

Diversitet og overføring av *Bacteroides fragilis* i en kohort av mødre og deres barn

Guro Alette Bjerke



Mastergradsoppgave
Avdeling for lærerutdanning og naturvitenskap

HØGSKOLEN I HEDMARK
2010

Innhold

INNHold	2
FORORD	5
NORSK SAMMENDRAG	6
ENGELSK SAMMENDRAG (ABSTRACT)	7
1. INNLEDNING	8
1.1 TARMFLORA.....	8
1.2 ATOPISK ALLERGI	10
1.3 BACTEROIDES FRAGILIS	12
1.4 GENETISKE MARKØRER / GENOTYPING	14
1.4.1 <i>Multilokus sekvenstyping (MLST)</i>	15
1.4.2 <i>Tandemrepeterende sekvenser (TRS)</i>	16
1.4.3 <i>Genetiske markører i B. fragilis</i>	16
1.5 MÅLSETNINGER.....	17
2. MATERIALER OG METODER	18
2.1 PRØVEMATERIALE	18
2.1.1 <i>Isolering av DNA</i>	19
2.1.2 <i>Dyrking av bakterier</i>	21
2.2 KONSTRUKSJON AV PRIMERE.....	21
2.2.1 <i>MLST primere</i>	22
2.2.2 <i>TRS-primere</i>	22
2.3 PCR-ANALYSE.....	23
2.4 SEKVENSERING AV PCR-PRODUKTER	24
2.4.1 <i>Sammenstilling og kvalitetsanalyse av sekvenserte PCR-produkter</i>	25

2.5	ANALYSE AV TRS-AMPLIKONER VED KAPILLÆRELEKTROFORESE	25
2.5.1	<i>Analyse av alleler fra kapillær gelelektroforese</i>	26
2.6	FYLOGENETISKE ANALYSER	26
2.7	STATISK ANALYSE AV OVERFØRING AV <i>B. FRAGILIS</i> FRA MOR TIL BARN	27
3.	RESULTATER	29
3.1	MULTILOKUSSEKVENSTYPING (MLST)	29
3.1.1	<i>Konstruksjon og evaluering av MLST primere</i>	29
3.1.2	<i>Direkte sekvensanalyse av icd-genet med PCR i avføringsprøver</i>	31
3.2	ANALYSE AV <i>B. FRAGILIS</i> OVERFØRING FRA MOR TIL BARN VED ICD-GENOTYPING	36
3.3	TRS SUBTYPING AV ICD-1 GRUPPEN	37
3.3.1	<i>Konstruksjon og evaluering av TRS-primere</i>	37
3.3.2	<i>TRS1-analyse med PCR i avføringsprøver og i dyrkingskolonier</i>	39
3.4	ANALYSE AV <i>B. FRAGILIS</i> OVERFØRING FRA MOR TIL BARN VED TRS1-GENOTYPING	43
3.5	SEKVENSANALYSE AV UTVALGTE TRS1-FRAGMENTER	43
3.5.1	<i>Analyse av TRS1-flankeområder</i>	44
3.6	KORRELASJON MELLOM GENOTYPING OG SENSIBILISERING	45
3.6.1	<i>icd-genotyper og sensibilisering</i>	45
3.6.2	<i>TRS1-genotyper og sensibilisering</i>	46
4.	DISKUSJON	48
4.1	DIVERSITET AV <i>B. FRAGILIS</i>	48
4.2	OVERFØRING AV <i>B. FRAGILIS</i> FRA MOR TIL BARN OG PERSISTENS HOS BAKTERIEN	50
4.3	<i>B. FRAGILIS</i> OG IGE-SENSIBILISERING	52
4.4	GEN SOM KODER FOR 5,10-METYLENTETRAHYDROFOLAT REDUKTASE	53
4.5	FØRSLAG TIL VIDERE STUDIER	53
5.	KONKLUSJON	55

LITTERATURLISTE..... 56

VEDLEGG:

Vedlegg 1: Detaljert oversikt over *icd*-genotypene påvist ved sekvensering i denne studien

Vedlegg 2: PCR-amplifiserte TRS-produkter

Vedlegg 3: TRS1-alleler påvist i studien

Vedlegg 4: Krysstabeller for *icd*- og TRS-genotypene

Vedlegg 5: Delesjonsmønstre i sammenstillingen og TRS

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Høgskolen i Hedmark, avdeling for lærerutdanning og naturfag (LUNA), i perioden januar 2009 til juni 2010. Det kliniske materiale fra denne oppgaven kommer fra PACT studien Ledet av Roar Johnsen ved NTNU.

Jeg ønsker rette en spesielt stor takk til mine veiledere professor Knut Rudi og førsteamanuensis Robert Wilson for all veiledning, hjelp og støtte både i forbindelse med det praktiske arbeidet og ved oppgaveskrivingen. Jeg har hatt stort faglig utbytte av å være deres masterstudent.

Jeg vil også takke de ansatte ved bioteknologistudiet og Biohuset på Hamar, stipendiater og medstudenter for hjelp og støtte underveis.

Til slutt vil jeg takke min familie og mine barn for deres forståelse og oppmuntring underveis og en spesiell takk til min samboer Bjørn Vestheim for din enorme tålmodighet og støtte.

Hamar, juni 2010

Guro A. Bjerke

Norsk sammendrag

Vår tarm koloniseres av bakterier som har betydning for vår helse ved blant annet å være en barriere mot patogene mikroorganismer, å stimulere utviklingen av vårt immunforsvar og å tilføre næringsstoffer. Kolonisering av tarmen starter rett etter fødselen og *Bacteroides fragilis* er en av de første som koloniserer spedbarnstarmen. Studier har påpekt sammenhenger mellom tarmfloraen hos barn og utvikling av atopisk allergi.

I dette prosjektet har vi utviklet metoder for å påvise og typebestemme *B. fragilis* ved bruk av multilokus sekvenstyping (MLST) og tandemrepererende sekvenser (TRS). Vi har brukt disse metodene til genotyping av *B. fragilis* i avføringsprøver fra en kohort bestående av 93 mødre og deres barn. Kohorten er fra en immunologi- og mikrobiologi studie (IMPACT) startet i Trondheim i 2001. Av MLST-genene ble det valgt å bruke isocitrat dehydrogenase (*icd*)-fragmenter i genotypingen av IMPACT-materialet fordi disse viste størst polymorfisme ved undersøkelse i renkulturstammer av *B. fragilis*.

De viktigste funnene i prosjektet var at *B. fragilis* med genotype *icd-1* og TRS1 overføres fra mor til barn. Vi fant overraskende liten diversitet i kohorten ved bruk av *icd*-genotyping, da størsteparten av *B. fragilis* genotypene i kohorten var av type *icd-1*. Ved bruk TRS1-genotyping ble det påvist stor diversitet i mor/barn-prøver med stabile *icd-1*-genotyper og at bakterien var persistent etter kolonisering.

Vårt materiale er for lite til å kunne konkludere i forhold til koloniseringsmønstre av *B. fragilis* og sensibilisering hos barna. Det kan antydes ut fra resultatene at tidlig kolonisering med genotypen *icd-1* ble sett oftere hos barn som er sensibilisert ved 2-års alder og at større diversitet ved påvisning av flere TRS1-alleler ble sett oftere hos de som ikke var sensibiliserte ved 1- og 2-års alder.

Engelsk sammendrag (abstract)

Gut bacteria that colonize our intestine play important roles in human health: by protecting against pathogens (the barrier effect), stimulating the development of our immune system and by fermentating non-digestible dietary residues. Colonization starts immediately after birth and *Bacteroides fragilis* is one of the first bacteria to become established in the infant intestine. Studies have suggested connections between gut biota and the development of atopy.

In this project we have developed methods to verify and type *B. fragilis* using multilocus sequence typing (MLST) and tandem repeat sequences (TRS). We have used these methods for genotyping *B. fragilis* in fecal samples from a cohort of 93 mothers and their children. The cohort comes from the Immunology- and Microbiology study (IMPACT) started in Trondheim in 2001. From the MLST genes we chose to use isocitrate dehydrogenase (*icd*) fragments in genotyping of the IMPACT material because they displayed the greatest polymorphism when tested on pure culture of *B. fragilis* strains.

The most important finding in this project is that *B. fragilis* of genotype *icd-1* and TRS1 was transferred from mother to child. We found surprisingly little diversity in the cohort by the use of *icd* genotyping, which showed that most of the *B. fragilis* was typed as *icd-1*. TRS1 typing elucidated great diversity among mother/child samples with stable *icd-1* genotypes and showed that the bacteria were persistent after colonization.

Our material is too small to be conclusive regarding the potential connection between colonization patterns and IgE sensitization in the children. The results indicate that early colonization with *B. fragilis* genotype *icd-1* was seen more often in children that were IgE sensitized at 2 years of age, and assumedly that diversity by verifying more TRS1 alleles was seen more often in non-sensitized children at the age of 1 and 2 years.

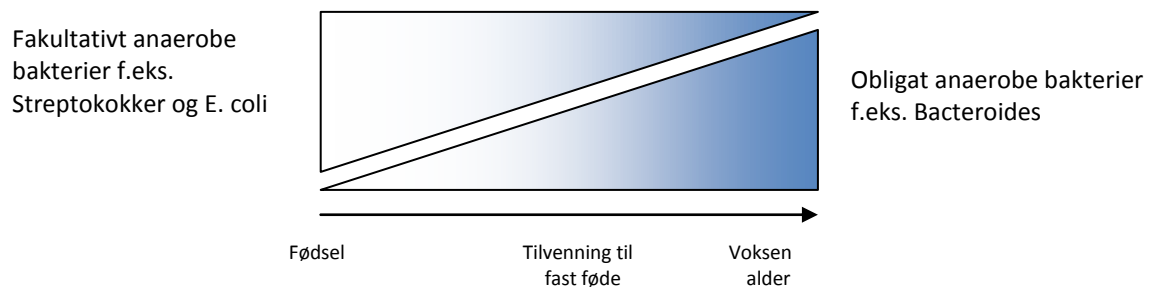
1. Innledning

1.1 Tarmflora

Tarmen er kolonisert av et enormt antall mikroorganismer, der størsteparten utgjøres av bakterier. Det er anslått at tarmfloraen er sammensatt av rundt 10^{14} bakterieceller. Dette antallet tilsvarer 10 ganger så mange som antall celler i menneskekroppen (Bengmark 1998; Guarner and Malagelada 2003; Hattori and Taylor 2009). Tarmfloraen innehar viktige funksjoner for menneskets helse; Ved å være en barriere mot patogene mikroorganismer, stimulere utviklingen av immunsystemet og en metabolsk funksjon. I metabolismen bidrar den til produksjon av viktige næringsstoffer og tilgjengeliggjøring av energi ved fermentering av fibre som er ufordøyelige for mennesker, anaerob omsetning av peptider og proteiner som gir kortkjedede fettsyrer, produksjon av K-vitamin og absorpsjon av ioner som kalsium, magnesium og jern (Guarner and Malagelada 2003; Hooper and Gordon 2001; MacDonald and Gordon 2005; Xu and Gordon 2003).

Sammensetningen av tarmfloraen varierer mellom individer. Fosteret blir eksponert for de første mikrobene under fødselen. De vaginale bakteriene som barnet kommer i kontakt med i fødselskanalen etablerer seg vanligvis ikke i spedbarnets tarm, men bakterier fra morens tarmflora er en kilde for kolonisering i tarmen hos nyfødte. Etablering av tarmfloraen er en kompleks prosess som påvirkes både av samspill mellom mikrobene og verten og av ytre og indre faktorer. Viktige faktorer er bakterier som finnes i miljøet rundt barnet og sammensetning av morens tarmflora, fødselsmåte, kosthold, immunresponser hos verten og mikrobielt samspill (Adlerberth et al. 1991; Berg 1996; Cebra 1999; Cummings et al. 1996; Fanaro et al. 2003; Fryklund et al. 1992; Mackie et al. 1999; Murray et al. 2005; Savage 1977; Serino et al. 2009; Tannock et al. 1990).

Tarmfloraen hos voksne består av klimakssamfunn karakterisert av stor tetthet av bakterier og arter som er bemerkelsesverdig stabilt til stede i tarmen av (Berg 1996). Ved fødselen blir tarmen først kolonisert av fakultative anaerobe bakterier mens hos voksne er det 100 – 1000 ganger flere anaerobe bakterier enn det er aerobe (Figur 1).



Figur 1 Tarmen hos spedbarn koloniseres først av fakultativt anaerobe bakterier inkludert streptokokker og Escherichia coli (E. coli). Ved tilvenning til fast føde skjer det et skifte i floraen til større andel obligate anaerobe bakterier som Bacteroides arter. Figuren er modifisert fra Sears (2005).

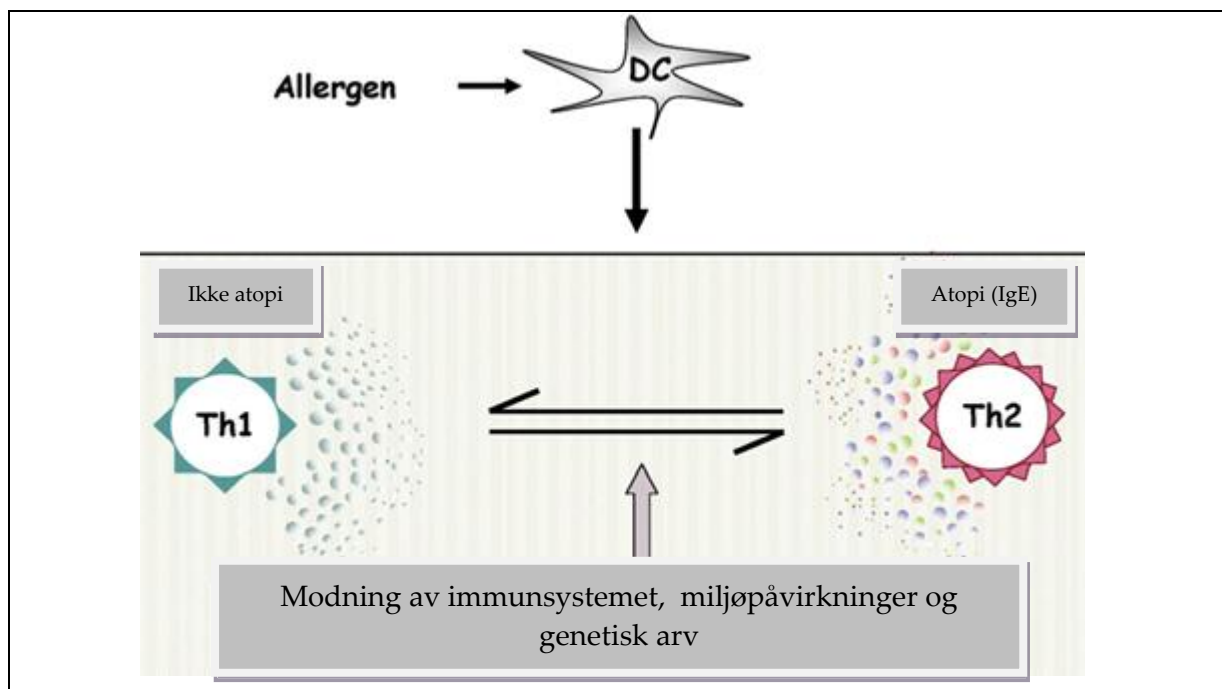
Vårt forhold til tarmfloraen blir ofte beskrevet som kommensalisme, der en den ene parten (tarmbakteriene) har fordeler av samlivet og den andre parten verken har fordeler eller ulemper. Kunnskaper om tarmbakterienes bidrag til vertens helse gjør at forholdet heller bør betegnes som en symbiose eller mutualisme, der samlivet gir begge organismene fordeler (Backhed et al. 2005; Hooper and Gordon 2001).

Struktur og sammensetning av tarmfloraen reflekterer naturlig seleksjon både i forhold til bakterienes innbyrdes konkurranse og tilpasning til tarmens skiftende miljø og i forhold til effekten de har på vertens helse. Dersom tarmfloraens vekst og sammensetning går på bekostning av verten, vil det ødelegge deres eget habitat (Backhed et al. 2005). I forsøk som er analoge med menneskets tarm, men som mangler vertsseleksjon, har bakteriepopulasjoner svingt voldsomt ved oppblomstring av subpopulasjoner (Fernandez et al. 2000). Til sammenligning er bakteriepopulasjoner i tarmen bemerkelsesverdige stabile innen et individ. Dette kan innebære at det finnes mekanismer som undertrykker oppblomstring av undergrupper og/eller som fremmer bakterier gunstige for verten (Zoetendal et al. 1998).

Samspeillet mellom verten og tarmbakteriene som fører til mutualismen er uklar. Bakterier som koloniserer tarmkanalen gjør det til tross for at verten utvikler spesifikt immunforsvar (Bayne 2003; Krinos et al. 2001).

1.2 Atopisk allergi

Immunsystemet skal både uskadeliggjøre farlige stoffer som kommer inn i kroppen og opprettholde toleranse for antigener (molekyler som kan framkalle immunologisk respons) fra næringsstoffer og fra kommensale bakterier. Atopisk allergi er en immunologisk reaksjon som fører til produksjon av antistoffet immunoglobulin E (IgE). Dette utløses av allergener (ikke-parasittiske antigener). Hvite blodceller er en del av kroppens immunforsvar og består blant annet av ulike grupper T- og B-lymfocytter som begge kan binde til seg og aktiveres av ulike antigener. T-celle responser rettet mot allergener utvikles tidlig i livet. En grunnleggende ide i hygienehypotesen (se forklaring under) er at Th1 immunitet fra økt eksponering av mikrobielle produkter hemmer utvikling av Th2 respons mot allergener. Forhøyet produksjon av Th2 celler bidrar til IgE-sensibilisering og videre utvikling av atopisk allergi (Figur 3) Måling allergenspesifikke IgE-verdier kan brukes til påvisning av sensibilisering (Maggi 1998; Neurath et al. 2002; Pipe et al. 2009; Rolland et al. 2009; Simons 2009; Woodfolk 2007).

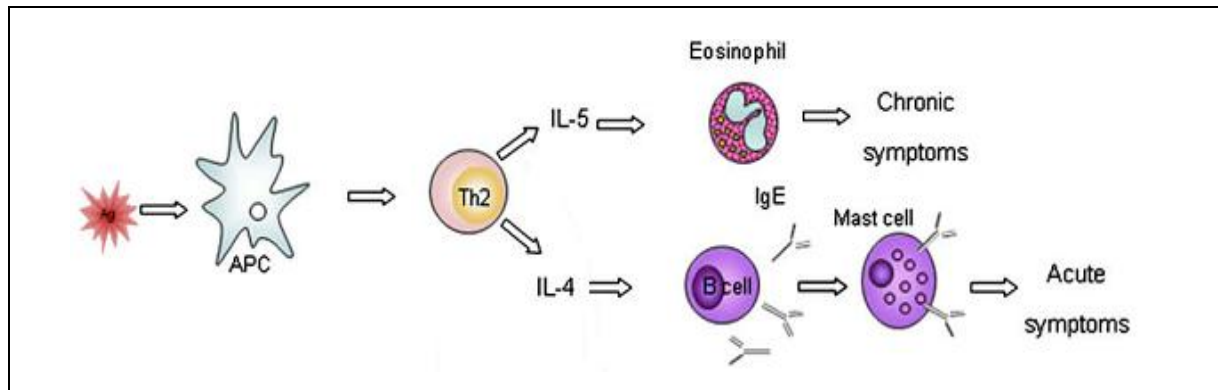


Figur 2: Allergener tas opp av dendrittiske celler i lymfatisk vev i tarmslimhinnen. Videre interaksjon i kroppens forsvarssystem og regulerende mekanismer som avgjørende for produksjon av Th2- eller Th1-celler er avhengig av modning av immunsystemet, genetisk arv og miljømessige faktorer. Th1- og Th2-celler er hjelpeceller i immunforsvaret. Figuren er modifisert etter Woodfolk (2007).

Polysakkarid A (PSA) fra *B. fragilis* kolonisering fremmer utvikling av immunsystemet ved å rette opp ubalanse mellom Th1 og Th2 (Mazmanian et al. 2005).

Store mengder data fra undersøkelser gjort i løpet av de siste 40 årene tyder på at astma og atopi (allergisk predisposisjon) har økt dramatisk i vesten, men ikke i utviklingsland. Epidemiologiske studier antyder forskjeller i sammensetningen av tarmfloraen hos mennesker med og uten atopi (Bjorksten et al. 1999; Kalliomaki et al. 2001). Dette fenomenet har gitt opphav til flere forskjellige forklaringsmodeller blant annet hygienehypotesen til David Strachan som sier at lavere eksponering av smittsomme mikroorganismer tidlig i livet (blant annet på grunn av bruk av antibiotika, vaksinasjon og bedre sanitære forhold) fører til avvikende immunresponser mot ufarlige antigener senere i livet (Mazmanian and Kasper 2006). En alternativ hypotese satt fram av Gary Huffnagle og Mairi Noverr (2005) sier at en balansert mikroflora bidrar positivt til vår helse, mens forstyrrelser i antallet og artene på grunn av endringer i livsstilen de siste tiårene, kan gjøre enkelte individer mer mottagelige for allergiske sykdommer.

Tarmslimhinnen er hele tiden i kontakt med antigener i omgivelsene og må hele tiden tilpasse hensiktsmessige reaksjoner på potensielt farlige stoffer. Kolonisering av tarmen hos nyfødte er en kritisk fase i denne prosessen. Avbrytelser i dannelsen av denne floraen kan ha langvarige helsekonsekvenser som eksem, allergi og tarminflammasjoner, mens etablering av spesifikke arter kan redusere tilfellene av disse sykdommene (Bottcher et al. 2003; Braun-Fahrlander et al. 2002; Conroy et al. 2009; Mazmanian and Kasper 2006; Sepp et al. 1997).



Figur 3: Hos en allergisk person vil antigenpresentasjon i APC føre til at T-celler differensieres til Th2 celler. Th2-celler vil ved produksjon av interleucin (IL)-4 og IL-13 aktivere B-celler til å produsere IgE. IgE-antistoffer vil fremme utskillelse av histaminer som gir en inflammasjonsreaksjon. Th2-cellens utskillelse av IL-5 tiltrekker og aktiverer eosinofile celler. Disse produserer proteiner som skader epitelceller og fører til en kronisk allergisk reaksjon. Ag: antigen, APC: antigenpresenterende celle. Figuren er modifisert etter Pipe et al. (2009).

Tidligere studier har påpekt en sammenheng mellom tarmfloraen hos spedbarn og utvikling av atopisk allergi (2001; Kalliomaki et al. 2001; Penders et al. 2007; Sjogren et al. 2009).

1.3 *Bacteroides fragilis*

Artene i *Bacteroides*-slekten er av de mest fremherskende anaerobe bakteriene og utgjør ca 25 % av tykktarmsfloraen. De er gram-negative staver, danner ikke sporer og er motstandsdyktige mot gallesyrer. Taksonomisk inndeling av *Bacteroides*: Bacteria, Bacteroidetes, Bacteroidetes, Bacteroidia, Bacteroidales, Bacteroidaceae, *Bacteroides* (slekt). *Bacteroides* slekten inneholder mange arter. Her er nevnt arter som tilhører *B. fragilis* gruppen: *Bacteroides fragilis*; *Bacteroides thetaiotaomicron*; *Bacteroides ovatus*; *Bacteroides distasonis*; *Bacteroides vulgates*; *Bacteroides uniformis*; *Bacteroides eggerthii* (Appelbaum et al. 1991).

Bacteroides kan overføres fra mor til barn under vaginal fødsel og blir dermed en del av menneskets flora fra et tidlig stadium (Reid 2004). *Bacteroides*-arter opptrer ca 10 dager etter fødselen og opprettholder et komplekst og vanligvis gunstig forhold med verten når den befinner seg i tarmen (Backhed et al. 2005; Mazmanian et al. 2005; Simon and Gorbach 1984; Xu and Gordon 2003). Disse artene har stor evne til å utnytte næringsstoffer som er

tilgjengelige og fermenterer sukkerarter og polysakkarider i tykktarmen (Flint et al. 2008; Hooper et al. 2002; Salyers et al. 1977; Sonnenburg et al. 2005; Wexler 2007).

Antall isolerte *Bacteroides fragilis* er 10 – 100 ganger lavere enn for andre *Bacteroides* arter i tarmen. Den er likevel den oftest isolerte arten fra kliniske prøver og blir regnet som den mest virulente *Bacteroides* arten (Finegold 1995; Gibson and Macfarlane 1988; Myers et al. 1990; Wexler 2007). *B. fragilis* er tilpasset overlevelse i tarmkanalen hos pattedyr og har ingen annen nisje i miljøet (Pamer 2007).

B. fragilis har mange tilpassninger som er viktige i den bakterielle koloniseringen av tarmen. Den kan modulere graden av immunrespons mot sine overflatemolekyler ved at de kan produsere minst 8 distinkte overflatepolysakkarider. Produksjonen kan reguleres ved reversibel inversjon av deosyribonukleinsyre (DNA)-segmenter som inneholder promoterer. Ulike kombinasjoner av kapselpolysakkarider gir bakterien et stort repertoar i overflatediversitet (Krinós et al. 2001). *B. fragilis* lever i nær tilknytning til tarmslimhinnene og det er høyere forekomst av denne bakterien i tilknytning til slimhinnene enn for de andre artene av *Bacteroides*. Dette tyder på en større evne til å adhere til overflateepitelet i tarmen, og denne egenskapen kan være knyttet til kapseldannelsen (dannelsen av overflatepolysakkarider) (Namavar et al. 1989). Sammenlignet med *Bacteroides thetaiotaomicron* som er mer konsentrert i hulrommet i tarmen, finner Kuwahara et al. (2004) interessante forskjeller i ellers forholdsvis like genomer. *B. thetaiotaomicron* har mer fremtredende genamplifikasjon for polysakkaridutnyttelse, mens *B. fragilis* har flere genetiske systemer for å endre overflatestrukturer som kan bidra til å unngå angrep fra vertens immunforsvar (Kuwahara et al. 2004). Det er vist at mutante bakterier uten kapsel raskt blir utkonkurrert i tarmen. Data indikerer også at evnen disse organismene har til å syntetisere multiple fasevariable polysakkarider er en viktig biologisk egenskap for langvarig overlevelse i den komplekse og konkurransepregede tarmøkosystemet (Coyne et al. 2008). Det er identifisert en alternativ reaksjon for å gjenopprette kapselproduksjon og regulere uttrykk av overflatepolysakkarider. Bakterier som kan regulere og alle overflatepolysakkaridene sine utkonkurrerer mutante bakterier som bare kan uttrykke ett overflatepolysakkarid. (Liu et al. 2008).

B. fragilis har O-glykosyleringssystemer som antas å være viktige for bakteriens kolonisering i tarmen. Det er ikke observert uglykosylerte former for villbakterier og O-glykosyleringssystemene har vist seg å være konserverte innen *Bacteroides* slekten.

Adderingen av polysakkarider til proteiner har betydning for blant annet proteinfoldingen og i protein-protein interaksjoner. (Fletcher et al. 2009).

Bakteriociner er antibakterielle peptider eller små proteiner som skilles ut av bakterier for å hemme konkurrenter. Analyse av *B. fragilis* isolert fra tarmen har utsondret store mengder bakteriociner, mens de selv var resistente mot bakteriociner skilt ut av andre *B. fragilis* stammer. Dette antas å være en mekanisme som reduserer konkurransen mellom stammer som okkuperer samme økologiske nisje (Pumbwe et al. 2006).

For *Bacteroides* har tidligere studier vist at kolonisering i spedbarnstarmen ikke var assosiert med atopisk allergi (Bjorksten et al. 1999; Penders et al. 2007; Sepp et al. 2005), mens andre studier har pekt på en mulig sammenheng mellom *B. fragilis* og astma (Vael et al. 2008) og *B. fragilis* gruppen og pollen allergi (Odamaki et al. 2007).

B. fragilis stammer hos mor kan overføres til barnet under fødselen. Bakterien opprettholder normalt et gunstig forhold til verten så lenge den befinner seg i tarmen og den antas å være viktig i forbindelse utvikling av barnets immunforsvar. Foreløpig er det få studier som har undersøkt koloniseringsmønstrene og diversiteten til denne bakterien og i hvilken grad barnet koloniseres av de samme bakteriestammene som sin mor. Det vil derfor være nødvendig å utvikle genetiske verktøy for både påvisning av *B. fragilis* i prøver med blandingssekvenser og samtidig undersøke diversiteten til bakterien.

1.4 Genetiske markører / genotyping

Utvikling av molekylærgenetiske markører har gått raskt i løpet av siste 10-årene. To former for sekvensbaserte markører, enkelt nukleotid-polymorfisme (SNP) og tandem repeterende sekvenser (TRS) er dominerende innen moderne genetisk analyse. TRS (i noen tilfeller kalt mikrosatellitter) består av flere gjentakende repetisjonsenheter etter hverandre og alleler skilles fra hverandre etter lengden på de repeterende enhetene (Duran et al. 2009). I mikrobiologi brukes ofte også multilokussekvensstyping (MLST). MLST- og SNP-teknikker er basert på komparative sekvenssammenstillinger av husholdningsgener. Nye bruksområder tar i bruk etablerte eller nylig utviklede bioinformatikk applikasjoner og databaser som muliggjør raske og målrettede søk etter spesifikke markører (Albuquerque et al. 2009).

1.4.1 Multilokus sekvenstyping (MLST)

MLST karakteriseres ved SNP-polymorfisme. SNP beskriver polymorfisme der punktmutasjoner som gir opphav til forskjellige alleler. Allelene inneholder alternative baser i en gitt nukleotidposisjon innen et lokus. Teoretisk sett kan én SNP i et lokus gi fire forskjellige alleler som hver inneholder en av de fire basene: A, T, C eller G. I praksis er SNPer oftest bi-alleliske, der allelet oftest inneholder en av de to pyrimidinene (C/T) eller en av purinene (A/G) (Liu and Cordes 2004).

I et genom er SNP er den vanligste formen for genetisk variasjon. Per definisjon skal SNP-allelet finnes hos minst 1 % av populasjonen, men i praksis brukes det også om insesjoner, delesjoner og variasjoner funnet i mindre enn 1 % av populasjonen. En vanlig måte å finne SNPer på er ved sekvensering av PCR-amplifiserte DNA-fragmenter. Metoden er veldig pålitelig, men relativt kostbar og arbeidskrevende da spesifikke primere må konstrueres og et stort antall sekvenser må amplifiseres, sekvenseres og sammenstilles i gensekvenser for påvisning av nye SNPer (Liao and Lee 2010).

MLST er en robust og portabel typingsmetode der nukleotidsekvenser fra multiple loci som koder for husholdningsgener eller fragmenter av husholdningsgener undersøkes for genetisk diversitet. Metoden brukes mye til molekylær karakterisering av patogene bakterier (Maiden 2006). Husholdningsgener er gener som er involvert i grunnleggende funksjoner i cellen. Genene uttrykkes konstitutivt da produktene er nødvendig for cellens overlevelse.

Lengden på DNA-fragmentene som brukes ved multilokus sekvenstyping er på rundt 450 - 500 nukleotider, noe som muliggjør nøyaktig sekvensering av begge DNA-trådene ved bruk av et enkelt primerpar per husholdningsgen. Denne fragmentlengden gir som oftest også tilstrekkelig variasjon for å kunne identifiserer mange forskjellige alleler innen en populasjon (Enright and Spratt 1999).

MLST har blitt utviklet for flere patogene bakteriearter som for eksempel *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* og *Streptococcus pyogenes*. Hver unike sekvens gis et unikt og vilkårlig allelnummer. Kombinasjonen av allelnummer i for eksempel sju loci kalles for allelisk profil. Hver unike allelprofil, sekvenstypen, gis på tilsvarende måte et vilkårlig nummer etter hvert som de oppdages (Maiden et al. 1998).

MLST data er fritt tilgjengelig via databaser over internett, noe som sikrer rask tilgang og utveksling av informasjon (Chan et al. 2001). Nye studier kan bruke tidligere ervervede data og tilføre sine nye funn (Taylor and Fisher 2003).

1.4.2 Tandemrepeterende sekvenser (TRS)

Tandem repeterende sekvenser (TRS) er polymorfe mellom individer og kan derfor brukes til DNA-genotyping. Slike sekvenser er funnet i DNAet fra alle organismer som har blitt genomsekvansert og det er vist høy mutasjonsfrekvens hos både prokaryoter og eukaryoter (Bichara et al. 2006). Mutasjonsfrekvenser for TRS varierer mellom arter. For *E. coli* og *Yersinia pestis* ligger den mellom 10^{-6} – 10^{-4} (Vogler et al. 2006; Vogler et al. 2007). Den generelle mutasjonsfrekvensen i bakterier ved målinger og beregninger satt til rundt 10^{-10} per nukleotid per replikasjon (Drake et al. 1998; Ochman et al. 1999) En vidt akseptert forklaringsmodell for den høye mutasjonsfrekvensen i repeterende DNA motiver er at det under polymerasens bevegelser (eller pauser) dannes sekundærstrukturer på templattråden eller på tråden som syntetiseres. Dersom hårnålsstrukturer dannes i etternøler-templattråden (lagging strand) og forbigangers av polymerasen dannes delesjon av TRS, mens dersom hårnålsstruktur dannes i Okazaki fragmenter i den nylig syntetiserte tråden kan det føre til addisjon av TRS. Det antas at hårnålsstrukturer dannes oftest i etternølertråden, men de kan også forekomme i den ledende tråden (Parniewski and Staczek 2002).

1.4.3 Genetiske markører i *Bacteroides fragilis*

I litteraturen finnes det lite informasjon om genetisk diversitet hos den mutualistiske tarmbakterien *B. fragilis* i forbindelse med koloniseringsmønstre i tarmen. Det er ervervet få genetiske markører for *B. fragilis* som både identifiserer arten og som tillater undersøkelse av diversiteten hos bakterien. I MLST-databaser finnes det foreløpig ingen sekvenser for *B. fragilis*. En studie fra Japan og Korea har undersøkt struktur og distribusjon av virulensrelaterte gener hos *B. fragilis* ved konstruksjon av genspesifikke primere og sekvensering de PCR-amplifiserte genene (Ko et al. 2009). Denne studien ble publisert etter at vi startet vårt prosjekt. Så vidt vi vet er det ikke konstruert noen markører for genotyping ved hjelp av TRS hos *B. fragilis*. I denne oppgaven har vi derfor utviklet metoder for å både

påvisning og undersøkelse av diversiteten hos *B. fragilis* og vi har brukt disse metodene for genotyping i en kohort bestående av mødre og deres barn.

1.5 Målsetninger

Hovedmålsetningen for prosjektet er å finne ut i hvilken grad *Bacteroides fragilis* i tarmen overføres fra mor til barn. Forståelse av arvelighet at tarmbakterier er viktig fordi tarmbakterier har stor betydning på utforming av vårt immunforsvar. Årsaken til at vi valgte *B. fragilis* er at denne bakterien er viktig i koloniseringen av tarmen til spedbarn.

Spørsmålene som blir besvart i oppgaven er som følger:

- Hvor stor er den genetiske diversiteten hos *B. fragilis* som koloniserer spedbarnstarmen
- Er det den samme stammen av *B. fragilis* som finnes i mor og barn
- Hvor stabil er *B. fragilis* over tid i spedbarnstarm
- Finnes det en korrelasjon mellom *B. fragilis* koloniseringsmønster og utvikling av immunforsvar

Spørsmålene vil i hovedsak bli besvart ved bruk av dyrkningsuavhengig genotyping av *B. fragilis* direkte i avføring. Teknikkene som er valgt er DNA sekvensering av husholdningsgener, samt kapillærelektroforese for analyse av tandemrepererende sekvenser (TRS).

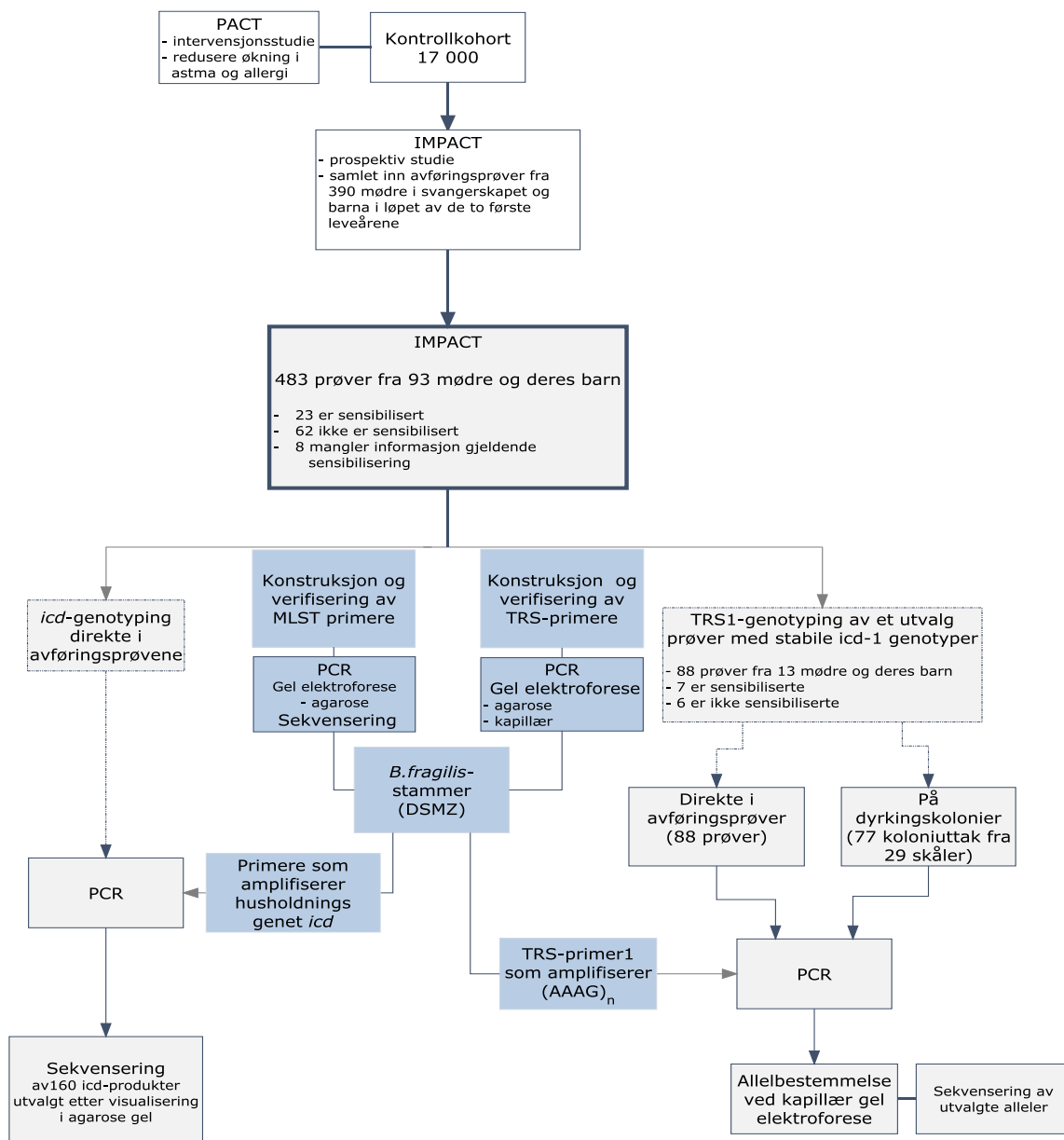
2. Materialer og metoder

2.1 Prøvemateriale

Prøvematerialet i denne oppgaven består av 483 avføringsprøver fra til sammen 93 mødre og deres barn i forbindelse med Immunologi- og Mikrobiologistudien (IMPACT) som ble startet i Trondheim i 2001. Formålet med IMPACT studien var å studere sammenhengen mellom mikroflora i tarmen og utviklingen av immunforsvaret og atopisk sykdom i en normal barnepopulasjon. Avføringsprøver ble tatt fra mødrene rundt svangerskapsuke 13 og 38, og fra de nyfødte barna ved 1,5 dag, 4 dager, 7 dager, 10 dager, 4 måneder, 1 år og 2 år. Blodprøver ble tatt ved fødsel, 4 måneder, 1 år og 2 år. Designet til IMPACT er beskrevet i detalj i Øyen et al. (2006).

IMPACT studien er en tilleggsstudie til Barneallergistudien i Trondheim, Prevention of Atopy among Children in Trondheim (PACT). PACT ble startet i 2000 med målsetning om å redusere økning i forekomst av astma og allergi. PACT-studien er en intervensjonsstudie der tiltak for å øke inntak av omega-3-fettsyrer, redusere fuktbelastning i boliger og redusere tobakkseksposering for fostre og små barn ble iverksatt og vurdert. Deltakerne i IMPACT-studien ble rekruttert fra hovedstudiens kontrollkohort (n = 17 000) og totalt ble det samlet inn prøver fra 390 mødre i løpet av svangerskapet og fra barna de to første leveårene (Storrø et al. 2006).

En oversikt over prøvematerialet samt genotypingsmetoder som har blitt utviklet og brukt til analyse av prøver i dette prosjektet er oppsummert i Figur 4.



Figur 4: Oversikt over prøvematerialet, metodeutvikling og genotypingsteknikker brukt i oppgaven. De hvite rubrikkene gir en oversikt over hvor prøvematerialet i studien er hentet fra. De blå rubrikkene gir en oversikt over metodene som er utviklet i forbindelse med dette prosjektet. De grå rubrikkene viser utvalget av prøver og genotypingsteknikkene brukt på prøvematerialet i denne oppgaven.

2.1.1 Isolering av DNA

Til analyse av husholdningsgenene, ble det mottatt ferdig isolert DNA-løsning fra avføringsprøvene. Disse prøvene er renses ved bruk av magnetiske kuler i overensstemmelse med en optimalisert og automatisert protokoll (Skanseng et al. 2006).

Til analyse av tandemrepeterte sekvenser (TRS) ble DNA fra avføringsprøver isolert på nytt, henholdsvis fra sju barn som var sensibiliserte og seks barn som ikke var sensibiliserte ved 2-års alder og som hadde fått påvist *B. fragilis* i avføringsprøver fra både mor og barn. Til DNA-isolasjonen ble det brukt QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) og protokollen for *isolasjon av DNA fra avføring for patogen deteksjon* ble fulgt. Det ble pipetert ut 200 µl fra avføringsprøvene da disse var i flytende form på grunn av at de er oppbevart i Cary Blair transport medium (7,7 mM Na₂HPO₄, 13 mM C₂H₃NaO₂S, 90 mM NaCl, 0,8 mM CaCl₂, pH 8,4). Prøvene ble lysert i ASL buffer ved 95 °C i 5 minutter. Etter første sentrifugering ble hemmestoffer i supernatanten adsorbent til InhibitEX tabletter og etter pelletering av hemmestoffer i ved sentrifugering ble supernatanten pipetert forsiktig opp. Proteiner i supernatanten ble brutt ned i en homogen løsning av supernatant, Proteinase K og AL-buffer ved 70 °C i 10 minutter. Etanol (96 – 100 %) ble tilsatt lysatet for å bedre bindingforholdene og lysatet applisert til QIAamp kolonnen. Buffer AW1 og AW2 ble tilsatt i to separate vasketrinn, og det ble sentrifugert før, mellom og etter vaskingen. AE-buffer ble applisert direkte på den tørre QIAamp membranen og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter før sentrifugering av eluatet. Sentrifugering ble utført ved 12 054 x g (Beckman Microfuge Lite) og sentrifugeringstidene ble økt med faktoren 1,8 (pga sentrifugen ikke kommer opp i 20 000 x g).

Bakteriecelle-pellet fra fem stammer *B. fragilis* fra Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (DSMZ) (stamnummer: 9671, 9668, 2151, 1396, 9669) ble rehydrert i 500 µl TE-buffer. Til DNA-isolasjonen ble det brukt DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) og prosedyre i protokollene for *forbehandling av gram-negative bakterier etterfulgt av rensing av alt (samlet) DNA fra dyrevev (fra punkt 2)* ble fulgt. Fra de rehydrerte bakteriestammene (DSMZ) ble det tatt ut 80 µl av celledensjonene og celler ble høstet ved sentrifugering etterfulgt av resuspending av cellepelletene i ATL-buffer. Celledensjonen ble tilsatt Proteinase K, vortexet grundig og lysert ved 56 °C i 80 minutter i en termomikser (Eppendorf Thermomixer 5436, Hamburg, Tyskland). AL-buffer og etanol (96 – 100 %) ble tilsatt lysatet og blandingen ble applisert til DNeasy Mini spin kolonnen for binding til membranen. Vasketrinnene med sentrifugering og eluering ble utført som beskrevet tidligere (for QIAamp DNA Stool Mini Kit).

For isolering av DNA fra dyrkingskolonier av *Bacteroides fragilis* gruppen, ble det brukt PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Foster City, USA). Det ble tatt ut 100 µl fra hver enkeltkoloni løst i Cary Blair transport medium og protokollen for *preparering og ekstrahering av prøver for bakteriell- og sopp testing* ble fulgt. Celler fra cellesuspensjonen ble høstet ved sentrifugering. For frigjøring av DNA i løsningen og inaktivering av stoffer som kan hemme PCR-amplifisering ble det tilsatt Prep Man Ultra, vortexet og inkubert ved 100 °C i 10 minutter. Etter sentrifugering ved 13 000 x g i 3 minutter ble det tatt vare på 50 µl av supernatanten.

DNA-konsentrasjonene ble målt ved absorpsjon av ultrafiolett lys på 260 nm med et spektrofotometer (NanoDrop ND, NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). DNA fra avføringsprøvene ble fortynnet med AE-buffer (brukt til eluering av DNA) til en sluttkonsentrasjon på mellom 5 og 10 ng/µl. Etter isolering ble DNA templatet oppbevart ved -20 °C.

2.1.2 Dyrking av bakterier

Det ble utført dyrkingsforsøk på *Bacteroides fragilis* gruppe selektivt medium (Bacteroides Bile Esculin Agar with Amikacin, BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Tyskland) for avføringsprøvene utvalgt til TRS-analyse. Fra hver prøve ble 100 µl platet ut og inkubert ved 37°C i 48 timer. Inkubasjonen foregikk under anaerobe forhold skapt av OXOID AnaeroGen (OXOID Ltd., Hampshire, England) som tar opp oksygenet i den lukkede beholderen under utvikling av karbondioksid. Enkeltkolonier ble så plukket og overført til 200 µl Cary Blair transport medium og fryst ved -80 °C.

2.2 Konstruksjon av primere

Primere ble konstruert for å amplifisere og påvise *B. fragilis* og for om mulig å kunne skille undergrupper (stammer) av *B. fragilis* fra hverandre. I denne oppgaven har CLC Main Workbench (versjon 4.1.1) (CLCbio, Aarhus, Danmark) har blitt brukt til konstruksjon av både MLST- og TRS-primere og analyser av sekvenserte fragmenter.

2.2.1 MLST primere

For konstruksjon av MLST-primere ble det tatt utgangspunkt i de sju publiserte MLST-genene for *E. coli* (Wirth et al. 2006). Genprodukter fra husholdningsgenene er som følger: *adk*, adenylat kinase; *gyrB*, DNA gyrase subenhet B; *mdh*, presumptiv malat dehydrogenase; *recA*, rekombinase A; *purA*, adenylosukkinat syntetase; *icd*, presumptiv isocitrat dehydrogenase (NADP) og *fumC*, fumarate hydratase (fumarase C). Videre ble MLST-genområdene *icd*, *gyrB*, *adk*, *mdh*, *purA* og *recA* for de genomsekvenserte og publiserte *B. fragilis* NCTC 9343, med aksesjonsnummer NC 003228 og *B. fragilis* YHC46, med aksesjonsnummer NC 006347 funnet i nukleotiddatabasen ved National Center for Biotechnology Information (NCBI). MLST-genområdene ble brukt som templat for konstruksjon av Forward og Reverse primere og de forhåndsinnstilte parameterne i programvaren ble anvendt. (Primerlengder mellom 18 – 22 nukleotider, G/C innhold mellom 40 – 60 %, maksimal selvhybridisering på 18, maksimal selvhybridisering i endene på 8 og maksimal sekundærstruktur på 16. Smeltetemperaturen ble satt til 48 – 64 °C).

Primerparene for hvert av husholdningsgenene med best score ble undersøkt for spesifisitet ved bruk av Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) under NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Videre ble de testet ut på fem *B. fragilis* stammer fra Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (stamnummer: 9671, 9668, 2151, 1396, 9669) (DSMZ, Braunschweig, Tyskland). Optimal hybridiseringstemperatur for PCR ble testet ut og valgt på bakgrunn av tydelige bånd uten dannelse av primer-dimer ved visualisering av PCR-produktene i 1,5 % agarose gel. PCR-produktene ble også sekvensert og verifisert ved sammenstilling med gjeldende husholdningsgener fra de to genomsekvenserte *B. fragilis* NCTC 9343 (aksesjonsnummer NC 003228) og *B. fragilis* YCH46 (NC 006347).

2.2.2 TRS-primere

For å finne TRS i *B. fragilis* ble mreps web server (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/mreps.php>) brukt. Mreps er en programvare for å identifisere tandem repetisjoner i en DNA sekvens. Dette programmet har ingen begrensinger på størrelsen til det repeterte mønsteret og kan derfor brukes for å påvise alle typer av tandem repetisjoner (Kolpakov et al. 2003). De to genomsekvenserte og annoterte *B. fragilis* NCTC 9343 (NC 003228) og *B. fragilis* YCH46 (NC 006347) ble analysert av programmet med feilmargen satt til null og uten noen filtrering

for maksimal eller minimal lengde av den tandem repeterende sekvensen eller av antall repetisjoner. Etter analysering presenterer programmet en liste over tandem repetisjoner som ble identifisert, med plassering i templatet, antall nukleotider i sekvensen, antall repetisjoner og eventuelt en verdi for feilmargin. TRSene funnet av mreps i de to anntorete *B. fragilis* stammene ble videre sortert ved bruk av excel for å finne samsvarende områder med tandemrepetisjoner.

De flankerende områdene til samsvarende TRSer som ble funnet i de to *B. fragilis*-stammene ble brukt som templat for konstruksjon av TRS-primere. Samme forhåndsinnstilte parametre ble brukt, men med smeltetemperatur satt til 55 – 58 °C og primerlengder mellom 17 – 22 nukleotider.

2.3 PCR-analyse

PCR reaksjoner ble utført i 25 µl reaksjonsvolum med; 1 µl DNA-løsning som templat, 1x Phusion HF-buffer (gir 1,5 mM MgCl₂) (Finnzymes, Espoo, Finland), 200 µM av hver deoksynukleosid trifosfat (dNTP) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 0,2 µM av hver primer (Forward og Reverse) (Invitrogen, Oregon, USA), 0,02 U/µl Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes).

For husholdningsgenene ble følgende amplifiseringsprotokoll benyttet: En første denaturering ved 98 °C i 10 sekunder, etterfulgt av 35 sykler med 98 °C i 10 sekunder, 54 °C i 30 sekunder, 72 °C i 30 sekunder, og en etterfølgende forlengelse ved 72 °C i 7 minutter. For hypervariable repetererte områder ble det benyttet samme amplifiseringsprotokoll, men med hybridiseringstemperatur på 53 °C og med 6-FAM merkede Forward primere.

Amplifikasjonsproduktene fra husholdningsgenene og hypervariable repetererte områder ble visualisert og sammenlignet ved analyse på 1,5 – 2 % agarose gel (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) tilsatt 0,5 µg/ml etidiumbromid (EtBr) i tris-acetat-EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA). (Ved separasjon av fragmentene i 130 minutter ble EtBr tilsatt i samme konsentrasjon i buffer). I gelene ble det brukt en 100 basepar molekylvektsstandard (Thermo Scientific) som størrelsesmarkør. Fragmentene ble undersøkt med en konstant spenning på 80 - 90 V i 35 – 130 minutter og visualisert med Kodak Image

Station (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) med UV-lys. Fem – 10 µl av PCR-produktet ble tilsatt 1 - 2 µl appliseringsfarge (loading dye) (0,25 % bromfenolblått, 0,25 % xylene cyanol, 30 % glyserol) som gir prøvene både tyngde og farge, noe som forenkler påsetting av prøver og DNA migrasjonen kan følges underveis.

2.4 Sekvensering av PCR-produkter

Sekvensering ble brukt til for å verifisere amplifikasjonsproduktene fra husholdningsgenene og TRS-områdene og til MLST-genotypingen av prøvematerialet.

For å fjerne enkelttrådede uinkorporerte oligonukleotider (DNA primere) før sekvenseringen ble 0,5 µl PCR-produkt behandlet med 0,4 U Exonuclease I (BioLabs, New England, Ipswich, MA, USA), 1x BigDye sequencing buffer (Applied Biosystems, Foster City, USA) i et volum på 5 µl. Prøvene ble inkubert ved 37°C i 30 minutter, med påfølgende 80°C i 15 minutter for å inaktivere nukleasen. Til sekvenseringsreaksjonene ble de Exo I-behandlede PCR-produktene tilsatt 0,5 µl 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems, Foster City, USA), 1,0 µl BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems), 0,32 µM Forward eller 0,32 µM Reverse sekvenseringsprimer i et volum på 10 µl. Både Forward og Reverse sekvenser ble sekvensert.

Sekvenseringsreaksjonen foregikk under følgende forhold: 96 °C i 1 minutt, etterfulgt av 25 syklener med 95 °C i 15 sekunder, 50 °C i 5 sekunder, 60 °C i 4 minutter. For å rense og stabilisere produktet etter sekvenseringsreaksjonen ble 45 µl SAM løsning (Applied Biosystems), 10 µl XTerminator løsning (Applied Biosystems) og templatet satt til risting (Mini-shaker for immunology PSU-2T, BioSan, Riga, Lativa) ved maksimal hastighet (1000 omdreininger per minutt (rpm)) i en time i et microtiter brett. Prøvene ble overført til en 96-brønners plate og sentrifugert ved 1650 x g (IEC Centra® CL3, Thermo Electron Corporation, Needham Heights, MA, USA) i 20 sekunder.

Deteksjon av sekvensene foregikk ved kapillærelektroforese på ABI Prim 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA), med POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems), 1x A.C.E.™ buffer (Amresco, Solon, OH, USA) og 36 cm kapillærer. Prøvene ble injisert i 1 sekund for *icd*-genet og 3 sekunder for mikrosatelitt-sekvensene ved 12 000 V og separert ved 8500 V i 36 minutter ved en temperatur på 60 °C.

For sekvensering av prøvene (som inneholder BigDye XTerminator), ble det valgt modul som tilpasser injeksjonshøyden i prøven for å hindre injeksjonsfeil.

2.4.1 Sammenstilling og kvalitetsanalyse av sekvenserte PCR-produkter

De komplementære sekvensene fra Forward og Reverse sekvenseringsprimere ble satt sammen til en konsensussekvens for hver prøve ved hjelp av forhåndsinnstilte parametere. (Minimum sammenfallende lengde var 15 nukleotider, scoringsfunksjonen i sammenstillingen hadde lav stringens, endene til sekvensene ble trimmet før sammensetting basert både på kvalitetsscore på 0,02 fra en algoritme for identifisering av nukleotider og på tvetydigheter i endene til sekvensene).

Det ble satt sammen multipl sekvenssammenstillinger av alle konsensussekvensene for hvert gen ved bruk av forhåndsinnstilte parametere. (Følgende forhåndsinnstilte parametre ble brukt: Kostnad for tomrom ble satt til 10, kostnad for utvidelse av tomrom ble satt til 1 og ved tomrom i endene ble satt kostnad som for de andre på grunn av at sekvensene var av tilnærmet lik lengde. Det ble valgt en nøyaktig sammenstilling, som tar noe lengre tid for programvaren å beregne).

Uoverensstemmelser i programvarens valg og tolkning av inkorporert nukleotid ble manuelt kontrollert og eventuelt korrigert ved hjelp av informasjon fra kromatogrammene (fra både sense- og antisense tråd) og fra multipl sammenstillingen. Endene til sekvensene ble klippet slik at alle fragmentene i sammenstillingen fikk lik lengde.

2.5 Analyse av TRS-amplikoner ved kapillærelektroforese

De 6-FAM merkede TRS-amplikonene ble fortynnet ut fra mengden PCR-produkt etter visualisering av båndstyrken i 1,5 % agarosegel. En μl av PCR-produktet ble tilsatt 9,3 μl deionisert formamide (HiDi™ Formamide, Applied Biosystems) for å senke smeltetemperaturen og 0,3 μl Gene Scan Rox500 (Applied Biosystems, Warrington, UK) som intern størrelses standard. Prøvene ble sentrifugert i 10 sekunder ved 1650 x g (IEC Centra® CL3, Thermo Electron Corporation), varmedenaturert ved 95 °C i 2 minutter og

avkjølt på is. Deteksjon av allelstørrelse ble utført ved kapillærelektroforese med betingelser som beskrevet i kapittel 2.4, men med injisering av prøver i 23 sekunder og separering av alleler ved 15 000 V i 13 minutter.

2.5.1 Analyse av alleler fra kapillær gelelektroforese

Dataene fra kapillærelektroforese for TRS-fragmentene ble analysert ved bruk av GeneMapper®Software v4.0 (Applied Biosystems). Alleler ble størrelsesbestemt ut fra den tilsatte størrelsesstandard og antallet tandemrepererende enheter (mono-, di-, tri- og tetra repetisjoner). Det ble brukt forhåndsinnstilte analyseparametre for tetranukleotider. (Med pluss A forhold på 0,95, pluss A distanse på 1,6, sekundærtopp (stuttere) forhold på 0,15 og sekundærtopp distanse mellom 0,0 – 4,5 og der programvaren bestemmer fragmentstørrelsen ved bruk en avskjæringsverdi på 0,25. Avskjæringsverdien angir minste størrelse på forholdet mellom to topper for ikke å regnes som bakgrunnsstøy av programvaren i genotyping av ulike alleler). Videre ble det brukt en venstre- og høyre forskyving på 1,70 i områdene som ble definert for påvisning av alleler (bin) og en minste høyde for homozygote topper på 200 og heterozygote topper på 100.

2.6 Fylogenetiske analyser

I denne oppgaven ble Maximum Likelihood (ML) metoden brukt til å konstruere et fylogenetisk tre. Treet ble brukt til å finne antallet mutasjoner som skiller de forskjellige gruppene i *icd*-genotyping av avføringsprøvene. Dataene ble framstilt i en figur, et mutasjons kompleks, der arealet av sirklene representerer antallet av hver *icd*-genotype og strekene fremstiller antallet mutasjoner.

Maximum Likelihood (ML) er en karakterbasert metode som ved sannsynlighetsberegninger evaluerer alle mulige trær som kan dannes ut i fra hver posisjon i sammenstillingen. I hvert sete for et gitt tre beregnes sannsynligheten for at en evolusjonær modell kan ha frembrakt de observerte data og sannsynlighetene for alle setene multipliseres for å gi sannsynligheten for hvert tre. ML metoden er potensielt kraftig statistisk metode

dersom evolusjonsmodellen som brukes er en rimelig tilnærming til prosessen som produserte dataene. ML er en mye brukt metode i behandling av data fra nukleotidsekvenser. For sekvensene fra *icd*-genotypingen av avføringsprøvene ble det konstruert et distansebasert fylogenetisk tre ved bruk av Neighbour Joining algoritmen. Neighbor joining (NJ) er en distansebasert algoritme som tillater evolusjonsraten å variere fritt i ulike linjer og den plasserer ikke noen rot. Det starter med et uløst stjernelignende tre. Det gjøres beregninger for gruppering av hvert par og der avstanden til alle andre forgreininger trekkes fra avstanden til de to sekvensene som utgjør paret. Dette gjøres for å ta høyde for en situasjon der de to nærmeste forgreiningene ikke er naboer i det virkelige treet. NJ algoritmen regnes for å være rimelig god og er mye brukt. En bootstrapanalyse er en metode som brukes for å vurdere hvor troverdig plasseringen av grenene i treet er. Ut fra tilfeldig valgte kolonner i sekvenssammenstillingen produseres nye sekvenssammenstillinger av samme lengde og nye trær blir konstruert. For at treet skal være pålitelig bør datasettene hyppig forutsi samme grenmønster. NJ ble brukt med 100 replikasjoner i bootstrapanalysen.

2.7 Statisk analyse av overføring av *Bacteroides fragilis* fra mor til barn

For å undersøke overføring av bakteriestammer fra mor til barn ble det laget krysstabeller for oppsummering av genotypfrekvenser påvist i de ulike alderskategoriene. Krysstabell er en metode for å studere sammenhengen mellom to variabler der begge variablene inneholder to kategorier. Hver celle i krysstabellen viser antall enheter med en gitt kombinasjon mellom variablene. De kategoriske variablene som ble undersøkt var *B. fragilis*-genotyper som ble påvist: Hos både mor og barn, bare hos moren, bare hos barnet eller verken hos moren eller barnet.

De kategoriske variablene undersøkt var *B. fragilis* genotyper påvist hos moren og barnet i de ulike aldersgruppene. For de fire datarubrikkene viste score for hver genotype påvist hos: Både mor og barn, bare hos moren, bare hos barnet eller verken hos moren eller barnet.

Resultatet av krysstabellene ble analysert for signifikans ved bruk av online kalkulator på websiden til Øyvind Langsrud (<http://www.langsrud.com/fisher.htm#INTRO>), med Fishers eksakt test der en-sidet høyre p-verdier $< 0,05$ ble betraktet som signifikant. Dette er en type eksakt test fordi signifikansen til avviket fra nullhypotesen kan beregnes nøyaktig.

Testen undersøker samtlige utfall som kan beskrives via krysstabellen og rangerer disse utfallene etter hvor langt de er fra et gitt tilfelle der alle observasjonene er helt jevnt fordelt i cellene. Dersom fordelingen i cellene i tabellen er så ujevn at det skjer under 5 % av gangene via rene tilfeldigheter, kan det konkluderes med at de ikke har oppstått ved en tilfeldighet. Vi velger å tro at det er en sammenheng mellom de to variablene og vi aksepterer 5 % sjanse for å forkaste nullhypotesen selv om den skulle være riktig (type I-feil).

3. Resultater

Vi har utviklet metoder for å påvise og typebestemme ulike stammer av *B. fragilis*. Bakterien har blitt genotypet på husholdningsgenet *icd* og mikrosatellitt-markøren *TRSI* ved bruk av PCR og sekvensering. Genotypingsteknikkene ble hovedsakelig benyttet direkte på ekstrahert DNA fra avføringsprøvene. I tillegg ble kolonier fra dyrkingsforsøket *TRSI*-genotypet.

I denne oppgaven har vi undersøkt avføringsprøver fra 93 mødre og deres barn med hensyn til kolonisering, persistens og genetisk diversitet av *B. fragilis* i spedbarnstarmen og om mor og barn koloniseres av samme stamme (undergruppe) av bakterien.

3.1 Multilokusseksenstyping (MLST)

3.1.1 Konstruksjon og evaluering av MLST primere

Primerpar for MLST-genene ble konstruert med *B. fragilis* NCTC 9343 (aksesjonsnummer NC 003228 i NCBI) og *B. fragilis* YHC46 (NC 006347) som templat (Tabell 1).

Tabell 1: Oversikt over MLST-primere konstruert i dette prosjektet

Primer:	Sekvens (5` - 3`)	T _m *	GC i %	Amplikon-lengde
<i>adk</i>	F: TTTTCGGTGCTCCCGGTT R: CTGGTATTTGCCTTCGCCT	63,84 60,22	55,56 52,63	485
<i>gyrB</i>	F: AGCGAAGAACAGAATCCCAC R: TGCTGTTTGGTTCCTGTGT	59,29 57,62	50,00 47,37	521
<i>mdh</i>	F: ATGACTCGTGAAGAAGCTG R: AGATTCGCCATATTCGCC	48,52 58,62	44,44 50,00	528
<i>recA</i>	F: AGAGAAAAGCTTCGGTAAAGGT R: TACACCGATTTTCTCACGCAAC	57,82 62,29	40,91 45,45	553
<i>purA</i>	F: ATGGGGCGACGAAGGTAA R: CCTTCGAACCAGGCTTTTT	61,41 59,30	55,56 47,37	537
<i>icd</i>	F: ATAACGGGTGATGGAGTAGGAG R: CCGAGGGCAATTCATGCT	59,37 62,14	50,00 55,56	574

*T_m: smeltetemperaturen for primere

Spesifisiteten til MLST primerne konstruert i dette prosjektet ble undersøkt med PCR amplifisering av husholdningsgenene *icd*, *gyrB*, *adk*, *mdh*, *purA* og *recA* i fem rene *B. fragilis* stammer fra DSMZ-stammesamlingen. PCR-produktene ble analysert ved hjelp av

agarosegel elektroforese, og sammenstilling av sekvenserte produkter med tilsvarende gen fra de to genomsekvenserte *B. fragilis* NCTC 9343 og *B. fragilis* YCH46 (NCBI) verifiserte at primerne amplifiserte målområdet.

De multiple sekvenssammenstillingene for de fem DSMZ-stammene amplifisert ved MLST-primerne viste videre at det var fem SNPer i sammenstillingene for *icd*- og *purA*-sekvensene, to for *recA* og en for *adk*, mens *gyrA* og *mdh* ikke hadde noen. To av SNPene i *icd*-sammenstillingen representerer to substitusjonsmutasjoner, mens for de andre sammenstillingene representerte SNPene nøytrale mutasjoner (Tabell 2). Det ble konstruert fylogenetiske trær for sammenstillingene som hadde SNPer. Samme grenmønster ble funnet for *icd*- og *purA*-fragmentene. Det ble derfor valgt å bruke primerne for *icd*-genet til MLST-genotypingen av *B. fragilis* i avføringsprøvene.

Tabell 2: MLST fragmenter. Oversikt over SNPer i fragmentene amplifisert ved bruk av MLST primerne konstruert i dette prosjektet, undersøkt på fem *B. fragilis*-stammer (DSMZ).

Gen	Størrelse (bp) ¹ av analyserte fragmenter	Antall polymorfe seter	Antall endrede aminosyrer	Allelisk nukleotid posisjon i genomnoterte <i>B. fragilis</i> :		Plassering av SNPene i forhold til nukleotid posisjoner i <i>B. fragilis</i> YCH46 NC 006347 ²	SNP
				YCH46 NC 006347 ²	NCTC 9343 NC 003228 ²		
<i>icd</i>	507	5	2	4261118 – 4260611	4166831 – 4167338	# 1: 4260766 # 2: 4260787 # 3: 4260889 # 4: 4261039 # 5: 4261047	A/G A/T ³ T/C G/A A/G ³
<i>purA</i>	517	5	0	3910789 – 3910272	3817611 – 3817094	# 1: 3910313 # 2: 3910343 # 3: 3910492 # 4: 3910640 # 5: 3910658	A/T T/C G/A G/A T/C
<i>recA</i>	418	2	0	1446070 – 1445652	1435902 – 1435484	# 1: 1445730 # 2: 1445748	C/T T/C
<i>adk</i>	462	1	0	1344533 – 1344071	1283082 – 1282620	# 1: 1344303	G/A
<i>gyrA</i>	383	0	0	331043– 330660	275726 – 275343	-	-
<i>mdh</i>	502	0	0	4546865 – 4546363	4433695 – 4433193	-	-

¹ bp; basepar

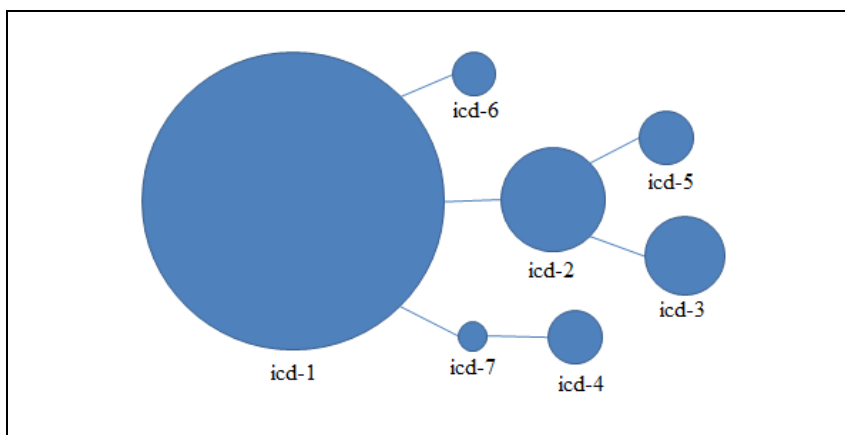
² Aksjesjonsnummer i NCBI

³ Punktmutasjon som gir endret aminosyre

3.1.2 Direkte sekvensanalyse av *icd*-genet med PCR i avføringsprøver

I prosjektet ble det utført PCR-amplifisering av *icd*-fragmenter direkte på DNA isolert fra avføringsprøvene i IMPACT studien. Ved agarosegelelektroforese ble det påvist *B. fragilis* i 160 av totalt 483 avføringsprøver.




De 160 PCR-produktene som hadde synlige bånd i agarosegelen ble sekvensert. Av disse var det 124 prøver som hadde bra kvalitet fra både Forward og Revers sekvens, slik at konsensussekvensene ble brukt i sammenstillingen. Ytterligere fem sekvenser ble tatt med i sekvenssammenstillingen basert på revers sekvens med tydelige kromatogram. De 129 *icd*-sekvensene à 290 nukleotider inneholdt åtte variable posisjoner (posisjoner i sammenstillingen som inneholdt SNPer). Ut fra det fylogenetiske treet som ble konstruert ble det basert på mutasjonene ble det laget et mutasjons-kompleks med sekvenser fordelt i sju grupper (Figur 5).



Figur 5: Mutasjons-kompleks for *icd*-genotypene. Figuren viser distribusjon av de 7 sekvenstypene i mutasjons-komplekset bestående av totalt 129 sekvenser for *icd*-genet. Arealet av sirklene tilsvarer antallet sekvenser i hver gruppe.

icd-sekvensene ble navngitt med gennavnet *icd* og et tall fra 1 til 7 etter fordelingen i de sju gruppene i mutasjons-komplekset. *icd-1* ble satt på sekvensene som tilhører den største gruppen bestående av 102 sekvenser, mens den minste gruppen, *icd-7*, inneholdt bare en sekvens.

De PCR-amplifiserte *icd*-fragmentene ble visualisert i agarosegel og en gradering av båndintensiteten til produktene ble gradert fra meget svak båndintensitet til meget sterk båndintensitet. Eksempel på bånd fra hver kategori er vist i Figur 6.

Meget svak båndintensitet	Svak båndintensitet	Sterk båndintensitet	Meget sterk båndintensitet
			

Figur 6: Vurdering av mengde PCR-produkt i *icd*-genotypingen. Figuren viser eksempler på hvordan PCR-produktmengden ble kategorisert ut fra styrken til DNA-båndene i agarose gel. Bilder av gelene ble tatt under samme betingelser og lik eksponering.

Oversikt over de ulike *icd*-genotypene som ble påvist ved sekvensering av PCR-produkter fra de forskjellige alderskategoriene for mødrene og deres barn ble samlet i Figur 7. Figuren inneholder også vurderingen av båndintensiteten fra visualiseringen i agarosegel. (En mer detaljert oversikt over *icd*-genotyper påvist i de ulike prøvetidspunktene er vist i Vedlegg 1).

icd-genotyper:

Mor/barn id-nummer	Mor	1-10 dg	4 mind	1 år	2 år	Sensibilisering
115						-
116						-
317						-
1134						-
1261						-
1308						-
1317						-
1318						-
1319						-
1342						-
1368						-
1375						-
1381						-
1384						-
1391						-
1394						-
1414						-
1471						-
1478						-
1537						-
1628						-
1629						-
1630						-
1660						-
1713						-
1807						-
1864						-
1870						-
1891						-
1892						-

icd-genotyper
fortsettelse:

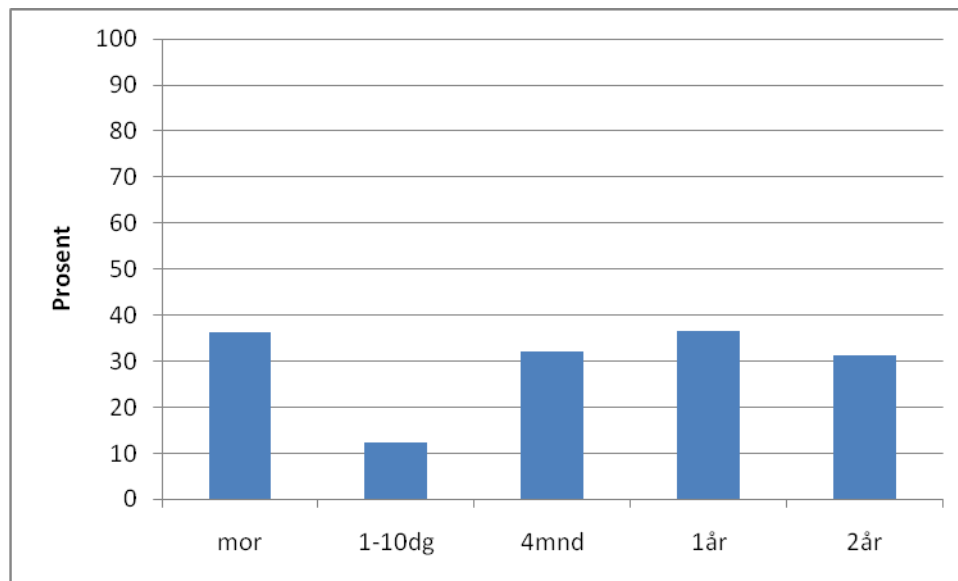
Mor/barn id-nummer	Mor	1-10 dg	4 mind	1 år	2 år	Sensibilisering
1928						-
1930						-
1939						-
1992						-
2042						-
2140						-
2451						-
2567						-
20075						-
123						+
138						+
1230						+
1315						+
1360						+
1483						+
1499						+
1551						+
1725						+
1768						+
1904						+
1956						+
1970						+
1984						+
1997						+
2103						+
2411						+
2652						+
2236						/
2575						/

Fargenøkkel for tolkning av Figur 7: Farge og fargeintensitet angir icd-genotypene påvist ved sekvensering og båndintensiteten for amplifiserte produkter påvist ved visualisering i agarosegel.

icd-genotyper	Meget svak båndintensitet	Svak båndintensitet	Sterkt båndintensitet	Meget sterk båndintensitet
icd-1				
icd-2				
icd-3				
icd-4				
icd-5				
icd-6				
icd-7				
Ikke påvist <i>B.fragilis</i>				
Ingen prøve				

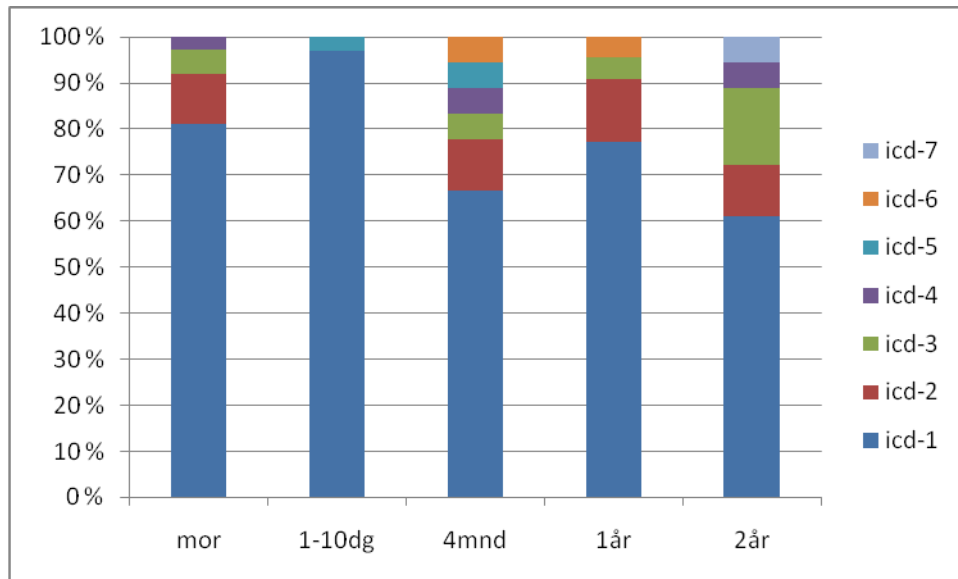
Figur 7: Oversikt over icd-genotypene påvist ved sekvensering i denne studien. Genotypene er basert på samme mutasjonskompleks som i Figur 5. Økende mørkhet i fargede ruter korresponderer med økende mengde amplifisert produkt (som tidligere beskrevet Figur 6). Grå ruter; Ble ikke påvist *B. fragilis* i prøvene. Hvite ruter; Tidspunkt da det ikke ble samlet inn avføringsprøve. Sensibilisering ved 2-års alder er anvist ved + (pluss) for spesifikke IgE verdier over terskelverdi på 0,35kUa/l (kiloUnits of antibody per liter) og - (minus) for IgE verdier under terskelverdi. Manglende opplysninger gjeldende sensibilisering er anvist ved symbolet: / Mødrenes icd-genotyper fra de to avføringsprøvene tatt i svangerskapet (uke 11 – 13 og 34 – 40) er vist sammenslått i kolonnen mor. Spedbarnets icd-genotyper fra de 4 avføringsprøvene tatt fra 1,5 – 10 dager er vist sammenslått i kolonnen 1-10 dg. I tilfeller der en eller flere av de sammenslåtte prøvene hadde forskjellig mengde PCR-produkt, er et gjennomsnitt vist i tabellen (visuelt vurdert).

I 19 tilfeller ble *B. fragilis* påvist hos både mor og barn, mens i 12 tilfeller ble den påvist bare hos mor og i 28 tilfeller bare hos barnet. *B. fragilis* ble påvist i rundt 35 % av prøvene til mødrene, i kategorien for 1 - 10 dager gamle barn ligger andelen rundt 12 %, mens andelen stiger igjen og ligger mellom 31 - 36 % for barna i de andre alderskategoriene (Figur 8).



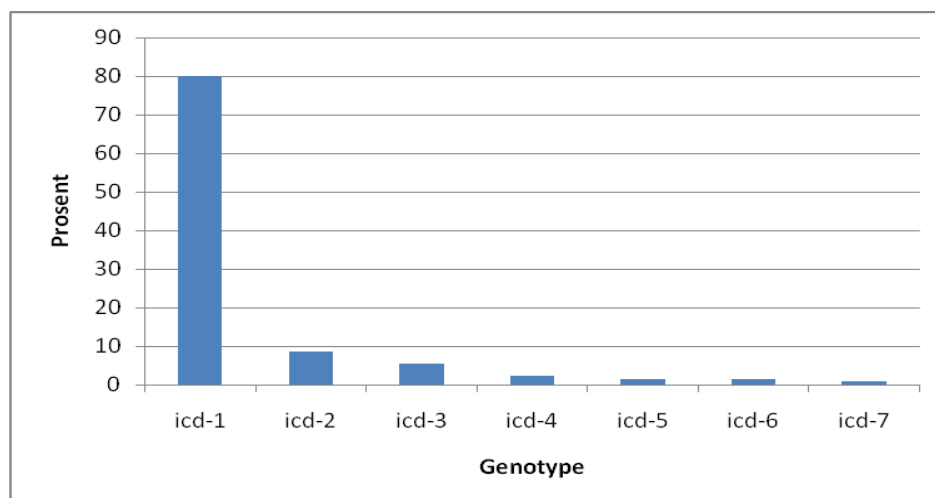
Figur 8: Andel prøver der *B. fragilis* er påvist ved sekvensering av icd-allelene de ulike alderskategorier. Figuren er basert på Vedlegg 1 der alle prøvene er vist. $n(\text{mor})=102$, $n(1-10\text{dg})=155$, $n(4\text{mnd})=75$, $n(1\text{år})=74$, $n(2\text{år})=77$

Hos mødrene ble det til sammen påvist fire *icd*-genotyper, der *icd-1* utgjorde 80 % av sekvensene. I aldersgruppen 1 – 10 dager ble det funnet to *icd*-genotyper og 98 % av sekvensene var av typen *icd-1*, mens *icd-5*-genotypen utgjorde to prosent av sekvensene. *icd-5* ble kun påvist i aldersgruppen 1 – 10 dager og 4 måneder. Ved 4 måneders alder fant vi størst diversitet med totalt 6 ulike *icd*-genotyper. Av disse utgjorde *icd-1* ca 32 % og *icd-2* var den nest største gruppen med ca 11 %. Ved 1-års alder ble det påvist 4 forskjellige *icd*-genotyper og andelen *icd-1* lå på ca 78 %, mens det ved 2-års alder ble det påvist 5 forskjellige *icd*-genotyper og rundt 60 % av disse var av typen *icd-1*. Ved 2-års alder utgjorde *icd-3* den nest største sekvensgruppen med ca 18 % (Figur 9).



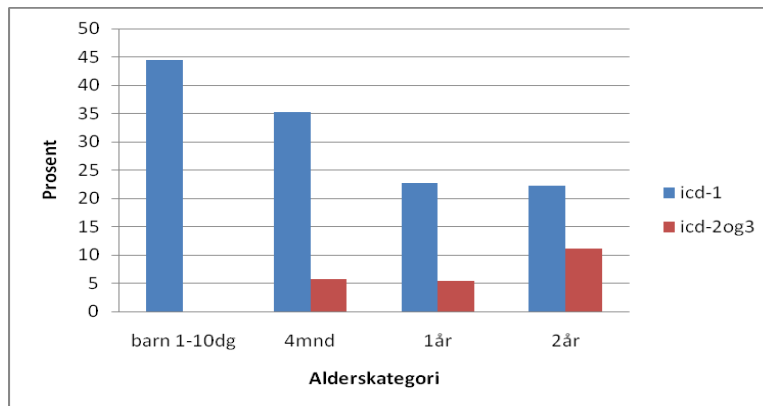
Figur 9: Andel av de ulike icd-genotypene påvist i de ulike alderskategoriene De ulike icd-genotypene (fra 1 – 7) er anvist ved ulike fargekoder ut fra prosentandel påvist i hver alderskategori. n (mor) = 37, n (1-10dg) = 34, n (4mnd) = 18, n (1år) = 22, n (2år) = 18.

Det ble påvist sju forskjellige icd-genotyper i IMPACT-materialet og genotypen *icd-1* utgjorde den største sekvensgruppen i alle alderskategoriene (Figur 9). Totalt var åtti prosent av sekvensene påvist ved *icd*-genotypingen var av typen *icd-1*, mens *icd-2* var den nest største gruppen med ca 9 % av sekvensene, *icd-3* utgjorde ca 6 % og *icd-4* ca 2 %. Ca 1,5 % av sekvensene var henholdsvis av typen *icd-5* og *icd-6*, mens *icd-7* utgjorde under 1 % (Figur 10).



Figur 10: Andelen av de ulike icd-genotypene påvist i IMPACT materialet. Viser den totale prosentandelen hver av icd-genotypene påvist til sammen i alle alderskategoriene. ($n = 129$)

Av de barna som har samme *icd*-genotype som sin mor, var det ca 45 % som hadde *icd-1* ved 1 – 10 dager. Ved 1- og 2-års alder lå denne andelen på rundt 23 %. For *icd-2* og *icd-3* var det ved 4 måneder og 1-års alder rundt 5 % som hadde samme genotype som sin mor og ved 2-års alder var det rundt 11 % (Figur 11).



Figur 11: **Andel barn med samme *icd*-genotype som moren.** Figuren viser prosentandelen av barn i hver alderskategori som har samme *icd*-genotype som sin. (*icd*-genotype 4 – 7 er ikke vist, da det ikke er påvist samme stamme hos mor og barn). n (1-10dg) = 18, n (4mnd) = 17, n (1år) = 22, n (2år) = 18

3.2 Analyse av *Bacteroides fragilis* overføring fra mor til barn ved *icd*-genotyping

For å undersøke om det er en sammenheng mellom *icd*-genotypene påvist hos mor og barn, ble Fishers eksakt test brukt til å beregne p-verdier for krysskjemaene (Tabell 3). Krysskjemaene ble konstruert ved å summere opp hver *icd*-genotype påvist hos mor og barn i fire variabler som beskrevet i kapittel 2.7 (Vedlegg 4). For genotypen *icd-1* er det på grensen til signifikans for mødrene og barna i alderskategorien 1 – 10 dager med p-verdi = 0,074 (Tabell 3). Det betyr at vi ikke kan utelukke en overføring av *B. fragilis* stammene fra mor til barn og at det er disse stammene som koloniserer barnet den første tiden. For de andre *icd*-genotypene er det signifikans for *icd-3* ved 4 måneder (p-verdi = 0,016) og 1 år (p-verdi = 0,034) og på grensen til signifikans for *icd-3* ved 2 år (p-verdi = 0,092) og *icd-2* ved 2 år (p-verdi = 0,094) (Vedlegg 4).

Tabell 3: **P-verdier for icd-1 genotypene beregnet ved Fishers eksakt test.** Tabellen viser p-verdier for alleforekomsten av icd-1 hos mødrene og deres barn. P-verdiene øker i alderskategoriene etter hvert som barnet blir eldre.

Alderskategorier	p-verdi	Totalt antall
Mor og barn 1 – 10 dg	0,074	52
Mor og barn 4 mnd	0,108	62
Mor og barn 1 år	0,217	53
Mor og barn 2 år	0,328	61

3.3 TRS subtyping av icd-1 gruppen

Det ble valgt å undersøke *icd-1* gruppen videre med analyse av tandemrepererende sekvenser for om mulig å skille *B. fragilis* stammer fra hverandre. Til denne TRS1-subtypingen ble det valgt ut prøver der både mor og barn hadde fått påvist *B. fragilis icd-1*, og der 6 av barna ikke var sensibilisert og 7 var sensibilisert ved 2 års alder.

3.3.1 Konstruksjon og evaluering av TRS-primere

Det ble konstruert 12 TRS-primere i dette prosjektet, med *B. fragilis NCTC 9343* (aksjonsnummer NC 003228 i NCBI) og *B. fragilis YHC46* (NC 006347) som templat.

Tabell 4: Oversikt over TRS-primere konstruert i dette prosjektet.

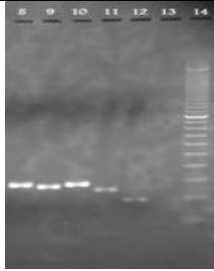
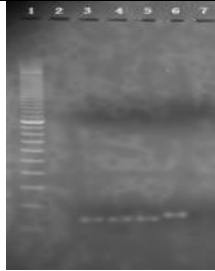
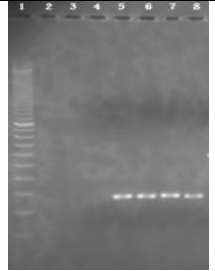
Primer:	Sekvens (5' - 3')	Tm	GC i %	Amplikon lengde	TRS
TRS1 ^a	F: AGGGGTGTTGTTGGCTTA R: AGGAGTGGGTGAGTGTG	57,88 57,81	50,0 58,8	262 i YCH46 286 i NCTC	(AAAG) ₅ (AAAG) ₇
TRS2 ^a	F: GGGAGGTCAAGAGGAAG R: AAGGAAAGAGAGTGGCAA	55,45	58,8	137	(CTTT) ₅
TRS3 ^a	F: TGCTGTTTGTGTCTAGGT R: CTCAGGGAAGGGTAGTCA	55,03	44,4	263	(G) ₁₀
TRS4	F: TTGAGGGGGTACGATTTG R: GTCATTTTTAGGTGCAAGGT	55,71	50,0	176	(AT) ₆
TRS5	F: GGAGGAGTTCCAGGACA R: ATTGGGTATTTGTGTAAGCG	55,89	58,8	318	(ATA) ₄
TRS6	F: GAAAGTATTTGGGCTTCTGT R: CTCTGATTGGTGGGATATGT	55,05	40,0	238	(TAT) ₄
TRS7	F: AGACGAGACAAATAAAGCAG R: GCTACTCCACCAATATTAAG	56,13	40,0	238	(TAT) ₄
TRS8	F: GCCCCCGGATAAAAAGA R: GTGGAAGATGGGAGGATG	55,02	52,9	79	(AT) ₆
TRS9	F: GAGAAAAGGATAGAGAAGACGA R: GGACATACTCCAAAGCCA	55,39	40,9	324	(AAT) ₄
TRS10	F: ACTCCAACGCAACCATA R: GGCCTGTCTGTGATGAT	57,20	50,0	285	(ATA) ₄

TRS11	F: TTTCTCTGCGTCCTCCT R: ATTCCGCCTGCCTGTTA	55,52	52,9	298	(GGCC) ₃
TRS12	F: CAACAAGAACAGAGCAAAAGAC R: CAAATAGAGGACACAGGGC	57,28	40,9	351	(GAC) ₃

^a TRS-primere 1, 2 og 3 ble også bestilt med Forward primer merket med 6-karboksyfluorescin (6-FAM)

Disse ble undersøkt ved PCR-amplifisering av *B. fragilis*-stammesamlingen (DSMZ) og agarosegelelektroforese. Det var 9 av primerne som ikke viste noen amplifisering eller som ga veldig lite produkt. PCR-produkter fra TRS-primer 1, 2 og 3 amplifiserte produkter på forventet størrelse ut fra genomstørrelsen for *B. fragilis* NCTC 9343 og *B. fragilis* YHC46. I tillegg til visualisering i agarosegel, ble fargemerkede PCR-produkter fra disse primerne påvist ved kapillærelektroforese.

PCR-produkter fra TRS-primer-1 viste PCR-produkter fra alle de fem DSMZ-stammene, mens TRS-primer 2 og 3 amplifiserte produkter fra fire av de fem stammene. I tillegg ga TRS-primer-1 PCR produkter med størst lengdeforskjeller sammenlignet med de to andre TRS-primerne (Figur 12). Ved videre undersøkelse av primerne på IMPACT prøver var det kun 2 av 18 TRS2 produkter og 1 av 18 TRS3 produkter med synlige bånd ved visualisering i agarose gel. TRS-1 primeren amplifiserte 11 av 18 prøver (Vedlegg 2). Til TRS-genotypingen av IMPACT prøvene ble det derfor valgt å bruke TRS-primer-1.

TRS-primer 1		TRS-primer 2		TRS-primer 3	
	<u>DSMZ-stamme:</u> 8: nr 1 9: nr 2 10: nr 3 11: nr 4 12: nr 5 13: tom 14: st		<u>DSMZ-stamme:</u> 1: st 2: tom 3: nr 1 4: nr 2 5: nr 3 6: nr 4 7: nr 5		<u>DSMZ-stamme:</u> 1: st 2: tom 3: tom 4: nr 1 5: nr 2 6: nr 3 7: nr 4 8: nr 5

st; molekylvekt-standard

Figur 12: PCR-produkter fra TRS-primere visualisert i agarose gel
Figuren viser at TRS-primer 1 amplifiserer målområdet i alle fem *B. fragilis*-stammene (DSMZ) og at det er størst lengdeforskjell på TRS1-fragmentene. PCR-produktene ble separert ved agarose gel elektroforese i 130 min for optimal differensiering av fragmenter med ulike lengde.

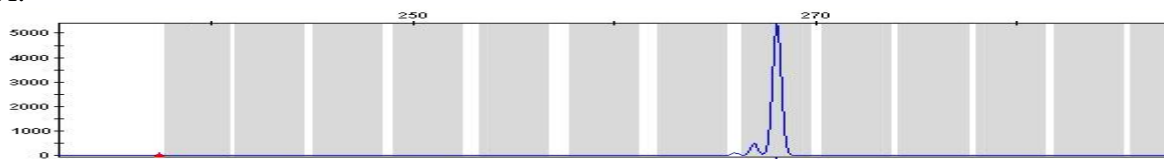
Ved PCR amplifisering av prøver fra IMPACT materialet med TRS-primer 1, ble det påvist at allelene inneholder den tandem repeterende målsekvensen (AAAG)_n / (CTTT)_n (Tabell 9 og Vedlegg 5)

3.3.2 TRS1-analyse med PCR i avføringsprøver og i dyrkingskolonier

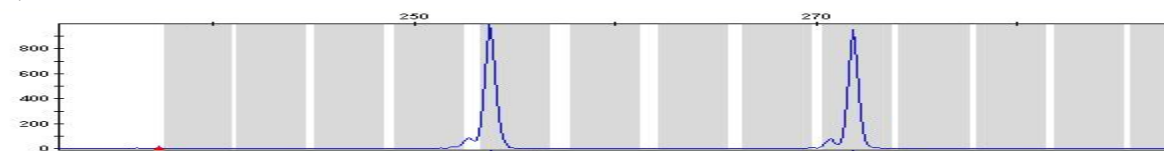
De PCR amplifiserte *TRS1*-fragmentene ble genotypet ved separasjon og deteksjon av de forskjellige allelene (fragmentlengdene) ved kapillærelektroforese. (Tabell 5 og Tabell 6).

Det ble hovedsakelig påvist ett allel pr prøve, men i noen prøver ble det detektert to eller tre alleler (Figur 13). Dette gjaldt 14 av 88 prøver genotypet direkte i DNA fra avføringsprøvene og 13 av 77 prøver genotypet i DNA fra koloniene (Vedlegg 3).

A:



B:



Figur 13: Viser tre representative alleler fra TRS1-genotypingen. Hvert allel utgjør en *B.fragilis* stamme påvist i avføringsprøvene. A: Ett allel på 268 basepar. B: To alleler på henholdsvis 256 og 272 basepar.

Ved re-typing viste 9 av 17 prøver de samme allelene som ble detektert i prøvene første gang. I de resterende 8 prøvene ble det i tillegg til det samme allelet også påvist ett eller flere andre alleler. Alleler som ble påvist ved hver re-typing for gjeldende prøve, framkommer i Tabell 5 med uthevet skrift. Et eksempel på dette er 2-års prøven til barn nr 1930 som ble genotypet tre ganger. Allelet på 276 basepar ble detektert hver gang, sammen med et allel på henholdsvis 196, 236 og 252 basepar.

Tabell 5: **TRS1-genotyper påvist i avføringsprøvene.** Tabellen gir en oversikt over PCR-amplifiserte TRS1-alleler påvist ved kapillær gel elektroforese av IMPACT prøver fra 13 mødre og deres barn.

Barn id:	Sensibilisering	Mor	1 – 10 dager	4 mnd	1 år	2 år
1317	–	272 280	244 252		252 284	
1384	–	236	236	236	IA	IA
1629	–	268	252	252	244	244
1930	–	276	252	IA	252 276	196 236 252 276
2451	–	224 240	240	240		
20075	–	268	268	IA	268	252 268 272 284
123	+	IA	252	272	236	268
1360	+	252	252	252	252	252
1768	+	268 252	244 252 268		252	252 196
1956	+	244	244	IA	IA	236
1984	+	196		196	196	
2411	+	272	272	272	240	256 272
2652	+	236	IA	IA	236	236

IA= ikke amplifisert prøve

Tom rute = mangler prøve for dette tidspunktet.

Uthevet skrift = dominerende stamme.

Tabell 6: **TRS1-genotyper påvist i dyrkingskoloniene.** Tabellen gir en oversikt over PCR-amplifiserte TRS1-alleler fra dyrkingsforsøket påvist ved kapillær gel elektroforese. Til genotypingen ble det isolert DNA fra tre¹ kolonier pr skål.

Barn id:	Sensibilisering	Mor	1 – 10 dager	4 mnd	1 år	2 år
1384	–	220 236		288 236	236 272	
1629	–	232			244	
1930	–				IA	IA
2451	–	240 224				
20075	–	236 272				
123	+	IA			236	
1360	+	252 248 264	252			
1768	+				272	IA
1956	+	252 240 220 244			IA	
1984	+				196	
2411	+	256 272 280	272			272
2652	+			236	236 252	236

IA= ikke amplifisert prøve

Tom rute = mangler prøve for dette tidspunktet.

¹ Tre skåler inneholdt færre enn tre kolonier.

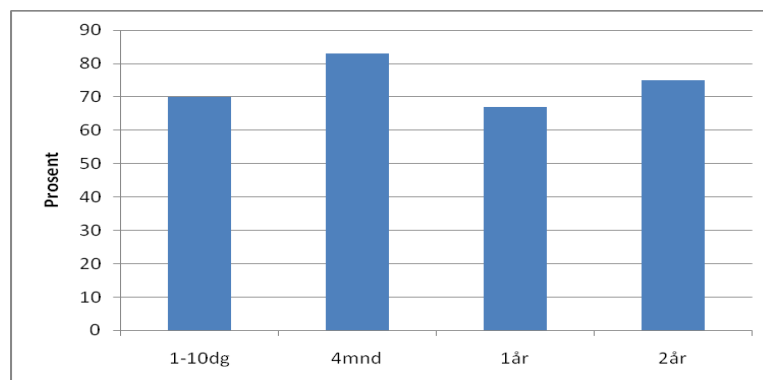
Vi kan se at det er samsvar mellom TRS1-alleler påvist fra dyrkingskoloniene (Tabell 6) og TRS1-alleler påvist direkte i avføringsprøver (Tabell 5) i tilsvarende alderskategorier for mor/barn. Noen prøver som ikke har blitt amplifisert direkte i avføringsprøvene, men som er påvist i dyrkingskoloniene viser forventet allel ut fra resten av tidsserien. For eksempel viser Tabell 6 at allel 236 for barn med nummer 2652 ved 4 måneders alder er amplifisert, og at allel 236 (og 272) for barn med nummer 1384 er amplifisert ved 1-års alder. Ved TRS-genotypingen direkte i avføringsprøver og i dyrkingskolonier ble det også påvist noen forskjellige TRS1-alleler fra tilsvarende prøver. For eksempel ble allel 280 og 256 for mor med nummer 2411 amplifisert i dyrkingskoloniene og ikke direkte fra avføringsprøvene.

Totalt 16 TRS1-alleler ble påvist i denne studien; 12 i avføringsprøvene og 13 i dyrkingskoloniene (Tabell 7).

Tabell 7: Oversikt over de 16 TRS1-allelene påvist i prosjektet. Tabellen viser alleler som ble funnet i avføringsprøvene og i dyrkingskoloniene.

Fragmentlengde:	TRS1 alleler påvist i:	
	Avføringsprøvene	Dyrkingskoloniene
196	x	x
220	-	x
224	x	x
236	x	x
240	x	x
244	x	x
248	-	x
252	x	x
256	x	x
264	-	x
268	x	-
272	x	x
276	x	-
280	x	x
284	x	-
288	-	x

For TRS1 ligger andelen barn som har samme genotype som sin mor mellom 67 – 83 % i alle de fire alderskategoriene. Til TRS1-genotypingen ble det valgt ut prøver der *icd-1* genotypen var påvist både hos mor og barn i (Figur 14).



Figur 14: Andel barn med samme TRS1-genotype som moren. Figuren er basert på et utvalg av barn med stabil *icd-1* genotype, og viser andelen av barna i hver alderskategori som har samme TRS1-genotype som sin mor. $n(1-10dg) = 10$, $n(4mnd) = 6$, $n(1år) = 9$, $n(2år) = 8$

3.4 Analyse av *B. fragilis* overføring fra mor til barn ved TRS1-genotyping

For å undersøke om det er sammenheng mellom TRS1-genotyper påvist hos mor og barn, ble også Fishers eksakt test brukt til å beregne p-verdier for gjeldende genotyper oppsummert i krysskjemaer (Vedlegg 4). Krysskjemaer for TRS1-genotyper ble utarbeidet på tilsvarende måte som for *icd*-genotypene beskrevet i kapittel 3.2. For TRS1-genotypene viste testen veldig lave p-verdier; Fra $p = 8,46e-7$ for mødrene og barna i alderskategorien 1 - 10 dager til $p = 0,0005$ for mødrene og barna i alderskategorien 2-år (Tabell 8). P-verdiene øker gradvis for hver alderskategori, men det er fremdeles signifikans ved 2-års alder (der p-verdien på 0,0005 angir 0,05 % sjanse for feilaktig avvisning av nullhypotesen).

Tabell 8: P-verdier for TRS1-genotypene beregnet ved Fishers eksakt test. Tabellen viser signifikante p-verdier for TRS1-alleforekomsten hos mødrene og deres barn. Nullhypotesen som sier at TRS1-genotypene hos barnet ikke har noen sammenheng med TRS1-genotypene hos moren, kan forkastes på bakgrunn av p-verdier $< 0,05$.

ALDERSKATEGORIER:	P-VERDI	TOTALT ANTALL
Mor og barn 1 – 10 dg	8,46e-7	116
Mor og barn 4 mnd	0,000009	71
Mor og barn 1 år	0,00005	107
Mor og barn 2 år	0,0005	96

3.5 Sekvensanalyse av utvalgte TRS1-fragmenter

Ved kapillærelektroforese ble det detektert en del fragmenter som hadde kortere lengde enn et eventuelt bortfall av tandem repetisjoner skulle tilsi. Ved sekvensering av ulike TRS1-alleler ble det oppdaget at det bare delvis var tandem repetisjonene som utgjorde lengdeforskjellene på fragmentene. Rett før tandem repetisjonene var det fem områder med delesjoner på 1 til 53 basepar (Vedlegg 5). Disse delesjonsmønstrene ga sammen med TRS på tre til fem repetisjoner ulike fragmentlengder som utgjorde TRS1-allelene (Tabell 9).

Tabell 9: **Delesjonsmønstre og TRS lengde i TRS1-allelene.** Tabellen gir en oversikt over de fem delesjonsområdene og lengden til den tandem repeterende sekvensen hos de 8 av TRS1-allelene der det ble påvist ett allel pr prøve. De resterende 8 allelene ble ikke sekvensert da de ble påvist i prøver med to eller flere TRS1-alleler.

Allel	Delesjonsmønstre					TRS lengde	Totalt ant delesjoner	Antall prøver av hvert allel som ble sekvensert
	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5			
196	-	32	-	5	53	12	106	1
236	-	34	1	-	17	12	68	2
240	-	32	-	5	12	12	65	2
244	-	34	1	-	17	20	60	2
252	-	32	-	5	-	12	53	2
268	1	-	1	-	17	12	35	2
272	1	-	1	-	17	16	31	2
276	1	-	1	-	17	20	27	1

* Resten av TRS-genotypene er ikke sekvensert da de inneholdt flere enn ett allel pr prøve.

3.5.1 Analyse av TRS1-flankeområder

TRS-området er plassert 572 basepar oppstrøms for det putative genet 5,10-methylenetetrahydrofolate reduktase i de to genomsekvenserte *B.fragilis* YCH46 og NCTC 9343. 5,10-methylenetetrahydrofolate reduktase generer 5-metyletetrahydrofolate (vitamin B₉).

I den multiple sammenstillingen for de sekvenserte TRS1-allelene (Vedlegg 5 A) fant vi fra baseparnummer 294 til 301, nukleotidsekvensen TATAGTCT som har homologi til tidligere identifiserte promotor-sekvenser (Park et al. 1997) (Cipollone et al. 2007) (Laishram and Gowrishankar 2007). I *B.fragilis* YCH46 og *B.fragilis* NCTC 9343 er sekvensen TATAGTCT plassert i henholdsvis nukleotidposisjon 4679666 – 4679672 og 4603627 – 4603633.

3.6 Korrelasjon mellom genotyping og sensibilisering

3.6.1 *icd*-genotyper og sensibilisering

B. fragilis-genotype *icd-1*

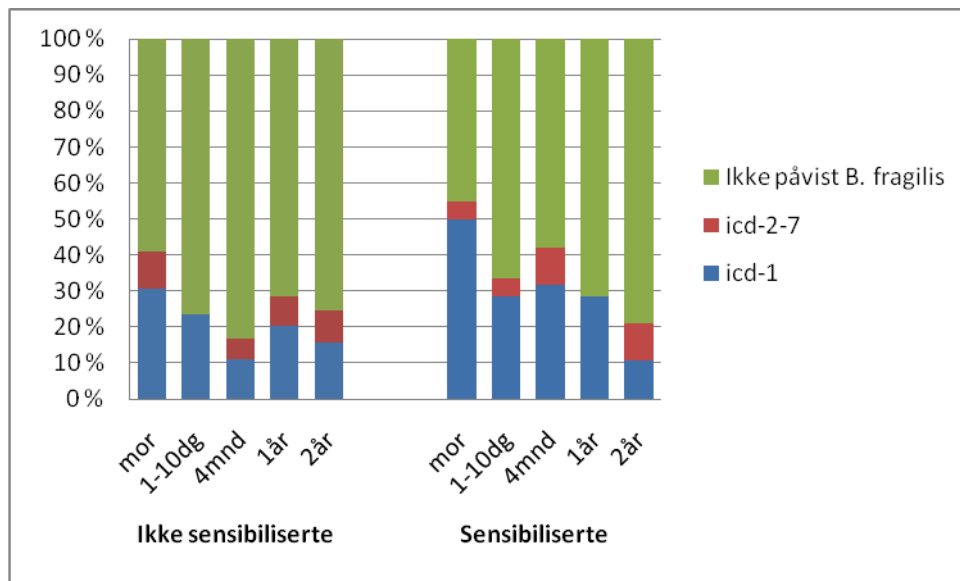
Det ble påvist en høyere andel prøver med *B. fragilis* genotype *icd-1* for de sensibiliserte barna til og med 1 års alder enn for de ikke sensibiliserte. Mødre til sensibiliserte barn fikk også påvist høyere andel prøver med *icd-1* enn mødre til ikke sensibiliserte barn. Ved 2 års alder lå andelen prøver med *icd-1* rundt 10 % for sensibiliserte barn og rundt 15 % for de ikke-sensibiliserte barna (Figur 15).

B. fragilis-genotype *icd-2 – 7*

Mødrene til de ikke-sensibiliserte barna fikk påvist noe høyere andel *B. fragilis* med genotype *icd-2-7* enn for mødrene til de sensibiliserte barna. Det ble påvist noe større andel sensibiliserte barn med *icd-2-7* ved 4 mnd alder og 2-års alder, mens det ved 1-års alder ikke er påvist noen prøver med *icd-2-7* for de sensibiliserte barna (Figur 15).

Prøver uten påvist *B. fragilis*

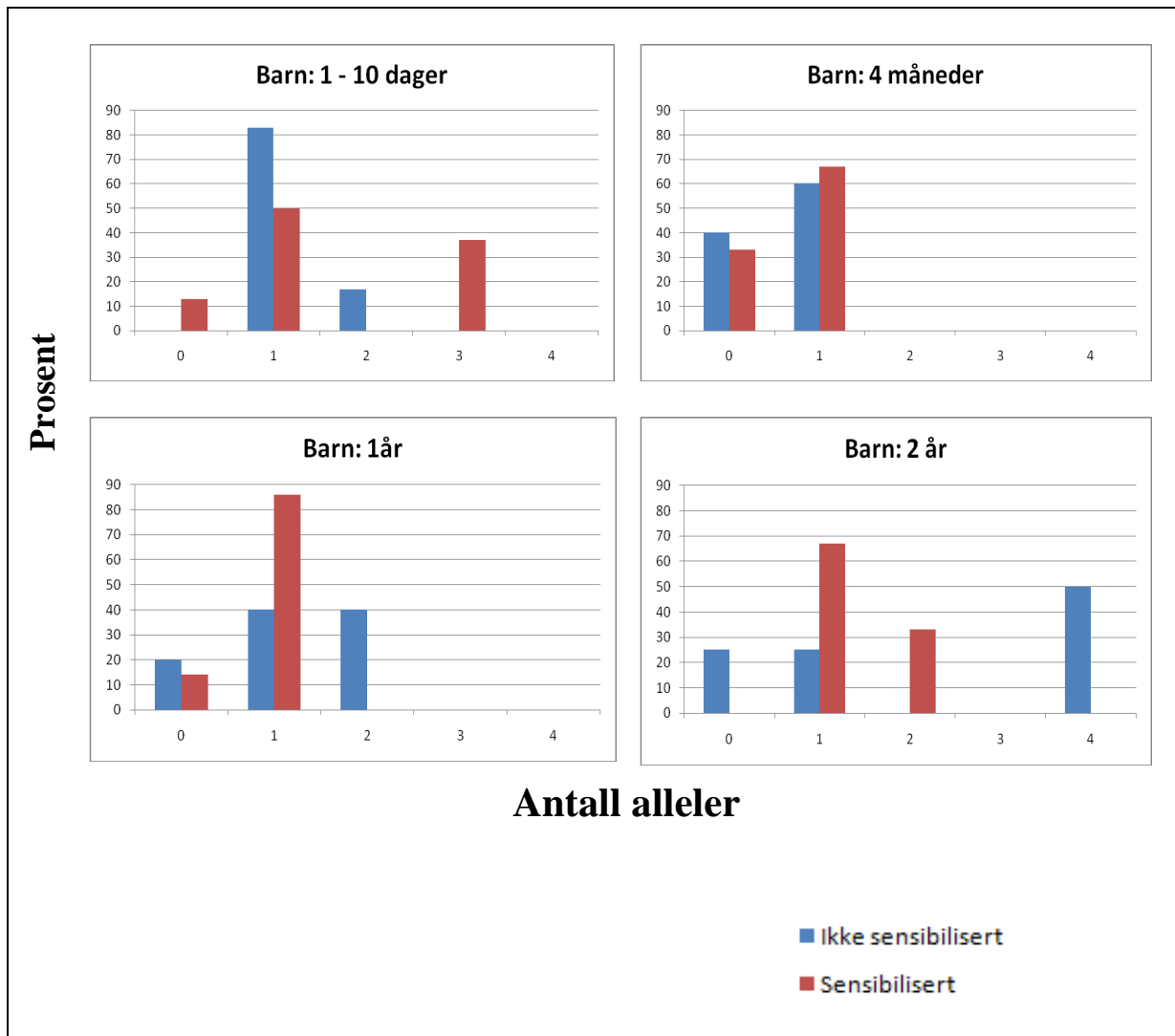
For barna som var sensibiliserte ved 2-års alder var det en lavere andel prøver uten påvist *B. fragilis* i alderskategoriene for mor, for 1 – 10 dager og for 4 måneder enn det var for de ikke-sensibiliserte barna. Ved 1- og 2-års alder ligger andelen for sensibiliserte og ikke-sensibiliserte barn omtrent likt (Figur 15).



Figur 15: IgE-sensibilisering og icd-genotyper. Figuren gir en oversikt over andelen prøver med påviste icd-genotyper i *B. fragilis* og andelen prøver uten påvist *B. fragilis* hos barn som var henholdsvis ikke-sensibiliserte og sensibiliserte ved 2-års alder. Blå søyler symboliserer genotypen icd-1, røde søyler symboliserer genotypene icd-2-7 og grønne søyler symboliserer prøver der det ikke har blitt påvist *B. fragilis*. (Terskelverdi for sensibilisering er beskrevet under Figur 7). Prøver uten opplysninger gjeldende sensibilisering er ikke medregnet i denne figuren. Figuren er basert på Figur 10 i vedlegg. $n(\text{mor})_{is} = 49$, $n(\text{mor})_s = 20$, $n(1-10\text{dg})_{is} = 46$, $n(1-10\text{dg})_s = 21$, $n(4\text{mnd})_{is} = 54$, $n(4\text{mnd})_s = 19$, $n(1\text{år})_{is} = 49$, $n(1\text{år})_s = 21$, $n(2\text{år})_{is} = 57$, $n(2\text{år})_s = 19$.

3.6.2 TRS1-genotyper og sensibilisering

For de 13 barna der det ble undersøkt TRS-genotyper, ble det påvist fra 0 til 4 TRS-alleler per prøve. Ved 1 – 10 dager er det størst andel ikke-sensibiliserte barn som har 1 og 2 TRS1-alleler, mens størst andel sensibiliserte barn med 0 og 3 alleler. Ved 4 måneder er det noe større andel ikke-sensibiliserte barn som ikke har fått påvist TRS1-alleler og noe større andel sensibiliserte barn med ett TRS1-allel. For 1- og 2-års alder er det høyere andel sensibiliserte barn med kun ett TRS1-allel påvist. Videre er det ved 1 års alder en større andel barn med to TRS1-alleler som ikke er sensibiliserte og ved 2 års alder en større andel barn med fire TRS1-alleler som ikke er sensibiliserte (Figur 16).



Figur 16: TRS1-genotyper og IgE sensibilisering Figuren viser antallet påviste TRS1-alleler (fra 0 til 4 stykker) hos sensibiliserte og ikke-sensibiliserte barn. De blå og røde søylene representerer henholdsvis ikke-sensibilisering og sensibilisering over en terskelverdi som forklart i Figur 7. 1-10dg; n (ikke sensibilisert) = 6, n (sensibilisert) = 8, 4mnd; n (ikke sensibilisert) = 5, n (sensibilisert) = 6, 1år; n (ikke sensibilisert) = 5, n (sensibilisert) = 7, 2år; n (ikke sensibilisert) = 4, n (sensibilisert) = 6

4. Diskusjon

4.1 Diversitet av *Bacteroides fragilis*

Genotyping ved sekvensering av *icd*-genet i avføringsprøvene i kohorten viste lav genetisk diversitet og flesteparten av de detekterte sekvensene både hos mødrene og hos barna var av typen *icd-1* (Figur 10). Vårt funn er kontroversielt i forhold til at *B. fragilis* er en foranderlig bakterie og at tidligere studier har identifisert stor diversitet hos *B. fragilis* (Claros et al. 1997; Eribe and Olsen 2000; Moraes et al. 1999; Podglajen et al. 1995; Sarma et al. 2000; Vallim et al. 2002). Vi hadde derfor ikke forventet å finne samme *icd*-genotype hos en så stor andel av deltakerne i vår studie. Prøvene i studien er hentet fra en kontrollkohort av friske individer og det ville derfor være grunn til å anta at et samspill mellom vertens immunforsvar og tarmbakterien som lever i nær tilknytning til vertens slimhinner ville vist større bakteriell diversitet som følge av samspill mellom vertens immunforsvar og bakteriens tilpassning. Ko et al. (2009) undersøkte de virulensrelaterte genfragmentene *rpoB*, *gyrB*, *pdiA* og *ompA* hos *B. fragilis* og fant høy genetisk diversitet i hvert lokus med henholdsvis 7, 11, 21 og 11 polymorfe seter. Prøvene var samlet inn fra to forskjellige land, Korea og Japan. Diversiteten i prøvene kan reflektere og en koevolusjon mellom den mutualistiske bakterien og vertenes mulige genetiske forskjeller i befolkningsgruppene i de to landene. Studien opplyser ikke om prøvene er hentet fra tarmen til friske individer eller om de er samlet inn fra infeksjoner. Vi ville forventet en større diversitet i prøver hentet fra friske individer enn i prøver fra en eventuell infeksjon. MLST kan noen ganger mangle evne til å skille bakteriestammer fra hverandre på grunn av konservering av sekvenser for husholdningsgener eller redusert genetisk diversitet som følge av en evolusjonær prosess (Hunter and Gaston 1988; Sreevatsan et al. 1997). Et spørsmål kan derfor være om sekvenser i husholdningsgenet *icd* er konserverte eller at innsamling av prøver fra et avgrenset område Norge kan ha betydning for diversiteten. Virulens gener har gitt høyere andel av nukleotidpolymorfisme enn husholdningsgener (Zhang et al. 2004) og multi-virulens-lokus sekvens-typing (MVLST) kunne kanskje vært en måte vi kunne prøvd å skille stammene fra hverandre på.

TRS lokus er i stor grad polymorfe mellom individer (van Belkum et al. 1998). Vi valgte derfor å utvikle et genotypingsverktøy ved bruk av TRS hos et utvalg av mor/barn prøver med stabil *icd-1* genotype. Ved bruk av TRS1-genotypingen ble det påvist stor diversitet, både for TRS1 genotypet direkte i avføringsprøvene og fra dyrkingsforsøk (Tabell 7).

Ved TRS1-genotypingen ble det funnet flere prøver der det ble påvist mer enn én *B. fragilis* stamme (Tabell 5, Tabell 6, Figur 13). På grunn av at det kan være flere forskjellige *B. fragilis* stammer til stede i tarmen, var dette forventet der PCR-amplifisering ble utført rett i avføringsprøvene. Vi hadde også kunnet forvente noen grad av blandingssekvenser ved *icd*-genotypingen, men det ble ikke påvist. Dette kan skyldes at det ble lav diversitet påvist ved *icd*-genotypingen.

Ved konstruksjon av artsspesifikke primere for sekvenser i målorganismen, kan PCR-amplifisering brukes for bakteriell identifikasjon direkte i prøver med blandingssekvenser (Ahmed et al. 2008; Condon and Oakey 2007) eller i isolater fra dyrkingskulturer (Fortina et al. 2007; Kardos et al. 2007). Før bruk av TRS-genotyping til for eksempel karakterisering av bakterier ved en epidemi, er det nødvendig å teste ut stabilitet og reproducerbarhet til valg av loci som skal genotypes og primere som er konstruert (Lindstedt 2005). Ved re-typing etter ny PCR-amplifisering av TRS1 ble det i noen prøver påvist ett eller flere andre alleler i tillegg til et dominerende allel som ble amplifisert hver gang (Tabell 5). Dette kan skyldes at PCR-artefakter kan underrepresentere diversiteten i en prøve. Dersom det for eksempel er få templatere av ett eller flere slag til stede i prøven, kan det være tilfeldig hvilke som blir hybridisert til primerne i de aller første syklusene i PCR-reaksjonen og dermed blir amplifisert i så stor grad at de er detekterbare. Fra en eventuell dominerende stamme vil det være tilstrekkelig mengde templat i prøven til at templatet blir amplifisert og påvist ved hver re-typing. PCR-artefakter kan på den annen side overrepresentere diversiteten i en prøve. Dette tror vi er lite sannsynlig i våre TRS1-fragmenter da den tandemrepeterende sekvensen er kort og siden det i stor grad var delesjonsmønsteret foran TRS-en som har gitt variasjonen i fragmentlengdene (Tabell 9). Ved korte TRS-er er det mindre sjans for feilamplifisering av antallet tandemrepetisjoner som skyldes polymerasens bevegelser langs templattråden (Dettman and Taylor 2004; Shinde et al. 2003).

Det er tidligere vist at tarmisolater av *B. fragilis* skilte ut høye nivåer av bakteriociner, mens de selv var resistente mot bakteriociner skilt ut av andre *B. fragilis* stammer. Denne spesifisiteten er typisk for bakteriociner som bindes til spesifikke reseptorer og de angriper

arter eller stammer nært beslektet med produsenten. Dette er antatt å redusere konkurransen mellom stammer som okkuperer samme økologiske nisje (Avelar et al. 1999; Mossie et al. 1981). Bakteriocinproduksjon kan være en forklaring på at det er en dominerende *B. fragilis* stamme påvist i noen prøver og at disse bidrar til å holde andre *B. fragilis* på et lavt nivå.

Det ble vist en noe større diversitet ved TRS1-genotyping av avføringsprøver dyrket på *Bacteroides fragilis* gruppe selektivt medium enn ved PCR-amplifisering av TRS1 direkte i avføringsprøvene (Tabell 6). Dette kan skyldes at stammer som er konkurransedyktige, men som i tarmen for eksempel holdes nede av vertens immunforsvar, vil ha en eksponentiell vekst når de ikke utsettes for denne seleksjonen.

4.2 Overføring av *Bacteroides fragilis* fra mor til barn og persistens hos bakterien

Bakterier fra moren som barnet kommer i kontakt med i forbindelse med en vaginal fødsel er vanlig kilder til den første koloniseringen hos barnet (Bennet and Nord 1987; Fryklund et al. 1992; Gronlund et al. 1999; Tannock et al. 1990). *Bacteroides* arter kan dukke opp i spedbarnstarmen i løpet av den første uken (Adlerberth et al. 2006; Stark and Lee 1982) og koloniserer vanligvis barnet i løpet av de første månedene etter fødselen (Mazmanian et al. 2008).

Det er tidligere foretatt veldig få studier som undersøker koloniseringsmønstrene til *B. fragilis* hos spedbarn og så vidt vi vet er det ingen andre som har studert overføring av *B. fragilis* fra mor til barn og persistensen til denne bakterien i spedbarnstarmen fram til 2-års alder. Våre funn viser at *B. fragilis* med genotypen *icd-1* overføres fra mor til barn (Figur 9, Figur 11 og Tabell 3). Andelen av mødre og barn som hadde samme *B. fragilis* stamme er i samsvar med andelen mødre og barn med like *E. coli* stammer påvist i tidligere studier (Gothefors et al. 1976; Mandar and Mikelsaar 1996). I prøvene som ble utvalgt til TRS1-genotyping ble det tydelig vist at *B. fragilis* overføres fra mor til barn og at bakterien var persistent i alle de fire alderskategoriene hos barnet (Figur 14).

Det var på grensen til signifikans for sammenheng mellom mors og barnets *icd-1* genotyper i aldersgruppen 1- 10 dager. Oppover i alderskategoriene øker p-verdiene gradvis (Tabell 3). Dette tyder på at *B. fragilis* av genotypen *icd-1* overføres fra mor til barn og koloniserer

barnet den første tiden, men at barnet etter hvert etableres av egne *B. fragilis* stammer. For TRS1-genotypingen ble det påvist signifikante p-verdier i alle alderskategoriene (Tabell 8). Selv om den høyeste p-verdien fremdeles er godt innenfor grensen til signifikans, ser vi også her at p-verdiene øker gradvis for hver aldergruppe. Dette støtter hypotesen om at barnet etter hvert koloniseres av egne *B. fragilis* stammer. Tidligere studier har vist at barnet over tid utvikler sin egen tarmflora (Palmer et al. 2007).

For TRS1-genotypingen forkastet vi nullhypotesen på bakgrunn av p-verdier $< 0,05$. Dette gjelder gitt at frekvensen av alle genotyper er like. Denne antagelsen er gjort på grunn av at hver genotype foreligger i et så lite antall.

Ved sekvensering og multipl sekvenssammenstilling av TRS1-allelene ble det oppdaget at forskjellen i fragmentlengder påvist ved kapillærelektroforese skyldtes både variasjoner i tandemrepetisjoner og at det var et mønster av nukleotider i området rett foran tandemrepetisjonene som fantes i noen av sekvensene, men som manglet i andre (Tabell 9 og vedlegg: Vedlegg 5) Områder som brukes til TRS-genotyping bør generelt være nøytrale og ikke endres av for eksempel innskuddssekvenser (IS-elementer) eller andre transposoner (Lindstedt 2005). I dette prosjektet brukte vi TRS1-genotypingen til subtyping av en stabil *icd*-genotype, og det ble påvist både diversitet og persistens ved analyse av disse TRS1-fragmentene (Figur 14 og Tabell 8).

B. fragilis er en bakterie som har stor evne til å tilpasse seg til omgivelsene (Coyne et al. 2008; Liu et al. 2008). Regulering av overflatemolekyler hos *B. fragilis* ser ut til å ha viktige funksjoner for bakteriens kolonisering i tarmen (Liu et al. 2008). I tillegg har glykosylering stor betydning for konkurransen med andre arter i tarmen (Fletcher et al. 2009). Vi forventet derfor at bakterien skulle være stabilt til stede i tarmen etter kolonisering. For *B. fragilis* genotypet ved TRS1 påviste vi en høy grad av persistens helt fram til 2 år (Tabell 8).

4.3 *Bacteroides fragilis* og IgE-sensibilisering

Det er tidligere vist sammenheng mellom *B. fragilis* kolonisering av tarmen og utvikling av allergi (Bjorksten et al. 2001; Kalliomaki et al. 2001; Murray et al. 2005; Penders et al. 2007). Vi undersøkte derfor om vi kunne finne sammenhenger mellom IgE-sensibilisering ved 2-års alder og icd- og TRS1-genotyper påvist hos barnet. Våre resultater viser en tendens i retning av at barn som fikk påvist *B. fragilis* genotype icd-1 i aldersgruppene 1-10 dager og 4 måneder var sensibiliserte ved 2-års alder (Figur 15). Hos de ikke-sensibiliserte barna så vi en tendens til at de var kolonisert med flere forskjellige *B. fragilis* TRS1-genotyper ved 1- og 2-års alder enn de som var sensibiliserte (Tabell 5). Dette resultatet kan tyde på at det er TRS1 diversiteten ved 1- og 2-års alder, og ikke hvilken TRS1-genotype barnet har, som er avgjørende for sensibilisering. Vårt materiale er likevel for lite til å trekke noen konklusjon basert på disse resultatene. I en nylig utført svensk studie ble det konkludert med at en stor diversitet i tarmfloraen tidlig i livet kan forebygge utvikling av allergi (Sjogren et al. 2009). Det er antydning at en tidlig *B. fragilis* kolonisering kan være forutgående for en mulig utvikling av astma senere i livet (Vael et al. 2008). Det ville derfor være interessant for videre studier å undersøke om TRS1-diversiteten hos flere av barna i IMPACT materialet for å finne ut om den er signifikant i forbindelse med sensibilisering.

Adlerberth et al. (2007) kunne i sin studie ikke knytte utvikling av atopisk eksem eller IgE-sensibilisering til noen spesiell bakterie gruppe. I en studie av sammenhengen mellom tarmflora og allergi utført i Estland og Sverige, to land med ulik levestandard og forskjellig forekomst av allergi, ble lav andel av *Bacteroides* forbundet med lavere forekomst av allergi i løpet av første og andre leveår (Bjorksten et al. 1999; Bjorksten et al. 2001). Ved 5-års alder ble mengden *Bacteroides* i avføringsprøver hos ikke-allergiske estiske barn forbundet med høyere IgE-konsentrasjoner i serum. Den høye andelen *Bacteroides* virker å være assosiert med nedregulering av allergisk respons til tross for et forhøyet nivå av total IgE-konsentrasjon (Sepp et al. 2005).

4.4 Gen som koder for 5,10-metylentetrahydrofolat reduktase

Ved søk i NCBI databasen for *B. fragilis* NCTC 9343 (NC 003228) og *B. fragilis* YHC46 (NC 006347) i områdene rundt *TRS1*-fragmentene fant vi overraskende nok et vi gen som koder for enzymet 5,10-metylenetetrahydrofolat reduktase nedstrøms for den tandemrepeterende sekvensen. Dette enzymet reduserer 5,10-metylentetrahydrofolat til 5-metyltetrafolat, som er den aktive formen for folat (Moat et al. 2004; Stanger 2002). Mangel på folat kan gi forhøyede verdier av homocystein i blodplasma. Homocystein er en aminosyre som ved forhøyede verdier i blodplasma blant annet er forbundet med hjerte- og karsykdommer (Selhub et al. 1993; Ubbink et al. 1993). Økte homocysteinivåer hos mor under svangerskapet er en risikofaktor for utvikling nevrallrørsdefekter hos fosteret, og folattilskudd er anbefalt både før graviditet og i løpet av de første månedene av svangerskapet (Hague 2003). Folat produsert av bakterier i tarmen blir absorbert av verten. Hvor stor del av dagsbehovet for folat som blir dekket av tarmbakterier er ukjent, men det antas at det bare er en mindre del (Dudeja et al. 1997).

4.5 Forslag til videre studier

Det ville vært interessant å undersøke IMPACT-materialet ved bruk av flere MLST-gener og tandemrepeterende områder. Det ville styrke våre observasjoner å ha data fra flere enn ett gen og ett tandemrepeterende område da *icd*- og *TRS1*-fragmentene ikke nødvendigvis vil representere hele genomet. I det videre arbeidet ville det også vært interessant og genomsekvensere noen av stammene fra forskjellige alderskategorier ved bruk av for eksempel 454 sekvensering eller illumina. Begge disse metodene unngår kloning av DNA-fragmenter ved at de er basert på parallell amplifisering av genomiske DNA-fragmenter og en etterfølgende sekvensering av disse. Dette ville gitt et solid grunnlag for å vurdere hvor like *B. fragilis*-stammene er hos barnet i de ulike alderskategoriene og for å følge utviklingen av bakteriestammene.

Noen TRS hos prokaryote arter har en betydning for bakteriell tilpassning (Bichara et al. 2006). Variasjonen i TRS kan skyldes at den er under seleksjon eller at de er tilstede kodende regioner eller en promotor (Lindstedt 2005). *TRS1*-genotypen er ikke nødvendigvis nøytral,

og undersøkelse av genuttrykk for genet 5,10-metylentetrahydrofolat-reduktase kan vise om ulike delesjonsmønstre i området rett foran tandemrepetisjonene har betydning for transkripsjonen.

5. Konklusjon

I forbindelse med denne oppgaven har vi utviklet metoder for genotyping av *Bacteroides fragilis* ved bruk av multilokus sekvenstyping (MLST) for husholdningsgenene *icd*, *gyrB*, *adk*, *mdh*, *purA* og *recA* og bruk av hypervariable tandem repeterende sekvenser (TRS).

Våre resultater viser at *B. fragilis* overføres fra mor til barn, med signifikante p-verdier for TRS1-genotyper. De signifikante p-verdiene viser også at stammene er persistente. P-verdier for *icd-1* genotypene var også på grensen til signifikans for aldersgruppen 1 - 10 dager. Det ble bruk av TRS1-genotyping påvist stor diversitet i et utvalg av prøvene.

Våre resultater viser en mulig sammenheng mellom barn kolonisert med *B. fragilis* genotype *icd-1* i aldersgruppene 1 - 10 dager og 4 måneder og sensibilisering ved 2-års alder. For TRS1 var det en mulig tendens til at det hos ikke-sensibiliserte barn ble påvist flere *B. fragilis* stammer ved 1- og 2-års alder. Datasettet disse resultatene bygger på er likevel for lite til at vi kan komme med noen konklusjon gjeldende sensibilisering.

Litteraturliste

- Adlerberth I, Carlsson B, Deman P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, Mellander L, Svanborg C, Wold AE, Hanson LA. 1991. **INTESTINAL COLONIZATION WITH ENTEROBACTERIACEAE IN PAKISTANI AND SWEDISH HOSPITAL-DELIVERED INFANTS.** *Acta Paediatrica Scandinavica* 80(6-7):602-610.
- Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Wold AE. 2006. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatric Research* 59(1):96-101.
- Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrne S, Orfei L, Aberg N, Perkin MR, Tripodi S, Hesselmar B, Saalman R and others. 2007. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(2):343-350.
- Ahmed W, Stewart J, Powell D, Gardner T. 2008. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. *Letters in Applied Microbiology* 46(2):237-242.
- Albuquerque P, Mendes MV, Santos CL, Moradas-Ferreira P, Tavares F. 2009. DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Science of the Total Environment* 407(12):3641-3651.
- Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR. 1991. **SUSCEPTIBILITIES OF 394 BACTEROIDES-FRAGILIS, NON-B-FRAGILIS GROUP BACTEROIDES SPECIES, AND FUSOBACTERIUM SPECIES TO NEWER ANTIMICROBIAL AGENTS.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(6):1214-1218.
- Avelar KES, Pinto LJJ, Antunes LCM, Lobo LA, Bastos MCF, Domingues R, Ferreira MCD. 1999. Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. *Letters in Applied Microbiology* 29(4):264-268.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915-1920.
- Bayne CJ. 2003. Origins and evolutionary relationships between the innate and adaptive arms of immune systems. *Integrative and Comparative Biology* 43(2):293-299.
- Bengmark S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42(1):2-7.
- Bennet R, Nord CE. 1987. **DEVELOPMENT OF THE FECAL ANAEROBIC MICROFLORA AFTER CESAREAN-SECTION AND TREATMENT WITH ANTIBIOTICS IN NEWBORN-INFANTS.** *Infection* 15(5):332-336.
- Berg RD. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4(11):430-435.
- Bichara M, Wagner J, Lambert IB. 2006. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 598(1-2):144-163.
- Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy* 29(3):342-346.
- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108(4):516-520.
- Bottcher MF, Bjorksten B, Gustafson S, Voor T, Jenmalm MC. 2003. Endotoxin levels in Estonian and Swedish house dust and atopy in infancy. *Clinical and Experimental Allergy* 33(3):295-300.

- Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A and others. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *New England Journal of Medicine* 347(12):869-877.
- Cebra JJ. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *American Journal of Clinical Nutrition* 69(5):1046S-1051S.
- Chan MS, Maiden MCJ, Spratt BG. 2001. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 17(11):1077-1083.
- Cipollone R, Frangipani E, Federica T, Imperi F, Ascenzi P, Visca P. 2007. Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* rhodanese in protection from cyanide toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 73(2):390-398.
- Claros MC, Gerardo SH, Citron DM, Goldstein EJC, Schonian G, Rodloff AC. 1997. Use of polymerase chain reaction fingerprinting to compare clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* from Germany and the United States. *Clinical Infectious Diseases* 25:S295-S298.
- Condon K, Oakey J. 2007. Detection of Chlamydiaceae DNA in veterinary specimens using a family-specific PCR. *Letters in Applied Microbiology* 45(2):121-127.
- Conroy ME, Shi HN, Walker WA. 2009. The long-term health effects of neonatal microbial flora. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9(3):197-201.
- Coyne MJ, Chatzidaki-Livanis M, Paoletti LC, Comstock LE. 2008. Role of glycan synthesis in colonization of the mammalian gut by the bacterial symbiont *Bacteroides fragilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(35):13099-13104.
- Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN. 1996. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *British Journal of Nutrition* 75(5):733-747.
- Dettman JR, Taylor JW. 2004. Mutation and evolution of microsatellite loci in *Neurospora*. *Genetics* 168(3):1231-1248.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148(4):1667-1686.
- Dudeja PK, Torania SA, Said HM. 1997. Evidence for the existence of a carrier-mediated folate uptake mechanism in human colonic luminal membranes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 272(6):G1408-G1415.
- Duran C, Appleby N, Edwards D, Batley J. 2009. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. *Current Bioinformatics* 4(1):16-27.
- Enright MC, Spratt BG. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* 7(12):482-487.
- Eribe ER, Olsen I. 2000. Strain differentiation in *Bacteroides fragilis* by ribotyping and computer-assisted gel analysis. *Apmis* 108(6):429-438.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica* 92:48-55.
- Fernandez AS, Hashsham SA, Dollhopf SL, Raskin L, Glagoleva O, Dazzo FB, Hickey RF, Criddle CS, Tiedje JM. 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9):4058-4067.
- Finegold SM. 1995. OVERVIEW OF CLINICALLY IMPORTANT ANAEROBES. *Clinical Infectious Diseases* 20:S205-S207.
- Fletcher CM, Coyne MJ, Villa OF, Chatzidaki-Livanis M, Comstock LE. 2009. A General O-Glycosylation System Important to the Physiology of a Major Human Intestinal Symbiont. *Cell* 137(2):321-331.

- Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology* 6(2):121-131.
- Fortina MG, Ricci G, Borgo F, Manachini PL. 2007. Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. *Letters in Applied Microbiology* 44(4):443-446.
- Fryklund B, Tullus K, Berglund B, Burman LG. 1992. IMPORTANCE OF THE ENVIRONMENT AND THE FECAL FLORA OF INFANTS, NURSING STAFF AND PARENTS AS SOURCES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA COLONIZING NEWBORNS IN 3 NEONATAL WARDS. *Infection* 20(5):253-257.
- Gibson SAW, Macfarlane GT. 1988. CHARACTERIZATION OF PROTEASES FORMED BY *BACTEROIDES-FRAGILIS*. *Journal of General Microbiology* 134:2231-2240.
- Gothefors L, Carlsson B, Ahlstedt S, Hanson LA, Winberg J. 1976. INFLUENCE OF MATERNAL GUT FLORA AND COLOSTRAL AND CORD SERUM ANTIBODIES ON PRESENCE OF *ESCHERICHIA-COLI* IN FECES OF NEWBORN-INFANT. *Acta Paediatrica Scandinavica* 65(2):225-232.
- Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: Permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 28(1):19-25.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361(9356):512-519.
- Hague WM. 2003. Homocysteine and pregnancy. *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology* 17(3):459-469.
- Hattori M, Taylor TD. 2009. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA Research* 16(1):1-12.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292(5519):1115-1118.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 22:283-307.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. NUMERICAL INDEX OF THE DISCRIMINATORY ABILITY OF TYPING SYSTEMS - AN APPLICATION OF SIMPSONS INDEX OF DIVERSITY. *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2465-2466.
- Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107(1):129-134.
- Kardos G, Farkas T, Antal M, Nogrady N, Kiss I. 2007. Novel PCR assay for identification of *Salmonella enterica* serovar *Infantis*. *Letters in Applied Microbiology* 45(4):421-425.
- Ko KS, Kuwahara T, Lee K, Kook YH. 2009. Population structure and distribution of virulence-related genes of *Bacteroides fragilis* isolates from Korea and Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64(3):340-343.
- Kolpakov R, Bana G, Kucherov G. 2003. mreps: efficient and flexible detection of tandem repeats in DNA. *Nucleic Acids Research* 31(13):3672-3678.
- Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. 2001. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 414(6863):555-558.

- Kuwahara T, Yamashita A, Hirakawa H, Nakayama H, Toh H, Okada N, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Ohnishi Y. 2004. Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41):14919-14924.
- Laishram RS, Gowrishankar J. 2007. Environmental regulation operating at the promoter clearance step of bacterial transcription. *Genes & Development* 21(10):1258-1272.
- Liao PY, Lee KH. 2010. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochemical Engineering Journal* 49(2):149-158.
- Lindstedt BA. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26(13):2567-2582.
- Liu CH, Lee SM, VanLare JM, Kasper DL, Mazmanian SK. 2008. Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(10):3951-3956.
- Liu ZJ, Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238(1-4):1-37.
- MacDonald TT, Gordon JN. 2005. Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Gastroenterology Clinics of North America* 34(3):401-+.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 69(5):1035S-1045S.
- Maggi E. 1998. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* 3(4):233-244.
- Maiden MCJ. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60:561-588.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou JJ, Zurth K, Caugant DA and others. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6):3140-3145.
- Mandar R, Mikelsaar M. 1996. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biology of the Neonate* 69(1):30-35.
- Mazmanian SK, Kasper DL. 2006. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nature Reviews Immunology* 6(11):849-858.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122(1):107-118.
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453(7195):620-625.
- Moat SJ, Lang D, McDowell IFW, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J. 2004. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15(2):64-79.
- Moraes SR, Goncalves RB, Mouton C, Seldin L, Ferreira MCD, Domingues R. 1999. *Bacteroides fragilis* isolates compared by AP-PCR. *Research in Microbiology* 150(4):257-263.
- Mossie KG, Robb FT, Jones DT, Woods DR. 1981. INHIBITION OF RIBONUCLEIC-ACID POLYMERASE BY A BACTERIOCIN FROM *BACTEROIDES-FRAGILIS*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 20(4):437-442.

- Murray CS, Tannock GW, Simon MA, Harmsen HJM, Welling GW, Custovic A, Woodcock A. 2005. Fecal microbiota in sensitized wheezy and non-sensitized non-wheezy children: a nested case-control study. *Clinical and Experimental Allergy* 35(6):741-745.
- Myers LL, Shoop DS, Collins JE. 1990. RABBIT MODEL TO EVALUATE ENTEROVIRULENCE OF BACTEROIDES-FRAGILIS. *Journal of Clinical Microbiology* 28(7):1658-1660.
- Namavar F, Theunissen EBM, Verweijvanvught A, Peerbooms PGH, Bal M, Hoitsma HFW, Maclaren DM. 1989. EPIDEMIOLOGY OF THE BACTEROIDES-FRAGILIS GROUP IN THE COLONIC FLORA IN 10 PATIENTS WITH COLONIC-CANCER. *Journal of Medical Microbiology* 29(3):171-176.
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Medicine* 8(6):567-573.
- Noverr MC, Huffnagle GB. 2005. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy* 35(12):1511-1520.
- Ochman H, Elwyn S, Moran NA. 1999. Calibrating bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(22):12638-12643.
- Odamaki T, Xiao JZ, Iwabuchi N, Sakamoto M, Takahashi N, Kondo S, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto T and others. 2007. Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 17(2):92-100.
- Oien T, Storro O, Johnsen R. 2006. Intestinal microbiota and its effect on the immune system - A nested case-cohort study on prevention of atopy among small children in Trondheim: The IMPACT study. *Contemporary Clinical Trials* 27(4):389-395.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biology* 5(7):1556-1573.
- Pamer EG. 2007. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nature Immunology* 8(11):1173-1178.
- Park JK, Okamoto T, Yamasaki Y, Tanaka K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. 1997. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and regulation of the *chiA* gene encoding one of chitinases from *Enterobacter* sp. G-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84(6):493-501.
- Parniewski P, Staczek P. 2002. Molecular mechanisms of TRS instability. *Triple Repeat Diseases of the Nervous Systems*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ. p 1-25.
- Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. 2007. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 56(5):661-667.
- Pipe A, Botturi K, Pinot D, Vervloet D, Magnan A. 2009. Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. Mechanisms and proof of efficacy. *Respiratory Medicine* 103(6):800-812.
- Podglajen I, Breuil J, Casin I, Collatz E. 1995. GENOTYPIC IDENTIFICATION OF 2 GROUPS WITHIN THE SPECIES BACTEROIDES-FRAGILIS BY RIBOTYPING AND BY ANALYSIS OF PCR-GENERATED FRAGMENT PATTERNS AND INSERTION-SEQUENCE CONTENT. *Journal of Bacteriology* 177(18):5270-5275.
- Pumbwe L, Skilbeck CA, Wexler HM. 2006. The *Bacteroides fragilis* cell envelope: Quarterback, linebacker, coach-or all three? *Anaerobe* 12(5-6):211-220.
- Reid G. 2004. When microbe meets human. *Clinical Infectious Diseases* 39(6):827-830.

- Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE. 2009. Allergen-related approaches to immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* 121(3):273-284.
- Salyers AA, Vercellotti JR, West SEH, Wilkins TD. 1977. FERMENTATION OF MUCIN AND PLANT POLYSACCHARIDES BY STRAINS OF BACTEROIDES FROM HUMAN COLON. *Applied and Environmental Microbiology* 33(2):319-322.
- Sarma PN, Tang YJ, Prindiville TP, Osborne PD, Jang S, Silva J, Cohen SH. 2000. Genotyping of *Bacteroides fragilis* isolates from stool specimens by arbitrarily-primed-PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37(4):225-229.
- Savage DC. 1977. MICROBIAL ECOLOGY OF GASTROINTESTINAL-TRACT. *Annual Review of Microbiology* 31:107-133.
- Sears CL. 2005. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe* 11(5):247-251.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. 1993. VITAMIN STATUS AND INTAKE AS PRIMARY DETERMINANTS OF HOMOCYSTEINEMIA IN AN ELDERLY POPULATION. *Jama-Journal of the American Medical Association* 270(22):2693-2698.
- Sepp E, Julge K, Mikelsaar M, Bjorksten B. 2005. Intestinal microbiota and immunoglobulin E responses in 5-year-old Estonian children. *Clinical and Experimental Allergy* 35(9):1141-1146.
- Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Bjorksten B, Mikelsaar M. 1997. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatrica* 86(9):956-961.
- Serino M, Luche E, Chabo C, Amar J, Burcelin R. 2009. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes & Metabolism* 35(4):262-272.
- Shinde D, Lai YL, Sun FZ, Arnheim N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acids Research* 31(3):974-980.
- Simon GL, Gorbach SL. 1984. INTESTINAL FLORA IN HEALTH AND DISEASE. *Gastroenterology* 86(1):174-193.
- Simons FER. 2009. Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124(4):625-636.
- Sjogren YM, Jenmalm MC, Bottcher MF, Bjorksten B, Sverremark-Ekstrom E. 2009. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and Experimental Allergy* 39(4):518-526.
- Skanseng B, Kaldhusdal M, Rudi K. 2006. Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Molecular and Cellular Probes* 20(5):269-279.
- Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307(5717):1955-1959.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(18):9869-9874.
- Stanger O. 2002. Physiology of folic acid in health and disease. *Current Drug Metabolism* 3(2):211-223.
- Stark PL, Lee A. 1982. THE MICROBIAL ECOLOGY OF THE LARGE BOWEL OF BREAST-FED AND FORMULA-FED INFANTS DURING THE 1ST YEAR OF LIFE. *Journal of Medical Microbiology* 15(2):189-203.
- Storrø O, Øien T, Johnsen R. 2006. Barneallergistudien i Trondheim - PACT: Hva kan vi lære av intervensjonsstudien? *ALLERGI I PRAKSIS*(3):38 - 41.

- Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. 1990. PLASMID PROFILING OF MEMBERS OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE, LACTOBACILLI, AND BIFIDOBACTERIA TO STUDY THE TRANSMISSION OF BACTERIA FROM MOTHER TO INFANT. *Journal of Clinical Microbiology* 28(6):1225-1228.
- Taylor JW, Fisher MC. 2003. Fungal multilocus sequence typing - it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6(4):351-356.
- Ubbink JB, Vermaak WJH, Vandermerwe A, Becker PJ. 1993. VITAMIN-B12, VITAMIN-B6, AND FOLATE NUTRITIONAL-STATUS IN MEN WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA. *American Journal of Clinical Nutrition* 57(1):47-53.
- Vael C, Nelen V, Verhulst SL, Goossens H, Desager KN. 2008. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BioMedCentral* 8(19).
- Vallim DC, Oliveira ICM, Antunes ENF, Ferreira EO, Moraes SR, Paula GR, Silva-Carvalho MC, Figueiredo AMS, Ferreira MCS, Domingues R. 2002. Evaluation of genetic relatedness of *Bacteroides fragilis* strains isolated from different sources by AP-PCR and pulsed-field gel electrophoresis assays. *Anaerobe* 8(4):192-199.
- van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(2):275-+.
- Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P. 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Bacteriology* 188(12):4253-4263.
- Vogler AJ, Keys CE, Allender C, Bailey I, Girard J, Pearson T, Smith KL, Wagner DM, Keim P. 2007. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 616(1-2):145-158.
- Wexler HM. 2007. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews* 20(4):593-+.
- Wirth T, Falush D, Lan RT, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MCJ, Ochman H and others. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* 60(5):1136-1151.
- Woodfolk JA. 2007. T-cell responses to allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119(2):280-294.
- Xu J, Gordon JI. 2003. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(18):10452-10459.
- Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ. 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(2):913-920.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10):3854-3859.

Vedlegg:

Vedlegg 1: Detaljert oversikt over icd-genotypene påvist ved sekvensering i denne studien

Genotypene er basert på samme mutasjonskompleks som i Figur 5. Økende mørkhet i fargede ruter korresponderer med økende mengde amplifisert produkt (som tidligere beskrevet i Figur 6). Sensibilisering ved 2-års alder er anvist ved s for spesifikke IgE verdier over terskelverdi på 0,35kUa/l (kiloUnits of antibody per liter) og is for IgE verdier under terskelverdi. Manglende opplysninger gjeldende sensibilisering er anvist ved symbolet: / Kolonne1: Mødrenes prøver fra svangerskapsuke 11 – 13, kolonne 2: Mødrenes prøver fra svangerskapsuke 34 – 40. De videre kolonnene inneholder icd-genotyper påvist i prøver tatt fra barna med; kolonne 3: 1,5 dag, kolonne 4: 4 dager, kolonne 5: 7 dager, kolonne 6: 10 dager, kolonne 7: 4 måneder, kolonne 8: 1 år og kolonne 9: 2 år.

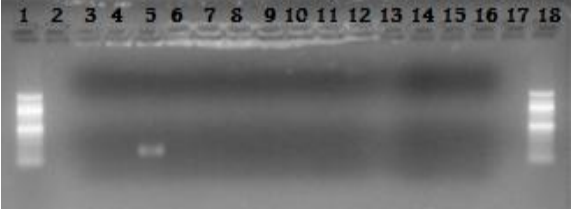
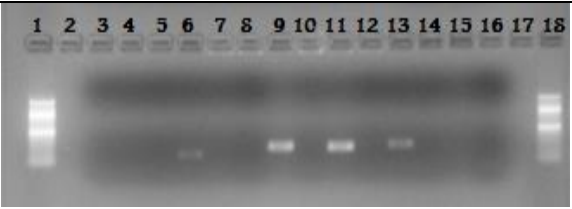


icd-genotyper påvist hos ikke-sensibiliserte barn:										
Barn id:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
115		0	0	0	0	0	0	0	0	is
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
317	0						0	0	0	is
1134	0	0	0	0	0				0	is
1261	0	0	0	0	0				0	is
1308	0	0							0	is
1317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1318		0	0		0				0	is
1319	0						0	0	0	is
1342				0					0	is
1368	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1384	0		0				0	0	0	is
1391	0	0	0				0	0	0	is
1394	0		0	0	0	0	0	0	0	is
1414	0	0					0	0	0	is
1471	0	0					0	0	0	is
1478							0	0	0	is
1537	0						0	0	0	is
1628	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1629	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1630			0	0	0	0	0	0	0	is
1660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1713	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1807	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1864	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1870	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is
1891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	is

icd-genotyper påvist hos sensibiliserte barn og barn uten informasjon gjeldende sensibilisering:										
Barn id:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
1230			0	0	0	0	0	0	0	s
1315	0			0	0	0	0	0	0	s
1360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
1483	0		0	0	0	0	0	0	0	s
1499	0		0	0	0	0	0	0	0	s
1551		0					0	0	0	s
1725	0	0						0	0	s
1768	0	0	0	0	0			0	0	s
1904	0		0		0	0	0	0	0	s
1956	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
1970	0						0	0	0	s
1984	0						0	0	0	s
1997	0	0		0	0	0	0	0	0	s
2103	0			0	0	0	0	0	0	s
2411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
2652	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
2236							0	0	0	/
2575								0	0	/
1145							0	0	0	s
1353	0							0	0	s
1370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
1616	0	0	0	0	0	0	0	0	0	s
2425	0	0			0	0	0	0	0	s
839										/
1385	0	0					0	0	0	/
1854	0									/

Fargenøkkel for tolkning av Vedlegg 1: Farge og fargeintensitet angir icd-genotypene påvist ved sekvensering og båndintensiteten for amplifiserte produkter påvist ved visualisering i agarosegel.				
Genotype	Meget svak båndintensitet	Svak båndintensitet	Sterk båndintensitet	Meget sterk båndintensitet
icd-1				
icd-2				
icd-3				
icd-4				
icd-5				
icd-6				
icd-7				

Vedlegg 2: PCR-amplifiserte TRS-produkter

PCR-produkter fra primer 1, 2 og 3 for TRS visualisert i 1,5 % agarosegel analysert ved 90 volt i 40 minutter.

Rad		
1		Brønn 1: Molekylvekt Brønn 2: Tom Brønn 3: a1-prim2 Brønn 4: b1-prim2 Brønn 5: c1-prim2 Brønn 6: d1-prim2 Brønn 7: e1-prim2 Brønn 8: f1-prim 2 Brønn 9: pr1-prim 2 Brønn 10: pr2ny-prim2 Brønn 11: pr3-prim2 Brønn 12: pr4-prim2 Brønn 13: pr5-prim2 Brønn 14: pr6ny-prim2 Brønn 15: pr1ny-prim2 Brønn 16: pr2-prim2 Brønn 17: Tom Brønn 18: Molekylvekt
2		Brønn 1: Molekylvekt Brønn 2: Tom Brønn 3: pr3ny-prim2 Brønn 4: pr4ny-prim2 Brønn 5: pr5ny-prim2 Brønn 6: pr6-prim2 Brønn 7: a1-prim1 Brønn 8: b1-prim 1 Brønn 9: c1-prim 1 Brønn 10: d1-prim1 Brønn 11: e1-prim1 Brønn 12: f1-prim1 Brønn 13: pr1-prim1 Brønn 14: pr2ny-prim1 Brønn 15: pr3-prim1 Brønn 16: pr4-prim1 Brønn 17: Tom Brønn 18: Molekylvekt
3		Brønn 1: Molekylvekt Brønn 2: Tom Brønn 3: pr5-prim 1 Brønn 4: pr6ny-prim 1 Brønn 5: pr1ny-prim 1 Brønn 6: pr2-prim 1 Brønn 7: pr3ny-prim 1 Brønn 8: pr4ny-prim 1 Brønn 9: pr5ny-prim 1 Brønn 10: pr6-prim1 Brønn 11: a1-prim 3 Brønn 12: b1-prim 3 Brønn 13: c1-prim 3 Brønn 14: d1-prim 3 Brønn 15: e1-prim 3 Brønn 16: f1-prim 3 Brønn 17: Tom Brønn 18: Molekylvekt
4		Brønn 1: Molekylvekt Brønn 2: Tom Brønn 3: pr1-prim 3 Brønn 4: pr2ny-prim 3 Brønn 5: pr3-prim 3 Brønn 6: pr4-prim 3 Brønn 7: pr5-prim 3 Brønn 8: pr6ny-prim 3 Brønn 9: pr1ny-prim 3 Brønn 10: pr2-prim 3 Brønn 11: pr3ny-prim 3 Brønn 12: pr4ny-prim 3 Brønn 13: pr5ny-prim 3 Brønn 14: pr6-prim 3 Brønn 15: Tom Brønn 16: Tom Brønn 17: Tom Brønn 18: Molekylvekt

Vedlegg 3: TRS1-alleler påvist i studien

Oversikt over alle TRS1-allelene påvist i avføringsprøvene fra IMPACT-materialet undersøkt i denne studien.

s = IgE-sensibilisert, is = ikke IgE-sensibilisert ved 2-års alder

BARN NR	ALDERS-KATEGORI	PRØVE NR	ALLEL 1	ALLEL 2	ALLEL 3	SENSIBILISERING
123	mor	1				s
123	42t	3				s
123	7d	5				s
123	10d	6	252			s
123	4mnd	7	272			s
123	1 år	8	236			s
123	2år	9	268			s
1317	mor1	1	272	280		is
1317	2d	3	244			is
1317	4d	4				is
1317	7d	5	252			is
1317	10d	6	252			is
1317	1år	8	284	252		is
1317	1år	8	252			is
1317	1år	8	252			is
1360	sv13	1	252			s
1360	sv13	1	252			s
1360	sv36	2				s
1360	1,5d	3				s
1360	7d	5				s
1360	10d	6	252			s
1360	4mnd	7	252			s
1360	1år 2	8	252			s
1360	2år	9	252			s
1360	2år	9	252			s
1384	sv13	1	236			is
1384	3d	4	236			is
1384	4mnd	7	236			is
1384	1år	8				is
1384	2år	9				is
1629	4d	4	252			is
1629	mor1	1	268			is
1629	mor1	1	268			is
1629	mor2	2	268			is
1629	2d	3				is
1629	4mnd	7	252			is
1629	1år	8	244			is
1629	1år	8	244			is

1629	2år	9	244			is
1768	uke34	1	268			s
1768	uke38	2	268			s
1768	uke38	2	252	268		s
1768	3d	3	244			s
1768	4d	4	244	252		s
1768	7d	5				s
1768	11d	6				s
1768	1år	8	252			s
1768	2år	9	196	252		s
1768	2år	9	252			s
1930	sv10	1	276			is
1930	sv10	1	276			is
1930	sv10	1	276			is
1930	1d10t	3	252			is
1930	4d	4				is
1930	7d	5				is
1930	10d	6				is
1930	4mnd	7				is
1930	1år	8	276			is
1930	1år	8	252	276		is
1930	2år	9	196	276		is
1930	2år	9	236	276		is
1930	2år	9	252	276		is
1956	uke21	1	244			s
1956	sv34	2	244			s
1956	90t	4	244			s
1956	7d	5				s
1956	4mnd	7				s
1956	1år	8				s
1956	2år	9	236			s
1984	sv39	2	196			s
1984	4mnd	7	196			s
1984	1år	8	196			s
2411	sv21	1	272			s
2411	sv40	2	272			s
2411	sv40	2	272			s
2411	2d	3	272			s
2411	3d	4	272			s
2411	8d	5	272			s
2411	9d	6				s
2411	4mnd	7	272			s
2411	1år	8	240	252		s
2411	1år	8	252			s

2411	2år	9	272			s
2451	sv34	2	224	240		is
2451	sv34	2	236	240		is
2451	sv34	2	240			is
2451	2,5d	3	240			is
2451	2,5d	3	240			is
2451	10d	6	240			is
2451	10d	6	240			is
2451	4mnd	7	240			is
2652	sv11	1	236			s
2652	uke11	1	236			s
2652	7d	5				s
2652	16d	6				s
2652	4mnd	7				s
2652	1år	8	236			s
2652	2år	9	236			s
2652	2år	9	236			s
2952	2d	3				s
20075	sv11	1	268			is
20075	2d	3				is
20075	4d	4				is
20075	7d	5	268			is
20075	10d	6	268			is
20075	4mnd	7				is
20075	1år	8	268			is
20075	2år	9	268	272	284	is
20075	2år	9	252	268		is

Vedlegg 4: Krysstabeller for icd- og TRS-genotypene

A: Krysstabell for icd-genotypene for mor og barnet i de ulike alderskategoriene med oversikt over p-verdier

	Mor og barn ved:	1 og 1	0 og 1	1 og 0	0 og 0	p-verdi	Totalt antall (n)
icd-1	1-10dg	8	8	9	27	0,074	52
	4mnd	6	5	15	36	0,108	62
	1år	5	9	8	31	0,217	53
	2år	4	5	16	36	0,328	61
icd-2	1-10dg	0	0	3	44	1	
	4mnd	0	1	2	60	0,9999	
	1år	0	1	2	57	1	
	2år	1	1	2	59	0,094	63
icd-3	1-10dg	0	0	2	54	1	
	4mnd	1	0	0	61	0,016	62
	1år	1	0	1	57	0,034	59
	2år	1	2	1	60	0,092	64
icd-4	1-10dg	0	0	1	58	1	
	4mnd	0	0	1	60	1	
	1år	0	0	1	60	1	
	2år	0	1	1	61	0,9999	
icd-5	1-10dg	0	1	0	54	1	
	4mnd	0	1	0	61	1	
	1år	0	0	0	60	1	
	2år	0	0	0	63	1	
icd-6	1-10dg	0	0	0	58	1	
	4mnd	0	1	0	62	1	
	1år	0	1	0	60	1	
	2år	0	0	0	63	1	
icd-7	1-10dg	0	0	0	57	1	
	4mnd	0	0	0	63	1	
	1år	0	0	0	60	1	
	2år	0	1	0	65	1	

B: Krysstabell for oppsummering av TRS1-alleler hos mor og barnet i de ulike alderskategoriene.

Mor og barn ved:	1 og 1	0 og 1	1 og 0	0 og 0
1 – 10 dg	8	4	5	99
4 mnd	5	1	2	63
1år	6	5	4	92
2 år	6	10	3	77

