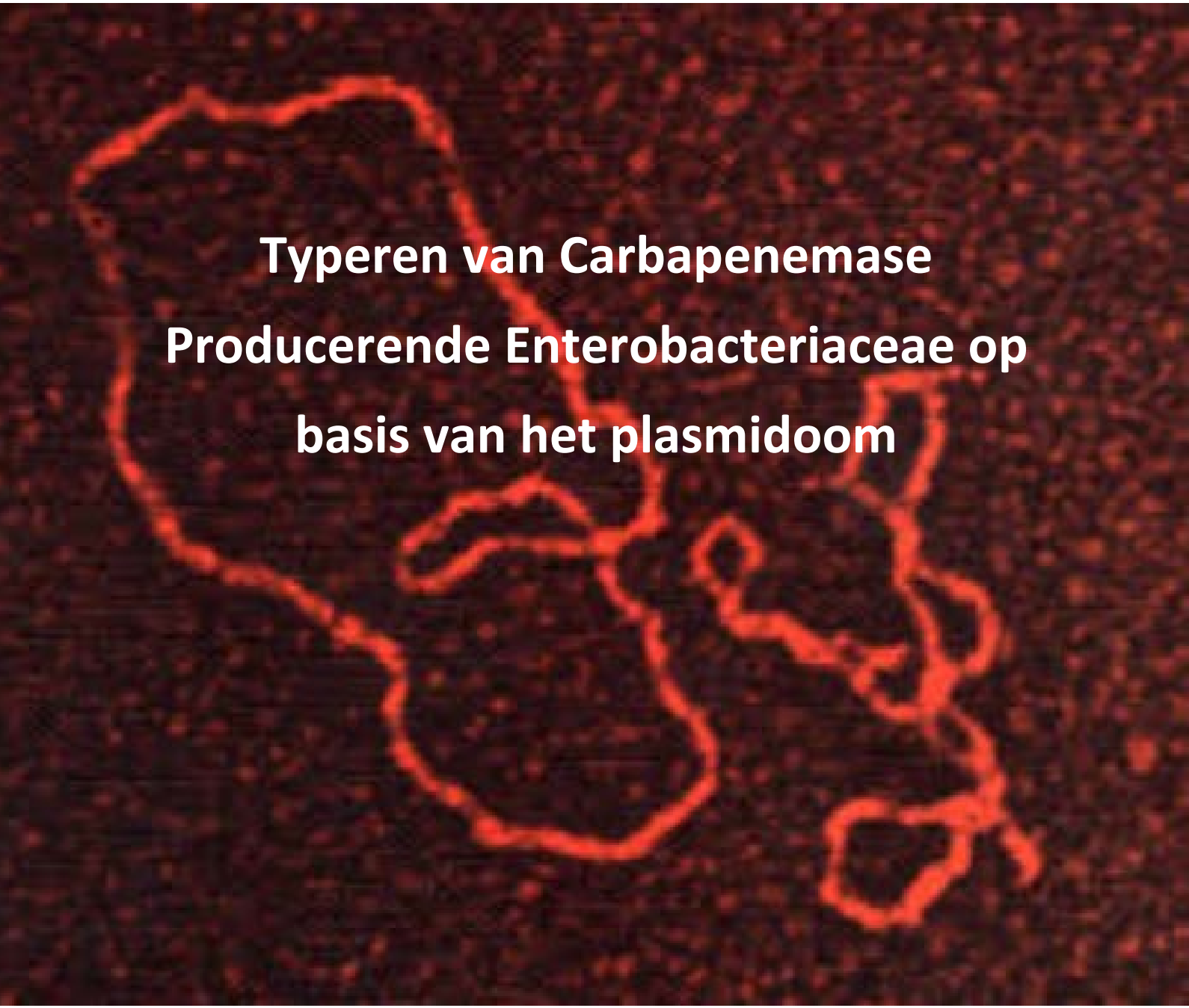




Typeren van Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae op basis van het plasmidoom

Auteur: Jaap van Meeteren
Datum: 23-05-2014
Locatie: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)

Typeren van Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae op basis van het plasmidoom

Auteur: Jaap van Meeteren

Opleiding: Hogeschool Utrecht
Institute for Life Sciences & Chemistry
Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek
F.C. Dondersstraat 65
3572 JE Utrecht

Afstudeerrichting: Microbiologie

Schoolbegeleider: Dr. Hans S.L.M. Nottet

Stageplaats: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
Centrum voor Infectieziektenonderzoek, Diagnostiek en Screening
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
3720 BA Bilthoven

Afdeling: Bacteriële Surveillance & Respons

Stagebegeleiders: Dr. H.J. Bootsma
Ing. C.S. Schot
Dr. L.M. Schouls

Stageperiode: Medio November 2013 t/m Juni 2014

Voorwoord

Dit onderzoek is gedaan ter afsluiting van mijn opleiding Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek met afstudeerrichting Microbiologie aan het Institute for Life Sciences & Chemistry van de Hogeschool Utrecht. Dit onderzoek heb ik mogen doen op het RIVM, bij het Centrum voor Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS) op de afdeling Bacteriële Surveillance en Respons (BSR).

Graag wil ik de gehele afdeling BSR bedanken voor de leerzame periode. In het bijzonder wil ik Corrie Schot bedanken voor haar begeleiding en positieve feedback. Tevens wil ik graag Hester Bootsma en Leo Schouls bedanken voor de feedback die zij hebben gegeven tijdens de werkbijeenkomsten over de voortgang van het project.

Jaap van Meeteren, Mei 2014



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Samenvatting

Enterobacteriaceae is een familie van gram-negatieve bacteriën. *Enterobacteriaceae* komen bij de mens voor in de darmflora en leven daar als commensalen. Zij behoren ook tot één van de meest voorkomende ziekteverwekkers bij mensen. Een reden hiervoor is dat er gemakkelijk transmissie plaats vindt door handcontact en geïnfecteerd voedsel- en water.

Het is dus van groot belang dat deze ziekteverwekkers goed te behandelen blijven met antibiotica. Toch worden *Enterobacteriaceae* steeds meer resistent tegen antibiotica. Dit begon met resistentie tegen penicillines en cefalosporines, deze antibiotica behoren tot de beta-lactam antibiotica. *Enterobacteriaceae* kunnen het enzym beta-lactamase produceren, dit enzym zorgt voor de afbraak van de beta-lactamring in beta-lactam antibiotica. Door de afbraak van deze ring verliezen de antibiotica hun effect. Steeds vaker gaan *Enterobacteriaceae* beta-lactamases produceren die van een breder spectrum aan antibiotica de beta-lactamring kan hydrolyseren, deze beta-lactamases zijn ook wel bekend als extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). Deze ESBL's zijn vaak nog wel gevoelig voor remmers, zoals clavulaanzuur. *Enterobacteriaceae* met ESBL productie zijn meestal nog wel gevoelig voor carbapenem antibiotica, dit wordt vaak nog gebruikt als laatste redmiddel. *Enterobacteriaceae* kunnen nu ook carbapenemases produceren. Deze enzymen hebben het vermogen carbapenems en andere beta-lactam antibiotica te hydrolyseren. Carbapenemase-coderende sequenties liggen vaak op plasmiden samen met andere antibioticaresistentie genen. Detectie van carbapenemases is erg belangrijk, omdat zij vaak geassocieerd zijn met uitgebreide en soms totale antibioticaresistentie.

Om inzicht te krijgen in de transmissie routes van carbapenemase genen is er een typering opgezet. Deze typering is voor de genotypische vergelijking van carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae* (CPE) op basis van het plasmidoom. Het plasmidoom zijn alle aanwezige plasmiden in één bacteriestam. De typering bestaat uit drie delen. Als eerste zal het plasmidoom geïsoleerd worden uit de bacteriestam. Ten tweede zal het geïsoleerde plasmide DNA gescheiden worden d.m.v. (pulsed-field) gel elektroforese, hierdoor zal het patroon te zien zijn van het plasmidoom. Als laatste zal er een Southern blot gemaakt worden van de gel. Op deze Southern blot kan worden gehybridiseerd met probes voor replicatiegenen, gebaseerd op plasmiden sequenties van stam 1191100717 waarvan het plasmidoom is gesequenced, hierbij zijn 6 plasmiden geïdentificeerd (referentieplasmiden). Ook wordt er gehybridiseerd met probes voor resistentiegenen die op de plasmiden aanwezig zijn. Om de typering op te zetten is gebruik gemaakt van 14 *Klebsiella pneumoniae* stammen die zijn verzameld ten tijden van een uitbraak van CPE in het Maasstad ziekenhuis in Rotterdam. Er zijn ook nog twee *Klebsiella pneumoniae* stammen getypeerd uit het Maasstad ziekenhuis buiten de periode van de uitbraak. Sommige van deze stammen bevatten het carbapenemase gen OXA-48 en soms ook het ESBL gen CTX-M.

Voor de isolatie van het plasmidoom uit deze 16 stammen is gebruik gemaakt van de 'large-construct' kit (Qiagen) met enkele aanpassingen. De belangrijkste aanpassing was het invoegen van een proteïnase K stap na de alkalische extractie van de plasmiden, dit is gedaan om eiwit af te breken zodat dit geen pellet kan vormen samen met het plasmide DNA.

Nadat de monsters op gels zijn gebracht en zijn geëlektroforeerd, zijn hiervan Southern blots gemaakt. Bij het plasmide preparaat waarvan de plasmiden zijn gesequenced, konden 5 van de 6 plasmiden worden aangetoond d.m.v. gel elektroforese en Southern blot met replicatie probes. De enige uitzondering was het grootste plasmide van 200 kb, deze is nooit aangetoond op gel of na hybridisatie op blot. Voor de ander stammen konden de kleinere plasmiden ook worden aangetoond met behulp van hybridisatie met replicatiegenen, gebaseerd op de plasmide sequenties van de referentiestam.

Na hybridisatie werd ook duidelijk dat de kleine plasmiden niet alleen in supercoiled vorm aanwezig waren in het preparaat, maar ook in andere vormen, zoals open circulair en lineair. De pulsed-field gel en blot met grote plasmiden liet zien dat niet altijd de grote plasmiden worden geïsoleerd met de aangepaste isolatie methode. Zolang deze grote plasmiden niet mee geïsoleerd kunnen worden kan er ook geen complete vergelijking plaats vinden tussen verschillende stammen.

Abstract

Enterobacteriaceae is a family of gram-negative bacteria. *Enterobacteriaceae* are found in humans in the intestinal flora and live there as commensals. However, they are also one of the most common pathogens in humans. A reason is that easy transmission takes place by hand contact and infected food and water. It is therefore important that these pathogens remain treatable with antibiotics. Yet *Enterobacteriaceae* become more resistant. This started with resistance to penicillins and cephalosporins, antibiotics belonging to the class of beta-lactam antibiotics. *Enterobacteriaceae* can produce the enzyme beta-lactamase, this enzyme is responsible for the degradation of the beta-lactam ring in beta-lactam antibiotics. Because of the degradation of this ring, the antibiotic will lose its effect. More and more often *Enterobacteriaceae* produce beta-lactamases able to hydrolyze a broader spectrum of antibiotics, these beta-lactamases are also known as extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). These ESBLs are often sensitive to inhibitors such as clavulanic acid. *Enterobacteriaceae* with ESBL production are usually still sensitive to carbapenem antibiotics, which is often used as a last resort. *Enterobacteriaceae* now also produce carbapenemases. These enzymes have the ability to hydrolyze carbapenems and other beta-lactam antibiotics. Carbapenemase-coding sequences are often located on plasmids together with other antibiotic resistance genes. Detection of carbapenemases is very important, because they are often associated with extensive and sometimes total antibiotic resistance.

In order to understand the transmission routes of carbapenemase genes a typing method was developed in this study. This method is based on the genotypic comparison of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE) based on their plasmidome. The plasmidome consists of all plasmids present in one bacterial strain. The typing method consists of three parts. First, the plasmidome will be isolated from the bacterial strain. Second, the isolated plasmid DNA will be separated by (pulsed-field) gel electrophoresis, this will show the pattern from the plasmidome. Finally, there will be made a Southern blot of the gel. On this Southern blot can be hybridized with probes for replication genes, based on plasmids sequences of strain 1191100717 of which the plasmidome has been sequenced, in this plasmidome are 6 plasmids identified (referenceplasmids). Furthermore, hybridization with probes for resistance gene that are present on the plasmids will be performed. To establish the typing method, 14 *Klebsiella pneumoniae* strains collected at the time of an outbreak of CPE in the Maasstad hospital in Rotterdam were used. There are also two *Klebsiella pneumoniae* strains used collected at the Maasstad hospital outside the period of the outbreak. Some of these strains contain the carbapenemase OXA-48 gene, and sometimes the ESBL gene CTX-M.

For the isolation of the plasmidome from these 16 strains, the 'large-construct kit' (Qiagen) is used with some modifications. The most important modification was the inclusion of a proteinase K step after the alkaline extraction of the plasmids, in order to degrade protein so that it cannot form a pellet together with the plasmid DNA.

After the samples are brought on gels and electrophoresed, Southern blots are made. For the plasmid preparation of which the plasmids have been sequenced, 5 of 6 plasmids could be detected by gel electrophoresis and Southern blot with replication probes. The only exception was for the largest plasmid of 200 kb, this has never been detected on the gel or on the blot after hybridization. For the other strains, the smaller plasmids could be detected with hybridization with replication genes, based on the plasmid sequences of the reference strain. After hybridization, it also became clear that the small plasmids were not only present in supercoiled form but also in other forms such as open circular and linear. The pulsed-field gel and blot with large plasmids showed that these large plasmids are not always isolated using the modified method of isolation. As long as these plasmids cannot be isolated a complete comparison between different strains cannot be performed.

Afkortingenlijst

ATP	-	Adenosinetrifosfaat
BSR	-	Bacteriële Surveillance en Respons
CCC	-	Covalent Closed Circulair
CIb	-	Centrum Infectiebestrijding
CPE	-	Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae
CTX-M	-	Cefotaximase-München
dsDNA	-	Dubbelstrengs DNA
ESBL	-	Extended-spectrum beta-lactamase
IDS	-	Centrum voor Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening
IMP	-	Imipenemase
kb	-	Kilobasen
OC	-	Open Circulair
OXA	-	Oxacillinase
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
PFGE	-	Pulsed-Field Gelelektroforese
RIVM	-	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
SDS	-	Sodium-Dodecyl-Sulfaat
TBE	-	Tris-Boraat EDTA
TE	-	Tris-EDTA
TEM	-	Temoniera
VIM	-	Verona Integron-gecodeerde Metallo-beta-lactamase

Inhoud

Voorwoord.....	3
Samenvatting	4
Abstract.....	6
Afkortingenlijst	7
Inhoud.....	8
1. Inleiding	10
1.1 Doel onderzoek	10
1.2 Beta-lactam antibiotica.....	10
1.2.1 Beta-lactamases	11
1.2.2 Extended spectrum beta-lactamase.....	11
1.3 Carbapenem antibiotica.....	11
1.4 Carbapenemases.....	11
1.4.1 Klasse A	12
1.4.2 Klasse B.....	12
1.4.3 Klasse D	12
1.5 Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae	12
1.6 Plasmiden	13
1.6.1 Structuur van plasmiden	13
1.7 Maasstad Ziekenhuis uitbraak.....	14
2. Materiaal en Methode	14
2.1 Stammen.....	14
2.2 Plasmide isolatie.....	14
2.2.1 Alkaline extractiemethode	14
2.2.2 Exonuclease digestie	15
2.2.3 Anionen-wisselaar	15
2.3 Meting DNA concentratie	15
2.4 S1 nuclease.....	16
2.5 Real-time PCR	16
2.6 Gelelektroforese	17
2.7 Pulsed-field gelelektroforese.....	17
2.8 Southern blotting.....	17
2.9 Hybridisatie	18
3. Resultaten	19
3.1 Stammen.....	19
3.2 Snelle Plasmide-isolatie	20
3.2.1 Cultuur.....	20
3.2.2 Proteïne kinase K.....	21
3.2.3 Overnacht oplossen DNA.....	22

3.2.4	S1 nuclease	22
3.3	Gelelektroforese	23
3.4	Hybridisatie gelelektroforese blot	24
3.5	Pulsed-field gelelektroforese.....	27
3.6	Hybridisatie PFGE blots	29
4.	Discussie en Conclusie.....	34
	Literatuurlijst.....	36
	Bijlagen.....	38
Bijlage I:	Dendrogram PFGE-Xbal patronen en geselecteerde stammen	39
Bijlage II:	Plasmide isolatie protocol uit 50 ml cultuur	40
Bijlage III:	Protocol voor de QuantiFluor bepaling	41
Bijlage IV:	Gelelektroforese protocol.....	42
(A)	Gelelektroforese	42
(B)	Pulsed-field gelelektroforese	42
Bijlage V:	Southern blotting protocol.....	43
Bijlage VI:	Hybridisatie protocol.....	44

1. Inleiding

1.1 Doel onderzoek

Het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) is een zelfstandig onderdeel van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport. Het instituut heeft diverse opdrachtgevers, onder andere verschillende ministeries en de Europese Unie.

Het RIVM is onderverdeeld in drie verschillende sectoren, één daarvan is het Centrum Infectiebestrijding (Clb). Deze sector heeft als doel signaleren, bestrijden en preventie van infectieziekten. Dit wordt onder andere gedaan door inzicht te krijgen in infectieziekten door middel van surveillance en wetenschappelijke studies.

Binnen het Clb speelt het centrum voor Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS) met haar afdelingen een belangrijke rol. Eén van de afdelingen is Bacteriële Surveillance en Respons (BSR). Voor goede surveillance en respons is het kunnen typeren van bacteriën essentieel. Alleen zo kan je zeggen of er sprake is van bijvoorbeeld transmissie en/of dat er een uitbraak gaande is. Hiervoor worden moleculaire technieken gebruikt.

Het doel van mijn onderzoek is een typering opzetten voor genotypische vergelijking van Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae (CPE) op basis van het plasmidoom. Het plasmidoom is de verzameling van alle plasmiden in één bacteriestam. Met deze genotypische vergelijking, wordt er inzicht verkregen over de resistentiegenen die gelegen zijn op alle plasmiden in een bacterie. Ook wordt er inzicht verkregen over eventuele overdracht van plasmiden tussen bacteriën. Dit allemaal in een zo'n kort mogelijk tijdsbestek, zodat een snelle respons gegeven kan worden.

Om het plasmidoom uit een bacteriestam volledig te kunnen karakteriseren, zal er een isolatiemethode samengesteld worden welke ook de grote plasmiden kan isoleren. De grote plasmiden bevatten vaak resistentiegenen en zijn lastiger te isoleren. Om het volledige plasmidoom in kaart te brengen, wordt het geïsoleerde plasmide DNA op gel gezet. Het bandenpatroon wat zichtbaar zal zijn op de gel, zal overgebracht worden op een nitrocellulose membraan door middel van Southern Blotting. Er zullen probes worden ontworpen om resistentiegenen aan te tonen door middel van hybridisatie op het membraan. Hieruit zal blijken welke resistentiegenen er voorkomen bij de stammen en op welke plasmiden zij zich bevinden. Bij dit onderzoek maak ik gebruik van stammen die afkomstig zijn uit de uitbraak van CPE in het Maasstad Ziekenhuis van 2009 t/m 2011 (zie hoofdstuk 1.7). Van één bacteriestam, uit deze uitbraak, is reeds het plasmidoom geïsoleerd en gesequenced, deze plasmiden van bacteriestam 1191100717 (717), zullen dienen als referentieplasmiden. Er zullen probes worden ontworpen op replicatiegenen van de referentieplasmiden van 717. Door met deze replicatieprobes te hybridiseren kan worden bekeken of verschillende stammen dezelfde plasmiden met zich meedragen.

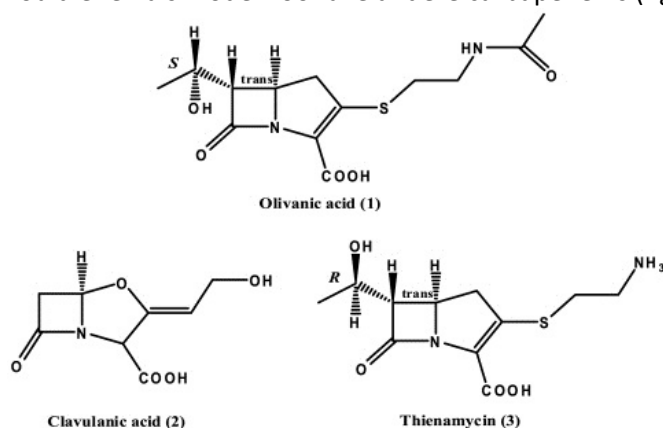
1.2 Beta-lactam antibiotica

De beta-lactams zijn een groep van verschillende antibiotica, waaronder Penicillines, Cefalosporines, Carbapenems en Monobactams. Deze antibiotica hebben allemaal een beta-lactamring in hun molecuulstructuur. Beta-lactams hebben een bactericide (bacteriedodend) effect, doordat zij het D-ALA-D-ALA substraat vervangen, welke bindt aan Penicilline-bindende eiwitten in de celwand van bacteriën. Het beta-lactam antibioticum vormt een acyl-eiwit complex met de Penicilline-bindende eiwitten. Deze binding zorgt voor een kristalstructuur, waardoor de bacterie wordt geremd in het maken van peptidoglycaan voor zijn celwand. Uiteindelijk zal de bacterie lyseren.¹⁶

Er zijn verschillende generaties van beta-lactam antibiotica. Elke nieuwere generatie van deze groepen beschikt over een breder spectrum.

1.2.1 Beta-lactamases

Eind jaren zestig namen beta-lactamases toe. Dit enzym, wat door bacteriën geproduceerd wordt, zorgt ervoor dat de beta-lactamring in een antibioticum geknipt wordt. Het antibioticum verliest hierdoor zijn werking. Als oplossing werd er naar beta-lactamase remmers gezocht. In 1976 werd de eerste beta-lactamase remmer gevonden. Deze olivanic zuren werden geproduceerd door de grampositieve bacterie *Streptomyces clavuligerus*. Toch werd er geen verder onderzoek verricht naar de olivanic zuren, omdat ze chemisch instabiel bleken en slecht konden binnendringen in de bacteriën. Kort daarna werden twee superieure beta-lactamase remmers ontdekt. Clavulaanzuur uit *S. clavuligerus*, de eerste klinisch beschikbare beta-lactamase remmer. En Thienamycine uit *Streptomyces cattleya*, dit is de eerste carbapenem en zou dienen als model voor alle andere carbapenems (figuur 1).¹⁰



Figuur 1: Chemische structuur van: Olivaniczuur (1), Clavulaanzuur (2) en Thienamycine (3).

1.2.2 Extended spectrum beta-lactamase

Extended spectrum beta-lactamases (ESBL's) zijn meestal beta-lactamases die gevoelig zijn voor remmers, zoals clavulaanzuur. Deze beta-lactamases kunnen penicillines, cefalosporines en aztreonam hydrolyseren en zijn gecodeerd door mobiele genen.

De meest voorkomende ESBL's behoren tot de CTX-M, SHV en TEM families. ESBL producerende bacteriën zijn meestal multiresistent tegen antibiotica.¹⁴

1.3 Carbapenem antibiotica

Carbapenems zijn beta-lactam antibiotica die gekenmerkt worden door het uitzonderlijk brede spectrum. Uitzonderingen zijn dat zij geen activiteit hebben tegen *Enterococcus faecium*, Methiciline-resistente *Staphylococcus aureus* en *Stenotrophomonas maltophilia*.¹⁷ In het algemeen worden Doripenem, Imipenem en Panipenem gebruikt tegen grampositieve bacteriën. Voor gramnegatieve bacteriën zijn Biapenem, Doripenem, Ertapenem en Meropenem effectiever.¹

1.4 Carbapenemases

Carbapenemases zijn diverse enzymen die het vermogen hebben om carbapenems en andere beta-lactam antibiotica te hydrolyseren. Detectie van carbapenemases is erg belangrijk, omdat zij vaak geassocieerd worden met uitgebreide en soms totale antibioticaresistentie.

Multiresistente stammen, zoals *Pseudomonas* en *Acinetobacter spp.* die een carbapenemase hebben verworven, kunnen als vector dienen en zorgen voor carbapenemase transmissie naar leden van de *Enterobacteriaceae* familie.¹⁴

In de meeste gevallen liggen carbapenemase-coderende sequenties op plasmiden samen met andere antibioticaresistentie genen. Carbapenemases worden gegroepeerd aan de hand van de meest gebruikte beta-lactamase groepering. Deze groepering behoort tot de classificatie volgens Ambler in 1980. In die tijd waren er maar vier aminozuursequenties bekend en hierop is deze moleculaire classificatie van beta-lactamases gebaseerd. De classificatie bestaat dus uit vier verschillende groepen: klasse A,B,C en D. Carbapenemases behoren tot de klasse A, B en D.³

1.4.1 Klasse A

Klasse A carbapenemases worden in verschillende mate geremd door clavulaanzuur. Ze hydrolyseren meestal penicillines en cefalosporines efficiënter dan carbapenems. Hierdoor ontbreekt bij sommige enzymen, zoals bij *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), een krachtige carbapenemase activiteit. Deze enzymen worden vaak ook meer beschouwd als ESBL's die ook carbapenems hydrolyseren. Veelal worden klasse A enzymen geproduceerd door *Enterobacteriaceae*.¹⁴

1.4.2 Klasse B

Klasse B carbapenemases zijn metallo-beta-lactamases. Deze carbapenemases kunnen meestal carbapenems efficiënt hydrolyseren, behalve Aztreonam. Klasse B carbapenemases kunnen beschikbare beta-lactamase remmers weerstaan. Zij worden echter wel geremd door chelerende middelen, zoals EDTA. Tot deze klasse behoren onder andere de Verona integron-gecodeerde Metallo-beta-lactamses (VIM) en Imipenemase IMP.¹⁴

1.4.3 Klasse D

De meeste klasse D carbapenemases worden slecht geremd door clavulaanzuur. Zij hebben ook een zwakke activiteit met betrekking tot het hydrolyseren van carbapenems. Klasse D carbapenemases behoren tot de Oxacillinase (OXA) familie en worden meestal geproduceerd door *Acinetobacter spp.*, maar ze komen ook steeds vaker voor in *K. pneumoniae* en *E. coli*.¹⁴

1.5 Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae is de familienaam van een groep gram-negatieve bacteriën. Binnen deze familie vallen o.a. de genera; *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* en *Salmonella*.¹¹ Enterobacteriaceae komen natuurlijk voor in de darmflora, maar behoren ook tot de meest voorkomende ziekteverwekkers bij mensen. Verspreiding vindt plaats door handcontact en geïnfecteerd voedsel en water. Verspreiding van genetisch materiaal vindt veelal plaats door horizontale genoverdracht door middel van plasmiden en transposons.⁹

Carbapenemase Producerende Enterobacteriaceae (CPE) veroorzaken ernstige infecties bij immuungecompromitteerde patiënten, vaak in combinatie met langdurig ziekenhuisverblijf. Door de kritieke toestand van deze patiënten, dient er een snelle, agressieve en effectieve behandeling plaats te vinden.¹⁵

Carbapenemresistentie bij Enterobacteriaceae wordt voornamelijk veroorzaakt door de productie van een van de drie groepen van carbapenemases, meestal in combinatie met ESBL-productie.⁵

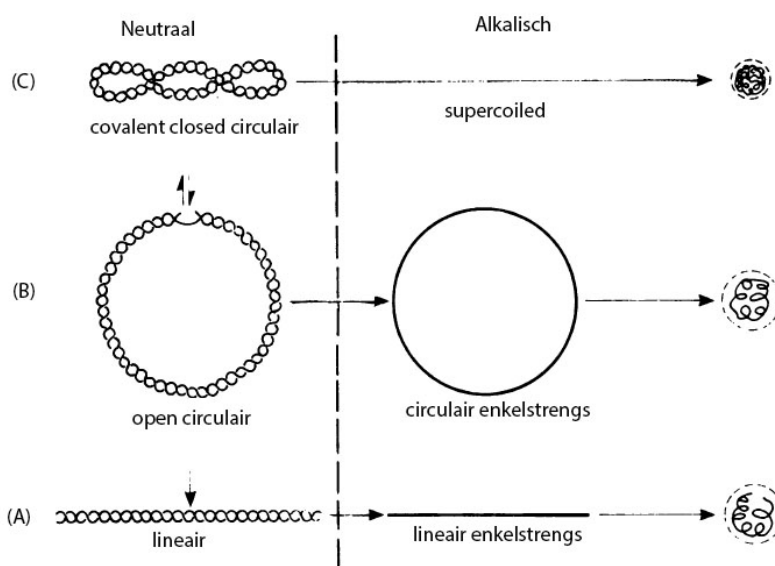
1.6 Plasmiden

Plasmiden zijn dubbelstrengs DNA (dsDNA) moleculen die zich onafhankelijk van het chromosomaal DNA kunnen repliceren.⁴ Alle plasmiden van één bacterie wordt het plasmidoom genoemd. Elk plasmide bevat replicatiegenen die uniek zijn per plasmide in het plasmidoom. De replicatiegenen zorgen niet alleen voor replicatie van het plasmide, maar bepalen ook het copy number, de hoeveelheid van één soort plasmide die in één cel voorkomt.⁶

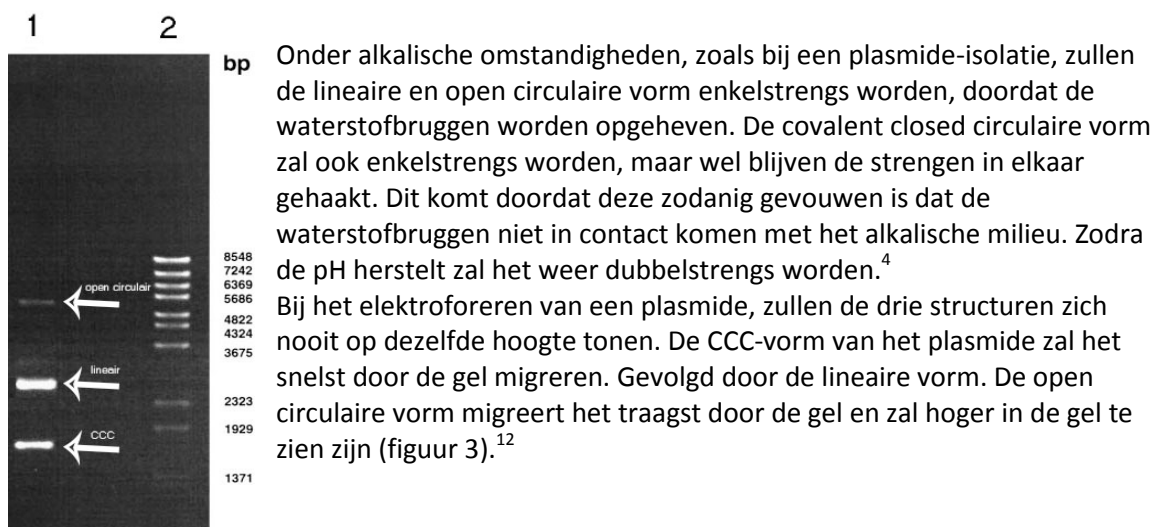
1.6.1 Structuur van plasmiden

Plasmiden bevinden zich over het algemeen circulair in een bacterie. De grootte van de plasmiden verschilt van enkele kilo baseparen (kb) tot 300 kb.⁷

Plasmiden kunnen drie structuren aannemen: lineair dubbelstrengs (figuur 2 (A)), open circulair (OC) (figuur 2 (B)) en covalent closed circulair (CCC) (figuur 2 (C)). De natuurlijke vorm van plasmiden is CCC.⁴



Figuur 2: Structuren plasmide DNA onder neutrale en alkalische omstandigheden. (A) lineair dubbelstrengs, (B) open circulair, (C) covalent closed circulair.⁴



Figuur 3: (1) Drie vormen van het pUC19 plasmide, onderste band is de supercoiled vorm. De middelste band is het plasmide in lineaire vorm en de bovenste band is de open circulaire vorm. (2) molaire massa standaard λ BstEII.¹²

1.7 Maasstad Ziekenhuis uitbraak

Op 31 mei 2011 zijn twee patiënten in het Maasstad Ziekenhuis in Rotterdam positief bevonden met OXA-48 en CTX-M producerende *Klebsiella pneumoniae*. Aan de hand van deze constatering is er een ziekenhuisbreed onderzoek gestart naar een uitbraak. Gebaseerd op de opkomst van ESBL-producerende *K. pneumoniae* sinds begin 2009, werd de uitbraak periode vastgelegd van 1 juli 2009 tot 18 juli 2011. Patiënten in risicogroepen werden vervolgens gescreend op aanwezigheid van OXA-48 producerende Enterobacteriaceae met een polymerase chain reaction (PCR) test. Tevens werden opgeslagen *K. pneumoniae* stammen van na 1 januari 2009 met PCR gescreend op OXA-48 en CTX-M-1 groep ESBL.⁵ Het RIVM beschikt over de *K. pneumoniae* isolaten uit die periode. Er is een genotypering uitgevoerd op deze stammen door te knippen met restrictie-enzym XbaI en de fragmenten te scheiden met behulp van Pulsed-field gelelektroforese (PFGE). De PFGE-XbaI patronen zijn te zien in bijlage I. Een selectie van 16 van deze stammen is gebruikt voor mijn onderzoek.

2. Materiaal en Methode

2.1 Stammen

Voor dit onderzoek zijn er 16 *Klebsiella pneumoniae* stammen gebruikt uit het Maasstad Ziekenhuis. Deze stammen zijn geselecteerd op basis van Pulsed-field gelelektroforese patroon (Bijlage I). Veertien van deze stammen zijn afkomstig uit de periode van de uitbraak (2009-2011). Stammen 1191200132 en 1191300159 zijn afkomstig uit 2012 en 2013. Voor vloeibare cultuur werd het gewenste aantal milliliter LB Broth medium (Melford bioindustries) met 1% natriumchloride aangeëent met een 10 µl entoog. Dit werd gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37°C met 200 rotaties per minuut (RPM).

2.2 Plasmide isolatie

Voor de isolatie van het gehele plasmidoom is er gebruik gemaakt van de 'Large-Construct Kit' van Qiagen® met enkele aanpassingen. Hieronder is de uiteindelijke isolatiemethode beschreven die is toegepast en waar verdere onderzoeken mee zijn uitgevoerd. Deze kit werkt volgens de principe van de alkaline extractiemethode volgens Birnboim en Doly.² Zie bijlage II voor het Plasmide isolatieprotocol uit 50 ml cultuur.

2.2.1 Alkaline extractiemethode

Er is 50 ml cultuur afgedraaid voor 15 minuten bij 6000 x g om een bacterie pellet te creëren. Het supernatant (medium) werd verwijderd en het pellet werd opgelost in 2 ml P1 buffer (Tris-Chloride, EDTA en 100 µg/ml RNase A). Vervolgens werd 2 ml P2 buffer (Sodium Dodecyl Sulfaat (SDS) en natriumhydroxide) krachtig in de oplossing gespoten en direct gemengd, dit om een goede homogene suspensie te krijgen. Dit werd 5 minuten geïncubeerd, nu waren alle cellen gelyseerd. Er was nu nog hoog moleculair chromosomaal DNA aanwezig en dit werd door de pH selectief gedenateerd. Het lysaat werd vervolgens geneutraliseerd met 2 ml P3 (zure natrium acetaat), hierdoor kon het chromosomaal DNA renatureren en aggregeren om vervolgens neer te slaan als een onoplosbaar netwerk. De hoge concentratie van sodium acetaat zorgde ervoor dat eiwit-SDS-complexen en hoog moleculair RNA is neergeslagen. Door het lysaat na tien minuten incubatie 30 minuten te centrifugeren bij 20.000 x g en 4°C, werd een groot gedeelte van de macromoleculen neergeslagen. Hierna werd het supernatant door een papierfilter gehaald en behandeld met 100 µg/ml proteïnase K voor 3.5 uur bij 50°C. De plasmiden werden geprecipiteerd met 0.6 volumes isopropanol door 30 minuten te centrifugeren bij 15000 x g.

De isopropanol werd verwijderd en het pellet werd gewassen met 2 ml 70% ethanol (EtOH) door 30 minuten te centrifugeren bij 15000 x g. De 70% EtOH werd verwijderd en het plasmide DNA kon worden opgelost in 500 µl 1x Tris-EDTA (100xTE, Sigma-Aldrich).

2.2.2 Exonuclease digestie

Om het resterende chromosomaal DNA te verwijderen volgde er een Adenosinetriphosfaat (ATP)-afhankelijke exonuclease digestie. Hierbij werd het chromosomaal DNA weggeknipt, waardoor het supercoiled DNA, wat door zijn vorm niet geknipt zal worden, overbleef.

Het opgeloste DNA werd verdund in 9 ml exonuclease buffer. Hier werd 200 µl ATP-afhankelijke exonuclease aan toegevoegd samen met 300 µl ATP oplossing. Het monster werd 60 minuten lang geïncubeerd bij 37°C.

2.2.3 Anionen-wisselaar

Voor de verwijdering van resterende zouten en eiwitten werd gebruik gemaakt van een anionen-wisselaar. Voor het opbrengen van het monster werd de kolom eerst geëquilibreerd met 10 ml laag zoutgehalte buffer met een pH van 7. Er werd 10 ml neutrale buffer aan het monster toegevoegd en deze oplossing werd op de kolom gebracht. Het plasmide DNA bindt aan de kolom door zijn sterke negatieve lading. Voor het wassen van het DNA werd er twee keer 30 ml van een neutrale wasbuffer op de kolom gebracht. Vervolgens werd het DNA geëluëerd met 15 ml 65°C warme elutiebuffer met een pH van 8, deze bevat een hoog zoutgehalte, waardoor de binding tussen het DNA en de kolom wegvalt. Het plasmide DNA wordt geprecipiteerd uit het eluaat door toevoeging van 10.5 ml isopropanol door 30 minuten te centrifugeren bij 15000 x g. Om geprecipiteerde zouten te verwijderen, werd er gewassen met 5 ml 70% EtOH door 30 minuten te centrifugeren bij 15000 x g. De 70% EtOH werd verwijderd en het zuivere plasmide DNA werd opgelost in 500 µl 1x TE.

2.3 Meting DNA concentratie

De DNA concentratie van het geïsoleerde plasmide DNA werd gemeten met behulp van QuantiFluor® dsDNA system. QuantiFluor bevat een fluorescerende dsDNA bindende kleurstof die het kwantificeren van kleine hoeveelheden dsDNA mogelijk maakt. Voor de meting moesten er verschillende werkoplossingen gemaakt worden. De werkoplossingen werden verdund met 1x TE. De verdunningsfactoren zijn te zien in tabel 1.

Tabel 1: Werkoplossingen met verdunningsfactoren voor QuantiFluor meting.

Werkoplossing	Verdunningsfactor
Blanco (1x TE)	0
DNA monsters	25
Standaard (100 ng/µl)	50
QuantiFluor	200

Neem 25 µl van de werkoplossingen van de DNA monsters, blanco en standaard en voeg hierbij 25 µl van de QuantiFluor werkoplossing toe. Vervolgens worden de oplossingen in het donker weggezet voor 5 minuten. Hierna kan de fluormeter gekalibreerd worden met de blanco en standaard welke 50 ng DNA bevat. Na de kalibratie kunnen de DNA monsters worden gemeten. De waarde die getoond wordt op de display van de fluormeter, is de concentratie in ng/µl. Als de waarde boven de 50 ng/µl komt, is de waarde niet betrouwbaar. Dit komt doordat de kalibratie is uitgevoerd met 50 ng. Het monster dient te worden verdund zodat de waarde onder de 50 ng/µl uitkomt. Zie bijlage III voor het protocol van QuantiFluor® dsDNA system.

2.4 S1 nuclease

S1 nuclease zorgde voor een breuk in dsDNA waardoor de supercoiled helix ontspande. Hierdoor werden de supercoiled- en OC vorm van plasmiden lineair. Voor incubatie met S1 nuclease werd er een mix gemaakt (tabel 2). De mix was gebaseerd op vijf units S1 nuclease, om meer Units toe te voegen werd er meer μl toegevoegd van S1 nuclease. De toevoeging van meer μl van vijf units werd gecompenseerd met het aantal μl van milli-Q. Voor minder units konden de vijf units worden verdund.

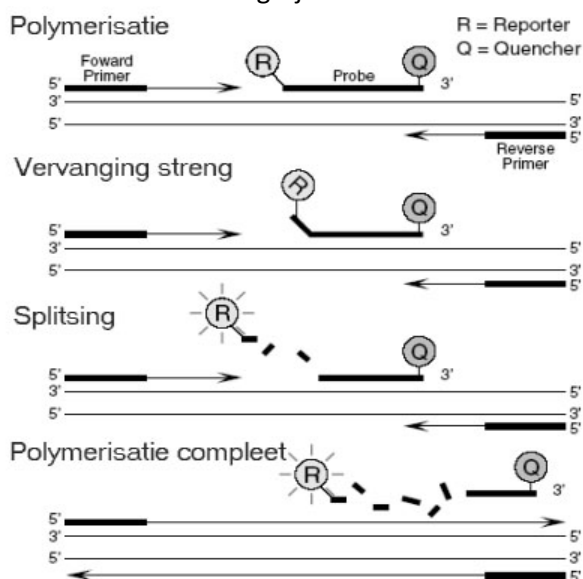
Tabel 2: Samenstelling van de mix voor S1 nuclease.

Vloeistof	Hoeveelheid in μl
10x S1 buffer	2
Milli-Q	12
5 Units S1 nuclease	1
Plasmide DNA	5

De mixen werden 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Hierna werden de reacties stop gezet door 2 μl 0.5M EDTA toe te voegen en dit voor 10 minuten te incuberen bij 70°C.

2.5 Real-time PCR

Voor real-time PCR werd er een mastermix gemaakt van 5 μl LightCycler® 480 Probes Master, 0.5 μl forward- en reverse primer en 1 μl Milli-Q. Bij deze mastermix werd 1 μl van de het monster toegevoegd. De LightCycler® 480 Probes Master bevat sequentie specifieke, fluorescent gelabelde probes. De probes binden aan het dsDNA van het monster. Deze probes bevatten een reporter en een quencher. Zolang de reporter en de quencher in elkaars aanwezigheid zich op de probe bevinden, zal de quencher het fluorescentie signaal van de reporter onderdrukken. De forward- en reverse primer binden aan het target DNA wat zich aan de 5'kant bevindt van de sequentie van interesse. Na binding vindt DNA polymerase activiteit plaats, dit zorgt voor 5' exonuclease. Zodra de 5' exonuclease activiteit de reporter scheidt van de quencher zal er fluorescentie signaal worden uitgezonden (zie figuur 4). Dit gebeurt telkens opnieuw naarmate de sequentie van interesse telkens vermeerderd wordt door DNA polymerase gedurende achtereenvolgende cycli. Zodra er voldoende signaal wordt afgegeven dat er significant vermeerdering plaats vindt, zal het door de drempelwaarde heengaan. Het punt waar de lijn de drempelwaarde overschrijdt noemen we de CP-waarde. Des te langer het duurt voordat de drempelwaarde is bereikt, hogere CP-waarde, des te minder zal de sequentie van interesse aanwezig zijn in het monster.



Figuur 4: Schematische weergave van polymerisatie tijdens een real-time PCR.

2.6 Gelelektroforese

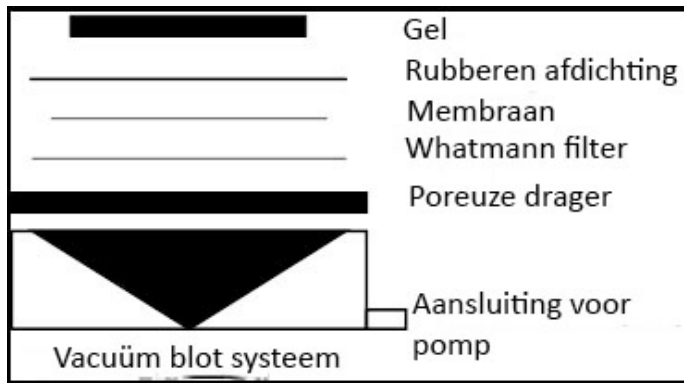
Bij gelelektroforese worden de plasmiden gescheiden op basis van grootte. Dit gebeurde in een agarosegel die bestond uit 0.5x Tris boor EDTA -buffer(10x,TBE (Tritium)) en 0.7% multi purpose agarose (Roche). De gel werd geplaatst in een elektroforesebak met 0.5x TBE buffer. Vervolgens werd er aan de bovenzijde (kant van de slotjes) de negatieve pool aangebracht (kathode) en aan de onderzijde de positieve pool (anode). Door een spanning hier op te zetten, zal het negatief geladen DNA naar de anode toe migreren. Nadat de monsters in de slotjes waren gepipetteerd werd er tien minuten bij 150 volt geëlektroforeerd, dit zorgde ervoor dat het DNA al in de gel migreerde en niet meer uit de slotjes gespoeld kon worden. Vervolgens werd 25 volt aangehouden voor 18 uur voor de verdere scheiding. Zie bijlage IV (A) voor het gelelektroforese protocol.

2.7 Pulsed-field gelelektroforese

PFGE werkt grotendeels hetzelfde als de gebruikelijk gelelektroforese. Het verschil zit in de richting van de stroom door de gel heen. Wordt bij gewone gelelektroforese de spanning simpelweg horizontaal geleid, bij PGFE wordt gebruikt gemaakt van drie spanningsvelden die afzonderlijk van elkaar actief zijn. Er is het normale spanningsveld wat van boven naar beneden gaat, en twee andere spanningsvelden die lopen met een hoek van 60 graden van beide kanten. Er werd een agarose gel gemaakt die bestaat uit 0.5x TBE-buffer en 1% sea kem® gold agarose (Lonza). Nadat de monsters in de slotjes waren gepipetteerd werd de run tijd ingesteld op 18 uur. Verder werd de initial tijd ingesteld op 6.8 seconden en de final tijd op 38.4 seconden. Hierna werd er 30 minuten bij zes volt/centimeter geëlektroforeerd, dit zorgde ervoor dat het DNA al in de gel migreerde en niet meer uit de slotjes gespoeld kon worden. Vervolgens werd de pomp aangezet. De 0.5x TBE buffer werd naar een koeling gepompt. De koeling werd ingesteld op 14°C, pas nadat de pomp aan was gezet. Zie bijlage IV (B) voor het Pulsed-field gelelektroforese protocol.

2.8 Southern blotting

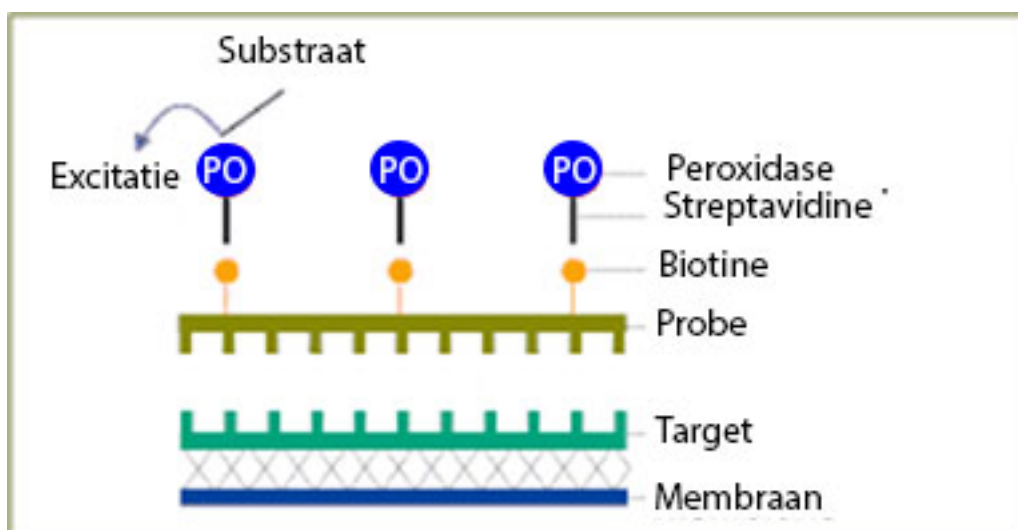
Voor verder onderzoek op het plasmidoom werd het DNA patroon uit een gel overgebracht op een nitrocellulose membraan, bekend als Southern blotting. De migratie van het DNA vindt plaats door een vacuüm blot-systeem (biometra). De gel is eerst 5 minuten op een UV-bak gelegd, dit zorgde ervoor dat het DNA breekt. Vervolgens werd de gel voor 15 minuten in 500 ml 0.25 HCL gelegd om het DNA in kleinere fragmenten te breken. Om het DNA enkelstrengs te maken werd de gel 2x 15 minuten in 0.4M NaOH geïncubeerd. Het vacuüm blot-systeem werd in elkaar gezet (figuur 5). De poreuze drager is eerst natgemaakt met kraanwater en het Whatmann filter en het membraan werden natgemaakt met aqua dest. Vervolgens werd er een rubberen afdichting over de gel gelegd, deze heeft er mede voor gezorgd dat het systeem vacuüm kan worden. De gel werd in één beweging op het membraan gelegd zonder later nog te verschuiven. De deksel werd op het systeem geplaatst. De slotjes werden afgesloten en de gel werd afgedicht langs de randen met 2% agarose. Er werd 800 ml 10x SSC (Saline-sodium citrate(Tritium)) op de gel gedaan en de vacuümpomp werd aan de onderzijde van het systeem aangesloten en vervolgens aangezet op 0.4Mbar. Door de afdichting van de gel met agarose kon het systeem vacuüm worden. Deze opstelling moest minimaal 30 minuten staan. Hierna werd het membraan op een Whatmann filter verzadigd met 0.4M NaOH gelegd voor twee minuten. Het membraan werd nog twee minuten gespoeld met 5x SSC. Zie bijlage V voor het Southern blotting protocol.



Figuur 5: Opstelling van het vacuüm blot-systeem.

2.9 Hybridisatie

De probe waarmee gehybridiseerd werd, bevat een biotine label aan de 5' kant. Er werd 5 μ l van 100 pmol/ μ l probe verdund in 10 ml DIG Easy Hyb buffer (Roche). Vervolgens is er één uur lang bij 42°C gehybridiseerd met de probe, deze bindt aan het complementaire DNA op het membraan. Door bij 42°C (15 °C onder de smelttemperatuur) te hybridiseren, is de probe specifiek en aspecifiek gebonden. De blot werd twee keer 15 minuten gespoeld met 2xSSC + 1% SDS bij 50°C. Door bij 50°C (7°C onder de smelttemperatuur) te wassen, zal de aspecifieke bindingen loslaten. Daarna werd 2.5 μ l streptavidine-peroxidase verdund in 10 ml 2xSSC + 5% SDS en vervolgens geïncubeerd voor één uur bij 42°C. Streptavidine heeft een krachtige binding met biotine. De blot werd twee keer tien minuten gespoeld met 2xSSC + 5% SDS bij 42°C. Zodra de blot goed gespoeld was met 2xSSC, werd luminolsubstraat (Thermo Scientific) toegevoegd. Het peroxidase zorgde voor een oxidatie tussen twee stikstof atomen in het luminol. Deze oxidatie zorgde voor excitatie, als de protonen weer teruggevallen zijn in grondtoestand, zal het fotonen uitzenden. Deze fotonen waren te zien als zichtbaar licht.¹³ Dit is chemoluminescentie (figuur 6). Om de chemoluminescentie waar te nemen werd de blot in de Luminescent image analyzer 3000 (Fujifilm) gelegd, dit apparaat detecteert de chemoluminescentie. Om de blot meerdere keren te kunnen gebruiken, moest de probe van het DNA gestript worden. Dit is gedaan door de blot 2x 20 minuten te incuberen met 0.2N NaOH+0.1%SDS bij 37°C. Zie bijlage VI voor het hybridisatieprotocol.



Figuur 6: Schematische weergave van een biotine gelabelde probe hybridisatie.

Er zijn twee soorten biotine gelabelde probes ontworpen: de replicatieprobes en resistentieprobes. Deze probes zijn geleverd door Eurogentec.

De replicatieprobes zijn ontworpen aan de hand van de stam 1191100717 (717), waarvan het plasmidoom is gesequenced door Corrie Schot. Hieruit zijn zes verschillende sequenties gekomen die elk een plasmide voorstellen. Deze plasmide zullen de referentieplasmiden worden genoemd. Op deze plasmidesequenties is gekeken naar replicatiegenen en hier zijn de probes op gebaseerd. De resistentieprobes zijn ontworpen op resistentiegenen waarvan we weten dat deze zich in ons referentieplasmiden bevinden uit stam 717 (tabel 3).

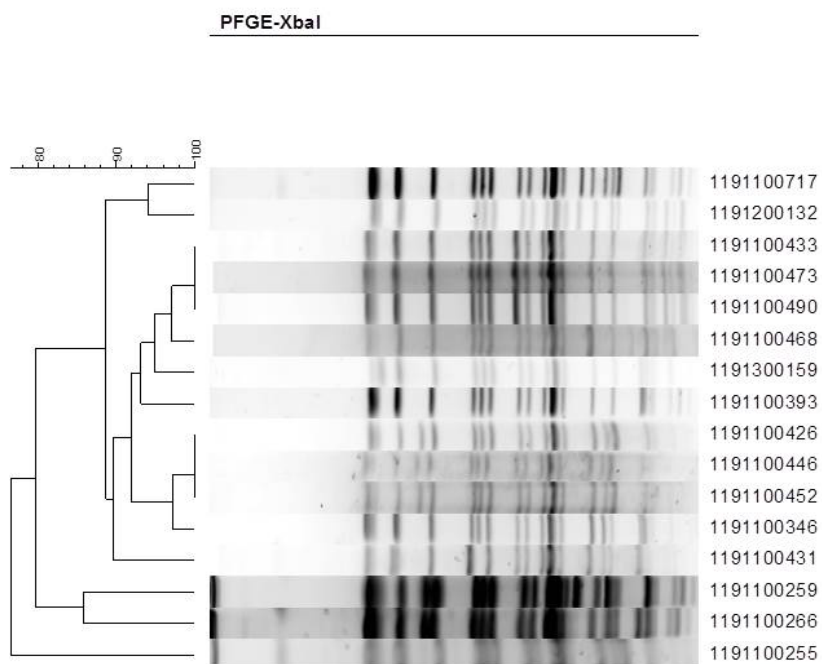
Tabel 3: A. Overzicht van ontworpen 5'biotine gelabelde probes voor replicatiegenen met grootte van plasmide en sequenties. **B.** Ontworpen probes voor resistentiegenen met sequenties.

A. Replicatieprobes	Grootte plasmide	Sequentie probe
Plasmide sequentie 1	200 kb	GAT-TAC-CAA-TAT-GGC-CAT-CGA
Plasmide sequentie 2	62 kb	CGA-CAC-TAT-CAA-CCT-CAG-TAA-A
Plasmide sequentie 3	20 kb	TTC-AAG-AAG-GAG-TTT-CTG-CC
Plasmide sequentie 4	70 kb	AGG-TCA-AGT-TCA-GTT-CTC-AAT-T
Plasmide sequentie 5	5 kb	CTC-GAA-CTT-TTC-AAC-GAA-CG
Plasmide sequentie 6	3.5 kb	ACC-CGA-CAG-GAC-TAT-AAA-GAT
B. Resistentieprobes	Resistentiegen	Sequentie probe
	OXA-48	AAA-ACA-AAA-GTT-GGA-ATG-C
	CTX-M	ATA-ATT-CGC-AAA-TAC-TTT-ATC-G

3. Resultaten

3.1 Stammen

De stammen waarvan de plasmiden geïsoleerd werden en het plasmidoom van bepaald is, zijn uitgezocht aan de hand van PFGE-XbaI patronen (Bijlage 1) die op elkaar lijken of juist verschillen. Een overzicht van deze stammen is te zien in figuur 7.



Figuur 7: Dendrogram van patronen PFGE typering met restrictie-enzym XbaI van geselecteerde *Klebsiella pneumoniae* stammen met isolaatnummer uit het Maastad Ziekenhuis.

Nadat de stammen zijn geselecteerd op hun PFGE-XbaI patroon, is gekeken of deze stammen uit de uitbraakperiode komen, als dit zo is vallen zij in het Mszk cluster. Wanneer ze buiten deze periode geïsoleerd zijn, dan vallen zij buiten het Mszk cluster. Verder zijn de resultaten van de real-time PCR op OXA-48 en CTX-M groep 1 teruggezocht. Na de plasmidoomisolatie, is de concentratie van plasmide DNA gemeten in de preparaten. In tabel 4 zijn de stammen waaruit de plasmiden zijn geïsoleerd met hun eigenschappen vermeld.

Tabel 4: Overzicht van PFGE cluster, resultaten real-time PCR en plasmide DNA concentratie in ng/μl afgerond van 16 geïsoleerde plasmidomen.

Isolaat nummer	PFGE cluster	Real-time PCR		Plasmide DNA concentratie in ng/μl afgerond
		OXA-48	CTX-M groep 1	
1191100717	Mszk	+	+	20
1191100452	Mszk	+	+	29
1191100490	Mszk	+	+	31
1191100346	Mszk	-	+	20
1191100393	Mszk	-	+	1.7
1191100431	Mszk	-	+	13
1191100433	Mszk	-	+	21
1191100446	Mszk	+	+	10
1191100255	Mszk	+	-	10
1191100259	Mszk	+	+	3
1191100266	Mszk	+	+	23
1191100426	Mszk	+	+	20
1191100468	Mszk	-	+	4
1191100473	Mszk	-	+	6
1191200132	Buiten Mszk	+	Niet gedaan	15
1191300159	Buiten Mszk	+	Niet gedaan	6

3.2 Snelle Plasmide-isolatie

Voor een snelle maar effectieve plasmide-isolatie zijn er drie condities veranderd in de bestaande isolatiemethode met de Large-Construct Kit van Qiagen®.

3.2.1 Cultuur

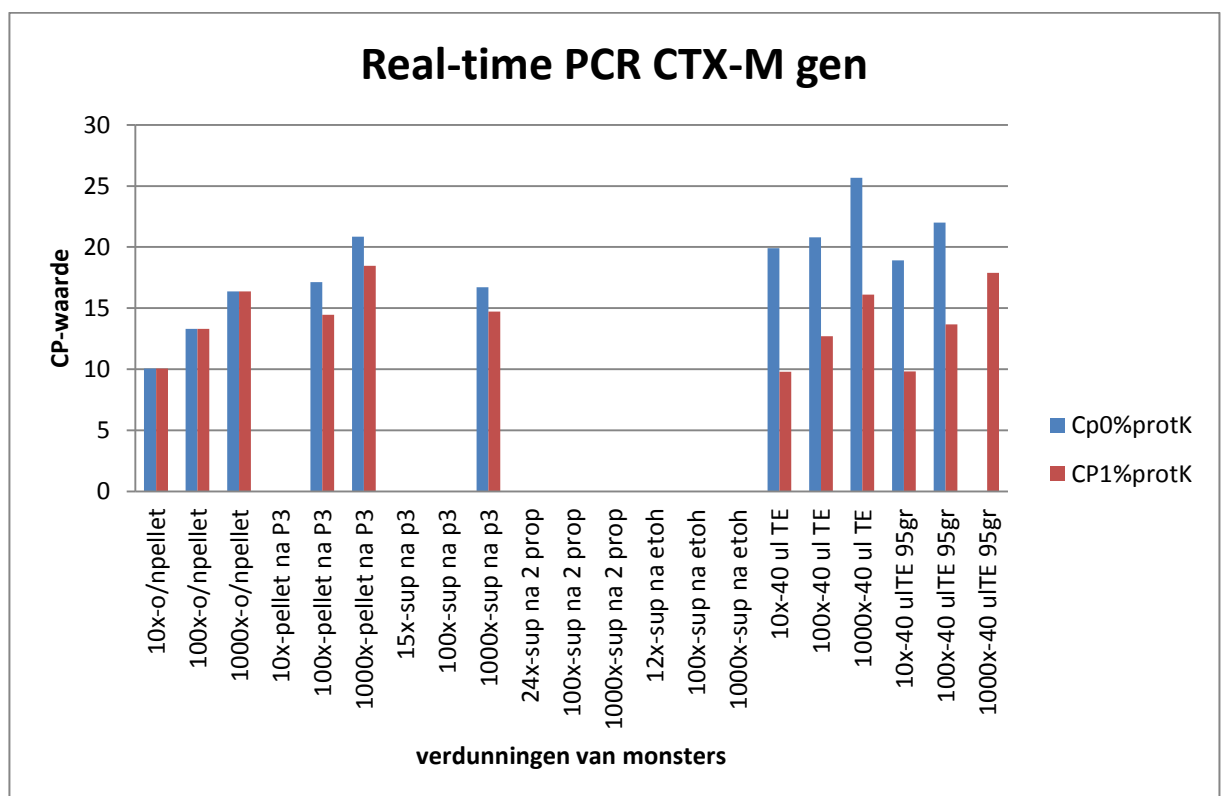
Als eerste hebben we het effect van de groeiomstandigheden op de isolatie onderzocht. De Large-Construct kit werkt met een verdunde 16-uurs cultuur waarvoor een bacteriestam eerst op plaat wordt gezet, vervolgens wordt er één kolonie afgehaald en geresuspendeerd in 2-5 ml LB medium en geïncubeerd voor acht uur bij 37°C en ~300RPM. 0.5-1 ml van deze precultuur wordt toegevoegd aan 500 ml LB medium en voor 12-16 uur geïncubeerd bij 37°C en ~300RPM. Om deze stap te verkorten, is er gekozen om met een 16-uurs cultuur te werken waarbij we het LB medium hebben geënt met een 10 μl entoog met vriescultuur, dit werd geïncubeerd bij 37°C. Deze verschillende incubatiemethoden zijn naast elkaar getest en lieten vrijwel geen verschil zien in DNA concentratie, daarom is gekozen voor de snellere optie.

Ook is getest om in plaats van 500 ml cultuur, 1-2 ml te gebruiken voor plasmide-isolatie, met aangepaste hoeveelheden buffer. Dit zou als voordeel hebben dat er weinig cultuur gekweekt zou worden en dat de procedure in reactievaatjes (eppen) uitgevoerd kon worden. De concentraties na deze isolaties lagen tussen de 1-6 ng/μl. Dit was niet voldoende DNA om de scheiding goed te waarnemen op gel.

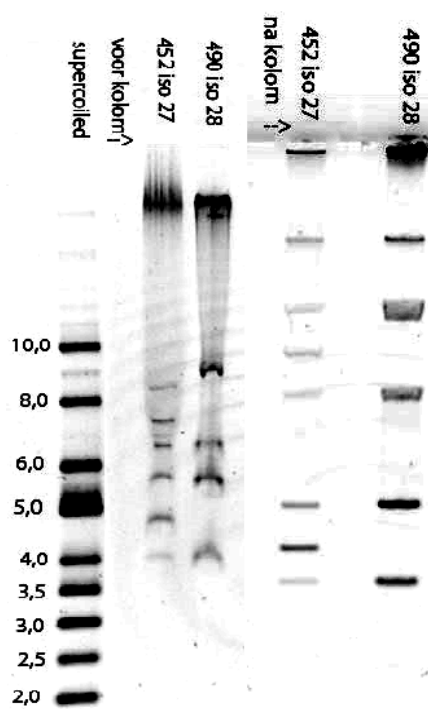
Uiteindelijk is er gekozen om de isolatie te doen uit 50 ml cultuur, dit levert voldoende plasmide DNA (tabel 4, laatste kolom) op voor verdere analyse. Voor verdere analyse zijn de plasmidenpreparaten op gel gezet (figuur 11,16 en 17).

3.2.2 Proteïne kinase K

Om de isolatie procedure verder in te korten, hebben we geprobeerd om de kolommen waarop het DNA verder gezuiverd werd weg te laten. Na precipitatie van de plasmiden (na P3), bleef er een wit pellet over met zout, eiwit en DNA, wat moeilijk oplosbaar was. Toen bleek dat er hogere concentraties gemeten werden naarmate het plasmide DNA langer (een aantal dagen) kon oplossen, is er gekeken hoe dit eiwit pellet opgelost kon worden. Met een real-time PCR is gekeken, aan de hand van primers op het CTX-M gen, hoeveel plasmide DNA aanwezig is tijdens verschillende stappen in het protocol (figuur 8). De verwachting was dat na de isolatie zonder proteïnase K er hogere CP-waarden te zien zouden zijn dan op het pellet, omdat er ook een lagere concentratie werd gemeten. Dit klopte ook, de CP-waarden van het DNA als het is opgelost in 40 µl TE liggen significant hoger dan de CP-waarden van het pellet. Zodra dat proteïnase k werd toegevoegd aan de isolatie, bleven de CP-waarden van voor en na de isolatie vrijwel gelijk. Dit hield in dat door toevoeging van proteïnase k meer plasmide DNA werd opgelost.



Figuur 8: Grafiek van verschillende verdunningen van monsters uit de isolatiemethode uitgezet tegen de CP-waarde die verkregen zijn met real-time PCR. De eerste drie monsters behoorde tot een verdunningsreeks van het bacterie pellet waaruit plasmiden worden geïsoleerd. De volgende drie monsters behoren tot een verdunningsreeks van het pellet na P3. Vervolgens komen er twee verdunningsreeksen van isopropanol en 70% ethanol. De volgende zes monsters behoren tot een verdunningsreeks van het plasmiden DNA opgelost in 40µl TE en verhit bij 95°C.



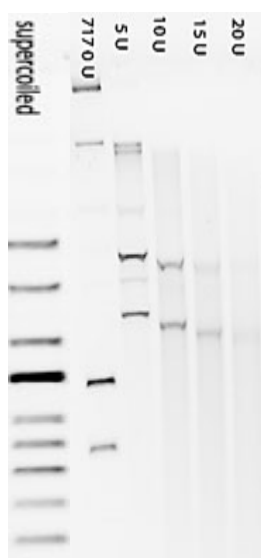
Hierdoor is er voor gekozen om het pellet af te breken met proteïnase K. Bij het pellet is 100 µg/ml proteïnase K opgelost in 1% SDS toegevoegd en één uur geïncubeerd bij 50°C. Proteïnase K zorgt voor afbraak van eiwit, hierdoor loste mijn pellet gedeeltelijk op. Maar door de zouten en eiwitresten bleef het eindproduct troebel en gaf het U-vormen op gel.

Er is uiteindelijk besloten om de proteïnase K toe te voegen bij het supernatant na de alkalische extractie (na buffer P3). Hierdoor konden de eiwit resten worden gescheiden van het DNA met de isopropanol precipitatie. Door het toevoegen van SDS en de aanwezigheid van overige zouten werd de scheiding op gel nog steeds gehinderd (figuur 9). Wanneer de kolommen toch werden gebruikt, werd het DNA goed gezuiverd en was er een goede scheiding te zien op gel (figuur 9).

Figuur 9: Isolaties op 18 uren 0.7% agarose gel met een supercoiled 10 kb marker. Aan de linkerkant de staan de plasmiden isolaties van stam 1191100452 en 1191100490 voor de kolom. En aan de rechterkant staan dezelfde isolaties maar dan na de kolom.

3.2.3 Overnacht oplossen DNA

Na de alkalische extractie werd het DNA geprecipiteerd door isopropanol en gewassen met 70% EtOH. Dit is verwijderd en het DNA pellet moest weer opgelost worden in exonuclease buffer om vervolgens het resterende genomisch DNA te digesteren. Om er zeker van te zijn dat het gehele pellet wel oploste, werd het schuddend opgelost in 500 µl TE buffer overnacht bij kamertemperatuur. De volgende dag werd er verder gegaan met de exonuclease digestie. In plaats van het DNA op te lossen in 9.5 ml exonuclease buffer werd er nu 9 ml exonuclease buffer bij de extractie gevoegd, omdat het DNA als was opgelost in 500 µl TE buffer. Hierdoor is het volume gelijk gebleven.



3.2.4 S1 nuclease

Om alle plasmiden in lineaire vorm te krijgen, is er getest of het geïsoleerde plasmide DNA geknipt kon worden met S1 nuclease. S1 nuclease geeft een knip in het dubbelstrengs supercoiled DNA, waardoor het zich uitvouwt tot de lineaire vorm van het plasmide (figuur 3). Er is met verschillende hoeveelheden units getest om te zien bij welke concentratie al het supercoiled DNA geknipt werd tot lineair DNA. Als er te veel S1 nuclease werd toegevoegd, verdween niet alleen de supercoiled DNA vorm, maar ook het lineaire DNA werd weggeknipt. Bij te weinig toevoeging van S1 nuclease bleven er meerdere plasmidevormen zichtbaar op gel (figuur 10). In de literatuur werd ook vermeld dat S1 nuclease nooit helemaal optimaal kan knippen. Voor nu hebben wij ervoor gekozen om niet verder te gaan met S1 nuclease. Dit moet eerst nog verder geoptimaliseerd worden.⁸

Figuur10: Scheiding op 0.7% agarose gel van stam 717 geknipt met Units (U) reeks (5- t/m 20 Units) van S1 nuclease. Bij 5U waren er nog meerdere plasmiden vormen zichtbaar en bij 20U werden alle plasmiden vormen weggeknipt.

3.3 Gelelektroforese

Na de isolatie zijn de plasmiden gescheiden op een 0.7% agarose gel door 18 uur elektroforeren (figuur 11). Deze 16 stammen staan vermeld in tabel 5. Van stam 717 (referentieplasmiden) is de isolatie zoals beschreven in hoofdstuk 2.2 (laan 1a) op gel gezet.

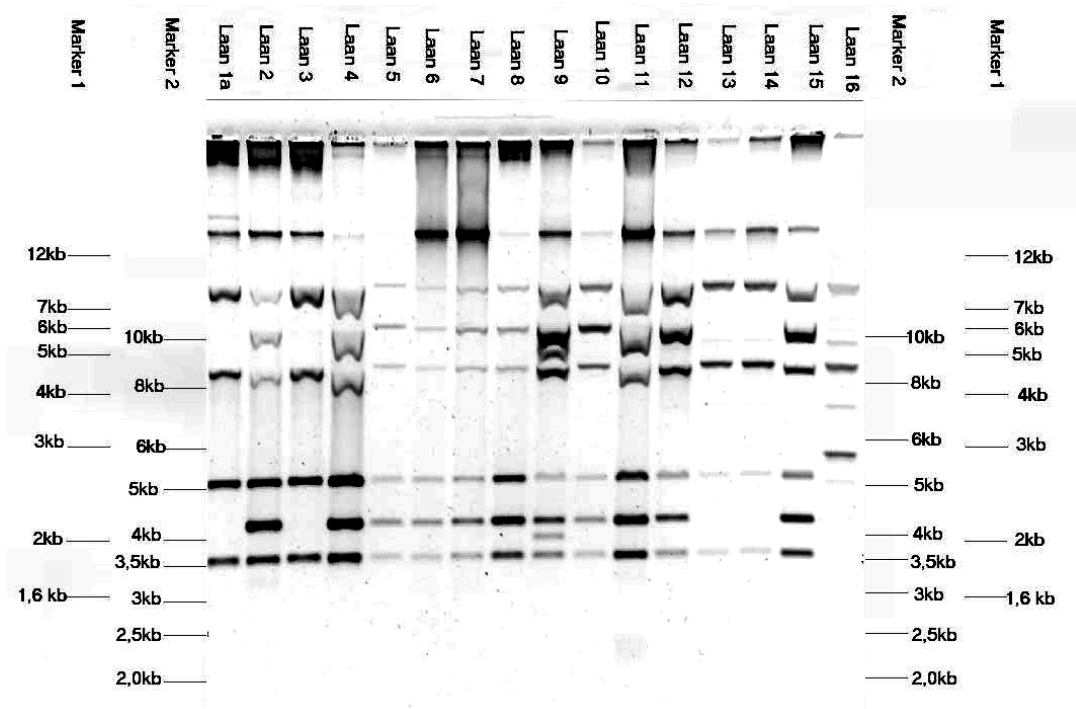
Op deze gel kunnen plasmiden tot en met 20 kb goed worden gescheiden. Er zijn twee markers gebruikt voor deze gel: Supercoiled (SC) en lineaire 1 kb marker (LN). De SC toont de grootte van supercoiled DNA t/m 10 kb. De LN toont de grootte van lineair DNA t/m 12 kb.

Aan de hand van het sequence resultaat van het referentieplasmidoom van stam 717 zouden in laan 1a op deze gel drie plasmiden te zien moeten zijn, namelijk 3.5; 5 en 20 kb. Er waren in laan 1a echter vijf duidelijke banden zichtbaar en één vaag bandje boven de bovenste band. In het slotje is ook DNA te zien. De andere lanen hadden wat betreft de zes duidelijke banden een overeenkomstig patroon, maar veel lanen hadden ook nog twee banden erbij, ter hoogte van 4.5 kb en 10 kb (SC). Laan 9 had ook ter hoogte van 4 kb (SC) nog een plasmide. Laan 16 vertoont in tegenstelling tot de andere lanen een heel ander patroon bij de kleine plasmiden. Verder was te zien dat er bij veel lanen bovenin de slotjes DNA zit, dit zouden de grote plasmiden (>20 kb) moeten zijn.

Verdere karakterisatie van de banden moest plaats vinden met behulp van hybridisatie.

Tabel 5: Overzicht van de inhoud van de lanen van de gels in figuur 11, 16 en 17.

Laan nummer	stamnummer	Laan nummer	stamnummer
1a	1191100717	10	1191100259
1b	1191100717 referentie	11	1191100266
2	1191100452	12	1191100426
3	1191100490	13	1191100468
4	1191100346	14	1191100473
5	1191100393	15	1191200132
6	1191100431	16	1191300159
7	1191100433	Marker 1	Lineair (1.6-12 kb)
8	1191100446	Marker 2	Supercoiled(2-10 kb)
9	1191100255	Marker 3	Lineair(9.4-388 kb)



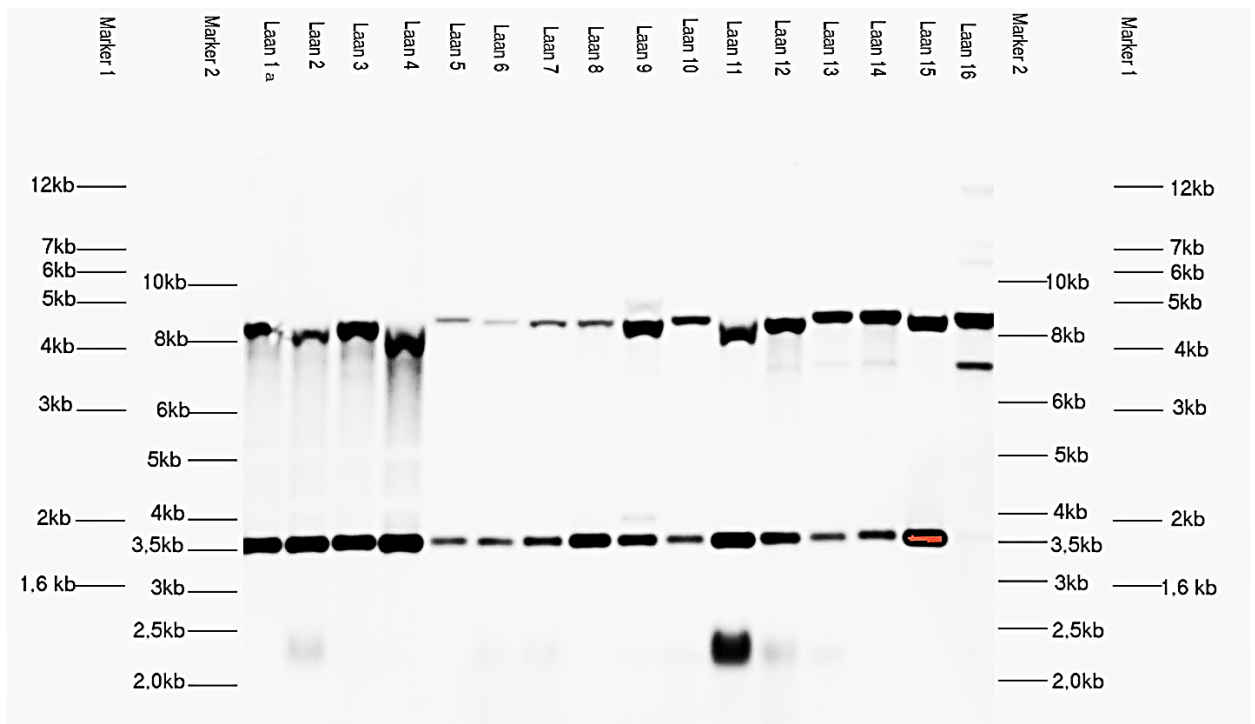
Figuur 11: Gelelektroforese van plasmidoom isolaties van 16 *Klebsiella pneumoniae* isolaten afkomstig uit het Maastricht Ziekenhuis samen met een lineaire (marker 1) en supercoiled marker (marker 2).

3.4 Hybridisatie gelelektroforese blot

Er is een Southern blot gemaakt van de gel uit figuur 11. Hierop zouden de kleinere plasmiden 3.5; 5 en 20 kb moeten hybridiseren met de replicatieprobes (tabel 3) die voor deze plasmiden zijn ontworpen. Dit bevestigt of de plasmiden ter hoogte van 3.5; 5 en 20 kb (SC) dezelfde zijn als diegene die zijn gesequenced. Ook kon aangetoond worden of de andere banden dezelfde plasmiden zijn, alleen dan in een andere (OC of lineair) vorm dan CCC (zie figuur 3).

Hybridisatie met de probe van plasmidesequentie 6 (3.5 kb) zou alleen een band bij 3.5 kb (SC) opleveren als al het plasmide supercoiled is. Inderdaad zagen we ter hoogte van 3.5 kb (SC) een band na hybridisatie (figuur 12) in alle stammen behalve in laan 16.

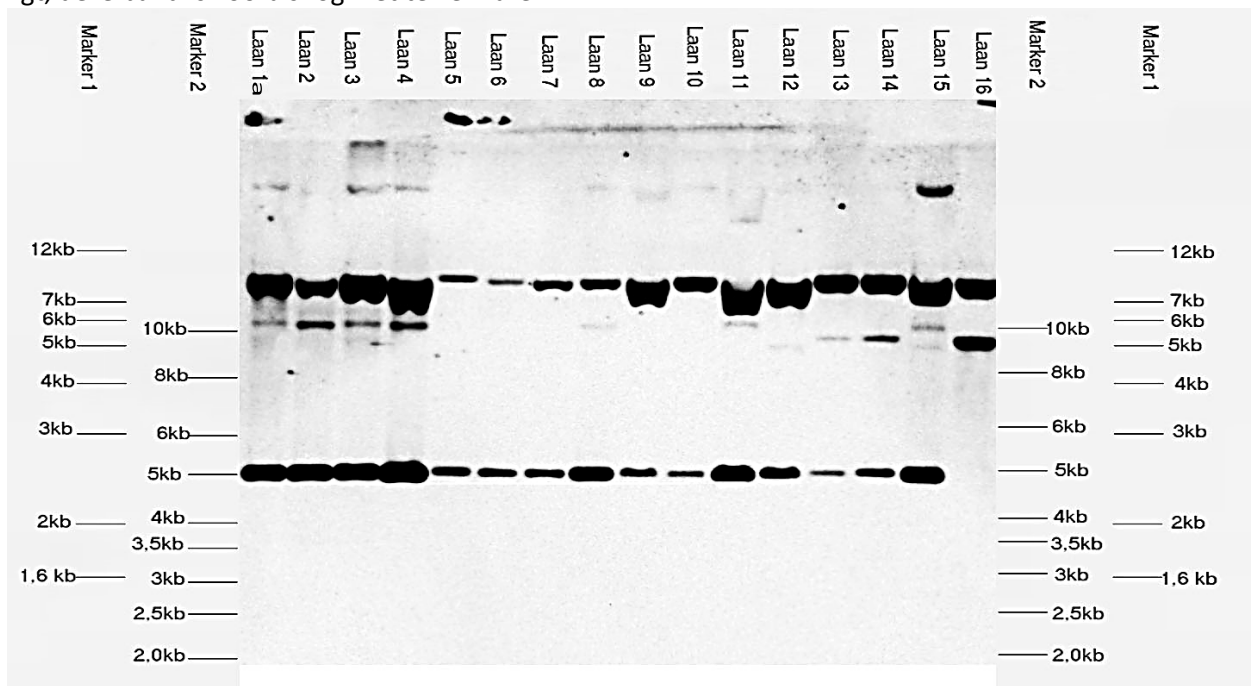
Daarnaast was er ook een duidelijke band te zien bij 4.5 kb (LN) in alle stammen. We verwachten dat deze band het plasmide is, in open circulaire vorm (OC). Bij de lanen 12,13,14 en 16 zijn vage banden te zien bij 3.5 kb (LN), dit zou de lineaire vorm van het plasmide kunnen zijn. Bij laan 11 is onder op de blot nog een band te zien die niet is waargenomen op de gel, hier is vooralsnog geen verklaring voor. De overige vage banden is waarschijnlijk specifiek signaal.



Figuur 12: Hybridisatie van replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 6.

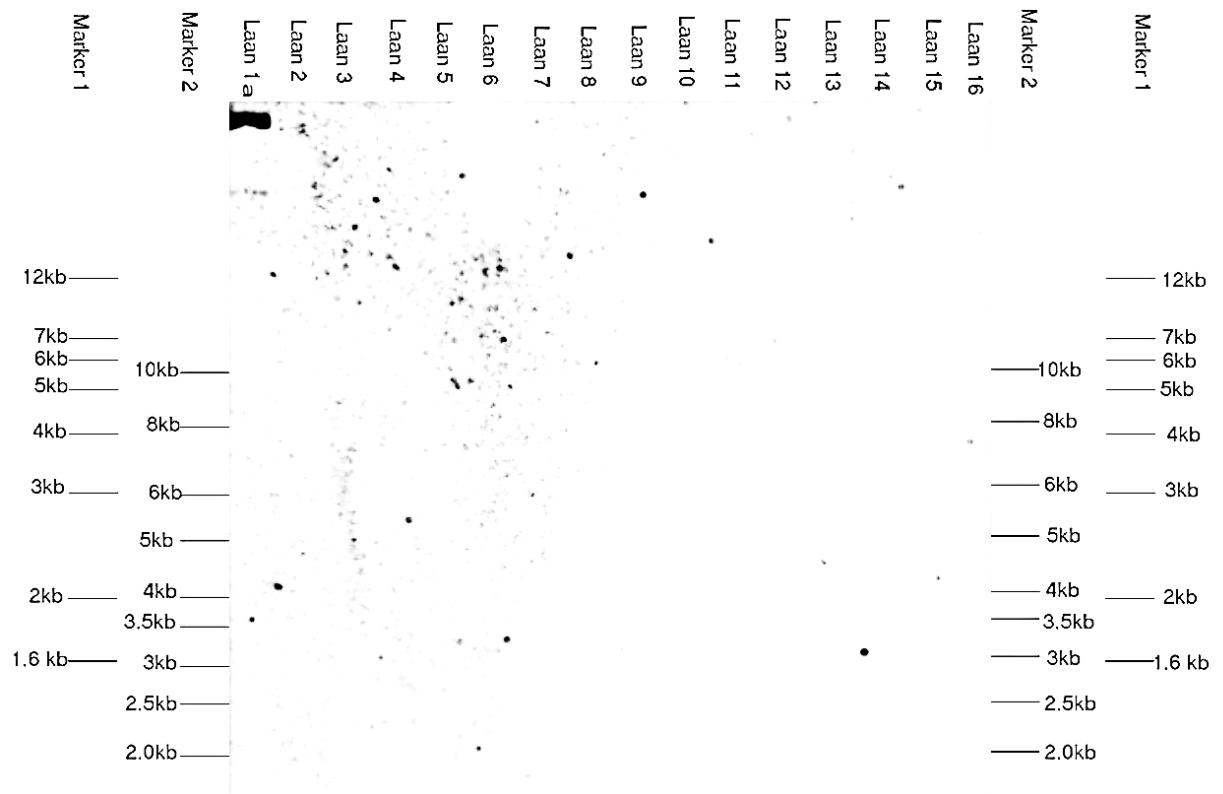
Hybridisatie met de probe van plasmidesequentie 5 (5 kb) zou alleen een band bij 5 kb (SC) opleveren als al het plasmide supercoiled is. Inderdaad zagen we ter hoogte van 5 kb (SC) een band na hybridisatie (figuur 13) in alle stammen behalve in laan 16.

Daarnaast was er ook een duidelijke band te zien bij 8 kb (LN) in alle stammen. We verwachtten dat bij deze band het plasmide OC is. Bij een aantal lanen zijn vage banden te zien bij 5 kb (LN), dit zou de lineaire vorm van het plasmide kunnen zijn of aspecifiek signaal, omdat het signaal van de andere banden zo sterk is. Bij laan 15 is nog een extra band te zien die onder de slotjes ligt, deze band is vooralsnog niet te verklaren.



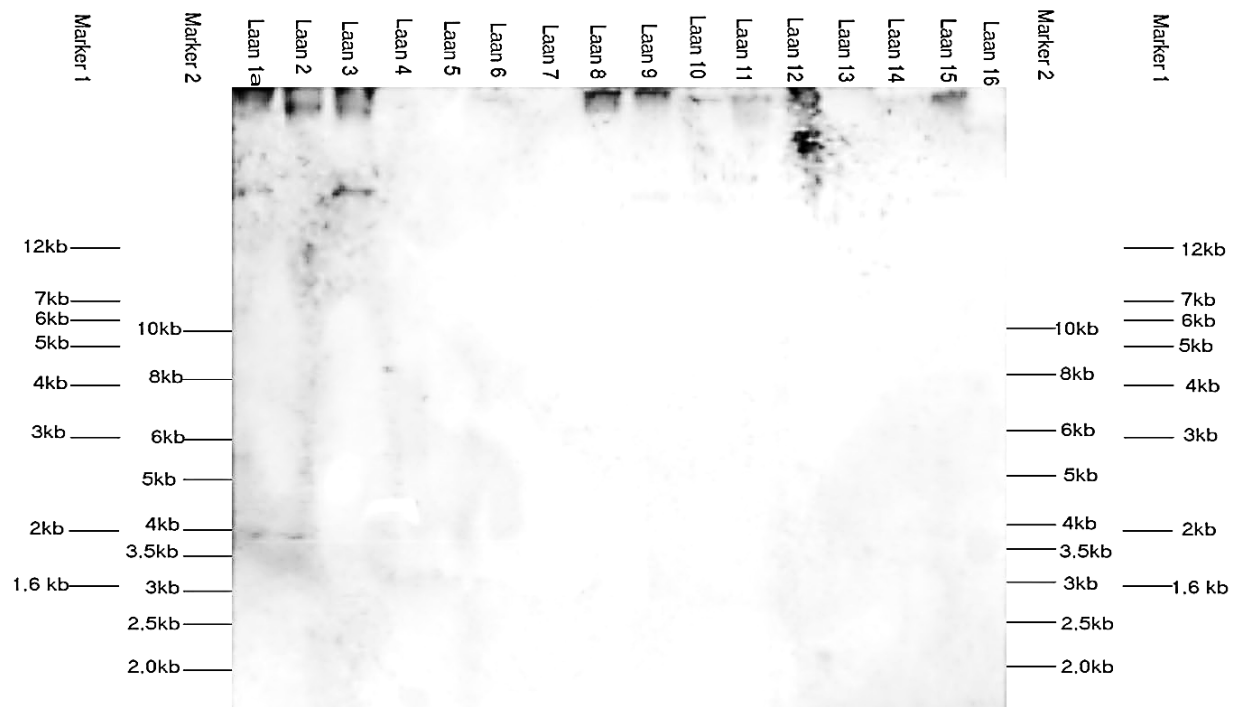
Figuur 13: Hybridisatie van replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 5.

Hybridisatie met de probe van plasmidesequentie 3 (20 kb) zou alleen een band tussen 12 kb (LN) en het slotje opleveren als al het plasmide supercoiled is. In laan 1a zit een vaag bandje tussen 12 kb (LN) en het slotje (figuur 14). Ter hoogte van dit signaal is op de gel (figuur 11) ook een vaag bandje te zien wat bij de andere lanen niet aanwezig is. Verder zien we in laan 1a een band in het slotje, dit kan het 20 kb plasmide zijn in OC en lineaire vorm.



Figuur 14: Hybridisatie van replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 3.

Het OXA-48 gen ligt op plasmidesequentie 2 (62 kb), de verwachting was dat deze niet gescheiden zou zijn op de gel en waarschijnlijk nog in de slotjes zou zitten. De resistentieprobe gebaseerd op het OXA-48 gen hybridiseert naar verwachting in de slotjes (figuur 15), behalve bij laan 4,5,6,7,13 en 14, deze zijn ook negatief bevonden op het OXA-48 gen met PCR (tabel 4). Bij laan 16 is ook geen signaal te zien terwijl deze wel positief was bevonden met PCR, dit kan komen doordat de bovenkant van de slotjes van de gel was afgescheurd. Door de storing op het blot is het niet goed te zien, maar in laan 1,3,9,10 en 15 is ook nog een vaag signaal waargenomen onder de slotjes.



Figuur 15: Hybridisatie van resistentieprobe gebaseerd op OXA-48 gen ter hoogte van de slotjes. In laan 1,3 en 9 is ook een signaal te zien vlak onder de slotjes.

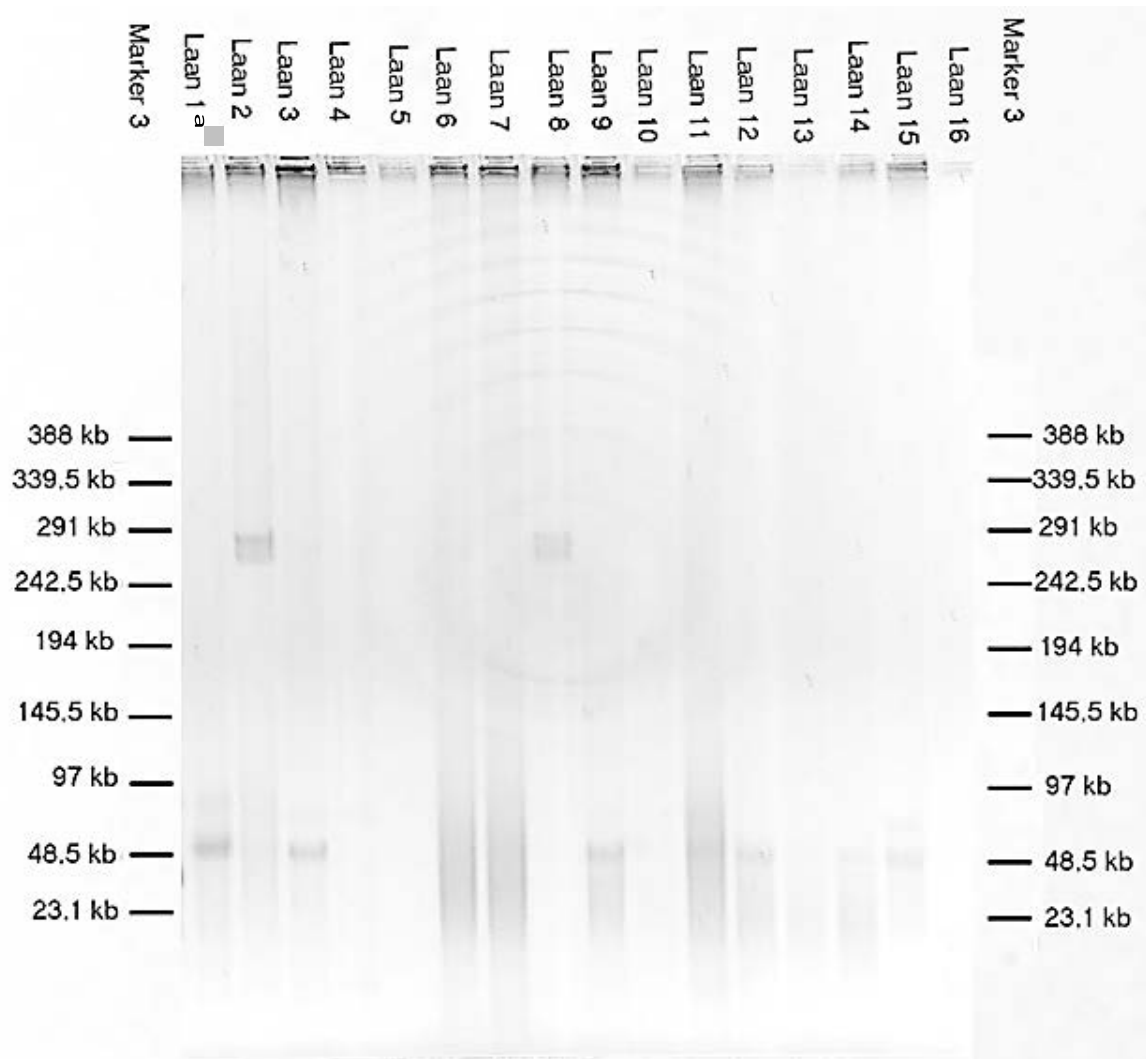
Verder is er gehybridiseerd met de probes gebaseerd op het CTX-M gen en plasmidesequentie 2, maar deze waren geheel negatief.

3.5 Pulsed-field gelelektroforese

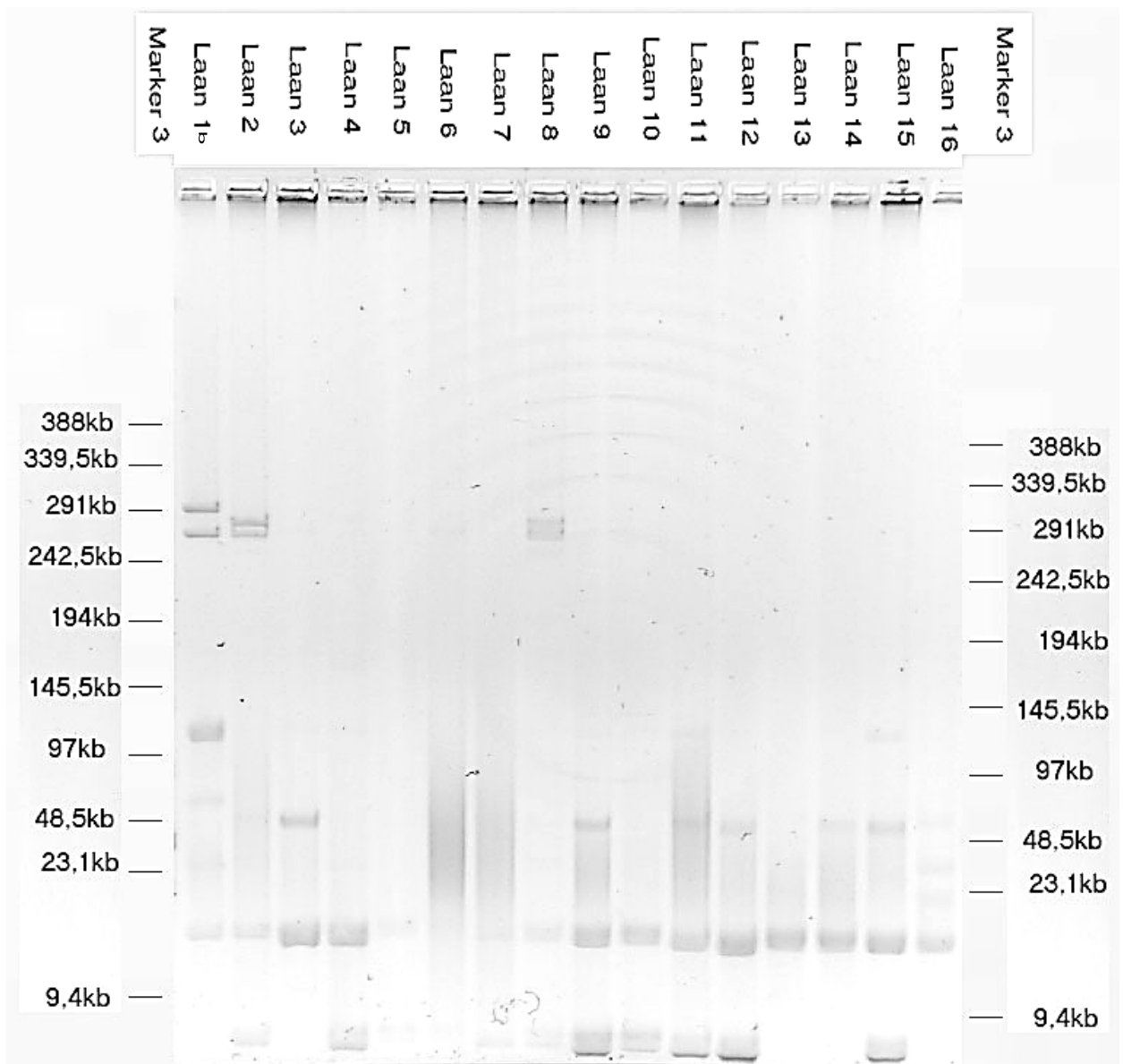
Om de grote plasmiden te kunnen scheiden na de isolatie zijn de monsters 18 uur lang geëlektroforeerd op een 1% Pulsed-field agarosegel (figuur 16 en 17). Deze gel heeft een bereik van 10 tot >300 kb. Eerst is er een PFGE (1) gedaan met stam 717 (referentieplasmiden) volgens de isolatie zoals beschreven in hoofdstuk 2.2 (laan 1a) (figuur 16). Daarna is er nog een PFGE (2) gedaan met de oorspronkelijke isolatie (laan 1b), waarvan het plasmidoom is gesequenced (figuur 17). Op beide gels staan ook de overige 15 stammen die zijn geselecteerd (tabel 5) en aan weerszijde staat een lambda PFGE marker(LP), deze marker is lineair en gescheiden van 9.4 t/m 388 kb. Volgens de sequence data van onze referentieplasmiden van stam 717 zouden we op deze gel vier plasmiden zien. Deze plasmiden hebben ongeveer een grootte van 20, 62, 70 en 200 kb. Er is geen supercoiled marker die groter is dan 10 kb, hierdoor kan nu niet worden vastgesteld welke grootte de banden hebben op de gel als het plasmide in supercoiled vorm voorkomt.

Bij PFGE (1) laan 1a zijn geen grote plasmiden te zien (figuur 16). Bij het preparaat van 717 op PFGE(2) laan 1b zijn twee banden waargenomen die grote plasmiden kunnen zijn (figuur 17). Dit zou betekenen dat de grote plasmiden niet geïsoleerd worden of in een andere vorm voorkomen als ze worden geïsoleerd volgens hoofdstuk 2.2.

Bij PFGE(1) laten laan 6, 7 en (in iets mindere mate) 11 geen (goede) banden zien alleen een smeer, het zou kunnen dat deze isolatieproducten zijn aangetast door DNase (figuur 16). Verder zijn alleen bij laan 2 en 8 grotere plasmiden te zien (figuur 15). Bij PFGE (2) is te zien dat er nog kleinere plasmiden zichtbaar waren tussen 9.4 en 23.1 kb (LP), behalve bij laan 5,6 en 7. Onder de 9.4 kb (LP) zijn bij sommige lanen ook nog banden te zien (figuur 17). Verder is te zien dat ook laan 2 en 8 weer grotere plasmiden hebben.



Figuur 16: Pulsed-field gelelektroforese (1) van 16 *Klebsiella pneumoniae* isolaten afkomstig uit het Maasstad Ziekenhuis samen met een lineaire lambda PFGE marker (marker 3).



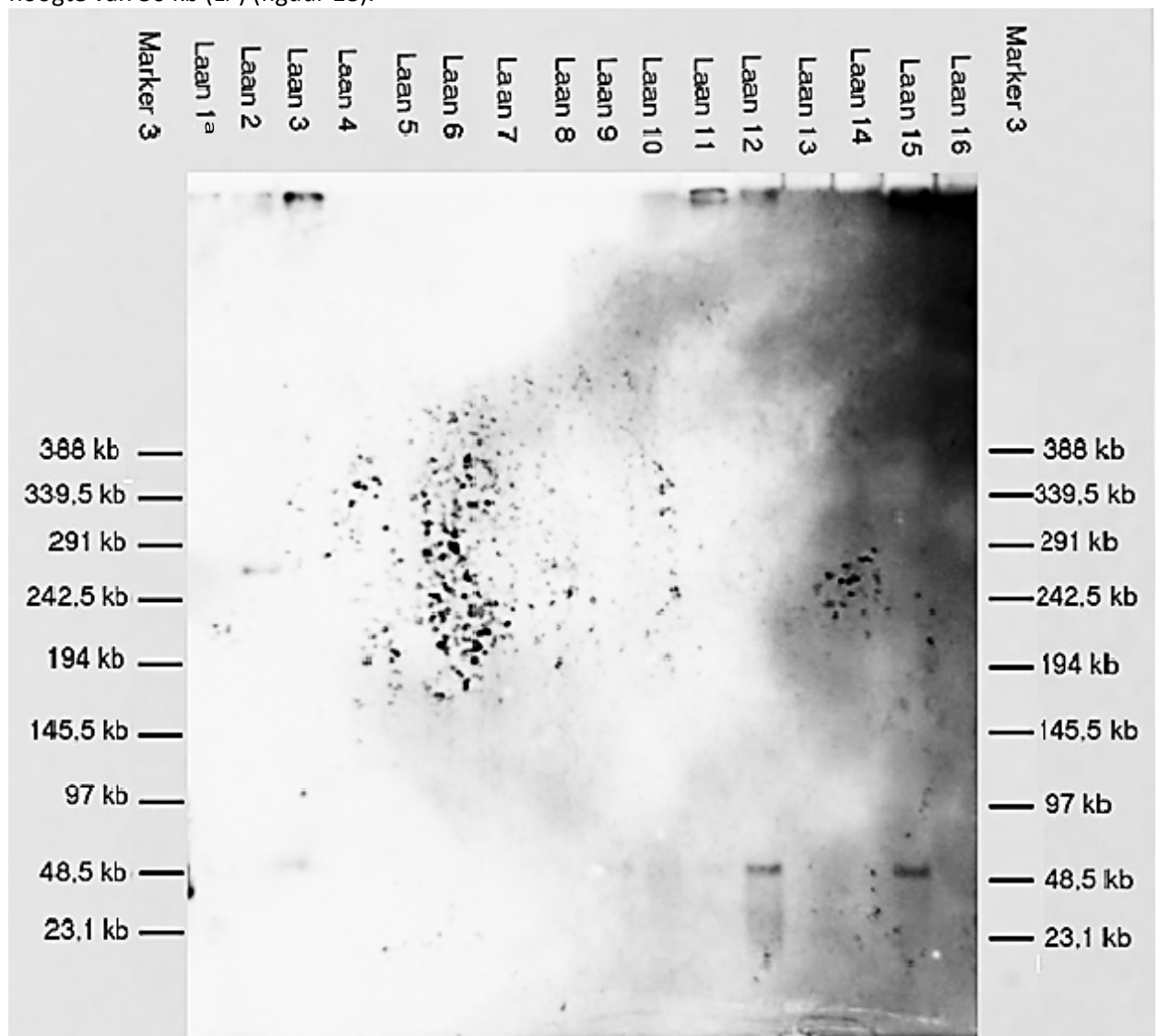
Figuur 17: Pulsed-field gelelektroforese (2) van 16 *Klebsiella pneumoniae* isolaten afkomstig uit het Maasstad Ziekenhuis samen met een lineaire lambda PFGE marker (marker 3).

3.6 Hybridisatie PFGE blots

Er zijn Southern blots gemaakt van de PFGE (1) en van PFGE (2) uit figuur 16 en 17. In laan 1b liggen de twee grootste plasmiden zo dicht bij elkaar dat dit waarschijnlijk de plasmiden van 62 en 70 kb zijn. Dit kunnen we bevestigen door te hybridiseren met de probe van plasmidesequentie 2 (62 kb) en de probe van plasmidesequentie 4 (70 kb). Uit de sequenties is gebleken dat op het 62 kb plasmide het OXA-48 gen ligt en op het 70 kb plasmide het CTX-M gen. Deze resistentieprobes zouden in ieder geval bij laan 1b op dezelfde plek moeten hybridiseren als de replicatieprobes van, respectievelijk, plasmidesequentie 2 en 4.

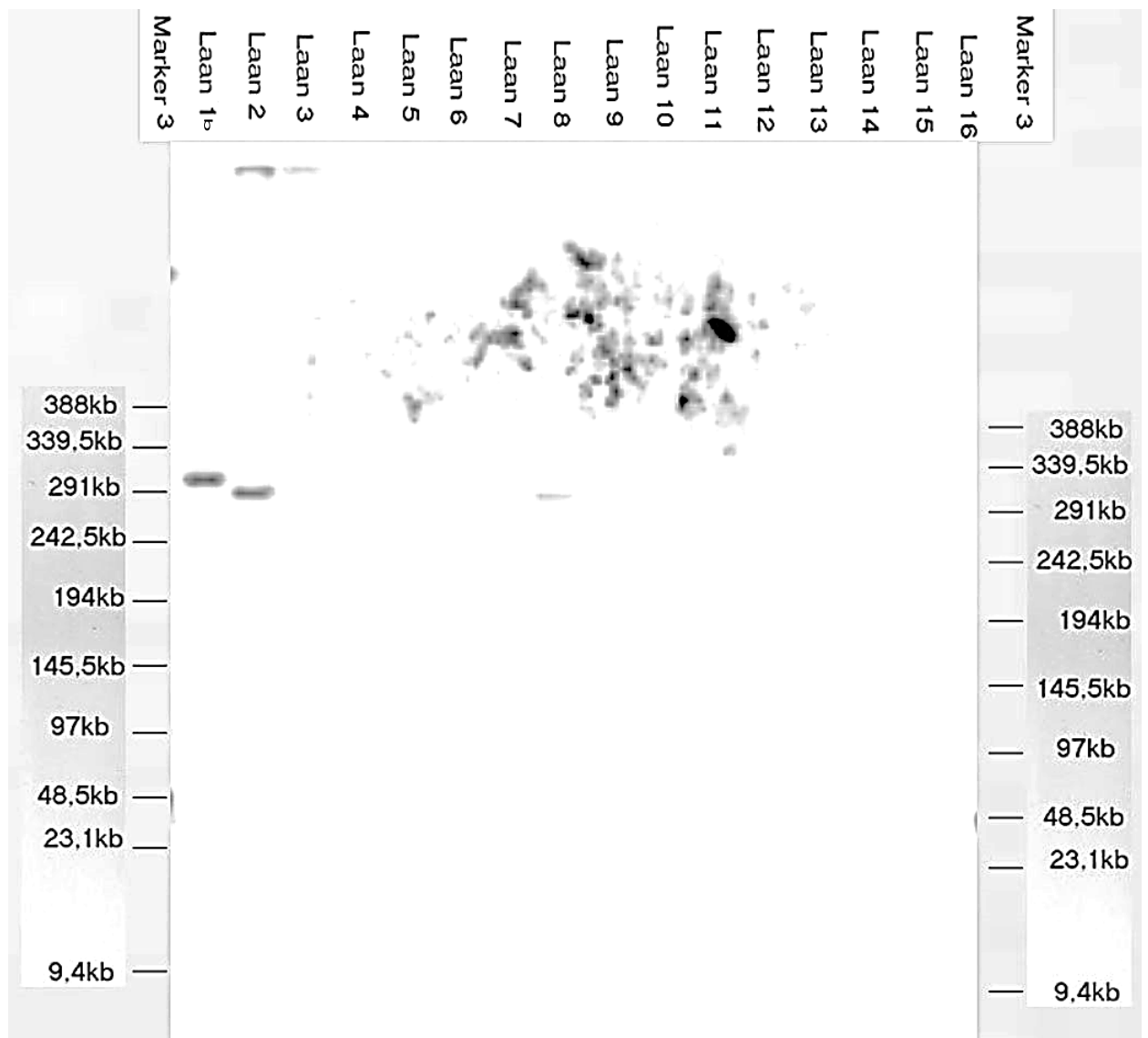
De replicatieprobe die gebaseerd is op plasmide sequentie 2 (62 kb) is alleen nog gebruikt voor hybridisatie op PFGE(1) blot (figuur 18). Het preparaat van stam 717 gaf hier geen hoog-moleculaire plasmiden banden, hierdoor kan er geen uitspraak over deze probe worden gedaan. Verder hybridiseerde de probe op de PFGE(1) blot bij laan 2 ter hoogte van ± 270 kb (LP).

In laan 8 leek hij ook op deze hoogte te hybridiseren, echter kon dit niet met zekerheid worden vastgesteld door de verstoring op de blot. Verder was bij laan 3,12 en 15 hybridisatie te zien ter hoogte van 50 kb (LP) (figuur 18).



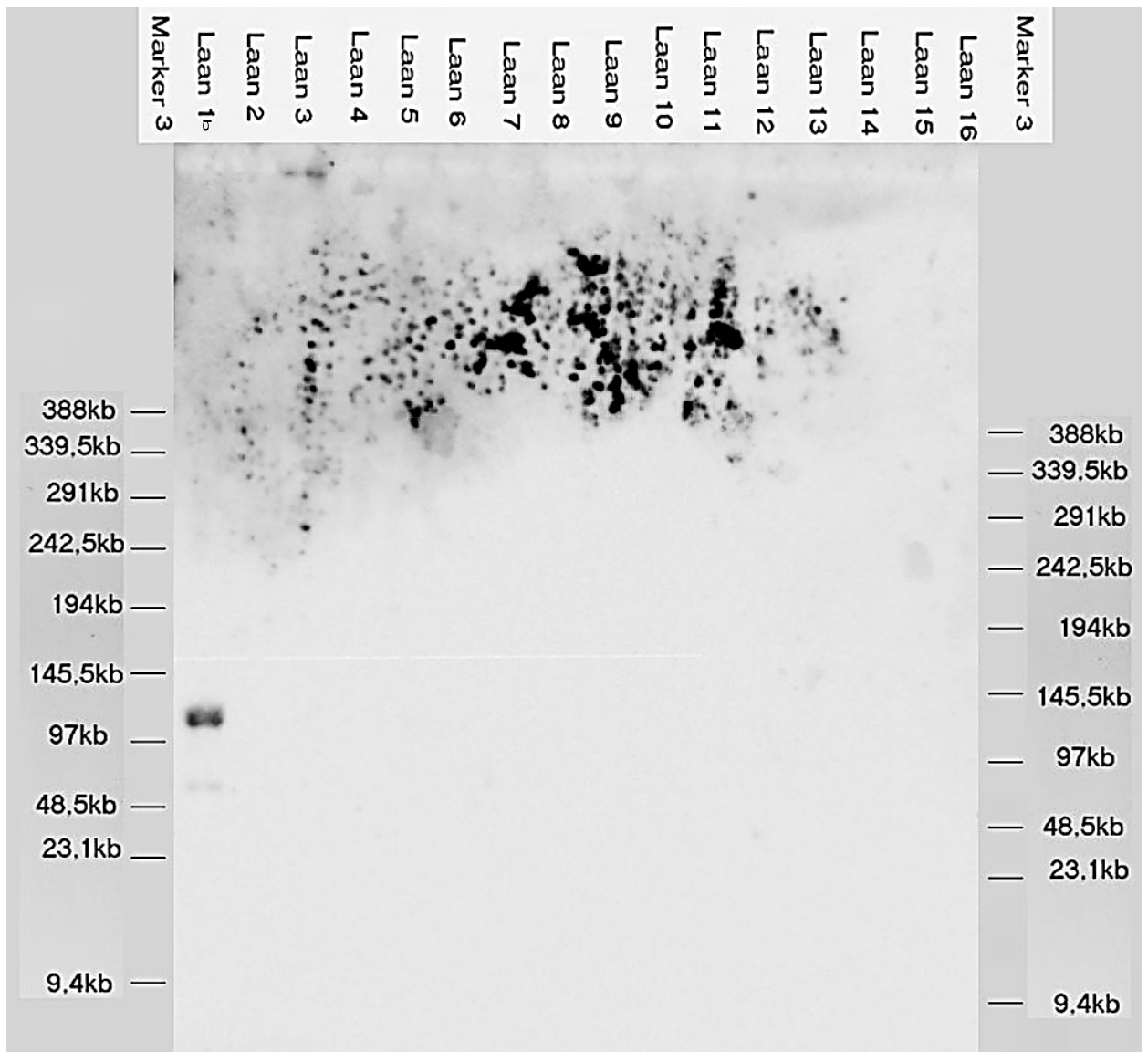
Figuur 18: Hybridisatie van replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 2 (62 kb) op PFGE(1) blot.

De resistentieprobe gebaseerd op het CTX-M gen hybridiseerde op PFGE(2) (figuur 19) op dezelfde plek waar het grootste plasmide zichtbaar is op de gel in laan 1,2 en 8 (figuur 11). Hieruit werd bevestigd dat het 70 kb plasmide het grootste plasmide is dat zichtbaar is op de gel. Veel andere stammen zouden ook moeten hybridiseren, omdat deze in de PCR ook positief bevonden waren op CTX-M groep 1. Het kan zijn dat het CTX-M gen bij de andere stammen op het chromosomaal DNA ligt of het plasmide waarop het ligt is niet geïsoleerd.



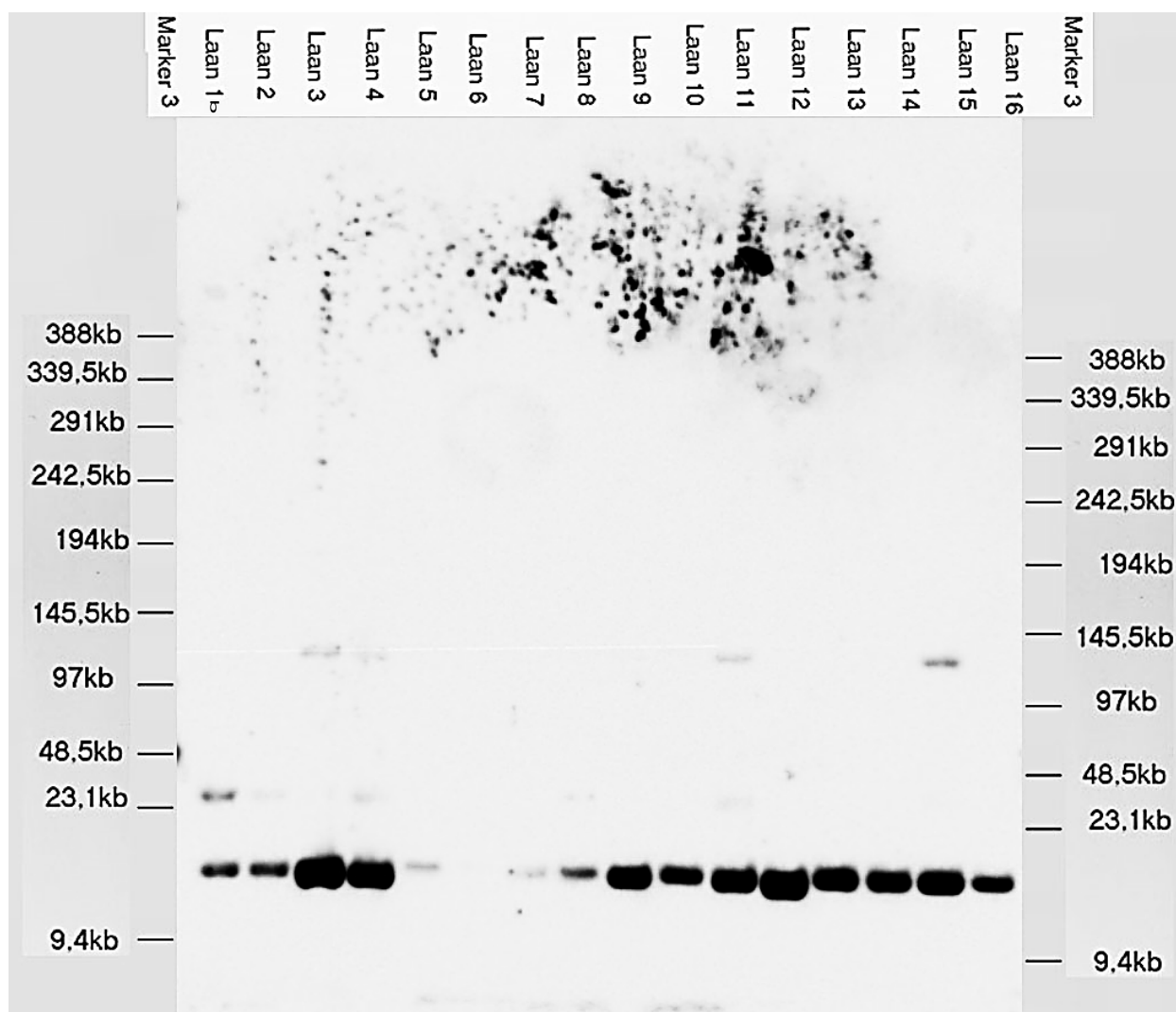
Figuur 19: Hybridisatie van resistentieprobe gebaseerd op het CTX-M gen op PFGE(2) blot.

De replicatieprobe die is gebaseerd op plasmidesequentie 3 (20 kb) hybridiseerde op PFGE(2) blot (figuur 20) alleen in laan 1 ter hoogte van ± 110 kb (LP). Dit kwam overeen met figuur 14 waar er ook alleen in laan 1 hybridisatie plaatsvond. Dit zou betekenen dat alleen in stam 717 het 20 kb plasmide zit.



Figuur 20: Hybridisatie van replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 3 (20 kb) op PFGE(2) blot.

Op de gelelektroforese blot (figuur 13) waren na hybridisatie met replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 5 twee banden te zien, de CCC vorm en een band rond 8 kb (LN) wat de OC vorm zou kunnen zijn. Om er achter te komen wat de kleinere banden zijn die zichtbaar zijn op PFGE(2) (figuur 17), is er gehybridiseerd met de replicatieprobe die gebaseerd is op plasmidesequentie 5. Op deze blot (figuur 21) hybridiseerde de probe bij alle lanen ter hoogte van ± 14 kb (LP) op laan zes na. Verder zijn er nog vage bandjes te zien ter hoogte van ± 25 en ± 140 kb (LP), dit zal waarschijnlijk specifiek signaal zijn. Het 5 kb plasmide is wel aanwezig, maar heeft wel een andere grootte dan in figuur 13.



Figuur 21: Hybridisatie van replicatieprobe gebaseerd op plasmidesequentie 5 (5 kb) op PFGE(2) blot.

4. Discussie en Conclusie

Om een typering op te zetten voor genotypisch vergelijk van CPE op basis van het plasmidoom, zijn voor ons drie stappen van essentieel belang. Ten eerste moet het plasmidoom goed en bij voorkeur snel te isoleren zijn, waarbij een minimale concentratie van 5 ng/μl plasmide DNA voldoende is voor vervolgtesten. De isolatie moet reproduceerbaar zijn en de plasmiden zouden in één vorm aanwezig moeten zijn. Ten tweede moeten de plasmiden goed van elkaar gescheiden kunnen worden met behulp van gelelektroforese. De laatste stap is Southern blotten, gevolgd door hybridisatie van probes op replicatiegenen van referentieplasmiden en op resistentiegenen.

Voor de isolatiemethode van het plasmidoom is gekozen om dit uit 50 ml 16uurs cultuur te doen. Met dit volume werd bij 13 van de 16 stammen voldoende DNA geïsoleerd. Drie stammen zaten onder de grens van 5 ng/μl plasmide DNA, toch is ervoor gekozen om deze op gel te zetten. Dit komt omdat er geen resterende tijd was om deze stammen opnieuw te isoleren. Ook is er gekozen om een proteïnase K stap van 3.5 uur in de isolatieprocedure toe te voegen. Deze stap zorgt er wel voor dat plasmide DNA beter wordt gescheiden van eiwitcomplexen en blijft er meer plasmide DNA over na de isolatie, maar bij referentiestam 717 is ook waargenomen dat de grootste plasmiden niet meer voorkomen op de pulsed-field agarosegel. Dit kan betekenen dat de grote plasmiden niet mee zijn geïsoleerd. Om te kijken of de proteïnase K incubatie hier verantwoordelijk voor is, moet worden gekeken om de incubatie in te korten.

Het spectrum van de gewone gelelektroforese en de pulsed-field gelelektroforese is voldoende om plasmiden van 3.5 t/m 70 kb te scheiden. Theoretisch gezien zouden ook plasmiden die groter zijn dan 70 kb gescheiden worden met behulp van pulsed-field gelelektroforese, maar het 200kb plasmide wat is gesequenced uit referentiestam 717 is nooit aangetoond op de gel. Een reden hiervoor zou kunnen zijn dat dit plasmide een laag copy number heeft, maar toch was er wel genoeg DNA aanwezig om het plasmide te sequencen. Dit betekent dat er ook voldoende moet zijn om hem op gel te kunnen waarnemen. Er is een PCR uitgevoerd op het 200 kb plasmide op het opgeloste plasmide DNA en deze is positief bevonden. Het is mogelijk dat de structuur en de grootte van het plasmide ervoor zorgen dat deze niet door de gel kan migreren. Verder is wel te zien dat meer banden te zien zijn op de gels dan het aantal referentieplasmiden, dit houdt in dat met de plasmiden isolatiemethoden niet alleen CCC plasmiden worden geïsoleerd maar ook andere vormen zoals OC en lineair. Dit is ook te zien bij de blots als er meerdere banden zichtbaar worden bij hybridisatie van één probe. Het is gemakkelijker om de plasmiden patronen met elkaar te vergelijken als alle plasmiden in één en dezelfde vorm voorkomen. Met behulp van S1 nuclease zouden de plasmiden allemaal in de lineaire vorm aanwezig moeten zijn, maar er moet nog een optimalisatie worden gedaan met betrekking tot toevoeging van S1 nuclease. Als alle plasmide in lineaire vorm aanwezig zijn, kan de grootte ook direct worden bepaald aan de hand van de lineaire markers die zich op de gel bevinden. Commerciële supercoiled markers hebben maar een bereik van 10 kb, hierdoor kan over de plasmiden die boven 10 kb zijn niet exact worden vastgesteld hoe groot deze zijn. Bij het hybridiseren zijn de 3.5 en 5 kb plasmiden duidelijk aangetoond bij alle stammen. Het 20 kb plasmid kwam alleen maar voor bij de referentiestam volgens de oorspronkelijke isolatie en volgens de isolatie zoals deze staat beschreven in hoofdstuk 2.2. Dit betekent dat dit plasmide niet verloren gaat door de aangepaste isolatiemethode. Dit is niet te zeggen van de 62 en 70 kb plasmiden, waarbij ze wel bij de oorspronkelijke isolatie aanwezig zijn maar bij de aangepaste isolatie zijn ze niet meer aan te tonen op de juiste hoogte bij het plasmidoom van stam 717. Er kan dus ook bij de andere stammen niet worden vastgesteld of zij deze plasmiden niet bezitten óf dat ze niet mee zijn geïsoleerd.

Het CTX-M gen bevindt zich op het 70 kb referentieplasmide, veel andere stammen waren in de PCR positief bevonden op CTX-M groep 1. Het kan zijn dat het CTX-M gen bij de andere stammen op het chromosomaal DNA ligt of het plasmide waarop het ligt is niet geïsoleerd. Om dit probleem op te lossen zal er nogmaals gekeken moeten worden naar de isolatieprocedure zoals hij nu beschreven staat om ervoor te zorgen dat deze grote plasmiden niet verloren gaan. De eerste stap gaat uit naar de proteïnase K stap die te drastisch lijkt te zijn.

De eindconclusie van dit verslag is dat eerst de isolatiemethode verder geoptimaliseerd moet worden. Vooral de optimalisatie van de proteïnase K stap is hierin belangrijk. En als criteria hiervoor moet niet alleen gekeken worden naar de eindconcentratie plasmide DNA, maar ook de aanwezigheid van de grote plasmiden. Verder is het belangrijk dat de plasmiden op gel in één en dezelfde vorm voorkomen, om direct de grootte van de plasmiden te kunnen vaststellen. Dit kan de supercoiled vorm of de lineaire vorm zijn. Voor de grootte van de lineaire vorm zijn voldoende markers beschikbaar, maar voor de grootte van de supercoiled vorm zou eventueel een marker samengesteld kunnen worden van bekende plasmiden patronen in supercoiled vorm. Om het 200 kb plasmide aan te tonen zou deze eerst geknipt moeten worden met S1 nuclease om te zien of het plasmide dan wel door de gel migreert.

Literatuurlijst

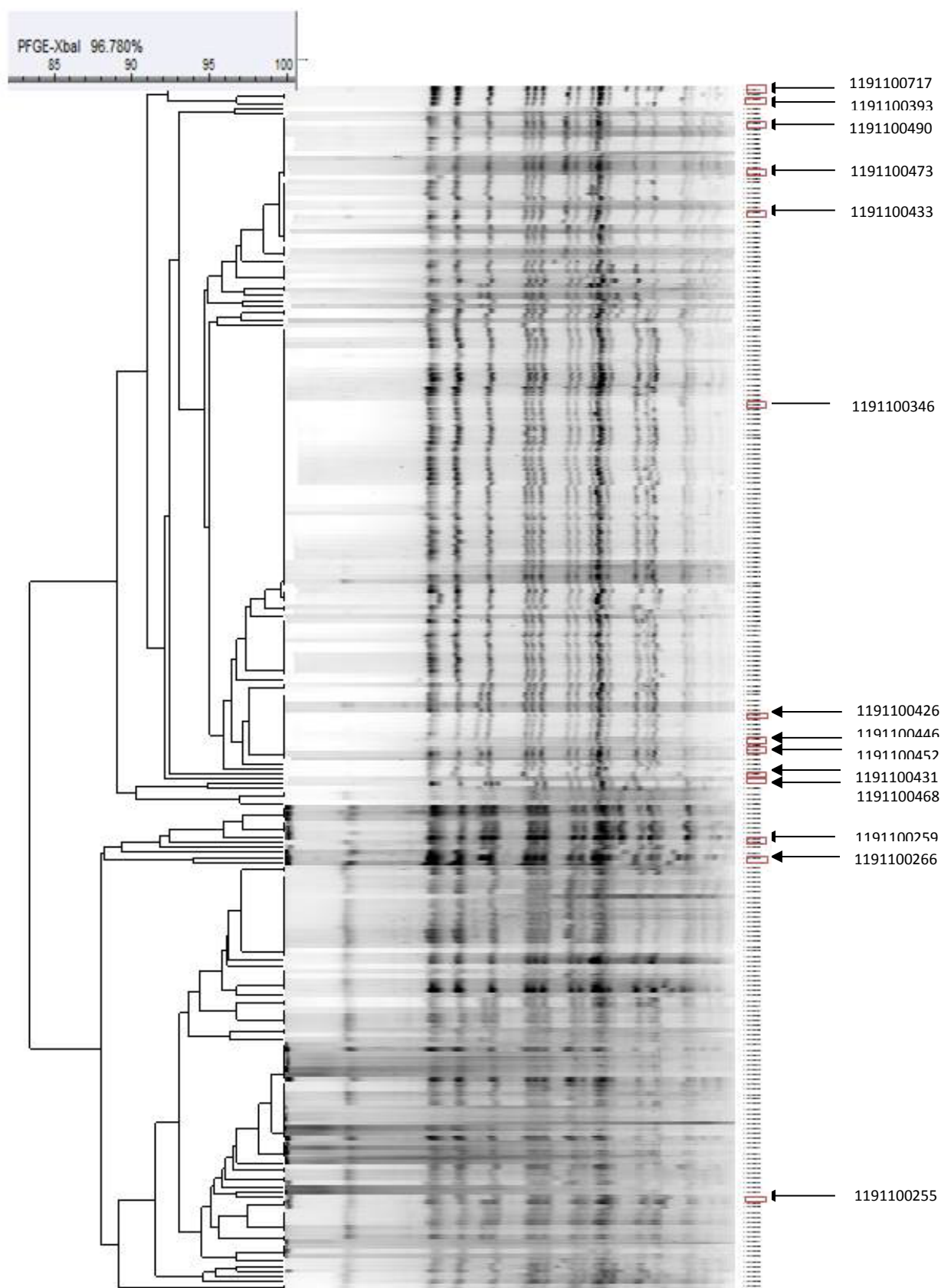
- 1 Bassetti, M. Nicolini, L. Esposito, S. Righi, E. Viscoli, C.(2009). Review current status of newer carbapenems. *Curr. Med. Chem*; 16(5): 564-75.
- 2 Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513–1523.
- 3 Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995). A functional classification scheme for β lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1211–33.
- 4 Clowes RC.(1972).Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 36:361-405.
- 5 Dautzenberg MJ et al. (2014). Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill.* 2014 Mar 6;19(9). pii: 20723.
- 6 Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *MMBR* 62: 434–464.
- 7 Kües U, Stahl U. (1989). Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 53, 491–516
- 8 Longkumer T, Kamireddy S, Muthyala VR, Akbarpasha S, Pitchika GK, Kodetham G, Ayaluru M, Siddavattam D. (2013). *Acinetobacter* phage genome is similar to Sphinx 2.36, the circular DNA copurified with TSE infected particles. *Sci Rep.* 3:2240. doi: 10.1038/srep02240.
- 9 Nordmann P, Naas T, Poirel L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *EID journal*; volume 17; no. 10.
- 10 Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*;12:4943–4960. doi: 10.1128/AAC.00296-11.
- 11 Rahn O.(1937). New principles for the classification of bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infek- tionskr. Hyg. Abt. 2* 96:273-286.
- 12 Schmidt, T.; Friehs, K.; Schleef, M.; Voss, C.; Flaschel, E.(1999). Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Gel Electrophoresis *Anal. Biochem.* 274 (2), 235–240.
- 13 Strachan T, Read AP. (1999). *Human Molecular Genetics*. 2nd edition. New York: Wiley-Liss; Chapter 5 Nucleic acid hybridization assays.
- 14 Thomson KS.(2010). Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* 48:1019–25.
- 15 Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* ;25(4):682–707.

- ¹⁶ Worthington RJ, Melander C. (2013). Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *J. Org. Chem.*, 78 (9), pp 4207–4213.
- ¹⁷ Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, et al. (2007) Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 67: 1027–1052.

Bijlagen

Bijlage I:	Dendrogram PFGE-Xbal patronen en geselecteerde stammen
Bijlage II:	Plasmide-isolatie protocol uit 50 ml cultuur
Bijlage III:	Protocol voor de QuantiFluor bepaling
Bijlage IV (A):	Gelelektroforese
Bijlage IV (B):	Pulsed-field gelelektroforese
Bijlage V:	Southern blotting protocol
Bijlage VI:	Hybridisatie protocol

Bijlage I: Dendrogram PFGE-Xbal patronen en geselecteerde stammen



Bijlage I: Dendrogram met percentage van gelijkenis van PFGE-XbaI patronen en geselecteerde stammen uitgelicht.

Bijlage II: Plasmide isolatie protocol uit 50 ml cultuur

1. Overnacht cultuur inzetten
2. Bij begin van de isolatie buffer P2 al bij 37°C zetten, buffer P3 al in koelkast 4°C
3. 50 ml per buis.
4. 6000g in sorvall 15 min 4°C (rotor code 05)
5. Bouillon afpipetteren
6. Pellet resuspenderen in 2 ml P1
7. 2 ml P2 snel erbij spuiten, direct mengen. 5 min laten staan
8. 2 ml koude P3 toevoegen, direct mengen. tien min op ijs laten staan
9. 20.000g 30 min 4°C = 13.000RPM in sorvall
10. Supernatant afpipetteren en door een filter halen naar een nieuwe buis.
11. Eindconcentratie van 100 ug/ml Prot k behandeling 3.5 uur bij 50°C
12. Precipiteren met 3.6 ml isopropanol.
13. 15.000g 30 min 4°C = 11.000RPM in sorvall
14. Wassen met 2 ml 70% EtOH
15. 15.000g 30 min 4°C = 11.000RPM in sorvall
16. Supernatant afpipetteren en pellet laten drogen aan de lucht (kort)
17. Pellet oplossen in 500 ul TE

Isolatie overnacht laten staan om op te lossen in TE

1. QF buffer al bij 65°C zetten
2. 9 ml EX buffer toevoegen aan opgeloste DNA in TE
3. Voeg 200 ul ATP-Dependent Exonuclease en 300 ul ATP solution toe aan het opgeloste DNA. meng voorzichtig maar goed en incubeer 60 minuten bij 37°C
4. Equilibreer de qiagen-tip 500 (kolom) door 10 ml QBT buffer er door te laten lopen
5. Voeg 10 ml QS buffer toe aan het DNA monster en breng dit over naar de kolom
6. Was de kolom twee keer met 30 ml QC buffer
7. Elueer DNA met 15 ml QF buffer, voorverwarmt op 65°C
8. Precipiteren met 10.5 ml isopropanol
9. 15.000g 30 min 4°C = 11.000RPM in sorvall
10. Wassen met 5 ml 70% EtOH
11. 15.000g 30 min 4°C = 11.000RPM in sorvall
12. Supernatant afpipetteren en pellet laten drogen aan de lucht (kort)
13. Pellet oplossen in 500 ul TE

Isolatie overnacht laten staan om op te lossen in TE

Bijlage III: Protocol voor de QuantiFluor bepaling

Verdunnen 1:200, 1 μ l QuantiFluor en 199 μ l TE buffer. Afhankelijk van hoeveel monsters je hebt de benodigde hoeveelheid verdunnen

2. DNA standaard 1:50 verdunnen (standaard = 100 ng/ μ l).

1 μ l DNA standaard en 49 μ l TE buffer. Concentratie is dan 2 ng/ μ l

In alle gevallen (standaard/blanco/monsters wordt 25 μ l materiaal genomen en 25 μ l QuantiFluor).

3. standaard : pipetteer 25 μ l standaard DNA (50 ng DNA) in een epje.

4. blanco : pipetteer 25 μ l TE buffer in een epje.

5. monster(s) : eventueel eerst meten op de nanodrop voor een schatting en aan de hand van de geschatte waarde een verdunning maken zodat de concentratie niet boven de 50 ng/ μ l komt. a. Bij monsters van 50 ng/ μ l of lager, pipetteer 1 μ l monster en vul aan met 24 μ l TE buffer
b. Monsters die een hogere concentratie hebben 10X verdunnen (als nodig is meer). Pipetteer 1 μ l van de verdunning en vul aan met 24 μ l TE buffer (vermenigvuldig later de uitkomst met de verdunningsfactor om de juiste concentratie te krijgen)

6. Pipetteer bij alle monsters, standaard en blanco 25 μ l verdunde QuantiFluor.

7. Meng de monsters (eventueel kort afdraaien zodat alles onderin zit).

8. Incubeer de monsters 5 minuten in het donker.

9. Breng de monsters over in borosilicate cuvetten.

10. Zet de Fluorometer aan.

11. Stel de STD val in op 50 (in de standaard zit 50 ng DNA).

12. Voer de kalibratie uit met de blanco en de 50 ng standaard. a. druk op "cal"

13. druk op "enter"

14. stop de blanco in de meter

15. druk op "enter"

16. stop de 50 ng standaard in de meter

17. druk op "enter"

18. nu is het apparaat gekalibreerd en kunnen de monsters afgelezen worden met de read knop

19. De monsters meten, inclusief de standaard en de blanco.

20. De gemeten waarde is de hoeveelheid in ng/ μ l van de gebruikte oplossing/verdunning.

Bijlage IV: Gelelektroforese protocol

(A) Gelelektroforese

1. Maak 150 ml 0.7% agarose in 0.5 X TBE in de magnetron en laat in een waterbad afkoelen tot ongeveer 50°C (Draag handschoenen en gelaatscherm)
2. Neem een geltray en kam van Biorad en zet deze in elkaar
3. Vul de geltray voorzichtig met agarose en laat deze 15 min. stollen
4. Vul de bak met 0.5 X TBE
5. Zorg dat de elektroforesebak waterpas staat
6. Plaats de gel in de mal in de bak
7. Verwijder de kam uit de geltray
8. Pipeteer het DNA met SB in de slotjes.
9. Sluit het deksel
10. Stel nu het apparaat in en elektroforeer gedurende 344 minuten met 150V zodat het DNA uit de slotjes in de agarose zit. Daarna overnacht bij (18 uur) 25V

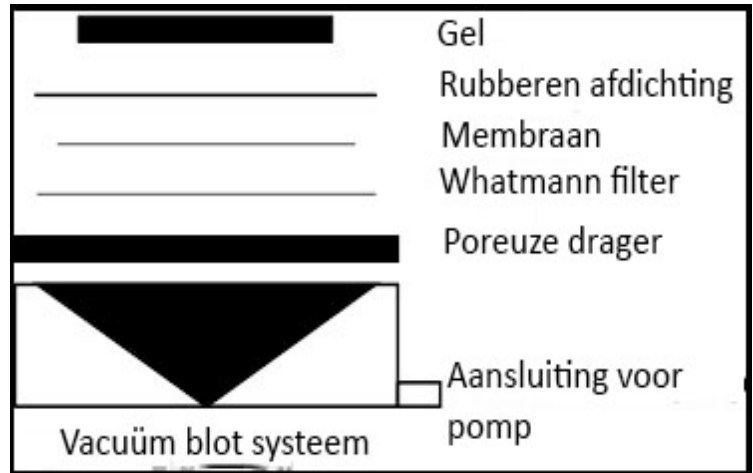
(B) Pulsed-field gelelektroforese

1. Maak 200 ml 1% SeaKem Gold agarose in 0.5 X TBE in de magnetron en laat in een waterbad afkoelen tot ongeveer 50°C (Draag handschoenen en gelaatscherm)
2. Neem een geltray en kam van Biorad en zet deze in elkaar
3. Vul de geltray voorzichtig met agarose en laat deze 15 min. stollen
4. Vul de bak met 2 liter 0.5 X TBE
5. Zorg dat de elektroforesebak waterpas staat
6. Verwijder de kam uit de geltray.
7. Stop de agarose plakjes met marker Low Range PFGE in een slotjes
8. Plaats de gel in de mal in de bak
9. Pipeteer het DNA met SB in de slotjes.
10. Sluit het deksel
11. Stel nu het apparaat in 6V/cm = 200 V; 6.8-38.4 sec. 18 uur.
12. Elektroforeer gedurende 30 minuten zonder de pomp aan te zetten zodat het DNA uit de slotjes in de agarose zit.
13. zet de pomp aan (stand 70)
14. Stel de temperatuur in (14°C)

Bijlage V: Southern blotting protocol

Blotten:

1. Plaats de gel voor 5 minuten in UV licht.
2. Leg de gel 15 minuten in 500 ml 0.25 M HCl.
3. Leg de gel 15 minuten in 500 ml 0.4 M NaOH. Giet vloeistof af en incubeer 15 min in verse 0.4 M NaOH.
4. Bouw de volgende blot-constructie:
5. Maak de poreuze drager nat met kraanwater en plaats hem op het apparaat.
6. Knip een Whatman 3 MM filter even groot als de gel. Maak hem nat met aqua dest en leg hem op de poreuze drager.
7. Knip een Hybond N⁺ mem-braan even groot als de gel. Maak hem nat met aqua dest en leg hem op de Whatmann filter, voorkom luchtballen.
8. Plaats de rubberen afdichting. Het moet het membraan met 0.5 cm overlappen.
9. Plaat de gel in één beweging (niet schuiven) op het membraan.
10. Doe de deksel op het apparaat. Bedek de slotjes en de 4 zijden met 2% agarose en laat het stollen
11. Giet 800 ml 10XSSC op de gel. Sluit het apparaat aan op een vacuümpomp en trek hem vacuüm met 0.4mBar. Doe dit minimaal 30 minuten.
12. Plaats de blot voor 2 minuten op een Whatman 3 MM filter verzadigd met 0.4 M NaOH.
13. Spoel de blot kort (1-2 minuten) in 5x SSC.
14. De blot kan direct gebruikt worden voor hybridisatie experimenten, of opgeslagen worden in afgesloten plastic seal onder natte conditie



Bijlage VI: Hybridisatie protocol

Hybridiseren met probe: 5'biotine gelabelde oligo de F primer van de qPCR. Hybridiseren in DIG Easy Hyb buffer van Roche.

Werkwijze:

1. prehybridisatie bij 42°C. 15 min in 10 ml DIG Easy Hyb buffer van Roche.
2. hybridisatie bij 42°C gedurende 1 uur, voeg toe aan de 10 ml DIG Easy Hyb buffer van Roche 5 ul van 100pmol/ul Biotine gelabelde probe aan de 5'kant.
3. Wassen: 2x 15 min bij 50°C in 100 ml 2x SSC+0.1% SDS
4. Incubatie SAPOD: 500 U/ml dit 1:4000 verdunnen dus 2.5 ul in 10 ml 2x SSC+0.5%SDS dit 1 uur bij 42°C .
5. Wassen: 2x 10 min bij 42°C in 100 ml 2x SSC+0.5% SDS
6. Spoelen: 2xSSC bij RT.
7. detectie: met supersignal west femto Maximum sensitivity substrate. Van Thermo scientific. Meng 7.5 ml van super signal west femto stable peroxide buffer met 7.5 ml super signal west femto luminal enhancer solution. Voeg toe in bak, en 5 min schudden
8. Strippen van blot: 2x 20 min bij 37°C met 0.2N NaOH+0.1% SDS. Daarna spoelen met 2x SCC.