balk de probe. Te zien is waar de primers en probes aan binden om de sequentie alignments.

	VanB Fw HK ->			probe	<- Hk Rev vanB		
	GCCGAYAGTCTCCCGCCATA			GGAAAACGCATGGGCTGCTT	GAGCCGCATAACTGCACC		
Query	TACGGAATGGGAA	GCCGATAGTCTCCCGCCATA	TTCTCCCGGATA	GGAAAACGCATGGTCTGCTT	GTTCATGAAAGAAAGAGAATACGAAA	CTCGGCGTATTGACGTGGCTTTCCCGGTTTTGCATGG	
E. faecium							n=2
E. faecalis							n=5
Clost. sp.							n=1
E. faecium		C.....C				A.....T	n=31
A. minutum		C.....C				A.....T	n=1
C. clostr		C.....C				A.....T	n=1
E. faecalis		C.....C				A.....T	n=4
Clost. Sp.		C.....C				A.....T	n=6
E. lenta		C.....C				A.....T	n=1
Ruminoc. sp.		C.....C				A.....T	n=1
E. faecalis		C.....C				A.....T	A.....n=1
Clost. Sp.		C.....C	Y.....			A.....T	n=1
E. faecium		C.....C				A.....T	A.....n=1
S. bovis			C.....			A.....T	n=1
E. faecium							n=1
E. faecalis							n=1
E. faecium							n=2
E. faecalis							n=1
E. faecium		C.....				A.....T	n=1
Paenibacillus apiarius					C.....	A.....T	n=1

Figuur 31. Sequentie alignment vanB UMC, originele probe en reverse primer. De grijze balken zijn de primers en de blauwe balk de probe. Te zien is waar de primers en probes aan binden om de sequentie alignments.

	VanB Fw UMC ->	New Probe	<- UMC New Rev vanB
Query	TACGGAATGGGAAGCCGATAGTCTCCCGCCATATTC	CCCCGGATAGGAAAACGCATGGGCTGCTT	TATGCTTTGAGCCGCATAAC
E. faecium			n=2
E. faecalis			n=5
Clost. sp.		G.....C.....A.....T.....	n=1
E. faecium	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=31
A. minutum	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=1
C. clostr	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=1
E. faecalis	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=4
Clost. Sp.	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=6
E. lenta	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=1
Ruminoc. sp.	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....n=1
E. faecalis	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....A.....n=1
Clost. Sp.	C.....C.....	Y.....G.....	C.....A.....T.....n=1
E. faecium	C.....C.....	G.....	C.....A.....T.....A.....n=1
S. bovis	C.....	G.....	C.....A.....T.....n=1
E. faecium			n=1
E. faecalis			n=1
E. faecium			n=2
E. faecalis			n=1
E. faecium	C.....	G.....	C.....A.....T.....n=1
Paenibacillus apiarius			C.....A.....T.....n=1

Figuur 32. Sequentie alignment vanB UMC, new probe en reverse primer. De grijze balken zijn de primers en de blauwe balk de probe. Te zien is waar de primers en probes aan binden om de sequentie alignments.

Bijlage 2

Tabel 7. Overzicht van de 23 circulerende stammen. De oranje gearceerde uitslagen zijn de monsters waar van de vanA/B in de klinische diagnostiek zijn bepaald.

Stammencollectie

Nummer	positie -80	Patiënten nummer	Monster nummer	Organisme	Ingevroren	Vancomycine res.	vanA	vanB	vanAc _q	vanBc _q
1	3322	8277701	13-536451-3	E. faecium	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
2	3328	7387019	13-555249	E. faecium	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
3	3330	7930139	13-557550	E. faecium	Ja	Ja	Ja	Nee	21,7	nvt
4	3331	2927497	13-579954	E. faecium	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
5	3337	6834049	13-609189	E. faecium	Ja	Ja	Nee	Ja	nvt	21,8
6	3338	3937879	13-609926	E. faecium	Ja	Ja	Nee	Ja	nvt	21,7
7	3343	1474047	13-621190	E. faecium	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
8	3346	1113092	14-511137	E. faecium	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
9	3320	5021997	12-571111	E. faecalis	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
10	N897	28290317	11-535327	E. faecalis	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt
12	-	2300217	14-523436	Enterococcus	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
13	-	6067241	14-522537-2	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
14	-	9962278	14-523020	E. faecium	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
15	-	1429191	14-523030	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
16	-	8430233	14-523029	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
17	-	5831068	14-522246-2	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
18	-	5956324	14-522247-2	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
19	-	899226	14-522277-2	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
20	-	2528964	14-523136	E. faecium	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
22	IIA29	nvt	ATT35667	E. faecium	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
23	-	nvt	29212	E. faecalis	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
24	-	nvt	27m156	HSCA	Ja	Nee	onb.	onb.	nvt	nvt
25	-	nvt	43300	MRSA	Ja	Ja	onb.	onb.	nvt	nvt

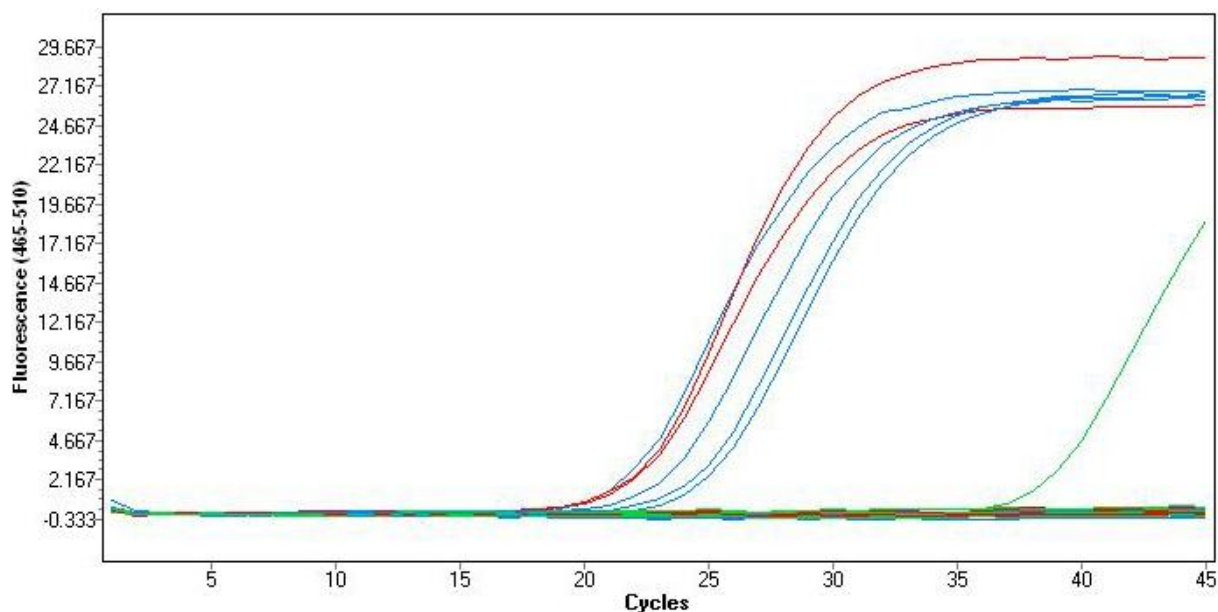
Bijlage 3

Tabel 8. Een overzicht met de UMC stammencollectie. Deze stammen zijn getest met de verschillende primer sets van vanA en B.

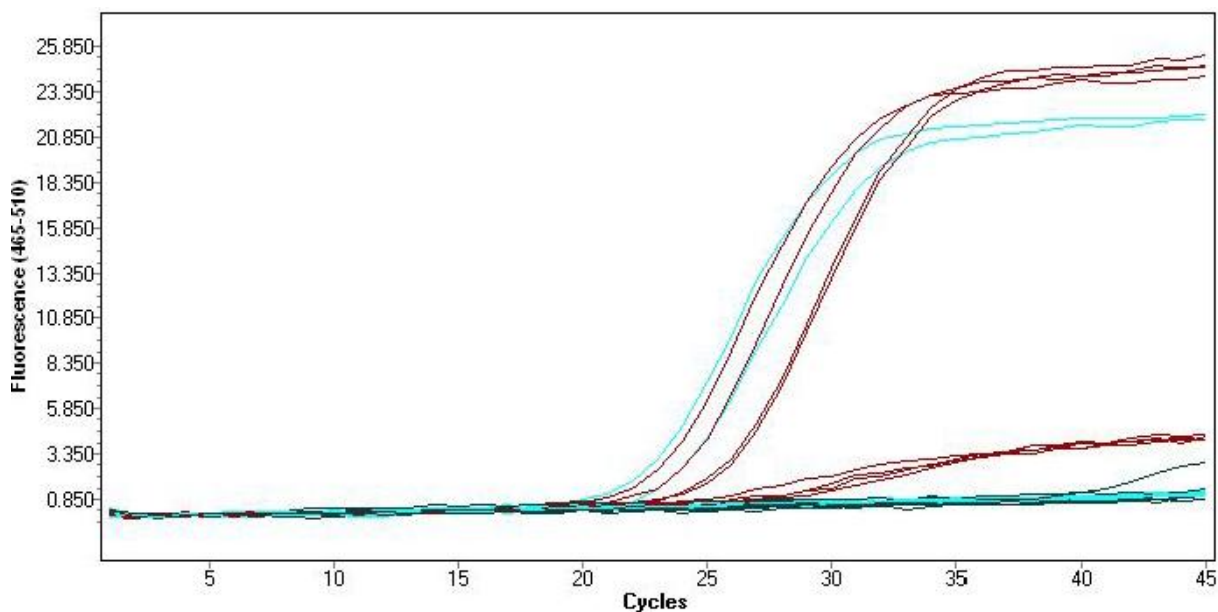
UMC Stammencollectie			
Nummer	Species	MLST	van gen
E7308	E. faecium	494	vanA
E7312	E. faecium	721	vanA
E7319	E. faecium	203	vanA
E7321	E. faecium	375	vanA
E7332	E. faecium	117	vanA
E7333	E. faecium	290	vanA
E7335	E. faecium	728	vanA
E7377	E. faecium	78	vanA
E7391	E. faecium	5	vanA
E7394	E. faecium	730	vanA
E7411	E. faecium	18	vanA
E7477	E. faecium	736	vanA
E7526	E. faecium	738	vanA
E7547	E. faecium	759	vanA
E7577	E. faecium	791	vanA
E7596	E. faecium	80	vanA
E7685	E. faecium	185	vanA
E7717	E. faecium	816	vanA
E7926	E. faecium	89	vanA
E8010	E. faecium	6	vanA
E8012	E. faecium	323	vanA
E7401	E. faecium	18	vanB
E7403	E. faecium	453	vanB
E7408	E. faecium	80	vanB
E7424	E. faecium	78	vanB
E7426	E. faecium	17	vanB
E7461	E. faecium	192	vanB
E7491	E. faecium	730	vanB
E7492	E. faecium	117	vanB
E7838	E. faecium	539	vanB
E7935	E. faecium	203	vanB
E8029	E. faecium	22	vanB
E7402	E. faecium	117	vanA vanB
E7350	E. faecium	729	Neg
E7859	E. faecalis	onb.	vanA
E7347	E. faecalis	onb.	vanB
E7406	E. faecalis	onb.	vanB
E7365	E. faecalis	onb.	Neg.

Bijlage 4

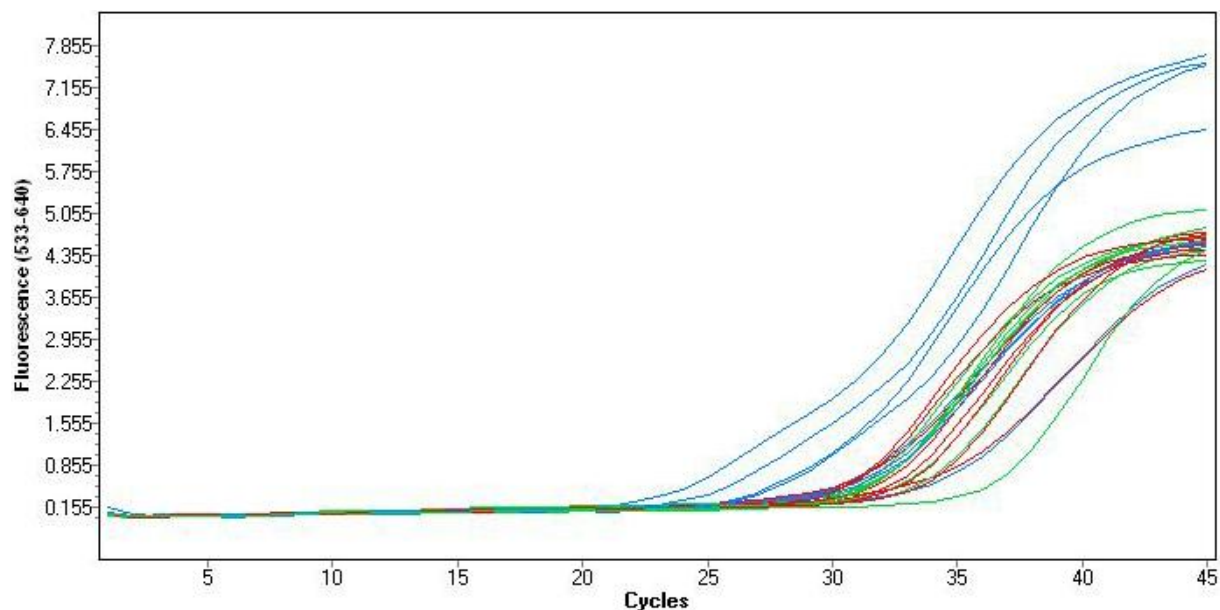
Hieronder staan de uitslagen van de multiplex Real-Time PCR's *vanA/B* Nieuwegein en UMC.



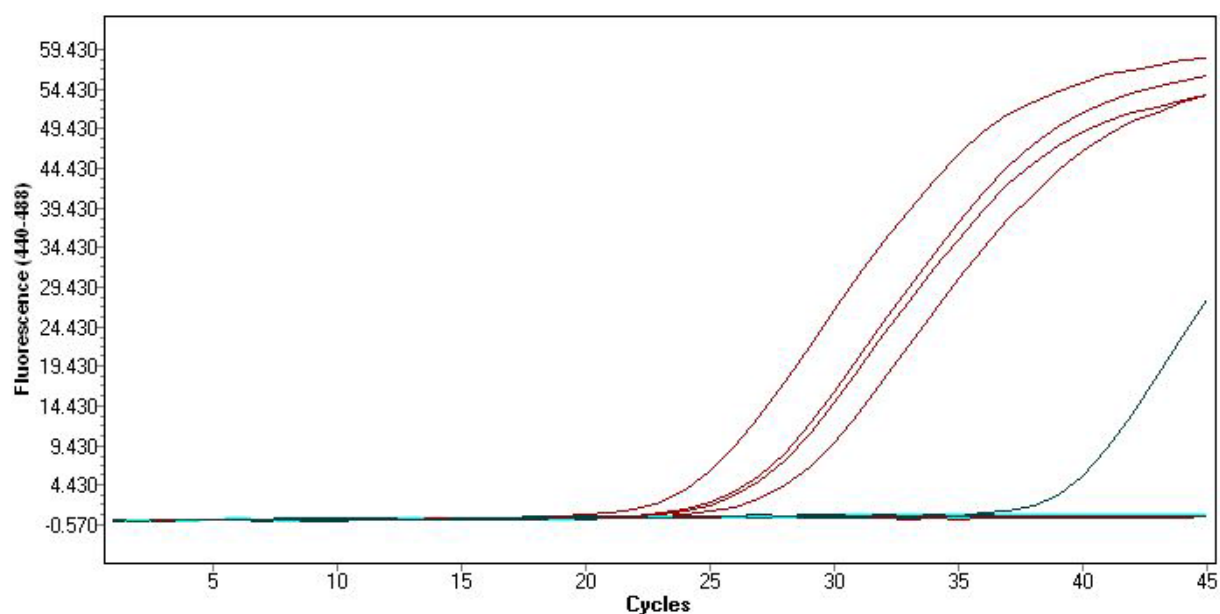
Figuur 33. De amplificatiecurves van *vanA* Nieuwegein. Hierin zijn de 6 positieve lijnen aangegeven met rood en blauw. De groene lijn die na de 35 cycli opkomt, is negatief bevonden.



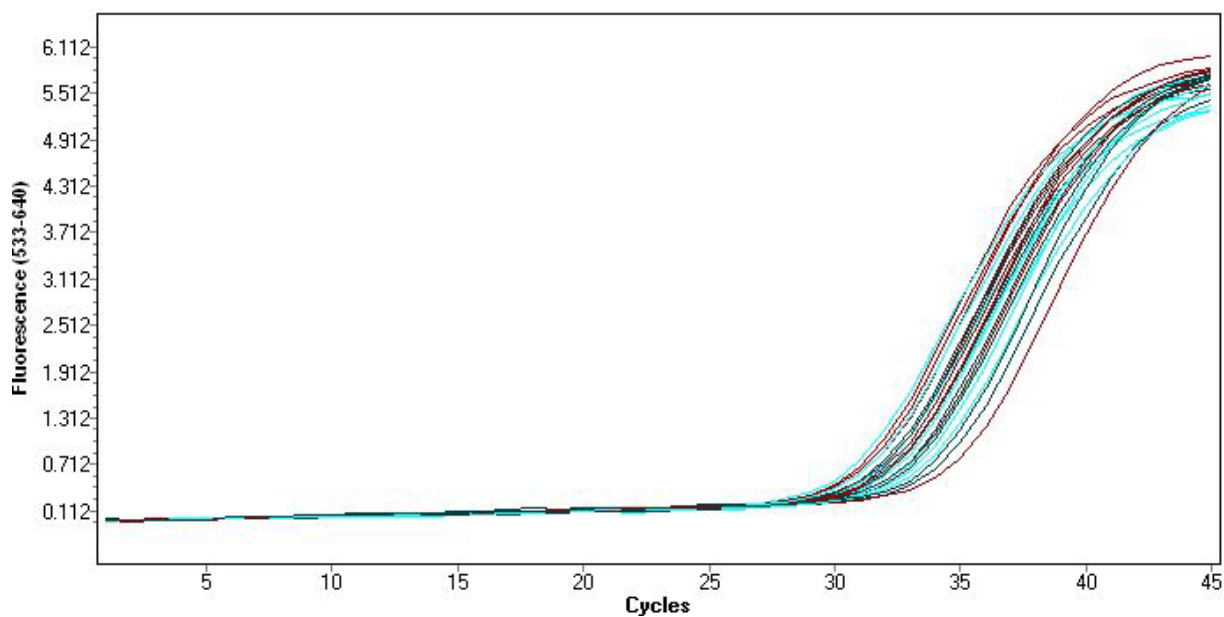
Figuur 34. De amplificatiecurve van *vanA* UMC. Hierin zijn de 6 positieve lijnen aangegeven met rood en lichtblauw. De aantal rode lijnen die afgevlakt opkomen waren aan gestraald in een ander kanaal en zonden licht uit.



Figuur 35. De amplificatiecurve van vanB Nieuwegein. De vier blauwen lijnen zijn de positieve monsters. Ook zit de interne controle op dezelfde golflengte als de probe. In het kopje 5.2.3 multiplex vanA/B wordt dit fenomeen uitgelegd.



Figuur 36. De amplificatiecurve van vanB UMC. De vier rode lijnen zijn positieve monsters. Het zwarte lijn die na 35 cycli opkomt is negatief bevonden.



Figuur 37. Interne controle van de vanA/B multiplex UMC. Aan de hand van de interne controle kan worden vastgesteld dat de Real-Time na behoren werkt.

Bijlage 5

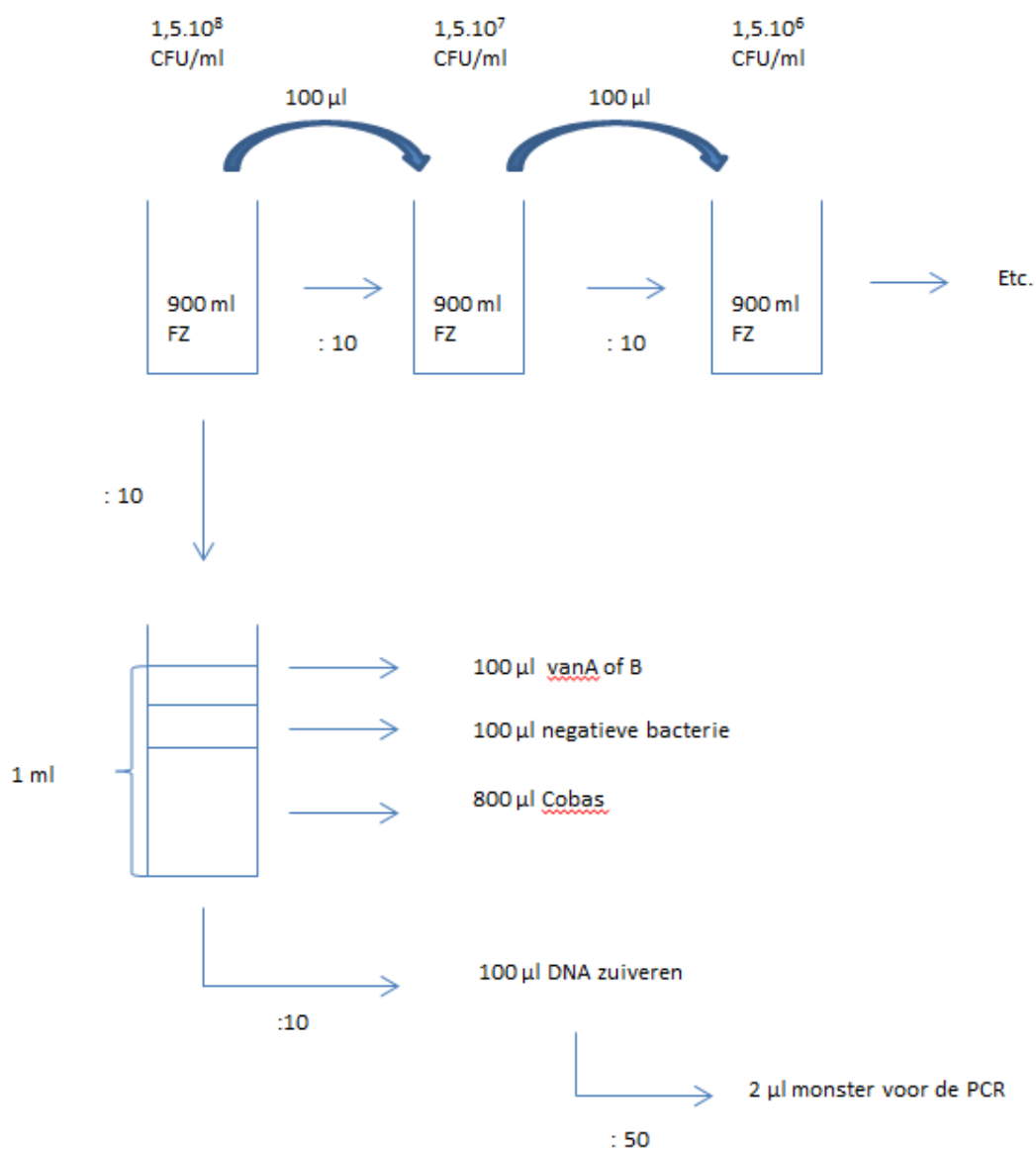
Verdunningsreeks maken om de gevoeligheid te bepalen van de Real-Time PCR.

Benodigdheden:

- Pipetten 1 ml, 200 μ l en bijbehorende pipetpunten
- Dichtheidsmeter
- Steriele buizen en epjes
- Cobas lysis buffer
- Demiwater
- 3 monster
- Bloedplaten
- Drigalski spatels
- Fysiologisch zout
- Bijbehorende rekjes

Methode:

Er wordt een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt vanuit een 0,5 McFarland oplossing ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml bacteriën). Dit wordt in 900 μ l fysiologisch zout (FZ) gedaan. Hier wordt 100 μ l uitgehaald in weer in de volgende buis gedaan, dit wordt 10 keer gedaan. Uit elke verdunning wordt 100 μ l gehaald en op een bloedplaat beënt. De bloedplaat wordt dan volledig bestreken met een drigalski spatel. Aan de hand van de bloedplaten kan worden vastgesteld hoeveel bacteriën er in de 10 verdunningen zaten. De 5 hoogste verdunningen worden gebruikt voor de PCR. Er wordt 100 μ l uit de verdunningsbuis gehaald en in een epje gedaan waar 800 μ l cobas lysis buffer en 100 μ l negatief monster in zit. Dit kan dan worden ingevroren voordat het DNA wordt opgezuiverd door MagNA Pure. Zie figuur 38 voor een schematisch overzicht.



Figuur 38. Verdunningsschema gevoeligheidstest. Hierin staan de handelingen die zijn uitgevoerd voor de gevoeligheidstest.

Bijlage 6

Tabellen van de verdunningsreeks *vanA*. In tabel 9 staat de oorspronkelijke concentratie in CFU/ml berekend. Dit is aan de hand gedaan door bacterie kolonies te tellen op de bloedagar platen maal de verdunning te doen.

Tabel 9. Bloedagar tellingstabel *vanA*. In deze tabel is berekend hoeveel CFU/ml in de oorspronkelijke concentratie zat aan de hand van de telling van bacterie kolonies.

Van gen	Verdunning	Theoretische conc. in CFU/ml	Telling	In 1 ml	Oorspronkelijke conc. in CFU/ml
vanA	1,00E+04	1,50E+04	580	5800	5,80E+07
	1,00E+05	1,50E+03	43	430	4,30E+07
	1,00E+06	1,50E+02	6	60	6,00E+07

In tabel 10 en 11 staan de *vanA* Nieuwegein en UMC uitslagen van de Real-Time PCR's. Van de oorspronkelijke concentratie in tabel 9 is het gemiddelde genomen. Dit gemiddelde waarden is gedeeld door de 5000x verdunning die gebruikt is voor de Real-Time PCR's. Hieruit komt de werkelijke concentratie in CFU/ml die in de Real-Time PCR heeft gezeten. De werkelijke concentratie in de Real-Time PCR staat gelijk aan de hoeveelheid bacteriën.

Tabel 10. Tabel werkelijke concentraties *vanA* Nieuwegein. Deze tabel geeft de hoeveelheid bacteriën weer met de C_q -waarden die er in de Real-Time PCR van *vanA* Nieuwegein hebben gezet.

Van gen	Theoretisch conc. PCR (CFU/ml)	5000x verdund	Gem. (CFU/ml)	Werkelijke conc. PCR (CFU/ml)	C_q -waarden	Bacteriën
vanA Ng	1,50E+08	3,00E+04	5,37E+07	1,07E+04	26,59	10733,3
	1,50E+07	3,00E+03	5,37E+06	1,07E+03	29,39	1073,3
	1,50E+06	3,00E+02	5,37E+05	1,07E+02	33,1	107,3
	1,50E+05	3,00E+01	5,37E+04	1,07E+01	35,71	10,7

Tabel 11. Tabel werkelijke concentraties *vanA* UMC. Deze tabel geeft de hoeveelheid bacteriën weer met de C_q -waarden die er in de Real-Time PCR van *vanA* UMC hebben gezet.

Van gen	Theoretisch conc. PCR (CFU/ml)	5000x verdund	Gem. CFU/ml	Werkelijke conc. PCR (CFU/ml)	C_q -waarden	Bacteriën
vanA UMC	1,50E+08	3,00E+04	5,37E+07	1,07E+04	27,53	10733,3
	1,50E+07	3,00E+03	5,37E+06	1,07E+03	30,56	1073,3
	1,50E+06	3,00E+02	5,37E+05	1,07E+02	34,58	107,3
	1,50E+05	3,00E+01	5,37E+04	1,07E+01	37,49	10,7

Bijlage 7

Tabellen van de verdunningsreeks *vanB*. In tabel 12 staat de oorspronkelijke concentratie in CFU/ml berekend. Dit is aan de hand gedaan door bacterie kolonies te tellen op de bloedagar platen maal de verdunning te doen.

Tabel 12. Bloedagar tellingstabel vanA. In deze tabel is berekend hoeveel CFU/ml in de oorspronkelijke concentratie zat aan de hand van de telling van bacterie kolonies.

Van gen	Verdunning	Theoretische Conc. in CFU/ml	Telling	In 1 ml	Oorspronkelijke conc. in CFU/ml	Verwachting in de PCR
vanB	1,00E+04	1,50E+04	968	9680	9,68E+07	1,94E+08
	1,00E+05	1,50E+03	125	1250	1,25E+08	2,50E+08
	1,00E+06	1,50E+02	9	90	9,00E+07	1,80E+08

In tabel 13, 14, 15 en 16 staan de *vanB* Nieuwegein en UMC uitslagen van de Real-Time PCR's. Van de oorspronkelijke concentratie in tabel 12 is het gemiddelde genomen. Dit gemiddelde waarden is gedeeld door de 5000x verdunning die gebruikt is voor de Real-Time PCR's. Hieruit komt de werkelijke concentratie in CFU/ml die in de Real-Time PCR heeft gezeten. De werkelijke concentratie in de Real-Time PCR staat gelijk aan de hoeveelheid bacteriën.

Tabel 13. Tabel werkelijke concentraties vanB Nieuwegein. Deze tabel geeft de hoeveelheid bacteriën weer met de C_q -waarden die er in de Real-Time PCR van vanB Nieuwegein hebben gezet.

Van gen	Theoretisch conc. PCR (CFU/ml)	5000x verdund	Gem. CFU/ml	Werkelijke conc. PCR (CFU/ml)	C_q -waarden	Bacteriën
vanB Ng	1,50E+08	3,00E+04	1,04E+08	2,08E+04	28,68	20786,7
	1,50E+07	3,00E+03	1,04E+07	2,08E+03	33,86	2078,7
	1,50E+06	3,00E+02	1,04E+06	2,08E+02	36,94	207,9

Tabel 14. Tabel werkelijke concentraties vanB UMC. Deze tabel geeft de hoeveelheid bacteriën weer met de C_q -waarden die er in de Real-Time PCR van vanB UMC hebben gezet.

Van gen	Theoretisch conc. PCR (CFU/ml)	5000x verdund	Gem. CFU/ml	Werkelijke conc. PCR (CFU/ml)	C_q -waarden	Bacteriën
vanB UMC	1,50E+08	3,00E+04	1,04E+08	2,08E+04	32,04	20786,7
	1,50E+07	3,00E+03	1,04E+07	2,08E+03	37,02	2078,7
	1,50E+06	3,00E+02	1,04E+06	2,08E+02	40	207,9

Tabel 15. Tabel werkelijke concentraties vanB UMC new probe. Deze tabel geeft de hoeveelheid bacteriën weer met de C_q -waarden die er in de Real-Time PCR van vanB UMC met de nieuwe probe hebben gezet.

Van gen	Theoretisch conc. PCR (CFU/ml)	5000x verdund	Gem. CFU/ml	Werkelijke conc. PCR (CFU/ml)	C_q -waarden	Bacteriën
VanB UMC new probe	1,50E+08	3,00E+04	1,04E+08	2,08E+04	30,93	20786,7
	1,50E+07	3,00E+03	1,04E+07	2,08E+03	35,46	2078,7
	1,50E+06	3,00E+02	1,04E+06	2,08E+02	40	207,9

Tabel 16. Tabel werkelijke concentraties vanB UMC new probe en new reverse primer. Deze tabel geeft de hoeveelheid bacteriën weer met de C_q -waarden die er in de Real-Time PCR van vanB UMC met de nieuwe probe en de nieuwe reverse primer hebben gezet.

Van gen	Theoretisch conc. PCR (CFU/ml)	5000x verdund	Gem. CFU/ml	Werkelijke conc. PCR (CFU/ml)	C_q -waarden	Bacteriën
vanB UMC new probe rev pr.	1,50E+08	3,00E+04	1,04E+08	2,08E+04	32,12	20786,7
	1,50E+07	3,00E+03	1,04E+07	2,08E+03	36,12	2078,7
	1,50E+06	3,00E+02	1,04E+06	2,08E+02	39,37	207,9

Bijlage 8

In tabel 17 staan de primers van *vanB* Nieuwegein in verhoudingen met de hoeveelheden die gepipetteerd zijn. In de linker kolom staat wat er is getest, met de verhoudingen ten opzichte van de niet te testen primer.

Tabel 17. Verhoudingstabel primers. Hierin staan de verhoudingen en de hoeveelheden van de primers die er zijn gepipetteerd.

Te testen primers	Verhouding	Forward (μl)	Reverse (μl)	H ₂ O (μl)	Totaal (μl)
Standaard	1:1	5	5	190	200
Fw test	3:1	15	5	180	200
	6:1	30	5	165	200
Rev test	1:3	5	15	180	200
	1:6	5	30	165	200

