

Kristian Brembo Ottem
Edvard Aske

Påvisning av ESBL_{M-C}⁻ og ESBL_{KARBA-MBL}-produserende gener i gram negative stavbakterier ved bruk av real-time PCR.

Detection of ESBL_{M-C}⁻ and ESBL_{KARBA-MBL}-producing genes in gram negative rods using real-time PCR.

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Marthe Lind Kroknes

Mai 2019

Kristian Brembo Ottem
Edvard Aske

**Påvisning av ESBL_{M-C}- og ESBL_{KARBA-MBL}-produserende gener i gram negative stavbakterier ved bruk av real-time PCR.
Detection of ESBL_{M-C}- and ESBL_{KARBA-MBL}-producing genes in gram negative rods using real-time PCR.**

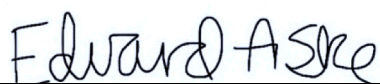
Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Marthe Lind Kroknes
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

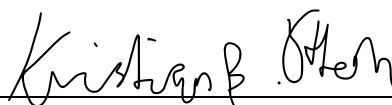
Forord

Denne oppgaven ble gitt av Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital HF. Den ble utført i perioden 11. mars til 20. mai 2019, som en avsluttende del av Bioingeniørutdanningen på NTNU 2016-2019. Vi ønsker å takke AMM, St. Olavs Hospital HF for tilgang på materiale og utstyr. En stor takk til spesialbioingeniør Marthe Lind Kroknes for god praktisk og teoretisk veiledning, og til Aleksandra Jakovljević for godt faglig samarbeid. En takk rettes også til Alexander Husby Albertsen for praktisk hjelp i prosjektet. Vi vil også takke universitetslektor på NTNU, Heidi Græsmann, for god veiledning.

Trondheim, 2019



Edvard Aske



Kristian Brembo Ottem

Sammendrag

Bakgrunn: Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi (AMM), St. Olavs Hospital HF har bakteriestammer fra pasientprøver med mistanke om ESBL_M (AmpC)- eller ESBL_{KARBA} (MBL)-produksjon. Disse sendes til Nasjonalt kompetansesenter for påvisning av antibiotikaresistens (K-Res), på Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN), Tromsø. Prosedyren er tidsbelastende for AMM, St. Olavs Hospital, og man ønsker hurtigere diagnostisering av disse mtp. å unngå unødvendig kontaktsmitteregime og ekstra tiltak som settes i gang på sykehuset.

Metode: Ved testing for påvisning av resistensmekanismer, ble real-time PCR og fenotypiske metoder ved bruk av diffusjonstabletter og MIC-strips, benyttet. Metoden for real-time PCR er bygget på prosedyrer som er benyttet av K-Res, Tromsø. Man ønsker å tilpasse denne prosedyren til bruk i rutinemessig diagnostikk på AMM. Hensikten er først å kvalitetssikre real-time PCR-metoden, og deretter sammenligne den med fenotypiske metoder som benyttes i rutinemessig diagnostikk per dags dato. 20 stammer ble testet for påvisning av genene CIT eller DHA, som finnes i ESBL_M-produserende bakterier. 20 andre stammer ble testet for påvisning av genene VIM, GIM, SPM, SIM, NDM, eller IMP i kategorien ESBL_{KARBA}.

Resultat: 19 stammer var positive på AmpC ved fenotypisk testing for påvisning av resistensgener, mens 9 stammer var positiv på real-time PCR. Der var henholdsvis 6 stammer positiv på CIT, mens 3 var positiv på DHA.

Ved fenotypisk testing for påvisning av resistensbestemmelse MBL ble 8 stammer positive, og 14 stammer positive ved real-time PCR. Av de var 8 stammer positiv på VIM-gen, mens 6 stammer var positiv på NDM. SPM kunne ikke detekteres.

Konklusjon: Sammenlignet med fenotypiske metoder, vil real-time PCR være en bedre metode for å detektere de utvalgte resistensgener i gruppene ESBL_M og ESBL_{KARBA}. Påvisning av CIT, DHA, NDM og IMP på real-time PCR viste gode resultat både på multiplex PCR og effektivitet. Man kan med stor sikkerhet detektere stammer som inneholder disse genene. VIM, GIM og SIM bør testes for bedre effektivitet.

Abstract

Purpose: The Department of Medical Microbiology (AMM), St. Olav's Hospital HF has bacterial strains from patient samples with suspected ESBL_M- (AmpC) or ESBL_{KARBA} (MBL)-production. These are sent to the National Competence Center for the detection of antibiotic resistance (K-Res), at the University Hospital in Northern Norway (UNN), Tromsø. The procedure is time-consuming for AMM, St. Olav's Hospital, and they want faster diagnosis of these, in order to avoid unnecessary and further contamination and additional action initiated at the hospital.

Method: When testing for the detection of resistance mechanisms, real-time PCR and phenotypic methods using diffusion tablets and MIC-strips, were used. The method for real-time PCR was based on procedures used by K-Res, Tromsø. AMM, St. Olavs Hospital HF wants to adapt this procedure for daily use in routine diagnostics. The purpose is first to assure the quality for the real-time PCR method, and then compare it with phenotypic methods used in routine diagnostics today. 20 strains were tested for detection of the CIT or DHA-genes, 2 of the many genes in the category ESBL_M. 20 other strains were tested for the detection of the VIM, GIM, SPM, SIM, NDM, or IMP genes in the category ESBL_{CARBA}.

Results: 19 strains were positive on AmpC by phenotypic testing for the detection of resistance genes, and 9 were positive by real-time PCR. 6 of these were positive for CIT, while 3 were positive for DHA.

By phenotypic testing for detection of resistance determination in MBL 8 strains were positive, while 14 strains were positive by real-time PCR. 8 of these strains were positive on the VIM gene, and 6 were positive on NDM, SPM could not be detected.

Conclusion: Compared to phenotypic methods, the real-time PCR will be a better method for detection of resistance genes in the groups ESBL_M and ESBL_{CARBA}. Real-time PCR analysis for detection of the genes CIT, DHA, NDM and IMP showed good results on multiplex-PCR efficiency. They can reliably detect strains containing these genes. VIM, GIM and SIM should be re-tested to get a better result on efficiency.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
INNHOLDSFORTEGNELSE	IV
1 INNLEDNING	1
1.1 GRAM NEGATIVE STAVERS OPPBYGNING AV CELLEVEGGEN OG FUNKSJON AV BETALAKTAMANTIBIOTIKA PÅ CELLEVEGGEN.....	2
1.2 BETALAKTAMASERS VIRKNING PÅ BETALAKTAMANTIBIOTIKA	3
1.3 BETALAKTAMANTIBIOTIKA	3
1.4 RESISTENSMEKANISMER KNYTTET TIL GRAM NEGATIVE STAVER	5
1.5 EKSTENDERT SPEKTRUM-BETALAKTAMASER (ESBL).....	6
1.6 AMPC-BETALAKTAMASER	9
1.7 FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER AMPC.....	9
1.8 METALLO-BETALAKTAMASE	10
1.9 FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER MBL	10
1.10 TAQMAN-PROBENS FUNKSJON I REAL-TIME PCR-ANALYSE	11
1.11 EFFEKTIVITET VED REAL-TIME PCR	12
1.12 UNG-ENZYM	12
1.13 PROBLEMSTILLING.....	13
2 MATERIALE OG METODE	14
2.1 POSITIVE KONTROLLSTAMMER	15
2.2 PRØVEMATERIALE BENYTTET TIL TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSGENER	16
2.3 FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER PÅ AMPC MED DIFFUSJONSTABLETTER OG MIC-STRIPS.....	18
2.4 FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER PÅ MBL	18
2.5 DNA-EKSTRAKSJON AV KONTROLLSTAMMER OG PASIENTSTAMMER.....	19
2.6 BRUK AV PCR TIL PÅVISNING AV PAMPC OG MBL GENER.....	19
2.7 PRIMER- OG PROBELØSNINGER BENYTTET TIL REAL-TIME PCR.....	20
2.8 TILLAGING AV PCR-MIX FOR MULTIPLEX REAL-TIME PCR.....	22
2.9 EFFEKTIVITETSTESTING OG UTREGNING AV DETEKSJONGRENSE	23
3 RESULTATER	24
3.1 UTPRØVING AV METODE, DETEKSJONGRENSE OG EFFEKTIVITET	24
3.2 FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER	26

3.3	RESULTAT FOR FENOTYPISK TESTING FOR RESISTENSMEKANISMER PÅ STAMME 1-20 PÅ AMPC	26
3.4	RESULTAT FOR FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER PÅ STAMME 21-40 PÅ MBL 28	
3.5	RESULTAT FOR PÅVISNING AV PAMPK OG MBL MED REAL-TIME PCR.....	29
3.6	OVERSIKT OVER RESULTATER AMPK OG MBL	31
4	<u>DISKUSJON</u>	<u>33</u>
5	<u>KONKLUSJON</u>	<u>36</u>
7	<u>REFERANSER</u>	<u>37</u>

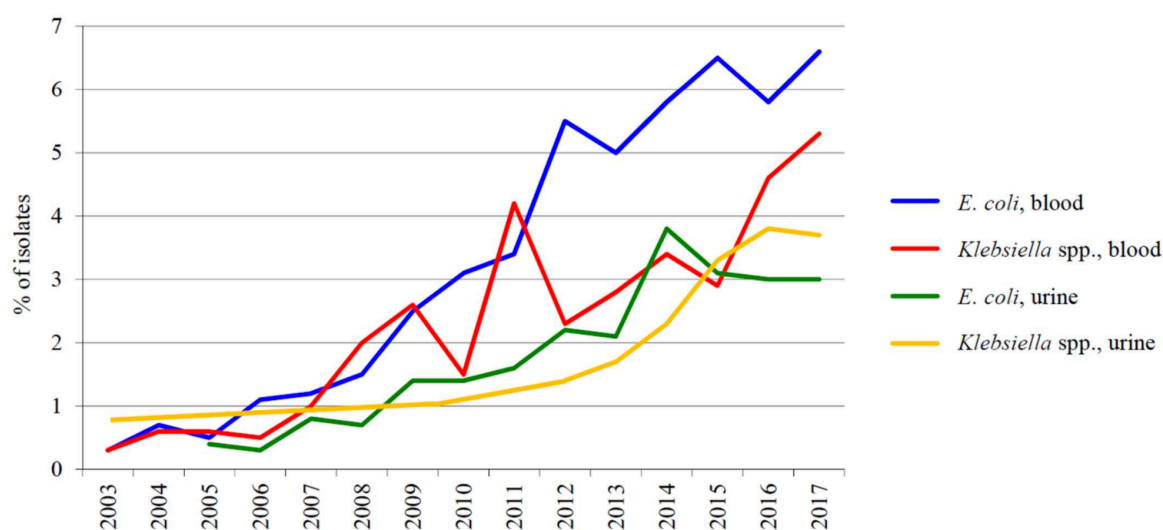
VEDLEGG 1: DHA, AMPLIFISERINGSKURVE FRA EFFEKTIVITETSTEST	39
VEDLEGG 2: DHA, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE.	40
VEDLEGG 3: DHA, AMPLIFISERINGSKURVER FOR TESTSTAMMER.	41
VEDLEGG 4: CIT, AMPLIFISERINGSKURVE FRA EFFEKTIVITETSTEST	42
VEDLEGG 5: CIT, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE.	43
VEDLEGG 6: CIT, AMPLIFISERINGSKURVER FOR TESTSTAMMER	44
VEDLEGG 7: VIM, UTPRØVING AV KONSENTRASJONER	46
VEDLEGG 8: VIM, AMPLIFISERINGSKURVE, EFFEKTIVITETSTESTING.....	47
VEDLEGG 9: VIM, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE.....	48
VEDLEGG 10: GIM, UTPRØVING AV DUPLEX PCR.....	49
VEDLEGG 11: GIM, AMPLIFISERINGSKURVE, EFFEKTIVITETSTEST	50
VEDLEGG 12: GIM, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE.	51
VEDLEGG 13: RESULTATER PÅ TESTING FOR PÅVISNING AV VIM OG GIM PÅ STAMMENR. 21-40. DUPLEX REAL-TIME PCR.	52
VEDLEGG 14: SIM, UTPRØVING AV TRIPLEX PCR	53
VEDLEGG 15: SIM, AMPLIFISERINGSKURVE FRA EFFEKTIVITETSTEST	54
VEDLEGG 16: SIM, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE.	55
VEDLEGG 17: SIM AMPLIFISERINGSKURVE, TESTSTAMMENR. 21-40	56
VEDLEGG 18: NDM, UTPRØVING AV TRIPLEX PCR	57
VEDLEGG 19: NDM, AMPLIFISERINGSKURVE, EFFEKTIVITETSTEST	58
VEDLEGG 20: NDM, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE	59
VEDLEGG 21: NDM, AMPLIFISERINGSKURVE, TESTSTAMMENR. 21-40	60
VEDLEGG 22: IMP, UTPRØVING AV TRIPLEX PCR	61
VEDLEGG 23: IMP, STANDARDKURVE OG CT-VERDIER FRA FORTYNNINGSREKKE	62
VEDLEGG 24: IMP, AMPLIFISERINGSKURVE, TESTSTAMME 21-40	63
VEDLEGG 25: PAKNINGSVEDLEGG, ENTEROBACTERIACEAE, FENOTYPISK RESISTENS-TESTKIT	64
VEDLEGG 26: AMPC, FENOTYPISKE TESTRESULTATER FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER	65
VEDLEGG 27: RESULTATER PÅ FENOTYPISK TESTING FOR PÅVISNING AV RESISTENSMEKANISMER MBL	67
VEDLEGG 28: CIT PROBE, PAKNINGSVEDLEGG	69
VEDLEGG 29: CIT FORWARD PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG	70
VEDLEGG 30: CIT REVERSE PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG.....	71
VEDLEGG 31: DHA PROBE, PAKNINGSVEDLEGG	72
VEDLEGG 32: DHA FORWARD PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG	73
VEDLEGG 33: DHA REVERSE PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG	74
VEDLEGG 34: VIM PROBE, PAKNINGSVEDLEGG.....	75
VEDLEGG 35: VIM FORWARD PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG.....	76
VEDLEGG 36: VIM REVERSE PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG	77
VEDLEGG 37: GIM PROBE, PAKNINGSVEDLEGG	78
VEDLEGG 38: GIM FORWARD PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG	79
VEDLEGG 39: GIM REVERSE PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG.....	80
VEDLEGG 40: SIM PROBE, PAKNINGSVEDLEGG	81
VEDLEGG 41: SIM FORWARD PRIMER, PAKNINGSVEDLEGG	82
VEDLEGG 42: SIM REVERSE PRIMER	83
VEDLEGG 43: NDM PROBE	84
VEDLEGG 44: NDM FORWARD PRIMER.....	85
VEDLEGG 45: NDM REVERSE PRIMER	86
VEDLEGG 46: IMP PROBE	87
VEDLEGG 47: IMP FORWARD PRIMER.....	88

VEDLEGG 48: IMP REVERSE PRIMER	89
VEDLEGG 49: SPM PROBE	90
VEDLEGG 50: SPM FORWARD PRIMER	91
VEDLEGG 51: SPM REVERSE PRIMER	92
VEDLEGG 52: RÅDATA REAL-TIME PCR EFFEKTIVITET	93

1 Innledning

Gram negative stavbakterier (GNS) med antibiotikaresistens er et økende, globalt helseproblem, og er blitt et stort hovedfokus blant helseorganisasjoner. Bakteriens evne til å utvikle spesifikke og generelle mekanismer for å hemme virkningen av antibiotika, er potensielt livstruende for verdens befolkning (1). De siste tiårene har man fått gradvis økende forekomst av bakterier som produserer ekstendert spektrum-betalaktamaser (ESBL) og karbapenemaser. En bakterie med ESBL- eller karbapenemaseproduksjon innehar resistensmekanismer mot de vanligste typer antibiotika, ved å motvirke effekten av dem. GNS med ESBL- og karbapenemaseproduksjon kan føre til økt dødelighet. Det er også ekstra belastning for sykehus, i form av forlenget sykehusopphold og økt bruk av ressurser. En tilleggsfaktor er økte kostnader. I Norge er situasjonen annerledes enn for to tiår siden. Rapporten fra 2017 av Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM/NORM-VET), viser en gradvis økning av tilfeller for ESBL- og karbapenemaseproduserende bakterier (2). Ut fra kurven i Figur 1-1: Linjediagram med årlig prosent av sykehustilfeller med ESBL. Fra 2003-2017. *E.coli* i blod (blå kurve), *Klebsiella* spp. i blod (rød kurve), *E.coli* i urin (grønn kurve) og *Klebsiella* spp. i urin (gul kurve) (2). ser man at prosentvise tilfeller av ESBL i blod og urin har økt gradvis siden 2003 (2).

E. coli og *K. pneumoniae* ESBL i blodkultur og urin

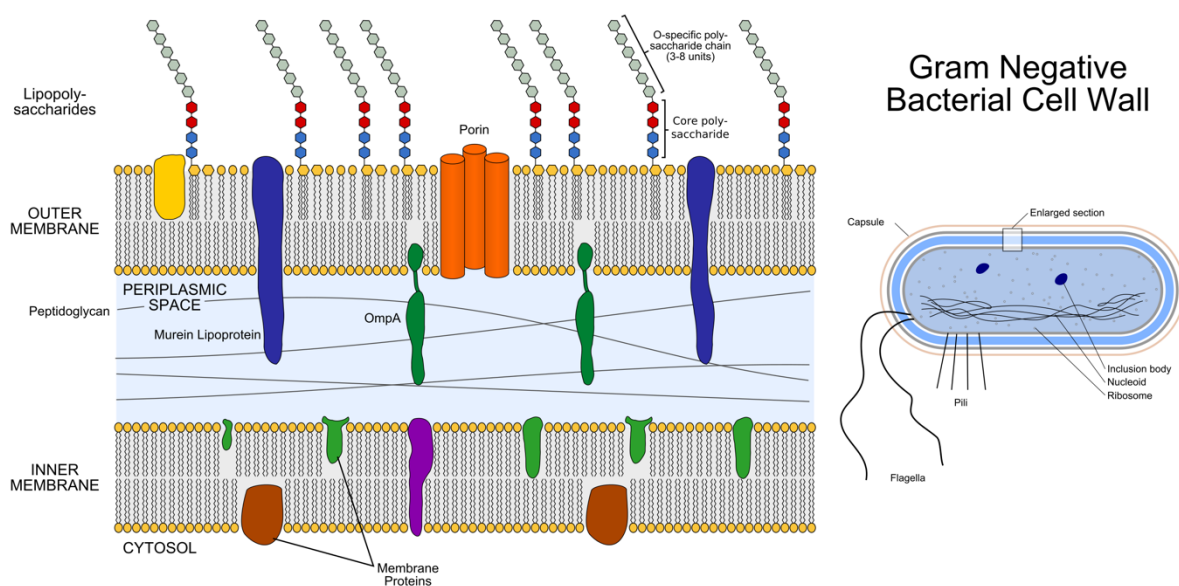


Figur 1-1: Linjediagram med årlig prosent av sykehustilfeller med ESBL. Fra 2003-2017. *E.coli* i blod (blå kurve), *Klebsiella* spp. i blod (rød kurve), *E.coli* i urin (grønn kurve) og *Klebsiella* spp. i urin (gul kurve) (2).

Antall tilfeller av karbapenemaseproduserende GNS fra 2007-2017, viser en signifikant økning fra 2007-2014, med et årlig gjennomsnitt på 7 pasienter. Fra 2015-2017 skjer en drastisk økning med 33 årlige tilfeller i gjennomsnitt (2). Den markante økningen av antall multiresistente bakterier i Norge viser nødvendighet for etablering av hurtige og pålitelige metoder for rask deteksjon av disse stammene.

1.1 Gram negative stavers oppbygning av celleveggen og funksjon av betalaktamantibiotika på celleveggen

GNS er bygd opp av indre plasmamembran og ytre membran, med et periplasmatiske rom imellom. Den ytre membran er et dobbelt lipoprotein-lag, og integrert i denne membranen finnes porin (hydrofile proteiner) som tillater små molekyler passasje gjennom membranen. Antibiotika slippes blant annet gjennom poriner. Inne i det periplasmatiske rommet finnes komponenter som er livsnødvendig for bakterien. Her finnes også detoksifiserende substanser, som skal beskytte bakterien mot ytre angrep (3). En av disse beskyttelsessubstansene for bakterier, er betalaktamase. Dette er et enzym som produseres intracellulært, og ofte i bakterier med resistensmekanismer. Betalaktamasen blir transportert til periplasmatiske rom der den vil prøve å motvirke antibiotika sin effekt (4).



Figur 1-2: Celleveggen til gram negativ bakterier (5).

I periplasmatisk rom finner man også peptidoglykan, som er karbohydrat-kjeder kryssbundet med aminosyrer, og er en del viktig del av celleveggen til en GNS. Peptidoglykanlaget bidrar til strukturell styrke i celleveggen. Den er derfor en viktig komponent i reproduksjon av bakterieceller. Peptidoglykanlaget dannes ved hjelp av enzymer som kalles transpeptidaser (6). Transpeptidaser er en gruppe enzymer som også kalles penicillin-bindende-proteiner (PBP). Disse enzymene har en viktig sammenheng med antibiotika. Dersom riktig type antibiotika bindes til PBP, interfererer dette med dannelse av peptidoglykanlaget, og bakteriens reproduksjon blir hindret.

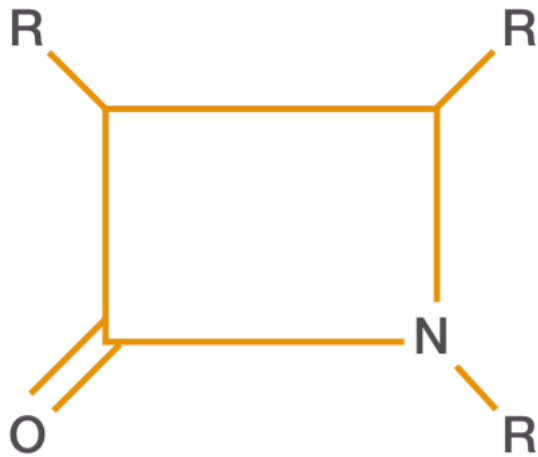
1.2 Betalaktamasers virkning på betalaktamantibiotika

Produksjon av betalaktamase er en av flere mulige resistensmekanismer som kan forekomme hos GNS. Avhengig av signaler fra det ytre, vil disse bli syntetisert og utskilt for å beskytte bakterien mot angrep fra betalaktamringen. Når betalaktam er registrert av bakterien, vil denne resistente mikroben motvirke betalaktam sin skadelige effekt ved å hydrolysere betalaktamringen. Stor produksjon av betalaktamase vil gjøre at mindre av antibiotikumet får binde seg til PBP på plasmamembranen, fordi de ikke når frem til PBP før de blir hydrolysert (7). Hos GNS finnes betalaktamase i det periplasmatiske rom og betydelig mindre i ekstracellulært område (8). Det finnes per i dag over 900 forskjellige betalaktamaser. Disse deles i to hovedgrupper: Serinenzymer og metalloenzymer (9). Forskjellen på disse to er at serinenzymer har serin på aktivt sete, mens metalloenzymer benytter kationer som Zn^{2+} eller Mg^{2+} , i aktivt sete (9).

1.3 Betalaktamantibiotika

Alexander Fleming oppdaget i 1928 ved en tilfeldighet at soppen penicillium hemmet bakterievekst. En stafylokokkstamme ble forurenset med penicillium, og det viste seg at området rundt soppen ble fritt for bakterier (10). Stoffet som soppen produserte, penicillin, var det første betalaktamantibiotikum som ble funnet. Videre studerte man effekten og virkningsmekanismen til penicillin. Flere andre typer betalaktamantibiotika har senere blitt syntetisert og oppdaget(9).

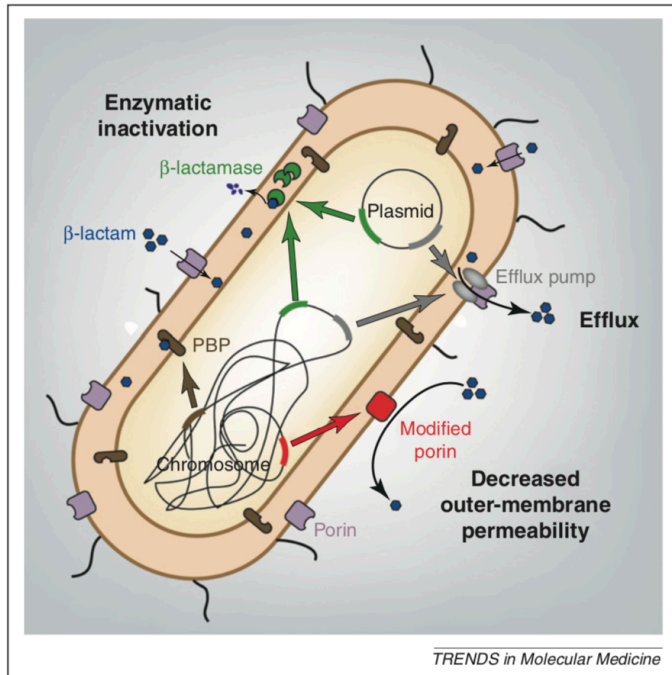
Ved siden av penicilliner finnes det også grupper av betalaktamantibiotika som omfatter cefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer, som alle har sine spesifikke molekylære strukturer. Den viktige delen av den molekylære strukturen, som er felles for alle og har antibakteriell effekt, er betalaktamringen. Det er en molekylring med syklisk amid (9).



Figur 1-3: Betalaktam-ring (6).

1.4 Resistensmekanismer knyttet til gram negative staver

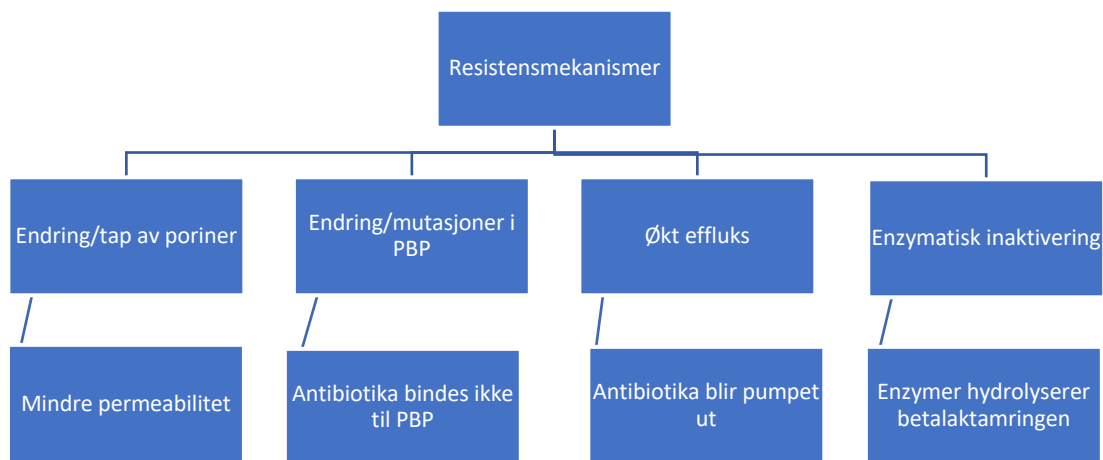
Inhibering av celleveggsyntese ser ut til å være en av de viktigste måtene for betalaktamantibiotika til å hemme bakterievekst på (11).



Figur 1-4: Viser mekanismene til Enterobacteriaceae ved enzymatisk inaktivering av betalaktamantibiotika. Hydrofile kanaler i sammenheng med porin gjør at antibiotikaen slipper gjennom den ytre membranen. I det periplasmatiske rom binder betalaktam seg irreversibelt til PBP, og inhiberer syntese av peptidoglykan. Mekanismer som foregår i resistente bakterier hos Enterobacteriaceae er hovedsakelig i) enzymatisk inaktivering av antibiotika. ii) lavere permeabilitet i yttermembranen gir mindre diffusjon av antibiotika inn i cella. iii) efflux av antibiotika til utsida øker på grunn av økte mengder efflux pumper (12).

Betalaktamer har struktur som ligner mye på D-alanyl-D-alanin, som er en ende av aminosyren på peptid delen av peptidoglykan (12). Takket være den likheten, kan betalaktamer binde seg irreversibelt til denne delen på PBP, og hindre kryss-binding av peptidoglykan. Dermed stopper syntese av celleveggen til bakterier. Da aktiveres autolysin, som sørger for at bakterien spaltes opp og dør (12). Det fins forskjeller i strukturer av PBP hos ulike bakteriestammer. Det gir oss mer forståelse for de mange forskjellige antibiotika som benyttes (9). Ved ervervelse av resistensmekanismer vil ikke bakterieveksten hemmes i

like stor grad. Generelt er det fire mekanismer som gir resistens.



Figur 1-5: 4 Resistensmekanismer med hvilken konsekvens det gir for antibiotikaen, under.

I enkelte bakterier som er en del av normalflora i kroppen, eller som befinner seg i miljøet rundt, kan resistensmekanismer smitte over på opportunistiske og strikte patogene mikrober. Resistens kan utvikles blant annet i forbindelse med antibiotikabehandling, og i mindre grad som spontane mutasjoner i bakterie-DNA. Ved høy bakteriekonsentrasjon in vivo, er det en sjanse for at det oppstår en tilfeldig mutasjon som kan inneha resistens mot antibiotika (10). Enkelte bakterier vil også oppnå multiresistens (se Figur 1-7: Utvikling av multiresistens. Erverving av resistensgener skjer på plasmidet og gjør at bakterien kan inneha resistens mot flere behandlingsmåter. Disse spres videre sammen, og overføres fra plasmid til plasmid. Her ser vi hvordan et plasmid kan motta flere resistensgener og oppnå multiresistens (9).. Dette er mye farligere ettersom behandlingsmåtene er mer begrenset. Et slikt problem vises hos bakterier med ESBL.

1.5 Ekstendert spektrum-betalaktamaser (ESBL)

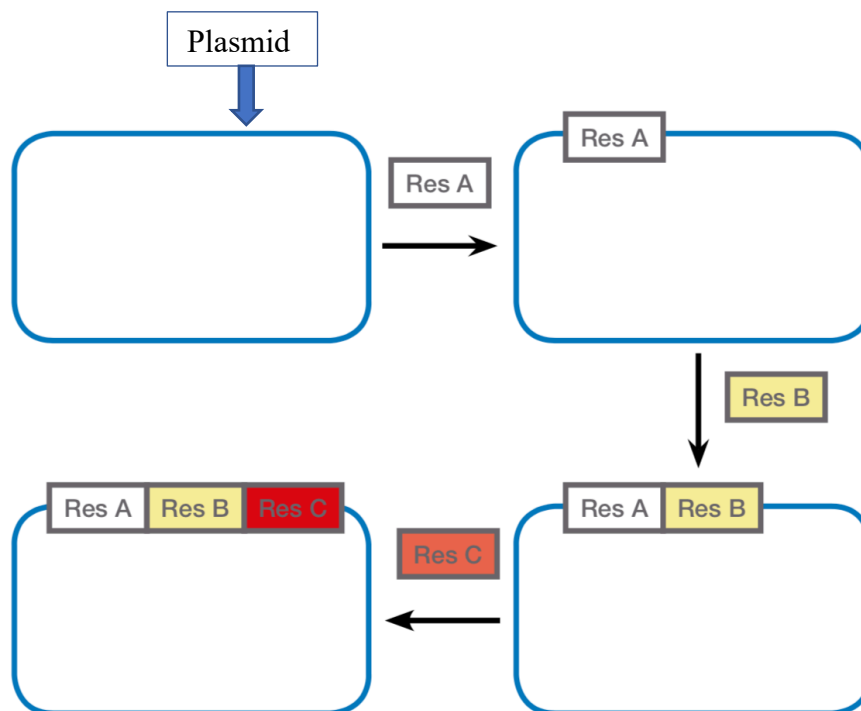
Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* samt andre bakterier fra *Enterobacterales*-orden befinner seg i menneskets normalflora i tarmen. Disse er ofte opphav til urinveisinfeksjon, og kan også føre til sepsis og andre infeksjoner. Økende forbruk av 3.generasjon cefalosporiner

(bl.a. Cefotaksim og Ceftazidime) og karbapenemer har de siste tiårene ført til resistentutvikling mot disse antibiotika hos *Enterobacterales* og andre klinisk viktige bakteriearter, som *Pseudomonas aeruginosa* og *Acinetobacter spp.* Plasmid-overførbare gener for ESBL-produksjon har spredt seg på globalt nivå og blir påvist i økende grad hos nevnte bakteriearter. Klassifisering av ESBL-enzymmer er utført etter deres molekylære struktur i Ambler klasse A, B, C og D. I Norge og andre Nordiske land var det foreslått av Giske et al. i 2008 en ny klassifisering basert på både molekylær struktur og klinisk viktighet av ulike ESBL og karbapenemase enzymer (13). I Norge deles ESBL inn i ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA}.

Acquired β -lactamases with hydrolytic activity against extended-spectrum cephalosporins and/or carbapenems			
	ESBL _A	ESBL _M	ESBL _{CARBA}
β -Lactamase classes	High prevalent ESBL _A CTX-M TEM-ESBLs SHV-ESBLs VEB PER	ESBL _{M-C} (Plasmid-mediated AmpC) CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	ESBL _{CARBA-A} KPC GES-2, -4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1, -2
	Low prevalent ESBL _A GES-1, -3, -7, -9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT ^a	ESBL _{M-D} (OXA-ESBL) OXA-10-group OXA-13-group OXA-2-group OXA-18 OXA-45	ESBL _{CARBA-B} (MBL) IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1
			ESBL _{CARBA-D} (OXA-carbapenemases) OXA-23-group OXA-24-group OXA-48 ^b OXA-58-group
Operational definition	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins AND clavulanate synergy	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins AND phenotypic detection (ESBL _{M-C}) OR genotypic detection (ESBL _{M-D})	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins and at least one carbapenem AND ESBL _{CARBA} detected with phenotypic and/or genotypic methods

Figur 1-6: Klassifisering av ESBL. Viser også hvilke gener som hører til i de tre hovedgruppene ESBL_A, ESBL_M og ESBL_{KARBA} (13).

ESBL_A omfatter enzymer som gir resistens mot alle 2. og 3. generasjons cefalosporiner, samt peniciliner med betalaktamasehemmere og monobaktamer. Neste gruppe, ESBL_M, omfatter Ampicillin klasse C(AmpC)-enzymer og noen oxacillinaser som kan overføres via plasmider eller kromosomalt. Plasmid-overførbart AmpC(pAmpC) har større smittevernbetydning, fordi resistens kan spre seg lett til andre bakteriestammer.



Figur 1-7: Utvikling av multiresistens. Erverving av resistensgener skjer på plasmidet og gjør at bakterien kan inneha resistens mot flere behandlingsmåter. Disse spres videre sammen, og overføres fra plasmid til plasmid. Her ser vi hvordan et plasmid kan motta flere resistensgener og oppnå multiresistens (9).

AmpC er cefalosporinaser, som kan hydrolysere ulike typer betalaktamantibiotika, deriblant cefalosporiner og penicilliner, men ikke karbapenemer. Den kalles cefalosporinase fordi betalaktamasen er mest aktiv ved antibiotikabehandling med cefalosporiner (9). Den tredje store gruppen er ESBL_{KARBA}, som omfatter karbapenemaser som gir resistens mot karbapenemer. Her finnes det blant andre metallobetalaktamaser (MBL), enzymer som er vanligst hos resistente stammer av *P. aeruginosa* og noen *Enterobacterales*, særlig *E. coli* og

K. pneumoniae. MBL hydrolyserer penicilliner og cefalosporiner, samt karbapenemer, mens monobaktamer blir skånet for deres effekt (14).

1.6 AmpC-betalaktamaser

AmpC er en gruppe betalaktamaser som finnes hovedsakelig i GNS. Gener som koder for AmpC finnes naturlig i kromosomalt DNA hos mange bakteriearter, blant annet i *Enterobacterales* og *Pseudomonas* (15). Disse genene uttrykkes ikke nødvendigvis, men kan bli aktiverte hvis de blir derepresserte på grunn av antibiotikabehandling.

Til forskjell fra kromosomalt DNA kan plasmid-DNA overføres mellom to levende bakterieceller via konjugasjon, spesielt mellom beslektede bakteriestammer. Derfor kan pAmpC spres mye enklere blant bakterier, også de som ikke har naturlig forekommende AmpC. AmpC oppfattes som en ESBL som har infeksjonsmessig betydning når AmpC-genet befinner seg i et plasmid (15).

Det er flere linjer av pAmpC som har blitt overført fra kromosomalt DNA i bakterier der AmpC er naturlig forekommende til plasmid-DNA (9). Det er kun noen i *Enterobacterales* orden som til nå har fått påvist pAmpC og som dermed har stor smittevernsbetydning. *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, og *Escherichia coli*. *E. coli* og *Shigella spp.* kan inneholde både pAmpC og kromosomalt AmpC, og det er kun real-time PCR analyse som kan gi svar på hvilken type resistens det dreier seg om. PCR kan skille mellom pAmpC og kromosomal AmpC hos *E. coli* fordi det er betydelige forskjeller i nukleotide-sekvensen mellom de to (16). Det er viktig med avklaring av type av AmpC resistensgener pga. smitteverntiltak som er nødvendige å sette i gang for inneliggende pasienter.

1.7 Fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer AmpC

Ved fenotypisk testing vil man kunne påvise både kromosomal AmpC og pAmpC. Man ønsker derimot å kunne skille mellom kromosomal AmpC og pAmpC. AmpC hemmes ikke av betalaktamasehemmere som klavulansyre og tazobaktam, men derimot av cloxacillin og borsyre (17). Cefotaxime og ceftazidim er to cefalosporiner som benyttes sammen med cloxacillin. Enkelte AmpC produserende bakterier, som er kategorisert som ESBL, kan

hydrolysere cefotaxime og/eller ceftazidim. Derfor testes stammene for både cefotaxime og ceftazidim med og uten cloxacillin (18).

1.8 Metallo-betalaktamase

MBL er en gruppe enzymer tilhørende $ESBL_{KARBA}$. Det er særlig MBL-produserende *Enterobacterales* og *Pseudomonas aeruginosa* blant GNS som representerer en stor trussel i helseinstitusjoner. Dette er på grunn av de begrensede behandlingmulighetene som finnes mot $ESBL_{KARBA}$. MBL innehar større resistenspotensiale enn andre enzymer i gruppene $ESBL_A$ og $ESBL_M$, som omfatter AmpC. Forskjellen mellom $ESBL_{KARBA}$ -MBL og andre karbapenemaser er at de benytter sink på aktivt sete (19).

Imipenemase (IMP), Verona integron-encoded metallo-betalaktamase (VIM), Sao Paulo metallo-betalaktamase (SPM), Germany imipenemase (GIM), New Delhi metallo-betalaktamase (NDM) er noen av genene som koder for produksjon av MBL-enzym, og som går under kategorien $ESBL_{KARBA}$ -MBL. IMP, VIM, NDM, og i mindre grad SPM, er de fire mest utbredte variantene. Innenfor MBL er det subgrupper B1, B2 og B3. Alle disse 6 gentyper nevnt over, ligger i B1. B1 ansees for å være den farligste gruppen ettersom den har enda større resistenspotensiale i forhold til betalaktamantibiotika. Gentyperne i B2 hydrolyserer i mindre grad penicilliner og cefalosporiner, mens i B3 gruppen er MBL-genet lokalisert kromosomalt og er ikke patogent (19).

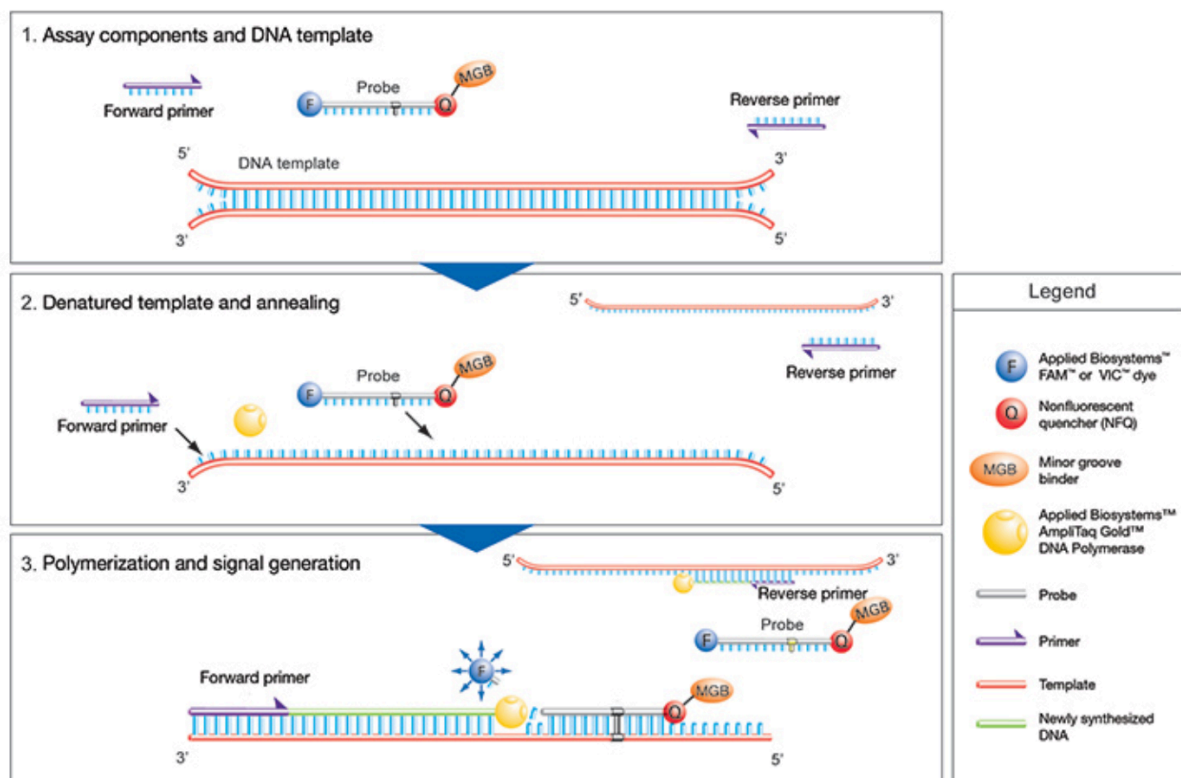
1.9 Fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer MBL

Fenotypiske tester kan ikke skille mellom plasmid og kromosomal gen. Dipicolinic Acid (DPA) og EDTA inhiberer effekt av enzymet MBL og kan brukes til å påvises det hos *Enterobacteriaceae* og *P. Aeruginosa*, (20). På grunn av uspesifikk effekt på inhibisjonen ved bruk av EDTA og DPA, vil resultatene ved fenotypisk testing av *P. aeruginosa* ved bruk av kit for testing av *Enterobacteriaceae*, bli usikkert. Det benyttes derfor spesifikt kit for *P. Aeruginosa*. Til tross for dette, kan man fortsatt få falsk-positive resultater (21), pga. høy sensitivitet og lav spesifisitet av den fenotypiske testen. For å påvise med sikkerhet tilstedeværelse av MBL, må man benytte molekylær diagnostikk, for eksempel real time PCR. Som hos AmpC, er disse plasmid-kodede MBL-variantene enda farligere på grunn av at genene smitter enklere over fra plasmid til plasmid (20).

1.10 TaqMan-probens funksjon i real-time PCR-analyse

Real-time PCR er en kvalitativ metode for påvisning av en spesifikk gensekvens ved bruk av fluorescens. Real-time innebærer at instrumentet avleser fluorescens etter hver syklus i PCR-programmet, slik at det vil foreligge en amplifiseringskurve som viser mengden PCR-produkt underveis i programmet (19). I metoden benyttes forward primer, reverse primer og probe.

TaqMan-probe er en av probetyperne som benyttes i real-time PCR.



Figur 1-8: Viser hvordan TaqMan-proben fungerer. Forward og reverse primer bundet til hver sin tråd til 5'-enden. TaqMan-proben hektes på spesifikk sekvens på DNA-tråden. Polymerase går langs DNA-tråden og limer komplementær base til. Når den kommer til TaqMan-proben kløyves denne av og man sitter igjen med reportere som avgir fluorescens-signal (23).

TaqMan-probe er et verktøy som kan benyttes i real-time-PCR for å detektere amplifisert PCR-produkt (amplikon). Proben hektes på en spesifikk gensekvens innen området som amplifiseres. TaqMan-proben er merket i begge ender, med en reporter i ene, og quencher i andre (se figur 1-8). Det benyttes en polymerase som vil kløyve TaqMan-proben samtidig

som den syntetiserer nytt DNA. Når proben kløyves er ikke quencher lenger i umiddelbar nærhet til reporteren, og reporteren kan så avgi fluorescens uten å hemmes. Antallet prober som har bundet seg til målsekvensen, blitt kløyvd og som dermed avgir fluorescens vil være proporsjonal med mengden amplifisert DNA. Slik blir også fluorescens-intensiteten proporsjonal med mengden PCR-produkt.

TaqMan-prober kan benyttes i multiplex-PCR, altså i PCR-mikser der det screenes for flere gensekvenser. I multiplex-PCR kan ulike målsekvenser påvises med samme reagensblanding, i samme reaksjonskammer. Instrumentet avleser fluorescens i flere bølgelengder. Dette forutsetter at det benyttes prober med ulike emisjonsbølgelengder for de ulike målsekvensene. Det er mulig å bestille skreddersydde prober med valgfri sekvens, reporter og quencher. (24).

1.11 Effektivitet ved real-time PCR

Effektivitetsmålinger på real-time PCR er en viktig del av kvalitetsvurderingen. Effektivitet på 90-110% anses som god effektivitet. En effektivitet på 100% tilsier at mengden PCR-produkt fordobles i hver syklus tidlig i PCR-programmet. Effektivitet over 100% er i prinsippet ikke mulig, men kan tilsynelatende forekomme blant annet på grunn av pipetteringsfeil og tilstedeværelse av stoffer som hemmer polymerasen (25).

1.12 UNG-enzym

Enzymet uracil-N-glycosylase (UNG) er ofte tilsatt i mastermikser til bruk for PCR. UNG er et enzym som fjerner uracil fra DNA. Hensikten med dette er å unngå kontaminering fra tidligere PCR-analyser. Kontaminering kan være et stort problem ved PCR-analyser, fordi svært små DNA-mengder kan gi utslag.

En forutsetning for at UNG skal fungere er at mastermikser som benyttes ved et laboratorium inneholder en andel deoksyuridin-trifosfat (dUTP), i stedet for deoksythymidin-trifosfat (dTTP). Dette medfører at PCR-produkter som dannes inneholder en andel uracil, i stedet for thymin, i motsetning til naturlig forekommende DNA. Hvis PCR-produkt fra en tidligere analysering har kontaminert en påfølgende PCR-reaksjon vil UNG bryte ned dette uracilholdige DNAet, og slik unngås falskt positive resultat. Man unngår at det påfølgende PCR-

produktet også brytes ned ved at UNG-enzymet denatureres ved høy temperatur før resten av PCR-programmet, og ved å benytte temperaturer hvor UNG ikke er aktivt (26).

1.13 Problemstilling

Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi (AMM), St. Olavs Hospital HF påviser rutinemessig vha. fenotypisk tester, mistanke om $ESBL_M$ (pAmpC) og $ESBL_{KARBA-MBL}$ hos *Enteribacteriaceae* og *P.Aeruginosa*. For verifisering av resultatet, sendes disse bakteriestammene for øyeblikket til Nasjonalt kompetansesenter for molekylær påvisning av antibiotikaresistens (K-Res) i Tromsø. Bakteriestammer fra pasienter med mistanke om $ESBL_{M-C}$ eller $ESBL_{KARBA-MBL}$ sendes via postgang til K-Res på Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN), Tromsø, og analyseres på real-time PCR. Prosedyren som brukes av St. Olavs Hospital i dag er tidsbelastende, og svar kan foreligge flere dager etter forsendelse. AMM, St. Olavs Hospital ønsker en hurtigere diagnostisering av de eventuelle prøvene, og vil derfor utvikle prosedyrer for diagnostisering av de aktuelle prøvene. Rask diagnostisering har stor betydning med tanke på behandling av pasienter, og kontaktsmitteregime som settes i gang på klinikkene. Ved utvikling av real-time PCR-analyser for påvisning av gener for $ESBL_{M-C}$ og $ESBL_{KARBA-MBL}$ produksjon, vil AMM få mulighet til å utføre diagnostikken raskere og mer effektivt enn nå. Disse analysene kan også bidra til å unngå unødvendig isolering og kontaktsmitteregime ved falsk-positive fenotypiske tester. Vår problemstilling er dermed:

Er det mulig å sikkert detektere og differensiere ulike gram-negative resistens-gener for $ESBL_{M-C}$ og $ESBL_{KARBA-MBL}$ ved bruk av real-time PCR?

2 Materiale og metode

I dette bachelorprosjektet ble 20 stammer (nummerert 1-20) testet for påvisning av AmpC og 20 andre stammer (nummerert 21-40) for påvisning av MBL. Bakteriestammene er hentet fra St. Olavs Hospital, og ble valgt ut på grunn av mulig tilstedeværelse av de aktuelle resistensgenene. Real-time PCR-metoden vi benytter baserer seg på metoden som benyttes på K-Res, UNN i Tromsø. I prosjektet er real-time PCR og fenotypisk påvisning av resistensmekanismer benyttet. Hensikten er å utvikle en prosedyre for real-time PCR-metoden og sammenligne den med den fenotypiske testmetoden som benyttes på St. Olavs Hospital i dag. Før rutinemessig bruk av real-time PCR for påvisning av et resistensgen, må real-time PCR-metoden kvalitetssikres for spesifisitet og sensitivitet. Ved real-time PCR benyttet man instrumentet CFX 96 (BIO-RAD). Ved fenotypisk påvisning av resistensmekanismer, ble identifikasjonskit med diffusjonstabletter (ROSCO Diagnostica) benyttet. Stammer 1-8 (AmpC) ble også testet med MIC-strips (Liofilchem).

2.1 Positive kontrollstammer

Positive bakteriekontroller: Det ble benyttet bakteriestammer sendt fra K-res UNN, Tromsø og Veterinærinstituttet, som hadde kjente resistensgen. Alle de positive kontrollstammene ble dyrket på blodagar og inkubert i 18 ± 2 timer i $35^\circ\text{C} \pm 2$. For hver av de 8 genene var det én stamme som skulle være positiv kontroll. CIT er et mer spesifikt gen innenfor CMY-gengruppen. Det benyttes derfor primere og prober designet for CIT.

Tabell 2-1: Viser oversikt over navn på positive kontrollstamme for MBL, bakteriestamme og hvilket resistensgen som uttrykkes. 7 stammer er sendt fra K-res, UNN Tromsø. CMY er sendt fra veterinærinstituttet.

Kontrollstamme	Species	Resistensgen
K5-20	<i>E. coli</i>	DHA
20410	<i>E. coli</i>	CMY(CIT)
A5-67	<i>P. aeruginosa</i> (NCTC 13437)	VIM
A2-19	<i>P. aeruginosa</i>	GIM
A5-66	<i>E. coli</i>	IMP
A2-56	<i>P. aeruginosa</i>	SPM
A5-71	<i>K. pneumoniae</i> (NCTC 13443)	NDM
A5-37	<i>P. aeruginosa</i>	SIM

Kontrollstammene ble fortyntet 1:100 for bruk i real-time PCR-analyse på stammer 1-20 og 21-40.

2.2 Prøvemateriale benyttet til testing for påvisning av resistensgener

Stammene er hentet fra St. Olavs egen stammebank og er presentert i tabell 2-2. Stammenr. 1-20, 21-26 og 31-40 er stammer dyrket fra pasientmateriale, og kommer fra pasientstammebanken til St. Olavs. Stammenr. 27-30(merket CCUG) er dyrket fra den generelle stammebanken til St. Olavs. Stammene ble alle dyrket på blodagar og inkubert i $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ i 18 timer ± 2 . Alle pasientstammer sendes til K-Res og lagres på St. Olavs i flere år i -70°C , for retesting og nye undersøkelser. På noen av stammene foreligger det info på hvilket gen som er blitt påvist av K-Res, Tromsø. De står listet opp i kolonnen for «predefinert gen». Ruter med «-» vises for de der info om gen ikke foreligger. KPC er et gen innenfor gruppen $\text{ESBL}_{\text{KARBA-A}}$, mens OXA-48 er i kategorien $\text{ESBL}_{\text{KARBA-D}}$ (se figur 1-6).

Tabell 2-2: Viser prøvenummer og bakteriestamme som testes for påvisning av AmpC eller MB og predefinert gen. Ruter merket – vises for de stammene der det ikke foreligger info om kjent gen.

AmpC			MBL		
Stammenr	Bakteriestamme	Predefinert gen	Stammenr	Bakteriestamme	Predefinert gen
1	<i>Escherichia coli</i>	-	21	<i>P. aeruginosa</i>	VIM
2	<i>Escherichia coli</i>	-	22	<i>P. aeruginosa</i>	VIM
3	<i>Citrobacter spp.</i>	-	23	<i>P. aeruginosa</i>	VIM
4	<i>Escherichia coli</i>	-	24	<i>P. aeruginosa</i>	VIM
5	<i>Escherichia coli</i>	-	25	<i>Escherichia coli</i>	-
6	<i>Escherichia coli</i>	-	26	<i>K pneumoniae</i>	-
7	<i>Escherichia coli</i>	-	27	CCUG 56233 <i>K. pneumoniae</i>	KPC
8	<i>Escherichia coli</i>	-	28	CCUG 58233 <i>K. pneumoniae</i>	VIM
9	<i>Escherichia coli</i>	-	29	CCUG 60138 <i>K. pneumoniae</i>	NDM
10	<i>Escherichia coli</i>	-	30	CCUG 64452 <i>K.pneumoniae</i>	OXA-48
11	<i>Escherichia coli</i>	-	31	<i>K. pneumoniae</i>	NDM
12	<i>Escherichia coli</i>	-	32	<i>K. pneumoniae</i>	NDM
13	<i>Escherichia coli</i>	-	33	<i>Escherichia coli</i>	VIM
14	<i>Escherichia coli</i>	-	34	<i>Proteus mirabilis</i>	NDM
15	<i>Escherichia coli</i>	-	35	<i>Escherichia coli</i>	NDM
16	<i>Escherichia coli</i>	-	36	<i>Citrobacter spp.</i>	NDM
17	<i>Escherichia coli</i>	-	37	<i>Escherichia coli</i>	IMP
18	<i>Escherichia coli</i>	-	38	<i>K. pneumoniae</i>	VIM
19	<i>Escherichia coli</i>	-	39	<i>K. pneumoniae</i>	VIM
20	<i>Escherichia coli</i>	-	40	<i>P. aeruginosa</i>	-

2.3 Fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer på AmpC med diffusjonstabletter og MIC-strips

Bakteriestamme 1- 20 ble brukt for fenotypisk testing for påvisning av AmpC. Stamme 1-8 ble testet med både MIC-strips og diffusjonstabletter. Bakteriekolonier ble hentet med 10^{-2} ml-øse og avsatt i 0,9% NaCl og justert til 0,5 MacFarland i et densiometer (Biosan DEN-1B). Denne bakteriesuspensjonen ble spredt på MacConkey-agar for kontroll av renhet av bakteriekultur. Videre ble en bomullspensel dyppet i samme bakteriesuspensjon. Denne bomullspenselen ble dyttet mot veggen av røret, slik at en del av væsken rant av, for å hindre for stor mengde bakteriesuspensjon i Müeller-Hinton(MH)-agaren. Det ble dratt en diagonal stripe over hele MH-agaren. Deretter ble den satt på en maskin med roterende evne. Bomullspensel ble så satt på midtpunktet av agarskålen og flyttet sakte ut mot siden samtidig som den roterte. To MH-agarer ble benyttet på stamme 1-8, mens en MH-agar ble benyttet på stamme 9-20. I den ene MH-agaren ble det avsatt fire resistenstabletter fra AmpC Confirm Kit (Rosco Diagnostica)

- Ceftazidime, 30 µg + Cloxacillin (Cazcx)
- Ceftazidime, 30 µg (Caz30)
- Cefotaxime, 30 µg + Cloxacillin (Ctxcx)
- Cefotaxime, 30 µg (Ctx30)

Den andre MH-agaren fikk MIC-strips (Liofilchem) der ene halvdelen inneholdt Cefotetan, og andre inneholdt Cefotetan + Cloxacillin.

Påvisning av resistensmekanismer ved fenotypisk testing ble avlest følgende dag etter 18 ± 2 timer i $35^{\circ} \text{C} \pm 2$.

2.4 Fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer på MBL

Bakteriestamme 21-40 ble testet for MBL med diffusjonstabletter.

Stamme 21-24, samt 40 ble testet med Total MBL Confirm KIT (ROSCO Diagnostica) pga. at disse var *Pseudomonas* stammer. Dette inneholdt:

- Imipenem (IMI10)
- Dipicolinic Acid (DPA)
- Imipenem + Dipicolinic Acid(IMIDP)

- Imipenem + EDTA (IMI10E)

Stammene sås ut med samme prosedyre som hos AmpC. Imipenem og Dipicolinic Acid legges helt inntil hverandre, mens Imipenem + Dicolinic Acid og Imipenem + EDTA legges så langt i fra hverandre som mulig. Påvisning av resistensmekanismer vurderes etter 18 ± 2 timer i $35^\circ \text{C} \pm 2$.

Stamme 25-39 ble testet med KPC, MBL og OXA-48 Conform Kit (ROSCO Diagnostica).

Dette inneholdt:

- Meropenem (MRP10)
- Meropenem + Dipicolinic Acid (MRPDP)
- Meropenem + Phenylboratic Acid (MRPBO)
- Meropenem + Cloxacillin (MRPCX)
- Temocillin (TEMOC)

Stammene sås ut med samme metode som hos AmpC. Her benyttes to MH-agarer, hvorav 2 diffusjonslapper er på ene og 3 på andre. Diffusjonslappene ligger spredt fra hverandre. Påvisning av resistensmekanismer leses av etter 18 ± 2 timer i $35^\circ \text{C} \pm 2$.

2.5 DNA-ekstraksjon av kontrollstammer og pasientstammer

Bakteriestammer og positive kontrollstammer ble utsådd på blodagar, og inkubert i $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ i 18-24 timer i normal atmosfære. Etter døgn-inkubasjon ble både positive kontrollstammer og prøvestammer av pAmpC og MBL ekstrahert med EZ1 Advanced XL (Qiagen). 200 μl Digestion Buffer (Qiagen) ble avsatt i prøverør. Bakteriekolonier ble hentet med 10^{-3} ml-øse og avsatt i 200 μl buffer. I ekstraheringsinstrumentet ble DNA fra bakteriestamme lysert og gjort tilgjengelig. Deretter ble magnetpartikler tilsatt i løsningen, der DNA ble bundet til. Så vasket man løsningen og fjernet overflødig materiale og magnetpartikler som ikke var bundet til DNA. Etter ekstraksjon satt man igjen med 50 μl bakterieekstrakt.

2.6 Bruk av PCR til påvisning av pAmpC og MBL gener

20 bakteriestammer ble testet med duplex real-time PCR (2 primer- og probe sett) for tilstedeværelse av pAmpC-gen. I metoden ble det testet for to av de vanligste pAmpC-genene, DHA og CIT.

20 andre bakteriestammer ble testet i triplex PCR-mix med SIM NDM og IMP, og i duplex PCR-mix med VIM og GIM.

FAM, HEX og Texas Red (TEX) var de tre fluoroforene som ble benyttet til real-time PCR.

Disse har ulike bølgelengder, og går an å kombinere i en triplex PCR-mix.

Innstillingen som ble benyttet til real-time PCR på CFX 96 var Perfecta 2-step TaqMan 60.

Den startet med 45°C i 5 min for UNG-aktivering, før temperaturen øker til 95°C i 3 min med polymeraseaktivering. Deretter kjørte instrumentet 40 sykluser der 1 syklus inneholdt: 95°C i 5 sek (step 1, denaturering) og 60°C i 30 sek (step 2, primer annealing). Fluorescens ble avlest etter hver syklus.

I mixene benyttet man Molecular Grade Water(MGW). Vannet var filtrert og behandlet med Diethylpyrocarbonate(DEPC). Dette er vann som er ultrarent og som er fritt for nuclease-enzymmer som kan bryte ned viktige substanser i real-time-PCR.

2.7 Primer- og probeløsninger benyttet til real-time PCR

Primer- og probesett ble bestilt fra Tyskland fra et firma ved navn TIB Molbiol, og benyttes av St.Olavs Hospital. Primer- og probesettene inneholdt forward primer, reverse primer og probe. Disse settene ble sendt som tørrstoff i rørene, og måtte dermed tilsettes MGW. Primere og prober ble tilsatt gitt volum MGW slik at konsentrasjonen til alle rørene ble 100 µM.

Tabell 2-3: Oversikt over primer- og probesett for real-time PCR.. Duplex med grønn skrift, og triplex er merket med rød skrift.

AmpC		MBL	
Gener	Fluorofor	Gener	Fluorofor
DHA	TEX	VIM	FAM
CIT	FAM	GIM	HEX
		SPM*	TEX
		SIM	HEX
		NDM	TEX
		IMP	FAM

*SPM ble også testet, men ble utelukket fra resultater pga. problemer med påvisning av genet i real-time PCR

De 100 μ M primer- og probeløsningene ble fortynnet til stockløsninger, og benyttet i en real-time PCR. Primere og probeløsninger ble utpipettert fra stamløsning. Primere fikk en konsentrasjon på 12 μ M etter tilsats av MGW, mens prober hadde 8 μ M.

Tabell 2-4: Oversikt over hver primer/TaqMan-probes oppbygning. Fluoroforer/reporter er merket med farge. Quencher i **tykk** skrift. viser basesekvens på prober og primere, og hvilke fluoroforer og quencher som ble benyttet.

Tabell 2-4: Oversikt over hver primer/TaqMan-probes oppbygning. Fluoroforer/reporter er merket med farge. Quencher i tykk skrift.

Primer/probe	Sekvens (5' - 3'), 5'-fluorofor, 3'-quencher
CIT-forward	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA
CIT-reverse	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC
CIT-probe	6FAM -CCG CTG GGT TCA GGY CAA CAT GGA- BHQ1
DHA-forward	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T
DHA-reverse	GCT GCC ACT GCT GAT AGA A
DHA-probe	TEX -AAA GCC GTG CGG ATC TGC TG- BHQ2
VIM-forward	GAT GAG TTG CTT TTG ATT GAT ACA GC
VIM-reverse	CCG ACK CGR TCG TCA T
VIM-probe	6FAM -TCG CGG AGA TTG ARA AGC AAA TTG GA- BHQ1
GIM-forward	TTG GTC TGA AGA AGA CAC GAA G
GIM-reverse	GTA GGA ACC GGC TTT CCT T
GIM-probe	HEX -ATC GCA CTG CTG GTA TCA AGT TGC TA- BHQ1
SIM-forward	CGG AAG AAG CCC AGC
SIM-reverse	GTT TTT TAA CGA TGC CGA ATC CCT TG
SIM-probe	HEX -AAG GGA TCT ATC TTC ATA CAT CTT TTC AAG A- BHQ1
NDM-forward	CCC GAC GAT TGG CCA
NDM-reverse	ATC CAG TTG AGG ATC TGG GC
NDM-probe	TEX -ACC GAA TGT CTG GCA GCA CAC TTC- BHQ2
IMP-forward	CCC ACG TAT GCA TCT GAA TTA ACA AA
IMP-reverse	CCA AAC CAC TAC GTT ATC TTG AGT G
IMP-probe	6FAM -CAA GCT AMA WAT TCA TTT AGC GGR GYT ARC TAT T- BHQ1
SPM-forward	AGG CAA GGT CTT CTC GTT TT
SPM-reverse	GCA TCT CCC AGA TAA CCA AGT T
SPM-probe	TEX -TCG CCC GAT AAT GTC GTC GTA TAT T- BHQ2

2.8 Tillaging av PCR-mix for multiplex real-time PCR

Det ble laget PCR-mixer for duplex og triplex real-time PCR. I duplex PCR-mixen ble det pipettert 0,5µl primere og prober, 5 µl eluat (fortynnet 1:100), 10 µl PCR multiplex supermix(UNG) og 2 µl MGW. I en triplex real-time PCR pipetterte man 2 primere og 1 probe ekstra i forhold til duplex. MGW ble da redusert til 0,5 µl, tilsvarende det økte primer-

og probevolumet, slik at totalvolum fortsatt var 20 µl for begge mixene. For påvisning av AmpC-genene brukte man en duplex PCR-mix, med prober og primere for DHA og CIT. MBL-genene ble delt i to triplex-grupper, fordi alle seks gener ikke kunne testes med samme PCR-mix. Dette er fordi noen av probene vi brukte til deteksjon i real-time PCR inneholdt samme fluorofor, og kan dermed interferere med resultatet. Det ble besluttet å teste SIM, NDM og IMP i én gruppe, og VIM, GIM og SPM i den andre gruppen. På grunn av vansker med å påvise SPM i positiv kontroll ble det bestemt at VIM og GIM i stedet skulle analyseres i duplex PCR-mix, uten primere/probe for SPM.

2.9 Effektivitetstesting og utregning av deteksjonsgrense

Effektivitet ble testet ved å lage en tifolds fortynningsrekke for de 7 positiv kontrollene. Kontrollene ble fortynnet syv ganger i forholdet 5µL:45µL med MGW. Høyeste konsentrasjon var ufortynnet, og laveste konsentrasjon hadde en fortynning på 1:10⁷ av opprinnelig DNA-bakterieekstrakt. På real-time PCR ble det pipettert 3 paralleller fra hver fortynning, i tillegg til ufortynnet kontroll, i en triplex eller duplex PCR-mix. Effektivitet beregnes ut fra formel:

$$\text{Effektivitet (E)} = 10^{(-1/\text{stigningstall})}$$

Formelen henviser til stigningstallet til en standardkurve for fortynningsrekken, med gjennomsnittlige C_T-verdier for de 3 parallellene av de 8 konsentrasjonene på y-aksen og log₁₀ av beregnet konsentrasjon på x-aksen.

DNA-mengde ble målt i ufortynnet eluat fra hver positive kontrollstamme med Qubit Fluorometer 3.0. Antatt genomstørrelse for hver bakterietype, angitt i millioner basepar (Mb):

E. coli: 5,0 Mb

P. aeruginosa: 6,3 Mb

K. pneumoniae: 5,6 Mb

3 Resultater

Hensikten med prosjektet er å utprøve en metode utarbeidet for multiplex real-time PCR. Målet er å sikkert detektere tilstedeværelse av de vanligste resistensgener i gruppene ESBL_{M-C} (pAmpC) eller ESBL_{KARBA-MBL}. I dette prosjektet ble 20 stammer (1-20) testet for tilstedeværelse av enten CIT eller DHA. 20 andre stammer (21-40) ble testet for ervervelse av MBL-gen, der man undersøkte om stammen hadde VIM, GIM, SIM, NDM, eller IMP. SPM kunne ikke påvises. Testmetodene som ble brukt i bacheloroppgaven var påvisning av resistensmekanismer vha. fenotypiske metoder og molekylær diagnostikk med real-time PCR. ROSCO diffusjonstabletter og MIC-strips (Liofilchem) ble benyttet i fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer. CFX 96 (BIO-RAD) var instrumentet som ble benyttet i real-time PCR. Real-time PCR-metoden måtte først kvalitetssikres. Disse to testmetodene ble sammenlignet med hverandre, og dette ble gjort for å eventuelt kunne benytte en real-time PCR i daglig rutine. I PCR-resultatene benyttes kurve av testrunde fra multiplex real-time PCR, effektivitetstesting med fortynningsrekke, og multiplex real-time PCR analyse av stammer.

Hensikten med å lage fortynningsrekke er å se på sensitiviteten og spesifisiteten til fortynningsrekken. Ut fra dette kan man vurdere sensitiviteten til real-time-PCR produktet og hvor lite bakterie-DNA som trengs for å detektere resistensgenet. Det ble laget fortynninger av DHA positiv kontroll, henholdsvis med 1:1, 1:10, og helt til 1:10⁷. Det ble laget 3 paralleller for hver fortykning. Real-time PCR-mixen er duplex eller triplex.

Testing av stammene 1-20 og 21-40 ble gjort etter metodisk oppsett for multiplex real-time PCR. I duplex real-time PCR-mix ble det pipettert volum på 0,5 µl for hver primer/probe, 5,0 µl bakterieeluat fra stammer, 10,0 µl Multiplex mastermix (UNG) og 2,0 µl MGW. Ved triplex endres MGW volum fra 2,0 µl til 0,5 µl, der det ekstra primer- og probesettet erstatter dette volumet.

3.1 Utprøving av metode, deteksjonsgrense og effektivitet

Alle kontrollstammer, unntatt SPM, ga forventede resultater på PCR med både singleplex og multiplex. Konvensjonell PCR med gelelektroforese på 2% agarosegel med ethidiumbromid

ble utført for SPM. Dette viste at det ikke ble dannet PCR-produkt for SPM hverken på singleplex eller multiplex.

Laveste målbare fortykning ble regnet som den laveste konsentrasjonen i fortykningsrekken der alle 3 paralleller hadde positivt resultat. Deteksjonsgrense ble beregnet ut fra målt DNA-konsentrasjon i ufortynnet eluat, mengde eluat i PCR-miks og de ulike bakterienes antatte genomstørrelse i antall basepar. Til dette ble kalkulator på følgende nettside brukt:

<https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>

Resultatet fra kalkulatoren (copy number) ble satt inn i følgende formel:

(copy number) * (eluatvolum benyttet i PCR) * (laveste målbare fortykning)

Eksempel for CIT:

$$(6,97 * 10^6) * 5 * \left(\frac{1}{10^6}\right) = 35$$

Dette vil si at så lite som 35 genomekvivalenter, dvs. DNA fra 35 bakterier, er tilstrekkelig for å få positivt resultat i alle 3 paralleller.

Tabell 3-1 Resultater fra fortykningsrekke. Laveste målbare konsentrasjon angitt kun for positivt resultat i triplett. Deteksjonsgrense angitt i genomekvivalenter (GE).

Gen	Målt DNA-konsentrasjon i ufortynnet eluat (ng/μL)	Laveste målbare fortykning	Deteksjonsgrense (GE/PCR-reaksjon)	Effektivitet (%)	R ² -verdi på standardkurve
CIT	37,6	1:10 ⁶	35	103	0,9972
DHA	44,3	1:10 ⁷	4	95	0,9994
VIM	38,5	1:10 ⁶	28	115	0,9903
GIM	35,1	1:10 ⁷	3	117	0,9938
SIM	40,5	1:10 ⁷	3	111	0,9944
NDM	28,9	1:10 ⁶	24	97	0,9986
IMP	35,0	1:10 ⁷	32	101	0,9976
SPM*					

* SPM ikke detektert på PCR

3.2 Fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer

Fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanisme ble utført med diffusjonstabletter for alle bakteriestammer og med MIC-strips hos stamme 1-8. Diffusjonstablettene ble avsatt i MH-agaren med god spredning mellom for å kunne avlese hemmingssoner, med unntak for enkelte av tablettene i testing for påvisning av *P. Aeruginosa* ved kit for MBL. Forskjeller i hemmingssone rundt diffusjonslappene ble studert etter inkubasjon 18 ± 2 timer i $35^\circ \text{C} \pm 2$ og vurdert etter kriterier for AmpC eller MBL.

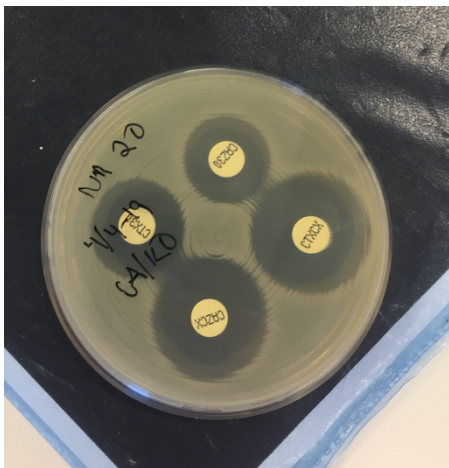
3.3 Resultat for fenotypisk testing for resistensmekanismer på stamme 1-20 på AmpC

Det ble målt differanse på hemmingssonene mellom cefotaxim/cloxacillin og cefotaxime alene, samt ceftazidime/cloxacillin og ceftazidime alene. Differanse ≥ 5 mm gir positivt resultat på AmpC.

Eksempel: Stammenr. 20:

Metode a og/eller b gir positivt resultat

a) Cazcx	–	Caz30 ≥ 5 mm	->	Positivt resultat for AmpC
28 mm	–	22 mm = 6 mm	->	Stamme 20 er positiv for AmpC
b) Ctxcx	–	Ctx30 ≥ 5 mm	->	Positivt resultat for AmpC
30 mm	–	22 mm = 8 mm	->	Stamme 20 er positiv for AmpC



Figur 3-1: Eksempel på positivt resultat for fenotypisk resistensbestemmelse på stamme nr.20 med bruk av diffusjonslapper fra AmpC Confirm Kit (ROSCO Diagnostica).

Fullstendig resultat for hemmingssoner for fenotypisk testing for åpvisning av AmpC finnes i vedlegg.

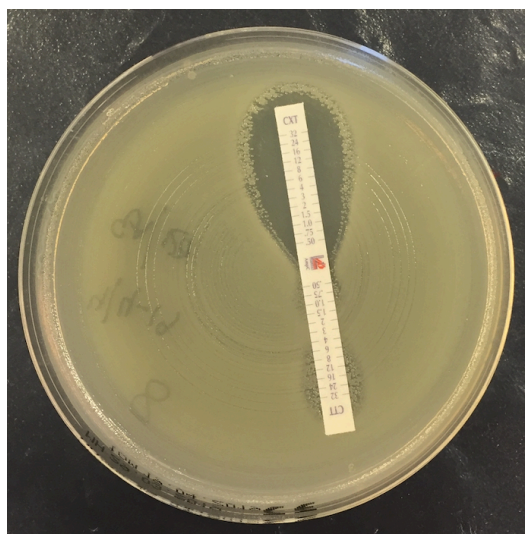
Ingen inhibering gir 32 i score på Liofilchem MIC-strips, mens fullstendig inhibering gir 0,5.

Ratio mellom $\frac{\text{Cefotetan}}{\text{Cefotetan}+\text{Cloxacillin}}$ beregnes. Positivt resultat er når ratio ≥ 8 .

Figur 3-2: Eksempel på positivt resultat for fenotypisk resistensbestemmelse på stamme nr.8 ved bruk av MIC-strips(ROSCO Diagnostica). viser ingen inhibering på Cefotetan, og fullstendig inhibering på Cefotetan+Cloxacillin.

$$\left(\frac{32}{0,5}\right) = 64$$

Stamme nr.8 er positiv for AmpC. Resterende resultat fra MIC-strips på stamme 1-7 finnes i vedlegg.



Figur 3-2: Eksempel på positivt resultat for fenotypisk resistensbestemmelse på stamme nr.8 ved bruk av MIC-strips(ROSCO Diagnostica).

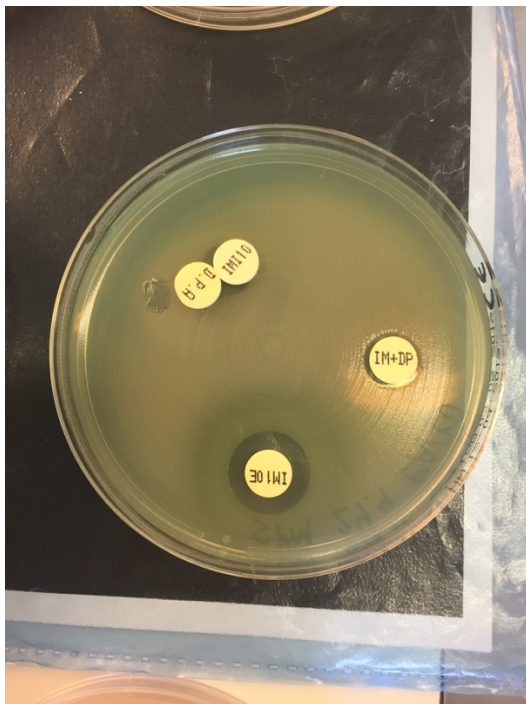
Tabell 3-2: Viser stammer av AmpC som gir positivt utslag på diffusjonslapper fra AmpC Confirm Kit (ROSCO Diagnostica) og MIC-strips

	Positive AmpC Confirm Kit	MIC-positive
Stammenr	2-20	2-8

3.4 Resultat for fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer på stamme 21-40 på MBL

Stamme 21-24, samt nr 40 ble testet med Total MBL Conform KIT(ROSCO Diagnostica) pga. at disse var *Pseudomonas*-stammer.

Positivt resultat vises enten ved hemmingssone/synergi mellom Imipenem og DPA(ligger inntil hverandre) eller hemmingssone der man måler differansen mellom Imipenem+DPA og Imipenem, eller Imipenem+EDTA og Imipenem. Differanse på ≥ 4 mm ansees som positivt for MBL.



Figur 3-3: Eksempel på positivt resultat for fenotypisk testing for påvisning av MBL hos *Pseudomonas Aeruginosa*. Bruk av Total MBL Confirm Kit (ROSCO Diagnostica).

Tabell 3-3: Viser stammer som er positive for MBL. *Pseudomonas* stammernr, 21-24 og 40. Bruk av Total MBL Confirm Kit(ROSCO Diagnostica)

	Stammenr.
Positiv for MBL	21-24 og 40

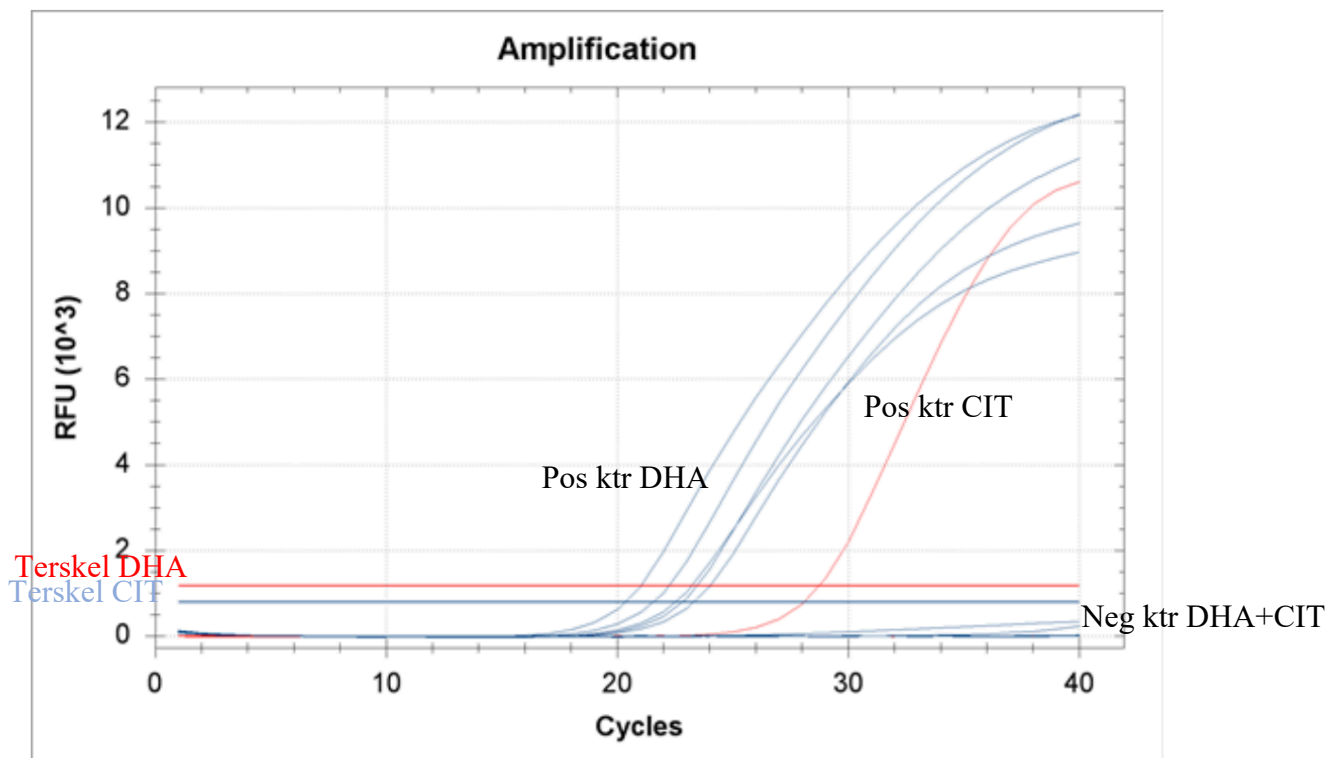
Resultatavlesning for stamme 25-39 baserer seg på tabell som ligger i vedlegg Figur 0-20: Oversikt over hvordan man vurderer hemmingssoner og kan eventuelt påvise MBL ved bruk av KPC/MBL, and OXA-48 Confirm Kit(ROSCO Diagnostica) Hemmingssoner vurderes ved å trekke ifra hemmingssone på MRP10. Eks. MROBO – MRP10 = x. Dette gjøres også med MRPDP, MRPCX, Temocillin. Alle krav for hemmingssoner i forhold til MRP10, må stemme overens med klassifisering for MBL, for å klassifisere det som MBL (30).

Tabell 3-4: Viser stammer som er positive for MBL. Enterobacteriaceae, stammenr. 25-39. Bruk av KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit(ROSCO Diagnostica)

	Stammenr
Positiv for MBL	31, 32, 39

3.5 Resultat for påvisning av pAmpC og MBL med real-time PCR

Eksempel på duplex real-time PCR analyse. Tester for påvisning av AmpC-gen i stamme 1-7. DHA (Rød kurve) og CIT (blå kurve). Negativ kontroll DHA+CIT og positiv kontroll for CIT og DHA er også testet. Positive real-time PCR-resultat vises ved kurver som overstiger linjen for terskel på DHA og CIT. Det betyr at det er amplifisert PCR-produkt. Ved godkjente PCR-resultat skal også kurver fra Positiv kontroll fra DHA og CIT vises, i tillegg til at negativ kontroll DHA+CIT ikke skal vise produktdannelse for CIT eller DHA.

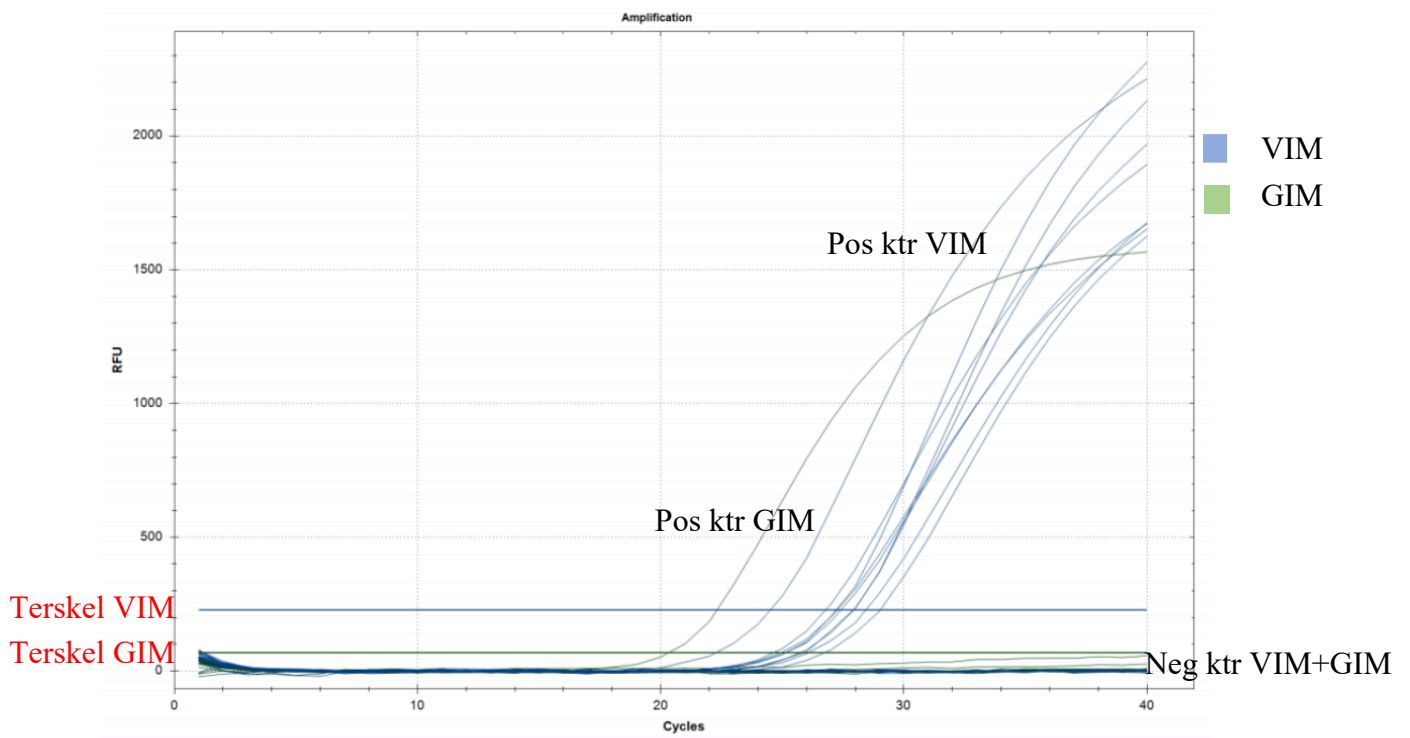


Figur 3-4: Eksempel på real-time PCR analyse.

Stammer 1, 5, 6 og 7 er positive for CIT. Ingen er positive for DHA. Positiv kontroll for DHA og CIT viser dannelse av produkt. Negativ kontroll DHA+CIT viser ingen produkt. Real-time PCR analysen kan godkjennes.

Eksempel på duplex real-time PCR-analyse med hensyn på VIM (blå kurver) og GIM (Grønne kurver).

Stammenr. 21-40 er analyserte i duplex PCR-mix, samt negativ og positiv kontroll for både VIM og GIM er med i PCR-mixen.



Figur 3-5: Eksempel på kurve ved real-time PCR analyse.

Av kurven er stammene 21, 22, 23, 24, 28, 33, 38 og 39 positive for VIM-gen. Ingen er positive for GIM. Positiv kontroll for VIM og GIM er påvist i real-time PCR. Negativ kontroll viser ingen dannelse av produkt. Analysen kan godkjennes. Oversikt over MBL-resultat finnes i Tabell 3-6: Resultatoversikt etter real-time PCR-analysering og fenotypisk påvisning (Fen) av stamme 21-40 på MBL, effektivitet(%), og forhåndskjent gen. Stammer med positivt resultat for resistensgen eller fenotypisk påvisning av resistensmekanismer er merket med + i tilhørende kolonner. Alle kurver og C_T -verdier for MBL analyse på real-time PCR finnes i vedlegg.

3.6 Oversikt over resultater AmpC og MBL

Tabell 3-5: Resultatoversikt etter real-time PCR-analysering og fenotypisk påvisning(Fen) av stamme 1-20 på AmpC og 21-40 på MBL, og effektivitet(%). Stammer med positivt resultat for resistensgen eller fenotypisk påvisning av resistensmekanismer er merket med + i tilhørende kolonner.

AmpC					
Stamm enr	Stamme	DH A	CIT	Fen	Kjent gen
1	<i>E. coli</i>	Neg	+	Neg	-
2	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
3	<i>Citrobacter spp.</i>	Neg	Neg	+	-
4	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
5	<i>E. coli</i>	Neg	+	+	-
6	<i>E. coli</i>	Neg	+	+	-
7	<i>E. coli</i>	Neg	+	+	-
8	<i>E. coli</i>	+	Neg	+	-
9	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
10	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
11	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
12	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
13	<i>E. coli</i>	+	Neg	+	-
14	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
15	<i>E. coli</i>	+	Neg	+	-
16	<i>E. coli</i>	Neg	+	+	-
17	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
18	<i>E. coli</i>	Neg	+	+	-
19	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
20	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	-
Effektiv itet		95%	103 %		

Tabell 3-6: Resultatoversikt etter real-time PCR-analysing og fenotypisk påvisning(Fen) av stamme 21-40 på MBL, effektivitet(%), og forhåndskjent gen. Stammer med positivt resultat for resistensgen eller fenotypisk påvisning av resistensmekanismer er merket med + i tilhørende kolonner.

MBL								
Stamme nr.	Stamme	VIM	GIM	SIM	NDM	IMP	Fen	Kjent gen
21	<i>P. aeruginosa</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	VIM
22	<i>P. aeruginosa</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	VIM
23	<i>P. aeruginosa</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	VIM
24	<i>P. aeruginosa</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	VIM
25	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-
26	<i>K. pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-
27	<i>K. pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	KPC
28	<i>K. pneumoniae</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	VIM
29	<i>K. pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Neg	NDM
30	<i>K. pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	OXA-48
31	<i>K. pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	+	NDM
32	<i>K. pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	+	NDM
33	<i>E. coli</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	VIM
34	<i>P. mirabilis</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Neg	NDM
35	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Neg	NDM
36	<i>Citrobacter spp.</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Neg	NDM
37	<i>E. coli</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	IMP
38	<i>K. pneumoniae</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	VIM
39	<i>K. pneumoniae</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	VIM
40	<i>P. aeruginosa</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	-
Effektivitet		115%	117%	111%	97%	101%		

4 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utprøvd en real-time TaqMan PCR metode for effektiv og pålitelig påvisning av utvalgte resistensgener hos GNS, hovedsakelig *Enterobacteriaceae* og *Pseudomonas aeruginosa*. Metoden tilsvarende den som benyttes av K-res ved UNN, Tromsø. Primere og prober er rettet mot de samme gensekvensene, og samme PCR-program benyttes. Forskjellen er at andre reportere og quencherer benyttes. K-res har utviklet metode sin på en oppdatert metode utviklet i Storbritannia med tilsvarende real-time PCR-analyser for påvisning av MBL og klinisk signifikante ESBL, som pAmpC (26). Den britiske forskningsgruppen brukte en metode som opprinnelig ble utviklet i Sverige for påvisning av pAmpC. Det ble ikke utført optimalisering, siden dette var utført ved K-res. I denne oppgaven ble det utprøvd en real-time PCR metode for effektiv og pålitelig påvisning av utvalgte resistensgener hos GNS, hovedsakelig Enterobacterales og Pseudomonas. Metoden tilsvarende den som benyttes av K-res ved UNN, Tromsø. Primere og prober er rettet mot de samme gensekvensene, og samme PCR-program benyttes. Forskjellen er at andre reportere og quencherer benyttes. K-res har utviklet metode sin på en oppdatert metode utviklet i Storbritannia med tilsvarende real-time PCR-analyser for påvisning av MBL og klinisk signifikante ESBL, som pAmpC (27). Den britiske forskningsgruppen brukte en metode som opprinnelig ble utviklet i Sverige for påvisning av pAmpC. Det ble ikke utført optimalisering, siden dette var utført ved K-res.

Det lyktes ikke å påvise SPM-genet hos positiv kontrollstamme, selv om K-res hadde påvist dette i samme isolat. Forsøk med konvensjonell PCR viste at det ikke ble produsert PCR-produkt. Det ble forsøkt ny ekstraksjon av positiv kontroll for SPM, men dette ga ingen endringer.

Real-time PCR-oppsett med singleplex og multiplex PCR av DHA, ble repetert tre ganger pga. dårlig amplifisering, og unormale kurver. Det ble også gjennomført gelelektroforese av real-time PCR produktet. Den viste at produkt hadde blitt dannet på gelen, og at primere fungerer som det skal. Dessverre var CFX 96 innstilt på feil fluorofor. Man hadde hele veien studert HEX-kurvene, da man skulle studert TEX. HEX har en deteksjonsbølglengde nær TEX, og det gjorde derfor utslag på amplifiseringskurven.

Effektivitet var innenfor ønskelig område (90% - 110%) for CIT, DHA, NDM og IMP. VIM, GIM og SIM har for høy effektivitet, henholdsvis 115%, 117% og 111%. R²-verdiene for standardkurvene var gode (≥ 0.99) for alle genene, men det er en tendens til lavere R²-verdier for genene med for høy effektivitet. Effektivitet over 100% er i realiteten umulig, og kan blant annet skyldes en systematisk pipetteringsfeil ved fortynning (28). Fortynningsrekkene med for høy effektivitet kunne med fordel vært utført på nytt.

Blant stammene testet for pAmpC var 11 av 20 positiv på fenotypisk resistenstesting, men negativ for både CIT og DHA. Mulige årsaker er at de har andre pAmpC enn de vi har testet for, eller at de har aktiverte kromosomale AmpC-gener. Alle disse, unntatt stamme 3, er *E. coli*-isolater, slik at kromosomal AmpC er en mulighet. Stamme 3 er en *Citrobacter*-art og kan også bære på kromosomale AmpC-gener. Stamme 1 ble negativ ved test på fenotypisk testing for AmpC, mens den ble positiv for CIT på real-time PCR. Denne ble retestet på real-time PCR, og gav samme resultat. En forklaring kan være at genet uttrykkes i så liten grad at det kun kan påvises på real-time PCR.

Blant stammene testet for MBL hadde 3 *K. pneumoniae*-isolater positivt resultat på PCR, og negativt på fenotypisk test. Det samme gjaldt 2 *E. coli*-isolater, 1 *P. mirabilis* og 1 *Citrobacter*. Det kan tenkes at det påviste genet ikke uttrykkes hos disse, at genet kun fins i en så liten andel av dem at det ikke gir utslag fenotypisk, eller at genet er ikke-funksjonelt pga. mutasjoner i andre deler av gen-sekvensen enn primer og probe-sekvensene. Stamme 37 ble retestet på real-time PCR, fordi man ikke kunne påvise IMP. Ved foregående tester har det blitt påvist IMP hos denne stammen. Retest gav også negativ resultat endring. Vi kan derfor ikke utelukke at det kan være et falsk-positiv svar hos K-Res, eller et falsk-negativt svar hos oss.

Ett *P. aeruginosa*-isolat hadde positivt resultat på fenotypisk test, men negativt for alle MBL-genene. Andre resistensmekanismer enn metallo-betalaktamase-produksjon er en mulighet, som for eksempel porintap eller økt antall efflux-pumper. Det kan også være tilstedeværelse av andre MBL-gener enn de vi testet for.

Hensikten med å etablere denne metoden ved St. Olavs Hospital er i første rekke å forkorte tiden det tar å få svar på genetiske tester for plasmid-mediert AmpC og MBL. Når resistens

påvises fenotypisk hos bakterier fra pasienter ved St. Olavs, må bakterieisolatene sendes til K-res for molekylær testing. I noen tilfeller kan ikke fenotypiske tester skille mellom kromosomale og plasmid-medierte resistensgener. Dette gjelder blant annet *E. coli*, som enten kan ha kromosomal AmpC eller plasmid-mediert AmpC. Hos andre arter, som *Klebsiella* og *Salmonella spp.* er kromosomal AmpC ennå ikke påvist, kun plasmid-mediert. Hos disse artene kan det dermed antas at fenotypisk resistens skyldes plasmid-mediert AmpC. *P. aeruginosa* kan bære på plasmid-medierte MBL-gener, eller den kan ha andre årsaker til resistens, slik som effluks-pumpe og porin-tap. De fenotypiske testene kan påvise resistens, men ikke alltid årsaken til resistens.

Plasmid-medierte resistensgener har potensiale til å spres mellom bakteriestammer; derfor blir pasienter som får påvist resistente bakterier smitteisolert i påvente av analysesvar fra K-res. I de tilfeller der det viser seg at bakterieresistensen ikke er plasmid-mediert, kunne pasienter vært spart for strenge smitteverntiltak. Disse tiltakene er belastende for pasienter og ressurskrevende for sykehuset. Derfor er det en fordel hvis disse analysene kan utføres lokalt, selv om prøvene uansett vil bli sendt til K-res for verifisering av resultater. Våre resultater kan tyde på at tvilsomme resultater ofte forekommer når den aktuelle bakterien er *E. coli*. Nyetablerte PCR-analyser for påvisning av pAmpC og MBL-gener kan bidra til å få rask avklaring av usikre fenotypiske resultater og dermed hjelpe klinikker til å foreta riktige beslutninger.

5 Konklusjon

Basert på resultatene våre og tidligere studier som sammenligner real-time PCR med fenotypiske metoder, vil man kunne si at real-time PCR har en bedre evne til å påvise de utvalgte resistensgener i ESBL_{M-C} og ESBL_{KARBA-MBL}-gruppene. Vi får med stor sikkerhet påvist stammer som er positive for CIT-, DHA-, NDM- og IMP-gen. Dersom effektiviteten forbedres for deteksjon av VIM-, GIM- og SIM-gen, vil også disse sikkert kunne detekteres.

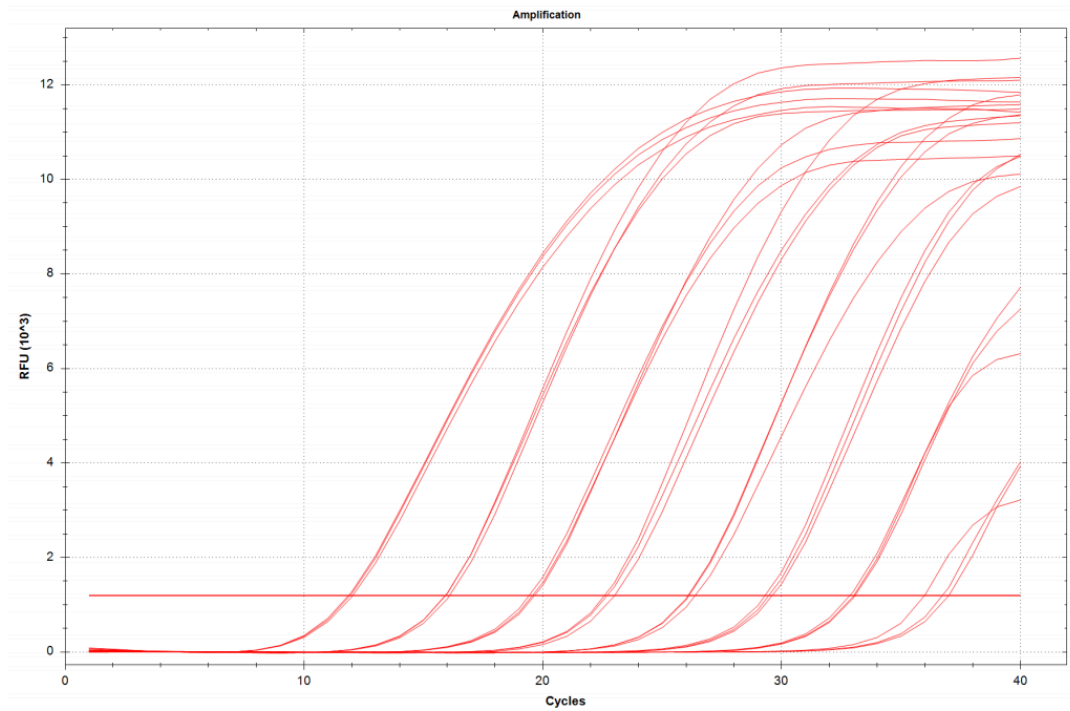
7 Referanser

1. Oliveira J, Reygaert WC. Gram Negative Bacteria. I: StatPearls [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [sitert 13. mars 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>
2. Gunnar Skov Simonsen. Status antibiotikaforbruk og antibiotikaresistens 2017 [Internett]. Oslo: Veterinærinstituttet; 2018 sep. Tilgjengelig på: https://www.vetinst.no/arrangementer/norm-og-norm-vet-arlig-status-for-antibiotikaforbruk-og-antibiotikaresistens/_attachment/download/c62b5986-35f2-4a99-bdbc-b2c3c26e9803:7d59081f35194a9193a6825cd0f358e1eea1cd48/Resultater%20NORM%20og%20NORM-VET%202017-17.09.2018.pdf
3. Beveridge TJ. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J Bacteriol.* 15. august 1999;181(16):4725.
4. Arnfinn Sundsfjord, Ørjan Samuelsen, Eirik Wasmuth Lundblad, Bjørg Haldorsen, Gunnar Skov Simonsen. Bredspektrede betalaktamaser hos gramnegative stavbakterier. 12. april 2008; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/sites/default/files/pdf2008--2741-5.pdf>
5. Wikipedia. Gram negative bacteria [Internett]. Tilgjengelig på: https://en.wikipedia.org/wiki/Gram-negative_bacteria
6. Salton MRJ, Kim K-S. Structure. I: Baron S, redaktør. *Medical Microbiology* [Internett]. 4th utg. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [sitert 1. mai 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/>
7. Tängdén T. Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Treatment, Selection and International Spread [Internett]. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis; 2012. Tilgjengelig på: <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:563708/FULLTEXT01.pdf>
8. Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine.* 1. juni 2006;119(6, Supplement 1):S3–10.
9. Haldorsen BC, Samuelsen Ø. Multiresistente Gram-negative bakterier – et økende globalt helseproblem [Internett]. 2017 [sitert 18. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/2012/fagartikkel-multiresistente-gram-negative-bakterier--et-okende-globalt-helseproblem/>
10. Handal T, Olsen I. Antibakteriell resistens med vekt på betalaktamaser. *TANDLAEGEBLADET.* 2002;106(1):22–7.
11. Ghooi RB, Thatte SM. Inhibition of cell wall synthesis — is this the mechanism of action of penicillins? *Medical Hypotheses.* 1. februar 1995;44(2):127–31.
12. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine.* 1. mai 2012;18(5):263–72.
13. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, mfl. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008;63(1):1–4.
14. Folkehelseinstituttet. ESBL holdige gramnegative stavbakterier - veileder for helsepersonell [Internett]. 2018. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>
15. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* januar 2009;22(1):161–82, Table of Contents.
16. Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* september 2010;82(3):229–33.

17. Samuelsen Ø, Aasnæs B, Sundsfjord A. Oppsummering og analysering av Enterobacteriaceae isolater med kromosomal (cAmpC) eller plasmid-mediert AmpC (ESBLM-C) innsendt til K-res i perioden 2010-2012. 2014. Norwegian language. 2014;
18. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol.* januar 2004;42(1):269–75.
19. Støle M. Screening av miljøprøver for bredspektrede β -laktamaseholdige bakterier (ESBL og karbapenemaser) ved molekylærbiologiske og fylogenetiske undersøkelser. 2017;
20. Naga Pardha Saradhi B. Structural and biochemical investigation of Metallo- β -lactamases: insights into antibiotic binding sites. 2012;
21. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2014;79(4):486–8.
22. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols.* 5. juni 2008;3:1101.
23. Thermo Fisher Scientific. How TaqMan Assays Work [Internett]. Unknown. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>
24. Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR Applications Guide [Internett]. 2006. Tilgjengelig på: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
25. Thermo Fisher Scientific. Efficiency of Real-Time PCR [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html>
26. Thermo Fisher Scientific. What is UNG/UDG? [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-ung-udg.html>
27. Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, Woodford N, Aliyu SH. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* oktober 2013;42(4):352–6.
28. Thermo Fisher Scientific. Poor Efficiency of PCR [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>
29. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(12):3877–80.
30. ROSCO diagnostics. Insert for Kit 98006/98010/98015 [Internett]. 2017. Tilgjengelig på: <http://www.rosco.dk/gfx/pdf/98006-10-15%20-%20Print%20Insert%202017.pdf>

Vedlegg

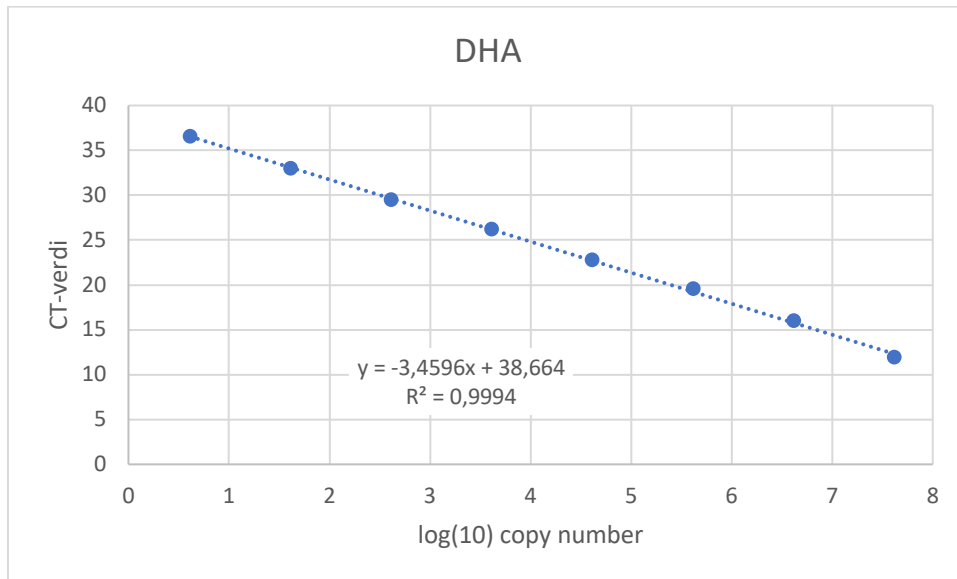
Vedlegg 1: DHA, amplifiseringskurve fra effektivitetstest



Figur 0-1: Fortynningsrekke. Real-time PCR utført på positiv DHA-kontrollstamme. 3 paralleller for hver fortynning. Ufortynnet til 1:10⁷ –fortynning

Av amplifiseringskurven ser vi at 3 og 3 paralleller får ganske tilsvarende C_T-verdier. Vi ser også at man kan detektere resistensgener ved 1:10⁷ fortynning.

Vedlegg 2: DHA, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke.



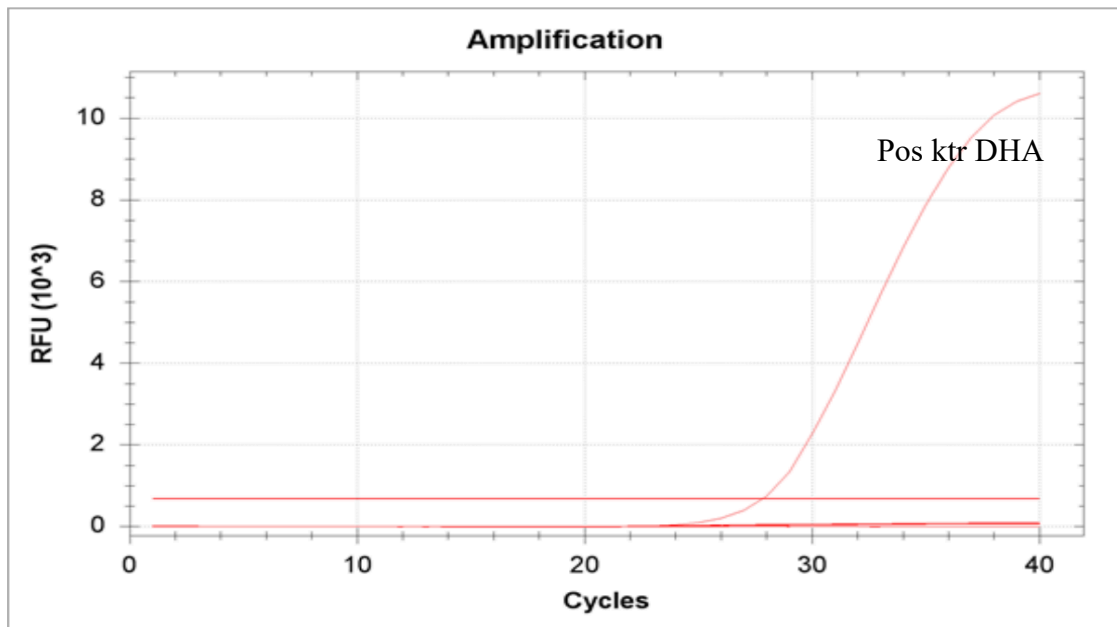
Figur 0-1: Standardkurve for DHA fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-1: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	Effektivitet
10^0	11,9466667	0,096	4,04	94,6 %
10^{-1}	15,9866667	0,099	3,56333333	
10^{-2}	19,55	0,111	3,21	
10^{-3}	22,76	0,159	3,43666667	
10^{-4}	26,1966667	2,024	3,26666667	
10^{-5}	29,4633333	1,993	3,52666667	
10^{-6}	32,99	0,150	3,58666667	
10^{-7}	36,5766667	2,103		

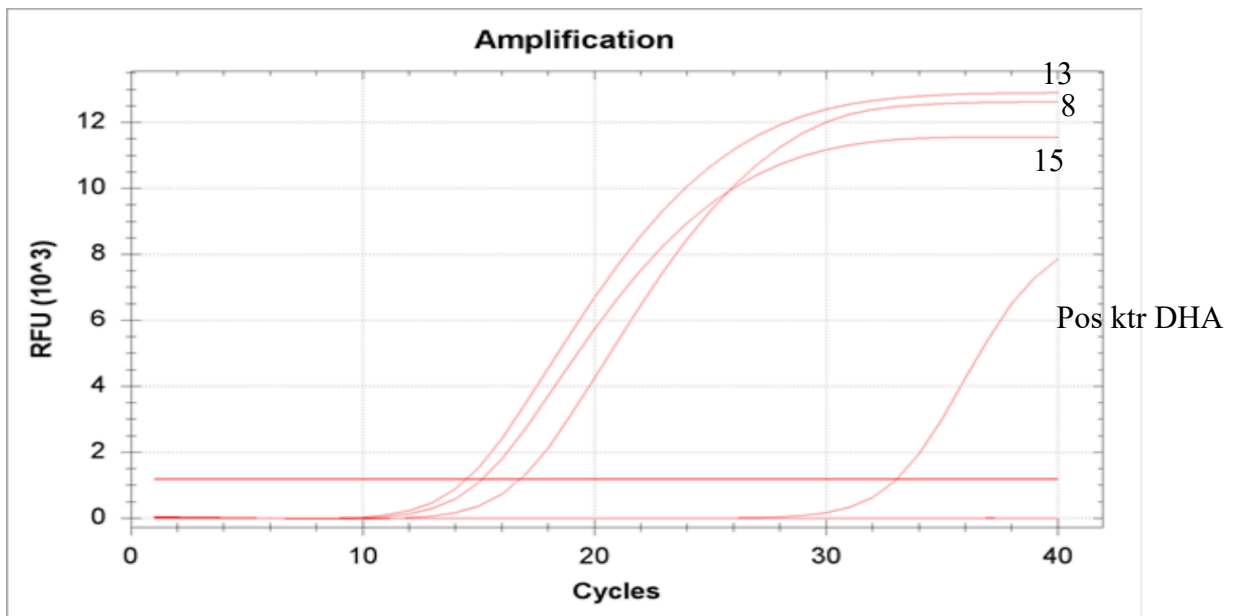
Vedlegg 3: DHA, amplifiseringskurver for teststammer.

DHA stammer 1-7



Figur 0-2: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på DHA. Stammenr. 1-7, samt negativ og positiv kontroll DHA er med i duplex PCR-mixen. Positive kurver er merket med navn/stammenr

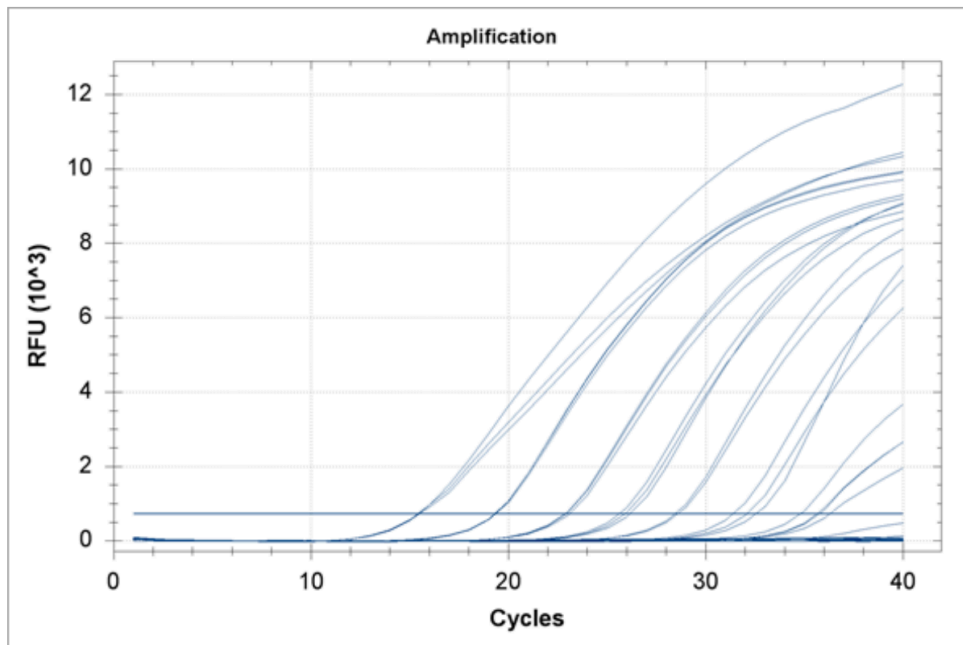
DHA stammer 8-20



Figur 0-3: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på DHA. Stammenr. 8-20, samt negativ og positiv kontroll DHA er med i duplex PCR-mixen. Positive kurver er merket med navn/stammenr.

Stammene 8, 13, 15 innehar positivt resultat, og dermed påvisning av DHA-gen i sitt DNA. Positiv og negativ kontroll er godkjente på begge analyseringene.

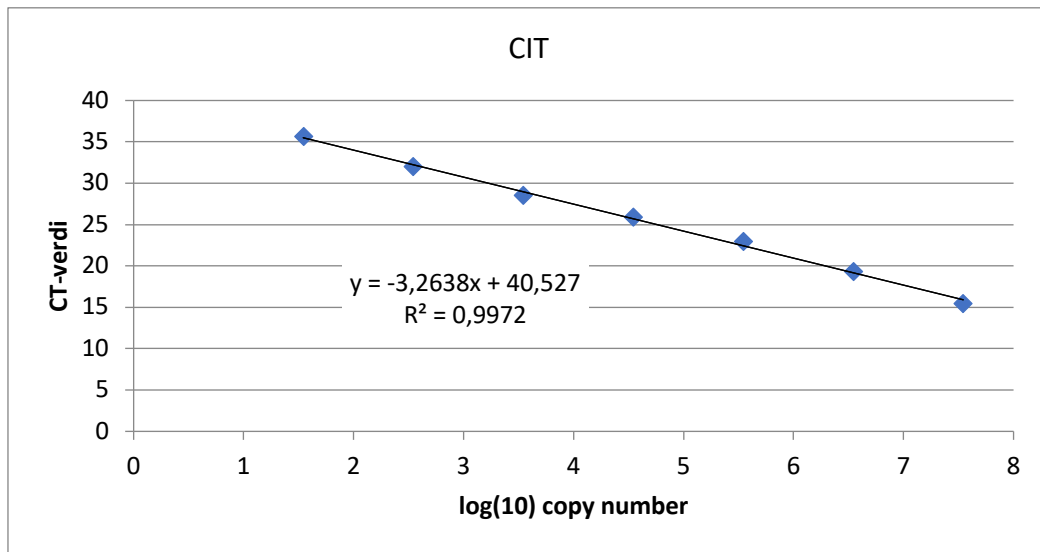
Vedlegg 4: CIT, amplifiseringskurve fra effektivitetstest



Figur 0-4: Real-time PCR, med duplex PCR-mix, utført på positiv CIT-kontrollstamme. 3 paralleller for hver fortynning. Ufortynnet ned til 10⁻⁷ -fortynning.

Kurven viser påfallende like C_T-verdier for hver fortynningsrekke. CIT-genet detekteres ned til 1:10⁶.

Vedlegg 5: CIT, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke.

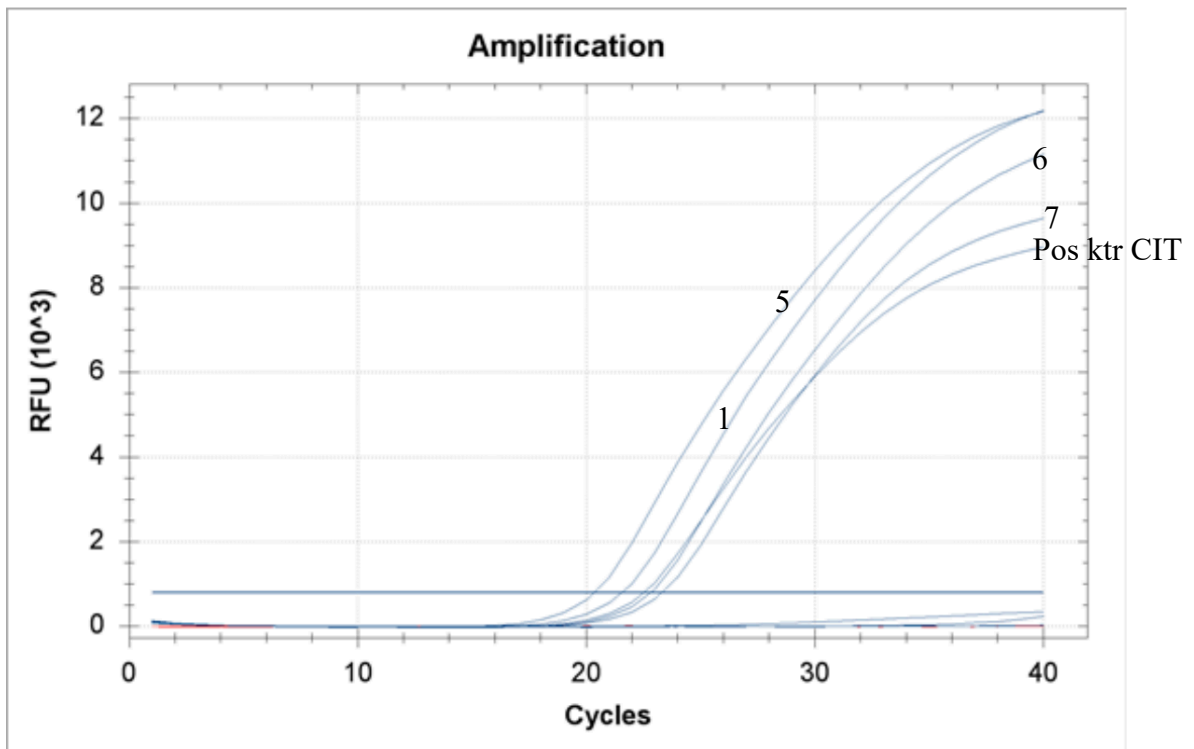


Figur 0-5: Standardkurve for CIT fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-2: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	Effektivitet
10^0	15,47333333	0,055	3,873333333	102,5 %
10^{-1}	19,34666667	0,031	3,643333333	
10^{-2}	22,99	0,115	2,926666667	
10^{-3}	25,91666667	0,099	2,613333333	
10^{-4}	28,53	0,09899495	3,49	
10^{-5}	32,02	0,58412327	3,62	
10^{-6}	35,64	0,7597368	0,01	
10^{-7}	35,65			

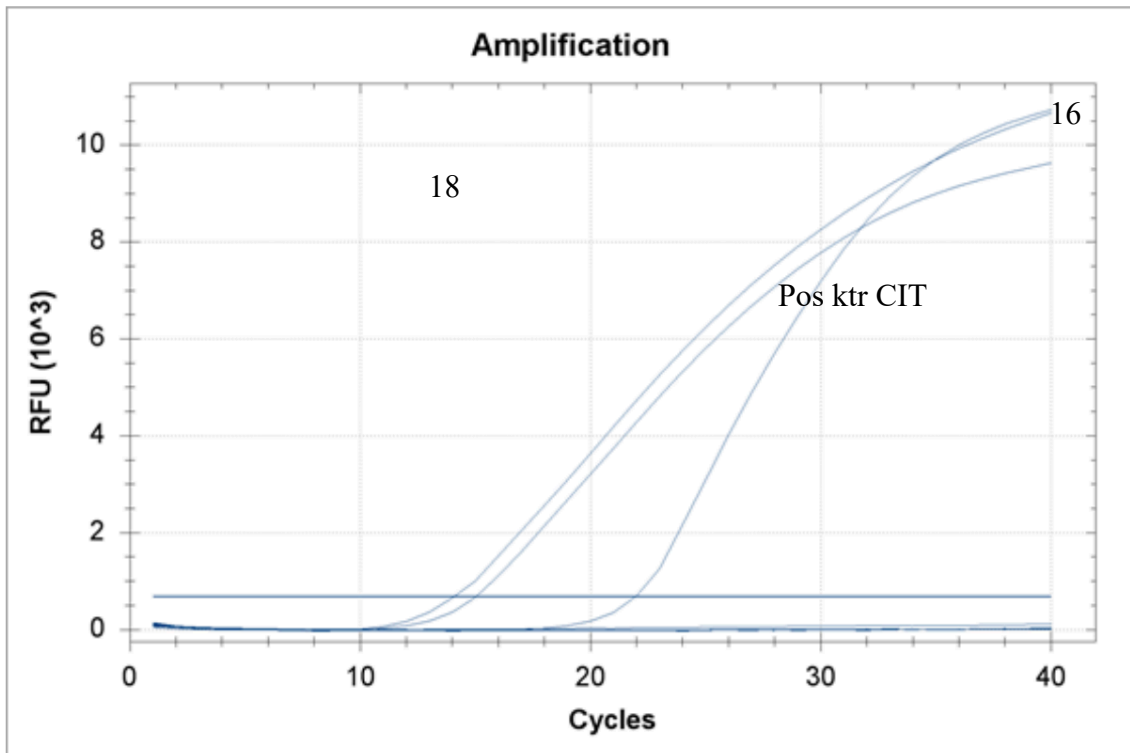
CIT stamme 1-7



Figur 0-5: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på CIT. Stammenr. 1-7, samt negativ og positiv kontroll CIT er med i duplex PCR-mixen. Positive kurver er merket med navn/stammenr.

Stammenr. 1, 5, 6, og 7 viser positivt resultat, og ervervelse av CIT-gen i sitt DNA. Positiv og negativ kontroll er godkjent.

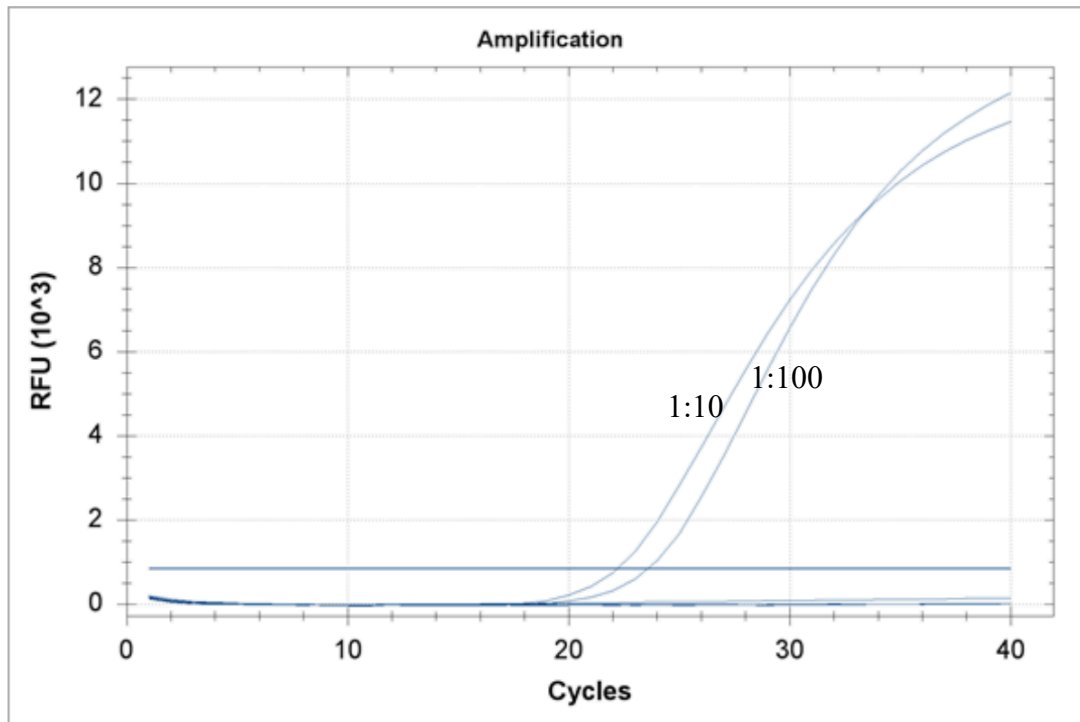
CIT stammer 8-20



Figur 0-6: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på CIT. Stammenr. 1-7, samt negativ og positiv kontroll CIT er med i duplex PCR-mixen. Positive kurver er merket med navn/stammenr.

Stamme nr. 16 og 18 viser positivt resultat på CIT-gen. Positiv og negativ kontroll er godkjente.

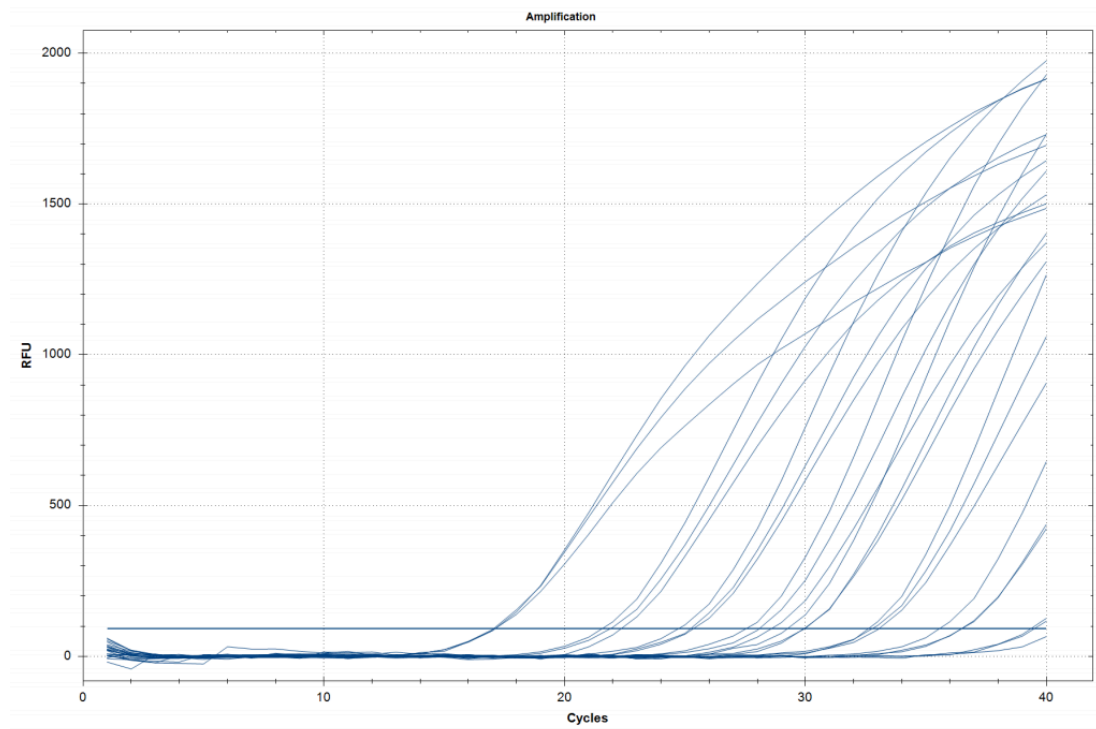
Vedlegg 7: VIM, utprøving av konsentrasjoner



Figur 0-7: Real-time PCR analyse på VIM positiv kontroll med 1:10 og 1:100 fortyning. Duplex PCR med primer- og probesett for VIM og GIM.

Av kurven ser man at en real-time PCR detekterer både 1:10 og 1:100 fortyning av positiv kontroll med VIM-gen i en duplex PCR-mix.

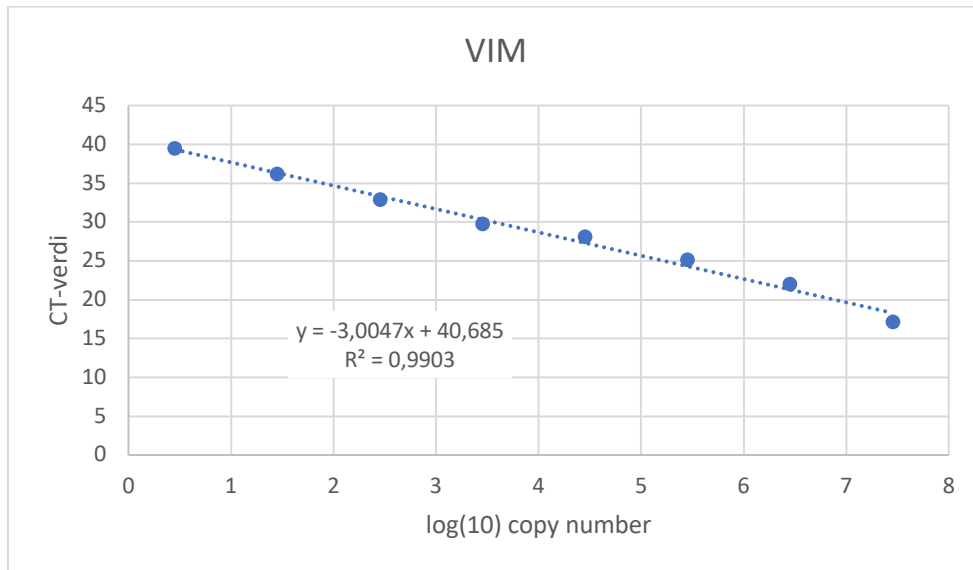
Vedlegg 8: VIM, amplifiseringskurve, effektivitetstesting



Figur 0-8: Duplex Real-time PCR utført på positiv VIM-kontrollstamme. 3 paralleller for hver fortynning. Ufortynnet ned til 1:10⁷-fortynning.

Kurven viser detekterbarhet ned til 1:10⁶ fortynning.

Vedlegg 9: VIM, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke.

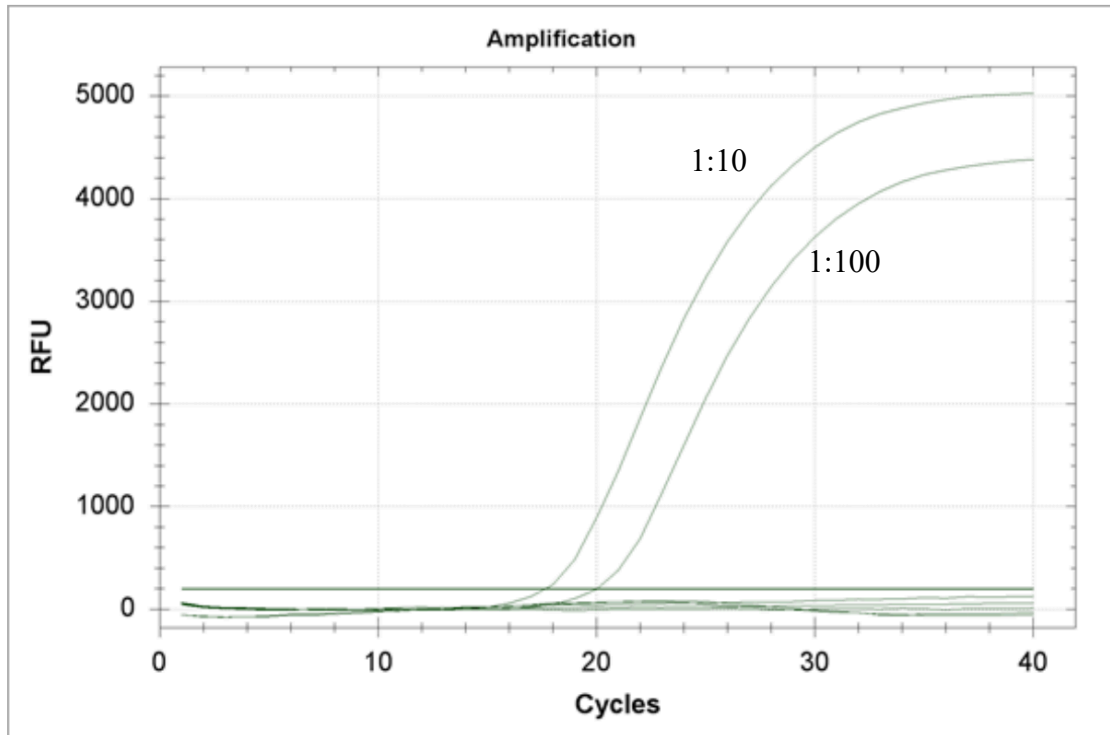


Figur 2: Standardkurve for VIM fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-3: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	Effektivitet
10^0	17,1066667	0,040	4,84666667	115,1 %
10^{-1}	21,9533333	0,391	3,17	
10^{-2}	25,1233333	0,329	2,96333333	
10^{-3}	28,0866667	0,408	1,65333333	
10^{-4}	29,74	2,026	3,09	
10^{-5}	32,83	2,118	3,36666667	
10^{-6}	36,1966667	0,223	3,25333333	
10^{-7}	39,45	2,190		

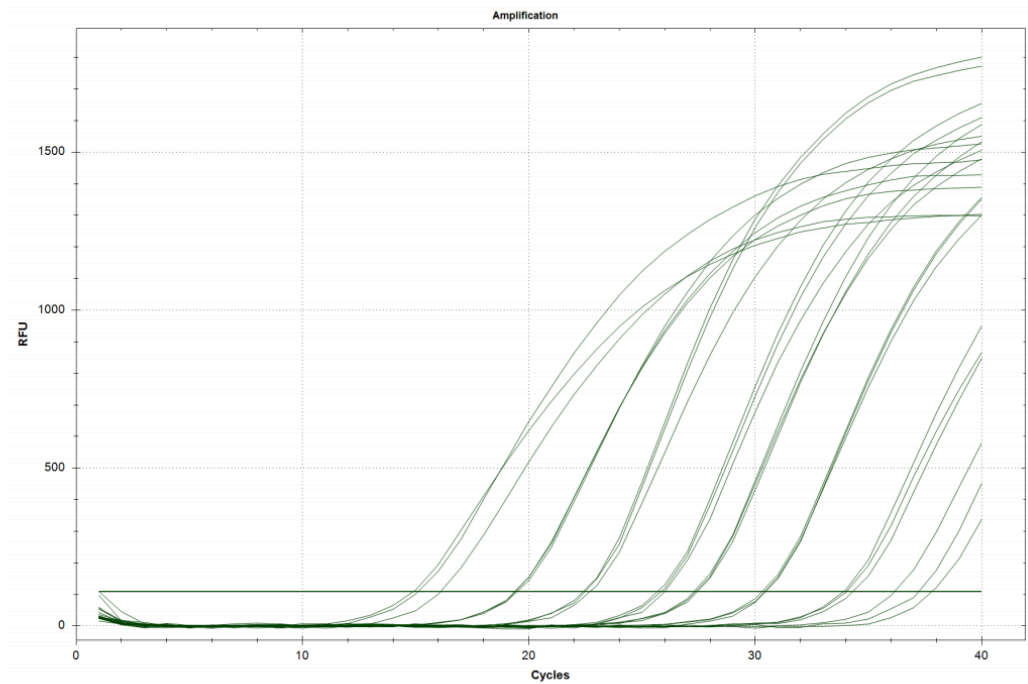
Vedlegg 10: GIM, utprøving av duplex PCR



Figur 0-9: Real-time PCR analyse på VIM positiv kontroller med 1:10 og 1:100 fortyning. Duplex PCR med primer- og probesett for VIM og GIM.

GIM kan detekteres i en duplex PCR-mix med primer og probesett for VIM og GIM. Positiv og negativ kontroller er godkjente.

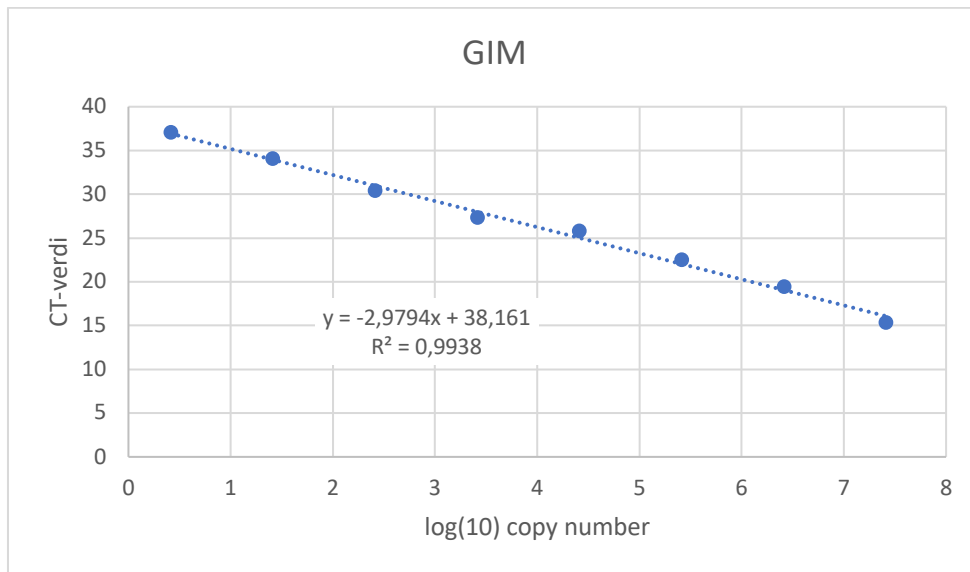
Vedlegg 11: GIM, amplifiseringskurve, effektivitetstest



Figur 0-10: Real-time PCR sensitivitetstest utført på positiv GIM-kontrollstamme. 3 paralleller for hver fortynning. Ufortynnet ned til 10⁻⁷ -fortynning.

Fortynningsrekken viser detekterbarhet ned til 1:10⁷ fortynning.

Vedlegg 12: GIM, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke.

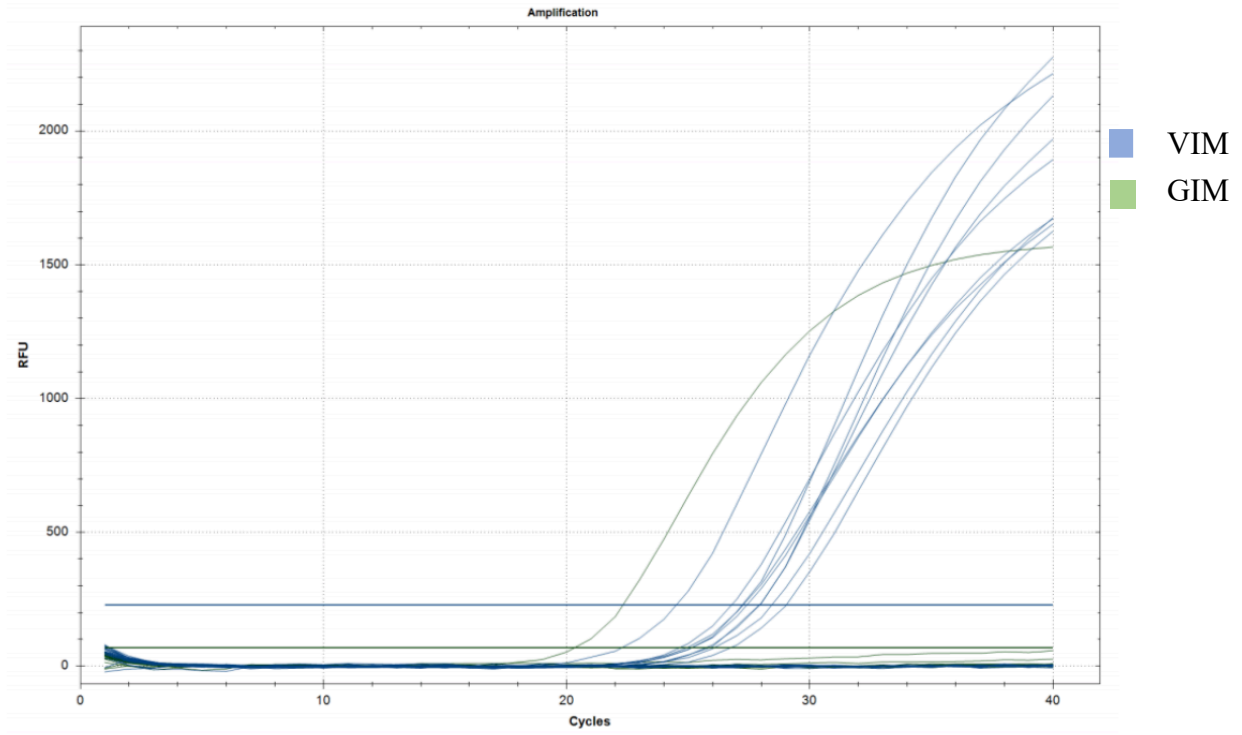


Figur 3: Standardkurve for GIM fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-4: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	effektivitet
10^0	15,37	0,641	4,05	116,6 %
10^{-1}	19,42	0,056	3,1	
10^{-2}	22,52	0,161	3,32666667	
10^{-3}	25,84666667	0,075	1,52	
10^{-4}	27,36666667	1,715	3,023333333	
10^{-5}	30,39	1,724	3,696666667	
10^{-6}	34,08666667	0,082	2,97	
10^{-7}	37,05666667	2,237	-37,056667	

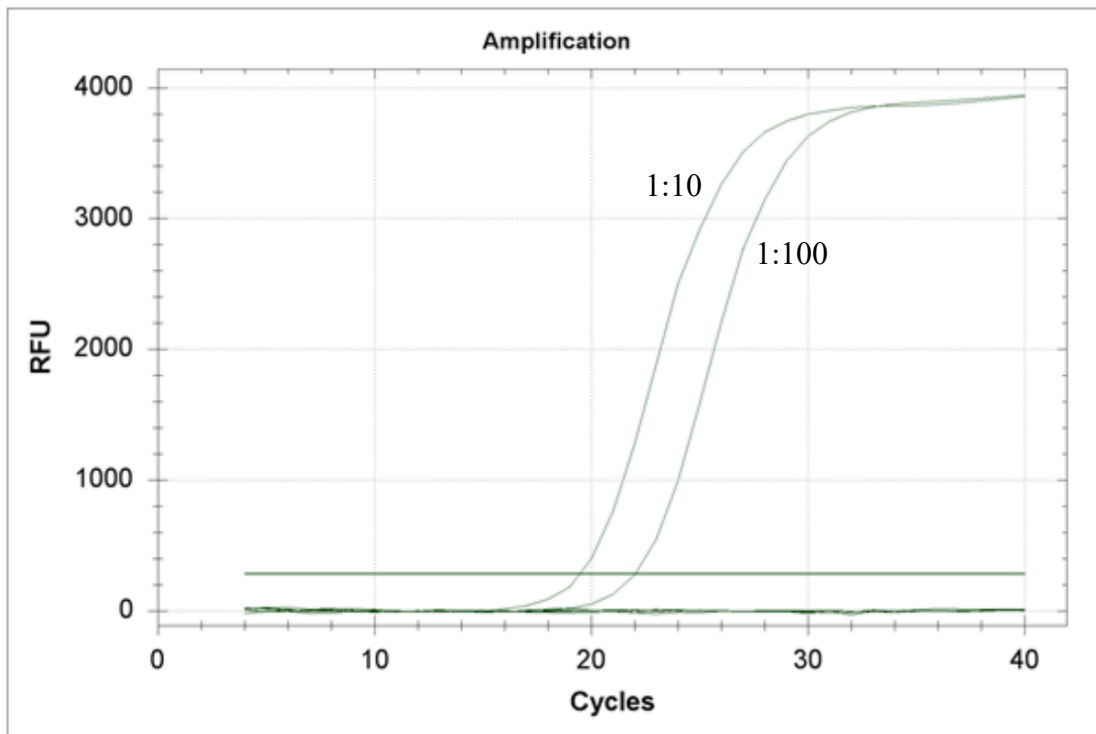
Vedlegg 13: Resultater på testing for påvisning av VIM og GIM på stammnr. 21-40.
Duplex real-time PCR.



Figur 0-11: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på VIM (blå kurver) og GIM (Grønne kurver). Stammnr. 21-40, samt negativ og positiv kontroll for VIM og GIM er med i duplex PCR-mixen.

Stamme nr. 21,22,23,24,28,33,38 og 39 er positive for VIM-gen. Ingen er positive for GIM.
Positiv og negativ kontroll for VIM og GIM er godkjente.

Vedlegg 14: SIM, utprøving av triplex PCR

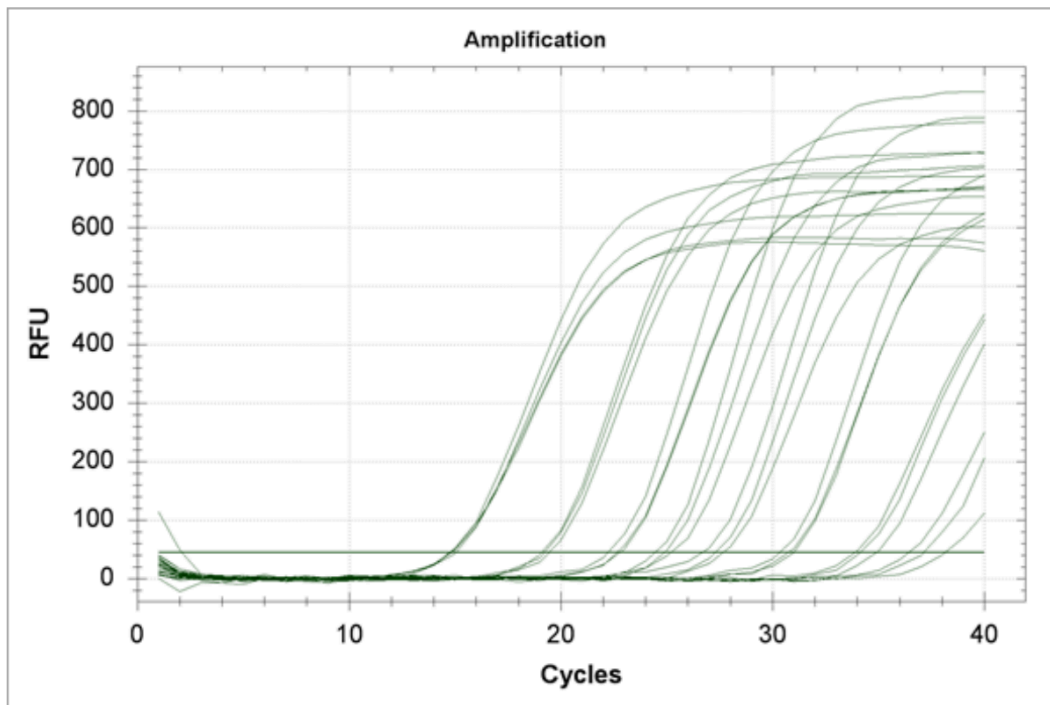


Figur 0-12: Real-time PCR analyse på SIM positiv kontroller med 1:10 og 1:100 fortynning. Triplex PCR med primer- og probesett for SIM, NDM og IMP.

SIM kan detekteres i en triplex PCR-mix med primer og probesett for SIM, NDM og IMP.

Positiv og negativ kontroller er godkjente.

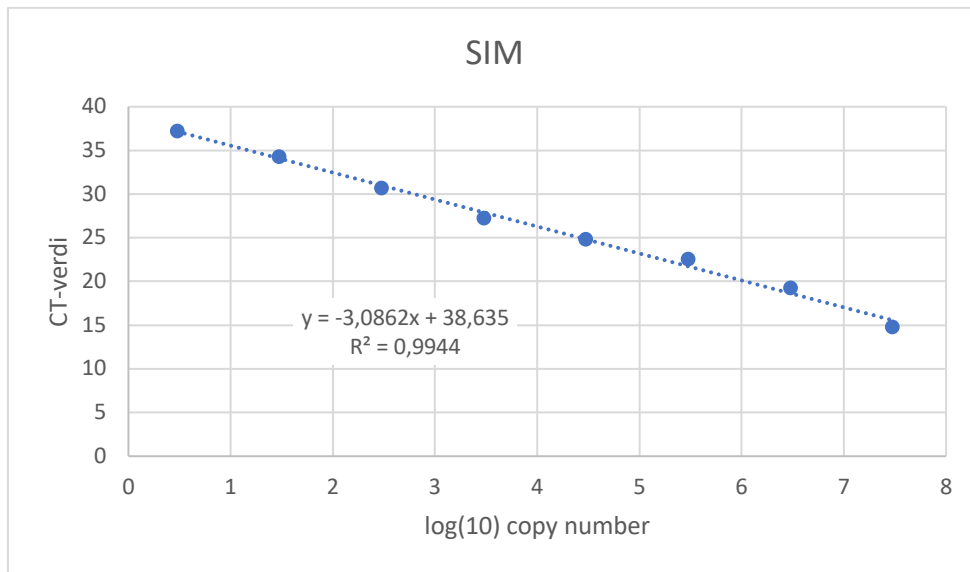
Vedlegg 15: SIM, amplifiseringskurve fra effektivitetstest



Figur 0-13: Real-time PCR utført på positiv SIM-kontrollstamme. 3 paralleller for hver fortynning. Ufortynnet ned til 10⁻⁷-fortynning.

Av amplifiseringskurven ser vi at C_T-verdiene for 3 og 3 fortynnings-paralleller er nokså like.

Vedlegg 16: SIM, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke.

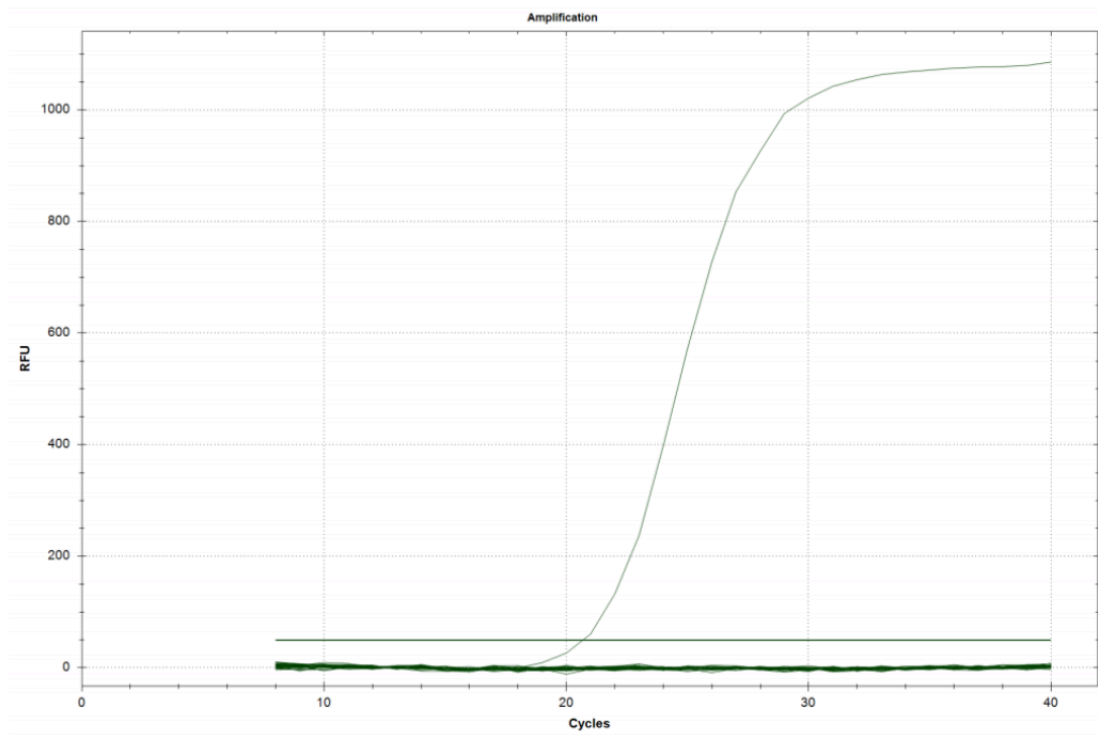


Figur 4: Standardkurve for SIM fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-5: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	Effektivitet
10^0	14,7966667	0,060	4,46333333	110,9 %
10^{-1}	19,26	0,177	3,30333333	
10^{-2}	22,5633333	0,297	2,28666667	
10^{-3}	24,85	0,495	2,37	
10^{-4}	27,22	2,338	3,48333333	
10^{-5}	30,7033333	2,425	3,61666667	
10^{-6}	34,32	0,339	2,92666667	
10^{-7}	37,2466667	1,951		

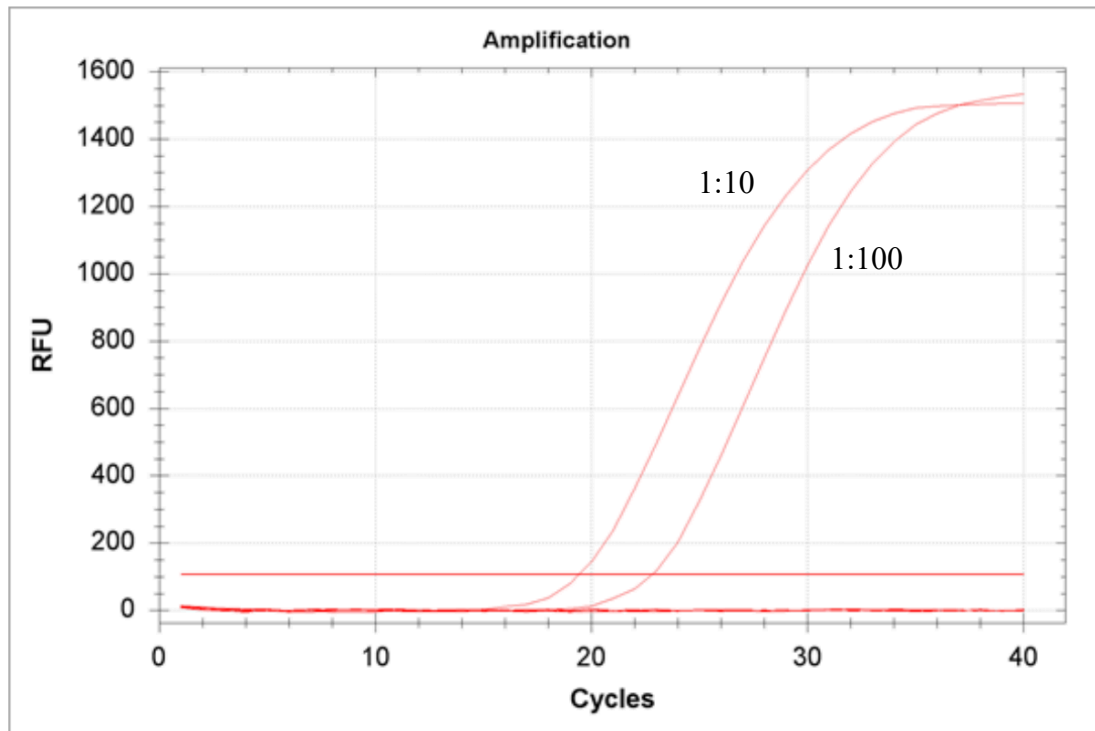
Vedlegg 17: SIM amplifiseringskurve, teststammenr. 21-40



Figur 0-14: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på SIM. Stammenr. 21-40, samt negativ og positiv kontroll for SIM er med i triplex PCR-mixen.

Ingen av stammene 21-40 er positive på SIM-gen. Positiv og negativ kontroll er godkjente.

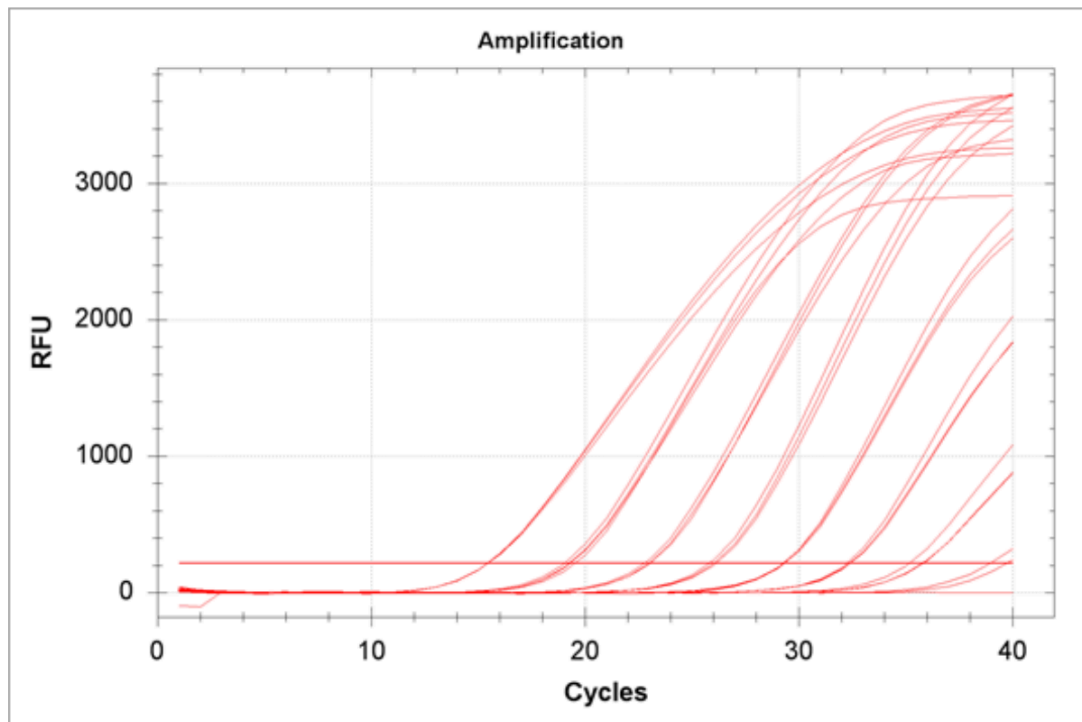
Vedlegg 18: NDM, utprøving av triplex PCR



Figur 0-15: Real-time PCR analyse på NDM positiv kontroller, med 1:10 og 1:100 fortynning. Triplex PCR med primer- og probesett for SIM, NDM og IMP

NDM kan detekteres i en triplex PCR-mix med primer og probesett for SIM, NDM og IMP. Positiv og negativ kontroller er godkjente

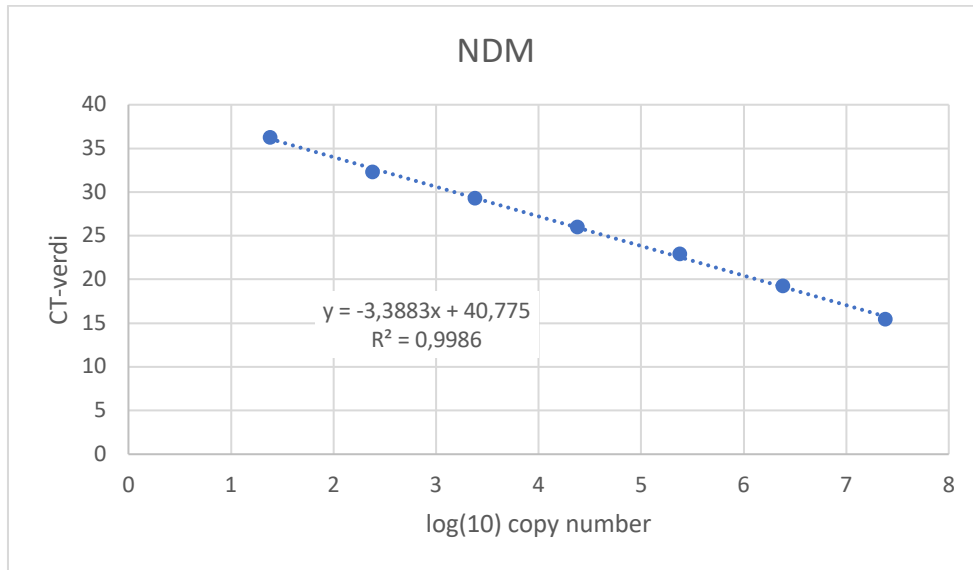
Vedlegg 19: NDM, amplifiseringskurve, effektivitetstest



Figur 0-16: Real-time PCR utført på positiv NDM-kontrollstamme. 3 paralleller for hver fortynning. Ufortynnet ned til 10^{-7} -fortynning.

Fortynningsrekka viser at man kan detekttere DNA-mengde som er fortynnet $1:10^6$.

Vedlegg 20: NDM, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke

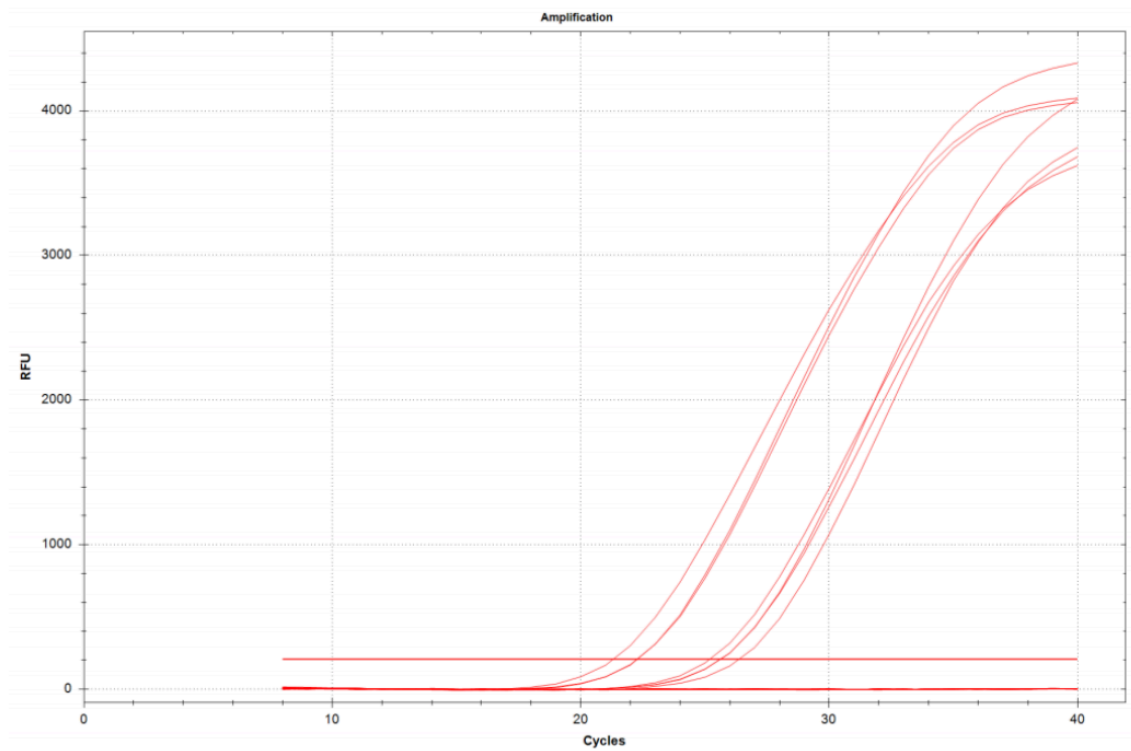


Figur 5: Standardkurve for NDM fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-6: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	Effektivitet
10^0	15,4533333	0,012	3,83	97,3 %
10^{-1}	19,2833333	0,236	3,66666667	
10^{-2}	22,95	0,151	3,04333333	
10^{-3}	25,9933333	0,031	3,30333333	
10^{-4}	29,2966667	1,715	3,04	
10^{-5}	32,3366667	1,742	3,92333333	
10^{-6}	36,26	0,078	3,095	
10^{-7}	39,355	1,617		

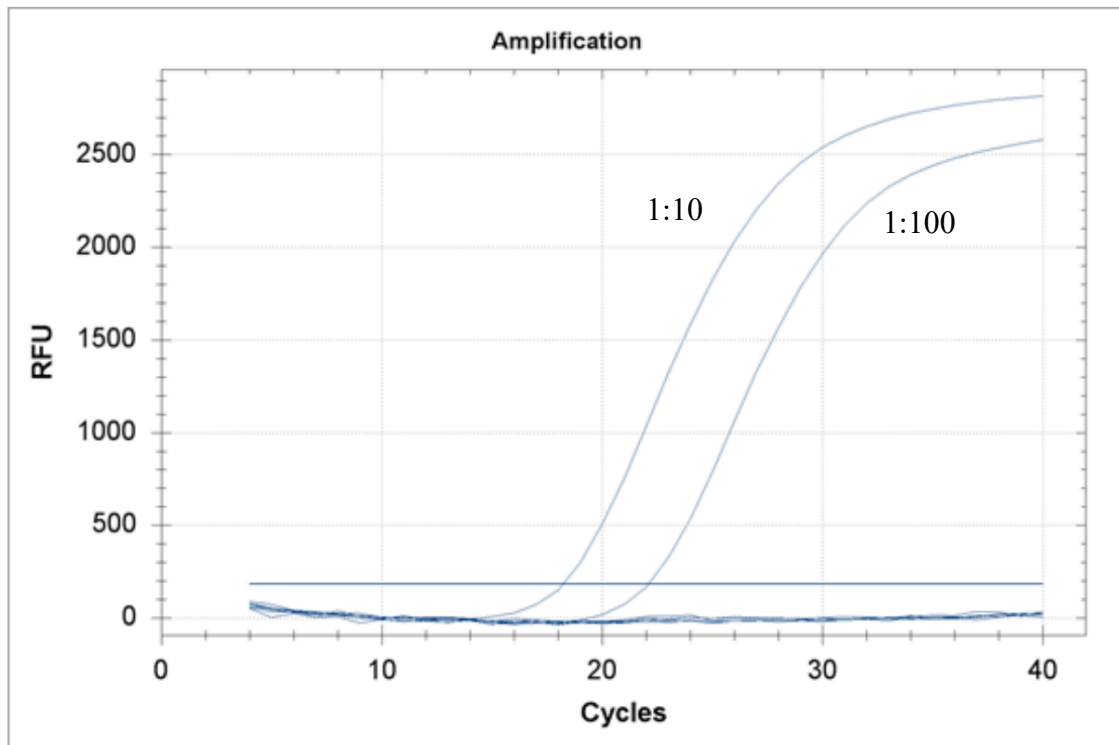
Vedlegg 21: NDM, amplifiseringskurve, teststammenr. 21-40



Figur 0-17: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på NDM. Stammenr. 21-40, samt negativ og positiv kontroll for NDM er med i triplex PCR-mixen.

Stammenr. 29, 31, 32, 34, 35 og 36 er positive på NDM-gen. Positiv og negativ kontroll for NDM er godkjente.

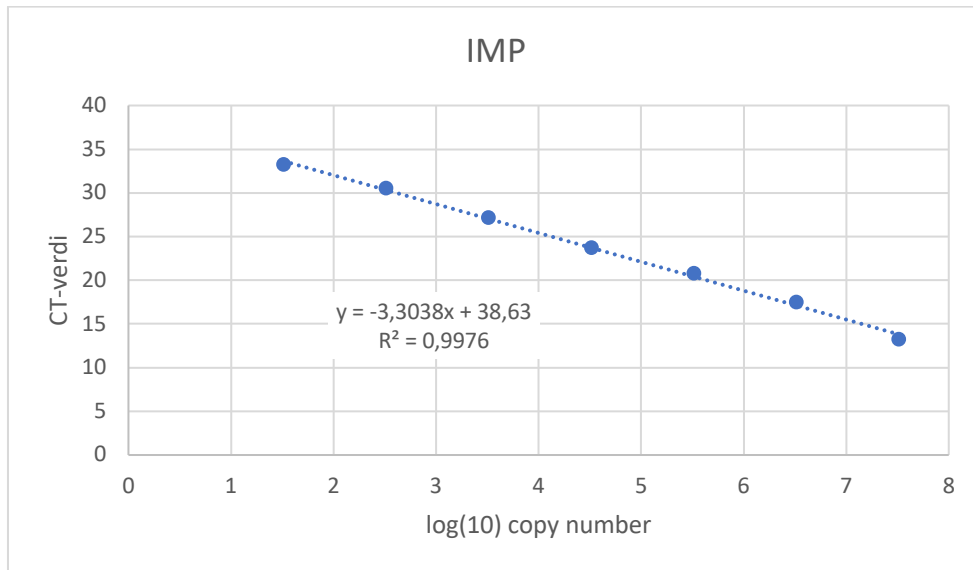
Vedlegg 22: IMP, utprøving av triplex PCR



Figur 0-18: Real-time PCR analyse på IMP positiv kontroll, med 1:10 og 1:100 fortyning. Triplex PCR-mix er benyttet med primer- og probesett for SIM, NDM og IMP.

IMP kan detekteres i en triplex real-time PCR-mix. Positiv og negativ kontroll er godkjente

Vedlegg 23: IMP, standardkurve og CT-verdier fra fortynningsrekke

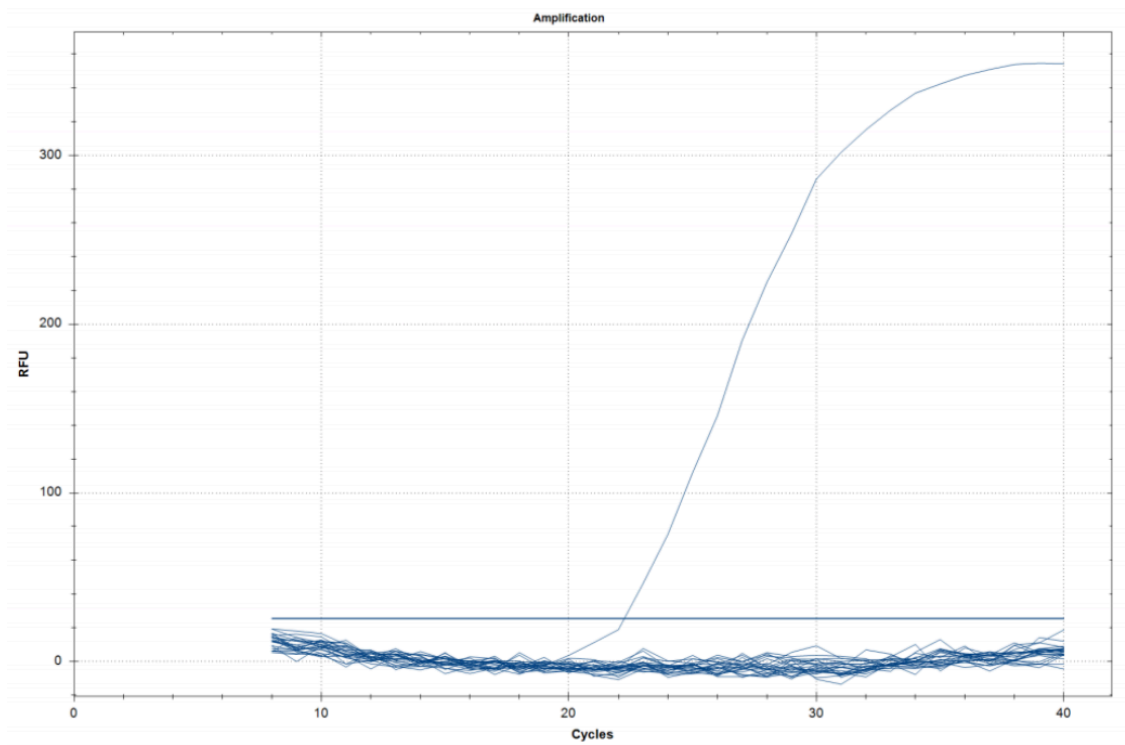


Figur 6: Standardkurve for IMP fra fortynningsrekke. Gjennomsnittlige CT-verdier fra 3 paralleller på y-aksen, log(10) av beregnet DNA-konsentrasjon på x-aksen.

Tabell 0-7: Snitt CT viser gjennomsnitt av 3 paralleller, CT SD viser standardavvik mellom CT-verdier fra 3 paralleller. Diff CT viser differansen mellom Snitt CT hos to fortynningsnivå

Fortynning	Snitt CT	CT SD	Diff CT	Effektivitet
10^0	13,24	0,748	4,22	100,8 %
10^{-1}	17,46	0,438	3,29333333	
10^{-2}	20,75333333	0,620	2,97333333	
10^{-3}	23,72666667	0,415	3,43	
10^{-4}	27,15666667	2,134	3,34	
10^{-5}	30,49666667	1,699	2,75333333	
10^{-6}	33,25	0,326	3,66333333	
10^{-7}	36,91333333	1,599	-36,913333	

Vedlegg 24: IMP, amplifiseringskurve, teststamme 21-40



Figur 0-19: Viser real-time PCR-analyse med hensyn på IMP. Stammenr. 21-40, samt negativ og positiv kontroll for IMP er med i triplex PCR-mixen.

Ingen av stammene er positive på IMP. Positiv og negativ kontroll er godkjente.

Vedlegg 25: Pakningsvedlegg, Enterobacteriaceae, fenotypisk resistens-testkit

Table 1: Enterobacteriaceae

		Meropenem + Phenylboronic MRPBO	Meropenem + DPA MRPDP	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	Temocilin 30 µg
AmpC + porin loss	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4mm and	≤ 3 mm	≥ 5mm	≥ 12mm
ESBL + porin loss (a)	Meropenem 10 µg MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12mm
KPC	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Variable
	Meropenem + Cloxacillin (MRPCX)	≥ 4mm	-	-	-
MβL	Meropenem 10 µg MRP10	< 4mm	≥ 5mm	≤ 3 mm	Variable
OXA-48 and similars	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	<=12 mm
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	<=12 mm

a: Synergism CAZ / Clavulanate.

Neither AmpC, KPC nor MβL: All zones within 3 mm of each other.

OXA-48 show negative results with KPC+MBL Confirm kit, but it is Temocillin resistant (no zone around Temocillin 30 ug Neo-Sensitabs).

Figur 0-20: Oversikt over hvordan man vurderer hemmingssoner og kan eventuelt påvise MBL ved bruk av KPC/MBL, and OXA-48 Confirm Kit(ROSCO Diagnostica) Hemmingssoner vurderes ved å trekke ifra hemmingssone på MRP10. Eks. MROBO – MRP10 = x. Dette gjøres også med MRPDP, MRPCX, Temocillin. Alle krav for hemmingssoner i forhold til MRP10, må stemme overens med klassifisering for MBL, for å klassifisere det som MBL (30).

Vedlegg 26: AmpC, fenotypiske testresultater for påvisning av resistensmekanismer

Tabell 0-8: Fenotypisk påvisning av resistensmekanisme med bruk av diffusjonstabletter. Bruker AmpC Confirm Kit. Hemmingssoner rundt diffusjonstabletter som inneholder Cefazidime+Cloxacillin(CazCx) og Cefazidime(Caz30) og Differanse. Viser også hemmingssoner rundt Cefotaxim+Cloxacillin(CtxCx) og Cefotaxim(Ctx30) og differanse samt hvilke stammer som er fenotypisk positive for AmpC-gener.

Stammenr	CazCx[mm]	Caz30[mm]	Diff	CtxCx[mm]	Ctx30[mm]	Diff	Pos.AmpC
1	-	-	0	-	-		-
2	24	9	15	26	16	10	+
3	26	13	13	26	20	6	+
4	28	22	8	26	28	2	+
5	29	14	15	29	21	8	+
6	28	11	17	27	16	11	+
7	28	13	15	28	21	7	+
8	29	18	11	29	26	3	+
9	29	18	11	28	24	4	+
10	26	17	9	26	20	6	+
11	29	22	7	30	26	4	+
12	27	19	8	30	25	5	+
13	31	21	10	32	24	8	+
14	29	22	7	30	27	3	+
15	30	22	8	31	26	5	+
16	24	9	15	21	9	12	+
17	30	23	7	30	28	2	+
18	28	16	12	26	19	7	+
19	30	22	8	31	25	6	+
20	28	22	6	30	22	8	+

Tabell 0-9: Fenotypisk påvisning av resistensmekanisme med bruk av MIC-strip.. Viser hemmingssoner rundt strips som inneholder Cefazidime+Cloxacillin(CazCx) og Cefazidime(Caz30). Ratio mellom Ctx og CtxCx ≥ 8 ved positivt resultat på AmpC.

Stammenr	CtxCx[mm]	Ctx[mm]	Ratio: Ctx/CtxCx	AmpC Resultat
1	32	32	1	-
2	0,5	32	64	+
3	3	32	11	+
4	0,75	32	43	+
5	0,75	32	43	+
6	0,5	32	64	+
7	0,5	32	64	+
8	0,5	32	64	+

Vedlegg 27: Resultater på fenotypisk testing for påvisning av resistensmekanismer

MBL

Tabell 0-10: Fenotypisk påvisning av resistensmekanisme med bruk av diffusjonstabletter. Benyttet KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit. Hemmingssoner rundt diffusjonstabletter som inneholder Meropenem+Cloxacillin(MRPCX), Temocillin(TEMOC), Meropenem+Borsyre(MRPBO) Meropenem+Dipicolinic Acid(MRPDP) og Meropenem(MRP10).

Stammenr	MRPCX	TEMOC	MRPBO	MRPDP	MRP10	Renkultur	MBL
25	34	24	34	34	35	Ja	Neg
26	0	15	18	9	0	Ja	Neg
27	14	14	23	15	14	Ja	Neg
28	16	0	12	21	0	Ja	Neg
29	0	0	11	21	0	Ja	Neg
30	23	0	23	23	24	Ja	Neg
31	0	0	0	14	0	Ja	+
32	12	10	12	22	9	Ja	+
33	20	0	20	23	20	Ja	Neg
34	21	26	22	24	22	Ja	Neg
35	18	20	19	24	18	Ja	Neg
36	18	12	18	22	9	Ja	Neg
37	22	27	23	23	23	Ja	Neg
38	20	11	19	24	20	Ja	Neg
39	0	0	0	22	0	Ja	+

Tabell 0-11: Fenotypisk påvisning av resistensmekanisme med bruk av diffusjonstabletter. Bruker Total MBL Confirm Kit. Hemmingssoner rundt diffusjonstabletter som inneholder Imipenem(IMI10), Dipicolinic Acid(DPA) Imipenem+DPA og Imipenem+EDTA.

Stammenr	IMI10	DPA	IMI10	IMI+DPA	IMI+EDTA	MBL
21	Synergi		9	13	18	+
22	Synergi		9	13	18	+
23	Synergi		9	14	19	+
24	Synergi		9	14	19	+
40	Synergi		12	14	18	+

Vedlegg 28: CIT probe, pakningsvedlegg

Product Description no. 1928355		CIT-probe				
TIB reference no :	019102636	24 - mer	25.02.2019			
5' - 6FAM-CCg CTg ggT TCA ggY CAA CAT ggA--BHQ1						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		3,9 nmol /	3,9 µM			
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,00 µmol	Purification: HPLC Condition: TMA 1.0 OD ly			
5'-Modifications :		wobble,				
Number of bases :		A : 5 G : 8 C : 6 T : 4	total 24			
Wobble bases and GC content :		Wobble: 1 Mod.: 0	GC-contents 58.3 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ϵ		255705	l / mol cm			
Molecular weight ammonium salt NH ₄		7783,4	g / mol			
Molecular weight free acid :		7391,7	g / mol			
Picomoles per OD ₂₆₀		3910,8	pmol / OD			
Micrograms per OD ₂₆₀		30,4	µg / OD			
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀		1,0	OD			
Molar amount :		3,9	nmol			
Amount in µg mass units :		30,4	µg			
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		3,9	µM (pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		196	µl			
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		78	µl (To prepare stock solutions of			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		39	µl different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,030	µg / µl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 61	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		304	µl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		69,0	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		65,5	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		77,0	°C			
Melting point G/C-content rule		63,3	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
$\Delta G / \Delta H / \Delta S$		-189.3 / -757.7 / -1907.3	kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 29: CIT forward primer, pakningsvedlegg

Product Description no. 1485573		CITMF				
TIB reference no :	013111153	21 - mer	28.06.2013			
5' - TggCCAgAACTgACAggCAAA						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		126,9 nmol / 126,9 µM				
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no				
5'-Modifications :						
Number of bases :		A : 8	G : 6 C : 5 T : 2 total 21			
Wobble bases and GC content :		Wobble: 0	Mod.: 0 GC-contents 52.4 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ϵ		245710	l / mol cm			
Molecular weight ammonium salt NH ₄		6814,0	g / mol			
Molecular weight free acid :		6473,4	g / mol			
Picomoles per OD ₂₆₀		4069,8	pmol / OD			
Micrograms per OD ₂₆₀		27,7	µg / OD			
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀		31,2	OD			
Molar amount :		126,9	nmol			
Amount in µg mass units :		864,8	µg			
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		126,9	µM (pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		6346	µl			
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		2538	µl (To prepare stock solutions of different concentration)			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		1269	µl			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,865	µg / µl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 1730	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		8648	µl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
		62,3	°C			
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		58,8	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		64,0	°C			
Melting point G/C-content rule		56,8	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S		-158.1 / -652.3 / -1658.5	kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 30: CIT reverse primer, pakningsvedlegg

Product Description no. 1485574		CITMR				
TIB reference no :	013111153	21 - mer	28.06.2013			
5' - TTTCTCCTgAACgTggCTggC						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	128,6 nmol / 128,6 µM					
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no					
5'-Modifications :						
Number of bases :	A : 2	G : 6	C : 6 T : 7 total 21			
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0	Mod.: 0	GC-contents 57.1 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε	203560 l / mol cm					
Molecular weight ammonium salt NH ₄	6744,8 g / mol					
Molecular weight free acid :	6404,2 g / mol					
Picomoles per OD ₂₆₀	4912,6 pmol / OD					
Micrograms per OD ₂₆₀	33,1 µg / OD					
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	26,2 OD					
Molar amount :	128,6 nmol					
Amount in µg mass units :	867,5 µg					
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	128,6 µM (pmol / µl)					
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6431 µl					
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2572 µl (To prepare stock solutions of					
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1286 µl different concentration)					
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,867 µg / µl					
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1735 dilution factor from a 1 ml solution					
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	8675 µl					
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
	63,1 °C					
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	59,6 °C					
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	66,0 °C					
Melting point G/C-content rule	58,8 °C					
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-163.3 /	-676.5 /	-1722.0 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 31: DHA probe, pakningsvedlegg

Product Description no. 1928356		DHA-probe				
TIB reference no :	019102636	20 - mer	25.02.2019			
5' - TEX-AAA gCC gTg Cgg ATC TgC Tg--BHQ2						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		4,7 nmol /	4,7 μM			
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,00 μmol	Purification: HPLC Condition: TME 1.0 OD ly no			
5'-Modifications :						
Number of bases :		A : 4	G : 7 C : 5 T : 4 total 20			
Wobble bases and GC content :		Wobble: 0	Mod.: 0 GC-contents 60.0 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε		213720	l / mol cm			
Molecular weight ammonium salt NH ₄		6481,7	g / mol			
Molecular weight free acid :		6158,1	g / mol			
Picomoles per OD ₂₆₀		4679,0	pmol / OD			
Micrograms per OD ₂₆₀		30,3	μg / OD			
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀		1,0	OD			
Molar amount :		4,7	nmol			
Amount in μg mass units :		30,3	μg			
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		4,7	μM (pmol / μl)			
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :		234	μl			
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :		94	μl (To prepare stock solutions of			
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :		47	μl different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,030	μg / μl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :		1 : 61	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :		303	μl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		62,9	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		59,4	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		64,0	°C			
Melting point G/C-content rule		58,4	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S		-162.6 / -672.0 / -1709.3	kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 32: DHA forward primer, pakningsvedlegg

Product Description no.	1485575	DHAMF	
TIB reference no :	013111153	22-mer	28.06.2013

5' - AACTTTTCACAggTgTgCTgggT

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	127,7 nmol / 127,7 µM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5'-Modifications :	
Number of bases :	A : 4 G : 7 C : 4 T : 7 total 22
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 50.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	231870 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	7139,1 g / mol
Molecular weight free acid :	6781,5 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	4312,8 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	30,8 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	29,6 OD
Molar amount :	127,7 nmol
Amount in µg mass units :	911,4 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6383 µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2553 µl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1277 µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,911 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1823 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	9114 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	<u>60,7 °C</u>
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	57,2 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	66,0 °C
Melting point G/C-content rule	57,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$	-155.3 / -663.8 / -1706.4 kJ / mol
----------------------------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

X: We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential origin. We accept VISA

Vedlegg 33: DHA reverse primer, pakningsvedlegg

Product Description no. 1905865		DHA-R	
TIB reference no :	018113832	19-mer	26.10.2018

5' - gCT gCC ACT gCT gAT AgA A

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	134,2 nmol / 134,2 µM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5-Modifications :	
Number of bases :	A: 5 G: 5 C: 5 T: 4 total 19
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 52.6 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	204900 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	6119,4 g / mol
Molecular weight free acid :	5812,9 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	4880,4 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	29,9 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	27,5 OD
Molar amount :	134,2 nmol
Amount in µg mass units :	821,3 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	134,2 µM (pmol / µl)
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	6711 µl
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	2684 µl (To prepare stock solutions of different concentration)
	1342 µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,821 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1643 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	8213 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	53,7 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	50,2 °C
Melting point G/C-content rule	58,0 °C
	53,6 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$	-132.9 / -574.4 / -1481.7 kJ / mol
----------------------------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 34: VIM probe, pakningsvedlegg

TIB reference no :	019102636	26 - mer	25.02.2019			
5' - 6FAM-TCg Cgg AgA TTg ARA AgC AAA TTg gA--BHQ1						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	3,2 nmol / 3,2 μM					
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,00 μmol wobble,	Purification: HPLC Condition: TMA 1.0 OD ly				
5'-Modifications :	A : 9 G : 8 C : 3 T : 5	total	26			
Number of bases :	Wobble: 1 Mod.: 0	GC-contents	42.3 %			
Wobble bases and GC content :						
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε	309635	l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8506,9	g / mol				
Molecular weight free acid :	8081,2	g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀	3229,6	pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀	27,5	μg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	1,0	OD				
Molar amount :	3,2	nmol				
Amount in μg mass units :	27,5	μg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	3,2	μM (pmol / μl)				
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	161	μl				
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	65	μl	(To prepare stock solutions of			
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	32	μl	different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,027	μg / μl				
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 55	dilution factor from a 1 ml solution				
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	275	μl				
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	65,1	°C				
Melting point GC/AT rule (ΔT = 2°C, G/C = 4°C)	61,6	°C				
Melting point GC/C-content rule	75,0	°C				
Melting point G/C-content rule	58,9	°C				
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-201.1 /	-856.5 /	-2199.2 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 35: VIM forward primer, pakningsvedlegg

TIB reference no :	019102636	26 - mer	25.02.2019
--------------------	-----------	----------	------------

5' - gAT gAg TTg CTT TTg ATT gAT ACA gC

Amount / Concentration for product of 1 ml	13,2 nmol / 13,2 μ M
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 μ mol Purification: GSF Condition: Primer lyo
5'-Modifications :	no
Number of bases :	A : 6 G : 7 C : 3 T : 10 total 26
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 38.5 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	280420 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8457,1 g / mol
Molecular weight free acid :	8031,3 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	3566,1 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	30,2 μ g / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	3,7 OD
Molar amount :	13,2 nmol
Amount in μ g mass units :	111,5 μ g
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	13,2 μ M (pmol / μ l)
20 μ M (20 pmol/ μ l) requires a volume of :	659 μ l
50 μ M (50 pmol/ μ l) requires a volume of :	264 μ l (To prepare stock solutions of
100 μ M (100 pmol/ μ l) requires a volume of :	132 μ l different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,111 μ g / μ l
Dilution to prepare a solution with 0,5 μ g/ml :	1 : 223 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μ g / μ l solution dissolve the product in :	1115 μ l

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 $^{\circ}$ C)	57,7 $^{\circ}$ C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2 $^{\circ}$ C, G/C = 4 $^{\circ}$ C)	54,2 $^{\circ}$ C
Melting point G/C-content rule	72,0 $^{\circ}$ C
	57,3 $^{\circ}$ C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$	-171.3 / -767.9 / -2002.0 kJ / mol
----------------------------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 36: VIM reverse primer, pakningsvedlegg

Product Description no.	1928346	VIM-R
TIB reference no :	019102636	16 - mer 25.02.2019

5' - CCg ACK CgR TCg TCA T

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	13,0 nmol / 13,0 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 μmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
5'-Modifications :	wobble
Number of bases :	A : 2 G : 3 C : 6 T : 3 total 16
Wobble bases and GC content :	Wobble: 2 Mod.: 0 GC-contents 56.3 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	157740 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	5059,2 g / mol
Molecular weight free acid :	4803,7 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	6339,5 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	32,1 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	2,1 OD
Molar amount :	13,0 nmol
Amount in μg mass units :	65,7 μg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	13,0 μM (pmol / μl)
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	650 μl
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	260 μl (To prepare stock solutions of different concentration)
	130 μl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,066 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 131 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	657 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	49,8 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	46,3 °C
Melting point G/C-content rule	52,0 °C
	48,4 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-114.9 / -491.6 / -1264.0 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 37: GIM probe, pakningsvedlegg

Product Description no. 1928362		GIM-probe	
TIB reference no :	019102636	26 - mer	25.02.2019

5' - HEX-ATC gCA CTg CTg gTA TCA AgT TgC TA--BHQ1

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	3,7 nmol / 3,7 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,00 μmol Purification: HPLC Condition: TMA 1.0 OD ly no
5'-Modifications :	
Number of bases :	A : 6 G : 6 C : 6 T : 8 total 26
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 46,2 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	272760 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8387,0 g / mol
Molecular weight free acid :	7961,3 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	3666,2 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	30,7 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	1,0 OD
Molar amount :	3,7 nmol
Amount in μg mass units :	30,7 μg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

3,7 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	183 μl
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	73 μl
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	37 μl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,031 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 61 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	307 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	61,8 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	58,3 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	76,0 °C
Melting point G/C-content rule	60,5 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-182.8 / -795.4 / -2055.7 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 38: GIM forward primer, pakningsvedlegg

Product Description no. 1928353		GIM-F	
TIB reference no :	019102636	22 - mer	25.02.2019

5' - TTg gTC TgA AgA AgA CAC gAA g

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	13,3 nmol / 13,3 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 μmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5'-Modifications :	
Number of bases :	A : 8 G : 7 C : 3 T : 4 total 22
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 45,5 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	260420 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	7190,2 g / mol
Molecular weight free acid :	6832,6 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	3840,0 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	27,6 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	3,5 OD
Molar amount :	13,3 nmol
Amount in μg mass units :	95,5 μg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

13,3 μM (13,3 pmol/μl)	13,3 μM (pmol / μl)
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	664 μl
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	266 μl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	133 μl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,096 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 191 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	955 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	55,5 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	52,0 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	64,0 °C
Melting point G/C-content rule	55,5 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-145.4 / -637.1 / -1650.3 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that...

Vedlegg 39: GIM reverse primer, pakningsvedlegg

Skjalgssons gate 1
 7010 Trondheim

 Troubleshooting
 service@tib-molt

Product Description no. 1928354 **GIM-R**
 Reference no: 019102636 19-mer 25.02.2019

TA ggA ACC ggC TTT CCT T

Concentration for product of 1 ml
 Scale and purification: 14,5 nmol / 14,5 µM
 Synthesis: 0,02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 no

Compositions:
 of bases: A: 3 G: 5 C: 5 T: 6 total 19
 GC-contents: Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 52.6 %

properties and constant factors of the product:
 Extinction coefficient ϵ 191300 l / mol cm
 Weight ammonium salt NH₄ 6101,4 g / mol
 Weight free acid: 5794,8 g / mol
 OD₂₆₀ per OD 5227,4 pmol / OD
 µg per OD 31,9 µg / OD

Amount (per vial when delivered in aliquots)
 Optical units OD₂₆₀ 2,8 OD
 Amount: 14,5 nmol
 µg mass units: 88,4 µg

Concentration when delivered in 1 ml solution:
 14,5 µM (pmol / µl)
 20 pmol/µl requires a volume of: 725 µl
 50 pmol/µl requires a volume of: 290 µl (To prepare stock solutions of
 100 pmol/µl requires a volume of: 145 µl different concentration)

Concentration (for hybridization):
 Dilution, if dissolved in 1 ml: 0,088 µg / µl
 To prepare a solution with 0,5 µg/ml: 1 : 177 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in: 884 µl

Thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)
 Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 55,5 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 52,0 °C
 Melting point G/C-content rule 58,0 °C
 Melting point G/C-content rule 53,6 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:
 ΔH / ΔS -144.5 / -643.7 / -1675.3 kJ / mol

Regenerated base positions (wobble positions IUB Code)
 Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

Vedlegg 40: SIM probe, pakningsvedlegg

Product Description no. 1928361		SIM-probe	
TIB reference no :	019102636	31 - mer	25.02.2019

5' - HEX-AAg ggA TCT ATC TTC ATA CAT CTT TTC AAg A--BHQ1

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	3,0 nmol / 3,0 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,00 μmol no Purification: HPLC Condition: TMA 1.0 OD
5'-Modifications :	
Number of bases :	A : 10 G : 4 C : 6 T : 11 total 31
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 32.3 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	334740 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	9979,2 g / mol
Molecular weight free acid :	9468,3 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	2987,4 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	29,8 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	1,0 OD
Molar amount :	3,0 nmol
Amount in μg mass units :	29,8 μg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

3,0 μM (pmol / μl)	
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	149 μl
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	60 μl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	30 μl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,030 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 60 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	298 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	57,9 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	54,4 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	82,0 °C
Melting point G/C-content rule	59,0 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-197.8 / -920.9 / -2426.4 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of non-conflict.

Vedlegg 41: SIM forward primer, pakningsvedlegg

Product Description no. 1928349		SPM-F	
TIB reference no :	019102636	20 - mer	25.02.2019

5' - Agg CAA ggT CTT CTC gTT TT

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	13,8 nmol / 13,8 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 μmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5'-Modifications :	
Number of bases :	A: 3 G: 5 C: 4 T: 8 total 20
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 45.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	201050 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	6437,6 g / mol
Molecular weight free acid :	6114,0 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	4973,9 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	32,0 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	2,8 OD
Molar amount :	13,8 nmol
Amount in μg mass units :	88,6 μg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	13,8 μM (pmol / μl)
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	688 μl
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	275 μl (To prepare stock solutions of different concentration)
	138 μl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,089 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 177 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	886 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	55,5 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	52,0 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	58,0 °C
Melting point G/C-content rule	52,2 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-144.4 / -644.9 / -1679.8 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that...

Vedlegg 42: SIM reverse primer

Product Description no. 1928352		SIM-R				
TIB reference no : 019102636		26 - mer 25.02.2019				
5' - gTT TTT TAA CgA TgC CgA ATC CCT Tg						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		13,0 nmol / 13,0 µM				
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no				
5'-Modifications :						
Number of bases :		A : 5 G : 5 C : 6 T : 10 total 26				
Wobble bases and GC content :		Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 42.3 %				
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ϵ	262350	l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8353,0	g / mol				
Molecular weight free acid :	7927,2	g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀	3811,7	pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀	31,8	µg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	3,4	OD				
Molar amount :	13,0	nmol				
Amount in µg mass units :	108,6	µg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		13,0	µM (pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		650	µl			
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		260	µl (To prepare stock solutions of			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		130	µl different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,109	µg / µl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 217	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		1086	µl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		64,3	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		60,8	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		74,0	°C			
Melting point G/C-content rule		58,9	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
ΔG / ΔH / ΔS	-200.1 / -873.7 / -2260.3	kJ / mol				
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 43: NDM probe

Product Description no. 1928359		NDM-probe				
TIB reference no. :	019102636	24 - mer	25.02.2019			
5'- TEX-ACC gAA TgT CTg gCA gCA CAC TTC--BHQ2						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		4,0 nmol /	4,0 μM			
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,00 μmol	Purification: HPLC Condition: TME 1.0 OD ly no			
5'-Modifications :		A : 6	G : 5 C : 8 T : 5 total 24			
Number of bases :		Wobble: 0	Mod.: 0 GC-contents 54.2 %			
Wobble bases and GC content :						
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε		249650	l / mol cm			
Molecular weight ammonium salt NH ₄		7689,6	g / mol			
Molecular weight free acid :		7297,9	g / mol			
Picomoles per OD ₂₆₀		4005,6	pmol / OD			
Micrograms per OD ₂₆₀		30,8	μg / OD			
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀		1,0	OD			
Molar amount :		4,0	nmol			
Amount in μg mass units :		30,8	μg			
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		4,0 μM	(pmol / μl)			
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :		200	μl			
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :		80	μl (To prepare stock solutions of			
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :		40	μl different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,031	μg / μl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :		1 : 62	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :		308	μl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		63,7	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		60,2	°C			
Melting point G/C-content rule		74,0	°C			
Melting point G/C-content rule		61,6	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
ΔG / ΔH / ΔS		-174.0 / -728.2 / -1859.8	kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 44: NDM forward primer

Product Description no. 1928347		NDM-F				
TIB reference no :	019102636	15- mer	25.02.2019			
5' - CCC gAC gAT Tgg CCA						
Amount / Concentration for product of 1 ml	13,0 nmol /	13,0 μM				
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 μmol	Purification: GSF	Condition: Primer lyo no			
5'-Modifications :						
Number of bases :	A : 3	G : 4	C : 6 T : 2 total 15			
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0	Mod.: 0	GC-contents 66.7 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε	152740	l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄	4776,5	g / mol				
Molecular weight free acid :	4538,1	g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀	6547,1	pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀	31,3	μg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	2,0	OD				
Molar amount :	13,0	nmol				
Amount in μg mass units :	62,2	μg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>						
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	651	μl	(pmol / μl)			
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	260	μl	(To prepare stock solutions of different concentration)			
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	130	μl				
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,062	μg / μl				
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 124	dilution factor from a 1 ml solution				
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	622	μl				
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	56,6	°C				
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	53,1	°C				
Melting point G/C-content rule	50,0	°C				
	49,8	°C				
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-128.3 /	-516.2 /	-1301.8 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 45: NDM reverse primer

Product Description no. 1928348		NDM-R				
TIB reference no :	019102636	20-mer	25.02.2019			
5' - ATC CAg TTg Agg ATC Tgg gC						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		12,9 nmol / 12,9 µM				
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no				
5'-Modifications :						
Number of bases :		A: 4 G: 7 C: 4 T: 5 total 20				
Wobble bases and GC content :		Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 55,0 %				
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε		215070 l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄		6496,7 g / mol				
Molecular weight free acid :		6173,1 g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀		4649,6 pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀		30,2 µg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀		2,8 OD				
Molar amount :		12,9 nmol				
Amount in µg mass units :		84,0 µg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		12,9 µM (pmol / µl)				
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		647 µl				
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		259 µl (To prepare stock solutions of different concentration)				
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		129 µl				
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,084 µg / µl				
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 168 dilution factor from a 1 ml solution				
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		840 µl				
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
		57,0 °C				
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		53,5 °C				
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		62,0 °C				
Melting point G/C-content rule		56,3 °C				
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-145,3 /	-619,5 /	-1591,2 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif .
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 46: IMP probe

Product Description no. 1928357		IMP11-probe	
TIB reference no :	019102636	34 - mer	25.02.2019

5' - 6FAM-CAA gCT AMA WAT TCA TTT AgC ggR gYT ARC TAT T--BHQ1

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	2,7 nmol / 2,7 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,00 μmol Purification: HPLC Condition: TMA 1.0 OD ly wobble,
5'-Modifications :	
Number of bases :	A : 9 G : 5 C : 5 T : 10 total 34
Wobble bases and GC content :	Wobble: 5 Mod.: 0 GC-contents 29.4 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	373960 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	10962,7 g / mol
Molecular weight free acid :	10400,7 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	2674,1 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	29,3 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	1,0 OD
Molar amount :	2,7 nmol
Amount in μg mass units :	29,3 μg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	2,7 μM (pmol / μl)
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	134 μl
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	54 μl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	27 μl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,029 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 59 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	293 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	<u>59,7 °C</u>
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	56,2 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	92,0 °C
Melting point G/C-content rule	59,7 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-222.9 / -1062.7 / -2818.3 kJ / mol
-----------------	-------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential origin. We accept VISA.

Vedlegg 47: IMP forward primer

Product Description no. 1928343		IMP-F				
TIB reference no :	019102636	26 - mer	25.02.2019			
5' - CCC ACg TAT gCA TCT gAA TTA ACA AA						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		137,6 nmol / 137,6 µM				
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no				
5'-Modifications :		A : 10 G : 3 C : 7 T : 6 total 26				
Number of bases :		Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 38.5 %				
Wobble bases and GC content :						
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ϵ	287780	l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8333,1	g / mol				
Molecular weight free acid :	7907,3	g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀	3474,9	pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀	29,0	µg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	39,6	OD				
Molar amount :	137,6	nmol				
Amount in µg mass units :	1146,7	µg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		137,6	µM (pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		6880	µl			
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		2752	µl (To prepare stock solutions of different concentration)			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		1376	µl			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		1,147	µg / µl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 2293	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		11467	µl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		60,5	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		57,0	°C			
Melting point G/C-content rule		72,0	°C			
		57,3	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-181.9 /	-802.8 /	-2083.6 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 48: IMP reverse primer

Product Description no. 1928344		IMP-R				
TIB reference no :	019102636	25 - mer	25.02.2019			
5' - CCA AAC CAC TAC gTT ATC TTg AgT g						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	13,8 nmol /	13,8	µM			
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 µmol	Purification: GSF	Condition: Primer lyo			
5'-Modifications :	no					
Number of bases :	A : 7	G : 4	C : 7 T : 7 total 25			
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0	Mod.: 0	GC-contents 44.0 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ϵ	262590	l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8009,8	g / mol				
Molecular weight free acid :	7601,1	g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀	3808,2	pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀	30,5	µg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	3,6	OD				
Molar amount :	13,8	nmol				
Amount in µg mass units :	110,4	µg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	13,8	µM	(pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	689	µl				
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	276	µl	(To prepare stock solutions of			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	138	µl	different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,110	µg / µl				
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 221	dilution factor from a 1 ml solution				
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	1104	µl				
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	57,7	°C				
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	54,2	°C				
Melting point G/C-content rule	72,0	°C				
	58,5	°C				
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-165.0 /	-742.9 /	-1939.3 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 49: SPM probe

Product Description no. 1928360		SPM-probe				
TIB reference no :	019102636	25 - mer	25.02.2019			
5' - TEX-TCg CCC gAT AAT gTC gTC gTA TAT T--BHQ2						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		3,9 nmol / 3,9 µM				
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,00 µmol	Purification: HPLC Condition: TME 1.0 OD ly			
5'-Modifications :		no				
Number of bases :		A : 5 G : 5 C : 6 T : 9	total 25			
Wobble bases and GC content :		Wobble: 0 Mod.: 0	GC-contents 44.0 %			
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ε		253950	l / mol cm			
Molecular weight ammonium salt NH ₄		8031,8	g / mol			
Molecular weight free acid :		7623,0	g / mol			
Picomoles per OD ₂₆₀		3937,8	pmol / OD			
Micrograms per OD ₂₆₀		31,6	µg / OD			
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀		1,0	OD			
Molar amount :		3,9	nmol			
Amount in µg mass units :		31,6	µg			
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		3,9	µM (pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		197	µl			
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		79	µl (To prepare stock solutions of			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		39	µl different concentration)			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,032	µg / µl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 63	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		316	µl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
		61,8	°C			
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		58,3	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		72,0	°C			
Melting point G/C-content rule		58,5	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S		-188.8 / -826.6 / -2140.2	kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 50: SPM forward primer

Product Description no. 1928349		SPM-F	
TIB reference no :	019102636	20 - mer	25.02.2019

5' - Agg CAA ggT CTT CTC gTT TT

<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>	13,8 nmol / 13,8 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,02 μmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5'-Modifications :	
Number of bases :	A: 3 G: 5 C: 4 T: 8 total 20
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 45.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	201050 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	6437,6 g / mol
Molecular weight free acid :	6114,0 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	4973,9 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	32,0 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	2,8 OD
Molar amount :	13,8 nmol
Amount in μg mass units :	88,6 μg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	13,8 μM (pmol / μl)
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	688 μl
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	275 μl (To prepare stock solutions of different concentration)
	138 μl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,089 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 177 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 μg / μl solution dissolve the product in :	886 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	55,5 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	52,0 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	58,0 °C
Melting point G/C-content rule	52,2 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-144.4 / -644.9 / -1679.8 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that...

Vedlegg 51: SPM reverse primer

Product Description no. 1928352		SIM-R				
TIB reference no : 019102636		26 - mer 25.02.2019				
5' - gTT TTT TAA CgA TgC CgA ATC CCT Tg						
<u>Amount / Concentration for product of 1 ml</u>		13,0 nmol / 13,0 µM				
Synthesis scale and purification :		Synthesis: 0,02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no				
5'-Modifications :		A : 5 G : 5 C : 6 T : 10 total 26				
Number of bases :		Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 42.3 %				
Wobble bases and GC content :						
<u>Chemical properties and constant factors of the product :</u>						
Molar extinction coefficient ϵ	262350	l / mol cm				
Molecular weight ammonium salt NH ₄	8353,0	g / mol				
Molecular weight free acid :	7927,2	g / mol				
Picomoles per OD ₂₆₀	3811,7	pmol / OD				
Micrograms per OD ₂₆₀	31,8	µg / OD				
<u>Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)</u>						
Amount in optical units OD ₂₆₀	3,4	OD				
Molar amount :	13,0	nmol				
Amount in µg mass units :	108,6	µg				
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>		13,0	µM (pmol / µl)			
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :		650	µl			
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :		260	µl (To prepare stock solutions of different concentration)			
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :		130	µl			
<u>Mass concentration (for hybridization) :</u>						
Concentration, if dissolved in 1 ml :		0,109	µg / µl			
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :		1 : 217	dilution factor from a 1 ml solution			
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :		1086	µl			
<u>Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)</u>						
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)		64,3	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		60,8	°C			
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)		74,0	°C			
Melting point G/C-content rule		58,9	°C			
<u>Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :</u>						
Δ G / Δ H / Δ S	-200.1 /	-873.7 /	-2260.3 kJ / mol			
<u>Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)</u>						
S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thio

Vedlegg 52: Rådata real-time PCR effektivitet



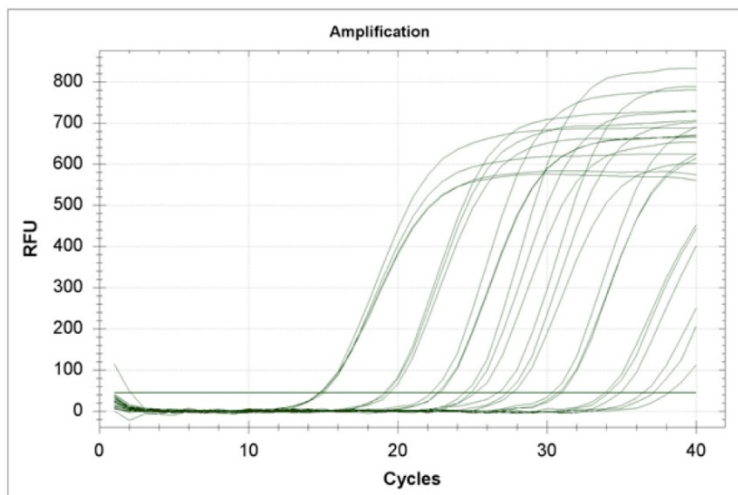
Effektivitet SIM NDM IMP_2019-03-27 14-22-01_CC011954.pcrd

11.04.2019 10:20

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: Effektivitet SIM NDM IMP_2019-03-27 14-22-01_CC011954.pcrd
Data File Path: C:\Documents and Settings\All Users\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\admin\Bachelor 2019
Well Group Name: SIM
Report Differs from Last Save: Yes

Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	HEX		Pos Ctrl	SIM	14,79	14,79	0,000
A02	HEX		Pos Ctrl	SIM	14,86	14,86	0,000

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A03	HEX		Pos Ctrl	SIM	14,74	14,74	0,000
A10	HEX		Pos Ctrl	3A	15,05	15,05	0,000
B01	HEX		Pos Ctrl	SIM -1	19,45	19,45	0,000
B02	HEX		Pos Ctrl	SIM -1	19,23	19,23	0,000
B03	HEX		Pos Ctrl	SIM -1	19,10	19,10	0,000
C01	HEX		Pos Ctrl	SIM -2	22,80	22,80	0,000
C02	HEX		Pos Ctrl	SIM -2	22,66	22,66	0,000
C03	HEX		Pos Ctrl	SIM -2	22,23	22,23	0,000
D01	HEX		Pos Ctrl	SIM -3	25,20	25,20	0,000
D02	HEX		Pos Ctrl	SIM -3	24,90	24,90	0,000
D03	HEX		Pos Ctrl	SIM -3	24,45	24,45	0,000
E01	HEX		Pos Ctrl	SIM -4	27,67	27,67	0,000
E02	HEX		Pos Ctrl	SIM -4	27,30	27,30	0,000
E03	HEX		Pos Ctrl	SIM -4	26,69	26,69	0,000
F01	HEX		Pos Ctrl	SIM -5	31,01	31,01	0,000
F02	HEX		Pos Ctrl	SIM -5	30,76	30,76	0,000
F03	HEX		Pos Ctrl	SIM -5	30,34	30,34	0,000
G01	HEX		Pos Ctrl	SIM -6	33,91	33,91	0,000
G02	HEX		Pos Ctrl	SIM -6	34,92	34,92	0,000
G03	HEX		Pos Ctrl	SIM -6	34,13	34,13	0,000
H01	HEX		Pos Ctrl	SIM -7	38,16	38,16	0,000
H02	HEX		Pos Ctrl	SIM -7	36,44	36,44	0,000
H03	HEX		Pos Ctrl	SIM -7	37,14	37,14	0,000



effektivitet vim(bronn1-3)-gim(4-6)+teststammer21-40(10-12)_2019-04-08 12-16-18_PYSA.pcrd

08.04.2019 13:32

Report Information

User: BioRad/admin

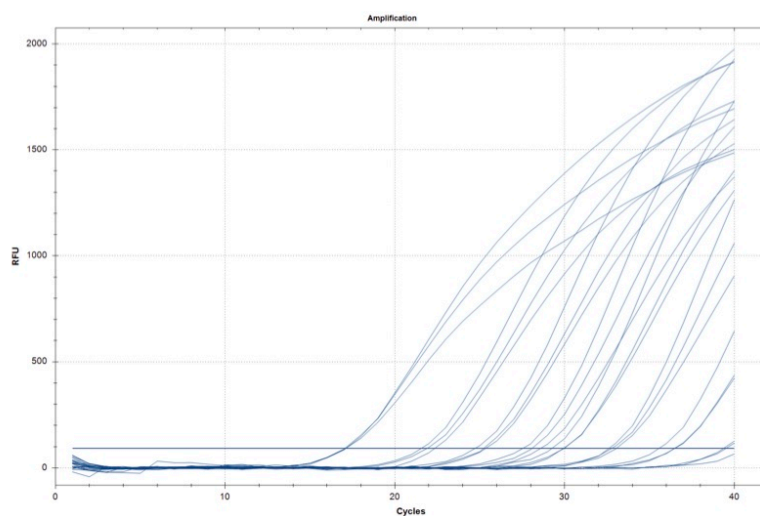
Data File Name: effektivitet vim(bronn1-3)-gim(4-6)+teststammer21-40(10-12)_2019-04-08 12-16-18_PYSA.pcrd

Data File Path: C:\Users\Public\Documents\Bio-Rad\CFXUsers\admin

Well Group Name: Effektivitet VIM

Report Differs from Last Save: Yes

Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	VIM	17,13	17,13	0,000
A02	FAM		Unkn	VIM	17,06	17,06	0,000
A03	FAM		Unkn	VIM	17,13	17,13	0,000
B01	FAM		Unkn	10-1	22,36	22,36	0,000

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.
B02	FAM		Unkn	10 ⁻¹	21,92	21,92	0,000
B03	FAM		Unkn	10 ⁻¹	21,58	21,58	0,000
C01	FAM		Unkn	10 ⁻²	25,37	25,37	0,000
C02	FAM		Unkn	10 ⁻²	25,25	25,25	0,000
C03	FAM		Unkn	10 ⁻²	24,75	24,75	0,000
D01	FAM		Unkn	10 ⁻³	28,60	28,60	0,000
D02	FAM		Unkn	10 ⁻³	28,10	28,10	0,000
D03	FAM		Unkn	10 ⁻³	27,56	27,56	0,000
E01	FAM		Unkn	10 ⁻⁴	30,00	30,00	0,000
E02	FAM		Unkn	10 ⁻⁴	29,95	29,95	0,000
E03	FAM		Unkn	10 ⁻⁴	29,27	29,27	0,000
F01	FAM		Unkn	10 ⁻⁵	33,07	33,07	0,000
F02	FAM		Unkn	10 ⁻⁵	32,79	32,79	0,000
F03	FAM		Unkn	10 ⁻⁵	32,63	32,63	0,000
G01	FAM		Unkn	10 ⁻⁶	36,50	36,50	0,000
G02	FAM		Unkn	10 ⁻⁶	36,51	36,51	0,000
G03	FAM		Unkn	10 ⁻⁶	35,58	35,58	0,000
H01	FAM		Unkn	10 ⁻⁷	N/A	0,00	0,000
H02	FAM		Unkn	10 ⁻⁷	39,38	39,38	0,000
H03	FAM		Unkn	10 ⁻⁷	39,52	39,52	0,000



DHA + CIT

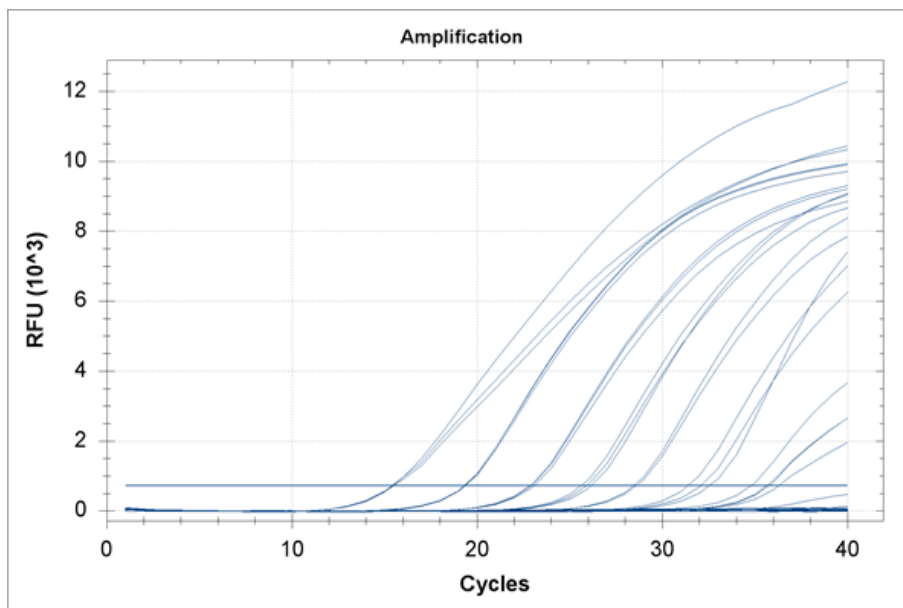
Effektivitet AmpC fortynning_2019-03-18 15-10-51_CC011954.pcrd

11.04.2019 10:07

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: Effektivitet AmpC fortynning_2019-03-18 15-10-51_CC011954.pcrd
Data File Path: C:\Documents and Settings\All Users\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\admin\Bachelor 2019
Well Group Name: All Wells
Report Differs from Last Save: No

Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10 ⁰	15,47	15,47	0,000
A02	FAM		Pos Ctrl	CIT 10 ⁰	15,42	15,42	0,000

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^0	15,53	15,53	0,000
A04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^0	N/A	0,00	0,000
A05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^0	N/A	0,00	0,000
A06	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^0	N/A	0,00	0,000
B01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-1	19,32	19,32	0,000
B02	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-1	19,34	19,34	0,000
B03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-1	19,38	19,38	0,000
B04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-1	N/A	0,00	0,000
B05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-1	N/A	0,00	0,000
B06	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-1	N/A	0,00	0,000
C01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-2	23,11	23,11	0,000
C02	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-2	22,98	22,98	0,000
C03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-2	22,88	22,88	0,000
C04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-2	N/A	0,00	0,000
C05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-2	N/A	0,00	0,000
C06	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-2	N/A	0,00	0,000
D01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-3	26,18	26,18	0,000
D02	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-3	25,93	25,93	0,000
D03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-3	25,64	25,64	0,000
D04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-3	N/A	0,00	0,000
D05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-3	N/A	0,00	0,000
D06	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-3	N/A	0,00	0,000
E01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-4	N/A	0,00	0,000
E02	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-4	28,60	28,60	0,000
E03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-4	28,46	28,46	0,000
E04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-4	N/A	0,00	0,000
E05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-4	N/A	0,00	0,000
E06	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-4	N/A	0,00	0,000
F01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-5	32,56	32,56	0,000
F02	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-5	32,10	32,10	0,000
F03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-5	31,40	31,40	0,000
F04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-5	N/A	0,00	0,000
F05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-5	N/A	0,00	0,000
G01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-6	35,78	35,78	0,000
G03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-6	34,82	34,82	0,000
G04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-6	N/A	0,00	0,000
G05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-6	N/A	0,00	0,000
G07	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-6	36,32	36,32	0,000
H01	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-7	N/A	0,00	0,000
H03	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-7	N/A	0,00	0,000
H04	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-7	N/A	0,00	0,000
H05	FAM		Pos Ctrl	DHA 10^-7	N/A	0,00	0,000
H07	FAM		Pos Ctrl	CIT 10^-7	35,65	35,65	0,000
A01	Texas Red		Pos Ctrl	CIT 10^0	N/A	0,00	0,000
A02	Texas Red		Pos Ctrl	CIT 10^0	N/A	0,00	0,000
A03	Texas Red		Pos Ctrl	CIT 10^0	N/A	0,00	0,000
A04	Texas Red		Pos Ctrl	DHA 10^0	11,24	11,24	0,000
A05	Texas Red		Pos Ctrl	DHA 10^0	11,64	11,64	0,000
A06	Texas Red		Pos Ctrl	DHA 10^0	11,30	11,30	0,000



effektivitet vim(bronn1-3)-gim(4-6)+teststammer21-40(10-12)_2019-04-08 12-16-18_PYSA.pcrd

08.04.2019 13:35

Report Information

User: BioRad/admin

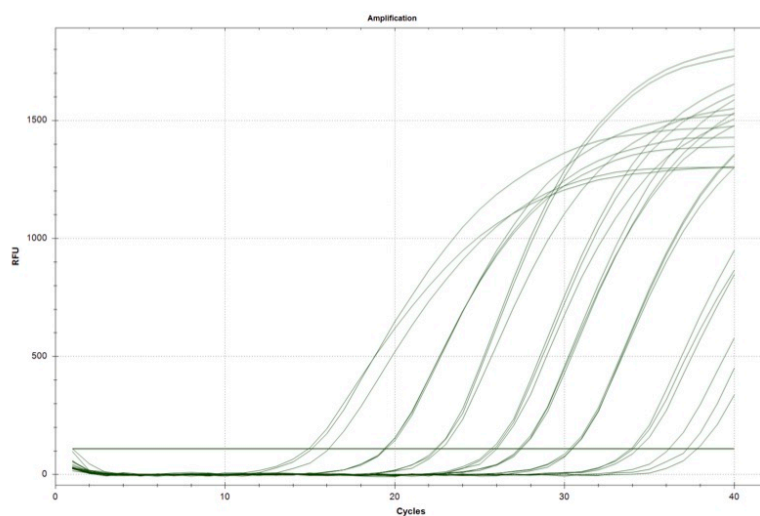
Data File Name: effektivitet vim(bronn1-3)-gim(4-6)+teststammer21-40(10-12)_2019-04-08 12-16-18_PYSA.pcrd

Data File Path: C:\Users\Public\Documents\Bio-Rad\CFXUsers\admin

Well Group Name: Effektivitet GIM

Report Differs from Last Save: Yes

Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A04	HEX		Unkn	GIM	14,90	14,90	0,000
A05	HEX		Unkn	GIM	15,11	15,11	0,000
A06	HEX		Unkn	GIM	16,10	16,10	0,000
B04	HEX		Unkn	10 ⁻¹	19,48	19,48	0,000

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.
B05	HEX		Unkn	10 ⁻¹	19,41	19,41	0,000
B06	HEX		Unkn	10 ⁻¹	19,37	19,37	0,000
C04	HEX		Unkn	10 ⁻²	22,39	22,39	0,000
C05	HEX		Unkn	10 ⁻²	22,47	22,47	0,000
C06	HEX		Unkn	10 ⁻²	22,70	22,70	0,000
D04	HEX		Unkn	10 ⁻³	25,68	25,68	0,000
D05	HEX		Unkn	10 ⁻³	26,01	26,01	0,000
D06	HEX		Unkn	10 ⁻³	25,85	25,85	0,000
E04	HEX		Unkn	10 ⁻⁴	27,44	27,44	0,000
E05	HEX		Unkn	10 ⁻⁴	27,29	27,29	0,000
E06	HEX		Unkn	10 ⁻⁴	27,37	27,37	0,000
F04	HEX		Unkn	10 ⁻⁵	30,30	30,30	0,000
F05	HEX		Unkn	10 ⁻⁵	30,41	30,41	0,000
F06	HEX		Unkn	10 ⁻⁵	30,46	30,46	0,000
G04	HEX		Unkn	10 ⁻⁶	34,31	34,31	0,000
G05	HEX		Unkn	10 ⁻⁶	33,91	33,91	0,000
G06	HEX		Unkn	10 ⁻⁶	34,04	34,04	0,000
H04	HEX		Unkn	10 ⁻⁷	36,15	36,15	0,000
H05	HEX		Unkn	10 ⁻⁷	37,22	37,22	0,000
H06	HEX		Unkn	10 ⁻⁷	37,80	37,80	0,000



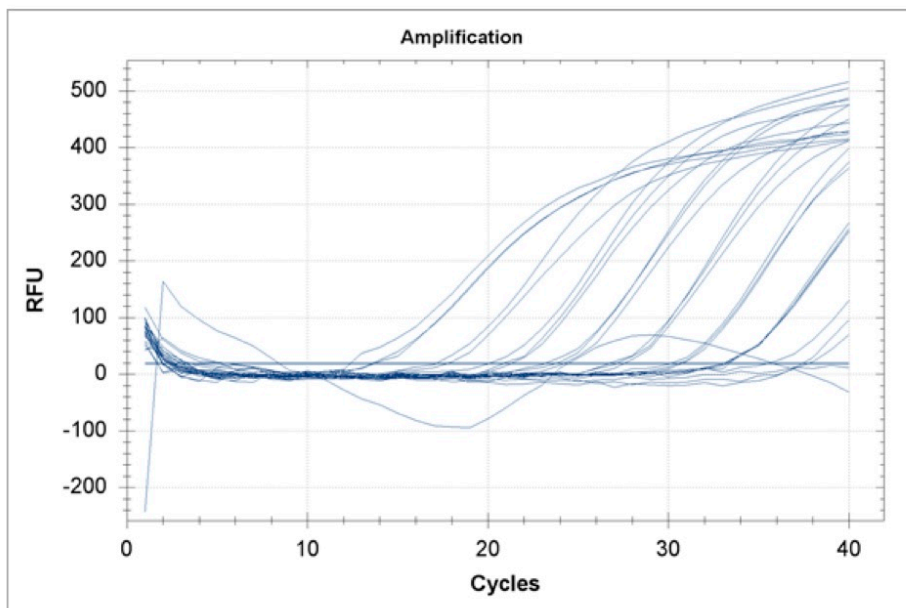
Effektivitet SIM NDM IMP_2019-03-27 14-22-01_CC011954.pcrd

11.04.2019 10:16

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: Effektivitet SIM NDM IMP_2019-03-27 14-22-01_CC011954.pcrd
Data File Path: C:\Documents and Settings\All Users\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\admin\Bachelor 2019
Well Group Name: IMP
Report Differs from Last Save: Yes

Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.
A07	FAM		Pos Ctrl	IMP	13,60	13,60	0,000
A08	FAM		Pos Ctrl	IMP	13,74	13,74	0,000

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A09	FAM		Pos Ctrl	IMP	12,38	12,38	0,000
B07	FAM		Pos Ctrl	IMP -1	17,77	17,77	0,000
B08	FAM		Pos Ctrl	IMP -1	24,46	24,46	0,000
B09	FAM		Pos Ctrl	IMP -1	17,15	17,15	0,000
C07	FAM		Pos Ctrl	IMP -2	20,88	20,88	0,000
C08	FAM		Pos Ctrl	IMP -2	20,08	20,08	0,000
C09	FAM		Pos Ctrl	IMP -2	21,30	21,30	0,000
C10	FAM		Pos Ctrl	9G	33,26	33,26	0,000
D07	FAM		Pos Ctrl	IMP -3	23,18	23,18	0,000
D08	FAM		Pos Ctrl	IMP -3	23,79	23,79	0,000
D09	FAM		Pos Ctrl	IMP -3	24,21	24,21	0,000
D10	FAM		Pos Ctrl	9H	37,78	37,78	0,000
E07	FAM		Pos Ctrl	IMP -4	27,16	27,16	0,000
E08	FAM		Pos Ctrl	IMP -4	26,74	26,74	0,000
E09	FAM		Pos Ctrl	IMP -4	27,57	27,57	0,000
F07	FAM		Pos Ctrl	IMP -5	30,78	30,78	0,000
F08	FAM		Pos Ctrl	IMP -5	30,14	30,14	0,000
F09	FAM		Pos Ctrl	IMP -5	30,57	30,57	0,000
G07	FAM		Pos Ctrl	IMP -6	33,10	33,10	0,000
G08	FAM		Pos Ctrl	IMP -6	33,39	33,39	0,000
G09	FAM		Pos Ctrl	IMP -7	N/A	0,00	0,000
H07	FAM		Pos Ctrl	IMP -7	35,52	35,52	0,000
H08	FAM		Pos Ctrl	IMP -7	37,44	37,44	0,000
H09	FAM		Pos Ctrl	IMP -6	33,10	33,10	0,000



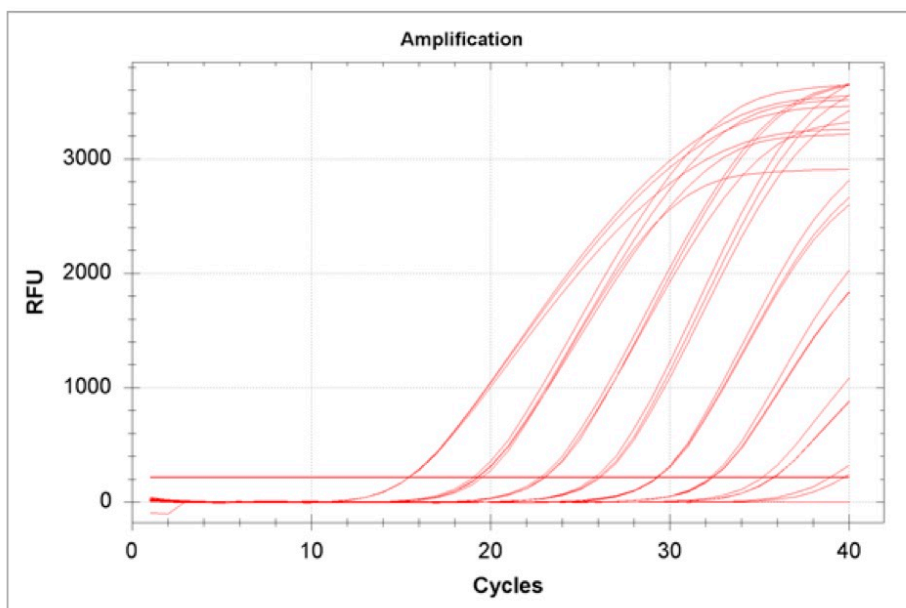
Effektivitet SIM NDM IMP_2019-03-27 14-22-01_CC011954.pcrd

11.04.2019 10:15

Report Information

User: BioRad/admin
Data File Name: Effektivitet SIM NDM IMP_2019-03-27 14-22-01_CC011954.pcrd
Data File Path: C:\Documents and Settings\All Users\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\admin\Bachelor 2019
Well Group Name: NDM
Report Differs from Last Save: Yes

Quantification



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM	15,44	15,44	0,000
A05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM	15,46	15,46	0,000

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM	15,46	15,46	0,000
B04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -1	19,26	19,26	0,000
B05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -1	19,06	19,06	0,000
B06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -1	19,53	19,53	0,000
B10	Texas Red		Pos Ctrl	6B	19,31	19,31	0,000
C04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -2	23,00	23,00	0,000
C05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -2	23,07	23,07	0,000
C06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -2	22,78	22,78	0,000
D04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -3	25,82	25,82	0,000
D05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -3	26,13	26,13	0,000
D06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -3	26,03	26,03	0,000
E04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -4	29,33	29,33	0,000
E05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -4	29,27	29,27	0,000
E06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -4	29,29	29,29	0,000
F04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -5	32,25	32,25	0,000
F05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -5	32,36	32,36	0,000
F06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -5	32,40	32,40	0,000
G04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -6	35,18	35,18	0,000
G05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -6	35,82	35,82	0,000
G06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -6	35,78	35,78	0,000
H04	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -7	39,74	39,74	0,000
H05	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -7	38,97	38,97	0,000
H06	Texas Red		Pos Ctrl	NDM -7	N/A	0,00	0,000

