

Ølberg, Rikke Harveland
Røysund, Helene Mehus

Etablering av real-time PCR-metoder for påvisning og differensiering av *Mycobacterium abscessus* complex subspecies ved bruk av molekulære beacon-prober

Establishment of real-time PCR methods for the detection and differentiation of *Mycobacterium abscessus* complex subspecies using molecular beacon probes

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Lorentsen, Lise Falk-Larssen
Medveileder: Flakne, An-Magritt Stjern
Mai 2022

Ølberg, Rikke Harveland
Røysund, Helene Mehus

Etablering av real-time PCR-metoder for påvisning og differensiering av *Mycobacterium abscessus* complex subspecies ved bruk av molekylære beacon-prober

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Lorentsen, Lise Falk-Larssen
Medveileder: Flakne, An-Magritt Stjern
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Etablering av real-time PCR-metoder for påvisning og differensiering av *Mycobacterium abscessus* complex subspecies ved bruk av molekylære beacon-prober

Establishment of real-time PCR methods for the detection and differentiation of *Mycobacterium abscessus* complex subspecies using molecular beacon probes

Av / by

Rikke Harveland Ølberg
Helene Mehus Røyksund

Trondheim, 2022

Forord

Denne oppgaven er skrevet som et avsluttende prosjekt ved bioingeniørutdanningen ved NTNU i Trondheim. Oppgaven er gitt av Avdeling for Medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital. Det praktiske arbeidet tilknyttet oppgaven ble gjennomført ved laboratoriet til avdelingen i perioden mars til mai 2022.

Vi ønsker først og fremst å rette en stor takk til fagansvarlig bioingeniør An-Magritt Stjern Flakne, bioingeniør Emilie Tungseth Bruun, bioingeniør Inger Jean Cooper Kjønnøy og overlege Kåre Bergh for god faglig og praktisk veiledning. Dere har stilt opp med godt humør, vist oss tillitt og både vært tålmodige og motiverende under hele prosessen. Dette har bidratt til en spennende, sosial og svært lærerik bachelorperiode. Takk til spesialbioingeniør Sidsel Krokstad for å alltid være behjelpelig og imøtekommende, samt øvrige ansatte ved AMM for deres gjestfrihet.

Vi vil også rette en stor takk til vår prosessveileder fra bioingeniørutdanningen, Lise Falk-Larssen Lorentsen for god konstruktiv veiledning i den skriftlige delen av oppgaven. Takk for all oppmuntring og støtte du har gitt oss gjennom perioden. I tillegg vil vi gi en takk til Kristian Nedrebø Nesse for motiverende ord og verdifull retting av oppgaven gjennom hele skriveprosessen. Til slutt vil vi takke venner og klassekamerater for mye latter og glede gjennom perioden.

Sammendrag

Mycobacterium abscessus complex er et bakteriekompleks som omfatter tre subspecies; *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* og *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. Dette bakteriekomplekset er opportunistisk og kan gi alvorlig infeksjon i flere organer i kroppen. Ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi på St. Olavs hospital finnes det per i dag ingen real-time PCR-metoder for å påvise og differensiere subspeciene. Hensikten med oppgaven var dermed å undersøke muligheten for å utvikle real-time PCR-metoder for påvisning og differensiering av subspeciene til *Mycobacterium abscessus* complex ved bruk av molekylære beacon-prober. Etablering av nye effektive PCR-metoder vil spille en sentral rolle når det kommer til valg av behandling og hvor raskt en infisert pasient mottar behandlingen.

Under prosjektet ble utviklingen av en multiplex real-time PCR-metode (for påvisning av *M. abscessus* og *M. massiliense*) og en spesifikk real-time PCR-metode (for påvisning av *M. bolletii*) påstartet. Arbeidet som ble gjennomført ved utvikling av metodene var basert på artikkelen «A Molecular-Beacon-Based Multiplex Real-Time PCR Assay To Distinguish *Mycobacterium abscessus* Subspecies And Determine Macrolide Susceptibility» skrevet av Marras et al. (2021).

Det ble gjennomført metodeoptimalisering, effektivitetsanalyse og utprøving av deteksjonsgrense for metodene på tre kontrollstammer, en for hver av subspeciene. Det ble i tillegg gjennomført spesifisitetsanalyser på 43 bakterieisolat hentet fra pasientprøver. Resultatene indikerer at metodene har god spesifisitet og at metodenes effektivitet ligger like under kravene som er satt av laboratoriet til avdelingen for real-time PCR-metoder. Basert på undersøkelse av metodenes deteksjonsgrense kan ikke metodenes sensitivitet fastslås og må bestemmes ved å utføre ytterligere analyser.

Arbeidet som ble gjennomført under bachelorprosjektet indikerer at utviklingen av real-time PCR-metoder basert på molekylære beacon-prober for identifisering av *Mycobacterium abscessus* complex subspecies kan være en mulighet. Metodene må videreutvikles og valideres av Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi til to fullverdige metoder før de kan benyttes i rutinen til sykehuslaboratoriet.

Abstract

Mycobacterium abscessus complex is a bacterial complex comprising the three subspecies: *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. The bacterial complex is opportunistic and can cause serious infection in several different organs in the body. At the Department of Medical Microbiology at St. Olav's Hospital, there are currently no real-time PCR methods for detecting and differentiating the subspecies. The purpose of the thesis was thus to investigate the possibility of developing real-time PCR methods for the detection and differentiation of the subspecies of *Mycobacterium abscessus* complex using molecular beacon probes. Establishment of new effective PCR methods will play a key role when it comes to the choice of treatment and how quickly an infected patient receives it.

During the project, the development of a multiplex real-time PCR method for the detection of *M. abscessus* and *M. massiliense* was started along with a specific real-time PCR method for the detection of *M. bolletii*. The work was based on the article «A Molecular-Beacon-Based Multiplex Real-Time PCR Assay To Distinguish *Mycobacterium abscessus* Subspecies And Determine Macrolide Susceptibility» by Marras et al. (2021).

Method optimization, efficiency analysis, and testing of the detection limits for the methods were performed on three control strains, one for each of the subspecies. In addition, specificity analyses were performed on 43 bacterial isolates obtained from patient samples. The results indicate that the methods have a good specificity, and that the efficiency of the methods is just below the requirements set by the laboratory for real-time PCR methods. Based on the testing of the detection limits of the methods, the sensitivity of the methods cannot be immediately determined and further analyses need to be carried out before a decision can be made.

The results obtained from this bachelor project indicate that the development of real-time PCR methods based on molecular beacon probes for the identification of *Mycobacterium abscessus* complex subspecies may be a possibility. The methods must be further developed and validated by the Department of Medical Microbiology before they can be used routinely in the hospital laboratory.

Ordliste

Forkortelser og faguttrykk	Forklaringer
AMM	Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi
Antisense	Ikke-kodende DNA-tråd
BHQ - 1/2	Blackhole Quencher 1/2
Biofilm	En biofilm er et slimlag med strukturerte samfunn av mikroorganismer, bestående av blant annet polysakkarider, enzymer, lipider og proteiner. Biofilmen er festet til en levende eller ikke-levende overflater og øker mikroorganismenes overlevelsesmuligheter.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basepar
CCUG	Culture Collection University of Gothenburg
CFX96™	CFX96™ Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler)
Ct	Cycle threshold
dtDNA	Dobbeltrådet DNA
FAM	Fluorescein Amidite
FHI	Folkehelseinstituttet
Forward primer	Primer som binder seg til antisense-tråden i dobbeltrådet DNA
GPL	Glykopeptidolipider
MGW	Molecular Grade Water
NTM	Nontuberkuløse mykobakterier
P3 laboratorium	Protection level 3 laboratorium (inneslutningsnivå 3 laboratorium)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerase kjedereaksjon)
Reverse primer	Primer som binder seg til sense-tråden i dobbeltrådet DNA
Sense	Kodende DNA-tråd
Subspecies	Underarter
Target	Målesekvens i bakterienes DNA for amplifisering i en PCR-reaksjon.
Threshold-linje	Linje som betegner terskelverdien som skiller mellom positive og negative analyseresultater ved real-time PCR-analyser
TXR	Texas Red

Innholdsfortegnelse

Forord.....	ii
Sammendrag	iii
Abstract.....	iv
Ordliste.....	v
1 Innledning	1
1.1 Mykobakterier.....	1
1.1.1 Non-tuberkuløse mykobakterier	2
1.1.2 <i>Mycobacterium abscessus</i> complex	2
1.2 Arbeid med patogene mikrober på protection level 3 laboratorium	5
1.3 Polymerase Chain Reaction	6
1.3.1 Real-time PCR	7
1.3.2 Multiplex PCR	8
1.3.3 Deteksjon av PCR-produkt	9
1.3.4 Effektivitetsanalyse.....	10
1.3.5 Smeltepunktsanalyse.....	11
1.4 Hensikten med oppgaven.....	12
2 Materiale og metode	14
2.1 Prøvemateriale	14
2.2 Kontrollmateriale	14
2.3 Bakteriepanel til spesifisitetsanalyse	15
2.4 Valg av primer- og probesekvenser	16
2.5 Reaksjonsmiks til real-time PCR	17
2.6 <i>Mycobacterium</i> genus real-time PCR med smeltepunktsanalyse	18
2.7 Sanger-sekvensering	19
2.8 Kapillærelektroforese.....	19
2.9 Metodeoptimalisering	20
2.10 Effektivitetsanalyse.....	20
2.11 Spesifisitetsanalyser	20
2.12 Deteksjonsgrense	21
3 Resultater	22
3.1 <i>Mycobacterium</i> genus real-time PCR med smeltepunktsanalyse av positive kontrollstammer..	22
3.2 Sanger-sekvensering av kontrollstammer (<i>hsp65</i>).....	23
3.3 Kontroll av PCR-produkt for kontrollstammer ved bruk av kapillærelektroforese	23
3.4 Probe- og temperaturoptimalisering av metodene	25

3.4.1	Optimalisering av probekonsentrasjoner.....	25
3.4.2	Temperaturoptimalisering	26
3.5	Effektivitetsanalyse.....	27
3.6	Spesifisitetsanalyse	28
3.6.1	Analysering av bakterieisolat fra generelt bakteriepanel og luftbakteriepanel	28
3.6.2	Analysering av bakterieisolat tidligere påvist som andre mykobakterier	29
3.6.3	Analysering av bakterieisolat tidligere påvist som <i>Mycobacterium abscessus</i> complex.....	29
3.7	Bestemmelse av deteksjonsgrense	29
4	Diskusjon	31
4.1	Sentrale resultater som fremkom under etableringsprosessen	31
4.1.1	Probekonsentrasjon	31
4.1.2	Effektivitetsanalyse.....	31
4.1.3	Spesifisitet.....	32
4.1.4	Deteksjonsgrense	32
4.1.5	Forbehandling av prøvemateriale.....	32
4.2	Videre arbeid.....	33
4.3	Konklusjon.....	34
6	Referanser	35
7	Vedlegg.....	37
7.1	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for sense primer til multiplex PCR	37
7.2	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for antisense primer til multiplex PCR	38
7.3	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for spesifikk probe for <i>M. abscessus</i>	39
7.4	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for spesifikk probe for <i>M. massiliense</i>	40
7.5	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for sense primer til <i>M. bolletii</i>	41
7.6	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for antisense primer til <i>M. bolletii</i>	42
7.7	Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for spesifikk probe til <i>M. bolletii</i>	43
7.8	Reagensvedlegg PerfeCta™ Multiplex qPCR SuperMix, UNG fra Quanta.....	44
7.9	EQS Nuclisense easyMAG, kortversjon	46
7.10	PCR programmer til CFX96™ Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler)	47
7.11	Resultater fra analysering med 34 bakterieisolat tidligere påvist som <i>M. abscessus</i> complex .	48
7.12	Beregninger av antall molekyler som tilsier den estimerte deteksjonsgrensen til metodene	49

1 Innledning

I dette kapittelet presenteres aktuell teori for oppgaven. Kapittelet avsluttes med hensikt og problemstilling.

1.1 Mykobakterier

Mycobacterium er bakterier som regnes som den eneste slekten i bakteriefamilien *Mycobacteriaceae* og inneholder omtrent 210 ulike bakteriearter hvor flere av de er sykdomsfremkallende. (1)(2) Mykobakterier deles hovedsakelig inn i to grupper; tuberkulosefremkallende mykobakterier og non-tuberkuløse mykobakterier (NTM). Det finnes også to bakteriearter som verken er tuberkulosefremkallende eller regnes som NTM, på grunn av de distinkte kliniske bildene bakteriene fremprovoserer. Dette er *Mycobacterium leprae* som fremkaller spedalskhet og *Mycobacterium ulcerans* som fremkaller hudsykdom i form av store åpne sår. (3) De viktigste artene blant de tuberkulosefremkallende mykobakteriene er *Mycobacterium tuberculosis* og *Mycobacterium bovis*, som fremkaller tuberkulose hos henholdsvis mennesker og dyr. *M. bovis* kan også gi tarmtuberkulose hos mennesker ved inntak av for eksempel kontaminert melk. (4)

Bakteriene i *Mycobacterium*-slekten har flere karakteristiske fellestrekk. De er stavformede, enten helt rette eller lett bøyde, og kan i tillegg ha forgreininger. Noen ganger kan også filamentøs og mycelliknende vekst observeres. Bakteriene er aerobe eller mikroaerofile, ubevegelige og ikke sporedannende. Et karakteristisk kjennetegn for disse bakteriene er at de har lav veksthastighet og generasjonstiden er på 2-20 timer. Mykobakteriene deles gjerne inn i langsomtvoksende (disse er ofte assosierte med human sykdom) og hurtigvoksende. (4) Hurtigvoksende bakterier defineres som bakterier hvor en etter sekundærspredning får oppvekst av kolonier med en moderat størrelse på et fast medium, som en agarskål, innen syv døgn. (1)

Celleveggen hos mykobakterier har høyt lipidinnhold med lav permeabilitet, noe som bidrar til resistens mot antibakterielle midler. Det høye lipidinnholdet gjør også bakteriene resistente mot kjemisk desinfeksjon og inntørring. Mellom lipidlagene i bakterienes cellevegg finnes det et lag med peptidoglykan som gjør at celleveggen oppbygning ligner grampositive bakterier. Bakteriene er syrefaste noe som kommer av et høyt innhold av mykolsyrer i bakterienes cellemembran. Dette gjør at de ikke lar seg avfarge med syre-alkohol-løsning når de først er farget, det er derfor utfordrende å farge dem med gramfarging. På grunn av dette benyttes ofte fargemetoden kalt Ziehl-Neelsens metode. (4)

1.1.1 Non-tuberkuløse mykobakterier

Det er identifisert over 200 nontuberkuløse mykobakteriearter. NTM er utbredt i naturen og finnes i vann og jord. Kontaminert vann er derfor en av de viktigste årsakene til NTM-infeksjoner. Bakteriene kan også overføres mellom mennesker eller fra biofilm på eksempelvis dusjhoder eller lignende. Mange av disse artene kan overleve i amøber. Det er grunn til å tro at overlevelse i amøber gjør NTM i stand til å overleve i miljøet i en beskyttet nisje, og samtidig forberedes til kolonisering i andre verter. NTM er resistent mot mange skadelige forbindelser som antibiotika, antiseptica, biocider, steriliseringsmidler og desinfeksjonsmidler, noe som gjør de rustet til å overleve i ugjestmilde miljø. (3)

Antall infeksjoner forårsaket av NTM har økt globalt de siste 20 årene og er vanskelig å behandle på grunn av resistensen disse bakteriene utvikler mot antibiotika som hyppigst blir benyttet mot infeksjoner forårsaket av NTM. Det er kun noen bakteriearter av NTM som gir alvorlig infeksjon, særlig hos immunkompromitterte pasienter. (3) Under denne gruppen finnes bakteriearter som *Mycobacterium abscessus* complex, *Mycobacterium ulcerans* og *Mycobacterium avium*. (4) Lungesykdom er den vanligste følgen av en NTM-infeksjon, men NTM kan gi sykdom som kan ramme nesten alle organer. Noen av årsakene til en betydelig økning i smittetilfeller er blant annet at vertsimmuniteten i verden har endret seg. Menneskers levetid øker og dermed blir den eldre delen av populasjonen mer immunkompromittert. Dette tilsier at verdens befolkning får et dårligere fungerende immunforsvar jo eldre den blir, noe som gjør den mer mottakelig for sykdom og infeksjon. Andre årsaker er blant annet en økning av kronisk lungesykdom generelt i samfunnet, at NTM-bakterier muterer seg og får økt virulens og at det har blitt et generelt større fokus og oppmerksomhet rundt NTM blant helsepersonell og i media. (1)

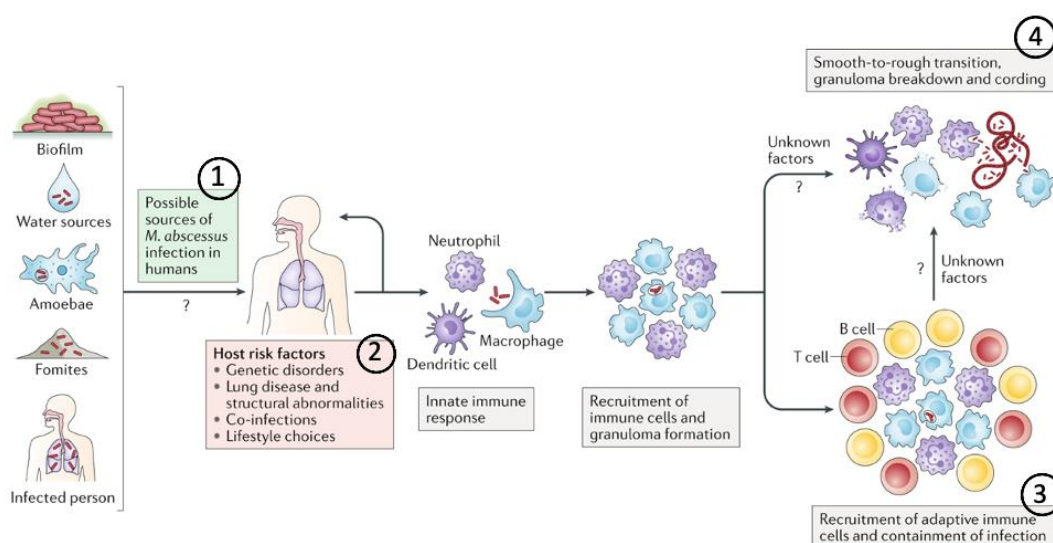
1.1.2 *Mycobacterium abscessus* complex

Mycobacterium abscessus complex er en gruppe under de non-tuberkuløse mykobakteriene og omfatter tre subspecies; *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* og *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Disse vil heretter bli referert til som henholdsvis *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii*. *M. abscessus* complex regnes som en hurtigvoksende bakterie som hovedsakelig gir alvorlig infeksjon i luftveiene, hud og slimhinner hos mennesker, men også andre steder i kroppen som i sentralnervesystemet, øynene og bløtvev. Komplekset er sammen med *M. tuberculosis* og *M. marinum* den vanligste årsaken til hudinfeksjoner blant mykobakteriene. Den er betraktet som en av de mest resistente mykobakteriene, noe som gir få terapeutiske muligheter. Komplekset er

opportunistisk, og det er derfor hovedsakelig immunkompromitterte pasienter som kan få infeksjon av *M. abscessus* complex. Dette er ofte pasienter med underliggende kroniske lungesykdommer, som f.eks. cystisk fibrose. (3) For disse pasientene kan en infeksjon med komplekset i verste fall føre til at pasienten omkommer. (5)

1.1.2.1 Infeksjon

Infeksjonsprosessen ved infeksjon med *M. abscessus* complex har likheter med blant annet *M. tuberculosis*. En oppsummering av infeksjonsprosessen og involverte patofysiologiske mekanismer er vist i Figur 1. Et viktig kjennetegn ved slike infeksjoner er dannelsen av granulom. Etter at mykobakterien har etablert seg i verten, vil nærliggende immunceller som makrofager og nøytrofile granulocytter fagocyttere bakteriene. Normalt vil det medfødte immunforsvaret klare å forhindre at det dannes en inflammasjon. Som andre patogene bakterier klarer likevel *M. abscessus* complex å unngå de fagocytterende cellene, og i tillegg øke produksjonen av inflammatoriske cytokiner. Dette vil føre til at nærliggende celler forflyttes til inflammasjonsstedet, som igjen fører til dannelsen av et granulom. Et granulom er en ansamling av immunceller rundt bakteriene på infeksjonsstedet (6). Etter hvert vil også B- og T-celler fra det ervervede immunforsvaret vandre til inflammasjonsstedet, noe som bidrar til modning av granulomet. *M. abscessus* complex sitt infeksjonsforløp skiller seg fra andre mykobakterier da bakteriene kan omdannes fra glatt til ru variant underveis i infeksjonsforløpet, noe som gjør bakterien mer virulent. Dette fører til at granulomet blir brutt ned og dannelsen av massive ekstracellulære bakterietråder. Disse bakterietrådene kan unngå fagocytose noe som resulterer i store ødeleggelser av bløtvev. (3)



Figur 1: Infeksjonssyklusen til *M. abscessus* complex. Viser mulige smittekilder (1), risikofaktorer (2), hvilke celler som inngår i dannelsen av et granulom (3) og at bakteriecellenes overflate kan endres fra glatt til ru (4). Bilde hentet fra (3).

1.1.2.2 Glykopeptidolipider

De tre subspeciene av *M. abscessus* complex har høy grad av fenotypiske ulikheter, noe som spiller en sentral rolle i hvor virulent bakterien er. De fenotypiske ulikhetene kan sees ved glatte og rue varianter hvor de glatte variantene inneholder glykopeptidolipider (GPL) i bakteriens cellevegg, mens de rue variantene har fravær av GPL i celleveggen.

Tilstedeværelsen eller fraværet av GPL, samt kolonimorfologien spiller en sentral rolle i interaksjonen mellom *M. abscessus* complex og verten bakterien har funnet ly hos. Det regulerer blant annet biofilmdannelsen og mobiliteten til bakterien, hvor en glatt overflate her er foretrukket. Bakteriens intracellulære overlevelsesstrategier og interaksjon med vertens immunforsvar vil også påvirkes av GPL-innholdet i cellemembranen, hvor en ru overflate gir størst fordeler. GPL-innholdet hos bakterien vil altså være med på å avgjøre det kliniske utfallet av infeksjonen. Dette er grunnen til at *M. abscessus* complex ofte går fra å ha en glatt til en ru overflate i løpet av infeksjonsforløpet, da begge de fenotypiske variantene har sine fordeler på ulike stadier i infeksjonen. (3)

1.1.2.3 Kliniske funn

De kliniske funnene for *M. abscessus* complex kan variere avhengig av hvor infeksjonen er lokalisert i kroppen. Ved infeksjon i lungene kan pasienten undersøkes med røntgen og CT. Da er knuter, betennelse i bronkiolene og utposninger av bronkiene vanlige funn. Hulrom med økt bindevevsdannelse omkring kan også observeres. Dersom infeksjonen er lokalisert i huden, kan infeksjonen observeres som kalde abscesser, papler, pustler eller knuter på huden. Pasienter som får disse hudinfeksjonene, er gjerne pasienter som nylig har gjennomgått et kirurgisk inngrep eller postoperative pasienter på sykehus. Infeksjoner forårsaket av *M. abscessus* complex i sentralnervesystemet er sjeldent, men både meningitt og abscesser i hjernen kan forekomme ved en infeksjon med *M. abscessus* complex. (5)

1.1.2.4 Behandling

Behandling av infeksjoner forårsaket av *M. abscessus* complex kan være utfordrende da komplekset er en multiresistent bakterieart. Det er ønskelig å kunne identifisere bakteriens subspecies da det er en betydelig forskjell på subspeciens antimikrobielle mottakelighet for makrolider. Bakteriens ervervede resistens for makrolider er assosiert med to punktmutasjoner i *rrl*-genet og indusert resistens er assosiert med *erm(41)*-genet. Makrolider kan aktivere bakteriens *erm(41)*-gen som fører til at bakteriene induserer makrolidresistens. De fleste bakterieisolat som inneholder *M. abscessus* og *M. bolletii* induserer makrolidresistens ved eksponering. I motsetning har *M. massiliense* to delesjoner i *erm(41)*-

genet som gjør genet inaktivt og dermed bakterien mottakelig for makrolider. (7) Ved infeksjon forårsaket av *M. abscessus* complex vil identifisering av subspecien og makrolidresistensen være til stor fordel ved valg av behandling og for det kliniske utfallet av infeksjonen. Respons på behandling av infeksjon forårsaket av *M. massiliense* vil eksempelvis kunne være bedre enn ved behandling av *M. abscessus* og *M. bolletii* på grunn av det inaktiverede *erm(41)*-genet. (5)

Som regel må pasientene som er infisert av *M. abscessus* complex gjennomgå svært kraftige behandlinger. Etersom bakterien er multiresistent, kan løsningen ved blant annet hudinfeksjoner være amputasjon i kombinasjon med kraftige antibiotikakurer. Behandlingen er svært intens, og pasientene må ofte behandles med tre til fire ulike antibiotikakurer samtidig over flere måneder, noe som kan gi kraftige bivirkninger som døvhets og forandringer i bakteriesammensetningen i tarm. (8)

1.2 Arbeid med patogene mikrober på protection level 3 laboratorium

Risikoen en mikrobe utsetter oss for, vurderes i forhold til dens smitterisiko, alvorlighetsgraden på en infeksjon forårsaket av mikroben og etter hvor stor grad infeksjonssykdommen kan spre seg videre i samfunnet. På grunn av dette er det satt krav til tiltak som hindrer smitte ved oppbevaring og behandling av spesifikke svært smittsomme mikrober. Mikrobenes biologiske faktorer blir klassifisert etter fire risikonivåer som forteller oss noe om hvilket inneslutningsnivå mikroben må behandles etter. (9)

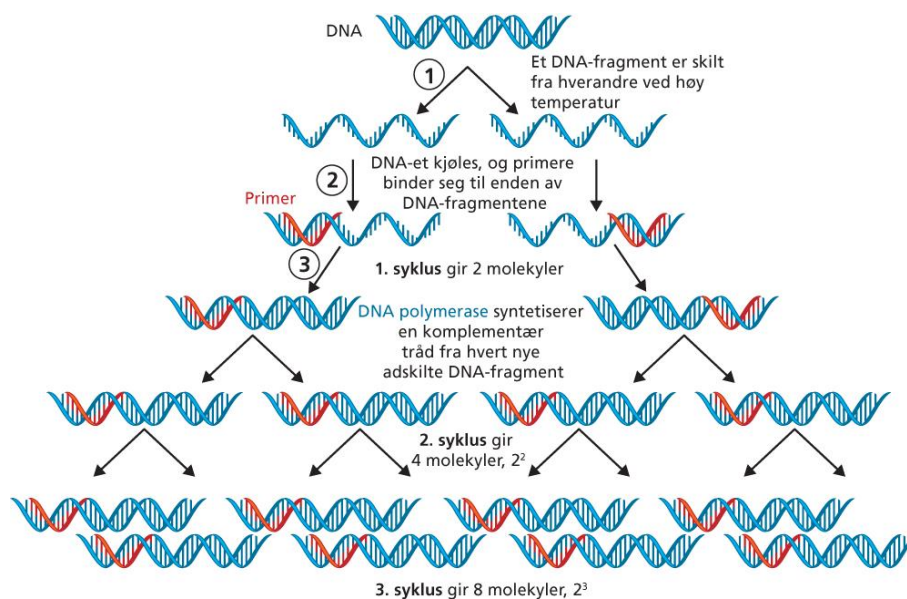
Mycobacterium tuberculosis er en bakterie som krever inneslutningsnivå 3, noe som tilsier at bakterien må behandles på protection level 3 (P3) laboratorium. Dette er laboratorier hvor det stilles høye krav til smittesikkerhet og det blant annet alltid benyttes smittevernustyr (typen utstyr varierer med arbeidet som gjennomføres). Det benyttes også både lufttrykk og luftfilter for å minimere sjansen for smitte til omgivelsene på utsiden av laboratoriet. P3 laboratorier har en sluse med ren sone hvor smittevernustyr appliseres før inngang og skitten sone hvor utstyr fjernes før utgang. De fleste mikrober, inkludert *M. abscessus* complex, krever kun nivå 2. Prøvemateriale som inneholder bakteriene kan altså behandles i et vanlig laboratorium i vanlig avtrekkskap. Likevel dyrkes alle prøver hvor det er mistanke om mykobakterier i et P3 laboratorium. Dette er fordi det ikke er mulig å skille mellom de ulike mykobakteriene før lenger ut i oppdykningsprosessen. Dermed behandles alle prøver hvor det mistenkes mykobakterier som om prøven inneholder *M. tuberculosis*, selv om den egentlige bakterien i prøven ikke nødvendigvis trenger sikkerheten som er knyttet til et P3 laboratorium. (9)

Prøvene dyrkes av bioingeniører ved laboratoriet i ett fast og ett flytende dyrkingsmedium. Det flytende mediet plasseres i et helautomatisk dyrknings-system kalt BACTEC MGIT, som detekterer eventuell oppvekst en gang hver time. Det faste mediet som benyttes kalles Løwenstein-Jensen medium. Her inkuberes prøvene i inntil åtte uker. Oppvekst på mediet blir farget med Ziehl-Neelsens fargemetode og mikroskopert. Ved mikroskopering kan det fastsettes om bakterien som gir oppvekst er en syrefast stav. Prøvene sendes deretter videre til ekstraksjon. (9)

1.3 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode som benyttes til å amplifisere og detektere DNA i virus og bakterier eller mutasjoner i disse, og er blant annet viktig for valg av behandling ved infeksjon hos pasienter. Dette gjøres ved å benytte spesifikke primere, DNA-polymerase, nukleotider og en tilpasset temperaturprofil slik at det dannes store mengder med kopier av ønskede områder på DNA-tråden fra små mengder arvemateriale. (10)

Amplifiseringen foregår i sykluser hvor hver syklus har ulike trinn med ulike temperaturer. (11)



Figur 2: De ulike trinnene i en PCR-reaksjon. Denaturering (punkt 1), hybridisering (punkt 2) og polymerisering (punkt 3). Bilde hentet fra (12).

Før PCR-reaksjonen starter, skjer det en initialisering hvor polymerasen aktiveres. Dette gjøres ved en temperatur på 94°C . Trinnene i PCR-reaksjonen er vist i Figur 2. I det første trinnet av PCR-reaksjonen holdes temperaturen ved 94°C og DNA-tråden denatureres ved at hydrogenbindingene mellom de to trådene i DNA-et blir brutt. DNA-et vil gå fra å være dobbeltrådet til å bli enkeltrådet. Dette vil gjøre det mulig for primere å binde seg i trinn to. Da vil hver enkeltråd fungere som et templat. For at primerne skal klare å binde seg optimalt

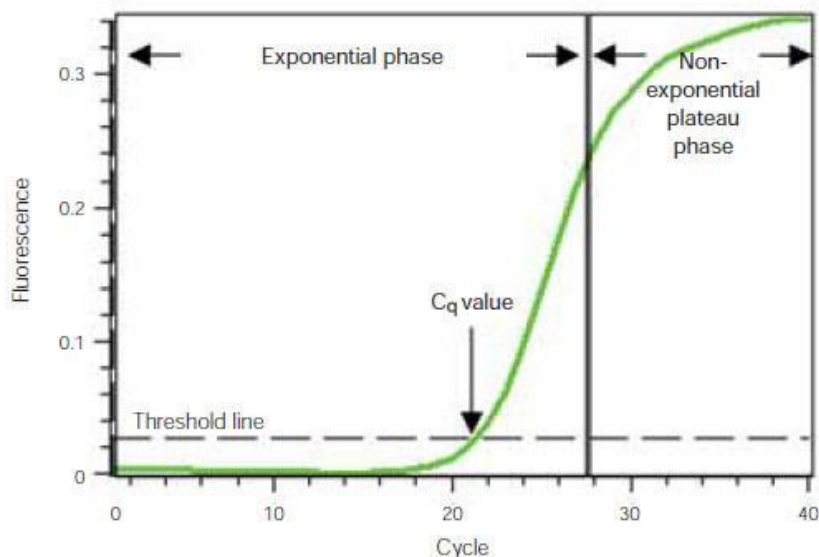
senkes temperaturen til 45-65°C (13), avhengig av hvilke primere som benyttes. (11) Primere er korte nukleotidsekvenser, kalt oligonukleotider, på mellom 15-30 basepar som binder seg til komplementære sekvenser på templattråden dersom sekvensen er til stede. Dette kalles annealing. I en PCR-reaksjon benyttes det to ulike typer primere, en forward og en reverse, som binder seg til komplementære nukleotidsekvenser på henholdsvis antisense- og sense-tråden i dobbeltrådet DNA (dtDNA). Etter primerne har bundet seg, vil temperaturen økes til 72°C, som er den optimale temperaturen for at DNA-polymerasen skal binde nukleotider fra 3'-enden av primeren. Primere er utgangspunktet for kjedeforlengelsen DNA-polymerasen danner og det syntetiseres derfra en ny DNA-tråd. Dette siste trinnet kalles polymerisering. Disse tre siste trinnene (denaturering, annealing og polymerisering) gjentas og det dannes kopier som er like den originale templattråden. For hver syklus dobles antall templattråder. Det vil si at for hver templattråd som var i prøven i utgangspunktet, vil det etter 20 sykluser, ved 100% effektivitet dannes 10^6 nye templattråder. Etersom prosessen ikke er 100% effektiv, trengs det flere sykluser for å kopiere opp nok DNA for kvantifisering. Dette varierer fra 25-40 sykluser, avhengig av hvor mye DNA det er i prøven fra start. (14)

PCR gjennomføres på hovedsakelig to måter, konvensjonell PCR og real-time PCR. Disse baseres på det samme reaksjonsprinsippet, men ved konvensjonell PCR vil PCR-produktet bli analysert ved bruk av gelelektroforese. Gelelektroforesen kan blant annet si noe om tilstedeværelsen eller fraværet av DNA-et som ble undersøkt. Ved real-time PCR kan mengden produkt monitoreres i sanntid, det vil si samtidig som amplifiseringen foregår ved å bruke fluorescerende fargestoffer eller fluorescerende prober. (15) Prober er kjente og korte nukleotidsekvenser bundet til en fluorofor, som er spesifikke for nukleotidsekvenser (target-DNA) i mikrobene som undersøkes. (10)

1.3.1 Real-time PCR

Real-time PCR er en type PCR hvor mengden DNA som amplifiseres, detekteres i sanntid. Dette er en semikvantitativ metode hvor resultatet gir en indikasjon på mengden DNA fra for eksempel mikroben som er funnet. Denne typen PCR skiller seg fra konvensjonell PCR ved at den kombinerer amplifiserings- og kvantifiseringstrinnet, noe som gjør metoden mer presis og sensitiv enn konvensjonell PCR. Det benyttes fluorescerende prober til å detektere mengden amplifisert produkt ved hybridiseringstrinnet i hver syklus. Probene fester seg mellom de spesifikke primerne på sekvensene som er ønskelig å undersøke. Det er dette som kalles kvantifisering. (10) Noen typer real-time PCR kombinerer annealing- og amplifiseringstrinnet i PCR-reaksjonen. Det kalles da en two-step real-time PCR. (16)

Registreringen av fluorescens skjer under forutsetningen av at reagenser som inneholder primere og prober er i overskudd, i tillegg til at prøven inneholder target-DNA. Økningen av fluorescens som sendes ut vil med disse forutsetningene være eksponentiell for hver syklus. (10) Fluorescensen måles ved hver syklus i PCR-reaksjonen og fremstilles som grafer av instrumentet. Positive reaksjoner angis med enheten cycle threshold (Ct) og tilsier antall sykluser hvor mengden fluorescens fra fluoroforene er større enn bakgrunnsfluorescensen i prøven. Positive reaksjoner kan også angis med enheten quantification cycle (Cq). Ct-verdien er omvendt proporsjonal med mengden target-DNA i prøven. Et positivt resultat bestemmes ut fra threshold-linjen. Denne kan justeres manuelt og betegner terskelverdien som må overstiges av prøvene for at de skal tolkes som positive og for at de skal få angitt en Ct-verdi. Prøver som ligger under denne terskelverdien vil regnes som negative og får ikke en Ct-verdi. (17) Etter analysering presenteres resultatene i et diagram som viser signalstyrken for hver syklus i PCR-reaksjonen, se Figur 3. Positive prøver får en sigmoid kurveform.



Figur 3: Amplifikasjonskurve der antall sykluser gjennomført er på x-aksen og den målte mengden fluorescenssignal er på y-aksen. Threshold-linjen, som tilsier terskelverdien, plasseres der det målte fluorescenssignalet i prøvene er høyere enn bakgrunnsfluorescensen. Cq-value viser punktet på kurven hvor det målte fluorescenssignalet passerer terskelverdien, og mengden målt fluorescenssignal tilsier en positiv prøve. Cq-verdien tilsvarer Ct-verdien. Nukleotidmengden i prøven som analyseres er omvendt proporsjonal med Ct-verdien målt for prøven. Den grønnfargede kurven illustrerer PCR-produktet. Bilde hentet fra (17)

1.3.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR er en PCR-metode hvor flere målsekvenser kan detekteres i en og samme prøve. Dette gjøres ved å bruke primere som er spesifikke for målsekvensene og ulike prober som skiller de ulike DNA-sekvensene fra hverandre. Fordelen med bruk av multiplex PCR er blant annet at mer informasjon kan hentes ut fra én prøve sammenlignet med en spesifikk PCR-metode, det er mindre tidkrevende og mindre kostbart. (18) Det finnes imidlertid noen

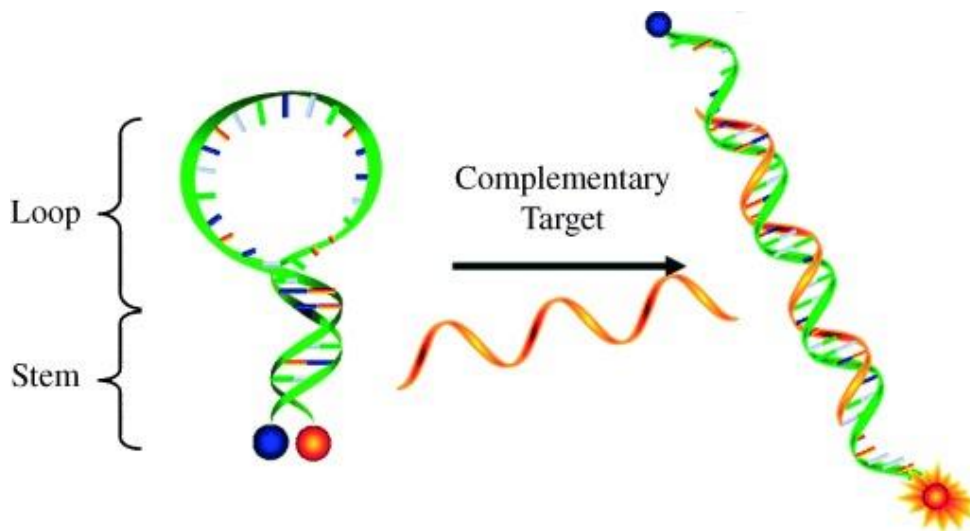
ulempen ved bruk av multiplex PCR. Det kan blant annet forekomme interferens mellom primere og prober i reaksjonsmiksen som benyttes ved analyse. Sensitiviteten kan også bli lavere ved bruk av multiplex PCR, sammenlignet med en spesifikk PCR-metode. (19)

1.3.3 Deteksjon av PCR-produkt

Det finnes to hovedmåter å måle den oppnådde fluorescensen fra PCR-produktet på. Ved den ene metoden benyttes det DNA-bindende fargestoffer som binder seg uspesifikt til dtDNA. Fargestoffet avgir et forsterket fluorescenssignal sammenlignet med hva det gir når det ikke er bundet. Et eksempel på et slikt fargestoff er SYBR Green I. Den andre metoden er probebasert. Eksempler på prober er FRET-, TaqMan- og molekylære beacon-prober. Probene har fluoroforer festet til seg som sender ut fluorescerende signal når de binder seg spesifikt til de ønskede sekvensene. Fordelen med probebasert PCR sammenlignet med DNA-bindende fargestoffer er at den er mer spesifikk. Fargestoffer binder seg uspesifikt til dtDNA og kan derfor binde seg til andre komponenter i prøvebrønnen enn det som er ønskelig. Dette kan blant annet være primere som har bundet seg til hverandre. Ved å bruke probebaserte metoder, vil spesifisiteten øke betydelig ettersom proben kun binder seg til target-DNA og ikke andre uspesifikke produkter. (20)(21)

1.3.3.1 Molekylær beacon

En molekylær beacon er en type probe med høy sensitivitet og spesifisitet som i tillegg til deteksjon av DNA, blir brukt til blant annet undersøkelser av enzymatiske prosesser og protein-DNA-interaksjoner. Når proben ikke er bundet til target-DNA er den formet som en loop, se Figur 4. Nukleotidsekvensen som er inni loopen, består av omtrent 10-30 nukleotider som er spesifikk for templattråden som skal påvises. På hver sin side av denne sekvensen er det komplementære basepar, bestående av kun C- og G-nukleotider, som er bundet til hverandre. Når disse nukleotidene er bundet til hverandre, vil nukleotidene i midten av proben være ubundet noe som gir proben loop-formen. På hver sin ende av DNA-sekvensen på proben finnes det en fluorofor og en quencher. Quencheren har som oppgave å hindre fluoroforen i å sende ut lys ved å absorbere lyset som blir sendt ut av fluoroforen. Når beacon-proben ikke er bundet til DNA, vil fluoroforen og quencheren være så nærme hverandre at fluoroforen ikke vil sende ut noe lyssignal. Dersom det er target-DNA til stede, vil nukleotidsekvensen i loopen binde seg til target-DNA, ettersom proben er mer stabil bundet enn i fri form. Dette fører til at de komplementære basene i proben vil løsne fra hverandre, avstanden mellom fluoroforen og quencheren blir større, og fluoroforen vil avgis fluorescens. (21)



Figur 4: Viser beacon-proben i fri form og bundet til target-DNA. Når proben er bundet, vil fluoroforen og quencheren ha stor nok avstand til at fluoroforen avgir fluorescens. Bilde hentet fra (21)

1.3.4 Effektivitetsanalyse

Effektivitetsanalyse er en undersøkelse som gjennomføres ved etablering av real-time PCR-metoder. Analysen illustrerer metodens evne til å amplifisere samtlige target-DNA i én syklus i en PCR-reaksjon uavhengig av konsentrasjonsnivå av DNA i bakterieisolat. En god spesifisitet og en høy prosentvis effektivitet på en PCR-metode tilsier at det er større muligheter for at selv svært små mengder target-DNA i en prøve amplifiseres og detekteres. Dette er grunnen til at effektivitetsanalyse en viktig del av kvalitetssikringen ved etablering av en ny metode. Teoretisk sett er det ønskelig at effektiviteten til nye analyser ligger på 100%, men i praksis tilstrebes en effektivitet på 90-110%. I teorien skal target-sekvensen dobles for hver syklus som gjennomføres ved PCR-metoden. Dersom effektiviteten til en analyse er for lav kan metoden optimaliseres ytterligere, ved at for eksempel annealing-temperaturen eller konsentrasjonen på reaksjonsmiksen endres. (22)

Med en effektivitet på 100%, forutsatt at alt target-DNA fordobles ved hver syklus i real-time PCR-metoden, vil det forventes en Ct-verdi-økning på 3,32 mellom hver av tifoldsfortynningene som analyseres ved en effektivitetsanalyse, se Formel 1.

$$\log_2 10 = \frac{\log_{10} 10}{\log_{10} 2} = 3,322 \quad (1)$$

Ved en effektivitetsanalyse dannes det en standardkurve for fortynningene i tifoldsfortynningene. Det beregnes også effektivitet (E), determinasjonskoeffisient (R^2) og stigningstall til standardkurven. Kurven dannes ved at Ct-verdiene til fortynningene plottes inn i et punktdiagram hvor den logaritmiske konsentrasjonen til parallellene som er oppgitt plasseres på x-aksen og de målte Ct-verdiene plasseres på y-aksen. Deretter vil det tilpasses

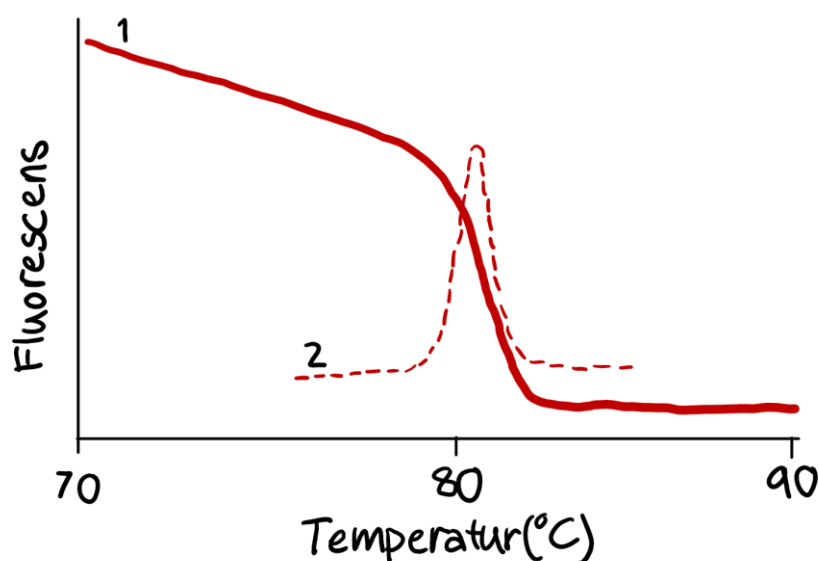
en trendlinje hvor stigningstallet er -3,32 dersom det er 100% effektivitet. Stigningstallet til kurven forteller den gjennomsnittlige endringen i Ct-verdi mellom fortyningene i tifoldsfortynningene. Determinasjonskoeffisienten sier noe om hvor godt punktene er plassert i diagrammet i forhold til trendlinjen. En koeffisient med verdi over 0,95 tilsier at det er god korrelasjon og overensstemmelse mellom Ct-verdiene til fortyningene i tifoldsfortynningene. (23)

1.3.5 Smeltepunktsanalyse

En smeltepunktsanalyse er en analyse som kan benyttes som en bekreftelse på funn som er har blitt gjort ved en PCR-analyse. Smeltepunktsanalysen gjøres etter at PCR-prosessen er utført. Fra en lav temperatur hvor PCR-produktet er dobbeltrådig eller proben er bundet til sin komplementære tråd, økes temperaturen gradvis slik at hydrogenbindingene brytes.

Smeltetemperaturen til en DNA-sekvens er den temperaturen hvor 50% av hydrogenbindingene er brutt. Fluorescensen i prøven måles samtidig som temperaturen økes. Fluorescensen kommer fra fluoroforen som finnes på proben benyttet i PCR-reaksjonen. Dersom SYBR Green I benyttes, vil det skje et fall i fluorescens når dtDNA-tråden denatureres. Dersom for eksempel en molekylær beacon-probe har blitt benyttet, vil det skje et fall i fluorescens når proben løsner fra target-DNA og går tilbake til sin opprinnelige form. Dette fordi proben ikke avgir fluorescens når den oppnår sin opprinnelige form.

I smelteanalysen måles fluorescensen per temperaturenheter og instrumentet danner en kurve som vist i Figur 5 (kurve 1). Figuren viser også en annen kurve (kurve 2) som tilsier den negativt deriverte av $\Delta\text{fluorescens}/\Delta\text{temperatur}$ fra kurven som dannes ved smelteanalysen. Toppen i denne kurven tilsier smeltepunktet til DNA-sekvensen av PCR-produktet (dtDNA) eller når 50% av proben har løsnet. (24)



Figur 5: Figuren viser et eksempel på et resultat fra en smeltepunktsanalyse. Kurve 1 viser en smeltekurve som dannes i en smelteanalyse. Kurve to tilsier den negativt deriverte av $\Delta\text{fluorescens}/\Delta\text{temperatur}$ av kurve 1. Toppen i kurve 2 tilsier smeltepunktet til DNA-sekvensen av PCR-produktet (dtDNA) eller når 50% av proben har løsnet fra DNA-sekvensen den er bundet til.

1.4 Hensikten med oppgaven

Analysemetodene som per dags dato benyttes ved St. Olavs hospital for å identifisere non-tuberkuløse mykobakterier (NTM) er ressurs- og tidkrevende metoder som omfatter *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktsanalyse og Sanger-sekvensering av genet *hsp65*. For å bekrefte hvilken bakterie og subspecies som er funnet må laboratoriet også sende prøven til Folkehelseinstituttets (FHI) laboratorium. Ved avdelingen for Medisinsk mikrobiologi (AMM) er det dermed ønskelig med egne effektive metoder som spesifikt kan påvise *M. abscessus* complex og skille de ulike subspeciene fra hverandre.

Resultatet av nye effektive PCR-metoder vil spille en betydelig rolle når det kommer til den infiserte pasientens behandling. *M. abscessus* complex er en patogen mikrobe som ofte blir oversett, spesielt når det kommer til hvor stor trussel bakterien kan være på befolkningens globale helse. Påvisningsmetodene som nå benyttes på verdensbasis mislykkes ofte med å identifisere *M. abscessus* complex eller subspeciene som ligger under denne arten. Bakterien blir ofte feildiagnostisert som *M. chelonae*, som utelukkende gir infeksjon i lungene og ikke i hud og bløtvev slik *M. abscessus* complex ofte gjør. Det er på grunn av dette viktig å ha spesifikke metoder slik at sykehuslaboratoriet kan påvise bakterien og subspeciene, da dette er avgjørende for hvilken behandling som skal gis til den infiserte pasienten. Slike spesifikke metoder vil kunne føre til at mer fokus havner på trusselen *M. abscessus* complex har på

kloden og at det dermed blir gjennomført mer forskning på blant annet behandling av infeksjon forårsaket av dette komplekset. (3)

Med dette behovet som grunnlag ble det gjennomført et litterært søk av overlege Kåre Bergh ved AMM, før etableringen av nye PCR-metoder for påvisning av *M. abscessus* complex subspeciene ble påbegynt. Artikkelen «A Molecular-Beacon-Based Multiplex Real-Time PCR Assay To Distinguish *Mycobacterium abscessus* Subspecies And Determine Macrolide Susceptibility» (7) beskriver to real-time PCR-metoder som kan benyttes til å skille *M. abscessus* complex subspeciene fra hverandre ved hjelp av molekylære beacon-prober.

Med artikkelen (7) som bakgrunn ble det avgjort at det var ønskelig å forsøke å etablere en multiplex PCR-metode for påvisning av *M. abscessus* og *M. massiliense* og en spesifikk real-time PCR-metode for påvisning av *M. bolletii*. Disse metodene vil da i teorien raskt kunne påvise *M. abscessus* complex og skille mellom de ulike subspeciene, noe som vil være til fordel for pasientens behandling.

Problemstilling:

Er det mulig å etablere to real-time PCR-metoder for påvisning og differensiering av subspeciene til *Mycobacterium abscessus* complex ved bruk av molekylære beacon-prober?

2 Materiale og metode

Ved etablering av real-time PCR-metoder for påvisning av *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii* ble det utført *Mycobacterium* genus PCR med påfølgende smeltepunktsanalyse, Sanger-sekvensering, kapillærelektroforese, metodeoptimalisering, effektivitetsanalyse, spesifisitetsanalyse og bestemmelse av deteksjonsgrense. Instrumenter, prøvemateriale og reagenser, samt metoder for gjennomføring av disse analysene er beskrevet i dette kapitlet.

2.1 Prøvemateriale

Det ble benyttet 43 pasientprøver hvor alle var hentet fra avdelingens prøvearkiv. Prøvene var på forhånd ekstrahert før utprøving av PCR-analyse av bioingeniører ved AMM.

Pasientprøvene besto av eluat ekstrahert fra bakterieisolat. Før ekstraheringen ble celleveggen til bakteriene i prøvematerialet destruert ved bruk av varmebehandling og tilsats av enzymet Proteinase K (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich). Deretter ble ekstraheringen gjennomført ved bruk av instrumentet NucliSens® easyMAG® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrike). Se vedlegg 7.9 for fremgangsmåte. Ni av pasientprøvene hadde tidligere blitt bekreftet som *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* eller *M. gordonae*. Oppvekst av *M. abscessus* complex var bekreftet av FHI hos de resterende 34 pasientprøvene, uten at den spesifikke subspecien var blitt spesifisert. De 34 bakterieisolatene som inneholdt *M. abscessus* complex ble hentet fra laboratoriets frysearkiv, hvor prøver som er positive for mykobakterier fryses i ti år. Det ble analysert prøver hentet fra 2012 til og med 2022. Subspesiene til disse 34 analyserte bakterieisolatene ble bekreftet etter søk i laboratoriets arkiv for sekvenseringsresultater.

2.2 Kontrollmateriale

Alle PCR-oppsettene ble kvalitetssikret ved hjelp av kontrollmateriale. Da laboratoriet til avdelingen ikke allerede hadde en metode for differensiering mellom *M. abscessus* complex subspeciene ble det benyttet fortynnede versjoner (1:10) av oppvekststammer fra de ulike subspeciene som positivt kontrollmateriale. Disse var bestilt inn fra Culture Collection University of Gothenburg (CCUG), se Tabell 1. Molecular Grade Water (MGW) ble benyttet som negativt kontrollmateriale for å kontrollere at det ikke var andre komponenter i reaksjonsmiksen som interfererte med metodene og som eventuelt kunne gi falske positive resultater.

Tabell 1: Bakteriestammene som ble benyttet som positivt kontrollmateriale i prosjektet og deres respektive identifikasjonsnummer bestilt inn fra Culture Collection University of Gothenburg (CCUG).

Bakteriestamme	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium massiliense</i>	<i>Mycobacterium bolletii</i>
Identifikasjon	CCUG 20995T	CCUG 48898T	CCUG 50184T

2.3 Bakteriepanel til spesifisitettsanalyse

PCR-metodene ble utprøvd mot to ulike bakteriepanel for å undersøke at det ikke forekom positivt resultat for andre bakterier enn *M. abscessus* subspeciene. Det ene panelet er et generelt bakteriepanel bestående av bakterier som er vanlige årsaker til infeksjon hos mennesker. Det andre panelet er et spesifikt luftveispanel bestående av bakterier som normalt gir luftveisinfeksjoner. Disse består av totalt 23 ulike bakteriestammer som er satt sammen av AMM. Det generelle bakteriepanelet og luftveispanelet er presentert i henholdsvis Tabell 2 og Tabell 3.

Tabell 2: Bakterieartene og stammenumrene til bakteriene som inngår i det generelle bakteriepanelet.

Bakterieart	Stamnummer
<i>S. aureus</i>	CCUG 15915
<i>S. pyogenes</i>	CCUG 33061
<i>S. agalactica</i>	CCUG 4208
<i>H. influenzae</i>	CCUG 33775
<i>C. albicans</i>	CCUG 19915
<i>S. pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>E. coli</i>	CCUG 37382
<i>K. pneumoniae</i>	CCUG 56233
<i>E. cloacae</i>	CCUG 6323T
<i>P. aeruginosa</i>	CCUG 17619
<i>E. faecalis</i>	CCUG 9997
<i>S. anginosus</i>	CCUG 223
<i>S. epidermidis</i>	CCUG 23118
<i>N. meningitidis</i> (gr. B)	CCUG 23101
<i>M. tuberculosis</i>	CCUG 25177
<i>L. pneumophila</i>	CCUG 33058

<i>Bacillus cereus</i>	CCUG 36925
<i>Clostridium perfringens</i>	CCUG 1795T
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CCUG 9994T

Tabell 3: Bakterieartene og stamnumrene til bakteriene som inngår i luftveis-bakteriepanelet.

Bakterieart	Stamnummer
<i>M. pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>C. pneumoniae</i>	MBC011
<i>B. pertussis</i>	MBC008
<i>M. catarrhalis</i>	CCUG 353

2.4 Valg av primer- og probesekvenser

Ved etablering av metoder for påvisning av *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii* ble det tatt utgangspunkt i artikkelen (7) ved innkjøp av primer- og probesekvenser. Sekvensene for primerne og probene til metoden for multiplex PCR og spesifikk PCR baseres på regioner i henholdsvis genene *MAB2830* og *MAB2248* og ble bestilt inn fra produsenten TIB® Molbiol. Ved bruk av disse primerne vil PCR-produktet fra multiplex PCR-metoden bestå av 115 basepar (bp) for både *M. abscessus* og *M. massiliense*, og produktet fra den spesifikke PCR-metoden vil bestå av 76 bp for *M. bolletii*. PCR-produktet i multiplex PCR-metoden er basert på GenBank Accession CU458896 for *M. abscessus* og GenBank Accession CP022230 for *M. massiliense*. PCR-produktet i den spesifikke PCR-metoden er basert på GenBank Accession AP018436 for *M. bolletii*.

Probene benyttet for påvisning av *M. abscessus* og *M. bolletii* er merket med fluoroforen Fluorescein Amitide (FAM) og quencheren Blackhole Quencher 1 (BHQ-1), og proben benyttet for påvisning av *M. massiliense* er merket med fluoroforen Texas Red (TXR) og quencheren Blackhole Quencher 2 (BHQ-2). Ved å benytte to ulike fluoroforer i metoden for multiplex PCR, vil det være enkelt å skille mellom prøver som er positive for *M. abscessus* og *M. massiliense*. Primer- og probesekvensene benyttet til metoden for multiplex PCR og spesifikk PCR er beskrevet i henholdsvis Tabell 4 og Tabell 5.

Primere og prober ble mottatt som tørrstoff og fortynnet med MGW til 100 µM av fagbioingeniør ved AMM. Det ble laget bruksløsninger av primerne og probene hvor de ble

fortynnet med MGW til henholdsvis 12 μ M og 8 μ M. Bruksløsningene ble benyttet ved tillaging av reaksjonsmikser.

Tabell 4: Primere og prober basert på genområdet MAB2830 som benyttes til multiplex real-time PCR-metode for påvisning av *M. abscessus* og *M. massiliense*

Primer/probe	Sekvens (5'-3')
<u>Forward</u> MAB2830_F (TIB® Molbiol)	CCT CAT CGA GGA CGG TCA GA
<u>Revers</u> MAB2830_R (TIB® Molbiol)	CAC GAA TCC GGG CAG CAA TA
<u>MB Probe FAM</u> MAB2830abs_MB (TIB® Molbiol)	6FAM - CCG TCG CGA GGC CGG CAT CGG CGC ACG ACG G - - BH Q1
<u>MB Probe TXR</u> MABM2830mas_M B (TIB® Molbiol)	TEX - CCG TCG GAA GCT GGT ATC GGT CCA GGC GAC GG - - BHQ 2

Tabell 5: Primere og prober basert på genområdet MAB2248 som benyttes til spesifikk real-time PCR-metode for påvisning av *M. bolletii*

Primer/probe	Sekvens (5'-3')
<u>Forward</u> MAB2248_F (TIB® Molbiol)	GTG ACC GGT CTC GAT CAG TT
<u>Revers</u> MAB2248_R (TIB® Molbiol)	CAT TGT CTG GCG TCA ATG GC
<u>MB Probe FAM</u> MAB2248bol_MB (TIB® Molbiol)	6FAM - CCG TGC CTC GGG AAC CGG ATG ACT CGA CGG - - BHQ1

2.5 Reaksjonsmikser til real-time PCR

Ved analysering av de ulike subspeciene, ble det utført en multiplex real-time PCR for påvisning av *M. abscessus* og *M. massiliense* og en spesifikk real-time PCR for påvisning av *M. bolletii*. Til de ulike analysene ble det laget tilhørende reaksjonsmikser bestående av PerfeCTa® Multiplex qPCR SuperMix (Quantabio), primere, prober og MGW.

Konsentrasjonene som ble benyttet til de ulike primerne og probene er presentert i Tabell 6. Disse ble bestemt etter å ha tatt utgangspunkt i det som ble presentert i artikkelen (7).

Tabell 6: Tabellen viser hvilke primere og prober som ble benyttet i reaksjonsmiksen for multiplex PCR og spesifikk PCR, samt de ulike primer- og probekonsentrasjonene som ble benyttet i reaksjonsmiksen.

	Multiplex PCR		Spesifikk PCR	
	Navn på primer/probe	Konsentrasjon (nM)	Navn på primer/probe	Konsentrasjon (nM)
Primer				
Forward	MAB2830_F	250	MAB2248_F	250
Reverse	MAB2830_R	250	MAB2248_R	250
Probe				
FAM	MAB2830abs_MB	500	MAB2248bol_MB	500
Texas Red	MABM2830mas_MB	500	-	-

Analyseringene ble utført med Hard-Shell PCR Plates (Bio-Rad Laboratories) (hvite plater med hvite brønner) på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler) (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Alle analysene som ble utført på CFX96™ benyttet programmet Perfecta 2step™ 60, med unntak av temperaturoptimalisering og amplifiseringen av PCR-produkt benyttet til Sanger-sekvensering. Se Vedlegg 7.10 for programmer som benyttes på dette instrumentet. Dette programmet, i tillegg til de andre Perfecta-programmene, er tilpasset analyseoppsett hvor reagenset PerfeCTa® Multiplex qPCR SuperMix blir benyttet. Med unntak av primere, prober og templat-DNA, inneholder reagenset alle komponenter som trengs for å utføre en PCR-reaksjon, inkludert inaktivert AccuStart™ Taq DNA polymerase (Quantabio).

2.6 *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktanalyse

Til påvisning av *M. abscessus* complex blir det ved AMM per dags dato benyttet en *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktanalyse, i tillegg til en Sanger-sekvensering av *hsp65*-genet som bekrefter resultatet fra smeltepunktanalysen. Smeltepunktanalysen benyttes til å skille og identifisere *M. tuberculosis* og andre mykobakterier, men er ikke spesifikk nok til å identifisere *M. abscessus* complex subspecies. Det ble derfor gjennomført *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktanalyse for å illustrere egnetheten denne metoden har til å påvise *M. abscessus* complex subspecies. Analysen ble utført av fagansvarlig bioingeniør ved AMM på instrumentet LightCycler® 2.0 (Roche, Basel, Sveits). Fremgangsmåten til gjennomføring av analysen er beskrevet i «EQS: *Mycobacterium* genus real-time PCR» (25).

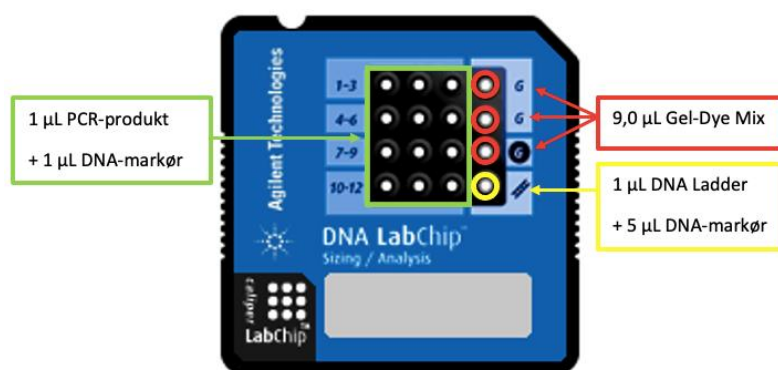
2.7 Sanger-sekvensering

Som en kontroll på at de innkjøpte kontrollstammene var korrekte, ble det gjennomført Sanger-sekvensering på genskvensen som koder for 65-kDa heat shock protein, *hsp65*. Sanger-sekvensering er en nøyaktig metode for bestemmelse av nukleotidsekvenser i DNA og benyttes blant annet til genetisk bestemmelse av ulike bakterier. (13) Sekvenseringen ble utført av bioingeniør ved AMM. Før sekvensering ble det utført en PCR-reaksjon med smeltepunktsanalyse på CFX96™ på programmet EvaGreenHSP65, hvor PCR-produktet ble benyttet videre til sekvensering. PCR-produktet ble rensset for ubundne komponenter og sekvensert på instrumentet C1000™ touch Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA). Sekvenseringsproduktet ble videre analysert ved kapillærelektroforese på instrumentet Applied Biosystems™ 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Fremgangsmåten til rens av PCR-produkt og oppsett av sekvenseringsreaksjon er hentet fra «EQS: Mykobakterier, identifikasjon ved hsp65 PCR og sekvensering» (26).

2.8 Kapillærelektroforese

Ved etablering av metodene var det ønskelig å undersøke om det ble amplifisert target-DNA i PCR-reaksjonene. Ved å utføre en kapillærelektroforese kunne det kontrolleres om fluorescenssignalet som ble målt under analysene ikke kom fra uspesifikke bindinger mellom primere og prober, men fra bindinger mellom probe og amplifisert target-DNA. Kapillærelektroforesen ble gjennomført på Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, USA) av fagbioingeniør ved AMM.

Til kapillærelektroforesen ble det benyttet PCR-produkt fra PCR-reaksjoner av bakterieisolat fra kontrollstammene med multiplex PCR-metode og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Kapillærelektroforesen ble utført i en DNA LabChip (Agilent Technologies) på programmet DNA 7500. Ved dette programmet kan nukleotidsekvenser fra 100-7500 bp analyseres. Chipen består av totalt 16 brønner hvor 12 benyttes til 1 µL prøvemateriale, i tillegg til egne brønner for tilsats av 9,0 µL Gel-Dye mix (Agilent Technologies), 5 µL DNA Marker (Agilent Technologies) og 1 µL DNA Ladder (Agilent Technologies), se Figur 6. Fremgangsmåten for tillaging og analysering med DNA LabChip på Agilent 2100 Bioanalyzer er beskrevet i «Agilent DNA 7500 and DNA 12000 – Kit Guide» (27), manual fra Agilent Technologies.



Figur 6: DNA LabChip til analysering på Agilent 2100 Bioanalyser. Figuren viser tilsats av reagens/prøve med tilhørende volum.

2.9 Metodeoptimalisering

Det ble gjennomført optimalisering av probekonsentrasjoner og annealing- og polymeriseringstemperatur for å undersøke om konsentrasjonene og temperaturene som ble nevnt i artikkelen måtte justeres. Optimaliseringen av probekonsentrasjoner ble utført med bakterieisolat fra kontrollstammene hvor alle probene ble analysert med konsentrasjonene 250 nM og 500 nM. Probekonsentrasjonene er presentert i Tabell 6.

Temperaturgradientsanalysen ble utført ved å analysere bakterieisolat fra kontrollstammene ved åtte ulike temperaturer mellom 50°C og 60°C. Optimaliseringen av probekonsentrasjoner og annealing- og polymeriseringstemperatur ble gjennomført med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™.

2.10 Effektivitetsanalyse

Det ble gjennomført en effektivitetsanalyse ved at det ble satt opp tifolds fortynningsrekker av bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii*.

Bakterieisolatene ble analysert med fortynningsnivåene 1:10-1:10⁵ med tre paralleller for hvert nivå med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Ved oppsett av analysen ble hvert av fortynningsnivåene satt som standarder i programvaren til instrumentet, slik at ble generert en standardkurve ut fra resultatene fra analysene. Programvaren benytter standardkurven til å beregne metodenes effektivitet, kurvens determinasjonskoeffisient og kurvens stigningstall.

2.11 Spesifisitetanalyser

Det ble gjennomført spesifisitetanalyser på tre ulike sammensetninger av bakterieisolat; to bakteriepanel, 9 bakterieisolat som tidligere er påvist som andre mykobakterier enn *M. abscessus* complex og 34 bakterieisolat som tidligere har blitt identifisert som *M. abscessus*

complex. Spesifisitetsanalysene ble gjennomført med bakterieisolat fra kontrollstammene med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™.

2.12 Deteksjonsgrense

Metodenes deteksjonsgrenser sier noe om hvor mange bakterier som må være til stede i prøven for at analysene skal gi et positivt resultat og gir en indikasjon på metodenes sensitivitet. Deteksjonsgrensene for metodene ble anslått ved å utføre PCR-reaksjoner med tifoldsfortynningsrekker med paralleller av bakterieisolat fra kontrollstammene. Analysene ble utført ved bruk av multiplex og spesifikk PCR-metode for de tre kontrollstammene på CFX96™. Bakterieisolat fra kontrollstammen til *M. abscessus* ble analysert med tifoldsfortynninger fra 1:10 – 1:10⁶ med tolv paralleller for de siste fire fortynningene. Bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. massiliense* og *M. bolletii* ble analysert med tifoldsfortynninger fra 1:10 – 1:10⁷ med tolv paralleller for de siste fem fortynningene.

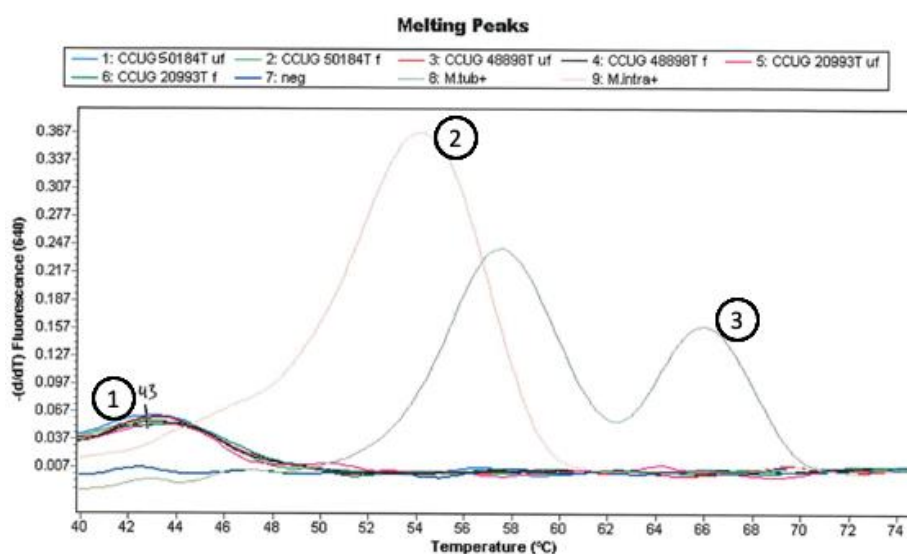
Videre ble instrumentet NanoDrop™ 1000 Spectrofotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) benyttet til bestemmelsen av konsentrasjonen til DNA-molekyler i bakterieisolat fra kontrollstammene. 1,5 µL ufortynnet bakterieisolat fra kontrollstammen til *M. abscessus* og 1,5 µL fortynnet (1:10) bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. massiliense* og *M. bolletii* ble brukt for hver måling. Konsentrasjonen av DNA-molekyler i bakterieisolat og kjent genomstørrelse for bakteriene ble benyttet til å beregne antall DNA-molekyler i bakterieisolat fra kontrollstammene. Target-genet for PCR-reaksjonen finnes som én kopi i hvert av bakterienes genom og antallet DNA-molekyler tilsvarer dermed antall bakterier i de ufortynnede bakterieisolatene til kontrollstammene. Et estimat av metodenes deteksjonsgrenser ble bestemt ved å beregne antall DNA-molekyler i den høyeste fortynningen hvor alle parallellene for kontrollstammene ble positive. For at metodene skal ha en god sensitivitet burde deteksjonsgrensen ligge under 100 DNA-molekyler.

3 Resultater

I dette kapittelet vil resultater av *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktsanalyse, Sanger-sekvensering, kapillærelektroforese, optimalisering av probekonsentrasjoner og temperaturer i PCR-syklusen, effektivitetsanalyse, spesifisitetsanalyse og bestemmelse av deteksjonsgrense presenteres.

3.1 *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktsanalyse av positive kontrollstammer

Dersom det er mistanke om mykobakterier i en prøve benytter AMM per dags dato analysen *Mycobacterium* genus real-time PCR med påfølgende smeltepunktsanalyse for å påvise og identifisere mykobakterier. Noen mykobakteriearter kan identifiseres ved at de har egne karakteristiske smeltepunkt. Dette gjelder ikke for alle artene, inkludert *M. abscessus* complex og det må dermed videre gjøres sekvensering dersom resultatet er usikkert. For å illustrere egnetheten PCR-analysen har til å påvise *M. abscessus* complex, ble det gjennomført *Mycobacterium* genus real-time PCR med påfølgende smeltepunktsanalyse av bakterieisolat fra kontrollstammene. Analysen ble gjennomført på instrumentet LightCycler 2.0. Bakterieisolat som inneholdt *M. intracellulare* og *M. tuberculosis* ble benyttet som positive kontroller. Resultatet av smeltepunktsanalysen er presentert i Figur 7.



Figur 7: Resultater fra *Mycobacterium* genus real-time PCR med smeltepunktsanalyse på instrumentet LightCycler® 2.0. Kontrollstammene CCUG 50184T tilsvarende *M. boletii*, CCUG 48898T tilsvarende *M. massiliense* og CCUG20995T tilsvarende *M. abscessus*. Kurvene viser smeltepunktene til kontrollstammene (1) og de positive kontrollene *M. intracellulare* (2) og *M. tuberculosis* (3).

Kurvene i Figur 7 viser smeltepunktskurvene til de positive kontrollene og en ansamling av svært svake smeltepunktskurver ved ca. 43-44°C, hvor stammene med subspecies av *M.*

abscessus complex befinner seg. Disse bakteriene har for lave smeltepunkt til at genus PCR-metoden er egnet til å fange dem opp med god sikkerhet. Med dette som grunnlag er det ikke mulig å bekrefte at bakteriestammene som ble analysert er *M. abscessus* complex, da smeltepunktsskurvene til bakteriene er svake og ved en lav smeltepunktstemperatur. Metoden er dermed ikke godt egnet til å analysere bakterieisolat som inneholder *M. abscessus* complex.

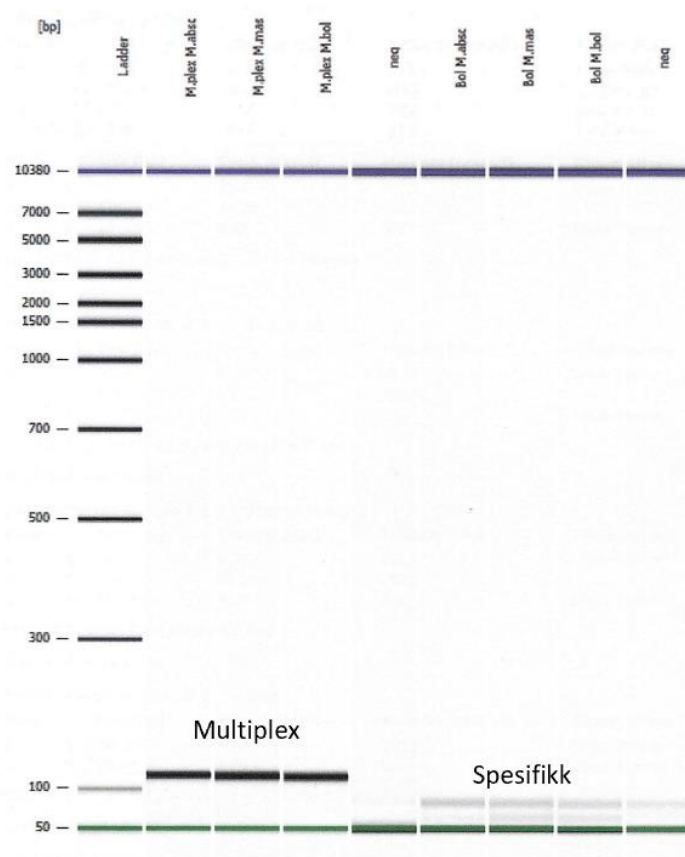
3.2 Sanger-sekvensering av kontrollstammer (*hsp65*)

For å kontrollere at de innkjøpte kontrollstammene var de korrekte *M. abscessus* complex subspeciene, ble det utført en Sanger-sekvensering. Det ble utført sekvensering på *hsp65*-genet, som per dags dato er metoden som benyttes for identifisering av *M. abscessus* complex. Denne gensekvensen finnes som ulike varianter i alle mykobakterier og kan derfor benyttes til å skille de ulike mykobakteriene og subspeciene fra hverandre. (28) Til sekvensering ble det benyttet PCR-produkt fra PCR-analyser med smeltepunktanalyse hvor multiplex og spesifikk PCR-metode ble benyttet. PCR-analysene ble utført med bakterieisolat fra kontrollstammene på CFX96™ på programmet EvaGreenHSP65. Sekvenseringen ble utført på Biorad Thermal cycler C1000 og sekvenseringsproduktet ble videre analysert ved kapillærelektroforese på Applied Biosystems™ 3500xL Genetic Analyzer. Resultatet fra sekvenseringen ble sammenlignet med kjente nukleotidsekvenser som ligger lagret i databaser, ved hjelp av verktøyet Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Ved bruk av BLAST blir resultatet presentert ut fra hvilke nukleotidsekvenser til mikrober i databasen de amplifiserte DNA-sekvensene er mest homologe med. Kontrollstammen til *M. abscessus* fikk 100% homologi med *M. abscessus*. Dette bekrefter at bakteriestammen er *M. abscessus*. Ved sekvensering av kontrollstammene til *M. massiliense* og *M. bolletii* ble ikke sammensettingen av sekvensene optimal, likevel viste kontrollstammene høyest homologi til henholdsvis *M. massiliense* og *M. bolletii*.

3.3 Kontroll av PCR-produkt for kontrollstammer ved bruk av kapillærelektroforese

I en PCR-reaksjon kan det forekomme uspesifikke og uønskede reaksjoner som kan føre til falsk positive resultater. For å fastslå at det var det amplifiserte target-DNAet som ble detektert i brønnene ved analysering med metodene, ble det gjennomført kapillærelektroforese. Kapillærelektroforesen kontrollerer dermed at fluorescenssignalet som måles under PCR-analysene ikke kommer av kryssbindinger mellom probene og primerne, men fra binding mellom probe og amplifisert target-DNA.

Til kapillærelektroforese ble det benyttet PCR-produkt fra en PCR-reaksjon av bakterieisolat fra alle kontrollstammene utført på CFX96™ med metode for multiplex PCR og spesifikk PCR. Kapillærelektroforese ble utført på instrumentet Agilent 2100 Bioanalyzer. Deteksjonen av nukleotidsekvensene er basert på laserindusert fluorescensdeteksjon hvor fluorescerende fargemolekyler binder seg til nukleotidsekvensene i prøven. Det er altså ikke probene i reaksjonsmiksen som sender ut signal som registreres, slik det gjøres ved real-time PCR. Under analysen ble det benyttet interne og eksterne størrelsesmarkører. Disse ble benyttet til bestemmelsen av størrelsen på nukleotidsekvensene i PCR-produktet. (29) Resultatene fra kapillærelektroforese er presentert i Figur 8.



Figur 8: Resultater fra utført kapillærelektroforese på instrumentet Agilent 2100 Bioanalyzer. Kontrollstammene og de negative kontrollene har hver sin merkede kolonne. Den eksterne størrelsesmarkøren (Ladder) fungerer som en referanse og kan observeres i kolonnen helt til venstre hvor den illustrerer ulike nukleotidsekvenser og deres størrelse. De ulike metodene som er benyttet til å analysere kontrollstammene er markert over båndene.

Det ble observert bånd for alle kontrollstammene, både for de som ble tilsatt multiplex reaksjonsmiks og de som ble tilsatt spesifikk reaksjonsmiks. Det vil si at target-DNA fra alle kontrollstammene ble amplifisert ved begge metodene og at primerne som blir benyttet i metodene amplifiserer DNA fra alle subspeciene og ikke bare fra subspeciene metodene er

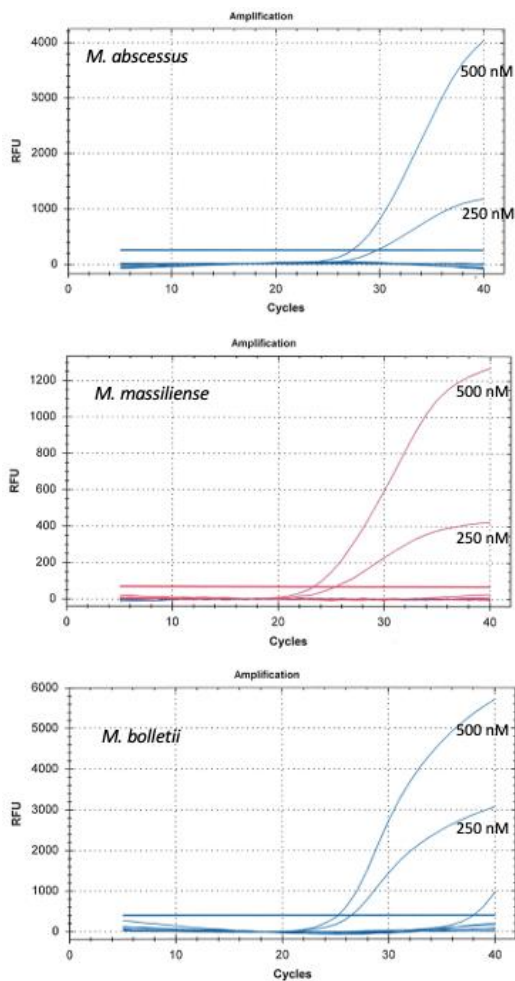
ment til å påvise. Dette tyder på at det kun er probene som er spesifikke for de enkelte subspeciene.

Resultatene fra kapillærelektroforesen viste at PCR-produktene fra multiplex PCR metoden besto av 118 bp og 117 bp for henholdsvis *M. abscessus* og *M. massiliense* og at PCR-produktet fra den spesifikke metoden besto av 81 bp for *M. bolletii*. Som beskrevet i Kapittel 2.4 skal PCR-produktene ved analysering med multiplex PCR metoden bestå av 115 bp for både *M. abscessus* og *M. massiliense*, og PCR-produktet i den spesifikke metoden bestå av 76 bp for *M. bolletii*. Ved å gå ut fra dette som fasit og at estimatene fra Agilent 2100 Bioanalyser er innenfor en feilmargin på 5-10%, kan det virke som at det er de korrekte DNA-sekvensene som amplifiseres ved analysering med metodene.

3.4 Probe- og temperaturoptimalisering av metodene

3.4.1 Optimalisering av probekonsentrasjoner

For å undersøke om probekonsentrasjonene trengte justering, ble det utført analyser med to ulike probekonsentrasjoner på bakterieisolat fra de tre kontrollstammene. Det ble tatt utgangspunkt i artikkelen (7) hvor ble det benyttet 500 nM FAM-probe og 250 nM Texas Red-probe i reaksjonsmiksen til multiplex PCR-metoden og 500 nM FAM-probe i reaksjonsmiksen til den spesifikke PCR-metoden. Analysen ble dermed gjennomført ved å benytte probekonsentrasjonene 250 nM og 500 nM for hver av probene i både metoden for multiplex PCR og spesifikk PCR. Dette ble utført på instrumentet CFX96™. Resultatet for utprøvingen av probekonsentrasjoner med bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii* er presentert i Figur 9. Analysene hvor reaksjonsmiks med probekonsentrasjonen 500 nM ble benyttet, ga lavere Ct-verdi og høyere signalstyrke enn analysene hvor reaksjonsmiks med probekonsentrasjonen 250 nM ble benyttet. Valgt probekonsentrasjon på 500 nM for FAM-prober og 500 nM for Texas Red-probe ga best resultater og ble benyttet videre i prosjektet.



Figur 9: Analysering med to ulike konsentrasjoner (250 nM og 500 nM) for probene til *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii*. Analysene ble utført med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™.

3.4.2 Temperaturoptimalisering

I artikkelen (7) ble det beskrevet at annealing- og polymeriseringstrinnet i PCR-reaksjonene ble utført ved 60°C. For å undersøke om det var nødvendig å justere denne temperaturen, ble det utført en temperaturgradientanalyse hvor annealing- og polymeriseringstrinnet skjer med ulike temperaturtrinn. Temperaturgradienten ble også utført for å undersøke om det ville forekomme uspesifikke bindinger i PCR-reaksjonen ved lavere temperaturer enn 60°C, ettersom dette hyppigere oppstår ved lavere temperaturer. Ved analysering ble bakterieisolat fra de tre kontrollstammene analysert med åtte ulike temperaturer fra 50°C til 60°C.

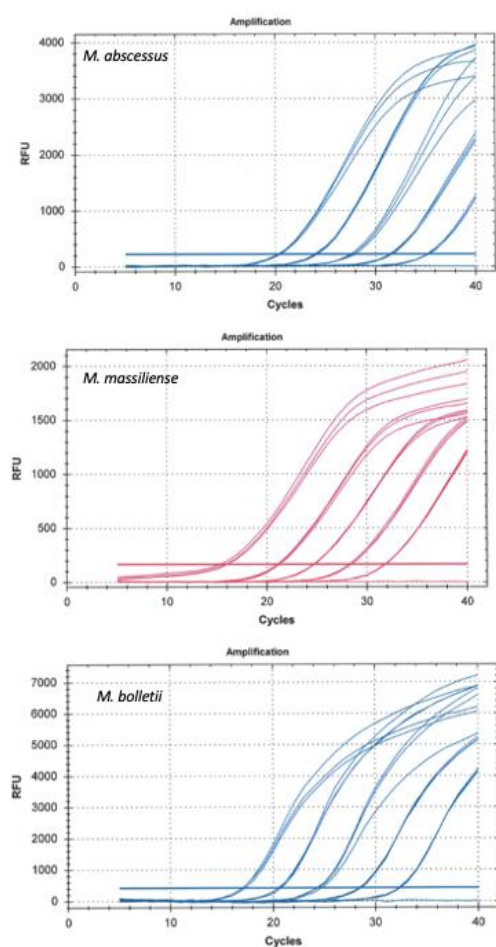
Analysene ble utført med multiplex og spesifikk PCR-metode på instrumentet CFX96™.

Resultatet viste at høyere temperaturer ga en trend i retning lavere Ct-verdier og ga ingen indikasjon på at det forekom uspesifikke bindinger i PCR-reaksjonene ved lavere temperaturer da det ikke ble observert falsk positive resultater. Resultatet ga ikke grunnlag for å justere temperaturen i annealing- og polymeriseringstrinnet fra det som var beskrevet i artikkelen (7) og det ble benyttet 60°C ved videre analysering.

3.5 Effektivitetsanalyse

Effektiviteten til metodene ble undersøkt som en oppfølging av optimaliseringen av probekonsentrasjoner og annealing- og polymeriseringstemperatur. Dette ble gjennomført for å kontrollere at optimaliseringen av metodene var effektiv nok til at metodene kunne benyttes videre. Analysen ble også gjennomført for å undersøke om metoden var sensitiv nok til å amplifisere bakterieisolat som inneholder ulike mengder target-DNA.

Effektivitetsanalysen ble gjennomført ved å analysere tifolds fortynningsrekker med tre paralleller for hvert fortynningsnivå av bakterieisolat fra kontrollstammene. Analysen ble utført med fortyningene 1:10-1:10⁵ med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Ved oppsett av analysen på instrumentet ble hver fortykning satt som en standard, slik at programvaren på instrumentet kunne generere en standardkurve for hver av kontrollstammene ut fra resultatene. Resultatene fra effektivitetsanalysen er vist i Figur 10 og Tabell 7.



Figur 10: Resultater fra effektivitetsanalyse analysert med multiplex og spesifikk PCR-metode på instrumentet CFX96™. Kurvene har fem hovedområder hver hvor det er tre grafer i hvert av områdene, dette tilsier fem ulike fortynningsnivåer (1:10-1:10⁵) med de tre parallellene for hvert fortynningsnivå.

Alle tifoldsfortynningene til de tre kontrollstammene fikk amplifisert PCR-produkt ved analysering, noe som indikerer at sensitiviteten til metodene er god selv ved variasjoner i mengde target-DNA i brønnene.

Tabell 7: Tabellen viser beregnet effektivitet, determinasjonskoeffisient og stigningstall til standardkurven for de tre ulike kontrollstammene.

Analyse	Effektivitet	Determinasjonskoeffisient	Stigningstall
<i>Mycobacterium abscessus</i>	85,50 %	0,999	-3,726
<i>Mycobacterium massiliense</i>	79,60 %	0,990	-3,933
<i>Mycobacterium bolletii</i>	82,40 %	0,999	-3,831

Den beregnede effektiviteten til begge metodene ligger i området 80-85% noe som er like under kravet for nye PCR-metoder. Stigningstallet til standardkurvene til kontrollstammene, altså den gjennomsnittlige Ct-verdi-endringen mellom fortynningene, ligger mellom 3,7-3,9. Dette tilsier at det er mindre mengde target-DNA som amplifiseres og markeres ved bruk av probene i reaksjonsmiksen enn det som er optimalt og ønskelig i fortynningene. Likevel ble resultatet vurdert som godt nok etter diskusjon med fagansvarlig bioingeniør og overlege ved AMM til at metodene kunne benyttes ved videre analysering.

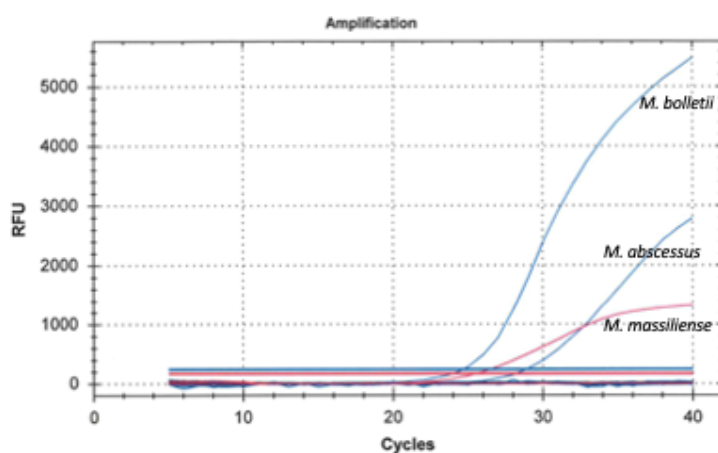
3.6 Spesifisitetsanalyse

3.6.1 Analysering av bakterieisolat fra generelt bakteriepanel og luftbakteriepanel

Ved etablering av nye metoder er det viktig å kvalitetssikre at analysemetodene ikke gir falske positive resultater for andre bakterier. Det ble derfor utført en spesifisitetsanalyse som en kontroll på at det ikke forekom en reaksjon mellom reaksjonsmiksene som ble benyttet i metodene og andre bakterier enn *M. abscessus* complex. Analyseringen ble utført ved å analysere to bakteriepanel; et luftpanel og et generelt panel. Bakterieisolat fra bakteriepanelene ble analysert ved å benytte multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Bakteriepanelene er presentert i Tabell 2 og Tabell 3. Bakterieisolat fra kontrollstammene ble benyttet som positiv kontroll. For begge metodene ble det observert at kun kontrollstammene til *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii* ble positive, noe som indikerer god spesifisitet.

3.6.2 Analysering av bakterieisolat tidligere påvist som andre mykobakterier

Som en del av spesifisitetstesting ble det analysert ni bakterieisolat som tidligere har blitt påvist som andre mykobakterier enn *M. abscessus* complex. Dette ble gjort for å kontrollere at det ikke oppsto uønskede kryssreaksjoner mellom reaksjonsmiksen som ble benyttet i metodene og andre mykobakterier enn *M. abscessus* complex, noe som kan føre til falsk positive resultater. Bakterieisolatene ble analysert ved å benytte multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Bakterieisolat fra kontrollstammene ble benyttet som positiv kontroll. Resultatene er presentert i Figur 11. Det ble observert at kun kontrollstammene til *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii* ble positive noe som indikerer god spesifisitet for metodene.



Figur 11: Analysering av bakterieisolat som tidligere har blitt påvist som andre mykobakterier enn *M. abscessus* complex. Kurvene viser kontrollstammene til *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii*. Analyseringen er utført med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™.

3.6.3 Analysering av bakterieisolat tidligere påvist som *Mycobacterium abscessus* complex

For å undersøke metodenes spesifisitet ble bakterieisolat fra 34 pasientprøver som tidligere har fått påvist *M. abscessus* complex analysert. Undersøkelse av spesifisitet ble utført ved å benytte multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Resultatene er presentert i Vedlegg 7.11. Det ble observert at alle prøver fikk Ct-verdi ved analysering med multiplex PCR-metoden og at de er positive for enten *M. abscessus* eller *M. massiliense*. Ingen prøver som ble analysert med den spesifikke PCR-metoden fikk Ct-verdi, noe som tyder på at ingen av bakterieisolatene inneholdt *M. bolletii*. Resultatene indikerer at metodene har god spesifisitet.

3.7 Bestemmelse av deteksjonsgrense

Metodenes deteksjonsgrenser ble undersøkt for at det skal være mulig å omtale hvor mange DNA-molekyler per prøve som må til for å gi positivt resultat ved en PCR-reaksjon. En bestemmelse av metodenes deteksjonsgrenser vil gi en indikasjon på metodenes sensitivitet.

Det ble utført PCR-reaksjoner med tifolds forfynningsrekker med paralleller av bakterieisolat fra kontrollstammene. PCR-reaksjonene ble utført med multiplex og spesifikk PCR-metode på CFX96™. Bakterieisolat fra kontrollstammen til *M. abscessus* ble analysert med forfynninger fra 1:10 – 1:10⁶ med tolv paralleller for de siste fire forfynningene.

Bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. massiliense* og *M. bolletii* ble analysert med forfynninger fra 1:10 – 1:10⁷ med tolv paralleller for de siste fem forfynningene. De valgte forfynningene baserer seg på tidligere analyseresultater for multiplex PCR-metoden fra blant annet probeoptimalisering og effektivitetsanalyse som illustrerer at kontrollstammen til *M. abscessus* har vist en tendens til å ha omtrent 3,3 høyere Ct-verdier enn tilsvarende kontrollstamme for *M. massiliense*.

Instrumentet NanoDrop™ 1000 Spectrofotometer ble brukt til bestemmelse av konsentrasjonen av DNA-molekyler i bakterieisolat fra kontrollstammene. Til dette ble det benyttet ufortynnet bakterieisolat fra kontrollstammen til *M. abscessus* og fortynnet (1:10) bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. massiliense* og *M. bolletii*. Et estimat av antall DNA-molekyler i bakterieisolatene ble beregnet ved bruk av kjent DNA-konsentrasjon og kjent størrelse på bakterienes genom. Utrekninger er vist i Vedlegg 7.12.

Ved beregning ble det funnet $9,92 \cdot 10^6$, $9,15 \cdot 10^6$ og $6,80 \cdot 10^6$ DNA-molekyler i hvert ufortynnet bakterieisolat fra kontrollstammene for henholdsvis *M. abscessus*, *M. massiliense* og *M. bolletii*. Resultatene viser at deteksjonsgrensen vil ligge mellom 99,2-992 DNA-molekyler for *M. abscessus*, 91,5-915 DNA-molekyler for *M. massiliense* og 68,0-680 DNA-molekyler for *M. bolletii*.

4 Diskusjon

I dette kapittelet diskuteres de mest sentrale resultatene som fremkom under etableringsprosessen av en multiplex og en spesifikk PCR-metode for påvisning av *M. abscessus* complex subspecies, og videre utviklingspotensialer for metodene. I slutten av kapittelet vil det bli gitt en konklusjon på bachelorprosjektets problemstilling.

4.1 Sentrale resultater som fremkom under etableringsprosessen

I dette bachelorprosjektet var hensikten å etablere real-time PCR-metoder for påvisning av *M. abscessus* complex subspecies basert på molekylære beacon-prober. Bakgrunnen for etablering av disse metodene var et behov for real-time PCR-metoder som spesifikt var designet for påvisning av *M. abscessus* complex subspecies, for å forbedre behandlingen av infiserte pasienter. Etablering av de nye metodene vil føre til at pasienter raskere får en spesifikk behandling ved infeksjoner forårsaket av dette kompleksset. De nye metodene ble vurdert og validert med krav om spesifisitet, sensitivitet og effektivitet.

4.1.1 Probekonsentrasjon

Resultatene fra probeoptimaliseringen viste at det var hensiktsmessig å bytte probekonsentrasjonen til *M. massiliense* fra 250 nM til 500 nM ettersom økt probekonsentrasjon ga økt signalstyrke fra proben ved analysering. Dette er foretrukket i en multiplex PCR-metode da en signifikant lavere signalstyrke ved en av probene i forhold til den andre vil kunne føre til at proben med lavest intensitet havner under threshold-linjen. Dette kan føre til at prøvene blir tolket som falsk negative og at pasienten dermed ikke får korrekt behandling.

4.1.2 Effektivitetsanalyse

Det ble gjennomført en effektivitetsanalyse hvor resultatet viste at effektiviteten var lavere enn kravene satt av laboratoriet til avdelingen. En god effektivitet er nødvendig for at metodene skal amplifisere høyest mulig grad av target-DNA som finnes i prøven. Hvis effektiviteten ikke er tilstrekkelig vil det kunne føre til at prøver med få DNA-molekyler ikke får en tilstrekkelig mengde target-DNA amplifisert til at prøven blir positiv. Dette kan gi falsk negative resultater og føre til at pasienten ikke får den nødvendige behandlingen. En forbedring av effektiviteten kan gjøres ved å utføre ytterligere optimalisering av primer- og probekonsentrasjoner da for høye eller lave konsentrasjoner kan gi dårligere effektivitet. Om man lykkes med å øke metodens effektivitet, minimeres sjansen for at en pasientprøve analysert med metodene blir falsk negativ.

4.1.3 Spesifisitet

Resultater fra spesifisitetsanalyser med bakterieisolatene viser at metodene ikke gir falsk negative eller positive svar, noe som indikerer at metodene har god spesifisitet. Dette er nødvendig for riktig diagnostikk og behandling av pasienter med infeksjon forårsaket av *M. abscessus* complex. En svakhet med prosjektet er at det er få positive prøver i sykehusets arkiv, noe som gjør det utfordrende å få analysert nok prøver til at det kan bekreftes at metodenes spesifisitet er god. En annen svakhet med prosjektet er at det ikke ble gjennomført noen analyser med eluat fra direkte prøvemateriale fra pasienter, da dette ikke var tilgjengelig i laboratoriets frysearkiv. Dette er prøver som er hentet direkte fra pasientens infeksjonssted og kan inneholde humant materiale. Det er dermed viktig å fastslå om humant materiale kan interferere med analysene. For å kunne gi en konklusjon på metodenes spesifisitet må det et gjennomføres ytterligere analyser med flere prøver, både med eluat fra direkte prøvemateriale og bakterieisolat.

4.1.4 Deteksjonsgrense

Metodenes deteksjonsgrenser ble estimert til å ligge mellom 99,2-992 DNA-molekyler for *M. abscessus*, 91,5-915 DNA-molekyler for *M. massiliense* og 68,0-680 DNA-molekyler for *M. bolletii*. Dersom deteksjonsgrensen er høy, må det flere DNA-molekyler til i prøven for at analysen skal gi positivt resultat. Dette kan føre til at prøver med lite mengde DNA gir falsk negative resultater, noe som gjør at pasienten kan få feil behandling. Deteksjonsgrensene som ble estimert under prosjektet er ikke presise nok til at metodenes sensitivitet kan omtales. Det er derfor ønskelig å fastslå mer nøyaktige deteksjonsgrenser for metodene slik at eventuelle endringer kan gjøres for å bedre sensitiviteten. For å finne en lavere og mer presis deteksjonsgrense burde det gjennomføres mer omfattende analyser hvor det benyttes tofoldsfortynningsrekker med 100 paralleller innenfor de omtrentlige deteksjonsgrenseområdene som ble funnet med tifoldsfortynningene.

4.1.5 Forbehandling av prøvemateriale

Gjennom etableringsprosessen av metodene ble det observert at bakterieisolat fra kontrollstammen til *M. abscessus* fikk høyere Ct-verdier enn bakterieisolat fra kontrollstammene til *M. massiliense* og *M. bolletii*. Dette ble tydelig illustrert i effektivitetsanalysen, se Figur 10. Ut fra resultatene fra bestemmelsen av metodenes deteksjonsgrenser kan det se ut til at metodene ikke har noe signifikant dårligere evne til å detektere *M. abscessus* enn *M. massiliense* og *M. bolletii*, men at det er lavere konsentrasjoner av DNA fra *M. abscessus* enn *M. massiliense* og *M. bolletii* i

bakterieisolatene. Den lavere konsentrasjonen av DNA-molekyler kan komme av at det ved avdelingens forbehandling av bakterieisolat ekstraheres mindre DNA fra *M. abscessus* enn *M. massiliense* og *M. bolletii*, noe som kan skyldes ulikheter i subspeciernes cellevegg. Riktig forbehandling av bakteriene er viktig for at mest mulig DNA skal ekstraheres fra bakteriene, slik at metodene fungerer optimalt og gir riktige resultater. Dersom forbehandlingen er årsaken til den lavere konsentrasjonen, kan det føre til at det ekstraheres for lite DNA fra bakteriene til *M. abscessus* til at det blir detektert slik at falsk negative resultater kan forekomme. Ytterligere forbedring av metodene bør derfor bestå av en optimalisering av forbehandlingsprosessen.

4.2 Videre arbeid

Dersom AMM ferdigutvikler PCR-metodene som ble forsøkt etablert i bachelorprosjektet, finnes det også andre muligheter for ytterligere forbedringer og videreutvikling av metodene. Dette går blant annet ut på muligheten til utvikling av en felles multiplex PCR-metode for påvisning av subspeciene og å få ytterligere informasjon om subspeciene sin resistensutvikling ved utvikling av en separat real-time PCR-metode basert på molekylære beacon-prober.

Resultatene fra kapillærelektroforesen viste at av primerne som benyttes i reaksjonsmiksen for metodene, amplifiserte DNA fra bakterieisolat fra alle kontrollstammene, ikke kun for de subspeciene metodene er ment til å påvise. Dette indikerer at det bare er probene som er spesifikke for de ulike subspeciene i reaksjonsmiksen. Dette er et interessant resultat som indikerer at det i fremtiden, ved videre utvikling av metodene, kan være mulig å danne én felles multiplex PCR-metode for påvisning av alle tre subspeciene. Dette forutsetter at det ved tilblending av for eksempel proben som er spesifikk for *M. bolletii*, ikke dannes uspesifikke kryssbindinger med primere fra reaksjonsmiksen som benyttes til å påvise *M. abscessus* og *M. massiliense*. Det må også gjøres et arbeid med å finne en ny fluorofor (annet enn TXR og FAM) som kan festes til den spesifikke molekylære beacon-proben for *M. bolletii*, slik at det i praksis skal være mulig å skille resultatene fra de ulike subspeciene fra hverandre. Utviklingen av en slik metode kan være til fordel for avdelingen ved at dette kan gi mulighet for en reduksjon av tidsbruk, sammenlignet med metodene som det ble arbeidet med i bachelorprosjektet. Dette vil også potensielt kunne gi raskere analysesvar og dermed en raskere start av behandling for pasienter.

Artikkelen (7) beskriver også en mulighet for påvisning av makrolidresistens hos de påviste subspeciene ved bruk av real-time PCR. Denne analysemetoden baserer seg på identifisering av den genotypiske profilen til subspeciene som er assosiert med makrolidresistens, blant annet ved bruk av registrering av typiske mutasjoner i *erm(41)*-genet. Dette arbeidet vil være til stor fordel for pasientens behandling, ved at det unngås at pasienten starter med en behandling som ikke fungerer. Metoden vil også potensielt gjøre det mulig å enklere kunne overvåke endringer i *M. abscessus* complex sin resistensutvikling, noe som kan være en fordel ved utviklingen av behandlingstilbud til infiserte pasienter.

4.3 Konklusjon

Arbeidet som ble gjennomført med denne oppgaven indikerer at etablering av real-time PCR-metoder basert på molekylære beacon-prober for identifisering av *Mycobacterium abscessus* complex subspecies kan være mulig og at metodene som er forsøkt utviklet i prosjektet kan benyttes av sykehuslaboratoriet til videre utvikling av to fullverdige metoder.

Begge metodene ga raske, spesifikke og korrekte resultater ved analysering av bakterieisolater fra pasientprøver. Dette er en forbedring fra metodene som benyttes per dags dato ved AMM til identifisering av *M. abscessus* complex subspecies, da dette potensielt vil gjøre det mulig å starte korrekt behandling av infiserte pasienter med spesifikk antibiotika, tidligere enn før. Likevel anbefales det at sykehuslaboratoriet gjennomfører ytterligere utprøvinger av metodene og forbedring av forbehandling av pasientprøvene før de tas i bruk som del av rutinen, da tidspress i prosjektperioden hindret en fullverdig etablering av metodene. Metodene som ble arbeidet med i denne bacheloroppgaven basert på molekylære beacon-prober vil dermed kunne benyttes av AMM som et grunnlag for videre validering og utvikling av metodene. De vil dermed kunne fungere som en ressurs i avdelingens og sykehusets evne til påvisning av *M. abscessus* complex subspecies og et viktig verktøy mot forbedring av behandling av infiserte pasienter.

6 Referanser

1. Bergh K. NTM - Non-tuberculous mycobacteria. Spesielt: *M. abscessus*.
2. Folkehelseinstituttet. Mykobakterieinfeksjoner (non-tuberkuløse mykobakterier, NTM) [Internett]. Folkehelseinstituttet. [sisert 24. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/atypisk-mykobakterieinfeksjoner-myk/>
3. Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol.* juli 2020;18(7):392–407.
4. Miklos Degré, Hovig B. *Medisinsk mikrobiologi*. 3. utgave. Rollag H, redaktør. Oslo: Gyldendal akademisk; 2010. 803 s.
5. Lee MR, Sheng WH, Hung CC, Yu CJ, Lee LN, Hsueh PR. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. *Emerg Infect Dis.* september 2015;21(9):1638–46.
6. Klepp O. granulom. I: *Store medisinske leksikon* [Internett]. 2019 [sisert 9. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/granulom>
7. Marras SAE, Chen L, Shashkina E, Davidson RM, Strong M, Daley CL, mfl. A Molecular-Beacon-Based Multiplex Real-Time PCR Assay To Distinguish *Mycobacterium abscessus* Subspecies and Determine Macrolide Susceptibility. *J Clin Microbiol.* 59(8):e00455-21.
8. Folkehelseinstituttet. Antibiotika - NHI.no [Internett]. [sisert 26. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/diverse/antibiotika/?page=4>
9. Vikan J, Volløyhaug J. EQS: Arbeidsrutiner i P3 laboratorium 232.03.028 [Internett]. St. Olavs hospital; 2021. Tilgjengelig på: ID: 12783
10. Institutt for biovitenskap, UiO. PCR - Institutt for biovitenskap [Internett]. [sisert 24. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>
11. Higgins O, Smith TJ. 3' Tth Endonuclease Cleavage Polymerase Chain Reaction (3TEC-PCR) Technology for Single-Base-Specific Multiplex Pathogen Detection using a Two-Oligonucleotide System. *Int J Mol Sci.* 2021;13.
12. Grønlien HK, Ryvarden L, Tandberg C, Eidsmo JA. *Bi 2 - grunnbok biologi VG3*. 3. utgave. Gyldendal undervisning; 2008. 398 s.
13. Pelt-Verkuil E van, van Belkum A, P. Hays J. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer; 2008. 325 s.
14. McPherson MJ, Møller SG. *PCR*. 2. utgave. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 2001. 276 s.
15. Sreejith KR, Ooi CH, Jin J, Dao DV, Nguyen NT. Digital polymerase chain reaction technology – recent advances and future perspectives. *Lab Chip.* 2018;18(24):3717–32.
16. Overlege Kåre Bergh. *Two-Step real-time PCR*. 2022.
17. Bio-Rad Laboratories. What is Real-Time PCR (qPCR)? [Internett]. Bio-Rad

- Laboratories. [sitert 4. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
18. Bio-Rad. Multiplex PCR | Bio-Rad [Internett]. [sitert 30. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.bio-rad.com/featured/en/multiplex-pcr.html>
 19. Overlege Kåre Bergh. Multiplex PCR. 2022.
 20. Agilent Technologies. Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix - Instruction Manual [Internett]. Agilent Technologies; Tilgjengelig på: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/600828.pdf>
 21. Wang K, Tang Z, Yang CJ, Kim Y, Fang X, Li W, mfl. Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons. *Angew Chem Int Ed*. 2009;48(5):856–70.
 22. Christensen A, Kommedal Ø, Tylden G, Rykkvin R. Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder [Internett]. Folkehelseinstituttet; [sitert 19. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/publ/2018/kvalitetskontroll-av-genteknologiske-metoder/>
 23. Overlege Kåre Bergh. Effektivitetsanalyse. 2022.
 24. Burtis CA, Brunz DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7. utgave. Elsevier; 2015. 1075 s.
 25. Stjern Flakne AM. EQS: Mycobacterium genus real-time PCR [Internett]. St. Olavs hospital; 2020. Tilgjengelig på: ID: 17228
 26. Krokstad S, Westerhus E. EQS: Mykobakterier, identifikasjon ved hsp65 PCR og sekvensering [Internett]. St. Olavs hospital; 2021. Tilgjengelig på: ID: 35245
 27. Agilent Technologies. Agilent DNA 7500 and DNA 12000 - Kit Guide [Internett]. Agilent Technologies; 2016 [sitert 30. mars 2022]. Tilgjengelig på: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2938-90024_DNA7500-12000_KG.pdf
 28. Syre H, Lervik Larsen A, Mengshoel AT. Mykobakteriediagnostikk [Internett]. Folkehelseinstituttet; [sitert 3. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/publ/strategimoter/strategimote-nr-30-2016-mykobakteriediagnostikk/>
 29. Agilent Technologies. Agilent 2100 Bioanalyzer System - 2100 Expert Software User's Guide [Internett]. Agilent Technologies; 2020. Tilgjengelig på: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/2100_Bioanalyzer_Expert_USR.pdf

7 Vedlegg

7.1 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for sense primer til multiplex PCR

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. 2163972

MAB2830_F

TIB reference no : 022104173

20 - mer 16.03.2022

5' - CCTCATCgAggACggTCaG

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

121,1 nmol / 121,1 µM

Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo

no

A : 5 G : 6 C : 6 T : 3 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 60,0 %

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient ϵ

215560 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH₄

6450,7 g / mol

Molecular weight free acid :

6127,1 g / mol

Picomoles per OD₂₆₀

4639,1 pmol / OD

Micrograms per OD₂₆₀

29,9 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

26,1 OD

Molar amount :

121,1 nmol

Amount in µg mass units :

781,0 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

121,1 µM (pmol / µl)

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

6054 µl

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

2422 µl

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

1211 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

0,781 µg / µl

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

1 : 1562 dilution factor from a 1 ml solution

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

7810 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

58,8 °C

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

55,3 °C

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

64,0 °C

Melting point G/C-content rule

58,4 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -145,9 / -602,7 / -1533,0 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.

Gesellschaft für: UMD Dr. Marcus Dräger AG, No. DL 841 018 750 (IS code: 2957 9990 / Inv Kits 5822 0000) GmbH, Eresburgstraße 22, D-10249 Berlin
 Handelsregister: HRB 28163 B, BIC: TIB2333, IBAN: DE 25 12 05 1000 0000 0000 0000
 Registergericht: Berlin-Charlottenburg, D.NS no. 313820315, U.NS: 260159630007, FOLIO No. DE 8000173, SWIFT: TIB233330315

7.2 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for antisense primer til multiplex PCR

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12105 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-12105 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. 2163973

MAB2830_R

TIB reference no.: 022104173

20 - mer 16.03.2022

5' - CACgAATCCgggCAgCAATA

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

123,7 nmol / 123,7 µM

Synthesis: 0,20 µmol no Purification: GSF Condition: Primer lyo

A: 7	G: 5	C: 6	T: 2	total	20
Wobble: 0	Mod.: 0	GC-contents		55.0	%

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	225550	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄ ⁺	6443,7	g / mol
Molecular weight free acid :	6120,2	g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	4433,6	pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	28,6	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	27,9	OD
Molar amount :	123,7	nmol
Amount in µg mass units :	797,1	µg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	123,7	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6185	µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2474	µl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1237	µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,797	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1594	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0.1 µg / µl solution dissolve the product in :	7971	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	61,7	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	58,2	°C
Melting point G/C-content rule	62,0	°C
	56,3	°C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS	-161.1 / -669.5 / -1706.0	kJ / mol
--------------	---------------------------	----------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T H = A/C R = 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.



Gesellschaft mbH Dr. Marcus Droege · VAT No. DE 804 018 770 · USt-IdNr. 2034 9999 / Tax Ids. 3822 0000 · Commerzbank, Koppenstraße 95, D-10245 Berlin
 Handelsregister TRB 93163 B · DE 28 28 33 35 · USt-IdNr. 2760 505300 · USt-IdNr. DE 801635 · HRV-IdNr. 008 090 0 30 7769 00
 www.molbiol.com · Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99 · E-Mail: dna@tib-molbiol.de

7.3 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for spesifikk probe for *M. abscessus*

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. 2163978 MAB2830abs_MB
 TIB reference no : 022104173 31 - mer 16.03.2022

5' - 6FAM-CCgTCgCgAggCCggCATCggCgCACgACgg--BHQ1

Amount / Concentration for product of 1 ml
 Synthesis scale and purification : 6,3 nmol / 6,3 µM
 Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: MB 2.0 OD lyo
 5'-Modifications : no
 Number of bases : A : 4 G : 13 C : 12 T : 2 total 31
 Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 80,6 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient 318330 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄ 10060,2 g / mol
 Molecular weight free acid : 9549,3 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 3141,4 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 31,6 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 2,0 OD
 Molar amount : 6,3 nmol
 Amount in µg mass units : 63,2 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 314 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 126 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 63 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,063 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 126 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 632 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 90,1 °C
 Melting point GC/AT rule (ΔT = 2°C, G/C = 4°C) 86,6 °C
 Melting point G/C-content rule 95,0 °C
 78,8 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S -317.1 / -1171.4 / -2866.7 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.



Beschäftigter (oM) Dr. Marcus Dörge VAT No. DE 814 018 770 1 TIN code: 2951 9990 / for kds: 3822 0000
 Handelsregister HRB 93357 B USt-IdNr.: DE275280051 USt-IdNr.: DE275280051 EORI No. DE 2801153
 Firmenbuch: Koppmstraße 93, D-10243 Berlin BRV DE 6 1065 9000 0 81 7 09 00
 SWIFT/BIC: BFSW3333

7.4 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for spesifikk probe for *M. massiliense*

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12105 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-12105 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. 2163979 **MABM2830mas_MB**
 TIB reference no : 022104173 32 - mer 16.03.2022

5' - TEX-CCgTCgGAAgCTggTATCgGTCCAggCgACgg--BHQ2

Amount / Concentration for product of 1 ml -	5,9 nmol / 5,9 μM
Synthesis scale and purification :	Synthesis: 0,00 μmol Purification: HPLC Condition: MB 2.0 OD lyo
5'-Modifications :	no
Number of bases :	A: 5 G: 13 C: 9 T: 5 total 32
Wobble bases and GC content :	Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 68.8 %

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient ϵ	337580 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	10435,5 g / mol
Molecular weight free acid :	9907,5 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	2962,3 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	30,9 μg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	2,0 OD
Molar amount :	5,9 nmol
Amount in μg mass units :	61,8 μg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	5,9 μM (pmol / μl)
20 μM (20 pmol/μl) requires a volume of :	296 μl
50 μM (50 pmol/μl) requires a volume of :	118 μl (To prepare stock solutions of
100 μM (100 pmol/μl) requires a volume of :	59 μl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,062 μg / μl
Dilution to prepare a solution with 0,5 μg/ml :	1 : 124 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0.1 μg / μl solution dissolve the product in :	618 μl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	81,4 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	77,9 °C
Melting point G/C-content rule	95,0 °C
	74,6 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

ΔG / ΔH / ΔS	-283,6 / -1109,1 / -2770,0 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.

Geschäftsbereich (GVD) Dr. Marcus Dreyer · Fax No.: 0049 30 78 79 94 770 · JUS grade 2934 0000 / Jorkhals 5822 0000 · Coppenradsbank, Coppenradsstrasse 93, D 10245 Berlin
 Handelsregister HRB 93163 B · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506
 USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506 · USt-IdNr.: DE275691506

7.5 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for sense primer til *M. bolletii*

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. 2163974
 TIB reference no : 022104173

MAB2248_F
 20 - mer 16.03.2022

5' - gTgACCGgTCTCgATCAgTT

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

127,0 nmol / 127,0 µM

Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo

no

A : 3 G : 6 C : 5 T : 6 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 55.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ

203310 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH₄

6447,6 g / mol

Molecular weight free acid :

6124,1 g / mol

Picomoles per OD₂₆₀

4918,6 pmol / OD

Micrograms per OD₂₆₀

31,7 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

25,8 OD

Molar amount :

127,0 nmol

Amount in µg mass units :

819,2 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

127,0 µM (pmol / µl)

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

6352 µl

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

2541 µl

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

1270 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

0,819 µg / µl

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

1 : 1638 dilution factor from a 1 ml solution

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

8192 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

56,2 °C

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

52,7 °C

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

62,0 °C

Melting point G/C-content rule

56,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -139,2 / -593,3 / -1523,6 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.

Ges. Handels- u. Maschinenfabrik GmbH · VAT No. DE 814 018 770 · TIB code: 2020-0000 / for EHS 5823-0000 · Commerzbank, Koppenhagenstr. 33, D-10243 Berlin
 Handelsregister TIB 02102 R · IBAN: DE 25 12 05 01 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 · BIC: COMDE33HAN · Fax: +49 30 78 79 94-99 · www.tib-molbiol.de

7.6 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for antisense primer til *M. bolletii*

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



Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

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

Product Description no. 2163975

MAB2248_R

TIB reference no : 022104173

20 - mer

16.03.2022

5' - CATTgTCTggCgTCAATggC

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

130,0 nmol / 130,0 µM

Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
 no

A : 3 G : 6 C : 5 T : 6 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 55,0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ

203310 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH₄

6447,6 g / mol

Molecular weight free acid :

6124,1 g / mol

Picomoles per OD₂₆₀

4918,6 pmol / OD

Micrograms per OD₂₆₀

31,7 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

26,4 OD

Molar amount :

130,0 nmol

Amount in µg mass units :

838,2 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

130,0 µM (pmol / µl)

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

6500 µl

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

2600 µl

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

1300 µl

(To prepare stock solutions of
 different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

0,838 µg / µl

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

1 : 1676 dilution factor from a 1 ml solution

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

8382 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

60,4 °C

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

56,9 °C

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

62,0 °C

Melting point G/C-content rule

56,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -151,3 / -625,3 / -1590,4 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.

W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio



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

Geschäftsbereich TIB-MOLBIOL Syntheselabor GmbH · VAT-No. DE 814 018 770 1 (BS code: 4939 9990 / für EHS 4822 0000) · Sommerbank, Koppersstraße 95, D-10245 Berlin
 Handelsregister HRB 15105 B · Umsatzsteuer-Identifikationsnummer: DE 275 618 909 · IBAN: DE 25 12 05 00 10 00 10 00 00 · BIC: TIB3333
 TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99 · WWW.TIB-MOLBIOL.COM

7.7 Reagensvedlegg fra TIB® MOLBIOL for spesifikk probe til *M. bolletii*

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. 2163980

MAB2248bol_MB

TIB reference no : 022104173

30 - mer 16.03.2022

5' - 6FAM-CCgTgCCTCgggAACGgATgACTCgACg--BHQ1

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

6,4 nmol / 6,4 µM
 Synthesis: 0,00 µmol no Purification: HPLC Condition: MB 2.0 OD lyo
 A: 5 G: 11 C: 10 T: 4 total 30
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 70.0 %

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

312210 l / mol cm
 9728,0 g / mol
 9234,1 g / mol
 3203,0 pmol / OD
 31,2 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 :

2,0 OD
 6,4 nmol
 62,4 µg
 6,4 µM (pmol / µl)
 321 µl
 128 µl (To prepare stock solutions of
 different concentration)
 64 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 :

0,062 µg / µl
 1 : 125 dilution factor from a 1 ml solution
 624 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

81,0 °C
 77,5 °C
 95,0 °C
 73,7 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -266,7 / -1029,9 / -2561,3 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

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



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

Gesellschaft für (GfM) Dr. Merck & Co. GmbH
 Handelsregister HRB 381165 B
 VAT No. DE381 018 770 / US code: 29-20-0900-7 for KSt 3822 0900
 DUNS no. 31870815 / TIN: 49-61150230001 / BORN No. DE 3806-053
 Commerzbank, Koppenstraße 98, D-10243 Berlin
 BIC: BFSW33HAN / IBAN: DE44 1018 0000 0731 7769 00
 SWIFT MICR: 2512 0530 0001 001

7.8 Reagensvedlegg PerfeCta™ Multiplex qPCR SuperMix, UNG fra Quanta



PerfeCta™ Multiplex qPCR SuperMix, UNG

Cat No. 172-5021CUST Size: 200 x 50-µL reactions

Store at -20°C protected from light

Description

PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix, UNG is a 2X concentrated, ready-to-use reaction cocktail for real-time quantitative PCR (qPCR) that contains **all components**, except primers, probes and templates. The system transcends multiplex limitations of conventional PCR master mixes, enabling unbiased amplification of up to five target sequences in a single tube. Suppression of low copy amplicons by high copy reference targets in the amplification is a common problem in multiplex PCR. This can skew, or mask the apparent representation and quantification of low copy target sequences. PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix, UNG delivers dynamic range and sensitivity to multiplexed qPCR that is comparable to that for singleplex qPCR probe assays without the need for limiting or variable primer concentrations.

A key component of this supermix is AccuStart™ Taq DNA polymerase, which contains monoclonal antibodies that bind to the polymerase and keep it inactive prior to the initial PCR denaturation step. Upon heat activation (2 minutes at 95°C), the antibodies denature irreversibly, releasing fully active, unmodified Taq DNA polymerase. This enables specific and efficient primer extension with the convenience of room temperature reaction assembly. The inclusion of dUTP and uracil-N-glycosylase (UNG) in the product prevents amplification of carry-over contamination from previous dU-containing PCRs

Instrument Compatibility

Different real-time PCR systems employ different strategies for the normalization of fluorescent signals and correction of well-to-well optical variations. **It is critical to match the appropriate qPCR reagent to your specific instrument.** PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix, UNG does not contain an internal reference dye to allow greater flexibility in your choice of reporter fluorophores and instrument platforms. Concentrated solutions of ROX Reference Dye or Low ROX Reference Dye are provided separately for compatibility on different real-time PCR systems (see component descriptions below). In general, instruments that utilize variable excitation wavelengths that are tuned to the each respective dye detection channel provide superior sensitivities and dynamic ranges for multiplex probe applications. Your choice of probe reporter dyes and any optional internal reference dye must be matched to the excitation and emission optics of your particular instrument. Please consult the user manual for your real-time PCR system.

Components

PerfeCta Multiplex qPCR Supermix, UNG (2X)	2X reaction buffer containing optimized concentrations of MgCl ₂ , dNTPs (including dUTP), AccuStart Taq DNA Polymerase, uracil-N-glycosylase, and stabilizers.
ROX Reference Dye (50X)	50X concentrated ROX solution for Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne™, or StepOne Plus
Low ROX Reference Dye (50X)	50X concentrated ROX solution for Applied BioSystems 7500 or Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™

Storage and Stability

PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix, UNG is stable for 1 year when stored in a constant temperature freezer at -20°C, protected from light. For convenience, it may be stored unfrozen at +2 to +8°C for up to 6 months. Repeated freezing and thawing of the supermix is not recommended.

Guidelines for Multiplex qPCR:

- The design of highly specific primers and probes is a critical and challenging aspect of successful multiplex qPCR. Each primer and probe should have similar thermodynamic properties to support efficient PCR amplification using a common temperature cycling program for all amplicons. The use of computer aided primer design programs is encouraged in order to minimize the potential for internal secondary structure and complementation at 3'-ends within each primer, primer pairs, and primer/probe combinations
- Amplicon size should be consistent for each target sequence and limited to approximately 65 - 100 bp.
- Limiting primer concentration for high copy genes is acceptable, but not required. A final concentration of 300 nM each primer and 100 to 250 nM probe is effective for most applications. Each probe for a multiplex assay should be labeled using dyes with minimal spectral overlap and non-fluorescent quencher compounds. Matching dyes with discrete fluorescent excitation and emission optima improves the accuracy of the multicomponenting, or dye deconvolution algorithms employed by the real-time PCR analysis software.

Guidelines for qPCR continued:

- Preparation of a reaction cocktail is recommended to reduce pipetting errors and maximize assay precision. Assemble the reaction cocktail with all required components except sample template (genomic DNA or cDNA) and dispense equal aliquots into each reaction tube. Add the DNA template to each reaction as the final step. Addition of samples as 5 to 10- μ L volumes will improve assay precision.
- Suggested input quantities of template are: cDNA corresponding to 10 pg to 1 μ g of total RNA; 100 pg to 1 μ g genomic DNA
- After sealing each reaction, vortex gently to mix contents. Centrifuge briefly to collect components at the bottom of the reaction tube.

Reaction Assembly

Component	Volume for 50- μ L rxn.	Final Concentration
PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix, UNG	25 μ L	1x
Forward primers	variable	100 – 500 nM
Reverse primers	variable	100 – 500 nM
Probes	variable	100 – 250 nM
ROX or Low ROX Reference Dye	1 μ L	optional
Nuclease-free water	variable	
Template(s)	<u>5 – 10 μL</u>	Variable
Final Volume (μ L)	50 μ L	

Reaction Protocol

Incubate complete reaction mix in a real-time thermal detection system as follows:

UNG incubation	45°C, 5 min
Initial denaturation:	95°C, 2 to 3 min
PCR cycling (30-45 cycles):	95°C, 10 to 15 s
	55 – 65°C, 60s (collect and analyze data)

Full activation of AccuStart Taq DNA polymerase occurs within 30 seconds at 95°C. Initial denaturation times greater than 3 minutes are not required. However, amplification of gDNA targets may benefit from a prolonged initial denaturation step (5-10 min) to fully denature and fragment the template. This minimizes the potential for renaturation of long fragments and/or repetitive sequence regions that can impair replication of the target sequence by the PCR process.

Quality Control

Kit components are free of contaminating DNase and RNase. PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix, UNG is functionally tested in a four-plex TaqMan qPCR using variable concentrations of one target sequence from 100 to 1 x 10⁷ copies and 1 x 10⁸ copies each of three other target sequences. Kinetic analysis must demonstrate linear resolution over six orders of dynamic range ($r^2 > 0.995$) and a PCR efficiency > 90%.

Limited Label Licenses

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,677,152, 5,773,258, 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652, 5,210,015, 5,487,972, 5,804,375, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, 6,258,569, 6,214,979, and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as apparatus or system claims in US Patent No. 6,814,934) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA

Licensed to Quanta BioSciences, under U.S. Patent Nos. 5,338,671, 5,587,287, and foreign equivalents for use in research only.

PerfeCta and AccuStart are trademarks of Quanta BioSciences Inc. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. ROX is a trademark of Life Technologies Corporation.

Mottall 22/10-16

©2008 Quanta BioSciences, Inc. All rights reserved.
For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

172-5021CUST REV 110927

NucliSens easyMAG, kortversjon

OPPSTART:

- Slå på easyMAG med bryter på høyre side
- PC og skjerm slås på når easyMAG's indikator lyser grønt (tar ca 2 min)
- Åpne easyMAG software
 - Username: easymag
 - Password: 0 (null)
 - Trykk Login eller bruk Enter tast
- Velg deretter ikon for INSTRUMENT og scan inn de 4 reagensene:
 - Posisjon A: Lysis buffer
 - Posisjon B: Extraction buffer 1
 - Posisjon C: Extraction buffer 2
 - Posisjon D: Extraction buffer 3

TIPS: Nye flasker av Extraction buffer 3 oppbevares i kjøleskap/på kjølerom. Dersom lite igjen på instrumentet, ta ut ny, slik at denne får romtemperert seg (bør stå minimum 30 min)!

Flasker med reagensrester settes på rom 232.03.016B. Slå sammen flasker med samme lot.

For ekstrahering av prøver henvises til Brukerperm og prosedyre.

Lysering av prøver tar ca 10 min i instrumentet.

Etter tilsetning av Silica tar resten av protokollen i underkant av 40 min:

8 prøver: 34 min

16 prøver: 37 min

24 prøver: 41 min

AVSLUTNING:

- Velg ikon for nøkkel, og deretter Quit
- Velg OK (Shutdown operating system)
- Slå av easyMAG når PC har blitt mørk (slå av skjerm i tillegg)

VEDLIKEHOLD:

Utfør ukentlig vedlikehold i starten av hver uke (se prosedyre).

I starten av hver måned utføres månedlig vedlikehold (se prosedyre).

Dokument 28000 "NucliSens easyMAG, kortversjon" versjon 1.3



7.10 PCR programmer til CFX96™ Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler)

PCR-programmer

Merket med * der avlesning av fluorescens avleses

Program	Instrument	Temp.UNG aktivering	Polymerase aktivering	Denaturering Sykling step1	Primer annealing Sykling step2	Extension Sykling step3	Antall sykler
3-step programmer							
Perfecta TaqMan (TM) 50	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 10sek	50°C 10sek*	72°C 10sek	40
Perfecta TaqMan (TM) 52	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 10sek	52°C 10sek*	72°C 10sek	40
Perfecta TaqMan (TM) 55	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 10sek	55°C 10sek*	72°C 10sek	40
		45°C 5min	95°C 3min				
Perfecta TaqMan (TM) 58	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 10sek	58°C 10sek*	72°C 10sek	40
Perfecta TaqMan (TM) 60	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 10sek	60°C 10sek*	72°C 10sek	40
Perfecta TaqMan (TM) 50	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	50°C 10sek*	72°C 20sek	45
Perfecta TaqMan (TM) 52	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	52°C 10sek*	72°C 20sek	45
Perfecta TaqMan (TM) 55	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	55°C 10sek*	72°C 20sek	45
Perfecta TaqMan (TM) 58	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	58°C 10sek*	72°C 20sek	45
Perfecta TaqMan (TM) 60	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	60°C 10sek*	72°C 20sek	45
2-step programmer							
				Sykling step1	Sykling step2		
Perfecta 2-stepTM 50	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	50°C 30sek*		40
Perfecta 2-stepTM 52	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	52°C 30sek*		40
Perfecta 2-stepTM 55	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	55°C 30sek*		40
Perfecta 2-stepTM 58	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	58°C 30sek*		40
Perfecta 2-stepTM 60	CFX	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	60°C 30sek*		40
Perfecta TaqMan (TM) 50	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	50°C 20sek*		45
Perfecta TaqMan (TM) 52	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	52°C 20sek*		45
Perfecta TaqMan (TM) 55	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	55°C 20sek*		45
Perfecta TaqMan (TM) 58	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	58°C 20sek*		45
Perfecta TaqMan (TM) 60	Lightcycler	45°C 5min	95°C 3min	95°C 5sek	60°C 20sek*		45
One-step programmer							
		Revers transkribering	Polymerase aktivering	Sykling step1	Sykling step2		
One-step RT-PCR Qiagen	CFX	50°C 30min	95°C 15min	95°C 15sek	60°C 30sek*		40
One-step RT-PCR Qiagen	Lightcycler	50°C 20min	95°C 15min	95°C 0sek	60°C 1min*		45
Toughmix onestep	CFX	50°C 10min	95°C 1min	95°C 3sek	60°C 30sek*		40

7.11 Resultater fra analysering med 34 bakterieisolat tidligere påvist som *M. abscessus* complex

Prøvenummer	Prøve hentet fra	Type materiale	Fluorofor	Ct-verdi	Resultater		
					Multiplex og spesifikk real-time PCR-metoder	HSP65-sekvensering	Resultat fra FHI
1	Sekret 3. finger	Isolat	Texas red	24,78	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	Ikke oppgitt
2	Bakteriekultur	Isolat	Texas red	24,17	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	Ikke oppgitt
3	Ekspektorat	Isolat	Texas red	29,32	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	Ikke oppgitt
4	Ekspektorat	Isolat	FAM	29,02	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	Ikke oppgitt
5	Ekspektorat	Isolat	Texas red	27,86	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	Ikke oppgitt
6	Ekspektorat	Isolat	Texas red	39,62	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	Ikke oppgitt
7	Vev - underarm	Isolat	FAM	24,09	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
8	Ekspektorat	Isolat	Texas red	36,42	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	Ikke oppgitt
9	Ekspektorat	Isolat	FAM	28,12	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
10	Indusert sputum	Isolat	FAM	26,47	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
11	Ekspektorat	Isolat	Texas Red	26,63	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
12	Ekspektorat	Isolat	Texas Red	25,45	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
13	Indusert sputum	Isolat	FAM	24,22	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
14	Ekspektorat	Isolat	FAM	25,99	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
15	Abscess	Isolat	Texas Red	28,26	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
16	Bronkialskyllvæske	Isolat	FAM	23,99	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
17	Bronkialskyllvæske	Isolat	Texas red	26,10	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
18	Indusert sputum	Isolat	Texas red	33,63	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
19	Ekspektorat	Isolat	Texas red	29,26	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
20	Ekspektorat	Isolat	Texas red	30,13	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
21	Ekspektorat	Isolat	FAM	30,62	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
22	Bronkialskyllvæske	Isolat	Texas red	32,26	<i>M. massiliense</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
23	Ekspektorat	Isolat	FAM	27,07	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
24	Indusert sputum	Isolat	FAM	24,92	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
25	Vev/biopsi	Isolat	FAM	27,21	<i>M. abscessus</i>	Ikke gjennomført	<i>M. abscessus</i> complex
26	Ekspektorat	Isolat	Texas red	28,01	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
27	Ekspektorat	Isolat	Texas red	27,35	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
28	Bakteriekultur	Isolat	Texas red	21,27	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
29	Indusert sputum	Isolat	FAM	19,12	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> complex
30	Ekspektorat	Isolat	FAM	27,28	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> complex
31	Ekspektorat	Isolat	FAM	28,13	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	Ikke oppgitt
32	Ekspektorat	Isolat	Texas red	27,04	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
33	Ekspektorat	Isolat	FAM	27,30	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
34	Ekspektorat	Isolat	Texas red	24,45	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>

7.12 Beregninger av antall molekyler som tilsier den estimerte deteksjonsgrensen til metodene

Konsentrasjonen DNA-molekyler (ng/ μ L) i bakterieisolat fra kontrollstammene som ble målt på NanoDrop er presentert i Tabell 8.

Tabell 8: Resultater fra analysering av bakterieisolat fra kontrollstammene på NanoDrop. Konsentrasjonene som er presentert er beregnet middelerdi av tre paralleller.

Bakteriestamme	Konsentrasjon (ng/ μ L)
<i>Mycobacterium abscessus</i>	11,1
<i>Mycobacterium massiliense</i>	10,0
<i>Mycobacterium bolletii</i>	7,2

Videre ble antall DNA-molekyler i fortyningene som deteksjonsgrensen har blitt estimert til å ligge innenfor beregnet for de tre subspeciene:

M. abscessus:

Estimert molar masse for genomet:

$$5 \cdot 10^5 \cdot 10^3 \text{ basepar} \cdot 660 \text{ pg} / (\text{pmol} \cdot \text{basepar}) = 3\,369\,385\,800 \text{ pg} / \text{pmol}$$

Antall mol i eluat i hver prøvebrønn beregnet ut fra resultater fra NanoDrop:

$$5 \text{ mL} \cdot 11100 \text{ pg/mL} = 55500 \text{ pg}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{masse}}{\text{molarmasse}} = \frac{55500 \text{ pg}}{3369385800 \text{ pg/pmol}} = 1,647 \cdot 10^{-5} \text{ pmol} = 1,647 \cdot 10^{-17} \text{ mol}$$

Antall molekyler i hver prøvebrønn:

$$\text{Avogadros tall: } 6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$1,647 \cdot 10^{-17} \text{ mol} \cdot 6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = \underline{9919578 \text{ molekyler}}$$

i ufortynnet prøve

Antall molekyler i prøven med 10^{-4} fortykning:

$$9,92 \cdot 10^6 \text{ molekyler} \cdot 10^{-4} = \underline{992 \text{ molekyler}}$$

Antall molekyler i prøven med 10^{-5} fortykning:

$$9,92 \cdot 10^6 \text{ molekyler} \cdot 10^{-5} = \underline{99,2 \text{ molekyler}}$$

Deteksjonsgrensen til metoden ligger mellom 99,2 - 992 molekyler

M. massiliense:

Estimert molar masse for genomet:

$$4969787 \text{ basepar} \cdot 660 \text{ pg} / (\text{pmol} \cdot \text{basepar}) = 3280059420 \text{ pg/pmol}$$

Antall mol i eluat i hver prøvebrønn beregnet ut fra resultater fra NanoDrop:

$$5 \text{ mL} \cdot 9967 \text{ pg/mL} = 49835 \text{ pg}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{masse}}{\text{molarmasse}} = \frac{49835 \text{ pg}}{3280059420 \text{ pg/pmol}} = 1,519 \cdot 10^{-5} \text{ pmol} = 1,519 \cdot 10^{-17} \text{ mol}$$

Antall molekyler i hver prøvebrønn:

Avogadros tall: $6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

$$1,519 \cdot 10^{-17} \text{ mol} \cdot 6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = \underline{9,15 \cdot 10^6 \text{ molekyler i prøve fortynnet 1:10}}$$
$$= \underline{9,15 \cdot 10^7 \text{ molekyler i ufortynnet prøve}}$$

Antall molekyler i prøven med 10^{-5} fortynning:

$$9,15 \cdot 10^7 \text{ molekyler} \cdot 10^{-5} = \underline{915 \text{ molekyler}}$$

Antall molekyler i prøven med 10^{-6} fortynning:

$$9,15 \cdot 10^7 \text{ molekyler} \cdot 10^{-6} = \underline{91,5 \text{ molekyler}}$$

Deteksjonsgrensen til metoden ligger mellom 91,5 - 915 molekyler

M. bolletii:

Estimert molar masse for genomet:

$$4809311 \text{ basepar} \cdot 660 \text{ pg} / (\text{pmol} \cdot \text{basepar}) = 3174145260 \text{ pg/pmol}$$

Antall mol i eluat i hver prøvebrønn beregnet ut fra resultater fra NanoDrop:

$$5 \text{ mL} \cdot 7167 \text{ pg/mL} = 35835 \text{ pg}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{masse}}{\text{molarmasse}} = \frac{35835 \text{ pg}}{3174145260 \text{ pg/pmol}} = 1,130 \cdot 10^{-5} \text{ pmol} = 1,130 \cdot 10^{-17} \text{ mol}$$

Antall molekyler i hver prøvebrønn:

Avogadros tall: $6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

$$1,130 \cdot 10^{-17} \text{ mol} \cdot 6,0221415 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = \underline{6,81 \cdot 10^6 \text{ molekyler i prøve fortynnet 1:10}}$$
$$= \underline{6,81 \cdot 10^7 \text{ molekyler i ufortynnet prøve}}$$

Antall molekyler i prøven med 10^{-5} fortynning:

$$6,81 \cdot 10^7 \text{ molekyler} \cdot 10^{-5} = \underline{681 \text{ molekyler}}$$

Antall molekyler i prøven med 10^{-6} fortynning:

$$6,81 \cdot 10^7 \text{ molekyler} \cdot 10^{-6} = \underline{68,1 \text{ molekyler}}$$

Deteksjonsgrensen til metoden ligger mellom 68,1 - 681 molekyler

