

Eline Bjørnstad
Linn Bruvik

Etablering av multipleks-PCR for deteksjon av *Campylobacter* species i avføringsprøver fra pasienter med diaré

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag

Veileder: Kine Husteli Kristiansen

Medveileder: Jan Egil Afset, Dorothea Aamnes Mostue, Janne
Fossum Malmring

Mai 2022

Eline Bjørnstad
Linn Bruvik

Etablering av multipleks-PCR for deteksjon av *Campylobacter* species i avføringsprøver fra pasienter med diaré

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag
Veileder: Kine Husteli Kristiansen
Medveileder: Jan Egil Afset, Dorothea Aamnes Mostue, Janne Fossum
Malmring
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Dette bachelorprosjektet ble utført som avsluttende oppgave for bioingeniørutdanningen ved institutt for bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU).

Oppdragsgiver for prosjektet var avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital HF.

Vi vil rette en stor takk til våre faglige veiledere ved AMM; fagansvarlig bioingeniør Dorothea Aamnes Mostue og spesialbioingeniør Janne Fossum Malmring. Dere har en enorm kompetanse innenfor fagområdet og har vært til stor hjelp med det praktiske laboratoriarbeidet. Vi vil også takke professor/overlege Jan Egil Afset som prosjektleder for oppgaven. Dere har alle gitt oss innsikt i den daglige driften ved en laboratoriemedisinsk klinikk, og viktigheten av gode bioingeniører og nøyaktig laboratoriarbeid for medisinsk diagnostikk.

Sist, men ikke minst, vil vi takke vår fantastiske prosessveileder Kine Husteli Kristiansen. Vi er ekstremt takknemlige for all hjelpen du har gitt med det skriftlige arbeidet og innsikt i teorien som ligger bak oppgaven. Du har en enorm tålmodighet, og har vært en viktig støttespiller for oss gjennom bachelorperioden. Du møter oss alltid med latter og smil, selv på sene kvelder når motivasjonen har vært på bunn.

Trondheim, 20.mai 2022

Linn Bruvik

Bioingeniørstudent, Linn Bruvik

Eline Bjørnstad

Bioingeniørstudent, Eline Bjørnstad

Sammendrag

Campylobacter jejuni og *Campylobacter coli* er en av de hyppigste årsakene til gastroenteritt hos pasienter med akutt diaré. Det er totalt 11 ulike *Campylobacter species* som er registrert som tarmpatogene, og det var derfor interessant å undersøke forekomsten av andre *Campylobacter species* enn *Campylobacter jejuni* og *Campylobacter coli* hos pasienter med symptomer på gastroenteritt, samt hvor stor andel av disse som er klassifisert som tarmpatogene.

I dette bachelorprosjektet ble det etablert en multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* for å undersøke om det å benytte primere og prober for *C. fetus* og *C. species* med målsekvensen 16S rRNA førte til deteksjon av flere *C. species* enn avdelingens rutineanalyse for diagnostikk av tarmpatogene agens (Seegene® Allplex™ Bacteria(I)). For å etablere multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ble analysen optimalisert, samt analysens effektivitet, spesifisitet og deteksjonsgrense bestemt. 826 pasientprøver fra pasienter med diaré ble analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, og sangersekvensering ble benyttet for å identifisere bakteriestammene som ble detektert i pasientprøvene.

Resultatene viste at multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* hadde god effektivitet, spesifisitet, og lav deteksjonsgrense, og kunne benyttes til påvisning av *C. species* i pasientprøver. Fire pasientprøver ble identifisert med sangersekvensering, hvor tre av pasientprøvene fikk identifikasjon for *Campylobacter concisus*, og én av pasientprøvene fikk identifikasjon for *Candidatus Campylobacter infans strain*.

Det ble konkludert med at multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* var egnet til påvisning av *C. fetus* og *C. species* i avføringsprøver fra pasienter med akutt diaré, samt at analysen detekterte flere *C. species* enn avdelingens rutineanalyse. Bakterieartene som ble funnet i pasientprøvene er ikke klassifisert som tarmpatogene, men funn i tidligere studier indikerer likevel at artene kan være tarmpatogene.

Abstract

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* are known to be one of the most frequent causes to gastroenteritis worldwide for patients with acute diarrhea. There are in total eleven different *Campylobacter species* that is known to be gastrointestinal pathogen, and therefore it is interesting to investigate the instance of other *Campylobacter species* than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in patients with symptoms of gastroenteritis, including the percentage of gastrointestinal pathogen *Campylobacter species* detected in patient stool samples.

In this bachelor thesis, a multiplex-PCR for *C. fetus* and *C. species* was established to review if the use of primers and probes for *C. fetus* and *C. species* with the target sequence 16S rRNA, lead to detection of further *C. species* than the routine multiplex-PCR Allplex Bacteria (I), which is currently used for detection of gastrointestinal pathogens at the clinical department of medical microbiology at St. Olavs Hospital. To establish the multiplex-PCR for *C. fetus* and *C. species*, the analysis was optimized, additionally to the determination of the analysis's efficiency, specificity, and detection limit. 826 stool samples from patients with diarrhea were analyzed with the multiplex-PCR for *C. fetus* and *C. species*. Sanger sequencing was practiced for the identification of bacteria detected in patient stool samples with the multiplex-PCR for *C. fetus* and *C. species*.

The results affirmed that the multiplex-PCR for *C. fetus* and *C. species* had acceptable efficiency, specificity, and a low detection limit, and could be used for detection of *C. species* in patient samples. Four of 826 patient samples were identified with sanger sequencing, where three of the patient samples were identified as *Campylobacter concisus*, and one of the patient samples was identified as *Candidatus Campylobacter infans strain*.

In conclusion, the multiplex-PCR for *C. fetus* and *C. species* was suitable for detection of *C. fetus* and *C. species* in stool samples from patients with acute diarrhea, and the analysis detected further *C. species* than the routine Allplex-PCR. The bacteria species that were detected in the patient samples is not classified as gastrointestinal pathogens, but newer studies indicate that they might be a cause to gastroenteritis.

Forkortelser

BLAST= Basic Local Alignment Search Tool

ATCC = American Type Culture Collection

CCDA = Charcoal Cefoperazone Desoxycholat Agar

CCUG = Culture collection University of Gothenburg

C. coli = Campylobacter coli

C. hyointestinalis = Campylobacter hyointestinalis

C. fetus = Campylobacter fetus

C. jejuni = Campylobacter jejuni

C. lari = Campylobacter lari

C. species = Campylobacter species

C. upsaliensis = Campylobacter upsaliensis

Ct = Cycle threshold

dNTPs = deoksynukleotider trifosfater

ddNTPs = dideoxynukleotider

MGW = Molecular grade water

PCR = Polymerase kjede-reaksjon / Polymerase Chain reaction

rRNA = ribosomalt RNA

TaqMan MGB probe = TaqMan minor groove binding probe

T_M= Smeltetemperatur

Innholdsfortegnelse

1.0	Innledning	1
1.1	Campylobacter og campylobacteriose.....	1
1.2	Påvisning av Campylobacter	3
1.3	Ekstraksjon av DNA.....	3
1.4	PCR.....	4
1.4.1	Mastermix	4
1.4.2	Primere	4
1.4.3	Probe	4
1.4.4	Prinsippet for PCR	5
1.4.5	Real-time PCR.....	8
1.4.6	Optimalisering av PCR.....	9
1.4.7	Kvalitetssikring av PCR.....	10
1.5	Sangersekvensering	10
1.6	Hensikt og problemstilling	11
2.0	Materiale og metode	13
2.1	Materiale benyttet ved etablering av multipleks-PCR for C. fetus og C. species.....	13
2.1.1	Primere og prober	13
2.1.2	Kontrollstammer.....	14
2.1.3	Spesifisitetspanel.....	14
2.1.4	Pasientprøver.....	16
2.2	Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for C. species og C. fetus.....	17
2.3	Optimalisering av annealingtemperatur for C. species-PCR og C. fetus-PCR.....	18
2.4	Optimalisering av primere- og probe-konsentrasjon for C. fetus-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C.....	19
2.5	Undersøkelse av multipleks-PCR for C. fetus og C. species med optimalisert konsentrasjon av primere og probe for C. fetus.....	20
2.6	Effektivitetsanalyse av multipleks-PCR for C. fetus og C. species.....	21
2.7	Spesifisitetsanalyse av multipleks-PCR for C. fetus og C. species	21
2.8	Bestemmelse av deteksjonsgrense for multipleks-PCR for C. fetus og C. species ved bruk av to ulike metoder	21
2.8.1	Bestemmelse av deteksjonsgrense med Colony Forming Units (CFU).....	22
2.8.2	Bestemmelse av deteksjonsgrense med antall molekyler/PCR.....	24
2.9	Analysing av pasientprøver	26
2.10	Sangersekvensering av positive pasientprøver	26
3.0	Resultater	27
3.1	Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for C. fetus og C. species.....	27
3.2	Optimalisering av annealingtemperatur for C. fetus-PCR og C. species-PCR.....	28
3.3	Optimalisering av konsentrasjon av primere og probe for C. fetus-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C	31
3.4	Undersøkelse av multipleks-PCR for C. fetus og C. species med optimalisert konsentrasjon av primere og probe for C. fetus.....	32

3.5	Effektivitetsanalyse av multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	34
3.6	Spesifisitetsanalyse av multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	34
3.7	Bestemmelse av deteksjonsgrense for multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i> med to ulike metoder	35
3.7.1	Bestemmelse av deteksjonsgrense med CFU	35
3.7.2	Bestemmelse av deteksjonsgrense med molekyler/PCR.....	36
3.8	Analysering av ti kjente positive pasientprøver for <i>C. species</i> med multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i> for sammenligning mot Allplex GI assay (Seegene)	37
3.9	Analysering av pasientprøver med symptomer på gastroenteritt.....	38
3.9.1	Positive pasientprøver med høy Ct-verdi.....	38
3.9.2	Positive pasientprøver med lav Ct-verdi.....	41
3.10	Identifisering av positive pasientprøver med lav Ct-verdi ved sangersekvensering.....	42
4.0	Diskusjon	44
4.1	Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	44
4.2	Optimalisering av annealingtemperatur for <i>C. fetus</i> -PCR og <i>C. species</i> -PCR.....	44
4.3	Optimalisering av konsentrasjon av primere og probe for <i>C. fetus</i> -PCR ved annealingtemperatur 60,0°C	45
4.4	Undersøkelse av multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i> etter økning av konsentrasjon av primere og probe for <i>C. fetus</i>	45
4.5	Effektivitetsanalyse for multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	46
4.6	Spesifisitetsanalyse for multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	46
4.7	Bestemmelse av deteksjonsgrense for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	47
4.8	Påvisning av <i>C. species</i> i avføringsprøver fra pasienter med diaré	48
4.8.1	Pasientprøver med høy Ct-verdi	48
4.8.2	Sangersekvensering av pasientprøver med lav Ct-verdi.....	48
4.9	Feilkilder.....	50
4.10	Konklusjon og videre arbeid.....	51
5.0	Referanser.....	52
6.0	Vedlegg.....	55

1.0 Innledning

Ved avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital benyttes molekylærbiologiske metoder for å diagnostisere en rekke ulike mikrober. Polymerase-kjedereaksjon (PCR) er en analyse som blir hyppig brukt i laboratoriets daglige drift. Multipleks PCR-analyse gir mulighet for å påvise flere ulike virus, bakterier og parasitter i samme prøve, og benyttes blant annet ved fæcesdiagnostikk til screening av pasienter med symptomer på tarminfeksjon.

Multipleks PCR-analysen som benyttes i rutinedrift ved avdeling for medisinsk mikrobiologi for å screene avføringsprøver for de mest kjente tarmpatogene mikrobenes er Allplex GI assay (Seegene), som blant annet screener avføringsprøver for *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) og *Campylobacter coli* (*C. coli*). Det er derimot flere pasienter med symptomer på gastroenteritt som får negativt resultat for tarmpatogene mikrober det screenes for i Allplex GI assay. *C. jejuni* og *C. coli* er kjent som en av de hyppigste årsakene til gastroenteritt på verdensbasis, men flere studier av *Campylobacter species* (*C. species*) konkluderer med at andre arter kan være tarmpatogene (1–3). Avdelingen ønsker derfor å etablere en supplerende multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* for å undersøke om andre *C. species* enn *C. coli* og *C. jejuni* finnes i avføringsprøver fra pasienter med diaré i Midt-Norge.

1.1 *Campylobacter* og campylobacteriose

Campylobacter er små, komma-formede, kresne, gram negative staver (1,4). Det er identifisert 44 ulike arter av *Campylobacter* (5), hvor 11 av disse er klassifisert som tarmpatogene og kan forårsake zoonotisk sykdom hos mennesker (6). Humanpatogene *C. species* finnes ofte i normalfloraen hos fjærfe og andre husdyr, men flere arter i bakterieslekten kan også finnes i normalfloraen i munnhulen hos mennesker (7).

Tarmpatogene *C. species* har flere virulensfaktorer, som blant annet innebærer en ytre polysakkarid-kapsel bestående av lipooligosakkarider (LOS), flageller og produksjon av toksin. Polysakkarid-kapselen bidrar til virulens, da tilstedeværelse av kapsel kan begrense produksjon av cytokiner og dermed hemme immunforsvarets respons. LOS bidrar til virulens ved å gi bakterien evne til å unngå immunforsvaret, overlevelse i fiendtlig miljø og invasjon av epitelceller (8). Flagellene gir økt motilitet, som bidrar til økt koloniseringsevne. Disse kan

også skille ut proteiner som bidrar til adhesjon til vertsceller. *C. jejuni* skiller kun ut toksinet cytolethal distending toxin (CDT), som også gir evnen til å binde bakterien til vertscellen. Subenheter av CDT inhiberer proliferasjon av vertscellen, som videre forårsaker apoptose. Virulensen til flere *C. species* er fortsatt ukjent, men det er et dagsaktuelt tema som stadig forskes på (9–11).

Tilfellene av campylobacteriose har de siste årene økt i store deler av verden, inkludert i Norge hvor campylobacteriose forekommer hyppigere enn salmonellainfeksjon (1,2). Campylobacteriose kan føre til en rekke sykdommer, inkludert akutt tarmbetennelse, ekstraintestinal infeksjon, postinfeksiøse komplikasjoner og Guillane-Barré syndrom (8,12). Økningen av campylobacteriose kan skyldes økt inntak av fugl i kostholdet og at en svært liten mengde av bakterien kan være sykdomsfremkallende (7). Bakterien dør langsomt og kan dermed overleve flere uker i fjærfeprodukter oppbevart i kjøleskaptemperatur (6).

De aller fleste tilfellene med campylobacteriose i Norge forekommer om sommeren, og spesielt etter utenlandsopphold i middelhavsområde og Asia. Infeksjon kan komme av forurenset drikkevann, dårlig hygiene ved grilling, kontakt med avføring fra husdyr, upasteurisert melk og inntak av utilstrekkelig varmebehandlet fugl og svinekjøtt. I sjeldne tilfeller kan campylobacteriose skyldes kontaktsmitte mellom mennesker ved dårlig håndhygiene (6).

Inkubasjonstiden for campylobacteriose er 1 til 10 døgn etter eksponering, mens en kan være smittebærer i 2 til 5 døgn etter endte symptomer, ettersom bakterien skilles ut med avføringen (6). Smittespredningen kan forhindres ved hjelp av god personlig håndhygiene, og korrekt behandling av mat (13).

Symptomene ved campylobacteriose er vanligvis magesmerter, lett feber og diare, ofte med blod og slim. Symptomer som kvalme og oppkast kan også forekomme. Normalt varer symptomene i 3 til 7 døgn, mens magesmerter kan vare noen døgn etter diareen har stoppet. Ved smitte av campylobacteriose vil kroppen utvikle antistoffer, som beskytter mot infeksjon av aktuell *C. species* i et par uker (6).

1.2 Påvisning av *Campylobacter*

C. species kan påvises med PCR-analyse og dyrkning av avføringsprøver, hvor tidligere studier viser at PCR-analyse har god sensitivitet og spesifisitet for påvisning av *C. species* i avføringsprøver. 16s rRNA er målsekvensen for PCR-analysene som er beskrevet i disse studiene (1–3), og samme målsekvens benyttes i etableringen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* i dette prosjektet.

16S rRNA er en målsekvens som hyppig benyttes i identifisering av bakterier. Det er et godt bevart gen med liten grad av mutasjon hos bakterier som gjør det hensiktsmessig å benytte for identifisering, og har i tillegg en viktig rolle for bakteriens funksjon. Ribosomalt RNA (rRNA) er en viktig komponent av ribosomer, hvor 16S rRNA er en del av den lille ribosomale subenheten hos bakterier, og er viktig for DNA-translasjon (14). Gensekvensen 16S rRNA er omtrent 1550 basepar lang, hvor ulike bakterier har tilstrekkelige interspesifikke ulikheter som gjør det mulig å identifisere bakterier. Generelt kan 16S rRNA benyttes for å differensiere mellom forskjellige bakterier, både for species og subspecies (15). I dette prosjektet benyttes primere og prober som er spesifikke for 16S rRNA for *C. species* og *C. fetus*, og dette gir videre mulighet for subtyping av *C. species* ved sekvensering.

Positive funn på PCR må bekreftes ved bakteriologisk dyrkning. For å påvise *C. fetus* og *C. species* ved bakteriell dyrkning, benyttes mediet Charcoal Cefoperazone Desoxycholat Agar (CCDA) (2). CCDA er et selektivt dyrkingsmedium for *C. species*, og har som hensikt å hindre vekst av normalflora, samt forbedre vekst og lufttoleranse for *C. species*. *C. species* krever en mikroaerofil atmosfære, som vil si at de trives best i en atmosfære med redusert oksygen (5-7%) og økt karbondioksid (5-10%). Bakterieslekten er hovedsakelig termofile bakterier som trives bedre ved høyere temperaturer, og inkuberes derfor ved 42°C. *C. fetus* er et unntak fra dette, og inkuberes ved 35°C (3).

1.3 Ekstraksjon av DNA

Ved PCR-analyse av fæcesprøver er ekstraksjon av genmateriale en viktig preanalytisk faktor. Fæces inneholder store mengder substanser som kan interferere analyseprosessen, og dermed må cellerester fjernes fra fæcesprøver slik at kun mikrobielt og humant DNA og RNA ekstraheres fra prøvematerialet til et eluat. Renset DNA og RNA vil være løst i en elueringsbuffer som stabiliserer nukleinsyrer, og gir eluatet lengre holdbarhet (2,16).

1.4 PCR

PCR er en hyppig brukt analyse som benytter de grunnleggende elementene til den naturlige DNA-syntesen og replikasjonsprosessen for å oppkonsentrere DNA (17). Innenfor medisinsk mikrobiologi benyttes PCR først og fremst for å påvise og semi-kvantitere ulike mikrober, som bakterier, virus, sopp og parasitter.

1.4.1 Mastermix

Mastermix er en blanding av deoksynukleotid trifosfater (dNTPs), DNA-polymerase, buffer og nødvendige kofaktorer. DNA-polymerase er inaktiv i mastermixen, hvor enzymet er bundet til monoklonale antistoff. Nukleotidbasene dNTPs er byggesteinene som benyttes til å syntetisere nytt DNA ved hjelp av DNA-polymerase. Bufferen gir optimal pH-verdi ved de ulike temperaturene i analysen, slik at DNA-polymerase kan binde seg til primer som har blitt bundet til DNA-templatet. Magnesium bidrar til aktivering av DNA-polymerase og er den vanligste kofaktoren til enzymet i PCR-analyser (17).

1.4.2 Primere

Primere er syntetisk produserte DNA-sekvenser med omtrent 20 nukleotider. En primer er komplementær til en DNA-sekvens i den opprinnelige DNA-tråden, altså DNA-templatet, og bindes til denne sekvensen. For at primeren skal utøve sin funksjon, er det nødvendig å vite nukleinsyresekvensen for DNA-et man ønsker å undersøke. Årsaken til dette er at primere som benyttes, forward og revers primer, binder seg til den komplementære nukleinsyresekvensen på hver sin komplementære DNA-tråd (17).

1.4.3 Probe

Probe er, i likhet med primere, en syntetisk produsert DNA-sekvens som er komplementær til en spesifikk DNA-sekvens på templatstråden. I Real-time PCR benyttes probe for å detektere amplifisert DNA, og i dette prosjektet benyttes det TaqMan minor groove binding probe (TaqMan MGB probe), som er korte TaqMan prober. MGB-prober har evnen til å danne svært stabile duplekser med komplementært DNA, og fører til mer spesifikk binding av probe. Ved å benytte MGB-prober, vil i tillegg bakgrunnsfluorescensen bli betraktelig lavere, som vil føre til mer effektiv amplifikasjon (18). TaqMan MGB probe er merket på begge sider av sekvensen, hvor 5'-enden er merket med en reporter bundet til en fluorofor, og 3'-enden er merket med en quencher. Hensikten med quencher er å inhibere fluorescens-signalet

fra reporteren når proben er ubundet. Når proben binder seg til DNA-sekvensen vil DNA-polymerase degradere proben, og quencher blir skilt fra reporter. Reporteren vil da kunne sende ut fluorescenssignal som detekteres ved hjelp av et fluorometer i instrumentet. Mengden fluorescens er proporsjonal med mengden amplifisert DNA i prøven (17).

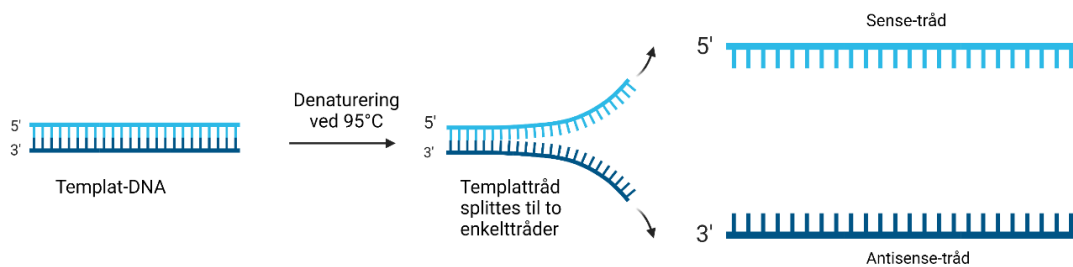
1.4.4 Prinsippet for PCR

For å initiere PCR-reaksjonen, økes temperaturen til 45°C for å aktivere DNA-polymerase. Videre består PCR-reaksjonen av gjentatte sykluser som består av tre ulike trinn styrt av ulike temperatur. Trinnene er denaturering, annealing og DNA-syntese, og syklusen med de tre trinnene gjentas vanligvis mellom 25 og 40 ganger (17).

1.4.4.1 Denaturering

Denaturering er det første trinnet i PCR-reaksjonen, og baserer seg på å øke temperaturen til 94-95°C for å bryte bindingene i DNA-et som er en dobbelthelix. Dette fungerer altså som selve startpunktet for PCR-analysen hvor templattråden eksponeres, og DNA-polymerase kan binde seg til en fri 3'-OH-gruppe og bygge videre på DNA-tråden. DNA består av nukleotidene dATP, dTTP, dCTP og dGTP. Mellom dATP og dTTP i dobbelthelixa er det en dobbelt-hydrogenbinding, mens mellom dCTP og dGTP er det en trippel-hydrogenbinding. Hvilken temperatur som må til for å bryte alle bindingene avhenger av om det er overskudd av dobbeltbindinger eller trippelbindinger i DNA-sekvensen. Det er derfor vanlig å øke temperaturen til 94°C i fem minutter for å sikre at dobbelthelixa blir denaturert til enkelttråder uansett sekvens. Dersom denatureringen ikke er effektiv, vil utilstrekkelig denaturerte duplex-molekyler fort bindes igjen og forhindre effektiv primer-binding under annealingstrinnet (17). Denatureringsprosessen er illustrert i Figur 1.

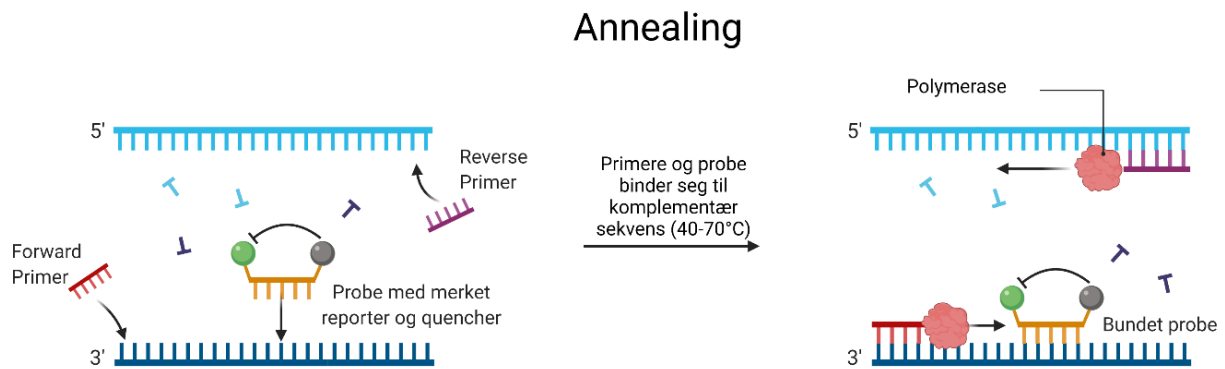
Denaturering



Figur 1: Illustrasjon av denatureringsprosessen i en PCR-analyse, hvor dobbelthelix DNA splittes til to enkeltråder; sense og antisense. Figuren ble laget med BioRender.com.

1.4.4.2 Annealing

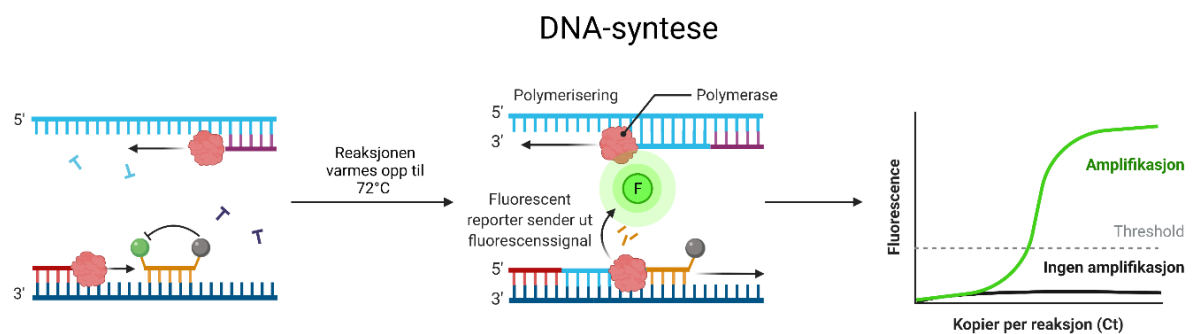
De to komplementære enkeltrådene med DNA, benyttes videre i neste trinn, annealing, også kalt binding eller hybridisering. Annealingen fungerer ved at reaksjonen raskt kjøles ned til 40-70°C, og ettersom de denaturert enkeltrådene er lange og komplekse, vil de ikke binde seg til hverandre igjen ved denne hyppige nedkjølingen. Oligonukleotid-primere og -probe er derimot korte og har spesifikk sekvens for templattråden, og vil binde komplementær tråd, hvor forward-primer binder seg til antisense-tråd, mens revers-primer binder seg til sense-tråd. Under annealingen vil termostabilt DNA-polymerase også binde seg til en viss grad, og begynne å forlenge primertrådene så fort de binder seg til fri OH-gruppe på 3`-enden av primeren (17,19). Annealingen er illustrert i Figur 2.



Figur 2: Illustrasjon av annealing hvor primere og probe binder seg til komplementær DNA- sekvens i templattråden. Forward-primer binder antisense-tråde, og revers-primer binder sense-tråd. Figuren ble laget med BioRender.com.

1.4.4.3 DNA-syntese og deteksjon

Det tredje trinnet i PCR-reaksjonen er DNA-syntese, og er illustrert i Figur 3. Reaksjonen varmes opp, typisk til 72°C, for effektiv DNA-syntese katalysert av det termostabile enzymet DNA-polymerase. Syntesen skjer i 5` → 3`-retning ved at polymerase binder seg til fri OH-gruppe på 3`-enden, og oppkonsentrerer mengde DNA i prøvebrønnen. Ved syntetiseringen spalter DNA-polymerase proben, slik at quencher og reporter blir skilt fra hverandre og det blir emittert fluorescerende lys. Dette detekteres av fluorometeret, og det genereres en amplifikasjonskurve (17).



Figur 3: Illustrasjon av DNA-syntese, hvor polymerase katalyserer syntese av DNA ved hjelp av nukleotider og bundet primere. DNA-polymerase spalter proben, og skiller reporter og quencher fra hverandre. Reporter vil da

gi fluorescens som detekteres av et fluorometer. Amplifikasjonen visualiseres i en amplifikasjonskurve med mengde fluorescens per syklus. Figuren ble laget med BioRender.com

1.4.5 Real-time PCR

Real-time PCR er en semi-kvantitativ PCR-analyse, og er betraktet som den mest sensitive og reproduserbare varianten. Semi-kvantitativ PCR er en analysemetode som kan benyttes for å gi en indikasjon på opprinnelige mengde av agens ut ifra cycle threshold-verdier (Ct-verdier) (16,19).

Underveis i Real-time PCR-reaksjonen, dannes det en forenklet visualisering av amplifiseringen av sekvens. Dette er mulig ved å benytte gjennomsiktige lokk for å detektere økning i målt fluorescens-intensitet av fluorescerende reporter molekyl (fluorofor) (19). Agens påvises altså direkte uten påfølgende gelelektroforese, som konvensjonell PCR krever, og real-time PCR er dermed hensiktsmessig siden det er en ressurs sparende og mindre tidkrevende analyse. Real-time PCR minsker i tillegg kontaminasjonsfaren, ettersom det ikke krever videre påvisning av PCR-produkter i etterkant av analysen (16).

Ved analysering med Real-time PCR, genereres det Ct-verdier, som er antall sykluser som må til for at fluorescens fra PCR-amplifikasjon er høyere enn bakgrunnsfluorescens. Dette er en verdi som kan benyttes til å semi-kvantitere mengde DNA eller RNA i prøven, ettersom Ct-verdier er omvendt proporsjonal med mengde målsekvens som blir amplifisert (19).

Real-time PCR kan også benyttes som en multipleks-PCR for å detektere flere ulike agens i samme prøvebrønn. Dette er mulig ved å benytte flere par med primere og probe, hvor probe er merket med ulikt fluorescerende fargestoff ved reporter, altså fluorofor. Ved å benytte ulik fluorofor, kan resultatet for aktuell målsekvens detekteres ved at reporter emitterer ulikt fluorescerende lys (19).

Analysen som benyttes i dette prosjektet er en two-step Real-time PCR, som betyr at annealing og DNA-syntese foregår i ett trinn ved samme temperatur. Dette kan gjøres ettersom begge disse trinnene foregår i omtrent samme temperaturområde på 50-70°C. Fordelen med dette er at det tillater en mindre streng annealingtemperatur, som er hensiktsmessig ved korte amplifiseringsprodukt (11).

1.4.6 Optimalisering av PCR

For at en PCR-analyse skal være mest mulig effektiv, bør den optimaliseres. Optimalisering omhandler ulike aspekter som inkluderer reagenser, temperaturer for denaturering og annealing og konsentrasjon av primere og probe. Ved etablering av multipleks-PCR, bør hvert av primere- og probesettene optimaliseres hver for seg og deretter i kombinasjon med andre primere- og probesett. Årsaken til dette er at ulike primere- og probesett potensielt ikke fungerer optimalt ved samme betingelser, eller i kombinasjon med andre primere- og probesett. Det er også viktig å analysere både kontrollstammer og pasientprøver ved etablering av en PCR-analyse, for å kartlegge om det er problemer med spesifisitet eller kontaminering (17). I dette underkapittelet vil fokuset være rettet mot optimalisering av annealingtemperatur og konsentrasjon av primere og probe.

1.4.6.1 Optimalisering av annealingtemperaturer

Annealingtemperatur er viktig for å sikre en mest mulig spesifikk og sensitiv PCR. Generelt vil en høyere annealingtemperatur gi bedre spesifisitet, siden lavere annealingtemperatur kan føre til at primere binder andre gensekvenser og dermed føre til økt amplifikasjon av uspesifikke produkt. For høy annealingtemperatur kan derimot gå utover analysens sensitivitet, hvor en mulig årsak kan være smeltetemperaturen (T_M) til primere. T_M er den temperaturen der halvparten av primere er bundet og halvparten er fritt, og færre primere vil binde seg til komplementær sekvens dersom annealingtemperaturen er høy i forhold til smeltetemperatur. Annealingtemperaturen er dermed en viktig faktor for analysen, og kan endres for å gi bedre resultat (16,17).

1.4.6.2 Optimalisering av konsentrasjon av primere og probe

Det kan være relevant å optimalisere konsentrasjonen av primere og probe i tilfeller der amplifikasjon av PCR-produkt ikke er optimal ved aktuell denaturerings- og annealingtemperatur. Primere kan binde seg uspesifikt om annealingtemperatur er høy i forhold til T_M , og ved å øke konsentrasjon av primere og probe blir mer primere tilgjengelig for å binde målsekvensen. For høy konsentrasjon av primere kan derimot føre til at det blir overflødige primere, som kan gi økt sannsynlighet for dannelse av artefakter, som primer-dimer og mispriming til andre gensekvenser enn målsekvens (17).

1.4.7 Kvalitetssikring av PCR

Effektivitet er et estimat på PCR-analysens amplifikasjonsevne ved ulike konsentrasjoner av agens, og er en viktig del i kvalitetssikring av PCR-analyser. Effektiviteten blir detektert ved å generere en standardkurve med logaritmen av analyserte fortynninger på x-aksen og tilhørende Ct-verdier på y-aksen. Slope-verdien til standardkurven kan videre benyttes til å beregne effektiviteten ved hjelp av følgende formel:

$$E = \left(10^{\frac{-1}{\text{Slope}}} - 1 \right) * 100$$

Effektivitet på 100% tilsvarer en slope-verdi på 3,33, som er et estimat på antall sykluser analysen benytter for å amplifisere tidoblet mengde produkt. For å utnytte kapasiteten til primere og probe maksimalt, er det derfor ønskelig at Ct-verdiene i en PCR-analyse skal øke med tilnærmet 3,33 per tifolds-fortynning (20). Ved avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital, er det ønskelig at effektivitet til en realtime-PCR ligger mellom 95-105% (16).

Sensitivitet og spesifisitet er også viktig i kvalitetssikring av PCR, for å sikre reelle prøvesvar. Sensitiviteten tilsvarer deteksjonsgrensen, og sier noe om analysens evne til å detektere lave konsentrasjoner av målsekvensen, og er dermed viktig for å unngå falsk negative prøvesvar. Spesifisitet blir vurdert ut fra primere og probes evne til å binde målsekvensen spesifikt, og er viktig for å unngå falske positive prøvesvar (19).

Gelelektroforese benyttes ved kvalitetssikring av en ny analyse for å undersøke renheten til PCR-produktet. Prinsippet for gelelektroforese er at negative DNA-fragmenter vandrer mot positiv pol gjennom porer i en gel, som separerer DNA-fragmentene fra hverandre basert på baseparstørrelse. På denne måten kan man undersøke om primerne har bundet seg uspesifikt og dannet uønskede fragmenter i endeproduktet (17).

1.5 Sangersekvensering

Sangersekvensering er en analyse som benyttes for å identifisere en genssekvens, ved å benytte et genspesifikt PCR-produkt. For å kunne benytte PCR-produktet i sekvensering må det renses for å fjerne kontaminerende DNA, ubundet primere, probe og nukleotider, enzymer og lignende som kan interferere i sekvensreaksjonen (17,19).

I selve sangersekvenseringen, er det nødvendig med fire ulike komponenter. Disse komponentene er PCR-produktet, en kort DNA-primer som er komplementær med templat-DNA, enzymet DNA-polymerase, og dNTPs. Det er også nødvendig med fluorescensmerkede dideoxynukleotider (ddNTPs), som mangler 3'-OH-grupper (19). Sangersekvenseringen starter med en denatureringsprosess ved 96°C. Deretter senkes temperaturen til omtrent 50°C, som gir primere mulighet til å binde komplementær templattråd. I neste trinn økes temperaturen til 60°C, slik at DNA-polymerase kan binde seg til primer og syntetisere ny DNA-tråd. Nukleotidene fungerer som byggesteiner i analysen, men analysen skiller ikke mellom dNTPs og ddNTPs. Ved binding av ddNTPs uten 3'-OH-gruppe, vil DNA-syntesen stoppe opp. Dermed dannes det sekvenseringsprodukt med mange DNA-fragmenter av ulik lengde. Etter ferdig sekvensering, renses produktene for å fjerne ubundet materiale (19,21).

Kapillærelektroforese utføres for å kunne plassere og identifisere nukleotidene i en gensekvens. Fragmentene migrerer mot positiv pol etter størrelse i kapillærelektroforesen, hvor de blir ført gjennom et laserlys. Hver type ddNTPs emitterer et lys med karakteristisk bølglengde. Disse bølglengdene blir detektert av et simulert gel-bilde, som blir konvertert til rådata. De ulike fragmentene har ulike lengder, og ettersom fragmentene leses av etter størrelse vil alle nukleotidene i sekvensen i teorien detekteres (19,21). Nukleotidsekvensen kan utledes fra rådataene ved hjelp av ulike programvarer, hvor det er mulig å redigere og tolke elektroferogrammene og oversette dem til en sammenstilt sekvens, altså konsesussekvens. Konsesussekvensen kan deretter eksporteres og benyttes i søk i egnede databaser (16).

1.6 Hensikt og problemstilling

C. jejuni og C. coli er kjent som en av de hyppigste årsakene til gastroenteritt på verdensbasis, og avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital sin rutine-PCR (Seegene Allplex Gastrointestinal panel Bacteria I, Bacteria II, Virus og parasite) påviser kun disse to Campylobacter-artene. Det er likevel en betydelig andel av prøvene fra pasienter med diareesykdom hvor det ikke detekteres tarmpatogene agens med avdelingens rutine-PCR, hverken de to nevnte Campylobacter-artene, eller andre vanlig forekommende tarmpatogene bakterier, virus eller parasitter. På grunnlag av dette ble det etablert en supplerende multipleks-PCR for å finne ut:

1. Om det detekteres DNA fra *Campylobacter species* i flere avføringsprøver fra pasienter med gastroenteritt med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* med målsekvensen 16s rRNA, sammenlignet med avdelingens rutine-PCR for *C. jejuni* og *C. coli*.
2. Hvilke *Campylobacter species* andre enn *C. jejuni* og *C. coli* finnes i avføringsprøver fra pasienter med diare i Midt-Norge, og hvor stor andel av disse er klassifisert som tarmpatogene?

2.0 Materiale og metode

I dette kapitlet er benyttet materiale og gjennomførelse av etableringen og optimaliseringen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* beskrevet.

2.1 Materiale benyttet ved etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Materialet som ble benyttet i etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* er primere og prober, kontrollstammer og pasientprøver, som er presentert i dette underkapitlet.

2.1.1 Primere og prober

Primere og prober med målsekvens 16s rRNA for *C. fetus* og *C. species*, syntetisert av TIB Molbiol, ble benyttet til etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Primere- og probesettet for *C. species* er spesifikk for de fleste *C. species*, inkludert *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. coli* og *C. jejuni*. Det ble derimot benyttet et eget primere- og probesett spesifikk for *C. fetus*, ettersom 16s rRNA-sekvensen for *C. fetus* avviker fra andre *C. species*. Bakgrunnen for valg av primere- og probesett, som er oppgitt i Tabell 1, var tidligere studier av *C. species* i avføringsprøver fra pasienter med gastroenteritt.

Tabell 1: Primere- og probesett for *C. species* og *C. fetus* syntetisert av TIB MOLBIOL, som ble benyttet i etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

	Primere/ Probe	Målsekvens	Gensekvens	Hentet fra artikkel	Baseparstørrelse av PCR-produkt
C. species- PCR	Forward primer	16s rRNA	CGTGCTACAATGGCAT ATACAATGA	(1) tilpasset fra (2)	113 basepar
	Revers primer	16s rRNA	CGATTCCGGCTTCATGC TC		
	Probe	16s rRNA	6FAM- CAGAGAACAATCCGAA CTG-MGBNFQ		
C. fetus- PCR	Forward primer	16s rRNA	GCACCTGTCTCAACTTT C	(3)	77 basepar
	Revers primer	16s rRNA	CCTTACCTGGGCTTGAT		
	Probe	16s rRNA	VIC- ATCTCTAAGAGATTAGT TG-MGBNFQ		

Reporter-fluoroforene benyttet i dette prosjektet var FAM (~518 nm) for *C. species*, og VIC (~550 nm) for *C. fetus*.

2.1.2 Kontrollstammer

Kontrollstammene, oppgitt i Tabell 2, ble benyttet i etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Disse ble isolert og identifisert av Culture Collection University of Gothenborg (CCUG) og American Type Culture Collection (ATCC). Det ble også benyttet en ekstern kvalitetskontrollstamme fra UK NEQAS.

Tabell 2: Kontrollstammer benyttet i etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. upsaliensis*, isolert og identifisert av CCUG og ATCC, samt en ekstern kvalitetskontrollstamme fra UK NEQAS..

Bakterieart	Kontrollstamme
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	CCUG 14169
<i>C. upsaliensis</i>	CCUG 14913
<i>C. hyointestinalis</i>	CCUG 10373
<i>C. lari</i>	CCUG 19512
<i>C. coli</i>	UK NEQAS
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33252

For å lage eluat av kontrollstammene, ble kontrollstammene sådd ut på blodagar og inkubert i et mikroaerofilt miljø, med økt nivå av CO₂ (5-10%) og redusert nivå av O₂ (5-7%). Det mikroaerofile miljøet ble dannet ved hjelp av Whitley Jar Gassing System. *C. species*-stammene ble inkubert i 42°C, med unntak av *C. fetus* som ble inkubert i 35°C. Etter to døgn ble flere bakteriekolonier av kontrollstammene løst opp i glyserin og fysiologisk saltvann, hvor kontrollstammene i glyserin ble fryst til eventuell senere bruk. Stammene i fysiologisk saltvann ble varmelysert i 15 minutter i 95°C ved hjelp av instrumentet Thermomixer comfort (Eppendorf). DNA fra de varmelyserte kontrollstammene ble ekstrahert ved hjelp av instrumentet Nuclisens EasyMag (Biomerieux).

2.1.3 Spesifisitetspanel

Ved validering av nye PCR-analyser, har avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital HF satt sammen et spesifisitetspanel med kontrollstammene oppgitt i Tabell 3. Dette

spesifisitetspanelet ble benyttet for å undersøke spesifisiteten til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

Tabell 3: Kontrollstammer benyttet i spesifisitetspanel for å undersøke om multipleks-PCR er spesifikk for *C. species* og *C. fetus*.

Bakterieart	Kontrollstamme
Arcobacter baumannii	CCUG 19096
Bacteroides fragilis	CCUG 4856T
Burkholderia cepacia	CCUG 12691
Candida albicans	CCUG 19915
Hafnia alvei	ACC A2-60
Helicobacter pylori	ATCC 43504
Kluyvera georgiana	A2-36
Proteus mirabilis	ATCC 35659
Stenotrophomonas maltophilia	ATCC 13636
Vibrio cholerae	MBC 118
Campylobacter jejuni	ATCC 33252
Yersinia enterocolitica O3	CCUG 25567
Vibrio parahemolyticus	NEQAS 5227
Clostridium difficile toxin B	CCUG 4938
Aeromonas veronii	CCUG 27821 T
Salmonella enteritidis	CCUG 27021
EIEC	CCUG 46406
ETEC	CCUG 38079
EAEC	Vircell MBC 121
Hypervirulent Clostridium difficile	NEQAS 2442
Astrovirus	QCMD GastroV19-02
Norovirus GII	Vircell MBC 111
Adenovirus (41)	ATCC ad1/TMG Vircell MBC114
Sapovirus	QCMD GastroV18-10
Norovirus GI	QCMD GastroV18-04
Rotavirus	Rotarix vaksine

Giardia lamblia	Vircell MBC119
Entamoeba histolytica	Entam. ATCC 30459D
Cryptosporidium spp.	Vircell MBC 126
Enterococcus faecalis	CCUG 9997/34289/25188
Staphylococcus aureus	CCUG 15915/17621
Streptococcus pyogenes	CCUG 33061
Streptococcus agalatae	CCUG 29780
Streptococcus anginosus	CCUG 28200/27298T
Streptococcus equi	ATCC 700400
Streptococcus pneumoniae	CCUG 33638
Escherchia coli	CCUG 17620/30600
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603
Pseudomonas aeruginosa	CCUG 17619
Haemophilus influenzae	CCUG 29539

2.1.4 Pasientprøver

For å kunne undersøke pasientprøver, ble prosjektet godkjent av den regionale komiteen for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Alle pasientprøvene benyttet i dette prosjektet ble anonymisert av hensyn til personvern.

Det ble også benyttet ti pasientprøver med positivt resultat på rutine-PCR Allplex GI assay (Seegene). Kjente positive pasientprøver ble benyttet for å sammenligne multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* med Allplex GI assay (Seegene). Ct-verdier fra Allplex GI assay (Seegene), sammen med påvisning ved bakteriologisk dyrkning, er oppgitt i Tabell 4.

Tabell 4: Kjente positive pasientprøver analysert med Allplex GI assay (Seegene) som ble benyttet for å sammenligne avdelingens rutine-PCR (Seegene) og multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

Pasientprøve-ID	Ct-verdi fra Allplex GI assay (Seegene)	Påvisning ved bakteriologisk dyrkning
P-01	25,54	<i>C. coli</i> eller <i>C. jejuni</i>
P-02	23,91	<i>C. coli</i> eller <i>C. jejuni</i>
P-03	26,14	<i>C. coli</i> eller <i>C. jejuni</i>

P-04	24,60	C. coli eller C. jejuni
P-05	19,56	C. coli eller C. jejuni
P-06	28,16	C. coli eller C. jejuni
P-07	26,13	C. coli eller C. jejuni
P-08	37,61	C. upsaliensis
P-09	26,89	C. coli eller C. jejuni
P-10	21,00	C. coli eller C. jejuni

826 avføringsprøver ble benyttet for å undersøke forekomsten av andre C. species enn C. coli og C. jejuni hos pasienter med diaré. Avføringsprøvene var hentet fra pasienter i Helse Midt-Norge i perioden april-oktober 2021, som hadde negativt prøveresultat på avdelingens rutine-PCR Allplex GI assay (Seegene).

2.2 Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for C. species og C. fetus

I dette forsøket ble det undersøkt om primere og prober i Tabell 1 binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA i C. fetus-PCR og C. species-PCR. Det ble benyttet 1:10-fortynning av eluatene av kontrollstammene, oppgitt i Tabell 2. Eluatene ble analysert på CFX96 Real-Time System (CFX96) med programmet «Perfecta Two-step TM60».

Ved oppsettet av analysen ble det tillagd PCR-miks for C. species-PCR og C. fetus-PCR ved å benytte respektive primere og prober oppgitt i Tabell 1. For å lage miksene ble mastermiksen Custom Multiplex PCR supermix UNG (Quantabio), samt Molecular Grade Water (MGW) benyttet. Bruksskonsentrasjonene av primere og probe til C. species-PCR-miks og C. fetus-PCR-miks er oppgitt i Tabell 5.

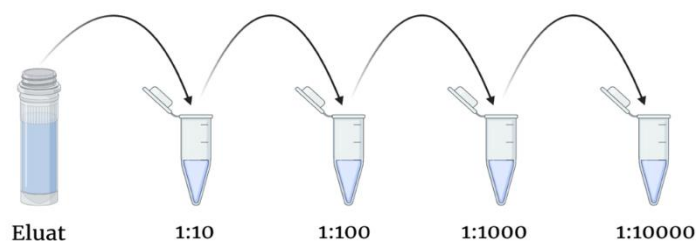
Tabell 5: Bruksskonsentrasjon av primere og probe for tillaging av PCR-miks til analysering av C. species- PCR og C. fetus-PCR.

Innhold	Bruksskonsentrasjon (nM)
Primer F	300
Primer R	300
Probe	200

2.3 Optimalisering av annealingtemperatur for *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR

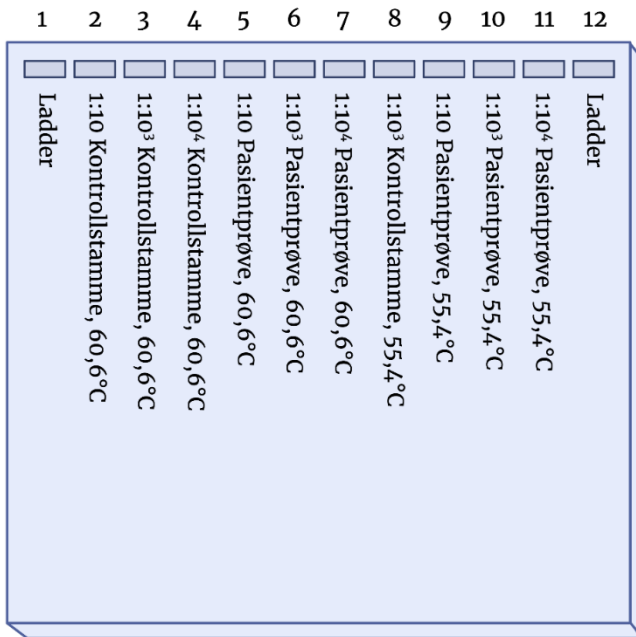
For å finne optimal annealingtemperatur for *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR ble det benyttet en tifolds-fortynningsrekke av kontrollstammer og kjente positive pasientprøver, med fortynningene 1:10, 1:10³ og 1:10⁴. For *C. species*-PCR ble fortynningene av kontrollstammen *C. upsaliensis*, oppgitt i Tabell 2, og kjent positiv pasientprøve for *C. jejuni* analysert med annealinggradient fra 55-65°C. For *C. fetus*-PCR ble fortynninger av kontrollstammen *C. fetus*, oppgitt i Tabell 2, og kjent positiv pasientprøve for *C. fetus* analysert med samme annealinggradient. Pasientprøvene ble analysert for å undersøke om primere og probe for *C. species* og *C. fetus* binder seg uspesifikt til komponenter som er til stede i en pasientprøve.

Analysene ble utført ved å benytte brukskonsentrasjon av primere og probe oppgitt i Tabell 5. Tifolds-fortynningsrekken ble utført slik Figur 4 illustrerer. En parallell av hver fortynning av kontrollstammene og pasientprøvene ble analysert på CFX96 med et egendefinert gradient-PCR program med annealingtemperaturene 55,4°C, 57,7°C, 60,6°C, 63,0°C og 65,0°C.



Figur 4: Oppsett av en tifolds-fortynningsrekke for å oppnå konsentrasjonsgradient med ti ganger mindre produkt per fortynning. Figuren ble laget med BioRender.com

For å bekrefte at primere og probe ble spesifikt bundet ved aktuelle annealingtemperaturer for *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR, ble baseparstørrelse av PCR-produktene fra annealingtemperatur 60,6°C og 55,4°C undersøkt ved gelelektroforese. Forventet baseparstørrelse er 113 basepar for *C. species*, og 77 basepar for *C. fetus*. Oversikt over hvilke fortynninger og annealingtemperatur for PCR-produkt som ble analysert med gelelektroforese, er illustrert i Figur 5.



Figur 5: Oppsett av gelelektroforese for undersøkelse av baseparstørrelse for PCR-produkt av *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR. Figuren inkluderer fortyndinger og annealingtemperatur for PCR-produktene. Det ble laget ett oppsett for *C. fetus*-PCR og ett for *C. species*-PCR. Figuren ble laget med BioRender.com.

Gelelektroforesen ble utført ved å benytte E-gel (Invitrogen, Thermofisher). Ladder «Invitrogen 100bp DNA Ladder» (Thermofisher), ble benyttet for å identifisere baseparstørrelsen på PCR-produktene. Gelen ble plassert i elektroforesinstrument, og analysert i 30 minutter.

2.4 Optimalisering av primere- og probe-konsentrasjon for *C. fetus*-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C

For at *C. fetus*-PCR skal inkluderes i en multipleks-PCR med *C. species*-PCR, var det ønskelig å undersøke om andre konsentrasjoner av primere og probe for *C. fetus* førte til mer spesifikk binding til målsekvensen ved annealingtemperatur 60,0°C.

Seks ulike PCR-mikser med ulike konsentrasjoner av primere og probe for *C. fetus* ble tillaget. Bruksskonsentrasjonen av forward og revers primer, samt MGB-probe i de ulike miksene er oppgitt i Tabell 6.

Tabell 6: Brukskonsentrasjon av primere og probe for *C. fetus* i seks ulike PCR-mikser. Miksene ble benyttet i optimaliseringen av primere- og probekonsentrasjon for *C. fetus*-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C.

	Forward primer (nM)	Revers primer (nM)	Probe (nM)
1	300	300	200
2	400	400	200
3	500	500	200
4	300	300	250
5	400	400	250
6	500	500	250

Det ble analysert tre paralleller av kontrollstammen *C. fetus*, oppgitt i Tabell 2, med fortynningene 1:10³ og 1:10⁴ for hver PCR-miks. Disse ble analysert på CFX96 med PCR-programmet «Perfecta Two-step TM60».

2.5 Undersøkelse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* med optimalisert konsentrasjon av primere og probe for *C. fetus*

Etter økt primere- og probe-konsentrasjon i *C. fetus*-PCR, ble 1:10³-fortynning av alle kontrollstammene i Tabell 2 analysert med *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR, for å sammenligne Ct-verdiene opp mot en multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Samme fortynninger av alle kontrollstammene ble analysert under samme betingelser med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Programmet som ble benyttet var «Perfecta Two-step TM60» på CFX96.

Brukskonsentrasjon av primere og prober benyttet i multipleks PCR-miks er oppgitt i Tabell 7, hvor samme konsentrasjon av respektive primere og probe ble benyttet for *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR.

Tabell 7: Brukskonsentrasjon av primere og probe i PCR-miks for å analysere *C. fetus*-PCR, *C. species*-PCR og multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

Multipleks-PCR	Brukskonsentrasjon (nM)

C. species-PCR	Forward primer	300
	Revers primer	300
	Probe	200
C. fetus-PCR	Forward primer	500
	Revers primer	500
	Probe	250

2.6 Effektivitetsanalyse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Effektiviteten til multipleks-PCR ble undersøkt ved å analysere en tifolds-fortynningsrekke fra 1:10-1:10⁸, av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus*, oppgitt i Tabell 2, med annealingtemperatur 60,0°C. For å undersøke om analysen ga best effektivitet ved 60,0°C, ble resultatene sammenlignet med samme fortynningsrekke analysert med annealingtemperatur 55,0°C.

Fortynningsrekkene av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus* ble analysert i tre paralleller på CFX96 med programmene «Perfecta Two-step TM60» og «Perfecta Two-step TM55».

2.7 Spesifisitetsanalyse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Spesifisiteten til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ble undersøkt ved å analysere spesifisitetspanel oppgitt i Tabell 3. Dette ble utført for å kontrollere at primere og prober binder spesifikt til målsekvens 16S rRNA i *C. fetus* og *C. species*, og ikke binder uspesifikt til andre bakterier.

De 40 bakteriestammene oppgitt i Tabell 3 ble analysert med 1:10-fortynning sammen med positiv kontroll for *C. species* og *C. fetus* på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60».

2.8 Bestemmelse av deteksjonsgrense for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ved bruk av to ulike metoder

Analyse av deteksjonsgrense ble utført for å undersøke hvor lave konsentrasjoner av *C. species* multipleks-PCR kan detektere. Det ble benyttet to ulike metoder for å bestemme deteksjonsgrensen til analysen, hvor den ene finner antall kolonier av bakterien som må være til stede for å få positivt resultat på multipleks-PCR. Den andre metoden finner antall kopier av målgenet som må være til stede for å få positivt resultat.

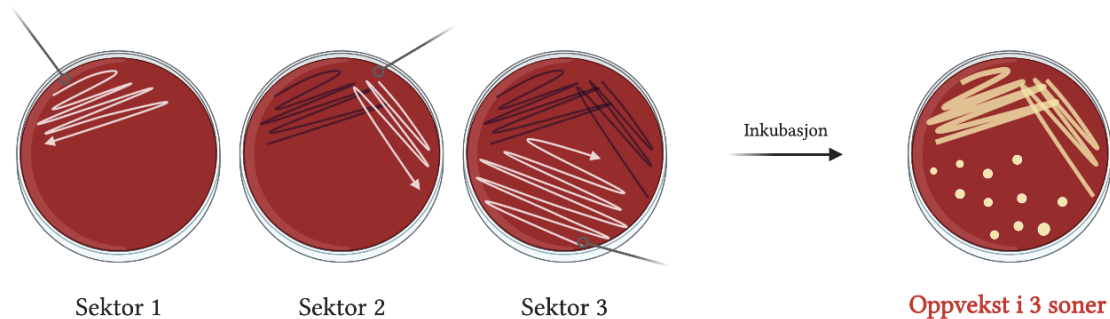
Disse metodene er videre forklart i underkapitlene «Bestemmelse av deteksjonsgrense med Colony Forming Units (CFU)» og «Bestemmelse av deteksjonsgrense med antall molekyler/PCR ».

2.8.1 Bestemmelse av deteksjonsgrense med Colony Forming Units (CFU)

Bestemmelse av deteksjonsgrense for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ble utført ved bakteriologisk dyrkning av kontrollstammene *C. fetus* og *C. upsaliensis*, oppgitt i Tabell 2, for å finne antall kolonier av *C. fetus* og *C. species* som må være til stede for at analysen skal få positivt resultat. Dette tilsvarer CFU, og ble funnet ved å analysere kontrollstammene *C. species* og *C. fetus* med konsentrasjonene $1,5 \cdot 10^5$ - $1,5 \cdot 10^1$ CFU/mL med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

For å oppnå disse konsentrasjonene, ble de frysede kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus* i Tabell 2 sådd ut på blodagar slik Figur 6 illustrerer. Agarene ble inkubert i mikroaerofilt miljø i to døgn. *C. upsaliensis* ble inkubert i 42°C, mens *C. fetus* ble inkubert i 35°C. For å oppnå en tetthet på 0,5 MacFarland (McF), ble oppveksten av bakteriekoloniene løst i fysiologisk saltvann, og tettheten av bakteriesuspensjonen ble målt med et densitometer (Biosan). 0,5 McF tilsvarer en konsentrasjon på $1,5 \cdot 10^8$ CFU/mL, som videre ble benyttet til å lage en tifolds-fortynningsrekke med konsentrasjoner fra $1,5 \cdot 10^8$ - $1,5 \cdot 10^1$ CFU/mL.

Utsåing i 3 sektorer

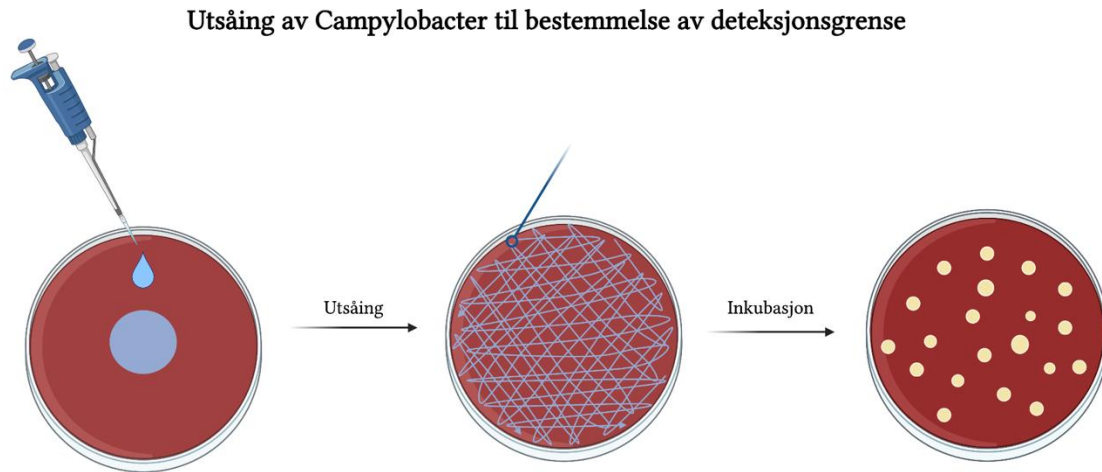


Figur 6: Utsåing av bakterier i 3 sektorer for å fjerne overflødig materiale. Bakterien sås først ut i sektor 1, deretter sektor 2 og til slutt sektor 3. Denne prosedyren benyttes ved St. Olav Hospital HF. Figuren ble laget med BioRender.com.

Bakteriesuspensjonene som ble benyttet for å bestemme CFU, ble også analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Det ble gjennomført ved å benytte bakteriesuspensjoner av *C. fetus* og *C. upsaliensis* med konsentrasjon $1,5 \cdot 10^5$ CFU/mL. Disse bakteriesuspensjonene ble varmelysert og ekstrahert med EasyMag (BioMerieux), før eluatene ble benyttet til å lage en tifolds-fortynningsrekke. Konsentrasjonene som ble analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* var mellom $1,5 \cdot 10^5$ - $1,5 \cdot 10^1$ CFU/mL. Det ble analysert tre paralleller av hver fortynning på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60». For å gi en nøyaktig konsentrasjon (CFU/mL) for deteksjonsgrensen, ble 20 paralleller av konsentrasjoner rundt deteksjonsgrensen analysert under samme betingelser.

For å bekrefte konsentrasjonen av bakteriesuspensjonene som ble analysert på multipleks-PCR, ble bakteriesuspensjonene av kontrollstammene *C. fetus* og *C. upsaliensis* med konsentrasjon $1,5 \cdot 10^3$ CFU/mL sådd ut på blodagar for å telle enkeltkolonier. 50 μ L av bakteriesuspensjonene ble sådd ut i 3 paralleller, i tillegg til 3 paralleller av 30 μ L. Utsåingsteknikken som ble benyttet er illustrert i Figur 7, og baserte seg på å spre suspensjonen mest mulig utover agaren for å fremme oppvekst av enkeltkolonier. Hensikten med dette var å telle antall enkeltkolonier for å kvantitere bakterieoppveksten. Agarene ble

inkubert, og etter to døgn ble oppveksten vurdert. Forventet oppvekst er 75 bakteriekolonier på blodagar med 50 μL av suspensjonene, og 50 bakteriekolonier på blodagar med 30 μL .



*Figur 7: Illustrasjon av utsåingsteknikk benyttet til kontroll av deteksjonsgrense. 30 og 50 μL bakteriesuspensjon av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus* med konsentrasjon $1,5 \cdot 10^3 \text{CFU/mL}$ ble avsatt på blodagar. Suspensjonen ble videre sådd ut i alle retninger på blodagaren for å spre materialet mest mulig. Hensikten med dette var å oppnå enkeltkolonier for kvantitering av bakterieoppveksten. Blodagarene ble inkubert i mikroaerofil atmosfære over 2 døgn i 35°C (*C. fetus*) og 42°C (*C. upsaliensis*).*

2.8.2 Bestemmelse av deteksjonsgrense med antall molekyler/PCR

Deteksjonsgrense kan også bestemmes ved å finne antall DNA-molekyler med målgenet 16S rRNA som må være til stede for å få positivt resultat på multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Ved å benytte et Nanodrop spektrofotometer, er det mulig å kvantitere mengde nukleinsyrer i ett eluat. Denne konsentrasjonen kan videre benyttes til å beregne antall molekyler/PCR i siste positive fortykning av eluat i multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

NanoDrop spektrofotometer (Thermofisher) ble nullstilt ved å benytte elueringsbuffer som blank. Eluat av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus*, oppgitt i Tabell 2, ble analysert i tre paralleller ved 260 nm. Instrumentet kvantiterte konsentrasjon av nukleinsyrer i eluatet ved å benytte Beers lov, samt to ulike ratioer som sier noe om nukleinsyrerenheten. Renheten måles primært ved ratioen 260/280 nm, samt en sekundærratio ved 260/230 nm.

For å kunne beregne deteksjonsgrensen, er det nødvendig med kunnskap om størrelsen på genomet for *C. fetus* og *C. upsaliensis*, som er oppgitt i Tabell 8.

Tabell 8: Størrelse på genomet i antall basepar for *C. fetus* og *C. upsaliensis* hentet fra National Library of Medicine, National Center for Biotechnology information (NCBI). Verdiene benyttes for å beregne deteksjonsgrense for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

	Størrelse på genomet (antall basepar)
C. fetus	1,77*10 ⁶ (23)
C. upsaliensis	1,63*10 ⁶ (24)

Det er også nødvendig med informasjon om antall kopier av målgenet, molekylvekt, volum av eluat, Avogadros tall og fortytning ved siste positive svar for *C. fetus* og *C. upsaliensis* i multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Fortyntingen for siste positive resultat ble hentet fra «Effektivitetsanalyse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*», ettersom dette var den eneste fortyntingsrekken som ble analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* av eluatet. Denne informasjonen er oppgitt i Tabell 9 **Feil! Fant ikke referanseilden.**, og ble benyttet for å beregne deteksjonsgrensen til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

Tabell 9: Tallverdier for antall kopier av målgenet 16S rRNA, gjennomsnittlig molekylvekt per basepar, mengde eluat, Avogadros tall og fortytning ved siste positive resultat i multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* som ble benyttet til beregning av deteksjonsgrense.

	Tallverdi
Antall kopier av målgenet 16S rRNA	3
Gjennomsnittlig molekylvekt per basepar	660 pg/pmol
Volum av eluat benyttet i PCR-reaksjonen	5 µL
Avogadros tall (NA)	6,0221415*10 ²³ mol ⁻¹
Fortyning ved siste positive resultat i multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. upsaliensis</i>	1:10 ⁷

2.9 Analysering av pasientprøver

10 kjente positive pasientprøver for *C. coli* og *C. jejuni*, tidligere analysert med Allplex GI assay, ble analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* for å undersøke om sensitiviteten og spesifisiteten er lik for de to analysene.

826 pasientprøver ble også analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Dette er pasientprøver med negativt resultat på avdelingens rutine-PCR Allplex GI assay (Seegene) for avføringsprøver. Prøvene ble analysert for å undersøke om andre *C. species* enn *C. coli* og *C. jejuni* kunne være årsak til gastroenteritt. Alle pasientprøvene ble analysert på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60».

2.10 Sangersekvensering av positive pasientprøver

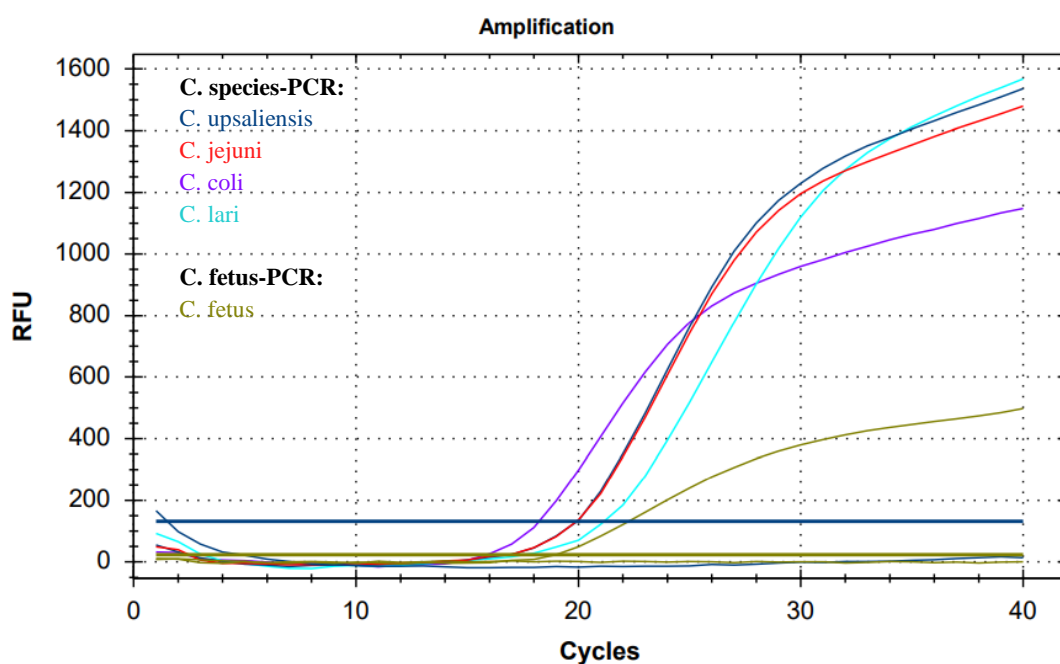
Ved å benytte sangersekvensering, kan *C. species* som er detektert i pasientprøver ved analysering med multipleks-PCR for *C. species* og *C. fetus* identifiseres. I dette prosjektet ble gjennomføring og optimalisering av sangersekvensering utført av faglig veileder ved avdeling for medisinsk mikrobiologi, hvor resultatene ble tilsendt i etterkant av optimalisering.

3.0 Resultater

I dette kapitlet er resultater fra de ulike analysene som ble utført i etableringen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* gjengitt. Dette innebærer hensikten for analysene, hvordan de ble utført og hva som ble funnet.

3.1 Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for *C. fetus* og *C. species*

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA i alle kontrollstammer oppgitt i Tabell 2, analysert med *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR. Kontrollstammene ble analysert med 1:10-fortynning på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60». Reaksjonskurvene generert av instrumentet ble vurdert, hvor det er ønskelig at kurvene har bratt stigning, og er mest mulig sigmoid. Kurvene for kontrollstammene er illustrert i Figur 8.



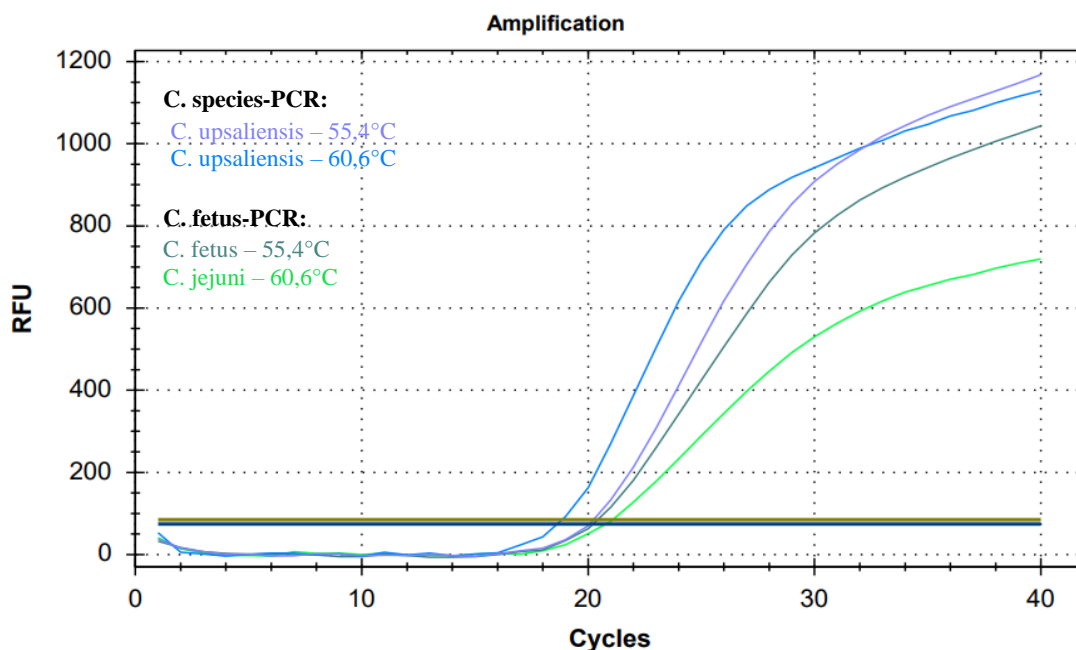
Figur 8: Reaksjonskurve for kontrollstammene *C. coli*, *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. lari* og *C. fetus*, analysert med *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR, hvor primere og prober for *C. species* og *C. fetus* binder målsekvensen 16S rRNA og detekterer kontrollstammene.

Reaksjonskurvene viser at primere og prober binder målsekvensen i kontrollstammene og kan detektere ønskede bakteriestammer med 16S rRNA som målsekvens. Kurvene for *C. species*

viser bratt stigning, mens kurven for *C. fetus* er slakere, som kan komme av at primere og probe binder seg uspesifikt i *C. fetus*-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C. Dermed indikerer resultatene fra denne analysen at primere og prober for *C. fetus* og *C. species* kan benyttes videre i etableringen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

3.2 Optimalisering av annealingtemperatur for *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR

Optimalisering av annealingtemperatur ble utført for å undersøke i hvilken grad primere og prober for *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR ble bundet spesifikt ved ulike annealingtemperaturer. Dette ble undersøkt ved å benytte fortynningene 1:10, 1:10³ og 1:10⁴ av kontrollstammen *C. fetus* og kjent positiv pasientprøve for *C. fetus* på *C. fetus*-PCR, og kontrollstammen *C. upsaliensis* og kjent positiv pasientprøve for *C. jejuni* på *C. species*-PCR. Det ble benyttet en annealinggradient fra 55-65°C for *C. fetus*- og *C. species*-PCR analysert på CFX96. Reaksjonskurvene for 1:10-fortynningen av kontrollstammene *C. fetus* og *C. upsaliensis*, analysert ved annealingtemperatur 60,6°C og 55,4°C, er illustrert i Figur 9.

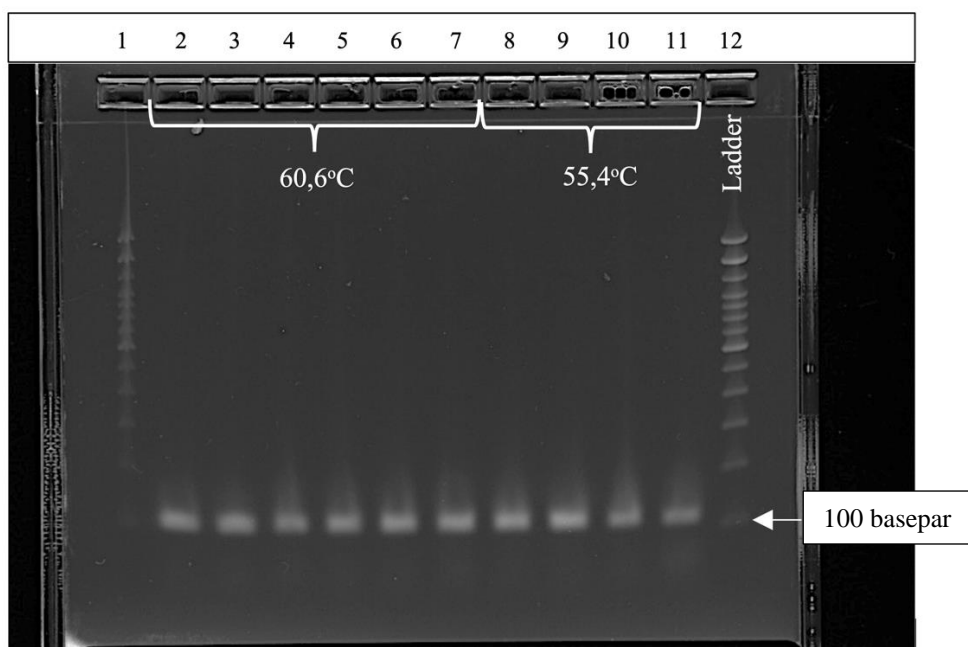


Figur 9: Reaksjonskurver fra optimalisering av annealingtemperatur for *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR analysert ved annealingtemperaturene 60,6°C og 55,4°C.

Reaksjonskurvene for *C. species*-PCR viste at annealingtemperatur 60,6°C ga brattest stigning, mens for *C. fetus*-PCR viste kurvene brattest stigning ved 55,4°C. Dette indikerer at

primere og probe har mer spesifikk binding til målsekvens ved 60,6°C for *C. species*-PCR og ved 55,4°C for *C. fetus*-PCR.

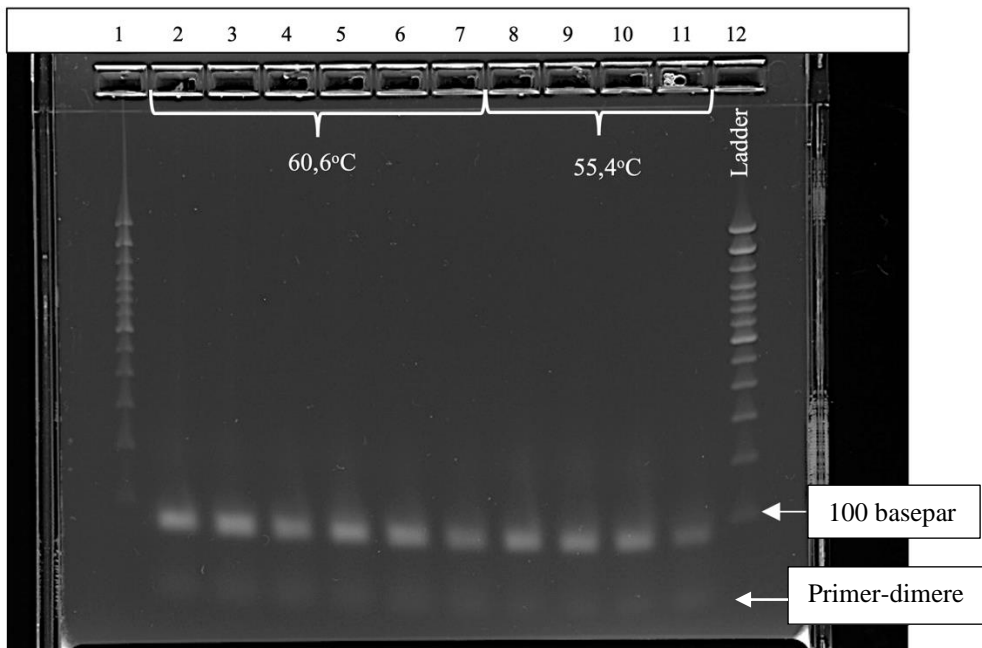
For å kontrollere om primere og prober ble spesifikt bundet til målsekvens ved annealingtemperatur 55,4°C og 60,6°C, ble baseparstørrelse av PCR-produkt undersøkt ved hjelp av gelelektroforese. PCR-produktene som ble undersøkt var kontrollstammer og pasientprøver med ulik fortynning fra *C. species*-PCR og *C. fetus*-PCR, analysert ved de to aktuelle annealingtemperaturene. Oppsettet av gelelektroforese for de to analysene er illustrert i Figur 5. Resultatene av gelelektroforese av *C. species* PCR-produkt er vist i Figur 10, og av *C. fetus* PCR-produkt i Figur 11.



Figur 10: Gelelektroforese av PCR-produkt for *C. species* kontrollstamme og kjent positiv pasientprøve, ved annealingtemperatur 60,6°C og 55,4°C. PCR-produkt av kontrollstammen *C. upsaliensis* er i brønn 2, 3 og 4 fra analysen med annealingtemperatur 60,6°C, og i brønn 8 fra analysen med annealingtemperatur 55,4°C. PCR-produkt fra kjent positiv pasientprøve for *C. jejuni* er i brønn 5, 6 og 7 fra analysen med annealingtemperatur 60,6°C, og i brønn 9,10 og 11 analysert med annealingtemperatur 55,4°C.

Gelelektroforesen for *C. species* PCR-produkt viste tydelige bånd ved omtrent 100 basepar, hvor forventet baseparstørrelse for *C. species* PCR-produkt er 113 basepar. PCR-produkt fra pasientprøver og kontrollstammer, analysert med annealingtemperatur 55,4°C og 60,6°C, viste tilsvarende båndstørrelse, samt ingen bånd med andre baseparstørrelser. Dette indikerer

at primere og probe for *C. species* binder seg spesifikt til målsekvensen ved begge annealingtemperaturene.



Figur 11: Gelelektroforese av PCR-produkt for *C. fetus* kontrollstamme og kjent positiv pasientprøve, ved annealingtemperatur 60,6°C og 55,4°C. PCR-produkt av kontrollstammen *C. fetus* i brønn 2, 3 og 4 fra analysen med annealingtemperatur 60,6°C, og i brønn 8 fra analysen med annealingtemperatur 55,4°C. PCR-produkt fra kjent positiv pasientprøve for *C. fetus* er i brønn 5, 6 og 7 fra analysen med annealingtemperatur 60,6°C, og i brønn 9,10 og 11 analysert med annealingtemperatur 55,4°C.

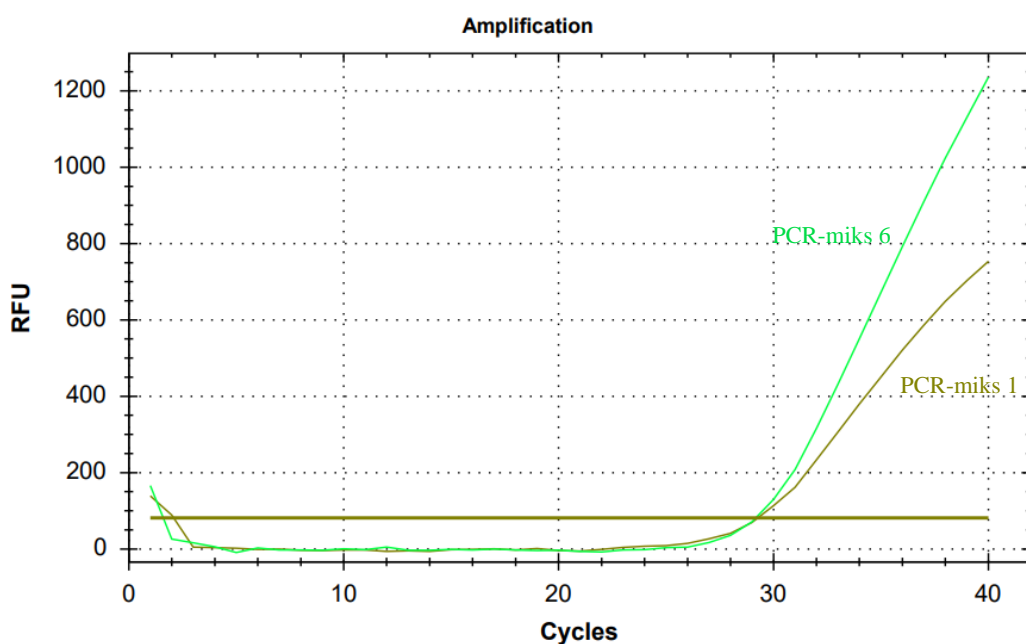
Gelelektroforesen for alle *C. fetus* PCR-produkt viste tydelige bånd ved omtrent 100 basepar, hvor forventet baseparstørrelse for *C. fetus* PCR-produkt er 77 basepar. Det ble også dannet en liten mengde primer-dimer, som observeres som svake bånd med en størrelse på under 100 basepar. Primer-dimere og PCR-produkt med forventet baseparstørrelse dannes i relativt lik grad ved annealingtemperatur 60,6°C og 55,4°C for både kontrollstammen og pasientprøven.

Primere og prober kan konkluderes med å binde målsekvensen spesifikt, ettersom det kun var sterke bånd ved forventet baseparstørrelse. Dannelse av primer-dimer for *C. fetus*-PCR antas å være av liten betydning for analysen, og siden det var primer-dimer i lik grad ved annealingtemperatur 55,4°C og 60,6°C, ble videre etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* utført ved annealingtemperatur 60,0°C.

3.3 Optimalisering av konsentrasjon av primere og probe for C. fetus-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C

For å etablere multipleks-PCR for C. fetus og C. species ved annealingtemperatur 60,0°C, må C. fetus-PCR optimaliseres. Dette ble gjennomført ved å analysere 1:10-fortynning av kontrollstammen C. fetus med ulike konsentrasjoner av primere og probe, for å undersøke om økt konsentrasjon førte til mer spesifikk binding av målsekvensen og bedre amplifikasjon.

Seks PCR-mikser for C. fetus-PCR med ulike konsentrasjoner av primere og probe, oppgitt i Tabell 6, ble benyttet for å analysere C. fetus kontrollstammen på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60». Reaksjonskurvene av kontrollstammen C. fetus, analysert med PCR-miks 1 og 6, vises i Figur 12.



Figur 12: Reaksjonskurve for C. fetus-PCR analysert med PCR-miks 1 og PCR-miks 6. Miksene inneholder ulike konsentrasjoner av primere og probe oppgitt i Tabell 6.

Reaksjonskurvene viste at PCR-miksen med høyest konsentrasjon av primere og probe, altså 500 nM primere og 250 nM probe, ga best resultat for C. fetus-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C. Det er denne kurven som har brattest stigning, og vil derfor gi best amplifikasjon for analysen. PCR-miks 6 benyttes dermed videre i etableringen av multipleks-PCR for C. fetus og C. species.

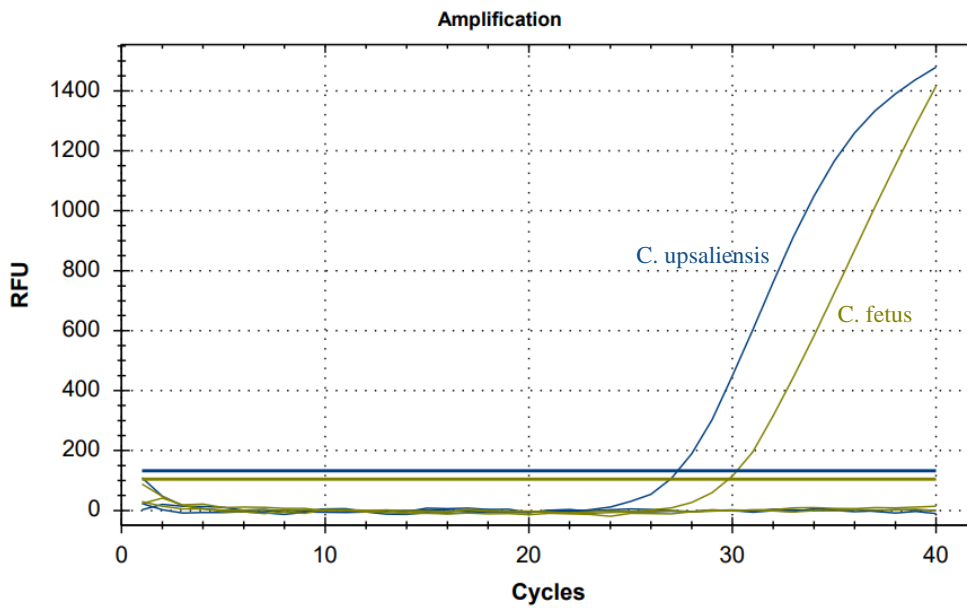
3.4 Undersøkelse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* med optimalisert konsentrasjon av primere og probe for *C. fetus*

Etter økning i konsentrasjon av primere og probe for *C. fetus*-PCR, ble 1:10-fortynning av alle kontrollstammene oppgitt i Tabell 2, analysert med *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60». Samme kontrollstammer ble analysert under samme betingelser med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, for å kunne sammenligne Ct-verdiene fra *C. fetus*- og *C. species*-PCR opp mot Ct-verdiene fra multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Tabell 10 viser Ct-verdiene fra multipleks-PCR, og *C. fetus*- og *C. species*-PCR, samt differansen mellom disse.

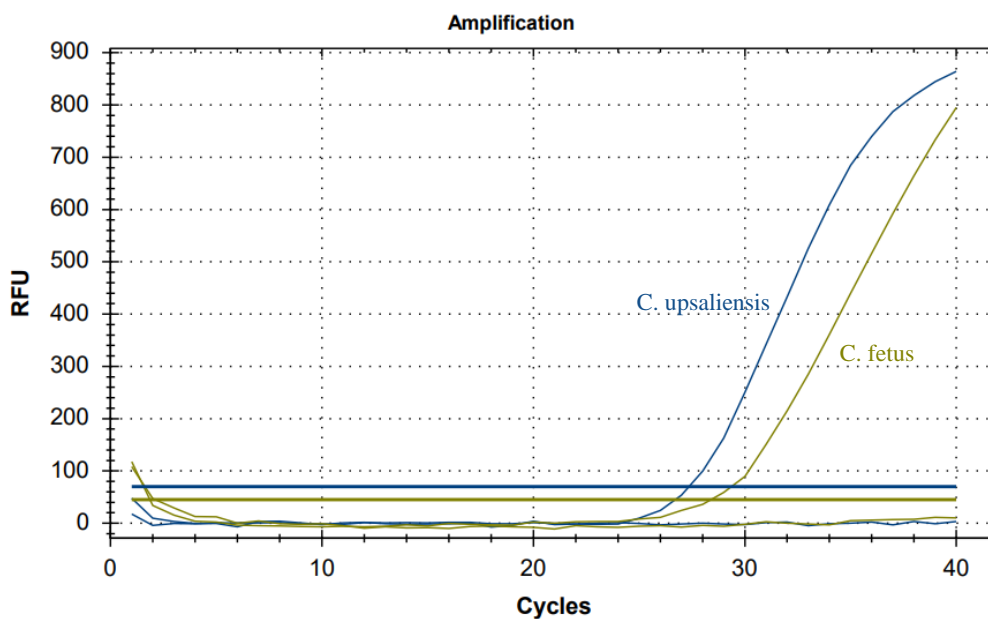
Tabell 10: Ct-verdier fra multipleks-PCR av kontrollstammer, og Singelplex *C. fetus*- og *C. species*- PCR av kontrollstammer.

Bakteriestamme	Ct-verdier			
	Multipleks-PCR	<i>C. species</i> -PCR	<i>C. fetus</i> -PCR	Differanse
<i>C. upsaliensis</i>	23,28	22,76	-	0,52
<i>C. hyointestinalis</i>	23,70	23,27	-	0,43
<i>C. lari</i>	27,34	27,37	-	0,03
<i>C. jejuni</i>	27,63	26,91	-	0,72
<i>C. coli</i>	24,41	23,92	-	0,49
<i>C. fetus</i>	29,54	-	28,69	0,85

Resultatene viste at differansen i Ct-verdier konsekvent var lavere enn 1 mellom multipleks-PCR og *C. fetus*- og *C. species*-PCR. Ved å vurdere reaksjonskurvene fra multipleks-PCR, vist i Figur 13, i forhold til *C. fetus*- og *C. species*-PCR, vist i Figur 14, ble det observert at kurvene var tilsvarende.



Figur 13: Reaksjonskurve for *C. upsaliensis* og *C. fetus* analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.



Figur 14: Reaksjonskurve for *C. upsaliensis* og *C. fetus* analysert med *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR-analyse.

Kurvene for alle analysene viser en bratt stigning, og dermed at primere og prober binder målsekvens i kontrollstammene spesifikt i lik grad ved multipleks-PCR som ved *C. fetus*- og *C. species*-PCR. Videre optimalisering ble utført på multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

3.5 Effektivitetsanalyse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Effektiviteten til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ble undersøkt ved å analysere en tifolds-fortynningsrekke av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus* med fortynningene 1:10-1:10⁸. Fortynningsrekken av kontrollstammene ble analysert med to program med annealingtemperatur 60,0°C og 55,0°C, for å bekrefte at 60,0°C gir bedre effektivitet og dermed er best egnet for multipleks-PCR. Programmene som ble benyttet var «Perfecta Two-step TM60» og «Perfecta Two-step TM55» på CFX96.

Det ble generert standardkurver av programvaren benyttet i CFX96, hvor det er ønsket at effektiviteten (E) skal ligge mellom 95-105%. Standardkurvene for *C. species* og *C. fetus* ved de aktuelle annealingtemperaturene er oppgitt i Vedlegg 4. Resultatene fra effektivitetsanalysen er oppsummert i Tabell 11, og viser at effektiviteten for både *C. species* og *C. fetus* var bedre ved 60,0°C. Multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* kan dermed gjennomføres ved 60,0°C.

Tabell 11: Oversikt over effektivitet og slope-verdi for *C. species* og *C. fetus* ved 60,0°C og 55,0°C som ble estimert ved å benytte standardkurver.

		Annealingtemperatur 60,0°C	Annealingtemperatur 55,0°C
C. species	Effektivitet (%)	98,8%	101,8%
	Slope	3,350	3,279
C. fetus	Effektivitet (%)	101,6%	104,3%
	Slope	3,284	3,222

3.6 Spesifisitetsanalyse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Det ble utført en spesifisitetsanalyse for å undersøke om primerne og probene binder seg spesifikt til *C. fetus* og *C. species*, eller om analysen også detekterer andre bakteriearter. Spesifisitetsanalysen ble utført ved å analysere spesifisitetspanelet, oppgitt i Tabell 3, sammen med positive kontroller for *C. fetus* og *C. species* med multipleks-PCR for *C. species* og *C. fetus* analysert på CFX96 med programmet «Perfecta two-step TM60».

Resultatene viste at kun positive kontroller ga positivt resultat på spesifisitetsanalysen, og det ble dermed konkludert med at multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* er spesifikk for *C. fetus* og *C. species*.

3.7 Bestemmelse av deteksjonsgrense for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* med to ulike metoder

Det ble benyttet to ulike metoder for å finne deteksjonsgrensen til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Resultatene fra de ulike metodene er presentert i underkapitlene «Bestemmelse av deteksjonsgrense med CFU» og «Bestemmelse av deteksjonsgrense med molekyler/PCR».

3.7.1 Bestemmelse av deteksjonsgrense med CFU

Deteksjonsgrensen til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ble bestemt ved å kvantitere antall bakteriekolonier av *C. fetus* eller *C. species* en prøve må inneholde for å bli detektert av analysen. Tre paralleller av konsentrasjonene $1,5 \cdot 10^1$ - $1,5 \cdot 10^5$ CFU/mL av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus*, oppgitt i Tabell 2, ble analysert med multipleks-PCR på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step TM60». Samme kontrollstammer ble sådd ut på blodagar med 50 μ L og 30 μ L av bakteriesuspensjonen med konsentrasjonen $1,5 \cdot 10^3$ CFU/mL for å oppnå enkeltkolonier.

Resultatene av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* viste at alle tre parallellene var positive ved konsentrasjonen $1,5 \cdot 10^2$ CFU/mL for *C. upsaliensis*, og $1,5 \cdot 10^3$ CFU/mL for *C. fetus*. For å bestemme konsentrasjonen ved deteksjonsgrensen for de to kontrollstammene, ble 20 paralleller av konsentrasjonene rundt deteksjonsgrensene analysert. Antall positive paralleller for de ulike konsentrasjonene med *C. upsaliensis* og *C. fetus* er oppgitt i Tabell 12.

Tabell 12: Antall positive paralleller av 20 analyserte paralleller med ulike konsentrasjoner av kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus*, for bestemmelse av deteksjonsgrense.

Kontrollstamme	Konsentrasjon (CFU/mL)	Antall positive paralleller av 20 paralleller
C. upsaliensis	$1,5 \cdot 10^2$	20
	$3,0 \cdot 10^1$	6
	$1,5 \cdot 10^1$	1

C. fetus	1,5*10 ³	20
	3,0*10 ²	14
	1,5*10 ²	5

Resultatene indikerer dermed at deteksjonsgrensen for *C. species* ligger mellom 1,5*10² og 3,0*10² CFU/mL, mens deteksjonsgrensen for *C. fetus* ligger ved 3,0*10³ CFU/mL.

Deteksjonsgrensen ble bestemt ved å telle kolonier fra utsåingen av suspensjonen med konsentrasjon 1,5*10³ CFU/mL. Det ble ikke noe oppvekst av hverken *C. upsaliensis* eller *C. fetus*, og resultatene måtte forkastes. Deteksjonsgrense kunne dermed ikke bestemmes med CFU.

3.7.2 Bestemmelse av deteksjonsgrense med molekyler/PCR

Deteksjonsgrense kan også bestemmes ved å finne antall kopier av målgenet som må være til stede for å få positivt resultat på multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Ved å benytte NanoDrop spektrofotometer, ble konsentrasjon av DNA i eluatene av kontrollstammene *C. fetus* og av *C. species*, oppgitt i Tabell 2, beregnet, samt to ratioer. Ratioene 260/280 og 260/230 angir renheten til eluatene som ble analysert, hvor 260/280 benyttes som primærmåling. Det er forventet å få en 260/280-ratio på over 1,8, og en 260/230-ratio mellom 1,8 og 2,2 for rent DNA. Resultatene for konsentrasjon beregnet av instrumentet, samt ratio, er oppgitt i Tabell 13.

Tabell 13: Resultater av eluat for *C. fetus* og *C. upsaliensis* analysert på NanoDrop spektrofotometer for bestemmelse av deteksjonsgrense.

	Konsentrasjon (ng/μL)	Gjennomsnitt kons (ng/μL)	Ratio (260/280)	Ratio (260/230)
C. fetus	15,01	15,71	2,55	0,79
	16,48		2,00	0,81
	15,65		1,99	0,79
C. upsaliensis	52,86	53,36	2,17	2,41
	54,38		2,08	2,41
	52,84		2,21	2,57

260/280-ratioen for både *C. fetus* og *C. upsaliensis* ligger over 1,8, noe som indikerer at eluatet inneholder rent DNA. Det ble dermed antatt at eluatet har få interfererende komponenter med absorbans ved 280 nm. 260/230-ratioen for begge kontrollstammene lå utenfor forventede verdier, som kan indikere tilstedeværelse av interferenter med absorbans ved 230 nm i eluatet, og dermed gi en usikkerhet til konsentrasjonen beregnet av instrumentet.

Middelverdien av konsentrasjonene for *C. fetus* og *C. upsaliensis* ble benyttet for å regne ut antall molekyler/PCR ved siste positive fortytning i multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Dette tilsvarer antall kopier av målgenet 16S rRNA som må være til stede for at analysen skal gi positivt resultat, altså deteksjonsgrensen. Utrekningen av deteksjonsgrense for *C. fetus* og *C. species* er oppgitt i Vedlegg 5. Deteksjonsgrensen ble bestemt til å være 1,3 molekyler/PCR for *C. fetus*, og 5,0 molekyler/PCR for *C. species*.

3.8 Analysering av ti kjente positive pasientprøver for *C. species* med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* for sammenligning mot Allplex GI assay (Seegene)

Ti pasientprøver med kjent campylobacteriose forårsaket av *C. jejuni* og *C. coli* ble analysert på multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Dette ble gjennomført for å undersøke riktigheten til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ved å sammenligne Ct-verdier fra avdeling for medisinsk mikrobiologi sin rutine-PCR Allplex GI assay (Seegene) og multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Ct-verdiene fra begge analysene for de ti kjente positive pasientprøvene er oppgitt i Tabell 14

Tabell 14: Ct-verdier for pasientprøver med kjent campylobacteriose, analysert med Allplex GI assay (seegene) og multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

Prøve-ID	Ct-verdi		Påvisning ved bakteriologisk dyrkning
	Allplex GI assay (Seegene)	Multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	
P-01	25,54	24,17	<i>C. coli</i> eller <i>C. jejuni</i>
P-02	23,91	22,43	<i>C. coli</i> eller <i>C. jejuni</i>
P-03	26,14	24,54	<i>C. coli</i> eller <i>C. jejuni</i>

P-04	24,60	22,97	C. coli eller C. jejuni
P-05	19,56	18,93	C. coli eller C. jejuni
P-06	28,16	26,05	C. coli eller C. jejuni
P-07	26,13	24,83	C. coli eller C. jejuni
P-08	37,61	24,70	C. upsaliensis
P-09	26,89	25,61	C. coli eller C. jejuni
P-10	21,00	20,21	C. coli eller C. jejuni

Resultatene av kjente positive pasientprøver viste at multipleks-PCR for C. fetus og C. species ga relativt like Ct-verdier som Allplex GI assay (Seegene), som indikerer at analysene har relativt lik sensitivitet ved deteksjon av C. coli og C. jejuni. Pasientprøve med prøve-ID P-08 var kjent positiv for C. upsaliensis, og fikk relativt lavere Ct-verdi for multipleks-PCR for C. fetus og C. species enn ved analysering med Allplex GI assay (Seegene). Dette indikerer at primere og prober benyttet i multipleks-PCR for C. fetus og C. species var mer spesifikke for andre C. species enn C. coli og C. jejuni enn Allplex GI assay (Seegene).

3.9 Analysering av pasientprøver med symptomer på gastroenteritt

826 avføringsprøver fra pasienter med diaré og negativt prøvesvar på avdelingens rutine-PCR Allplex GI Assay (Seegene) ble analysert med multipleks-PCR for C. species og C. fetus. Hensikten med å analysere pasientprøvene var å undersøke om andre C. species enn C. jejuni og C. coli kunne være årsaken til tarminfeksjon hos disse pasientene. Prøvene ble analysert med programmet «Perfecta Two-Step TM60» på CFX96.

79 av 826 pasientprøver fikk positivt resultat for C. species, men 73 av 79 pasientprøver fikk en høy Ct-verdi rundt deteksjonsgrensen. Pasientprøver med Ct-verdi over 35 omtales videre som positive pasientprøver med lav Ct-verdi.

3.9.1 Positive pasientprøver med høy Ct-verdi

En stor andel av de positive pasientprøvene hadde høy Ct-verdi, og dermed er det usikkert om resultatet er reelt eller forårsaket av uspesifikk binding av primere og probe. Ti tilfeldig utvalgte pasientprøver med høy Ct-verdi ble reanalysert med multipleks-PCR for C. fetus og

C. species, for å undersøke om resultatet var reproduserbart. Disse pasientprøvene er gjengitt i Tabell 15, med Ct-verdier fra første analysering og reanalysering.

Tabell 15: Ct-verdier for ti pasientprøver med svakt positivt resultat for multipleks-PCR for C. fetus og C. specie, reanalyisert med multipleks-PCR for C. fetus og C. species for å undersøke reproduserbarheten.

Prøve-ID	Ct-verdi	
	Første analysering	Reanalysering
01-96	38,25	N/A
02-42	36,53	N/A
03-67	36,82	39,61
04-40	38,20	N/A
04-57	39,25	N/A
05-20	37,16	38,00
06-41	38,27	38,65
06-62	38,35	N/A
08-02	36,29	36,52
09-15	37,90	38,55

Fem av de reanalyserte pasientprøvene med høy Ct-verdi hadde relativt lik Ct-verdi ved første analysering og reanalysering, som kan indikere at lave mengde C. species var til stede i disse pasientprøvene. Fire av de reanalyserte pasientprøvene fikk ikke Ct-verdi ved reanalysering, som kan komme av uspesifikk binding av primere og probe.

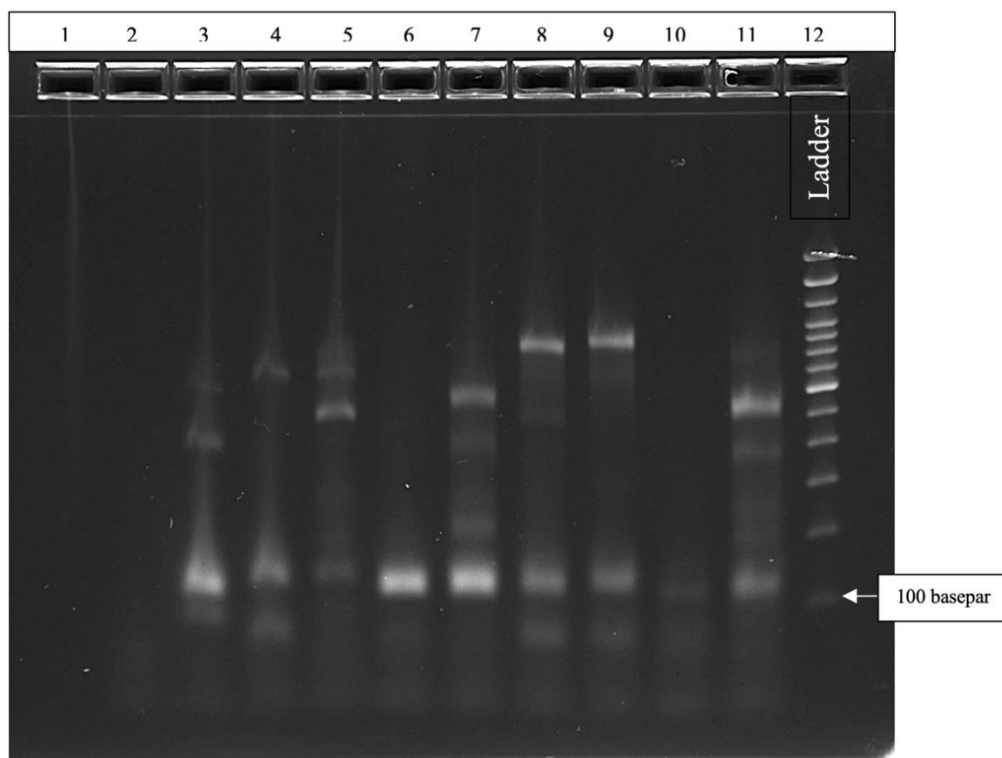
Videre ble PCR-produktet fra syv av 73 pasientprøver med høy Ct-verdi for C. species analysert ved gelelektroforese. Dette ble gjennomført for å undersøke om det positive prøvesvaret på PCR-analysen var reelt, eller skyldtes uspesifikk binding av primere og probe. Oversikt over hvilke PCR-produkt som er tilsatt i de ulike brønnene i gelen vises i Tabell 16, og resultatet fra gelelektroforesen vises i Figur 15.

Tabell 16: Oversikt over prøver med tilhørende Ct-verdier tilsatt de ulike brønnene i gelen

Brønn nummer	Prøve-ID	Ct-verdi
1	Ladder	-

2	Negativ kontroll	0,00
3	Positiv kontroll	27,40
4	04-04	38,95
5	04-05	N/A
6	04-10	34,20
7	04-12	35,33
8	04-36	38,00
9	04-40	38,20
10	04-50	39,73
11	04-57	39,27
12	Ladder	-

Pasientprøven med prøve-ID 04-05 hadde ingen Ct-verdi ved analysering med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, men ble analysert med gelelektroforese ved en feiltagelse.



Figur 15: Resultater fra gelelektroforese av PCR-produkt fra pasientprøver med høy Ct-verdi. Brønnene inneholder følgende: 1: Ladder, 2: Negativ kontroll, 3: Positiv kontroll, 4: Pasient 04-04, 5: Pasient 04-05, 6:

Pasient 04-10, 7: Pasient 04-12, 8: Pasient 04-36, 9: Pasient 04-40, 10: Pasient 04-50, 11: Pasient 04-57, 12: Ladder.

Gelelektroforesen viser at pasientprøvene med prøve-ID 04-10 og 04-12 hadde sterke bånd ved forventet baseparstørrelse for *C. species* ved 113 basepar, og ble videre analysert som sterke positive pasientprøver. De andre pasientprøvene med høy Ct-verdi som ble analysert med gelelektroforese viste enten svakt eller ingen bånd ved forventet baseparstørrelse, samt bånd ved andre baseparstørrelser, som kan indikere at den høye Ct-verdien kom av uspesifikk binding av primere og probe i multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Dette kan bekreftes ved at pasientprøvene med prøve-ID 04-40 og 04-57, som ikke viste sterkt bånd ved forventet baseparstørrelse i gelelektroforesen, ikke var reproducerbare ved reanalysering.

3.9.2 Positive pasientprøver med lav Ct-verdi

Fem av 79 pasientprøver fikk positivt resultat for *C. species* med en Ct-verdi under 35. Disse pasientprøvene, samt pasientprøve med prøve-ID 04-12, ble reanalysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* for å undersøke om Ct-verdiene var reelle. Resultatene fra begge analyseringene er oppgitt i Tabell 17.

Tabell 17: Ct-verdier fra første analysering og reanalyseing av pasientprøver med lav Ct-verdi for C. species i multipleks-PCR for C. fetus og C. species. Reanalysering ble gjennomført for å undersøke om Ct-verdier fra første analysering var reelle.

Prøve-ID	Ct-verdi	
	Analysering	Reanalysering
01-82	34,18	25,43
02-54	33,45	26,95
04-10	34,20	25,95
04-12	35,33	26,95
05-01	20,49	21,64
08-70	27,45	28,86

Ct-verdiene viser at differansen mellom første analysering og reanalysering er svært varierende, og dermed er det usikkert hvilke av Ct-verdiene som er reelle. Reanalysering burde ha blitt utført på nytt, men ble ikke gjort på grunn av tidsbegrensning for prosjektet. Videre

identifisering av pasientprøvene med lav Ct-verdi ble likevel gjennomført ved å benytte sangersekvensering.

3.10 Identifisering av positive pasientprøver med lav Ct-verdi ved sangersekvensering

Sterke positive pasientprøver med en Ct-verdi under 35 ble sangersekvensert av faglig veileder ved avdeling for medisinsk mikrobiologi for å identifisere bakteriestammene som ble detektert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Kontrollstammene *C. fetus* og *C. upsaliensis* ble også sangersekvensert for å undersøke om sekvenserings-primere ble bundet spesifikt til målsekvensen 16s rRNA. Resultatene fra sekvenseringen ble benyttet i søkeverktøyet Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Resultatene fra BLAST-søket av kontrollstammer er oppgitt i Tabell 18, og resultatene fra BLAST-søket av positive pasientprøver med lave Ct-verdier for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, er oppgitt i Tabell 19.

Tabell 18: Resultater av sangersekvensering for kontrollstammene *C. upsaliensis* og *C. fetus*.

Kontrollstamme	Resultat av sangersekvensering og BLAST-søk
C. upsaliensis	99,87% ID for <i>C. upsaliensis</i> / <i>C. vulpis</i>
C. fetus	99,73% ID for <i>C. fetus</i>

Sangersekvensering av kontrollstammen *C. fetus* fikk >99% identifikasjon for *C. fetus*, mens kontrollstammen *C. upsaliensis* fikk >99% identifikasjon for *C. upsaliensis* og *C. vulpis*. Det ble dermed antatt at sekvenserings-primere bandt seg spesifikt til målsekvensen, og kan benyttes til sekvensering av pasientprøvene.

Tabell 19: Resultater fra sangersekvensering av positive pasientprøver med lave Ct-verdier for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

Prøve-ID	Deteksjon ved multipleks-PCR for <i>C. fetus</i> og <i>C. species</i>	Resultat fra BLAST-søk
01-82	<i>C. species</i>	99,72% ID for <i>C. concisus</i>
02-54	<i>C. species</i>	99,58% ID for <i>C. concisus</i>
04-10	<i>C. species</i>	99,72% ID for <i>C. concisus</i>
04-12	<i>C. species</i>	97,97% ID <i>C. concisus</i>
05-01	<i>C. species</i>	100% ID Candidatus <i>Campylobacter infans</i> strain
08-70	<i>C. species</i>	Flere av toppene for nukleotidsekvensen i elektroferogrammet viste dobbelttopper, og dermed er det mange usikre basepar. ID ligger på omtrent 95% for en rekke <i>C. species</i>

For at bakteriestammen skal kunne identifiseres, må det være >99% identifikasjon for aktuell bakteriestamme. Dette tilsvarer at tre av seks positive pasientprøver med lav Ct-verdi kan identifiseres som *C. concisus* og én av seks kan identifiseres som Candidatus *Campylobacter infans* strain. To av resultatene fra sangersekvenseringen fikk <99% identifikasjon og bakteriestammene detektert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* kan dermed ikke identifiseres.

4.0 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en multipleks-PCR for *C. species* og *C. fetus* for å undersøke forekomsten av *C. species* hos pasienter med diaré. En viktig del i etablering av PCR-analyser til bruk i diagnostiske laboratorier er kvalitetssikring, for å sikre korrekte prøvesvar og derav kunne gi pasienter riktig diagnose og behandling. I dette kapittelet blir de viktigste resultatene fra etableringen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* oppsummert og diskutert.

4.1 Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for *C. fetus* og *C. species*

En viktig del av etablering av multipleks-PCR, er å undersøke om hvert primere- og probesett som skal benyttes i analysen binder seg til målsekvensen. Om primere- og probe ikke binder seg til målsekvensen, kan det bety at primere- og probesettene er uegnet, og baseparsammensetningen i disse bør endres. Primere og probe for både *C. fetus* og *C. species* bandt seg spesifikt til målsekvensen 16s rRNA, og kan dermed benyttes i etableringen av multipleks-PCR for påvisning av *C. fetus* og *C. species*.

4.2 Optimalisering av annealingtemperatur for *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR

Optimalisering av annealingtemperatur ble gjennomført for begge analysene ettersom det er en del av vanlig prosedyre å undersøke hvilken annealingtemperatur som fører til at primere og probe binder seg mest spesifikt. Analysen med annealingtemperatur-gradienten viste at *C. fetus*-PCR hadde mest spesifikk binding ved 55,4°C og *C. species*-PCR hadde mest spesifikk binding ved 60,6°C. En mulig årsak til at primere og probe for *C. fetus* ble bundet mer spesifikt til målsekvensen ved annealingtemperatur 55,4°C, kan være at *C. fetus* primere har lavere smeltetemperatur (T_M) enn primere for *C. species* (Vedlegg 1). T_M er den temperaturen der halvparten av primere er bundet og halvparten er fritt, og dersom annealingtemperaturen er for høy i forhold til T_M , vil mindre primere bindes, og mindre PCR-produkt av målsekvensen oppformes (16). For lav annealingtemperatur kan derimot føre til uspesifikk binding av primere og prober, som kan være årsaken til at primere og probe for *C. species* bandt seg mer spesifikt ved 60,6°C enn 55,4°C (11,17).

Gelelektroforese av kontrollstammene og pasientprøvene, analysert med annealingtemperatur-gradient, viste at det ble dannet tilnærmet ingen uspesifikke produkt for C. species-PCR. For C. fetus-PCR ble det dannet en liten mengde primer-dimere både ved annealingtemperatur 55,4°C og 60,6°C. Noe dannelse av primer-dimer kan forekomme i en PCR-analyse, men den svært lave mengden primer-dimere i PCR-produktene fra C. fetus-PCR blir antatt å være av ubetydelig grad (16,17).

4.3 Optimalisering av konsentrasjon av primere og probe for C. fetus-PCR ved annealingtemperatur 60,0°C

Økt konsentrasjon av primere og probe kan føre til mer spesifikk binding av målsekvens, ettersom det vil være flere primere og prober tilgjengelig som kan binde målsekvensen. Det er derimot viktig at konsentrasjonen av primere og probe ikke blir for høy i forhold til konsentrasjonen av agens, da det kan føre til økt dannelse av primer-dimere og mispriming. Optimaliseringen av konsentrasjon av primere og probe for C. fetus viste at økning i konsentrasjon av primere til 500nM, og probe til 250nM, ga bedre amplifikasjon ved annealingtemperatur 60,0°C. Det ble ikke utført gelelektroforese av PCR-produkt etter økningen av primere- og probe-konsentrasjon, og det kan dermed ikke avkreftes at endringen av konsentrasjonen for primere og probe ikke førte til økt dannelse av uspesifikke produkt. Reaksjonskurvene viste god amplifikasjon, og ikke antydning til økt dannelse av uspesifikke produkt ved optimalisert konsentrasjon av primere og probe for C. fetus. Det ble dermed konkludert med at optimalisert konsentrasjon av primere og probe for C. fetus kan benyttes i etableringen av multipleks-PCR for C. fetus og C. species med annealingtemperatur 60,0°C.

4.4 Undersøkelse av multipleks-PCR for C. fetus og C. species etter økning av konsentrasjon av primere og probe for C. fetus

Multipleks-PCR er gunstig ettersom det er ressurs- og tidsbesparende for avdelingen, samt gir pasienter raskere prøvesvar. Ved å benytte multipleks-PCR er det derimot en risiko for dårligere sensitivitet sammenlignet med PCR som kun benytter ett primere- og probesett. Årsaken til dette er at det kan bli større konkurranse om komponenter i en multipleks-PCR, og dermed økt dannelse av uspesifikke produkt. Sammenligning av Ct-verdiene fra C. fetus- og C. species-PCR opp mot Ct-verdier fra multipleks-PCR for C. fetus og C. species viste at resultatene var tilsvarende, som betyr at det ikke ble økt dannelse av uspesifikke produkt når

primere og prober for *C. fetus* og *C. species* ble benyttet i multipleks-PCR. Det ble dermed konkludert med at multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* kunne bli benyttet videre.

4.5 Effektivitetsanalyse for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Effektiviteten tilsvarer analysens evne til å amplifisere målsekvensen, og er dermed en viktig del av kvalitetssikringen for å sikre pålitelige prøvesvar til pasienter. Det er mange faktorer som kan påvirke effektiviteten til en PCR-analyse, hvor blant annet $E < 100\%$ kan indikere at baseparsammensetningen til primere eller prober har uoverensstemmelser med baseparsammensetningen til målsekvensen. $E > 100\%$ kan indikere interferens i prøver med høye konsentrasjoner, og at primere og probe har bundet seg uspesifikt. Feilkilder som menneskelige og tekniske feil kan også gi unøyaktige resultater, og kan gi E både over og under 100% (25).

Resultatene fra effektivitetsanalysen viste at det ikke var noen tendenser til disse feilkildene, da effektiviteten til multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* ved annealingtemperatur $60,0^{\circ}\text{C}$ var $98,8\%$ for *C. species* og $101,6\%$ for *C. fetus*. Resultatene viste også at analysen var mer effektiv ved $60,0^{\circ}\text{C}$ enn ved $55,0^{\circ}\text{C}$, som bekrefter at $60,0^{\circ}\text{C}$ er den mest optimale annealingtemperaturen for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Det ble dermed antatt at analysen har god amplifikasjon ved annealingtemperatur $60,0^{\circ}\text{C}$, og at analysen har lik troverdighet ved både lave og høye konsentrasjoner av agens.

4.6 Spesifisitetsanalyse for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

16S rRNA er en gensekvens som benyttes til å detektere mange ulike bakteriearter siden baseparsammensetningen av sekvensen er interspesifikk for ulike arter. Deler av 16S rRNA sekvensen kan likevel være delvis lik mellom arter, og det kan dermed være en risiko for uspesifikk binding av primere og probe til 16S rRNA i andre bakteriearter. Avføringsprøver inneholder store mengder normalflora, og det er dermed viktig å kontrollere at primere og probe binder seg spesifikt til 16S rRNA hos *C. species* og *C. fetus*. Ved analysing av pasientprøver er det spesielt viktig at primere og prober ikke binder uspesifikt, for å unngå å gi pasienter falske positive prøvesvar.

Spesifisitetsanalysen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* viste at primere og prober ble spesifikt bundet til målsekvensen 16s rRNA hos *C. fetus* og *C. species*, som betyr at analysen har god spesifisitet og dermed gir pålitelige prøvesvar.

4.7 Bestemmelse av deteksjonsgrense for *C. fetus* og *C. species*

Den infeksjose mengden av *C. species* kan være så lav som 500-800 CFU/mL (8), og det er derfor vesentlig for pasienter med campylobacteriose at multipleks-PCR for *C. species* og *C. fetus* kan detektere lave konsentrasjoner av bakteriene. For at deteksjonsgrensen skal være mest mulig nøyaktig, er det ønsket å vite hva deteksjonsgrensen er på molekylnivå (molekyler/PCR) og på bakterienivå (CFU/mL).

Deteksjonsgrenseanalysen som ble utført ved bestemmelse av CFU, ble forkastet ettersom det ikke ble noen oppvekst på noen av blodagarene for telling av enkeltkolonier. Sannsynlig årsak til at det ikke ble noen oppvekst av noen av kontrollstammene, er feilkilder ved utsåing. Bakteriesuspensjonene ble blandet med vortex, som kan ha vært for tøff behandling for *C. fetus* og *C. species*. Det ble heller ikke dyrket kontrollstammer med en høyere konsentrasjon enn $1,5 \cdot 10^3$ CFU/mL, og dermed er det usikkert hvor i analyserekken feilen oppsto. En annen mulig årsak er at bakteriesuspensjonen hadde for lav konsentrasjon til å oppnå bakterievekst, men dette er lite sannsynlig ettersom forventet oppvekst var 75 (50 μ L) og 50 (30 μ L) bakteriekolonier. Bestemmelse av deteksjonsgrense med CFU på multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, ga en indikasjon på at deteksjonsgrensen ligger på omtrent 300 CFU/ml for *C. fetus*, og mellom 30 og 150 CFU/ml for *C. species*, men dette ble ikke bekreftet ved telling av enkeltkolonier og er dermed usikkert.

Ved utbedring av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, bør forsøket for bestemmelse av deteksjonsgrense med CFU utføres på nytt for å bestemme deteksjonsgrense på bakterienivå. Det bør også analyseres tilleggsparalleller av fortynninger ved deteksjonsgrense på molekylnivå (molekyler/PCR), ettersom kun tre paralleller av fortynningene ble analysert og flere paralleller bør analyseres for å sikre et mer nøyaktig resultat. Årsaken til at utbedring ikke ble gjennomført ved etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* er tidsbegrensning for prosjektet.

Ufullstendig deteksjonsgrense ved bestemmelse av CFU, samt få paralleller ved bestemmelse av deteksjonsgrense på molekylnivå (molekyler/PCR) gir noe usikkerhet knyttet til

sensitivitet for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. Deteksjonsgrense på molekylnivå ble bestemt til å være 1,3 molekyler/PCR for *C. fetus*, og 5,0 molekyler/PCR for *C. species*, som tilsvarer at multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* har god sensitivitet. Multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* kan dermed antas å detektere svært lave konsentrasjoner av *C. species*, selv om den har noe unøyaktig deteksjonsgrense.

4.8 Påvisning av *C. species* i avføringsprøver fra pasienter med diaré

Avføringsprøvene fra pasienter med diare i perioden fra april-oktober 2021, analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, viste positivt resultat for *C. species* i 79 av de 826 pasientprøvene (9,6%). 73 av 79 pasientprøver hadde høy Ct-verdi og kunne ikke sangersekvenseres da de inneholdt for lave mengder *C. species*. Seks av 79 pasientprøver (0,7%) hadde lav Ct-verdi og kunne bli sangersekvensert for å identifisere bakteriearten som ble detektert i disse seks pasientprøvene ved multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*.

4.8.1 Pasientprøver med høy Ct-verdi

De ti pasientprøvene med høy Ct-verdi som ble analysert med gelelektroforese, viste at det ikke var uspesifikk binding av primere og probe, ettersom det var sterkere bånd ved forventet baseparstørrelse enn ved andre baseparstørrelser. *C. concisus* kan finnes i normalflora i munnhulen, og bånd ved riktig baseparstørrelse kan muligens komme av tilstedeværelse av *C. concisus* i normalflora. Svake bånd ved andre baseparstørrelser kan komme fra andre mikrober eller humant DNA, ettersom det er stor tilstedeværelse av mikrober og DNA i fæcesprøver. En mulig feilkilde, er at det ble analysert over 35 sykluser i multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, som øker sannsynligheten for oppformering av uspesifikke sekundære PCR-produkt mot slutten av analysen (26). Det er dermed en risiko for at svake positive pasientprøver kan komme av uspesifikke produkt.

4.8.2 Sangersekvensering av pasientprøver med lav Ct-verdi

Sangersekvensering ble utført av PCR-produkt for å kunne identifisere hvilke *C. species* som er detektert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*. For å kunne identifisere bakterier, bør sekvensen i pasientprøven vise >99% ID til en bakterieart i NCBI. Målsekvensen 16s rRNA benyttes til identifikasjon av mange ulike bakteriearter, hvor deler av denne målsekvensen kan inneholde likheter mellom bakteriearter. En kan dermed ikke identifisere en bakteriestamme når sekvensen er mindre enn 99% lik referansestammen. For å bekrefte

om sekvenseringsprimere ble bundet spesifikt til målsekvensen 16S rRNA, ble kontrollstammer sangersekvensert, hvor kontrollstammen *C. fetus* fikk >99% identifikasjon for *C. fetus*, og kontrollstammen *C. upsaliensis* fikk >99% identifikasjon for *C. upsaliensis* og *C. vulpis*. Årsaken til at *C. upsaliensis* fikk identifikasjon for to ulike *C. species*, er trolig siden de har relativt lik interspesifikk region i målsekvensen 16S rRNA, og dette anses ikke å være av betydning for sekvenseringsresultatet. Sekvenserings-primere kan dermed antas å binde seg spesifikt til målsekvensen og ble benyttet til identifikasjon av *C. species* detektert i positive pasientprøver.

Fire av seks pasientprøver med lav Ct-verdi og positivt resultat for *C. species* fikk >99% identifikasjon for to ulike *C. species*, mens to av pasientprøvene med lav Ct-verdi fikk ingen identifikasjon >99%. En av bakteriene som ikke kunne identifiseres hadde 97,97% ID for *C. concisus*, som kan indikere at denne bakterien var til stede. Den andre prøven som ikke kunne identifiseres fikk omtrent 95% ID for en rekke ulike *C. species*, men hadde flere dobbelttopper i elektroferogrammet og har dermed mange usikre basepar. En mulig årsak til at to pasientprøver med lav Ct-verdi ikke ble identifisert med sangersekvensering, kan være uspesifikk binding av primere og probe, som kan ha ført til oppkonsentrering av usikre basepar og følgelig uspesifikk gensekvens og dermed ingen nøyaktig identifikasjon. Prøvene som ikke ble identifisert bør derfor sangersekvenseres på nytt, for å undersøke om et bedre resultat er oppnåelig.

Tre av fire pasientprøver som ble identifisert med sangersekvensering, fikk >99% identifikasjon for *C. concisus*. En dansk studie av *C. species* viser at *C. concisus* forekommer omtrent like hyppig som *C. jejuni* og *C. coli* hos pasienter med gastroenteritt. Studien viser også at forekomsten av *C. jejuni* og *C. coli* er hyppigst i sommersesongen, mens forekomsten av *C. concisus* er jevn hele året (27). Tidligere studier av *C. concisus* viste også at bakterien ble funnet i munnhulen hos både friske pasienter og pasienter med tarminfeksjon, noe som indikerer at *C. concisus* er en del av normalfloraen i munnhulen (28). Det mistenkes at ulike genotyper av *C. concisus* kan være årsak til at bakterien kan kolonisere tarmen og samtidig finnes som normalflora (29,30), men virulensen til *C. concisus* er per i dag delvis ukjent. Det er gjort funn av virulensfaktorene zonula occludens toksin og fosfolipase A hos *C. concisus*, som begge kan forårsake gastroenteritt. Det er også gjort funn som kan indikere relasjon mellom *C. concisus* infeksjon og de kroniske betennelsene; inflammatorisk tarminfeksjon, ulcerøs kolitt og Crohns sykdom (30,31).

Én av fire pasientprøver med positivt resultat for *C. species* på multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, fikk 100% identifikasjon for *Candidatus Campylobacter infans* strain. Dette er en nylig oppdaget *C. species* funnet i en studie som omhandler forekomsten av *C. species* hos spebarn med diaré i utviklingsland. Dette studiet viste at *Candidatus Campylobacter infans* strain ble funnet like hyppig som *C. coli*, og kan indikere at den nye arten er tarmpatogen. Det er ikke gjort noen videre studier angående patogeniteten til denne arten (10).

Funnene i de tidligere studiene indikerer at *C. concisus* og *Candidatus Campylobacter infans* strain, detektert hos pasientene undersøkt i dette prosjektet, kan være årsaken til gastroenteritt hos disse pasientene. Det er derimot nødvendig med videre forskning av patogeniteten til *C. concisus* og *Candidatus Campylobacter infans* strain for å klassifisere bakterieartene som tarmpatogene, og konkludere med at disse artene kan forårsake gastroenteritt hos pasienter med akutt diaré. Dette er viktig for å kunne diagnostisere og behandle flere pasienter med alvorlig symptomer på gastroenteritt.

4.9 Feilkilder

Ved alle typer analyseringer vil feilkilder av ulik alvorlighetsgrad opptre. For å minimere feilkildene i denne analysen ble det benyttet positive og negative kontroller, for å avdekke feil ved reagensene som ble benyttet og kontaminering av miljøbakterier og PCR-produkt i PCR-oppsettene. Negativ kontroll bør settes opp til slutt i et PCR-oppsett for å avdekke kontaminering mellom prøvebrønnene i en PCR-plate. Alle kontrollene i dette forsøket ble godkjent, som indikerer at prøvesvarene i de ulike analyseringene er troverdige. Det er derimot en usikkerhet rundt negativ kontroll, da negativkontrollene i dette prosjektet ble satt opp først i alle PCR-oppsettene, og dermed ikke vil registrere eventuell kontaminering underveis i oppsettet.

En feilkilde i dette prosjektet er at threshold-linjen ble stilt manuelt i alle analyseringene. Plasseringen av threshold-linjen vil i noen grad påvirke Ct-verdiene til prøvene som blir analysert, og ettersom den ble stilt manuelt kan det påvirke reproduserbarheten av Ct-verdier ved sammenligning av samme prøve analysert flere ganger. Multipleks-PCR etablert i dette prosjektet benyttes til semi-kvantitativ påvisning av *C. fetus* og *C. species*, og vil dermed ikke påvirke påvisningen av *C. fetus* og *C. species* i stor grad.

En usikkerhet ved Ct-verdier for pasientprøver analysert med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, er at de seks pasientprøvene med lav Ct-verdi viste svært avvikende resultater mellom første analysering og reanalysering. Ti pasientprøver med høy Ct-verdi som ble reanalysert for å undersøke om Ct-verdiene var reelle, viste derimot at de høye Ct-verdiene er reproducerbare. Disse motstridende resultatene tyder på at det har skjedd en feil ved analysering av pasientprøver med lave Ct-verdier, og ettersom det er usikkert hvilken av analyseringene som er mest korrekt bør de analyseres på nytt. Dette ble ikke gjort på grunn av tidsbegrensning for prosjektet.

4.10 Konklusjon og videre arbeid

Dette bachelorprosjektet viste at multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* detekterte flere *C. species* enn avdelingens rutine-PCR Allplex GI assay (Seegene), og kan dermed benyttes for deteksjon og identifisering av *C. species* med målsekvensen 16S rRNA. Tre (0,4%) av de 826 pasientprøvene som ble analysert, ble identifisert som *C. concisus*, mens én pasientprøve (0,1%) ble identifisert som *Candidatus Campylobacter infans* strain.

Virulensen til *C. concisus* og *Candidatus Campylobacter infans* strains bør undersøkes nærmere for å kunne konkludere med at disse bakterieartene kan være årsak til gastroenteritt hos pasienter med akutt diaré. Ved videre arbeid med multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* bør pasientprøver over et helt år analyseres for å undersøke forekomsten av *C. concisus* i andre perioder enn sommermånedene, ettersom tidligere studier viser til at *C. concisus* kan være en potensiell årsak til gastroenteritt hele året. Det er også relevant å undersøke forekomsten av *C. species* hos pasienter uten symptomer på gastroenteritt.

5.0 Referanser

1. de Boer RF, Ott A, Güren P, van Zanten E, van Belkum A, Kooistra-Smid AMD. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* januar 2013;51(1):253–9.
2. Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* november 2004;42(11):5125–32.
3. Iraola G, Pérez R, Betancor L, Marandino A, Morsella C, Méndez A, mfl. A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Vet Res* [Internett]. desember 2016 [sitert 29. mars 2022];12(1):286. Tilgjengelig på: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0913-3>
4. Murray, Patrick R, Pfaller, Michael A., Rosenthal, Ken S. *Medical Microbiology*. 8.utgave. Elvsierv; 2015.
5. Genome List - Genome - NCBI [Internett]. [sitert 14. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/overview/campylobacter>
6. Oppdatert P. *Campylobacteriose* [Internett]. Folkehelseinstituttet. [sitert 18. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/campylobacteriose---veileder-for-he/>
7. Clinical relevance of infections with zoonotic and human oral species of *Campylobacter* | SpringerLink [Internett]. [sitert 8. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-016-6254-x>
8. Lopes GV, Ramires T, Kleinubing NR, Scheik LK, Fiorentini ÂM, Padilha da Silva W. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog.* 1. desember 2021;161:105265.
9. Tegtmeyer N, Sharafutdinov I, Harrer A, Soltan Esmaeili D, Linz B, Backert S. *Campylobacter* Virulence Factors and Molecular Host–Pathogen Interactions. I: Backert S, redaktør. *Fighting Campylobacter Infections: Towards a One Health Approach* [Internett]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [sitert 8. mai 2022]. s. 169–202. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8_7
10. Bian X, Garber JM, Cooper KK, Huynh S, Jones J, Mills MK, mfl. *Campylobacter* Abundance in Breastfed Infants and Identification of a New Species in the Global Enterics Multicenter Study. *mSphere.* 15. januar 2020;5(1):e00735-19.
11. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol.* 1. juni 2015;48:99–108.
12. Fitzgerald C. *Campylobacter*. *Clin Lab Med.* juni 2015;35(2):289–98.
13. Oppdatert P. *Tarminfeksjon med campylobacter - campylobacteriose* [Internett]. Folkehelseinstituttet. [sitert 18. mars 2022]. Tilgjengelig på:

<https://www.fhi.no/sv/smittsomme-sykdommer/smitte-fra-mat-vann-dyr/flere-artikler/campylobacter/>

14. Smith BA, Gupta N, Denny K, Culver GM. Characterization of 16S rRNA Processing with Pre-30S Subunit Assembly Intermediates from *E. coli*. *J Mol Biol.* 8. juni 2018;430(12):1745–59.
15. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* oktober 2004;17(4):840–62.
16. Muntlig samtale med faglig veileder ved avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital.
17. McPherson MJ, Møller SG. PCR. 2.utgave. New York: Taylor & Francis Group; 2006. 292 s.
18. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, mfl. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 15. januar 2000;28(2):655–61.
19. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [sisert 6. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6241-4>
20. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif.* 11. mars 2015;3:9–16.
21. «Cycle Sequencing» Biology Animation Library - CSHL DNA Learning Center [Internett]. [sisert 2. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://dnalc.cshl.edu/resources/animations/cycseq.html>
22. Culture Collection University Of Gothenburg [Internett]. [sisert 30. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.ccug.se/>
23. *Campylobacter fetus* (ID 528) - Genome - NCBI [Internett]. [sisert 6. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/528>
24. *Campylobacter upsaliensis* (ID 1147) - Genome - NCBI [Internett]. [sisert 6. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1147>
25. Poor PCR Efficiency - NO [Internett]. [sisert 19. mai 2022]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/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](http://www.thermofisher.com/uk/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)
26. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp JoVE.* 22. mai 2012;(63):3998.

27. Nielsen HL, Ejlersen T, Engberg J, Nielsen H. High incidence of *Campylobacter concisus* in gastroenteritis in North Jutland, Denmark: a population-based study. *Clin Microbiol Infect.* 1. mai 2013;19(5):445–50.
28. Zhang L, Budiman V, Day AS, Mitchell H, Lemberg DA, Riordan SM, mfl. Isolation and Detection of *Campylobacter concisus* from Saliva of Healthy Individuals and Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Microbiol.* august 2010;48(8):2965–7.
29. Kalischuk LD, Inglis GD. Comparative genotypic and pathogenic examination of *Campylobacter concisus* isolates from diarrheic and non-diarrheic humans. *BMC Microbiol.* 15. mars 2011;11:53.
30. Liu F, Ma R, Wang Y, Zhang L. The Clinical Importance of *Campylobacter concisus* and Other Human Hosted *Campylobacter* Species. *Front Cell Infect Microbiol.* 24. juli 2018;8:243.
31. Kaakoush NO, Mitchell HM. *Campylobacter concisus* – A New Player in Intestinal Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 3. februar 2012;2:4.

6.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Reagensvedlegg for primere og prober benyttet i etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* (side 56-61)

Vedlegg 2: PCR-programmene benyttet i etableringen av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* (side 62)

Vedlegg 3: Ct-verdier fra etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species* (side 63-66)

Vedlegg 4: Standardkurver generert ved effektivetsanalyse (side 67-68)

Vedlegg 5: Utregning av deteksjonsgrense med molekyler/PCR (side 69)

Vedlegg 6: Ct-verdier for svake positive pasientprøver (side 70-72)

Vedlegg 1

Reagensvedlegg for primere og probe benyttet i etablering av multipleks-PCR for C. fetus og C. species, og reagensvedlegg for primere benyttet i optimalisering av sangersekvensering.



Applied Biosystems UK.
 3 Fountain Drive
 Inchinnan
 Renfrewshire
 PA4 9RF

Page : 1

Despatch Note

Despatch Note No. 297561

Oligos this shipment 2 of 2

Customer Sidsel Krokstad
 Institute ST OLAVS HOSPITAL HF
 Customer No. 6601
 Delivery 69038230
 Address ERLING SKJALGSSONS GATE 1
 TRONDHEIM
 NORWAY
 7006

Purchase Order No. 68191891
 Despatch Date : 25/02/2022
 Order Received: 00/00/00 Urgency 7-10D
 Delivery Method CUR
 AB Order No. 387813 0007781311

Oligo Ref.	Item No	Part No.	Delivered End Product	Dye	MS QC Passed*	HPLC	Lyoph	Length Mol Wt	Concl/Amount
C.fetus_MGBP 2701781	10 Sequence	1.1 4316033	MGB PROBE, 20nmol ATC TCT AAG AGA TTA GTT G	VIC MGBNFQ	Yes	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	19 7878	100 µM
C.spp_MGBP 2701782	20 Sequence	2.1 4316033	MGB PROBE, 20nmol CAG AGA ACA ATC CGA ACT G	6-FAM MGBNFQ	Yes	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	19 7472	100 µM

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 : dna@tib-molbiol.de
 Consultation
 design@tib-molbiol.de
 Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2159168 **C.fetus_F**
 TIB reference no : 022103119 18-mer 23.02.2022

5' - **gCACCTgTCTCAACTTTC**

Amount / Concentration for product of 1 ml
 Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :
 Number of bases :
 Wobble bases and GC content :

128,0 nmol / 128,0 µM
 Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 no
 A: 3 G: 2 C: 7 T: 6 total 18
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 50,0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺
 Molecular weight free acid :
 Picomoles per OD₂₆₀
 Micrograms per OD₂₆₀

169370 l/mol cm
 5675,1 g / mol
 5385,6 g / mol
 5904,2 pmol / OD
 33,5 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀
 Molar amount :
 Amount in µg mass units :

21,7 OD
 128,0 nmol
 726,2 µg
 128,0 µM (pmol / µl)
 6398 µl
 2559 µl (To prepare stock solutions of
 1280 µl different concentration)

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :

0,726 µg / µl
 1 : 1452 dilution factor from a 1 ml solution
 7262 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

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

48,2 °C
 44,7 °C
 54,0 °C
 50,5 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS -115,9 / -518,7 / -1351,4 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



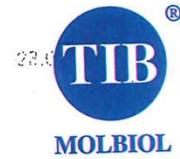
EX We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 93163 B

VAT No.: DE 814 018 770 | HS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 EORI No. DE 4806433

Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC DRIS DE 33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de
 Consultation
 design@tib-molbiol.de
 Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2159169 **C.fetus_R**
 TIB reference no : 022103119 17-mer 23.02.2022

5' - CCTTACCTgggCTTgAT

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

128,2 nmol / 128,2 µM
 Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 no
 A : 2 G : 4 C : 5 T : 6 total 17
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 52.9 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient 164090 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺ 5424,9 g / mol
 Molecular weight free acid : 5152,4 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 6094,2 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 33,1 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 21,0 OD
 Molar amount : 128,2 nmol
 Amount in µg mass units : 695,6 µg
 Molar concentration when delivered in 1 ml solution : 128,2 µM (pmol / µl)
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 6411 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 2564 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 1282 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,696 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 1391 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 6956 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 50,3 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 46,8 °C
 Melting point G/C-content rule 52,0 °C
 49,5 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS -123,8 / -553,5 / -1442,0 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



We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Drooge
 Handelsregister HRB 93163 B
 VAT-No.: DE 814 018 770 | BIS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC DRBS DE 33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de
 Consultation
 design@tib-molbiol.de
 Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2159170 **C.spp.Sek_altR**
 TIB reference no : 022103119 18-mer 23.02.2022

5' - CATTgTAGCACgTgTgTC

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

129,3 nmol / 129,3 µM
 Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 no
 A: 3 G: 5 C: 4 T: 6 total 18
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 50.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε 184250 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺ 5795,2 g / mol
 Molecular weight free acid : 5505,7 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 5427,4 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 31,5 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 23,8 OD
 Molar amount : 129,3 nmol
 Amount in µg mass units : 749,3 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :
 129,3 µM (pmol / µl)
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 6465 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 2586 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 1293 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,749 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 1499 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 7493 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 48,2 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 44,7 °C
 Melting point G/C-content rule 54,0 °C
 50,5 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS -113,2 / -498,6 / -1293,1 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 European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 93163 B

VAF-No.: DE 814 018 770 | IS code: 2934 9990 / for kts 3822 0000
 FORI-No. DE 4806433

Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 7709 00
 SWIFT/BIC DRIS DE 33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de
 Consultation
 design@tib-molbiol.de
 Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2159171 **C.spp.S_C1112R**
 TIB reference no: 022103119 19-mer 23.02.2022

5' - ACg TCg TCC MCA CCT TCCT

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

125,3 nmol / 125,3 µM
 Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 wobble
 A: 2 G: 2 C: 9 T: 5 total 19
 Wobble: 1 Mod.: 0 GC-contents 57.9 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ

Molecular weight ammonium salt NH₄

Molecular weight free acid :

Picomoles per OD₂₆₀

Micrograms per OD₂₆₀

170995 l / mol cm
 5955,1 g / mol
 5648,5 g / mol
 5848,1 pmol / OD
 34,8 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

Molar amount :

Amount in µg mass units :

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :

50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :

100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :

21,4 OD
 125,3 nmol
 746,0 µg
 125,3 µM (pmol / µl)
 6263 µl
 2505 µl (To prepare stock solutions of
 different concentration)
 1253 µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :

To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :

0,746 µg / µl
 1 : 1492 dilution factor from a 1 ml solution
 7460 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)

Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)

Melting point G/C-content rule

57,0 °C
 53,5 °C
 61,0 °C
 55,7 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS -137.9 / -588.4 / -1511.7 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



We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droese VAT-No.: DE 814 018 770 IHS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 Handelsregister HRB 93163 B Commerzbank, Koppenstrasse 93, D 10243 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC DRES DE 33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de
 Consultation
 design@tib-molbiol.de
 Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2159172 **C.spp.S_C412F**
 TIB reference no: 022103119 19-mer 23.02.2022

5' - **ggATgACACTTTTCggAgC**

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification:

5'-Modifications:

Number of bases:

Wobble bases and GC content:

128,1 nmol / 128,1 µM
 Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 no
 A: 4 G: 6 C: 4 T: 5 total 19
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 52,6 %

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient ϵ

Molecular weight ammonium salt NH₄

Molecular weight free acid:

Picomoles per OD₂₆₀

Micrograms per OD₂₆₀

203060 l / mol cm

6150,4 g / mol

5843,9 g / mol

4924,7 pmol / OD

30,3 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

Molar amount:

Amount in µg mass units:

Molar concentration when delivered in 1 ml solution:

20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of:

50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of:

100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of:

26,0 OD

128,1 nmol

787,8 µg

128,1 µM (pmol / µl)

6405 µl

2562 µl

1281 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, if dissolved in 1 ml:

Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml:

To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in:

0,788 µg / µl

1 : 1576 dilution factor from a 1 ml solution

7878 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)

Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)

Melting point G/C-content rule

54,1 °C

50,6 °C

58,0 °C

53,6 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

Δ G / Δ H / Δ S

-135,8 / -588,4 / -1518,6 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 European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 93163 B

VAT-No.: DE 814 018 770 | IIS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 UST-IdNr.: DE 21303815 | IHS: 260150330007 | FORI No. DE 4806433

Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC DRES DE 33 100

Vedlegg 2

Spesifikasjoner for PCR-programmene benyttet i etableringen av multipleks-PCR for C. fetus og C. species.

Perfecta two-step TM60:

Run Setup

Protocol

- 1: 45,0°C for 5:00
 - 2: 95,0°C for 3:00
 - 3: 95,0°C for 0:05
 - 4: 60,0°C for 0:30
- Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

Perfecta two-step TM55:

Run Setup

Protocol

- 1: 45,0°C for 5:00
 - 2: 95,0°C for 3:00
 - 3: 95,0°C for 0:05
 - 4: 55,0°C for 0:30
- Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

Annealing-gradient:

Run Setup

Protocol

- 1: 45,0°C for 5:00
 - 2: 95,0°C for 3:00
 - 3: 95,0°C for 0:05
 - 4: Gradient 53,0°C / 65,0°C for 0:30
- Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

Vedlegg 3

Resultater (Ct-verdier) fra innledende forsøk for etablering av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Analyse av kontrollstammer for å undersøke om primere og prober binder seg spesifikt til målsekvensen 16S rRNA for *C. fetus* og *C. species*

Tabell 20: Ct-verdier for kontrollstammer analysert med 1:10 fortynning på CFX96 med programmet «Perfecta Two-step-TM60».

	Ct-verdi
C. coli	18,24
C. jejuni	19,92
C. upsaliensis	19,95
C. lari	21,16
C. fetus	19,00

Optimalisering av annealingtemperatur for *C. fetus*-PCR og *C. species*-PCR

Tabell 21: Ct-verdier for kontrollstammer og pasientprøver analysert med 1:10-, 1:10³- og 1:10⁴-fortynning med annealinggradient fra 55-65°C.

	Ct-verdier				
	55,4°C	57,7°C	60,6°C	63,0°C	65,0°C
C. upsaliensis 1:10	20,05	19,53	18,62	19,6	20,25
C. upsaliensis 1:10³	27,71	27,81	26,09	27,19	27,54
C. upsaliensis 1:10⁴	31,54	31,11	30,48	30,8	30,97
C. jejuni 1:10	20,48	20,68	20,42	20,95	20,94
C. jejuni 1:10³	27,48	27,63	27,06	27,23	27,69
C. jejuni 1:10⁴	32,42	31,14	30,63	30,91	31,9
C. fetus (CCUG) 1:10	19,54	20,26	19,96	20,35	20,54
C. fetus (CCUG) 1:10³	26,17	26,13	26,39	27,48	30,05
C. fetus (CCUG) 1:10⁴	29,24	29,37	30,5	30,43	35,18
C. fetus (pas) 1:10	22,64	22,96	23,33	23,45	26,35
C. fetus (pas) 1:10³	29,54	29,41	29,83	30,36	33,1
C. fetus (pas) 1:10⁴	34,08	33,07	33,64	33,74	37,2

Optimalisering av konsentrasjon av primere og probe for *C. fetus* analysert ved annealingtemperatur 60,0°C

Tabell 22: Ct-verdi for 1:10³- og 1:10⁴-fortynning av kontrollstammen *C. fetus*, analysert med seks ulike brukskonsentrasjoner av primere og probe for *C. fetus*

	Ct-verdier			
	C. fetus 1:10³	Middel	C. fetus 1:10⁴	Middel
Mix 1	29,27	29,17	30,86	31,84
	29,7		32,49	
	28,53		32,17	
Mix 2	29,59	29,25	32,72	32,58
	29,62		32,68	
	28,55		32,33	
Mix 3	29,43	29,43	32,55	32,59
	29,38		32,97	
	29,49		32,24	
Mix 4	29,63	29,33	32,1	32,06
	29,1		31,79	
	29,26		32,29	
Mix 5	29,17	29,2	32,34	32,04
	29,11		31,97	
	29,32		31,81	
Mix 6	29,17	29,02	32,43	32,22
	28,83		31,88	
	29,05		32,35	

Effektivitetsanalyse for multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*

Tabell 23: Ct-verdier fra effektivitetsanalyse av multipleks-PCR for *C. fetus* og *C. species*, analysert ved annealingtemperatur 55,0°C og 60,0°C E

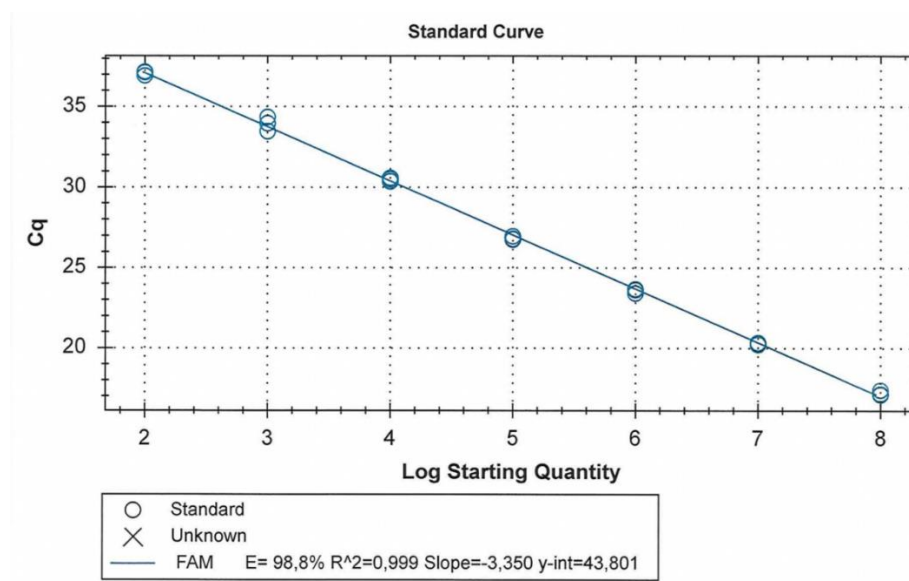
	Ct-verdier			
	TM 55	TM55_middel	TM 60	TM60_middel
C. upsaliensis 1:10	17,36	17,70	17,11	17,21
	18,03		17,14	
	-		17,39	
C. upsaliensis 1:10²	20,40	20,26	20,23	20,26
	20,12		20,22	

	-		20,33	
C. upsaliensis 1:10³	23,44	23,48	23,41	23,56
	23,63		23,67	
	23,37		23,61	
C. upsaliensis 1:10⁴	26,72	26,66	26,76	26,84
	26,60		26,81	
	26,67		26,96	
C. upsaliensis 1:10⁵	30,25	30,14	30,36	30,48
	30,10		30,48	
	30,08		30,59	
C. upsaliensis 1:10⁶	33,62	33,64	33,96	33,92
	33,95		34,34	
	33,36		33,46	
C. upsaliensis 1:10⁷	36,76	36,99	36,93	37,07
	37,41		37,12	
	36,81		37,17	
C. upsaliensis 1:10⁸	N/A	N/A	N/A	N/A
	N/A		N/A	
	N/A		N/A	
C. fetus 1:10	20,10	20,07	19,96	19,91
	19,95		19,95	
	20,17		19,83	
C. fetus 1:10²	23,36	23,23	23,02	22,97
	23,11		22,83	
	23,22		23,05	
C. fetus 1:10³	26,4	26,36	26,48	26,34
	26,34		26,27	
	26,33		26,27	
C. fetus 1:10⁴	29,72	29,61	29,82	29,61
	29,52		29,31	
	29,59		29,70	
C. fetus 1:10⁵	33,02	32,95	32,89	32,83
	32,68		32,71	
	33,15		32,88	

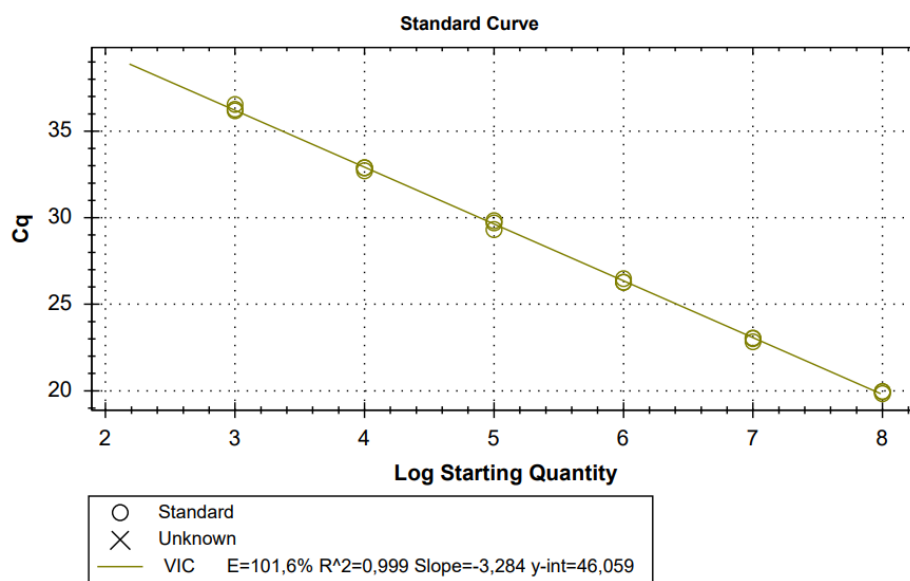
C. fetus 1:10⁶	36,58	36,15	36,27	36,33
	35,54		36,18	
	36,32		36,54	
C. fetus 1:10⁷	N/A	38,05	N/A	38,89
	38,05		N/A	
	N/A		38,89	
C. fetus 1:10⁸	N/A	N/A	N/A	N/A
	N/A		N/A	
	N/A		N/A	

Vedlegg 4

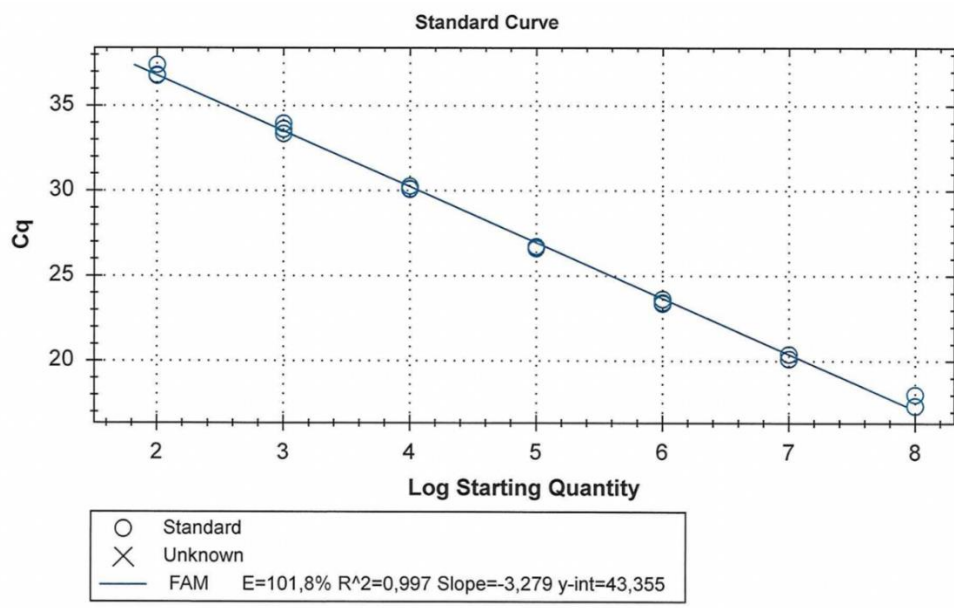
Standardkurver generert ved effektivitetsanalyse.



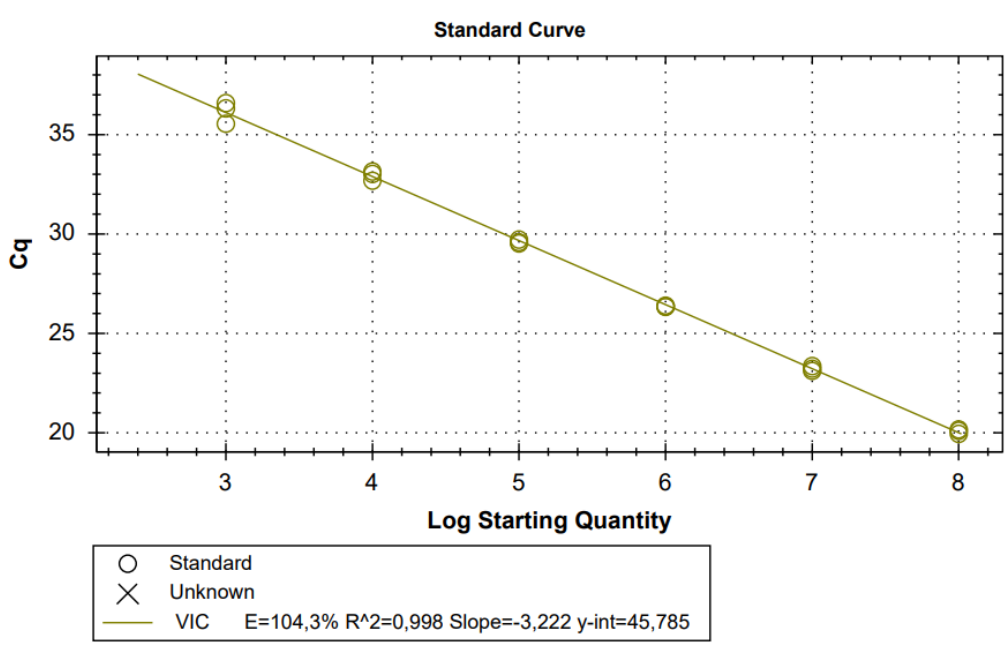
Figur 16: Standardkurve som illustrerer effektiviteten til primere og probe for *C. species* ved 60,0°C.



Figur 17: Standardkurve som illustrerer effektiviteten til primere og probe for *C. fetus* ved 60,0°C.



Figur 18: Standardkurve som illustrerer effektiviteten primere og for *C. species* ved 55,0°C.



Figur 19: Standardkurve som illustrerer effektiviteten til primere og probe for *C. fetus* ved 55,0°C.

Vedlegg 5

Utregning av deteksjonsgrense for C. fetus og C. species, ved å benytte konsentrasjon av nukleinsyrer fra Nanodrop, molekylvekt, antall kopier av målsekvens, Avagadros tall og siste positive fortynning.

Estimert vekt for C. fetus:

$$M_M = \text{Størrelse på genomet} * \text{gjennomsnittlig molekylvekt}$$

$$M_{M_{C.fetus}} = 1,77 * 10^6 \text{ bp} * 660 \text{ pg/pmol} = \underline{11,68 * 10^8 \text{ pg/pmol}}$$

Antall mol i eluat for C. fetus:

$$M = \text{Volum eluat} * \text{Gjennomsnittlig konsentrasjon}$$

$$n_{C.fetus} = \frac{M_{C.fetus}}{M_{m_{C.fetus}}}$$

$$M_{C.fetus} = 5 \mu\text{L} * 15,71 \text{ ng/} \mu\text{L} = 78,55 \text{ ng} = \underline{78550 \text{ pg}}$$

$$n_{C.fetus} = \frac{78550 \text{ pg}}{11,68 * 10^8 \text{ pg/pmol}} = 6,725 * 10^{-5} \text{ pmol} = \underline{6,275 * 10^{-17} \text{ mol}}$$

Antall molekyler i 3 kopier av eluat:

$$\text{Antall molekyler}_{C.fetus} = n_{C.fetus} * NA$$

$$\text{Antall molekyler}_{C.fetus} = 2,275 * 10^{-17} \text{ mol} * 6,0221415 * 10^{23} \text{ mol}^{-1} = \underline{40\,498\,901,59 \text{ molekyler}}$$

Antall molekyler i en kopi av genomet:

$$\text{Antall molekyler i en kopi av eluatet} = \frac{40498901,59 \text{ molekyler}}{3} = \underline{13\,499\,633 \text{ molekyler}}$$

Utregning av antall molekyler ved deteksjonsgrense:

$$\text{Molekyler/PCR} = \frac{\text{Antall molekyler i 1 kopi}}{\text{Fortynning ved deteksjonsgrense}} = \frac{13499633 \text{ molekyler}}{10^7} = \underline{1,3 \text{ molekyler/PCR}}$$

Den samme utregningen ble gjort for C. species, hvor resultatet ved siste positive prøve ble 5,0 molekyler/PCR.

Vedlegg 6

Positive pasientprøver med høy Ct-verdi for *C. species* analysert med multipleks-PCR for *C. species* og *C. fetus*.

Prøve-ID	Ct-verdi
01-96	38,25
02-23	39,44
02-27	39,95
02-39	37,53
02-41	38,27
02-42	36,53
02-43	39,58
02-46	39,38
02-49	37,71
02-56	38,84
02-62	39,83
02-65	39,36
02-70	39,71
02-72	39,54
02-78	39,42
02-95	37,19
03-22	38,39
03-25	39,71
03-27	39,45
03-30	38,12
03-32	38,27
03-33	39,20
03-58	39,02
03-66	39,29
03-67	36,82
03-68	37,57
03-75	39,66
03-89	39,82
03-90	39,73
03-93	39,21
04-04	38,95
04-36	38,00

04-50	39,73
04-57	39,25
05-12	39,83
05-13	38,75
05-19	39,71
05-20	37,16
05-28	39,00
05-33	39,74
05-40	37,27
05-53	39,06
05-60	39,30
05-67	39,07
05-75	39,03
05-98	38,61
06-05	38,94
06-06	38,35
06-09	39,94
06-10	38,37
06-11	39,81
06-16	39,16
06-29	36,96
06-41	38,27
06-49	39,43
06-52	38,78
06-56	39,46
06-62	38,35
07-78	39,66
07-83	39,78
07-90	39,57
08-02	36,29
08-06	37,14
08-36	38,66
08-52	39,33
08-54	37,92
08-60	39,73
08-65	37,44

08-78	39,02
08-86	39,47
09-12	38,86
09-15	37,90
09-16	38,54

