

Kristin Hovdal og Lin Gunhild Rygg Bruvoll

## Etablering av real-time PCR for påvisning av toksisk sjokk toksin hos *Staphylococcus aureus*

## Establishing real-time PCR for detection of toxic shock toxin in *Staphylococcus aureus*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Sidsel Krokstad, Kine Kristiansen, An-Magritt Stjern  
Flakne og Kjersti Wik-Larssen

Mai 2019



Kristin Hovdal og Lin Gunhild Rygg Bruvoll

**Etablering av real-time PCR for  
påvisning av toksisk sjokk toksin hos  
*Staphylococcus aureus***

**Establishing real-time PCR for detection  
of toxic shock toxin in *Staphylococcus  
aureus***

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Sidsel Krokstad, Kine Kristiansen, An-Magritt Stjern Flakne  
og Kjersti Wik-Larssen

Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden





## Forord

Rapporten er skrevet i forbindelse med fullføring av bachelorgrad, i regi av bioingeniørutdanningen ved NTNU og faget HBIO3001. Oppgaven er gitt av Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital, og alt praktisk arbeid i forbindelse med oppgaven er utført ved denne avdelingen.

Vi vil først og fremst takke vår veileder ved avdelingen, spesialbioingeniør Sidsel Krokstad, som fra dag en ga oss god opplæring, viste tillitt og gjorde oss engasjert i oppgaven. Hun har delt av sin kunnskap, sitt smittende engasjement, og gjort perioden spennende og lærerik. Vi vil også rette en stor takk til vår veileder ved bioingeniørutdanningen, universitetslektor Kine Kristiansen, som har vist tålmodighet og støtte i en krevende skriveperiode, og som vi ikke hadde klart oss uten. I tillegg vil vi takke overlege Kjersti Wik-Larssen, fagansvarlig bioingeniør An-Magritt Stjern Flakne, overlege Kåre Bergh og spesialbioingeniør Janne Fossum Malmring, samt alle andre ved Avdelingen for Medisinsk Mikrobiologi, som alltid var hjelpelige og imøtekommende.

Trondheim, 16.05.19, Kristin Hovdal og Lin Gunhild Rygg Bruvoll.

## Sammendrag

Bakgrunnen for dette prosjektet er at Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital hadde behov for å etablere en real-time PCR metode for å påvise genet *tst*, hos *Staphylococcus Aureus*, som gir Toksisk sjokksyndrom (TSS). Dagens metode for å påvise genet er konvensjonell PCR, som er en tidkrevende og arbeidsom analysemetode, og det tar lang tid før rekvirerende lege får prøvesvar. Siden sykdommen fort kan bli kritisk for pasienten er det ønskelig å få prøvesvar raskere, og dermed er det aktuelt å få metoden over på real-time PCR format.

Det ble anskaffet nye primere og TaqMan probe. Etablerings- og optimaliserings-prosessen innebar undersøkelse av effektivitet, optimal annealingtemperatur, deteksjonsgrense, sensitivitet og spesifisitet samt reproduserbarhet. I tillegg er det undersøkt om *tst*-genet kan påvises i eluat fra direktemateriale på lik linje med bakteriekoloni, og om dette kan være et alternativ for å korte ned svartiden enda mer.

Resultatene viser at metoden har god effektivitet, sensitivitet og reproduserbarhet, samt lav deteksjonsgrense, og primere og probe binder spesifikt. Undersøkelse på direktemateriale ga et lovende resultat som viser mulighet for påvisning av *tst*-genet i direktemateriale.

## Abstract

This project was initiated by the Department of Medical Microbiology at St. Olav's Hospital due to a wish for a real-time PCR method to detect the gene *tst*, in *Staphylococcus aureus*, which causes toxic shock syndrome (TSS). The current method for detecting the gene is conventional PCR, which is time-consuming and laborious, and it takes a long time before the requesting physician gets the test result. Since disease progression may be rapid and severe, it is desirable to obtain results quickly, which can be achieved by a real-time PCR format.

New primers and a TaqMan probe were purchased. The establishment and optimization of the PCR involved examining efficiency, optimum annealing temperature, limit of detection, sensitivity and specificity as well as reproducibility on *S. aureus* isolates. In addition, it was examined whether the *tst* gene can be detected in eluate from clinical specimens, to see if this can be an alternative to shorten the response time even more.

The results show that the method is efficient, sensitive and reproducible. The limit of detection was low, and the primers and probe are specific. Study on clinical specimens gave a promising result showing the possibility of detecting the *tst*-gene without prior culture.

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	i
Sammendrag .....	ii
Abstract .....	iii
Liste med forkortelser .....	vi
1 Innledning.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.2 Toksisk sjokksyndrom.....	1
1.3 Ekstraksjon .....	3
1.4 Polymerase Chain Reaction.....	3
1.5 Real-Time PCR.....	5
1.6 Problemstilling.....	6
2 Materiale og metode.....	7
2.1 Materiale .....	7
2.2 Ekstrahering.....	7
2.3 Reagenser, reaksjonsmiks og utstyr.....	8
2.3.1 Primere .....	8
2.3.2 Konvensjonell PCR.....	9
2.3.3 Real-time PCR.....	10
2.4 Sensitivitet til opprinnelige primere .....	12
2.5 Optimalisering av real-time PCR med nye primere .....	12
2.6 Analysering av pasientmateriale på real-time PCR med nye primere.....	14
3 Resultater.....	15
3.1 Sensitivitet til opprinnelige primere .....	15
3.2 Optimalisering av real-time PCR med nye primere .....	17
3.2.1 Test av probe og primere.....	17
3.2.2 Temperaturgradient .....	18

3.2.3	Effektivitet og sensitivitet .....	19
3.2.4	Spesifisitet .....	22
3.2.5	Anvendbarhet i klinisk bruk .....	23
3.2.6	Deteksjonsgrense .....	24
3.2.7	Reproduserbarhet .....	25
3.3	Analysering av pasientmateriale på real-time PCR med nye primere .....	26
3.3.1	<i>Tst</i> -positive pasientprøver .....	26
3.3.2	Eksfoliative positive pasientprøver .....	27
3.3.3	Analyse på direktemateriale .....	28
4	Diskusjon .....	29
4.1	Sensitivitet til opprinnelige primere .....	29
4.2	Optimalisering av real-time PCR med nye primere .....	29
4.3	Analysering av pasientmateriale på real-time PCR med nye primere .....	31
5	Konklusjon .....	33
6	Referanser .....	34
7	Vedlegg .....	35

## Liste med forkortelser

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

TSST-1 – Toksisk sjokksyndrom toksin-1

TSS – Toksisk sjokksyndrom

*Tst* – Toksisk sjokk toksin

PCR – Polymerase Chain Reaction

DsDNA – Dobbeltrådet DNA

RFU – Relative fluorescence units

Ct – Cycle threshold

ATCC – American Type Culture Collection

CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Bp – Basepar

MRSA – Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA – Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*

CFU/ml – Colony forming units/ml

# 1 Innledning

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Stafylokokker er katalase positive grampositive kokker. Bakteriene er som oftest rundt 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  store og har tendens til å legge seg i klaser. Både mennesker og dyr kan bli kolonisert, både på hud og slimhinner. Bakteriene vokser best ved 37°C, men kan vokse i temperaturspennet 18-40°C. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), gul stafylokokk, er den mest patogene av stafylokokkene og skiller seg fra andre ved at den er koagulase positiv (1).

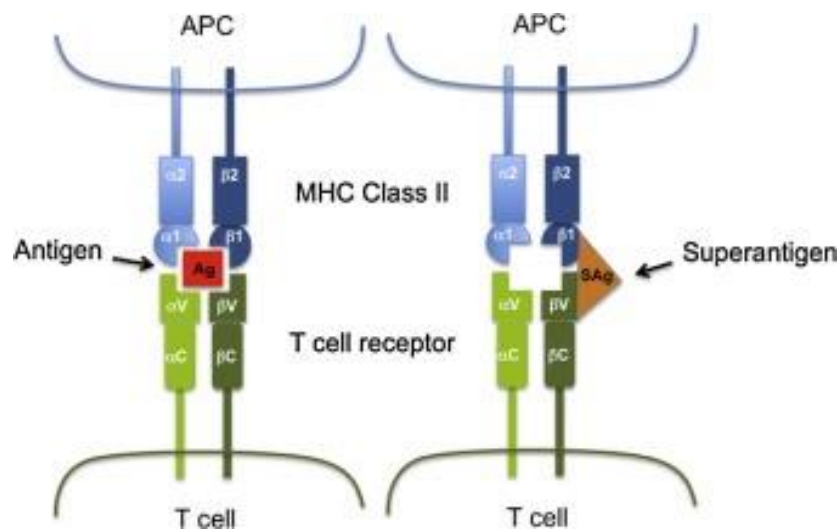
*S. aureus* har ulike virulensfaktorer som gjør bakterien svært patogen i kombinasjon med et svekket immunforsvar eller brudd på barrierer. På åpne sår og ved kirurgiske inngrep øker faren for infeksjon hos koloniserte pasienter. De viktigste virulensfaktorene kan deles i celleassosierte komponenter, enzymer og toksiner. Toksisk sjokksyndrom toksin-1 (TSST-1) er et eksotoksin som noen *S. aureus* produserer, og som kan gi toksisk sjokksyndrom (TSS) (1). Det er påvisning av dette toksinet det er fokus på i denne oppgaven.

## 1.2 Toksisk sjokksyndrom

TSS forårsaket av gule stafylokokker ble først beskrevet i 1973 (2). De fleste tilfellene dukket opp hos kvinner som hadde brukt tamponger under menstruasjon, og som hadde hatt tampongen liggende inne for lenge (3). Sykdommen går derfor også under navnet tampongsyken. I tidsrommet 1980-1996 ble det beskrevet over 5000 tilfeller av TSS, men i dag er tilstanden sjeldnere. De fleste tilfellene av TSS i dag ses hos unge kvinner (73%) og er ikke assosiert med menstruasjon, men ses blant annet ved post partum infeksjon, mastitt og hudinfeksjoner (4). Genet *toksisk sjokk toksin (tst)* som koder for TSST-1 er lokalisert på ulike patogenisitetsøyer (SaPI) som er mobile genetiske elementer. *Tst*-genet er beskrevet på blant annet følgende patogenisitetsøyer; SaPI1, SaPI2, SaPIbov1, SaPI3 og SaPI<sub>n1/m1</sub> (5).

Et fremmed antigen vil ved normal immunrespons bli bearbeidet av en antigenpresenterende celle, og deretter bli presentert i MHC klasse II til en antigenspesifikk T-celle. Det er kun T-cellene som er spesifikke for det aktuelle antigenet (0,001-0,0001% av T-cellene) som aktiveres. TSST-1 virker som et såkalt superantigen som er i stand til å binde seg direkte til MHC klasse II, ved å binde seg på utsiden av antigenreseptoren på T-cellen og MHC klasse II-molekylet (Figur 1.1). Dette medfører at TSST-1 kan aktivere opp til 30% av T-cellene, som tilsvarer flere hundre ganger så mange som normalt. Dette gir en kraftig immunrespons med cytokinproduksjon der TSS utvikles og pasienten utvikler hypotensjon, høy feber,

hudinfeksjon og affeksjon av flere organer. Tilstanden kan fort bli kritisk med multiorgansvikt og sjokktilstand dersom behandling ikke blir igangsatt raskt (4). Behandlingen er tredelt og består av korreksjon av væske og elektrolyttforstyrrelser, kirurgisk fjerning av alt affisert vev og eventuelle fremmedlegemer, samt antibiotika. Siden toksinene er proteiner benyttes antibiotika som hemmer proteinsyntesen, som klindamycin eller linezolid, slik at toxinproduksjonen bremses. Antibiotika som bryter ned celleveggen, som vancomycin eller oxacillin, gir en økning i produksjon av TSST-1, og bør ikke brukes i monoterapi (4) (6).



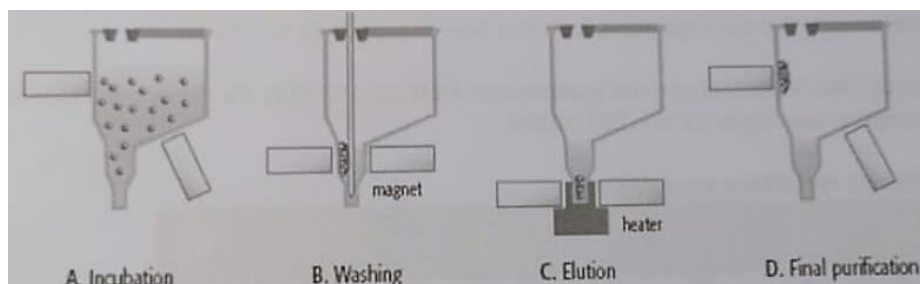
Figur 1.1 Illustrasjon av hvordan superantigen aktiverer T-celler sammenlignet med vanlig antigen (7).

TSS forekommer sjelden i Norge i dag, men på grunn av dens akutte- og livstruende sykdomsbilde er det viktig å kunne påvise genet *tst* ved mistenkt *S. aureus* infeksjon. *Tst*-genet påvises i dag ved konvensjonell Polymerase Chain Reaction (PCR), men for å kunne påvise genet raskere er det ønskelig å få metoden over på real-time PCR. Før analysering med PCR må DNA ekstraheres fra bakteriekoloni.



### 1.3 Ekstraksjon

Ekstraksjon skjer ved hjelp av NucliSens easyMAG og Booms metode. Dette er en absorpsjonsmetode som baserer seg på at nukleinsyrene til det lyserte prøvematerialet bindes til magnetiske silicakuler. Instrumentet inneholder magneter som trekker til seg silicakulene med bundne nukleinsyrer. Dette gjør det mulig å utføre gjentatte vasketrinn i løpet av prosessen for å få renest mulig produkt. Ved oppvarming vil nukleinsyrene frigjøres fra silicakulene, og kulene trekkes ut fra det ferdige eluatet av magnetene (Figur 1.2) (8) (9).



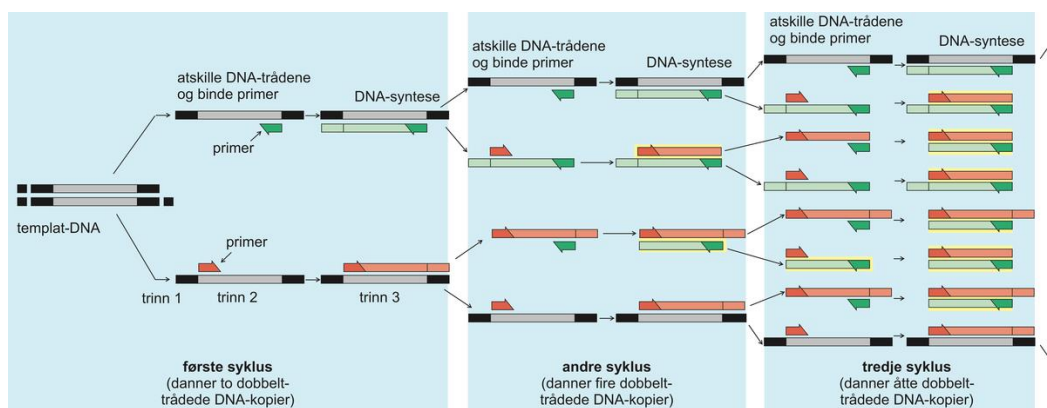
Figur 1.2 Bildet illustrerer hvordan ekstraksjon skjer ved Booms metode (8).

### 1.4 Polymerase Chain Reaction

PCR er en metode for å amplifisere DNA, og består av tre trinn: denaturering, hybridisering (også kalt annealing) og polymerisering. Reaksjonen er avhengig av primere, DNA polymerase, nukleotider, DNA-templat, og en termosyklus (PCR-maskin). Primere designes etter DNA-sekvensen som skal amplifiseres, siden de skal binde seg (hybridisere) spesifikt til deler av denne gensekvensen. Termosyklus er et instrument med varmeblokk som gjør det mulig å ha ulike temperaturer i de forskjellige trinnene, og varighet på hvert trinn kan innstilles. I varmeblokken heves og senkes temperaturen effektivt mellom trinnene. Hvilken temperatur, og hvor lenge hvert trinn skal vare, må tilpasses gensekvensen som skal amplifiseres og primerne som benyttes (10).

I det første trinnet, denaturering, som skjer ved rundt 95°C, blir hydrogenbindingene mellom nukleotidene brutt, slik at dobbeltrådet DNA som skal undersøkes blir denaturert til enkelttrådet DNA. Varigheten på det første denatureringstrinnet, og temperaturen, kan varieres etter størrelse på DNA-templatet for å sikre god denaturering (10).

Trinn 2, annealing eller hybridisering, foregår vanligvis ved 50-60°C. Primerne, som er syntetiske oligonukleotider cirka 20-30 baser lange, binder da til den enkeltrådede DNA-tråden. Primer I (sense-/forward-primer) og primer II (antisense-/revers-primer) hybridiserer til templatets komplementære basesekvens. Primernes evne til å hybridisere til DNA-templatet er avhengig av temperatur, det er viktig å tilpasse temperaturen i dette trinnet etter hvilke primere som benyttes. Smeltepunktet til en basesekvens beregnes fra forholdet mellom G/C og A/T. Optimal annealingtemperatur er 5°C lavere enn smeltepunktet til primeren (10). Det siste trinnet, trinn 3, er polymerisering. Denne prosessen foregår typisk ved 72°C. DNA-polymerase vil da syntetisere på nukleotider på DNA-enkeltrådene. Syntetiseringen starter på den frie 3'-OH-enden på primerne, og fortsetter mot 5'-enden på DNA-templatet. De tre trinnene utgjør en syklus, og for hver syklus dobles antallet DNA-tråder. Om man starter med 1 DNA-tråd, vil man etter 20 sykluser ha over 1 million kopier (Figur 1.3) (10).



Figur 1.3 Illustrasjon av de tre fasene i en PCR-reaksjon; denaturering (trinn 1), hybridisering (trinn 2) og polymerisering (trinn 3), og hvordan DNA blir amplifisert (11).

Konvensjonell PCR er en endepunktsmetode, hvor PCR-produkt kontrolleres etter amplifisering på termosykluser. Dette kan gjøres ved å visualisere produktet ved en gelelektroforese. DNA-ladder (størrelsesmarkør) og PCR-produkt tilsettes i forskjellige brønner på en agarosegel med tilsatt etidiumbromid, og gelen plasseres i et elektrisk felt. DNA, som er negativt ladd, vandrer mot positiv pol og separeres etter størrelse. PCR-produkt med få basepar vandrer raskere, og dermed lengre, enn større DNA-fragment. Når gelen utsettes for UV-lys vil DNA bundet til etidiumbromid fluorescere og vises som bånd i gelen. Størrelsen på det oppformerte PCR-produktet bestemmes ved å sammenligne båndstørrelsen til DNA-fragmentet med båndene med kjent molekylstørrelse fra DNA-ladder (12).

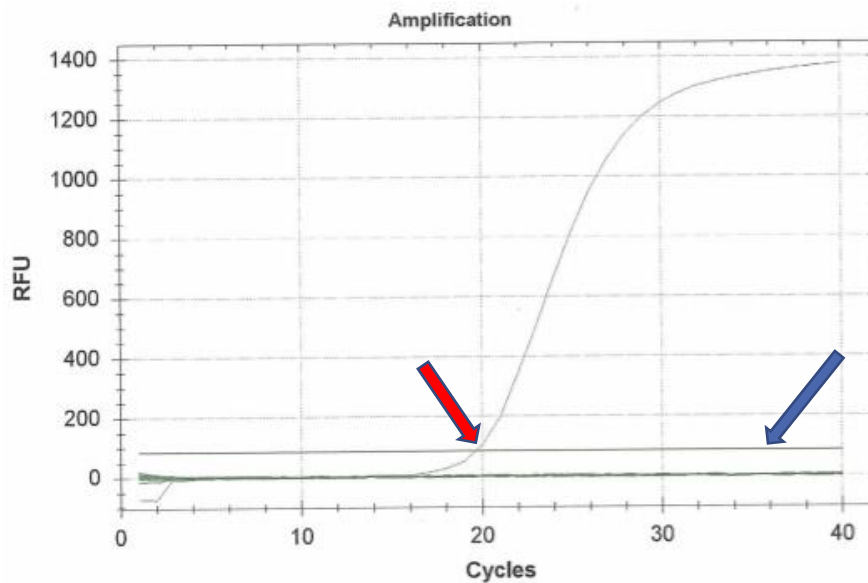
## 1.5 Real-Time PCR

Real-time PCR, eller sanntids PCR, innebærer at oppformering av PCR-produktet detekteres kontinuerlig for hver syklus. PCR reaksjonen går raskt, ofte mindre enn ett minutt per syklus, og mange prøver kan analyseres samtidig da maskinen benytter 96 brønns blokker (10).

Ved real-time PCR kan det benyttes spesifikke prober, for eksempel TaqMan probe, som sikrer påvisning av bestemte DNA-sekvenser i genomet (10). TaqMan proben, som består av cirka 25 baser, er komplementær til en gensekvens mellom de to spesifikke primerne. Proben er merket med to molekyler, en reporter (fluorofor) nær 5'-enden og en quencher nær 3'-enden. Så lenge proben er intakt vil quencheren hemme reporteren i å avgi fluorescens (12). DNA polymerasen inneholder 5'→3' eksonukleaseaktivitet. Under polymeriseringstrinnet vil eksonukleaseaktiviteten føre til at TaqMan proben kuttet slik at reporter og quencher skilles, og fluorescens vil avgis (10).

SybrGreen kan også benyttes til deteksjon av PCR-produkt ved real-time PCR. SybrGreen er et fargestoff som binder seg til dobbeltrådet DNA (dsDNA). Intensiteten av fluorescens er avhengig av mengden dsDNA som er tilgjengelig i prøven. Under denatureringsfasen vil fluorescenssignalene være lave siden SybrGreen ikke binder til enkelttrådet DNA. Under annealingfasen hybridiserer PCR primerne til targetsekvensen og syntetiserer PCR-produkt, da vil SybrGreen binde seg til dsDNA og fluorescensen begynner å øke. Under polymeriseringsfasen, hvor PCR primerne forlenges, vil en større mengde SybrGreen kunne binde seg. Målingen blir registrert på slutten av denne fasen, da er maksimal mengde fargestoff bundet til DNA. For hver syklus dannes det mer og mer dsDNA, og dette visualiseres i form av økende fluorescens. Siden SybrGreen binder alt dsDNA er det viktig å utføre smeltepunktanalyse for å se at det ikke er dannet uspesifikt PCR-produkt (12) (13, side 10-11).

Real-time PCR er en semi-kvantitativ metode. Resultater illustreres som kurver (Figur 1.4), med relative fluorescence units (RFU) på y-aksen og antall sykluser på x-aksen. Analysen har en «threshold»-verdi hvor fluorescens kan måles. Cycle threshold (Ct)-verdi er det punktet hvor fluorescenskurven krysser «threshold»-linjen. Lav Ct-verdi tyder på tidlig målbar fluorescens, altså mye DNA i prøven opprinnelig. På samme måte vil en høy Ct-verdi tyde på lite DNA i prøven opprinnelig eller inhibisjon, siden det kreves mange amplifiseringer før fluorescens blir målbar. Dersom det settes opp en 10-folds fortynningsrekke skal Ct-verdiene optimalt ligge med en avstand på 3,32 sykluser fra påfølgende fortykning. Jevnt separerte amplifikasjonskurver vil gi en lineær standardkurve (12) (13, side 4-5).



Figur 1.4 Resultat illustrert som kurve, med RFU på Y-akse, Cycles (sykluser) på X-akse, «threshold-linje» (blå pil) og Ct-verdi (rød pil).

## 1.6 Problemstilling

Toksisk sjokksyndrom er en akutt innsettende sykdom forårsaket av TSST-1 som enkelte stammer av bakterien *S. aureus* produserer. Toksinet igangsetter en kraftig immunrespons i kroppen som medfører at pasienten går fra å være frisk til akutt syk på kort tid. Uten nødvendig og riktig behandling vil sykdommen fort bli livstruende. Det er derfor viktig med rask diagnostikk og korrekt behandling. Genet *tst* hos *S. aureus* som koder for TSST-1 kan i dag påvises med konvensjonell PCR ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi.

Følgende problemstilling ble utarbeidet: *Er det mulig å etablere en real-time PCR metode med TaqMan probe for å påvise genet *tst* hos *S. aureus*, og kan *tst* påvises i direktemateriale?*

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Materiale

American Type Culture Collection (ATCC) stamme 51651 av *S. aureus* med genet *tst*, er en referansestamme i Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi St. Olavs Hospital sin stammebank. Denne stammen ble benyttet som positiv kontroll ved alle analyser (Tabell 2.1).

Tabell 2.1 Kontroller benyttet ved PCR-analyser, med stamme/navn og referanse/firma.

	Stamme/navn	Referanse/firma
Positiv kontroll	<i>S. aureus</i>	ATCC 51651
Negativ kontroll	Molecular Grade Water (MGW)	G-Biosciences

Ved undersøkelse av spesifisitet ble det benyttet eluat fra bakteriekoloni fra generelt bakteriepanel på 18 Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) stammer (vedlegg 8), og stafylokokkpanel fra pasientprøver, ATCC- og CCUG stammer på 20 prøver fra MRSA-referanselaboratoriet (vedlegg 9). Ved undersøkelse av anvendbarhet i klinisk bruk ble det benyttet eluat fra bakteriekoloni fra pasientprøver av 50 tilfeldige stammer Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) og 44 tilfeldige stammer Methicillin-Sensitive *S. aureus* (MSSA). Det ble også analysert eluat fra bakteriekoloni fra 8 tidligere *tst*-positive pasientprøver og 11 eksofoliative positive pasientprøver. Direktematerialet som ble undersøkt var fra 10 tilfeldige sårsekretprøver med vekst av *S. aureus*.

### 2.2 Ekstrahering

DNA-ekstraksjon av bakteriekoloni og direktemateriale før PCR (Tabell 2.2).

Tabell 2.2 Oversikt over reagenser benyttet ved enzymbehandling, tid og temperatur for inkubering, samt instrument og metode benyttet ved ekstraksjon av bakteriekoloni og direktemateriale.

	Enzymbehandling	Inkubering	Ekstraksjon
Bakteriekoloni <i>S. aureus</i>	TrisEDTA-buffer (TE-buffer) Proteinase K Lysostaphin	37°C, 15 min. 65°C, 15 min.	NucliSens easyMAG, Booms metode
Direktemateriale*	Proteinase K Lysostaphin	37°C, 15 min. 65°C, 15 min.	NucliSens easyMAG, Booms metode

\*Før enzymbehandling og ekstrahering ble prøver fra direktemateriale sådd ut på blodagar.

## 2.3 Reagenser, reaksjonsmikroskopi og utstyr

### 2.3.1 Primere

Konvensjonell PCR og real-time PCR med SybrGreen benyttet opprinnelige primere i bruk ved avdelingen (Tabell 2.3). Real-time PCR med TaqMan probe benyttet nye primere (informasjonsskriv for probe, sense- og antisense-primere er vist i henholdsvis vedlegg 2, 3 og 4), vist i Tabell 2.4.

Før utprøving av ny probe og nye primere analyserte bioinformatiker, ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St Olavs Hospital, de publiserte oligonukleotidsekvensene (14) mot alle tilgjengelige sekvenser i Genbank.

Tabell 2.3 Gensekvens til sense- og antisense-primere benyttet ved konvensjonell PCR og real-time PCR med SybrGreen, med størrelse på PCR-produktet og firmanavn.

<b>Primere for konvensjonell PCR og real-time PCR med SybrGreen</b>			
<b>Primer</b>	<b>Sekvens 5'→3' retning</b>	<b>PCR-produkt</b>	<b>Firmanavn</b>
Sense	CAG RTT TTA CCC CTG TTC C	545 basepar (bp)	TIB MolBiol
Antisense	TGT GGA TCC GTC ATT CAT TG		TIB MolBiol

Tabell 2.4 Gensekvens til probe, sense- og antisense-primere benyttet ved real-time PCR med TaqMan probe, med størrelse på PCR-produktet og firmanavn.

<b>Primere og probe for Real-time PCR med TaqMan probe</b>			
<b>Primer/probe</b>	<b>Sekvens 5'→3' retning</b>	<b>PCR-produkt</b>	<b>Firmanavn</b>
Sense, tst-S	ACTggTATAgTAgTgggTCTgA	81 bp	TIB MolBiol
Antisense, tst-R	gggCTATAATAAaggACTCgg		TIB MolBiol
TaqMan probe, tst-TM	HEX- AggCTgATgCTgCCATCTgTgTTT-- BHQ1	–	TIB MolBiol

### 2.3.2 Konvensjonell PCR

Konvensjonell PCR ble utført på 2720 Thermal Cycler (registreringsnummer 40781 og 45806) fra Applied Biosystems. Gensekvens til primere er vist i Tabell 2.3, og benyttet reaksjonsmiks er vist i Tabell 2.5 og vedlegg 5.

Tabell 2.5 Reagenser for reaksjonsmiks benyttet ved konvensjonell PCR, med konsentrasjon og firmanavn.

<b>Reaksjonsmiks, konvensjonell PCR</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>Firmanavn</b>
d’NTP	A	10 mM
	C	10 mM
	G	10 mM
	T	10 mM
GeneAmp 10X PCR Buffer m/15 mM MgCl <sub>2</sub>	–	Applied Biosystems
Sense primer	15 µM	TIB MolBiol
Antisense primer	15 µM	TIB MolBiol
Molecular Grade Water (MGW)	–	G-Biosciences
AmpliTaq Gold 1000 Units	5U/µL	Applied Biosystems

Gel, Ladder og instrument benyttet ved gelelektroforese er vist i Tabell 2.6.

Tabell 2.6 Reagenser og utstyr benyttet ved gelelektroforese, med navn, konsentrasjon og firmanavn.

<b>Reagens/Utstyr, gelelektroforese</b>		
<b>Navn</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>Firmanavn</b>
100 bp DNA Ladder	0,5 µg/µl	Invitrogen
E-Gel	2% Agarose (GP)	Invitrogen
E-Gel PowerBase	–	Invitrogen
Gel Doc 2000	–	BIO-RAD

### 2.3.3 Real-time PCR

Gensekvens for primere (Tabell 2.3) benyttet ved real-time PCR med SybrGreen og reaksjonsmiks benyttet ved disse analysene (Tabell 2.7 og vedlegg 6).

Tabell 2.7 Reagenser for reaksjonsmiks benyttet ved real-time PCR med SybrGreen, med konsentrasjon og firmanavn.

<b>Reaksjonsmiks med SybrGreen</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>Firmanavn</b>
Sense primer	5 µM	TIB MolBiol
Antisense primer	5 µM	TIB MolBiol
Quanta Perfecta SYBR Green FastMix, 2X reaksjonsbuffer	–	Quanta Biosciences
Molegular Grade Water (MGW)	–	G-Biosciences

Gensekvens for primere og probe (Tabell 2.4) benyttet ved real-time PCR med TaqMan probe og reaksjonsmiks benyttet ved disse analysene (Tabell 2.8 og vedlegg 7).

Tabell 2.8 Reagenser for reaksjonsmiks benyttet ved real-time PCR med TaqMan probe, med konsentrasjon og firmanavn.

<b>Reaksjonsmiks med TaqMan</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>Firmanavn</b>
Sense primer, <i>tst-S</i>	300 nM	TIB MolBiol
Antisense primer, <i>tst-R</i>	300 nM	TIB MolBiol
TaqMan Probe, <i>tst-TM</i>	150 nM	TIB MolBiol
Quanta Perfecta Custom Muiltplex PCR SuperMix, UNG*, 2X reaksjonsbuffer	–	Quanta Biosciences
Molegular Grade Water (MGW)	–	G-Biosciences

\*UNG er et enzym som bryter ned eventuell carry-over av PCR-produkt fra tidligere analyser.

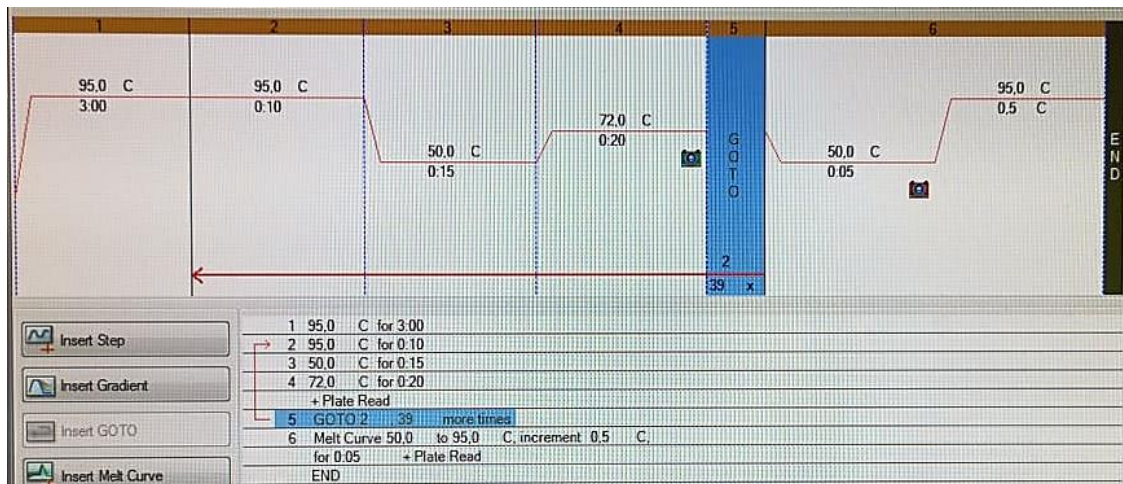
Utstyr og instrument benyttet ved real-time PCR (Tabell 2.9).

Tabell 2.9 Utstyr og instrument benyttet ved real-time PCR, med navn og firmanavn.

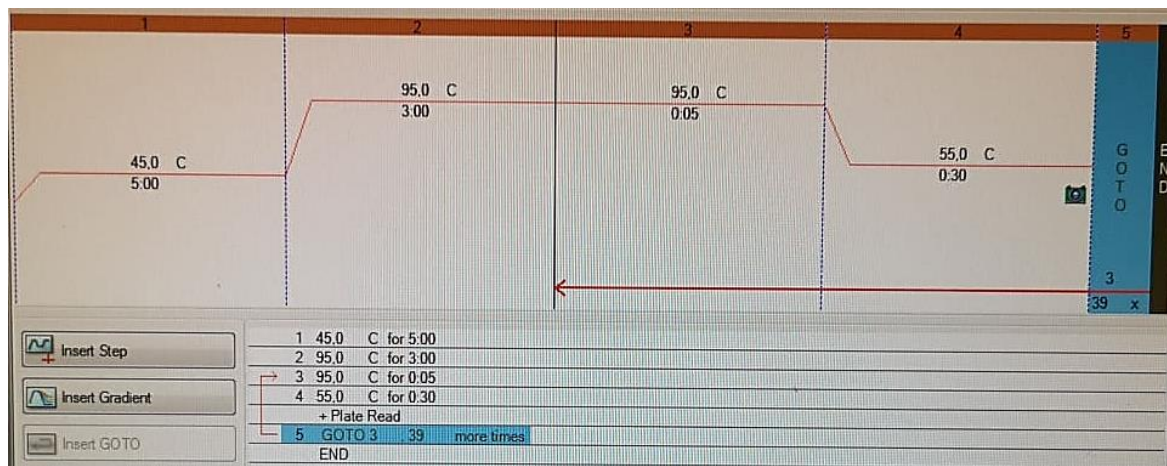
<b>Utstyr, real-time PCR</b>	
<b>Navn</b>	<b>Firmanavn</b>
0,2 ml Skirted 96-well PCR Plate, AB-0800	Thermo Scientific
Optically clear flat 8 Cap Strips, AB-0866	Thermo Scientific
CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler	BIO-RAD



Instrumentinnstillinger for real-time PCR med SybrGreen (Figur 2.1) og real-time PCR med TaqMan probe (Figur 2.2).



Figur 2.1 Illustrasjon av innstillinger for real-time PCR med SybrGreen på CFX96 Thermal Cycler. Viser temperatur og tid for hvert trinn i prosessen, samt antall sykluser. Ved trinn 1 skjer aktivering av polymerasen og ved trinn 2 foregår denaturering. Ved trinn 3 skjer hybridisering og ved trinn 4 polymerisering. Helt til slutt i trinn 4 avleses fluorescens, før trinn 5 gir beskjed om å gjenta syklusen (trinn 2-4). Etter amplifisering blir det gjennomført en smeltepunktanalyse med fluorescensavlesning (trinn 6).



Figur 2.2 Illustrasjon av innstillinger for real-time PCR med TaqMan probe på CFX96 Thermal Cycler. Antall sykluser (40) er vist med temperatur og tid for hvert trinn. Ved trinn 1 aktiveres UNG i mixen, ved trinn 2 skjer inaktivering av UNG og aktivering av polymerasen, ved trinn 3 denaturering og ved trinn 4 hybridisering og polymerisering. Helt til slutt ved trinn 4 avleses fluorescens, mens trinn 5 gir beskjed om å gjenta syklusen (trinn 3-4). Dette oppsettet ble brukt for alle real-time PCR analyser, med nye primere og TaqMan probe.

## 2.4 Sensitivitet til opprinnelige primere

For å undersøke sensitivitet av opprinnelige primere for *tst*-genet ble det laget en 10-folds fortynningrekke av positivkontroll (Tabell 2.1), som ble analysert ved å utføre konvensjonell PCR (Tabell 2.5 og Tabell 2.6) på 2720 Thermal Cyclers med innstillinger som vist i vedlegg 5.

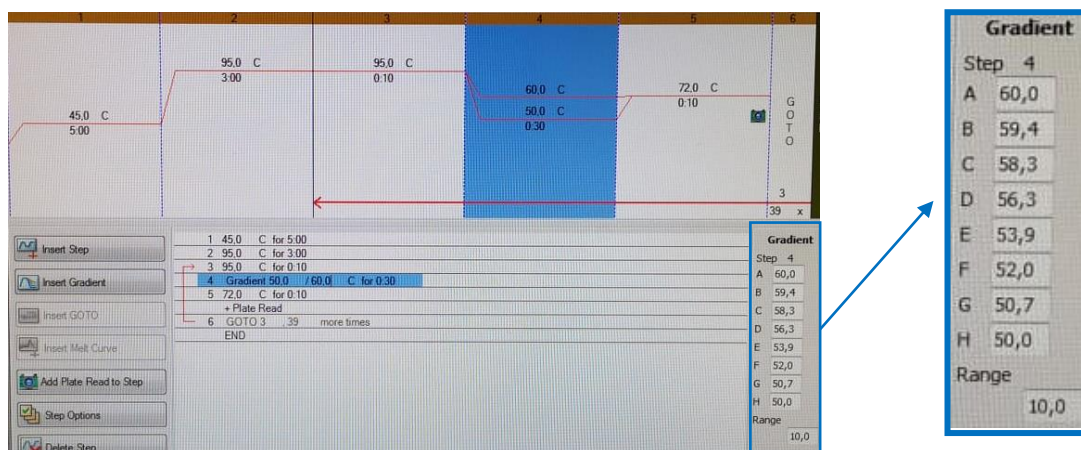
De samme fortynningene ble analysert på real-time PCR med SybrGreen, for å sammenligne sensitivitet med konvensjonell PCR. Analyserte på CFX96 Thermal Cykler med 50°C annealingtemperatur (Figur 2.1).

På grunn av differanse i tidsbruk og lik sensitivitet, ble real-time PCR med SybrGreen benyttet som sammenligningsmetode videre i forsøkene.

## 2.5 Optimalisering av real-time PCR med nye primere

Det ble satt opp en 10-folds fortynningsrekke, ned til  $10^{-4}$ , av positiv kontroll (Tabell 2.1) for å undersøke proben og primernes evne til å påvise genet *tst*. Analyserte på CFX96 Thermal Cykler med 55°C annealingtemperatur (Figur 2.2).

Temperaturgradient for annealingstrinnet ble utført på åtte paralleller av  $10^{-3}$ - og  $10^{-4}$ -fortynningene, for å finne den mest optimale annealingtemperaturen for primerne. Benyttet annealinggradient på 50,0-60,0°C (Figur 2.3).



Figur 2.3 Illustrasjon av temperaturgradientinnstillinger for annealingtrinnet, på real-time PCR med TaqMan probe på CFX96 Thermal Cykler.

Det var ønskelig å sammenligne PCR effektivitet mellom de opprinnelige primerne og de nye primerne. Analyserte derfor en 10-folds fortynningsrekke av positiv kontroll fra  $10^{-1}$  til  $10^{-7}$ , med tre paralleller på de to høyeste fortynningene ( $10^{-6}$  og  $10^{-7}$ ), både på real-time PCR med SybrGreen med  $50^{\circ}\text{C}$  annealingtemperatur (Figur 2.1), og real-time PCR med TaqMan med  $55^{\circ}\text{C}$  annealingtemperatur (Figur 2.2). Effektiviteten (E) beregnes fra standardkurvens «slope»-verdi ved bruk av følgende formel:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Optimal amplifiseringseffektivitet for en real-time PCR metode er på 90-105% (13, side 6). Formelen er innebygd i instrumentet sin software, så ved å legge inn resultatet som en standardkurve ble effektiviteten i % beregnet automatisk.

Spesifisitet ble undersøkt ved å analysere et generelt bakteriepanel (vedlegg 8), for å undersøke om primere og probe binder seg uspesifikt. Eluat fra bakteriekolonier ble fortynnet 1:10. Dette er rutine ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital, da for høy konsentrasjon av DNA kan hemme PCR-reaksjonen. Det ble også undersøkt et stafylokokkpanel på 20 prøver fra MRSA-referanselaboratoriet (vedlegg 9), som brukes ved validering av metoder for påvisning av stafylokokkgener.

For å undersøke anvendbarheten til metoden i klinisk bruk på laboratoriet ble det analysert eluat fra 50 stammer av MRSA og 44 stammer av MSSA, fra tilfeldige pasientprøver.

Det var ønskelig å undersøke deteksjonsgrensen til metoden og dette ble utført med colony forming units/ml (CFU/ml). Det ble laget en bakteriesuspensjon på 0,5 McFarland av positivkontrollen (Tabell 2.1), som tilsvarer en konsentrasjon på  $10^8$  CFU/ml. Fra bakteriesuspensjonen ble det laget en 10-folds fortynningsrekke. Et utvalg av fortynningene ble sådd ut på blodagar (Tabell 2.10) og antall kolonier ble telt. Deretter ble et utvalg av fortynningene ekstrahert på easyMAG og analysert på real-time PCR med TaqMan probe (Tabell 2.10). Antall CFU på blodagar ble brukt til å regne ut CFU/ml og antall kopier av *tst*-genet per PCR, i fortynningene som ble analysert på PCR. Resultatet av beregningene og PCR-analysen ble benyttet i en statistisk probit-analyse med IBM SPSS Statistics versjon 23 for å finne deteksjonsgrensen ved 95% konfidensintervall.

Tabell 2.10 Oppsett for deteksjonsgrenseforsøk, med oversikt over hvilke konsentrasjoner som ble dyrket på blodagar, hvilke det ble laget eluat av og hvilke som ble analysert på real-time PCR.

Teoretisk konsentrasjon [CFU/ml]	Blodagar [Paralleller]	Eluat tillaget på easyMAG [Antall]	Real-time PCR [Paralleller]
10000	3	1	5
5000	3	–	–
1000	3	1	25
500	–	–	20
100	–	1	25
10	–	1	5

Reproduserbarheten til metoden ble beregnet ved å sammenligne positivkontrollen for hvert forsøk gjort på real-time PCR med TaqMan probe. Positivkontrollen ble fortynnet 1:10, derfor ble  $10^{-1}$ -fortynningene fra forsøk utført på positivkontrollen også tatt med i beregningene.

## 2.6 Analysering av pasientmateriale på real-time PCR med nye primere

Tidligere *tst*-positive pasientprøver ble testet på den nye metoden med TaqMan probe (Figur 2.2). Analyserte også pasientprøver som har testet positivt for exfoliative toksin, for å se om noen av disse inneholdt *tst*-genet.

For å finne ut om *tst*-genet kan påvises i direktemateriale, på lik linje med bakteriekoloni, ble det analysert 10 prøver fra sårsekret med påvist *S. aureus*.

### 3 Resultater

#### 3.1 Sensitivitet til opprinnelige primere

Sensitivitetsforsøk på opprinnelige primere, med 10-folds fortykning av positiv kontroll (Tabell 2.1), med 3 paralleller av  $10^{-6}$ - og  $10^{-7}$ -fortynningene. Analysert på konvensjonell PCR og real-time PCR med SybrGreen.

Konvensjonell PCR detekterer *tst*-genet til  $10^{-5}$ -fortynning, mens real-time PCR med SybrGreen detekterer til  $10^{-7}$ -fortynning (Tabell 3.1) som indikerer bedre sensitivitet.

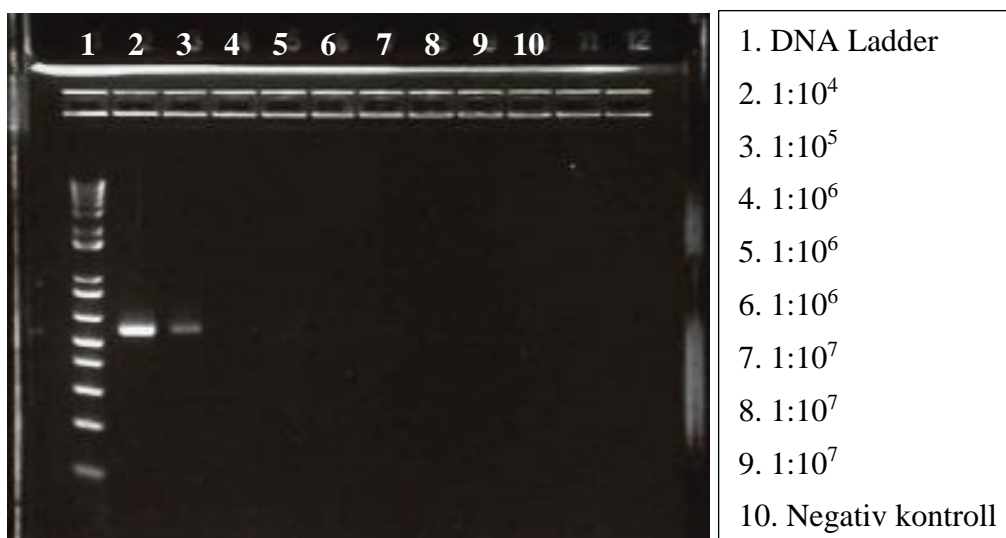
Konvensjonell PCR viser bånd på litt over 500 bp, som samsvarer med forventet størrelse til PCR-produktet på 545 bp, og ingen uspesifikke bindinger (Figur 3.1). Real-time PCR med SybrGreen (Figur 3.2 og Figur 3.3) viser ingen uspesifikk amplifisering og PCR-produktene har smeltepunkt med samme temperatur.

Tabell 3.1 Resultat av sensitivitetsforsøk for opprinnelige primere på konvensjonell PCR og real-time PCR med SybrGreen, med henholdsvis synlige bånd og Ct-verdi for fortynningene av positiv kontroll.

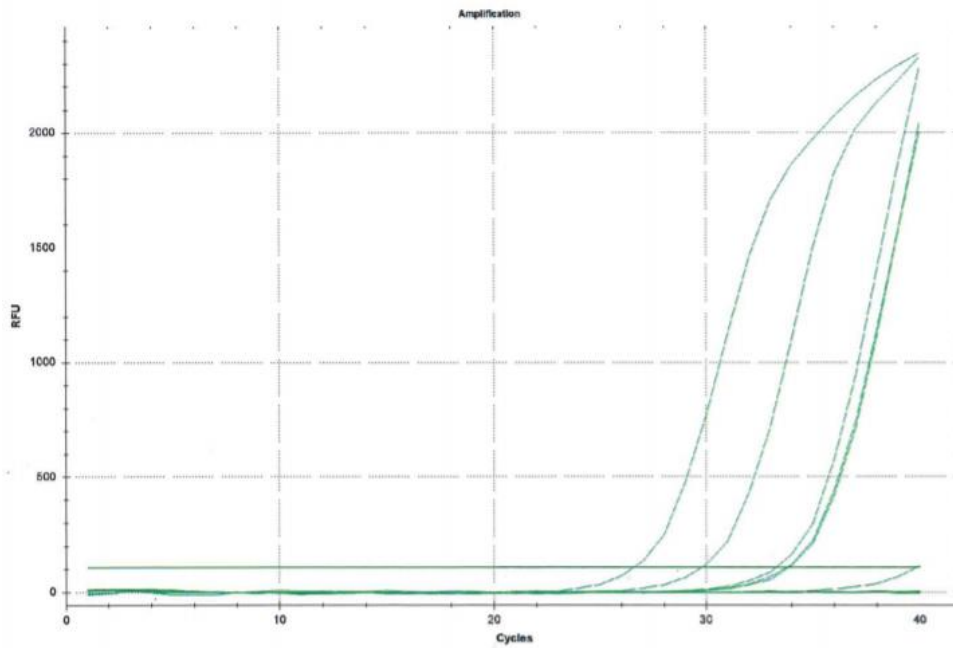
Fortynning av positiv kontroll	Konvensjonell PCR	Real-time PCR SybrGreen
	Bånd	Ct-verdi
$10^{-4}$	Ja	26,55
$10^{-5}$	Ja	29,76
$10^{-6}$	Nei	33,61*
$10^{-7}$	Nei	39,82**

\*Middelverdi av de tre parallellene.

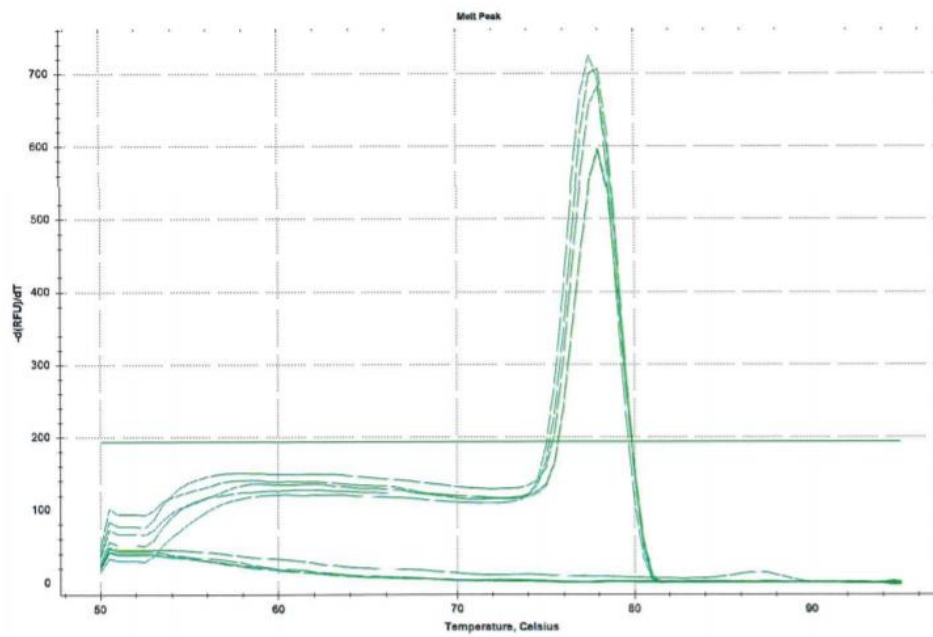
\*\*Kun en parallell med Ct-verdi.



Figur 3.1 Resultat av konvensjonell PCR utført på 10-folds fortykning av positiv kontroll, med negativ kontroll.



Figur 3.2 Graf som viser til resultat for real-time PCR med SybrGreen, med RFU på Y-akse og sykluser på X-akse.



Figur 3.3 Smeltepunktskurve som viser resultat fra smeltepunktsanalyse for real-time PCR med SybrGreen, med  $-d(RFU)/dt$  på Y-akse og temperatur i celsius på X-akse.



## 3.2 Optimalisering av real-time PCR med nye primere

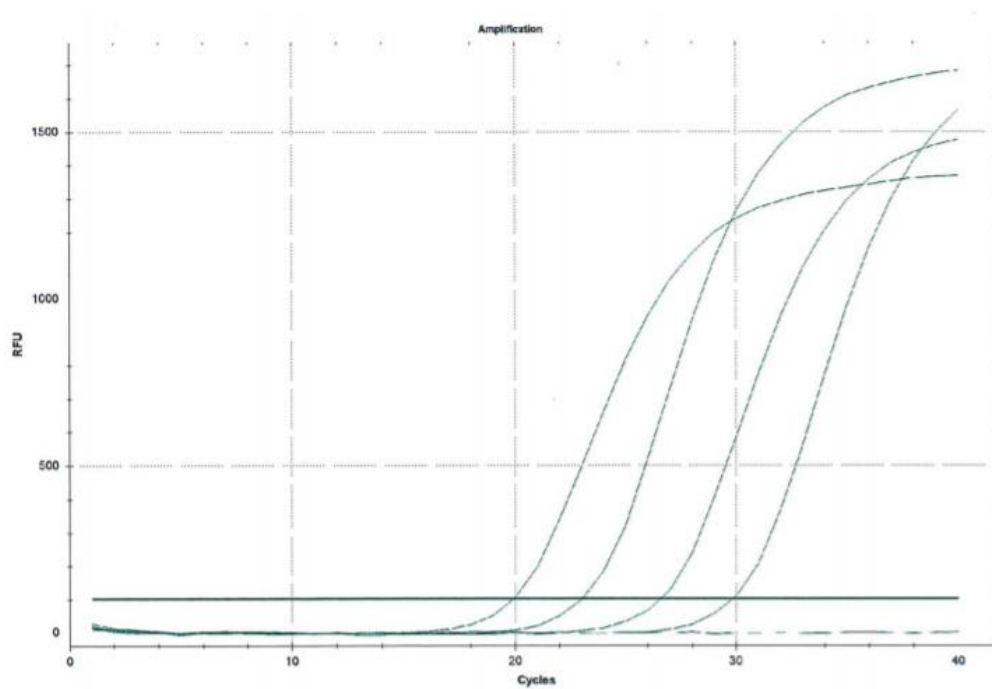
### 3.2.1 Test av probe og primere

Undersøker proben og primernes evne til å påvise genet *tst*. Forsøket utføres med en 10-folds fortynningsrekke av positiv kontroll (Tabell 2.1).

Resultatet (Tabell 3.2 og Figur 3.4) viser at proben og primerne påviser genet *tst*.

Tabell 3.2 Resultat fra test av primere og probe. Tabellen viser fortynninger av positiv kontroll med sine respektive Ct-verdier.

Fortynning	Ct-verdi
$10^{-1}$	19,91
$10^{-2}$	23,03
$10^{-3}$	26,55
$10^{-4}$	29,84



Figur 3.4 Graf som illustrerer resultatet fra Tabell 3.2, med RFU på Y-akse og sykluser på X-akse.

### 3.2.2 Temperaturgradient

Temperaturgradient utføres for å finne den mest optimale annealingtemperaturen for primerne. Utført på 10-folds fortynning av positiv kontroll med annealinggradient på 50,0-60,0°C (Figur 2.3).

Resultatet (Tabell 3.3) viser omtrentlig lik Ct-verdi ved alle temperaturene, for begge fortynningene. Ut fra dette ble 55°C annealingtemperatur valgt ved videre forsøk.

*Tabell 3.3 Resultat fra utført temperaturgradientforsøk med Ct-verdier for hver parallell av de to fortynningene av positiv kontroll.*

Parallell	Ct-verdi	
	Fortynning 10 <sup>-3</sup>	Fortynning 10 <sup>-4</sup>
1	27,18	30,63
2	27,33	30,49
3	27,14	30,54
4	27,14	30,41
5	27,06	30,23
6	27,19	30,42
7	27,17	30,30
8	27,47	30,61



### 3.2.3 Effektivitet og sensitivitet

Sammenligning av effektivitet og sensitivitet for real-time PCR med TaqMan probe med nye primere, og real-time PCR med SybrGreen med opprinnelige primere. Utført med 10-folds fortynning av positiv kontroll, med 3 paralleller av  $10^{-6}$ - og  $10^{-7}$ -fortynningene, da disse fortynningene er nær antatt deteksjonsgrense.

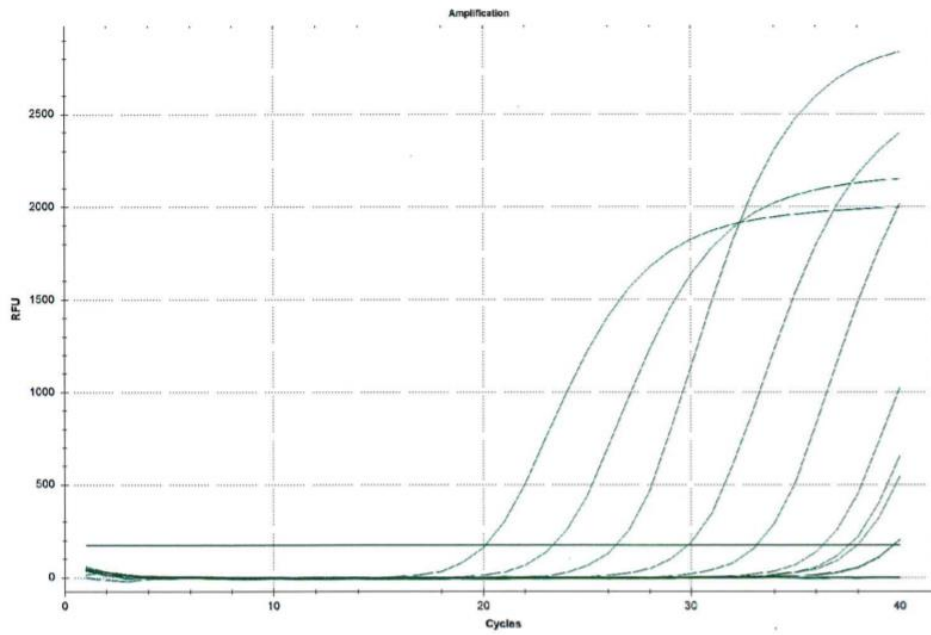
Real-time PCR med TaqMan probe (Tabell 3.4 og Figur 3.5) detekterer *tst*-genet til  $10^{-7}$ -fortynning og har en effektivitet på 98,6% (Figur 3.6 og Tabell 3.5), som er innenfor optimalt effektivitetsområde. Real-time PCR med SybrGreen (Tabell 3.4 og Figur 3.7) detekterer til  $10^{-6}$ -fortynning, og har en effektivitet på 82,0% (Figur 3.8 og Tabell 3.5) som er lavere enn optimalt. Resultatet viser at real-time PCR med TaqMan probe har bedre sensitivitet og effektivitet enn real-time PCR med SybrGreen.

Tabell 3.4 Resultat av effektivitets- og sensitivitets-sammenligning av real-time PCR med TaqMan probe, og real-time PCR med SybrGreen, med Ct-verdi for fortynningene av positiv kontroll.

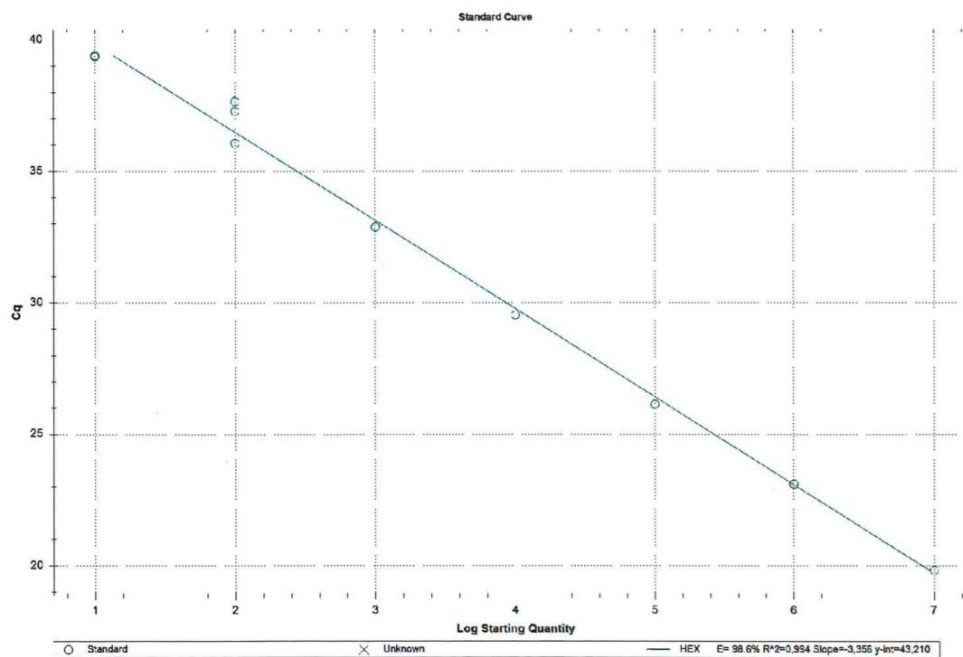
Fortynning av positiv kontroll	Ct-verdi	
	Real-time PCR TaqMan	Real-time PCR SybrGreen
$10^{-1}$	20,10	15,32
$10^{-2}$	23,33	19,23
$10^{-3}$	26,36	22,60
$10^{-4}$	29,83	26,20
$10^{-5}$	33,14	29,88
$10^{-6}$	37,28*	34,60*
$10^{-7}$	39,69**	Negativ

\*Middelverdi av de tre parallellene.

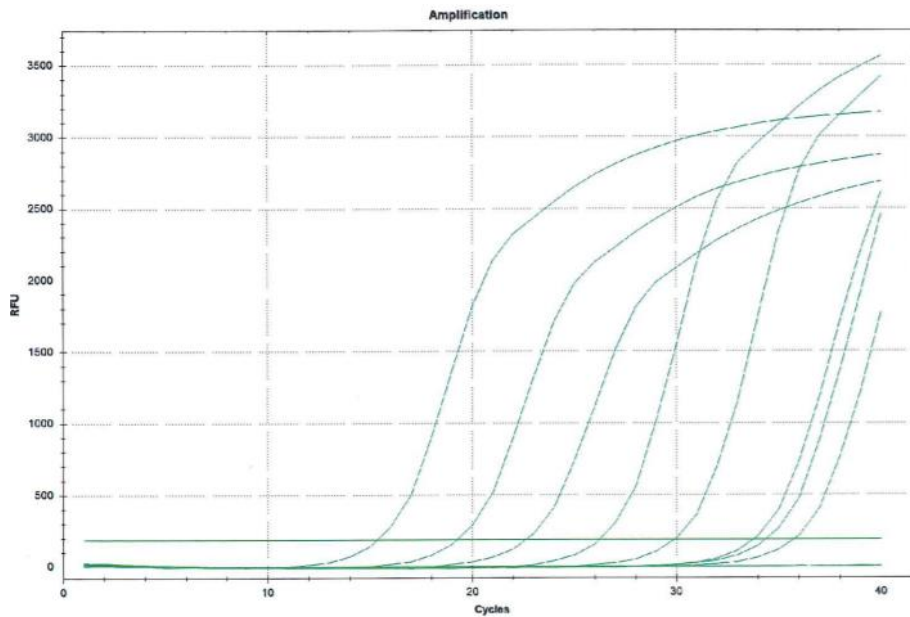
\*\*Middelverdi av de to parallellene som ga Ct-verdi.



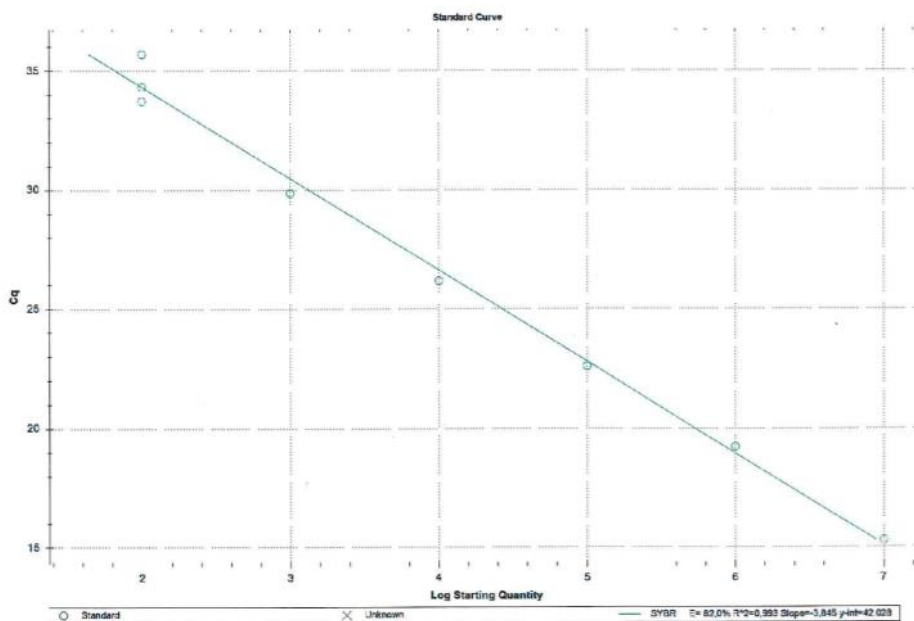
Figur 3.5 Graf som illustrerer resultatet for real-time PCR med TaqMan probe (Tabell 3.4), med RFU på Y-akse og sykluser på X-akse.



Figur 3.6 Standardkurve med beregnet effektivitet for real-time PCR med TaqMan probe.



Figur 3.7 Graf som illustrerer resultatet for real-time PCR med SybrGreen (Tabell 3.4), med RFU på Y-akse og sykluser på X-akse.



Figur 3.8 Standardkurve med beregnet effektivitet for real-time PCR med SybrGreen.

Tabell 3.5 Sammenligning av effektivitet for real-time PCR med TaqMan probe og real-time PCR med SybrGreen, med instrumentberegnete verdier for  $R^2$ , Slope og effektivitet.

	TaqMan	SybrGreen
$R^2$	0,994	0,993
Slope	-3,356	-3,845
Effektivitet [%]	98,6	82,0

### 3.2.4 Spesifisitet

Spesifisitet undersøkes for å sjekke om primere og probe binder uspesifikt til DNA fra andre bakterier, og er utført på et generelt bakteriepanel (vedlegg 8) og 20 prøver fra et stafylokokk-valideringspanel (vedlegg 9).

Resultatet for det generelle bakteriepanelet ga negativt resultat for bakteriestammene. Både prøve 6 og 24 (Tabell 3.6) fra stafylokokk-valideringspanelet som ble positive, hadde tidligere fått påvist *tst*-genet ved bruk av helgenomsekvensering. Resterende 18 prøver var negative for *tst*-genet, men det ble ikke sjekket om de var helgenomsekvensert.

Disse resultatene indikerer at primerne har god spesifisitet for *tst*-genet, og at de ikke binder uspesifikt.

Tabell 3.6 *Tst*-positive prøver fra stafylokokk-valideringspanel, med tilhørende Ct-verdi.

Prøve	Stamnummer	Ct-verdi
6	Ukjent opprinnelse	23,33
24	ATCC 700698	26,13

### 3.2.5 Anvendbarhet i klinisk bruk

Et tilfeldig utvalg av 50 MRSA- og 44 MSSA-pasientprøver ble analysert med ny metode, for å undersøke metodens anvendbarhet i klinisk bruk på laboratoriet. Prøvene ble fortynnet 1:10.

3 MRSA-prøver (6%) og 11 MSSA-prøver (25%) fikk påvist *tst*-genet (Tabell 3.7). Dette tyder på at metoden er anvendbar i klinisk bruk.

*Tabell 3.7 Resultat av anvendbarhetsundersøkelse på MRSA- og MSSA-prøver, med tilhørende Ct-verdi. Negative prøver er ikke med i tabellen.*

<b>Prøve</b>	<b>Ct-verdi</b>
MRSA 8	18,20
MRSA 23	16,51
MRSA 25	39,45
MSSA 3	17,79
MSSA 6	17,01
MSSA 7	21,98
MSSA 15	18,38
MSSA 22	17,14
MSSA 27	17,82
MSSA 32	32,09
MSSA 33	17,81
MSSA 34	18,91
MSSA 35	19,07
MSSA 38	18,34

### 3.2.6 Deteksjonsgrense

For å finne lavest antall kopier som må til for å detektere genen *tst* på real-time PCR med TaqMan probe ble det satt opp en 10-folds fortynningsrekke, med utgangspunkt i bakteriesuspensjon av positiv kontroll på 0,5 McFarland (Tabell 2.10). Resultatet er vist i Tabell 3.8 og Tabell 3.9.

Tabell 3.8 CFU/ml beregnet fra fortynning på 0,5 McFarland måling, med telling av kolonier på blodagar.

Teoretisk CFU/ml	Antall $\mu\text{L}$ avsatt på blodagar	Talte kolonier på blodagar	Middelverdi av telling	CFU/ml etter telling
10000	20	210	211	10550
	20	215		
	20	208		
5000	20	103	93	4650
	20	96		
	20	81		
1000	50	46	49	980
	50	52		
	50	50		

4650 CFU/ml etter telling (Tabell 3.8) ble benyttet videre for å beregne kopier/ml prøvemateriale og kopier/PCR (Tabell 3.9).

170  $\mu\text{L}$  av fortynning eluert til 55  $\mu\text{L}$  på EasyMag. 5  $\mu\text{L}$  eluat benyttes per PCR.

4650 CFU/ml = 72 kopier/PCR.

Tabell 3.9 Resultat av deteksjonsgrenseforsøk med fortynningsrekke, utført på real-time PCR med TaqMan probe.

Kopier/ml prøvemateriale	Kopier/PCR	Antall replikater testet i PCR	Antall positive i PCR
9300	144	5	5
930	14,4	25	24
465	7,2	20	18
93	1,4	25	14
9,3	0,1	5	0

Probit analyse av resultatene (Tabell 3.9) viser at på 95% konfidensnivå er deteksjonsgrensen på 11 kopier/PCR (Vedlegg 10).

### 3.2.7 Reproduserbarhet

Reproduserbarheten til metoden er beregnet ved å sammenligne  $10^{-1}$ -fortynningene av positivkontrollen fra hvert forsøk, utført på real-time PCR med TaqMan probe i dette prosjektet.

Resultatet (Tabell 3.10) viser at metoden har god reproduserbarhet. %CV er innenfor avdelingens krav på 2,0%.

Tabell 3.10 Beregning av metodens reproduserbarhet, med Ct-verdier, middelvei, standardavvik og %CV.

	<b>Ct-verdi</b>
<b>Positiv kontroll (1:10)</b>	19,91
	19,84
	19,62
	19,76
	19,70
	19,43
	19,82
	19,66
	20,11
	20,01
	19,77
	19,80
	19,22
	19,07
19,33	
<b>Middelvei</b>	19,67
<b>Standardavvik</b>	0,2918
<b>%CV</b>	1,5

### 3.3 Analysering av pasientmateriale på real-time PCR med nye primere

#### 3.3.1 *Tst*-positive pasientprøver

Kjente *tst*-positive pasientprøver analyseres på real-time PCR med TaqMan probe for å undersøke om den nye metoden gir samme resultat som konvensjonell PCR. Prøvene ble fortynnet 1:10.

Resultatet (Tabell 3.11) viser at resultater i real-time PCR med TaqMan probe samsvarer med konvensjonell PCR.

*Tabell 3.11 Ct-verdi for kjente *tst* positive pasientprøver med anonymiserte prøvenummer.*

<b>Prøve</b>	<b>Ct-verdi</b>
1	17,99
2	17,39
3	16,89
4	17,23
5	18,44
6	17,11
7	16,26
8	17,26



### 3.3.2 Eksfoliative positive pasientprøver

Det var ønskelig å sjekke om kjente eksfoliative positive pasientprøver også kan inneholde genet *tst*. Prøvene ble fortynnet 1:10.

Resultatet (Tabell 3.12) viser at genet *tst* ikke ble detektert i disse pasientprøvene.

*Tabell 3.12 Resultat fra analysering av positive prøver på eksfoliativt toksingen. Oversikt over prøvenummer og Ct-verdi.*

<b>Prøve</b>	<b>Ct-verdi</b>
EXFO 1	Negativ
EXFO 2	Negativ
EXFO 3	Negativ
EXFO 4	Negativ
EXFO 5	Negativ
EXFO 6	Negativ
EXFO 7	Negativ
EXFO 8	Negativ
EXFO 9	Negativ
EXFO 10	Negativ
EXFO 11	Negativ

### 3.3.3 Analyse på direktemateriale

Eluat direkte fra sårsekret analyseres for å undersøke om det er mulig å påvise genet *tst* fra direktemateriale.

Direktemateriale fra prøve 3 er positiv for genet *tst* (Tabell 3.13), resterende prøver er negative. Det er dermed mulig å påvise genet *tst* fra direktemateriale. Prøve 3 hvor *tst*-genet ble påvist ble også dyrket på blodagar, ekstrahert og analysert, med positivt resultat.

Tabell 3.13 Resultat av analyse på direktemateriale, med tilhørende Ct-verdier.

Direkteprøve	Ct-verdi
1	Negativ
2	Negativ
3	28,18
4	Negativ
5	Negativ
6	Negativ
7	Negativ
8	Negativ
9	Negativ
10	Negativ

## 4 Diskusjon

### 4.1 Sensitivitet til opprinnelige primere

For å kunne validere de nye primerne var det nødvendig å sammenligne de opp mot de opprinnelige. Det var derfor ønskelig å kunne bruke de opprinnelige primerne på en real-time metode siden den er mer tidsbesparende enn konvensjonell PCR. De opprinnelige primerne gir et PCR-produkt med størrelse på 545 bp som er stort, siden optimal lengde er 60-200 bp for real-time PCR (15, side 24). Sammenligning av real-time PCR med SybrGreen og konvensjonell PCR viste likevel at real-time metoden påviste *tst*-genet og var mer sensitiv enn den konvensjonelle. Basert på dette var det mulig å bruke denne metoden for sammenligning av de opprinnelige primerne opp mot de nye primerne på real-time PCR med TaqMan probe.

### 4.2 Optimalisering av real-time PCR med nye primere

Undersøkelse av TaqMan proben og de nye primernes evne til å påvise *tst*-genet viste at de kan påvise genet, følgelig var det muligheter for å etablere real-time PCR metoden. Dette vil være nyttig for pasienten, siden en real-time PCR er mer tidsbesparende enn en konvensjonell PCR. For pasienten kan et hurtig prøvesvar være livsviktig, siden sykdomsforløpet ved TSS kan utvikle seg fort og føre til en kritisk tilstand (4). For laboratoriet vil overgang til real-time PCR være gunstig for arbeidsflyten.

Ved optimalisering av annealingtemperatur viste det seg at de ulike temperaturene ga samme resultat, og dermed kunne det velges en annealingtemperatur mellom 50°C og 60°C. Det ble valgt annealingtemperatur på 55°C, siden avdelingen har mange analyser som utføres ved denne temperaturen, blant annet eksfoliative toksiner som det også er relevant å lete etter hos pasienter med alvorlig *S. aureus* infeksjon. Når flere analyser utføres med samme temperaturbetingelser kan de analyseres samtidig og gi bedre utnyttelse av PCR instrumentene.

Sammenligningen av effektivitet og sensitivitet viser at real-time PCR med TaqMan probe og nye primere både er mer sensitiv for *tst*-genet og mer effektiv, enn real-time PCR med SybrGreen og opprinnelige primere. Sannsynlig årsak til dette er at de nye primerne gir et PCR-produkt på 81 bp, mens de opprinnelige primerne gir et PCR-produkt på 545 bp. Det er lettere å oppnå høy effektivitet med et kortere PCR-produkt (15, side 24), noe resultatene fra dette prosjektet viser. Ny metode med nye primere virker derfor å være best egnet til å påvise *tst*-genet. God sensitivitet er viktig for at *tst*-genet blir påvist dersom bakteriekolonien som

ekstraheres innehar genet. Sensitiviteten til den nye metoden viser også at det kan være mulig å teste på direktemateriale, siden metoden klarer å påvise små mengder av *tst*-genet.

Spesifisitetsundersøkelsene viser at de nye primerne ikke binder uspesifikt, siden alle prøvene fra det generelle bakteriepanelet var negative. Ved analysing på stafylokokk-valideringspanel ble de positive prøvene bekreftet positive ved å se på resultat fra helgenomsekvensering, men de negative prøvene ble ikke sjekket. For å kontrollere resultatene kan det være aktuelt å undersøke med flere analyser, og eventuelt utføre helgenomsekvensering av prøver der disse data ikke er tilgjengelig. Det er viktig at analysen har god spesifisitet for å unngå falskt positive prøvesvar, siden dette kan føre til både feil behandling og at den egentlige grunnen til sykdom ikke blir oppdaget.

Resultatene fra undersøkelsen av anvendbarhet utført på MRSA- og MSSA-prøver viser at real-time PCR med TaqMan probe kan være nyttig i klinisk bruk på laboratoriet.

Prosentandelen av positive prøver indikerer at *tst*-genet er vanlig forekommende hos *S. aureus* i Midt Norge, og høyt i forhold til at TSS er en sjelden tilstand klinisk (4). Den gode anvendbarheten har gitt avdelingen et verktøy som gjør det enklere å screene pasientprøver, for eksempel blodkulturer. Det kan være interessant å screene et større antall MRSA- og MSSA- prøver for å undersøke prevalensen til *tst*-genet. I tillegg kan en screening av et stort antall stammer for påvisning av *tst*-genet, koblet med kliniske opplysninger, gi mulighet for å lete etter andre faktorer hos disse *S. aureus* stammene eller pasientene som bidrar til det kliniske forløpet.

For å finne deteksjonsgrensen ved hjelp av probit-analyse måtte først kopier/ml prøvemateriale og kopier/PCR beregnes, siden dette var to av parameterne som skulle være med i analysen. Beregningene var basert på resultatet fra telling på blodagar, og telling av oppveksten fra 5000 CFU/ml ble valgt. Disse tre agarene hadde best adskilte kolonier, noe som økte sannsynligheten for at resultatet av tellingen var korrekt, og dermed også resultatet av probit-analysen. Det var ønskelig å finne deteksjonsgrensen til den nye metoden, fordi det er relevant å vite hvor mange kopier av genet som må være til stede i PCR-reaksjonen for at det skal kunne påvises. Resultatet viste at dersom det er minimum 11 kopier av genet tilstede i PCR-reaksjonen, vil *tst*-genet med 95% sikkerhet bli påvist. Dette er viktig å kjenne til dersom det ekstraheres eluat direkte fra prøvemateriale. Prøven kan inneholde en liten mengde av bakterien og dermed få kopier av genet. Dersom dette er tilfellet vil ikke metoden kunne amplifisere nok av genet *tst* til at PCR-produktet gir et fluorescenssignal, kan da risikere å få falskt negativt svar. Siden prøvene skal dyrkes i tillegg kan eluat fra

bakteriekoloni analyseres påfølgende dag, for å bekrefte resultatet fra analysering på direktemateriale. For få kopier av *tst*-genet vil trolig ikke være et problem ved ekstrahering av eluat fra bakteriekoloni. Korrekte vekstbetingelser og riktig næring i agaren vil gi rikelig vekst av bakterien, og det vil være mer enn nok av bakterien og genet tilstede for påvisning med PCR.

Resultat fra real-time PCR med TaqMan probe viser til god reproducerbarhet, siden %CV ligger innenfor laboratoriets krav. Ct-verdiene fra denne undersøkelsen er tatt fra mange forskjellige forsøk med den nye metoden i dette prosjektet. Fortynning av kontroll og tillaging av reaksjonsmiks er utført av forskjellige personer, og det er blitt benyttet forskjellig utstyr og instrumenter. Dette viser at metoden har god reproducerbarhet under varierende betingelser, noe som indikerer at et kvalitetssikkert resultat kan forventes dersom det ikke oppstår tilfeldige feil. God reproducerbarhet viser god kvalitet og øker påliteligheten til prøvesvaret.

#### 4.3 Analysering av pasientmateriale på real-time PCR med nye primere

Ved undersøkelse av tidligere *tst*-positive pasientprøver ble alle prøvene positive. Dette tyder på at metoden ikke gir falskt negativt resultat. Sett i sammenheng med at sensitiviteten og spesifisiteten for metoden virker å være god, indikerer det at metoden påviser *tst*-genet dersom det er tilstede. For å validere at metoden ikke gir falskt negative svar, siden det kan føre til at pasienten ikke får den korrekte behandlingen, kan det analyseres et større panel av *tst*-positive prøver.

Eksfoliative toksiner og TSST-1 blir begge produsert av *S. aureus* (1), det kan derfor være ønskelig å utføre multiplex PCR for påvisning av genet for eksfoliative toksiner og *tst*-genet. Ingen av de eksfoliative positive pasientprøvene var positive for *tst*-genet, som antyder at de eksfoliative genskvensene ikke interferer med de nye primerne. I tillegg bruker de to analysene samme annealingtemperatur, så om ønskelig er det mulig å utføre multiplex PCR for påvisning av disse genene.

Resultatet av undersøkelse på direktemateriale, og den lave deteksjonsgrensen, gir indikasjon om at det er mulig å påvise *tst*-genet i eluat ekstrahert fra direktemateriale. Spesifisiteten til metoden underbygger at resultatet er reelt positiv, men spesifisiteten bør også undersøkes på et panel av direktemateriale, siden det inneholder større mengder DNA som kan interferere. Å analysere eluat fra direktemateriale er veldig nyttig da det vil påvirke svartiden betraktelig. Ved å påvise genet *tst* i direktemateriale kan prøvesvar gis ut samme dag som prøve kommer inn til laboratoriet, i motsetning til å gå veien om dyrkning da dette tar minst et døgn.

*S. aureus* er en del av normalfloraen, og kan være tilstede uten å gi sykdom (16). Det er også usikkert om en infeksjon med *S. aureus* med genet *tst* alltid vil gi TSS. Det er trolig ikke relevant for kliniker å påvise *tst*-genet dersom det ikke er uttrykt, eller dersom det ikke er *S. aureus* som er grunnen til sykdom hos pasienten. Dette forsøket ble utført på et tilfeldig utvalg av ti sårsekretprøver, og kliniske opplysninger var ikke kjent. For å kunne fastslå at dette er en metode som påviser *tst*-genet på lik linje i direktemateriale som bakteriekoloni, bør mottatte prøver til *tst* ekstraheres til real-time PCR på direktemateriale parallelt med utsåing. Resultatene vil etter en viss tid vise om sensitiviteten er god nok. Det kan også være interessant å utføre undersøkelser på om *tst*-genet alltid kommer til uttrykk når det er tilstede.

## 5 Konklusjon

Resultatet av de analysene som er utført viser at real-time PCR med TaqMan probe som ble etablert er godt egnet for å påvise genet *tst* hos *S. aureus*. Undersøkelsene som er utført viser til god sensitivitet, spesifisitet, effektivitet, en lav deteksjonsgrense, og muligheten for å analysere på direktemateriale er absolutt tilstede. Overgang fra konvensjonell PCR til real-time PCR påvirker svartiden betraktelig, noe som er til stor fordel for pasienten. Dersom en overgang til påvisning av *tst*-genet i direktemateriale er mulig, vil svartiden bli enda kortere.

Det kan utføres videre analyser på kjent *tst*-positive prøver for å sikre at metoden ikke gir falskt negative svar. En bredere undersøkelse av direktemateriale bør utføres for å se om *tst*-genet kan påvises i like stor grad i direktemateriale som bakteriekoloni.

## 6 Referanser

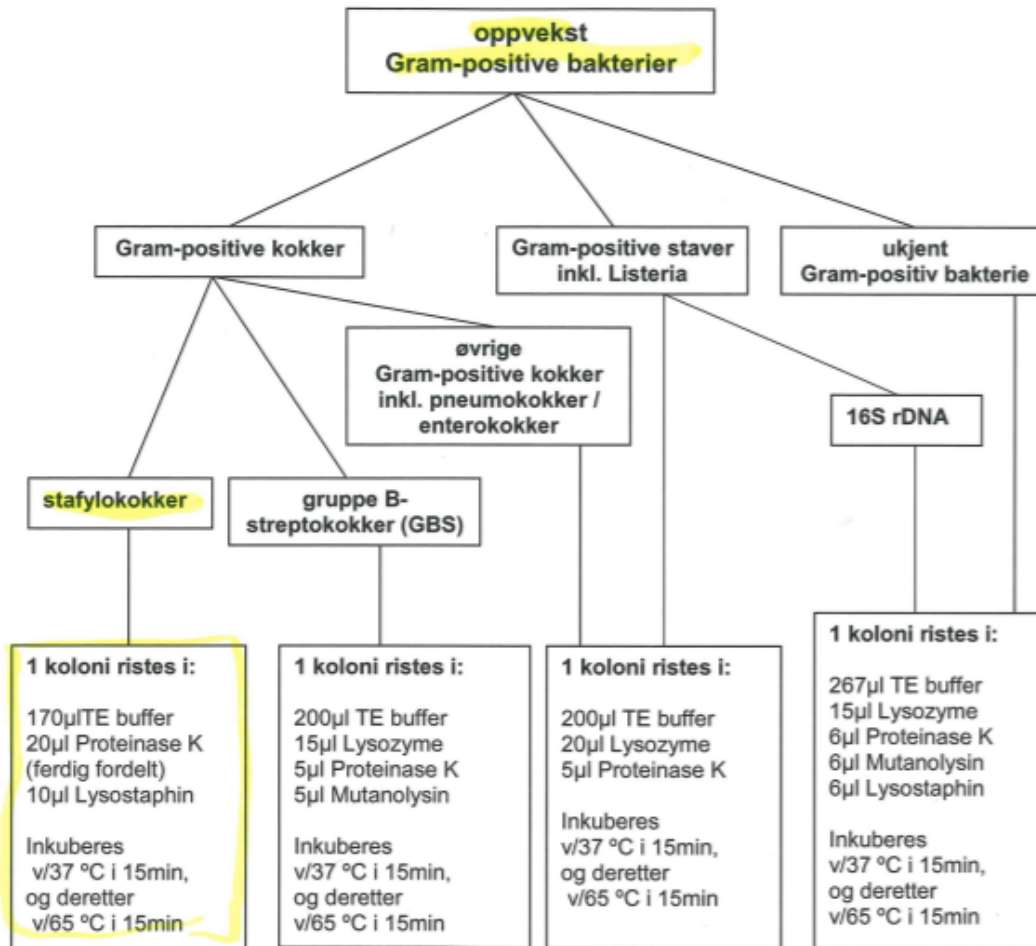
1. Rollag H, Müller F, Tønjum T. Medisinsk Mikrobiologi. 4. utgave, 1. opplag 2019. Gyldendal Norsk Forlag 2019;
2. Myrvang B. Toksisk sjokk-syndrom. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2017 [sitert 8. april 2019]. Tilgjengelig på: [http://sml.snl.no/toksisk\\_sjokk-syndrom](http://sml.snl.no/toksisk_sjokk-syndrom)
3. Toksisk sjokksyndrom [Internett]. NHI.no. [sitert 8. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/bakteriesykdommer/toksisk-sjokksyndrom/>
4. Sjursen H. Toksisk sjokk-syndrom [Internett]. Tidsskrift for Den norske legeforening. [sitert 13. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2008/12/noe-laere-av/toksisk-sjokk-syndrom>
5. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cell Mol Life Sci. september 2010;67(18):3057–71.
6. Chu V. Staphylococcal-toxic-shock-syndrome [Internett]. UpToDate. Tilgjengelig på: <https://www.uptodate.com/contents/staphylococcal-toxic-shock-syndrome>
7. Goldmann O, Medina E. Staphylococcus aureus strategies to evade the host acquired immune response. Int J Med Microbiol. 1. august 2018;308(6):625–30.
8. Bygland Nikolaisen A. NucliSens easyMAG, bruk og vedlikehold. EQS prosedyre; 2017.
9. nuclisens\_easymag\_brochure-1.pdf [Internett]. [sitert 16. mai 2019]. Tilgjengelig på: [https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary\\_us/files/nuclisens\\_easymag\\_brochure-1.pdf?fbclid=IwAR1X4UXoAVWWruVQivd17cqpo6dN06jfbhKVCz1EeYqRmv6Ac7rOAIktCN4](https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/nuclisens_easymag_brochure-1.pdf?fbclid=IwAR1X4UXoAVWWruVQivd17cqpo6dN06jfbhKVCz1EeYqRmv6Ac7rOAIktCN4)
10. Sjøberg NO. Molekylær genetikk, Genteknologi - Humant DNA. I: 5. utgave. s. 180–2, 245–7.
11. Fossum S, Dissen E. Polymerasekjedereaksjon. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 8. april 2019]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>
12. Haugen IJ. Konvensjonell PCR, Real-time PCR, prinsipp. EQS prosedyre; 2018.
13. Bulletin\_5279.pdf [Internett]. [sitert 13. mai 2019]. Tilgjengelig på: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5279.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf)
14. Motoshima Maiko mfl. Genetic Diagnosis of Community-Acquired MRSA: Multiplex Real-Time PCR Method of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Typing and Detecting Toxin Genes. 2010.
15. real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf [Internett]. [sitert 14. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
16. Tønjum T. Stafylokokker. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 10. mai 2019]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/stafylokokker>



## 7 Vedlegg

Vedlegg 1 Oppsett på enzymbehandling av stafylokokker før ekstraksjon .....	36
Vedlegg 2 Informasjonsskriv om TaqMan probe.....	37
Vedlegg 3 Informasjonsskriv om sense/forward primer .....	38
Vedlegg 4 Informasjonsskriv om antisense/reverse primer .....	39
Vedlegg 5 Oppsett reaksjonsmiks og instrumentinstillinger for konvensjonell PCR .....	40
Vedlegg 6 Blandingsforhold reaksjonsmiks for real-time PCR med SybrGreen.....	41
Vedlegg 7 Blandingsforhold reaksjonsmiks for real-time PCR med TaqMan probe .....	42
Vedlegg 8 Bakteriepanel benyttet ved spesifisitetstesting .....	43
Vedlegg 9 Stafylokokk valideringspanel benyttet ved spesifisitetstesting .....	44
Vedlegg 10 Probit analyse, deteksjonsgrense .....	45

## Vedlegg 1 Oppsett på enzymbehandling av stafylokokker før ekstraksjon



Enzymbehandling på eppendorf Thermomixer comfort

Ekstraheres på NucliSens easyMAG

# Vedlegg 2 Informasjonsskriv om TaqMan probe

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH  
 Erenbergstraße 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  
[dmr@tib-molbiol.de](mailto:dmr@tib-molbiol.de)

Consultation  
[design@tib-molbiol.de](mailto:design@tib-molbiol.de)

Troubleshooting  
[service@tib-molbiol.de](mailto:service@tib-molbiol.de)

TIB WILHELM Syntheselabor GmbH · Erenbergstraße 22-23 · D-12103 Berlin

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

**Product Description no. 1931001** **tst-TM**  
 TIB reference no.: 019103482 24 - mer 16.03.2019

**5' - HEX-AggCTgATgCTgCCATCTgTgTTT--BHQ1**

Amount / Concentration for product of 1 ml  
 Synthesis scale and purification: 20,8 nmol / 20,8 µM  
 Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TMA 5.0 OD by  
 5-Modifications: no  
 Number of bases: A: 3 G: 7 C: 5 T: 9 total 24  
 Wobble bases and GC content: Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 50.0 %

Chemical properties and constant factors of the product:  
 Molar extinction coefficient ε 240520 l / mol cm  
 Molecular weight ammonium salt NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 7757,5 g / mol  
 Molecular weight free acid: 7365,8 g / mol  
 Picomoles per OD 4157,7 pmol / OD  
 Micrograms per OD 32,3 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)  
 Amount in optical units OD 5,0 OD  
 Molar amount: 20,8 nmol  
 Amount in µg mass units: 161,3 µg  
Molar concentration when delivered in 1 ml solution:  
 20 µM ( 20 pmol/µl) requires a volume of: 1040 µl  
 50 µM ( 50 pmol/µl) requires a volume of: 416 µl (To prepare stock solutions of  
 100 µM ( 100 pmol/µl) requires a volume of: 208 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization):  
 Concentration, if dissolved in 1 ml: 0,161 µg / µl  
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml: 1 : 323 dilution factor from a 1 ml solution  
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in: 1613 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)  
 63,2 °C  
 Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)  
 59,7 °C  
 Melting point GC/AT rule (ΔT = 2°C, G/C = 4°C)  
 72,0 °C  
 Melting point G/C-content rule  
 59,9 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:  
 ΔG / ΔH / ΔS -175,2 / -739,6 / -1894,2 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions) (IUPAC 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



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. We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsführer (CEO): Offert Landt  
 Bundesregister III/19163 B  
 Registergericht Berlin Charlottenburg  
 VGF-No.: DE 814 018 770 | IS code: 2934 9990 / for kits: 3822 0000  
 BUN no. 312629815 | IEN 426015910007 | EORI No. DE 4896411  
 Günterzbank, Bogenstraße 93, D-10243 Berlin  
 IBAN DE37 1000 0000 0765 0836 01  
 AGIBT-BIC: DBS33333

# Vedlegg 3 Informasjonsskriv om sense/forward primer

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH  
 Eresburgstraße 23-25 · D-12105 Berlin · Germany  
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99  
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



Orders, quotes  
 tusa@tib-molbiol.de

Consultation  
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting  
 service@tib-molbiol.de

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

**Product Description no. 1930997** **tst-S**  
 TIB reference no : 019103482 22 - mer 16.03.2019

**5' - ACTggTATAgTAgtGggTCTgA**

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

120,1 nmol / 120,1 µM

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

no

A : 5 G : 8 C : 2 T : 7 total 22

Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 45.5 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient  $\epsilon$

244980 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

7203,2 g / mol

Molecular weight free add :

6845,5 g / mol

Picomoles per OD<sub>600</sub>

4082,0 pmol / OD

Micrograms per OD<sub>600</sub>

29,4 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD<sub>600</sub>

29,4 OD

Molar amount :

120,1 nmol

Amount in µg mass units :

865,3 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

120,1 µM (pmol / µl)

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

6007 µl

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

2403 µl

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

1201 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

1200

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, if dissolved in 1 ml :

0,865 µg / µl

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

1 : 1731 dilution factor from a 1 ml solution

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

8653 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

49,9 °C

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

46,4 °C

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

64,0 °C

Melting point GC-content rule

55,5 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

ΔG / ΔH / ΔS -133,3 / -622,8 / -1642,5 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 = Inasin a = 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. We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsführer (CEO): Oliver Lant  
 Handelsregister HRB 93163 B  
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 | IB code: 2934 9990 / für kits 3822 0000  
 DUNS no. 312829815 | BLN 426019930007 | EORI No. DE 4905433

Gatterhofbank, Appenzelstrasse 93, D-10713 Berlin  
 BIC: BFSW33HAN | SWIFT: BFSW33HAN  
 SWIFT/BIC: BFSW33HAN

# Vedlegg 4 Informasjonsskriv om antisense/reverse primer

**TIB MOLBIOL** Syntheselabor GmbH  
 Eichenburgstraße 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 · Eichenburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin

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

Orders, quotes  
 info@tib-molbiol.de

Consultation  
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting  
 service@tib-molbiol.de

**Product Description no. 1930998** **tst-R**  
 TIB reference no : 019103482 20-mer 16.03.2019

**5' - gggCTATAATAAggACTCgg**

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

120,9 nmol / 120,9 µM

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

A : 6 G : 7 C : 3 T : 4 total 20  
 Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 50.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient  $\epsilon$  230020 l / mol cm  
 Molecular weight ammonium salt NH<sup>+</sup> 6529,7 g / mol  
 Molecular weight free acid 6206,2 g / mol  
 Picomoles per OD<sub>260</sub> 4347,4 pmol / OD  
 Micrograms per OD<sub>260</sub> 28,4 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD<sub>260</sub> 27,8 OD  
 Molar amount : 120,9 nmol  
 Amount in µg mass units : 789,2 µg  
 Molar concentration when delivered in 1 ml solution : 120,9 µM (pmol / µl)  
 20 µM ( 20 pmol/µl) requires a volume of : 6043 µl  
 50 µM ( 50 pmol/µl) requires a volume of : 2417 µl (To prepare stock solutions of  
 100 µM ( 100 pmol/µl) requires a volume of : 1209 µl different concentration)  
 ↳ 1200

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,789 µg / µl  
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 1578 dilution factor from a 1 ml solution  
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 7892 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 51,8 °C  
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 48,3 °C  
 Melting point GC/C-content rule 60,0 °C  
 Melting point G/C-content rule 54,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

ΔG / ΔH / ΔS -143,0 / -662,2 / -1742,1 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions) (IUB Code)

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

We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsbüro (GEB): Offen Link  
 Handelsregister HRB 93163 B  
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 | BS code: 2054-9990 / for kits 3822 0000  
 DE NS no. 512829815 | BVS 4250159530007 | EORI-No. DE 0806433

Güntherbank, Koppenstraße 95, D-10243 Berlin  
 IBAN DE97 1000 0000 0565 3836 01  
 SWIFT/BIC GDB33333

## Vedlegg 5 Oppsett reaksjonsmiks og instrumentinnstillinger for konvensjonell PCR

### PCR for påvisning Toksisk sjokk toksin

PCR-produkt:

#### Reaksjonsmiks

Reagenser	Pr. prøve	X 25	X 50	X 100
dNTP (1mM)	2,5 µl	62,5 µl	125 µl	250 µl
Primer1 tst 590L20 (100ng/µl)	2 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Primer2 tst 65U19 (100ng/µl)	2 µl	50 µl	100 µl	200 µl
PCR buffer x 10 (m/15mM MgCl)	5 µl	125 µl	250 µl	500 µl
dH <sub>2</sub> O	36 µl	900 µl	1800 µl	3600 µl
totalt	47,5 µl	1187,5 µl	2375 µl	4750 µl

Enzym pr prøve: 0,5 µl AmpliTaq Gold (tilsettes i miksen rett før oppsett)  
(Ved beregning av miks + enzym: antall prøver + 1)

Tilsett enzym til reaksjonsmiks og fordel 48 µl i hvert PCR-rør.

Tilsett 2 µl lysat til 48 µl reaksjonsmiks. Pos.ktr tst+, står i eske med Rx-mix.  
Lysat fra bakt. kultur og pos.ktr. fort 1:10 / ufort. fra prøvemateriale.

Rørene sentrifugeres kort, og settes over i thermocycler og kjøres på programmet toksisk sjokk toksin.

Følgende cykler:

- 94 °C – 15 min.
- 94 °C – 1 min.
- 44 °C – 1,5 min.
- 72 °C – 2 min.
- 39 cykler
- 72 °C – 7 min.

**KOPI**  
Sign.: *ASV* Dato: 1/6-18



## Vedlegg 6 Blandingsforhold reaksjonsmiks for real-time PCR med SybrGreen

### Utregningstabell for Quanta PerfeCTa® SYBR® Green FastMix

Katalog nr: 95072-250 (250 reaksjoner)

Ant. ul pr. prøve

Ant prøver	Quanta perfeCTa® SYBR® Green	Primer sense	Primer antisense	Molecular grade water
1	10	2	2	1
2	20	4	4	2
3	30	6	6	3
4	40	8	8	4
5	50	10	10	5
6	60	12	12	6
7	70	14	14	7
8	80	16	16	8
9	90	18	18	9
10	100	20	20	10
11	110	22	22	11
12	120	24	24	12
13	130	26	26	13
14	140	28	28	14
15	150	30	30	15
16	160	32	32	16
17	170	34	34	17
18	180	36	36	18
19	190	38	38	19
20	200	40	40	20
21	210	42	42	21
22	220	44	44	22
23	230	46	46	23
24	240	48	48	24
25	250	50	50	25
26	260	52	52	26
27	270	54	54	27
28	280	56	56	28
29	290	58	58	29
30	300	60	60	30

BEREGN : ANT. PRØVER + 1 (evt.2 dersom mange prøver)

15ul rx.mix + 5 ul eluat

**KOPI**

Sign: *UM*

Dato: 4/2-16

## Vedlegg 7 Blandingsforhold reaksjonsmiks for real-time PCR med TaqMan probe

### Perfecta-mix 15+5



\*Custom Multiplex PCR SuperMix, UNG (PerfeCta)

Ant. ul pr. prøve

Ant.prøver	Custom Master	MGW	Primer sense	Primer antisense	Probe TaqMan
1	10	3,5	0,5	0,5	0,5
2	20	7	1	1	1
3	30	10,5	1,5	1,5	1,5
4	40	14	2	2	2
5	50	17,5	2,5	2,5	2,5
6	60	21	3	3	3
7	70	24,5	3,5	3,5	3,5
8	80	28	4	4	4
9	90	31,5	4,5	4,5	4,5
10	100	35	5	5	5
11	110	38,5	5,5	5,5	5,5
12	120	42	6	6	6
13	130	45,5	6,5	6,5	6,5
14	140	49	7	7	7
15	150	52,5	7,5	7,5	7,5
16	160	56	8	8	8
17	170	59,5	8,5	8,5	8,5
18	180	63	9	9	9
19	190	66,5	9,5	9,5	9,5
20	200	70	10	10	10
21	210	73,5	10,5	10,5	10,5
22	220	77	11	11	11
23	230	80,5	11,5	11,5	11,5
24	240	84	12	12	12
25	250	87,5	12,5	12,5	12,5
26	260	91	13	13	13
27	270	94,5	13,5	13,5	13,5
28	280	98	14	14	14
29	290	101,5	14,5	14,5	14,5
30	300	105	15	15	15
40	400	140	20	20	20
50	500	175	25	25	25
60	600	210	30	30	30
70	700	245	35	35	35
80	800	280	40	40	40
90	900	315	45	45	45
100	1000	350	50	50	50
150	1500	525	75	75	75
200	2000	700	100	100	100
250	2500	875	125	125	125
300	3000	1050	150	150	150
350	3500	1225	175	175	175
400	4000	1400	200	200	200
450	4500	1575	225	225	225
500	5000	1750	250	250	250
550	5500	1925	275	275	275
600	6000	2100	300	300	300
650	6500	2275	325	325	325
700	7000	2450	350	350	350
750	7500	2625	375	375	375
800	8000	2800	400	400	400
900	9000	3150	450	450	450
1000	10000	3500	500	500	500
2000	20000	7000	1000	1000	1000

KOP  
ASF 25/3-19



## Vedlegg 8 Bakteriepanel benyttet ved spesifisitetstesting

<b>Generelt bakteriepanelArt</b>	<b>Stammenr.</b>
<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>S. pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>E. coli</i>	CCUG 37382
<i>K. pneumoniae</i>	CCUG 56223
<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 23113
<i>N. meningitidis (gr.B)</i>	CCUG 23101
<i>M. tuberculosis</i>	CCUG 25177
<i>L. pneumophila</i>	CCUG 33058
<i>Bacillus cereus</i>	CCUG 36925
<i>Clostridium difficile</i>	CCUG 4938
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CCUG 9994T

## Vedlegg 9 Stafylokokk valideringspanel benyttet ved spesifisitetstesting

<b>Prøvenummer</b>	<b>Stammenr.</b>
3	CCUG 35600
4	Ukjent opprinnelse
6	Ukjent opprinnelse
7	Human prøve
9	Prøve fra dyr
12	Ukjent opprinnelse
16	CCUG 21989
17	CCUG 7323T
18	Human prøve
19	Prøve fra dyr
24	ATCC 700698
25	ATCC BAA-44
28	Ukjent opprinnelse
33	Ukjent opprinnelse
37	Ukjent opprinnelse
39	Ukjent opprinnelse
40	CCUG 7326
41	CCUG 33638
43	Ukjent opprinnelse
44	Ukjent opprinnelse

## Vedlegg 10 Probit analyse, deteksjonsgrense

```
Warning # 849 in column 23. Text: no_NO
The LOCALE subcommand of the SET command has an invalid parameter. It
could
not be mapped to a valid backend locale.
NEW FILE.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
PROBIT AntposPCR OF Antreptest WITH KopierPCR
  /LOG 10
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
  /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

## Probit Analysis

### Notes

Output Created		11-APR-2019 13:10:29
Input	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data	5
	File	
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT AntposPCR OF Antreptest WITH KopierPCR /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00:00:02,17
	Elapsed Time	00:00:01,45

[DataSet1]

**Data Information**

		N of Cases
Valid		5
Rejected	Missing	0
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

**Convergence Information**

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	15	Yes

**Parameter Estimates**

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> Kopier pr PCR	1,755	,401	4,378	,000	,969	
Intercept	-,196	,262	-,748	,455	-,458	

**Parameter Estimates**

Parameter	95% Confidence Interval	
	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> Kopier pr PCR		2,540
Intercept		,066

a. PROBIT model:  $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$  (Covariates X are transformed using the base 10,000 logarithm.)

**Chi-Square Tests**

		Chi-Square	df <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	,365	3	,947 <sup>a</sup>

- a. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.
- b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

**Cell Counts and Residuals**

Number	Kopier pr PCR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
PROBIT 1	2,158	5	5	4,999	,001
2	1,158	25	24	24,172	-,172
3	,857	20	18	18,093	-,093
4	,158	25	14	13,317	,683
5	-,842	5	0	,236	-,236

**Cell Counts and Residuals**

Number	Probability
PROBIT 1	1,000
2	,967
3	,905
4	,533
5	,047

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for Kopier pr PCR			95% Confidence Limits for log(Kopier pr PCR) <sup>a</sup>	
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound
PROBIT ,010	,061	,003	,214	-1,214	-2,594
,020	,087	,005	,276	-1,059	-2,316
,030	,110	,007	,324	-,960	-2,139
,040	,130	,010	,367	-,886	-2,007
,050	,149	,013	,405	-,826	-1,899
,060	,168	,016	,441	-,774	-1,808
,070	,186	,019	,475	-,729	-1,728

,080	,205	,022	,508	-,689	-1,656	
,090	,223	,026	,540	-,652	-1,591	
,100	,241	,029	,572	-,619	-1,531	
,150	,332	,052	,724	-,479	-1,285	
,200	,429	,081	,877	-,368	-1,090	
,250	,534	,119	1,036	-,273	-,924	
,300	,650	,167	1,207	-,187	-,776	
,350	,780	,229	1,395	-,108	-,641	
,400	,927	,306	1,606	-,033	-,514	
,450	1,097	,404	1,850	,040	-,394	
,500	1,293	,528	2,139	,112	-,277	
,550	1,525	,685	2,490	,183	-,164	
,600	1,803	,884	2,936	,256	-,054	
,650	2,144	1,135	3,524	,331	,055	
,700	2,573	1,454	4,344	,411	,162	
,750	3,134	1,859	5,560	,496	,269	
,800	3,902	2,383	7,507	,591	,377	
,850	5,039	3,091	10,970	,702	,490	
,900	6,951	4,147	18,277	,842	,618	
,910	7,512	4,435	20,759	,876	,647	
,920	8,174	4,763	23,872	,912	,678	
,930	8,968	5,144	27,877	,953	,711	
,940	9,948	5,598	33,201	,998	,748	
,950	11,196	6,154	40,594	1,049	,789	
,960	12,864	6,864	51,511	1,109	,837	
,970	15,259	7,831	69,199	1,184	,894	
,980	19,147	9,302	102,778	1,282	,969	
,990	27,382	12,136	192,762	1,437	1,084	

#### Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for log(Kopier pr PCR)	
		Upper Bound	
PROBIT	,010		-,669
	,020		-,559
	,030		-,489
	,040		-,436
	,050		-,393
	,060		-,356

	,070		-,323
	,080		-,294
	,090		-,267
	,100		-,243
	,150		-,140
	,200		-,057
	,250		,015
	,300		,082
	,350		,144
	,400		,206
	,450		,267
	,500		,330
	,550		,396
	,600		,468
	,650		,547
	,700		,638
	,750		,745
	,800		,875
	,850		1,040
	,900		1,262
	,910		1,317
	,920		1,378
	,930		1,445
	,940		1,521
	,950		1,608
	,960		1,712
	,970		1,840
	,980		2,012
	,990		2,285

a. Logarithm base = 10.

