Bacheloroppgave

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Robert Edin Hanssen og Ragnhild Sødal Gjennestad

Etablering av real-time PCR for påvisning av eksfoliativt toksin A og B

Development of a real-time PCR for the detection of the exfoliative toxins A and B

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Mai 2019

NTNU
Kunnskap for ei betre verd

Robert Edin Hanssen og Ragnhild Sødal Gjennestad

Etablering av real-time PCR for påvisning av eksfoliativt toksin A og B

Development of a real-time PCR for the detection of the exfoliative toxins A and B

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gitt av avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital i Trondheim i forbindelse med faget HBIO3001 Bacheloroppgave i bioingeniørfag. Oppgaven er skrevet ved Institutt for Bioingeniørfag ved Fakultet for Naturvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Vi vil gjerne takke vår praksisveileder Janne Fossum Malmring for veiledning på lab og for hjelp med skriving i hele bachelorperioden. Vi vil også takke praksisveileder Kjersti Wik Larssen og veileder Kine H. Kristiansen for hjelp med skrivingen. En stor takk sendes også ut til avdeling for medisinsk mikrobiologi og avdeling for medisinsk genetikk for bruk av reagenser, utstyr og lokaler under perioden og til de ansatte for all hjelp underveis i prosessen.

Undertegnet 19/05/2019, Trondheim:

Robert Edin Hanssen

Ragnhild Sødal Gjennestad

Sammendrag

Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) er en potensielt alvorlig sykdom der påvisning av *Staphylococcus aureus*-toksinene ETA og ETB er en sentral del av diagnostikken. Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital ønsket å erstatte en konvensjonell PCR-metode med en mindre tidkrevende metode, som real-time PCR med TaqMan®-probe for deteksjon av toksingenene. En slik metode vil korte ned svartiden og forenkle arbeidsflyten i laboratoriet. Dette ble testet ved å utføre PCR under forskjellige betingelser. Fast PCR ble prøvd ut som et alternativ til den opprinnelige konvensjonelle metoden. Det ble bestilt nye primere og prober, og de nye primerne ble sammenliknet med de opprinnelige primerne ved bruk av SYBR Green før real-time med probe ble prøvd ut. Real-time PCR med TaqMan®-probe var vellykket og kunne også utføres i multiplex. Spesifisitet og sensitivitet ble beregnet samt analyse av direktemateriale. Deteksjonsgrensen ble testet ved bruk av NaCl-suspensjon av en *S. aureus*-stamme positiv på *eta* og *etb.* Resultatene viste en deteksjonsgrense på 6,564 kopier per PCR for *eta* og 3,219 kopier per PCR for *etb*. Dette tyder på at metoden er meget sensitiv og gir mulighet for påvisning av toksinene også direkte fra klinisk materiale. Den opprinnelige konvensjonelle metoden ble utført på eluat fra bakteriekoloni og behøvde derfor et døgn dyrkning i tillegg til analysetiden. Ved overgang til en real-time multiplexmetode med TaqMan®-probe utført på eluat fra direktemateriale blir analysetiden kortet ned betraktelig i tillegg til at dyrkning ikke er nødvendig. Dette betyr at svartiden til rekvirent, antall analyseoperasjoner og reagensforbruk blir betydelig mindre ved eventuell overgang til en slik metode.

Abstract

Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) is a potentially sevre disease, where detection of the *Staphylococcus aureus* toxins ETA and ETB are essential to the diagnostics. The Department of Medical Microbiology at St. Olavs Hospital in Trondheim desired to replace a time consuming and laborious conventional PCR with a real time PCR with TaqMan®-probe for detection of the *eta* and *etb* genes. This was done by testing PCR under different conditions. Fast PCR was tested as an alternative to the original conventional method. New primers and probes were ordered and the new primers were compared with the original primers using SYBR Green before a real-time with probes was tested. The real-time PCR with TaqMan®-probe was successful and could also be executed in multiplex. Specificity and sensitivity were calculated and also the analysis of patient material (ESwab™) was done. The detection limit was tested with a NaCl-suspension of a *S. aureus* strain positive for *eta* and *etb*. The results showed a detection limit of 6,564 copies per PCR for *eta* and 3,219 copies per PCR for *etb*. This indicates that the method is highly sensitive and opens the possibility of performing the analysis directly on extracted patient material. The original conventional method was executed on extracted colony material and thus needed 24 hours of incubation before extraction in addition to the analysis time. With a transition to a real-time multiplex method with TaqMan®-probe executed on extracted patient material, the analysis time is shortened a significant amount in addition to the lack of incubation time. This means that the doctor gets the results faster and the number of analysing operations and reagents are much less with a transition to this type of method.

Innhold

Forord i
Sammendrag ii
Abstract iii
1 Innledning 1
1.1 *Staphylococcus aureus* 1
1.2 Eksfoliative toksin ETA og ETB og Staphylococcal scalded skin syndrome 1
1.3 Konvensjonell PCR og gelelektroforese 3
1.3.1 Polymerase chain reaction (PCR) 3
1.3.2 Gelelektroforese 4
1.4 Real-time PCR 4
1.5 Problemstilling 7
2 Materiale og metode 8
2.1 Materiale 8
2.1.1 Primere og Prober 8
2.1.2 Prøvemateriale 8
2.2 Metode 10
2.2.1 Opprinnelig konvensjonell PCR 10
2.2.2 Fast PCR 11
2.2.3 Valg av primere og prober 11
2.2.4 Real-time PCR med SYBR Green 11
2.2.5 Real-time PCR med TaqMan™-probe 12
3 Resultater 15
3.1 Opprinnelig konvensjonell PCR 15
3.2 Fast PCR 16
3.3 Real-time PCR med SYBR Green 18
3.4 Real-time PCR med TaqMan™-probe 22
3.4.1 Multiplex 25
3.4.2 Deteksjonsgrense i multiplex 27
4 Diskusjon 29
4.1 Konvensjonell PCR 29
4.2 Sammenlikning av opprinnelige og nye primere med SYBR Green 30
4.3 Real-time med probe 31
4.3.1 Multiplex 32
4.4 Konklusjon og videre arbeid 34

5 Referanser 35
6 Vedlegg 38

1 Innledning

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus er en av de viktigste og mest patogene av stafylokokkartene. Bakterien er en del av normalfloraen i tarm og slimhinner, og er som regel ikke infeksjonsårsak hos personer med intakt immunforsvar. Ved nedsatt immunforsvar eller skade på ytre barrierer vil *S. aureus* kunne forårsake sykdom (1). Den patogene effekten til bakterien skyldes at den unnviker immunforsvaret ved hjelp av ytre cellekomponenter samt produksjon av ulike enzymer og toksiner. Cellekomponenter som kapsel, biofilm og protein A bidrar til å unngå fagocytose og til å kolonisere vev (2). Produksjon av enzymene koagulase, stafylokinase, hemolysiner, nukleaser og lipaser fremmer spredning av bakterien ved dannelse og nedbrytning av koagel og cellekomponenter hos verten. *S. aureus* kan også produsere cytolytiske toksiner, eksfoliative toksiner, enterotoksiner og toksisk sjokk syndrom toksin-1 (TSST-1) som via ulike mekanismer skader verten. Noen av disse toksinene kan fungere som superantigener og fører dermed til langvarig stimulering av T4-cellene som kan resultere i feber og sjokk (3,4).

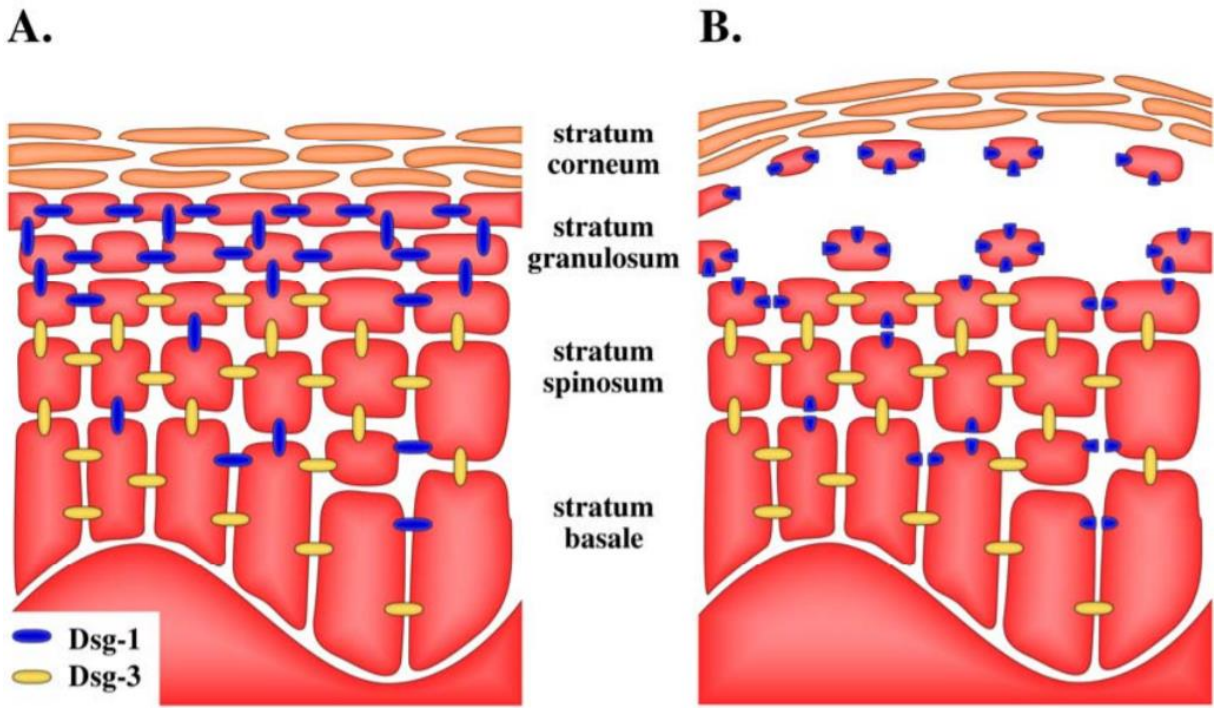
1.2 Eksfoliative toksin ETA og ETB og Staphylococcal scalded skin syndrome

Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) er en sykdom som i hovedsak rammer nyfødte (5), men kan også ramme voksne med nyresvikt og/eller svekket immunforsvar (6). Sykdommen ble først beskrevet av von Rittershain i 1878. Sammenhengen mellom SSSS og et hypotetisk toksin ble teoretisert av Lyell først i 1967. Lyells teori ble i 1972 bekreftet av Melish et al., da det ble påvist at isolert eksfoliativt toksin gav avskalling (eksfoliering) av hud hos nyfødte mus (7).

Sykdommen kjennetegnes med erytematøse utslett og dannelse av væskefylte blemmer. Ved mekanisk påvirkning kan disse blemmene sprekke slik at underliggende lag av epidermis blir eksponert (8). Sykdommen kan starte som bulløs impetigo, hvor infeksjon gir lokal blemmedannelse, og eventuelt utvikler seg til SSSS ved at toksiner fraktes gjennom blodstrømmen og gir mer generalisert blemmedannelse (9). Avskallingen er sjelden et problem i seg selv, ettersom tapet av hudceller er overflatisk. Likevel forekommer komplikasjoner som hypotermi, dehydrering og sekundære infeksjoner ettersom den ytre hudbarrieren er svekket (10). Hos *S. aureus* er det påvist fire eksfoliative toksiner navngitt A, B, C og D (ETA-ETD). Av disse er det kun ETA og ETB som er assosiert med sykdommen

hos mennesker (5,8). Ved utredning av SSSS forsøker man derfor å påvise genene for ETA og ETB (11).

De eksfoliative toksinene er serinproteaser med høy spesifisitet, og er påvist som årsaken til blemmedannelsen ved SSSS (8). Toksinene virker ved å hydrolysere desmoglein-1 (9). Desmogleiner er forankringsmolekyler som hjelper til med å holde strukturen i epidermis. Desmoglein-1 finnes i ytre strata av epidermis, mens desmoglein-3 finnes i indre strata og slimhinner (8). Dette forklarer at avskallingen er begrenset til overflatiske lag av epidermis. Årsaken til at man tror at målet for de eksfoliative toksinene er desmoglein-1 er likheten mellom SSSS og den autoimmune sykdommen pemphigus foliaceus (9). Her danner pasienten antistoff mot desmoglein-1, med påfølgende blemmer og avskalling fra stratum granulosum (12).



Figur 1: Skjematisk fremstilling av desmogleinene 1 og 3 (Dsg-1 og Dsg-3) sin fordeling i de ulike epidermale strata. A viser normal hud, mens B illustrerer histologisk bilde ved SSSS. Fra bildet kan man se at spaltingen av desmoglein-1 vil føre til avskalling fra stratum granulosum, mens nedre strata forholder seg delvis intakte på grunn av desmoglein-3. (8)

Omtrent 5% av alle *S. aureus* produserer eksfoliative toksiner (10). Prevalensen av de ulike eksfoliative toksinene varierer i stor grad etter geografisk område (5). I Europa, USA og Afrika dominerer ETA og er uttrykt hos over 80% av toksinproduserende stammer, mens Japan har høyest prevalens av ETB (8). Ulike bakteriestammer kan produsere enten kun ETA, både ETA og ETB eller kun ETB (5). Dødeligheten er mellom 3,6-11% for barn og mellom 40-63% for voksne. Årsaken til at voksne har høyere dødelighet er trolig underliggende

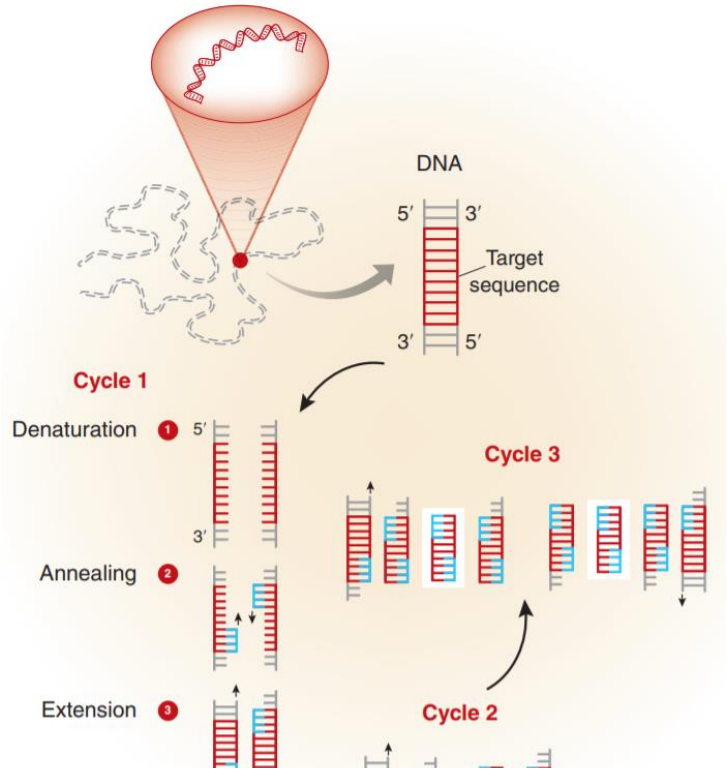
sykdom (6). ETA er et varmestabilt toksin og genet *eta*, som koder for toksinet, er plassert i kromosomet til bakterien. ETB er varmelabilt og genet *etb* er lokalisert i plasmid i cytoplasma (10). *Eta*-genet blir i hovedsak overført til *S. aureus*-stammer ved hjelp av bakteriofager (13). Bakteriofager er virus som injiserer sitt genom inn i bakterien og gir mulighet for integrering av fremmed DNA i bakteriegenomet (14). Plasmider er gensekvenser som overføres mellom bakterier enten ved mitose eller konjugasjon (15).

SSSS kan differensieres fra andre liknende sykdommer vha. PCR for de toksinproduserende genene *eta* og *etb* hos *S. aureus*, eller med biopsi (8). Ved biopsi hos pasient med SSSS kan man i histologiske snitt av huden se avskalling fra stratum granulosum som følge av spaltingen av desmoglein-1, mens f. eks ved toksisk epidermal nekrolyse vil en se subepidermale blemmer og nekrotiske keratinocytter (16). Normalt vil kliniske indikasjoner for SSSS føre til PCR-analyse av *eta*- og *etb*-genene hos *S. aureus* dyrket fra pasientmateriale.

1.3 Konvensjonell PCR og gelelektroforese

1.3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR er en mye brukt metode for oppformering av DNA. Metoden krever dNTP, to primere, Mg^{2+}, enzymet DNA polymerase og templat (DNA) for kopiering. PCR foregår i 3 trinn som repeteres et visst antall sykluser, ofte 25-35 (17,18). Denaturering foregår ved 94-98 °C og bryter hydrogenbindingene mellom dobbelttrådet DNA (dsDNA). Annealing (hybridisering) foregår ved temperatur 40-65 °C der to primere binder seg til DNA. Polymerisering (extension) foregår ved ca. 72 °C der DNA polymerasen bindes til primerne og elongerer disse i 5'-3'-retning. En slik metode utføres av en PCR-termosykler som regulerer temperaturer etter ønskede innstillinger (18). Oppformert DNA (PCR-produkt) kan påvises enten



Figur 2: Illustrasjon av de tre reaksjonstrinnene i en PCR. I trinn 1 denatureres dobbelttrådet DNA, i trinn 2 hybridiseres primere, og i trinn 3 elongeres primerne i 5'-3'-retning. (24)

ved endepunktaanalyse med gelelektroforese (konvensjonell PCR) eller under oppformeringen (Real-time PCR).

Primere er korte sekvenser (oligonukleotider) på normalt mellom 18-24 basepar (bp). Forward primer (sense) og reverse primer (anti-sense) er komplementære til områder i hver av de to trådene i dsDNA. Ved primerdesign er det viktig å benytte godt konserverte områder i genet av interesse (19). Nukleotidene Adenin (A) og Tymin (T) danner færre hydrogenbindinger enn Guanin (G) og Cytosin (C) og vil derfor ha et lavere smeltepunkt (Tm). Det er anbefalt å ha en primer med G/C-innhold på 40-60% (20). Annealingtemperatur på 5-7 °C lavere enn Tm av primerne er anbefalt (21). Lav annealingtemperatur kan føre til uspesifikke bindinger (22). Et eksempel er primerdimerer, som er produkt av uspesifikk hybridisering av primerne til hverandre. Dette gir amplifisering av primersekvensene og kan gi dårligere effektivitet til PCR-metoden. Primerdimerer kan detekteres ved å utføre en smeltepunktsanalyse av PCR-produktene, eller ved å se etter bånd i elektroforese med få basepar (23).

1.3.2 Gelelektroforese

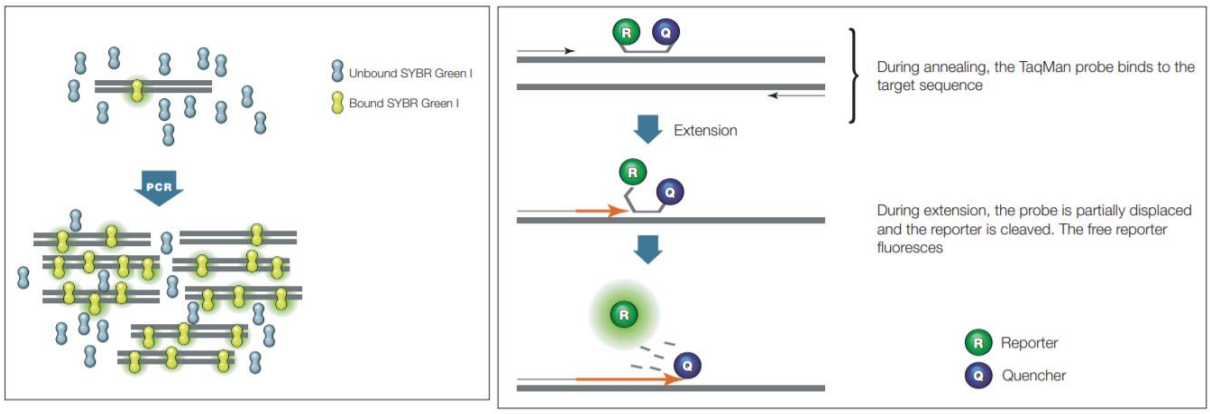
Elektroforese er en separasjonsteknikk som kan skille DNA-fragmenter fra hverandre basert på evnen til å bevege seg gjennom et medium, oftest agarosegel, som respons på elektrisk påvirkning. Negativt ladet DNA vil vandre mot positiv pol. Større DNA-molekyler og høy konsentrasjon av agarose i gelen vil føre til større retensjon i mediet. På denne måten kan man bestemme tilstedeværelse og størrelse på PCR-produktet. Gelelektroforese er en mye brukt teknikk i mikrobiologi på grunn av evnen til å skille DNA-fragmenter. Størrelsen på PCR-produktene bestemmes ved å sammenlikne båndenes retensjon med bånd fra en størrelsesmarkør (ladder) som inneholder flere ulike DNA-fragment med kjente antall basepar. DNA-fragmentene farges med for eksempel etidiumbromid (EtBr) eller annen kjemisk markør som binder dsDNA og avgir fluorescens ved UV-bestråling. (24).

1.4 Real-time PCR

Real-time PCR baserer seg på de samme reaksjonene som konvensjonell PCR gjennom denaturering av dsDNA, hybridisering av primere og polymerisering. Oppformert DNA påvises under PCR-syklusene ved kontinuerlig avlesning og kan benyttes til kvantifisering av PCR-produkt. Avlesning av resultat i real-time PCR skjer når fluorescensen øker over en gitt terskel. Den syklusen i reaksjonen hvor fluorescensen overgår terskelen kalles Ct-verdi (25).

Avlesning av PCR-produktet kan gjøres enten ved hjelp av fluorescerende fargestoff eller prober merket med fluorokromer, og gir en indikasjon på dannelsen av målmolekylet i løsningen. SYBR Green er et eksempel på et fargestoff som binder alt dsDNA, også produkt fra uspesifikke bindinger. Ulike produkter kan skilles fra hverandre med smeltepunktsanalyse hvor temperaturen øker gradvis og signal avleses underveis. Denaturering av produkter skjer ved forskjellige temperaturer avhengig av G/C-innhold og lengde på produkt. Produkter kan også skilles ved hjelp av gelelektroforese.

En annen teknikk er å benytte seg av fluorescerende prober som bindes spesifikt til komplementære nukleinsyresekvenser på DNAet vha. hybridisering. Probene må være komplementære til en godt konservert sekvens mellom forward og reverse primer på PCR-produktet. Prober gir økt spesifisitet ved at signal bare forekommer hvis komplementær sekvens er tilstede i prøven. Multiplex er en metode hvor to PCR-produkt kan detekteres i samme reaksjonsbrønn. Dette kan gjøres ved å designe prober med ulike fluorescerende forbindelser med forskjellige farger. Metoder som påviser ett gen i reaksjonsbrønnen kalles singleplex (26).



Figur 3: Skjematisk fremstilling av deteksjonsprinsipp for SYBR Green (venstre) og TaqMan-probe (høyre). SYBR Green bindes til alt dsDNA, mens TaqMan-probe krever 5´-3´-eksonukleaseaktiviteten til polymerasen for å skape fluorescens (27).

Det finnes flere ulike typer prober. Alle har til felles at de inneholder en fluorescerende reporter og en quencher som slukker signalet. Et eksempel er TaqMan®-probe. Ved polymerisering vil DNA-polymerasen med 5'-3'-eksonukleaseaktivitet bryte opp bindingen mellom probens reporter og quencher, noe som tillater at reporteren kan gi fluorescens. Under utvikling av en ny metode er smeltepunktet for primerne den viktigste faktoren for bestemmelse av annealingtemperatur. Parametere som påvirker smeltepunktet er G/C-innhold, saltkonsentrasjon og primerkonsentrasjon. Det er utarbeidet en rekke ulike formler for teoretisk beregning av smeltepunkt. For design av TaqMan®-prober gjelder mange

av de samme reglene som for design av primere. Generelt sett bør smeltepunktet til probene være 5-10 °C høyere enn primerne for å forsikre seg om at probene allerede er bundet til DNA i det polymerasen begynner replikasjonen (28).

Dersom probene i en real-time PCR har for lav Tm kan en gjøre enkelte modifikasjoner for å øke smeltepunktet. Blant de vanligste modifiseringene er Minor Grove Binders (MGB) og Locked Nucleic Acids (LNA). LNA fungerer ved at man tilfører en metylenbro mellom et oksygenatom og et karbonatom i sukkeret i et nukleotid i proben. Dette forhindrer konformasjonsendringer og fører til økt stabilitet. LNA-monomeren gir på denne måten en mer stabil hybridisering og dermed høyere smeltepunkt. Som følge av LNA-modifikasjoners egenskaper kan en dermed lage metoder som baserer seg på kortere nukleotidsekvenser, samt unngå uspesifikke produkter gjennom å bruke en høyere annealingtemperatur (29).

For å optimalisere en real-time PCR-metode er det flere parametere å ta hensyn til. Blant disse er effektiviteten til amplifikasjonen. Dette gjenspeiler hvor god fordoblingen av PCR-produkt er for hver syklus gjennom PCR-programmet. Effektiviteten gjenspeiles i brattheten på en amplifikasjonskurve, og kan fastslås ved å analysere en fortynningsrekke og lage en standardkurve ut fra denne. Ved perfekt dobling mellom hver syklus vil forskjellen i Ct-verdier følge sammenhengen oppgitt i formel 1, hvor n er antall sykluser mellom hver amplifikasjonskurve. Ved tifolds fortynning skal hver amplifikasjonskurve ha en forskjell i Ct-verdi på 3,32.

$$2^n = fortynningsfaktor \tag{1}$$

Effektiviteten E regnes ut fra formel 2 og avhenger av stigningstallet til standardkurven. Perfekt dobling av PCR-produktet mellom hver syklus vil gi en effektivitet på 2. En velger ofte å benytte seg av % effektivitet med utregning angitt i formel 3. Det er ønskelig å ha en effektivitet mellom 90 og 105%. Lav effektivitet kan skyldes dårlige reaksjonsbetingelser, mens høy effektivitet kan skyldes dannelse av uspesifikke produkter (27). På avdelingen brukes et effektivitetskrav på 90-110%.

$$E = 10^{\frac{-1}{stigningstall}} \tag{2}$$

$$\%Effektivitet = (E - 1) \times 100\% \tag{3}$$

1.5 Problemstilling

Ved avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital blir det brukt en konvensjonell PCR-metode med kapillærelektroforese for å detektere tilstedeværelse av toksingenene *eta* og *etb* fra *S. aureus*. Metoden er tidkrevende i en situasjon hvor rekvirent bør få svar så fort som mulig. Derfor vil det være hensiktsmessig å etablere en raskere metode, som real-time PCR, som erstatning. Hovedfokuset i denne oppgaven bunner derfor i ønsket fra avdelingen om å etablere og teste en real-time PCR ved bruk av TaqMan®-prober for deteksjon av *eta* og *etb*.

2 Materiale og metode

2.1 Materiale

2.1.1 Primere og Prober

Tabell 1: Oversikt over sekvenser på de opprinnelige primerne brukt i konvensjonell PCR i rutinen. Sekvensene er hentet fra artikkel (30). Produksjonsbeskrivelse er angitt i vedlegg 1-2.

Primer	Sekvens	Produktlengde
ETA sense	5´- GCA GGT GTT GAT TTA GCA TT	93 bp
ETA antisense	5´- AGA TGT CCC TAT TTT TGC TG	
ETB sense	5´- ACA AGC AAA AGA ATA CAG CG	226 bp
ETB antisense	5´- GTT TTT GGC TGC TTC TCT TG	

Tabell 2: Oversikt over sekvenser på nye primere og prober. Primerne og probene er beskrevet med bokstaven F (forward primer), R (reverse primer) og P (probe). Sekvensene er hentet fra en artikkel (31). Probenes LNA-modifikasjoner er markert med + tegn. Forkortelsene 6FAM og TEX står for henholdsvis fluorescein amidite og TexasRed. Produksjonsbeskrivelse er anngitt i vedlegg 3-5.

Primer/Probe	Sekvens	Produktlengde
ETA-F1	5´- AGATGGAGACAAACTCGAATTAATAGG	72 bp
ETA-R1	5´- CAATTTCACTTCTGTGCATTTGG	
ETB-F1	5´- CGGACAACATAATCTTCCAATAGGA	89 bp
ETB-R1	5´- TCCCCAAAGTGTCTCCAAAAGTAT	
ETA-P	5´- 6FAM-ATCCATT+C+GAT+CATAAA+GT--BHQ1	-
ETB-P	5´- TEX-TAAGTTCACTCTATTC+GGTTGAT--BHQ2	-

2.1.2 Prøvemateriale

Prøvematerialet brukt i prosjektet har blitt ekstrahert på EasyMAG eller ved hjelp av kokelysering. EasyMAG er et automatisert instrument for nukleinsyreekstraksjon hvor magnetiske silica-kuler brukes for purifisering av nukleinsyrer fra prøvematerialet (32). Forbehandlingen, presisert i Tabell 3, har blitt utført ved hjelp av lysering enzymatisk

(stafylokokker) fra koloni eller direktemateriale eller med egen forbehandling (vevsbiopsi). Enzymatisk forbehandlig av stafylokokker utføres ved at 1 koloni ristes i 170 µL TE buffer (substratlaboratorium, St. Olavs Hospital) som tilsettes 20 µL 20 mg/mL QIAGEN® Proteinase K (Qiagen, Tyskland) og 10 µL 1 mg/mL Lysostaphin L7386-1MG (Sigma-Aldrich, USA), etterfulgt av aktivering av enzymene ved 37 °C i 15 min og 65 °C i 15 min før lysering på EasyMAG.

Kokelysering er en ekstraksjonsmetode hvor cellene i prøven lyseres ved hjelp av varmebehandlig. 2-3 kolonier blandes i 200 µL Molecular Grade Water (MGW) og ristes (300 rpm) i varmeblokk på 95 °C i 15 min, før sentrifugering ved 14 500 rpm i 2 min. 100 µL av supernatanten brukes.

Tabell 3: Oversikt over prøvematerialet brukt under analyse.

Prøve-ID	Kommentar	Forbehandling
Positiv kontroll	Eluat fra stamme SA T17 positiv på *eta* og *etb* beskrevet i artikkel (33).	Enzymlysert fra koloni
Negativ kontroll	MGW	-
Vevsprøve	Prøve negativ på 16S* rDNA PCR fra hjerteklaff	Egen forbehandling vedlegg 6
Humant DNA prøve 1-5	Prøve negativ på 16S rDNA PCR fra kne (prøve 1 og 2), hjerteklaff (prøve 3), hudbiopsi (prøve 4), rygg (prøve 5)	Egen forbehandling vedlegg 6
Bakteriepanel prøve 1-18	Bakteriestammer fra autoriserte produsenter oppgitt i vedlegg 7	Enzymlysert fra koloni
TSST-1 prøve 1-7	Tidligere positive pasientprøve på TSST-1 fra avdelingen mellom 2016 og 2018	Enzymlysert fra koloni
EXFO prøve 1-10	Tidligere positive pasientprøver på eksfoliativt toksin (EXFO) fra avdelingen mellom 2016 og 2018	Enzymlysert fra koloni
Direkteprøver 1-10	ESwab™ fra poliklinisk sårprøve	Enzymlysert fra direktemateriale
MSSA 1-44	Methicillinsensitive *S. aureus* (MSSA) vilkårlig tatt ut fra pasientprøver fra 2019	Enzymlysert fra koloni

MRSA 1-50	Methicillinresistente *S. aureus* (MRSA) vilkårlig tatt ut fra pasientprøver fra 2019	Enzymlysert fra koloni
Stafylokokkpanel prøve 1-20	Oversikt over prøver oppgitt i vedlegg 8	Kokelysert
DSM19048	Stamme av *S. aureus* positiv for *eta* og *etb*	Enzymlysert fra koloni

*16S er et ribosomalt gen som finnes hos prokaryoter og brukes for å skille bakterietyper fra hverandre (34).

2.2 Metode

2.2.1 Opprinnelig konvensjonell PCR

Avdelingens konvensjonelle PCR-metode ble prøvd ut før etableringen av ny metode, inklusive sensitivitets- og spesifisitetstesting. Dette for å ha et sammenlikningsgrunnlag før utprøving og optimalisering av ny metode.

Annealingtemperaturen som tidligere ble benyttet var 44 °C. Det var derfor ønskelig å øke annealingtemperaturen for å forsøke å øke spesifisiteten til metoden. Programmet Oligo versjon 7,57 ble i tillegg brukt til å estimere optimal annealingtemperatur for primerne. Det ble utført PCR ved bruk av Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler i en blanding med 50 µL reaksjonsmix bestående av 2,5 µL 1mM dNTP mix (VWR, USA), 2,0 µL 15 µM av hver primer (TIB MOLBIOL, Tyskland), 5,0 µL 10xPCR-buffer 15 µM $MgCl_2$ (ThermoFisher Scientific, USA), 36,0 µL MGW (G-Biosciences®, USA), 0,5 µL AmpliTaq Gold 1000 units 5U/µL (ThermoFisher Scientific, USA) og 2 µL templat. Termosyklerprofilen bestod av initial denaturering ved 94 °C i 15 min, etterfulgt av 40 sykluser med 1 min på 94 °C (denaturering), 90 sek på 44 °C (annealing, opprinnelig PCR) eller 50 °C (annealing, utprøving) og 2 min 72 °C (polymerisering) etterfulgt av forlenget polymerisering på 72 °C i 7 min og lagring ved 4 °C. PCR-produkt ble analysert i gelelektroforese ved bruk av Invitrogen E-gel 2% Agarose GP (ThermoFisher Scientific, USA), med 1Kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, USA) og Invitrogen E-Gel® PowerBase™ Version 4 med avlesning og avbildning ved bruk av BIO-RAD Gel DOC 2000.

Det ble utført analyse av vevsprøve samt positiv og negativ kontroll presisert i Tabell 3 ved annealingtemperatur på 44 og 50 °C. Sensitivitetsanalyse ble utført med annealingtemperatur på 50 °C med positiv kontroll i tifolds fortynning fra $1:10^2$ til $1:10^6$.

2.2.2 Fast PCR

Fast PCR (hurtig PCR) er et PCR-program på et instrument som har mulighet til å skifte temperaturgradient hurtigere enn den opprinnelige konvensjonelle metoden. Dette forutsetter en polymerase som tåler raskere temperaturforskjell, eksempelvis en AmpliTaq Gold® DNA polymerase. Fast PCR ble prøvd ut som et raskere alternativ.

Det ble utført PCR ved bruk av BIO-RAD C1000 Touch™ Thermal Cycler i en blanding med 20 µL reaksjonsmix bestående av 10,0 µL AmpliTaq Gold Fast PCR MasterMix (ThermoFisher Scientific,USA), 2,0 µL 10 µM av hver primer (TIB MOLBIOL, Tyskland), 4,0 µL MGW (G-Biosciences®, USA) og 5 µL templat. Termosyklerprofilen bestod av initial denaturering ved 95 °C i 10 min, etterfulgt av 35 sykluser med 3 sek på 96 °C (denaturering), 3 sek på 44 °C eller 50 °C (annealing) og 5 sek 68 °C (polymerisering) etterfulgt av forlenget polymerisering på 72 °C i 10 sek og lagring ved 4 °C. Programmet ble valgt ut fra reagensvedlegget til AmpliTaq Gold Fast PCR MasterMix (vedlegg 9). PCR-produkt ble analysert i gelelektroforese ved bruk av Invitrogen E-gel 2% Agarose GP (ThermoFisher Scientific, USA) med 1Kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, USA) og Invitrogen E-Gel® PowerBase™ Version 4 med avlesning og avbildning ved bruk av BIO-RAD Gel DOC 2000.

Spesifisitet ble testet ved å analysere vevsprøve samt positiv og negativ kontroll etter Tabell 3 med annealingtemperatur på 44 og 50 °C. Sensitivitetsanalyse ble utført med annealingtemperatur på 50 °C med positiv kontroll i tifolds fortynning fra $1:10^2$ til $1:10^6$.

2.2.3 Valg av primere og prober

Primere og prober ble valgt basert på artikkel hvor det har blitt etablert real-time PCR for *eta* og *etb* samt andre virulensgener hos *S. aureus* (31). Bioinformatiker på avdelingen gikk gjennom publiserte sekvenserte genomer for *S. aureus* og sjekket match for både opprinnelige og nye primere og prober. De var ok sammenliknet med publiserte sekvenser i nukleotidedatabasen til NCBI (35). Primere og prober for *eta* og *etb* ble bestilt fra TIB MOLBIOL med LNA-modifisering av probene for å øke Tm. Probene ble bestilt med to ulike fluoroforer, *eta* med fluorescein amidite (FAM) og *etb* med TexasRed (TEX).

2.2.4 Real-time PCR med SYBR Green

De opprinnelige og de nye primerne ble utprøvd med real-time PCR med bruk av SYBR Green. Dette for å sammenlikne opprinnelige og nye primere i forhold til spesifisitet og sensitivitet. PCR ble utført ved bruk av BIO-RAD C1000 CFX96™ Real-Time System og

C1000™ Thermal Cycler eller C1000™ Touch Thermal Cycler i en blanding med 20 µL reaksjonsmix bestående av 10,0 µL Perfecta®SYBR®Green SuperMix (Quanta Biosciences™, USA), 2,0 µL 3 µM av hver primer (TIB MOLBIOL, Tyskland), 1,0 µL MGW (G-Biosciences®, USA) og 5 µL templat. Termosyklerprofilen bestod av initial denaturering ved 95 °C i 3 min, etterfulgt av 40 sykluser med 15 sek på 95 °C (denaturering), 45 sek på 50-65 °C (annealing og polymerisering) etterfulgt av lagring ved 4 °C. Programmet som ble gjennomført ble valgt ut fra reagensvedlegget til Perfecta®SYBR®Green SuperMix (vedlegg 10).

Gradientanalyse av positiv kontroll ble utført med annealingtemperatur fra 50 til 65 °C for å finne optimal temperatur. Optimal annealingtemperatur for primerne ble også estimert av programmet Oligo versjon 7,57. Negativ kontroll ble satt opp på 50 °C for de opprinnelige primerne og 55,9 °C for de nye primerne. Positiv kontroll av *etb* for begge primerpar samt negativ kontroll ble analysert i gelelektroforese. Sensitivitetsanalyse ble utført ved analyse av positiv kontroll i tifolds fortynning fra $1:10^2$ til $1:10^6$ med tre paralleller på henholdsvis 55 og 60 °C. I tillegg ble det tatt med negativ kontroll og vevsprøve presisert i Tabell 3.

2.2.5 Real-time PCR med TaqMan™-probe

De nye primerne ble testet med TaqMan™-probe. Det ble estimert smeltepunkt for probene fra produsent. PCR ble utført ved bruk av BIO-RAD C1000 CFX96™ Real-Time System og C1000™ Thermal Cycler eller C1000™ Touch Thermal Cycler i en blanding med 20 µL reaksjonsmix bestående av 10,0 µL Custom Multiplex PCR SuperMix UNG (Quanta Biosciences™, USA), 0,5 µL 12 µM av hver primer (TIB MOLBIOL, Tyskland), 0,5 µL 8 µM probe (TIB MOLBIOL, Tyskland), 3,5 µL MGW (G-Biosciences®, USA) og 5 µL templat. Termosyklerprofilen bestod av UNG enzymaktivering og spalting av DNA ved 45 °C i 5 min etterfulgt av initial denaturering ved 95 °C i 3 min, etterfulgt av 40 sykluser med 5 sek på 95 °C (denaturering) og 30 sek på 50-60 °C (annealing og polymerisering) etterfulgt av lagring på 3 °C. PCR-programmet ble valgt på grunnlag av program som blir brukt i rutinen da dette var ønskelig dersom metoden blir tatt i bruk ved avdelingen.

Gradientanalyse ble utført med annealingtemperatur fra 50 til 60 °C med fortynning $1:10^3$ og $1:10^5$ av positiv kontroll. Negativ kontroll ble satt opp på 50 °C. Spesifisitet ble testet ved analyse av humant DNA prøve 1-5 samt positiv og negativ kontroll på 50 °C og 55 °C. PCR-produktene til fire av prøvene ble analysert i gelelektroforese. Sensitiviteten ble testet med tifolds fortynning fra 1:10 til $1:10^7$ av positiv kontroll i tre paralleller med

annealingtemperatur på 50 og 55 °C i tillegg til negativ kontroll. Annealingtemperaturen for metoden ble valgt til 55 °C.

2.2.5.1 Multiplex

Det ble prøvd ut en multiplex PCR-metode under samme betingelser hvor primere og prober for *eta* og *etb* ble tilsatt samme reaksjonsrør med redusert volum av MGW tilsvarende volum av de ekstra primerne og proben. Sensitiviteten til metoden ble testet gjennom en tifolds fortynningsrekke fra 1:10 til $1:10^7$ av positiv kontroll i tre paralleller samt negativ kontroll med annealingtemperatur på 55 °C.

Spesifisiteten til multiplexmetoden ble testet ut ved å analysere prøver med stafylokokker samt andre bakteriestammer. Prøvene var bakteriepanel prøve 1-18, TSST-1 prøve 1-7, EXFO prøve 1-10, MSSA prøve 1-44, MRSA prøve 1-50 og stafylokokkpanel prøve 1-20 som vist i Tabell 3. MSSA- og MRSA-prøvene ble fortynnet 1:10 før analysering og positive prøver ble analysert i gelelektroforese med positiv og negativ kontroll.

I tillegg ble metoden prøvd ut ved analysering av direkteprøve 1-10. Av de 10 prøvene hadde 8 oppvekst av *S. aureus* og 2 av prøvene hadde ikke det. Prøvene ble forbehandlet ved bruk av 200 µL direktemateriale (ESwab™), 20 µL 20 mg/mL QIAGEN® Proteinase K (Qiagen, Tyskland) og 10 µL 1 mg/mL Lysostaphin L7386-1MG (Sigma-Aldrich, USA). Etterfulgt av aktivering av enzymene ved 37 °C i 15 min og 65 °C i 15 min før lysering og ekstrahering med Nuclisens® EasyMAG®. Direktemateriale ble i tillegg sådd ut på blodagar. Deretter ble eluat fra ekstraheringen analysert i multiplex og PCR-produkt ble analysert i gelelektroforese.

2.2.5.2 Deteksjonsgrense for multiplex

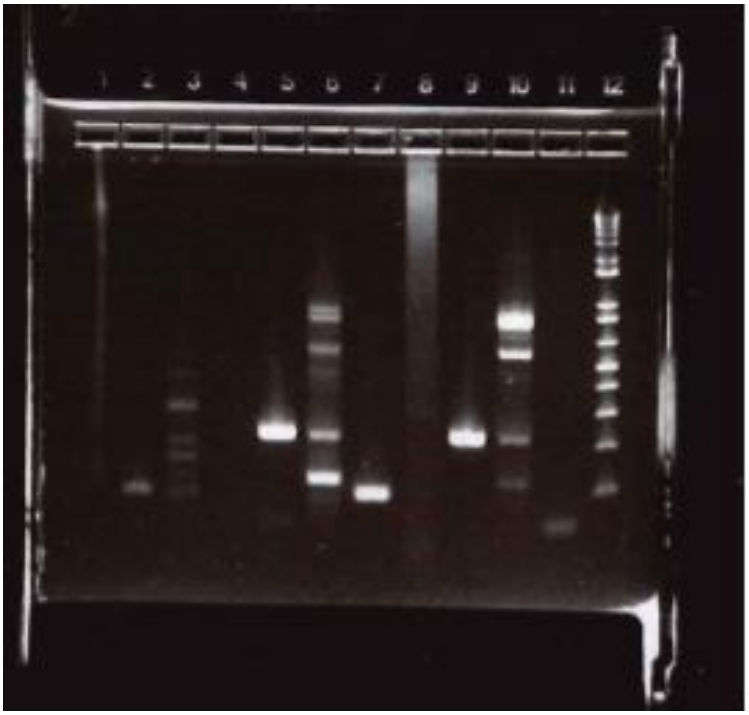
Deteksjonsgrensen for multiplexmetoden ble bestemt ved å analysere eluat fra bakteriesuspensjon av stammen DSM19048. Bakteriesuspensjonen ble laget på 0,5 McFarland i 0,9% NaCl, tilsvarende $1{,}5\times10^8$ CFU/mL (Colony forming units/mL) (36). Bakteriesuspensjonen ble fortynnet i tifold til $1{,}5\times10^1$ CFU/mL. 50 µL av bakteriesuspensjonen med konsentrasjon tilsvarende $1{,}5\times10^3$ CFU/mL ble spredt på blodagar i tre paralleller og antall CFU ble talt etter en dag inkubasjon. 200 µL av suspensjonene med konsentrasjoner tilsvarende mellom $1{,}5\times10^4$ og $1{,}5\times10^1$ CFU/mL ble eluert til 55 µL DNA. Eluatene ble først analysert i tre paralleller for å finne omtrentlig område for deteksjonsgrensen, deretter ble nye fortynninger av eluatet rundt deteksjonsgrensen analysert i totalt 20 paralleller. Ved beregning ble antall CFU på blodagar brukt til å regne ut reell

CFU/mL i hver enkelt fortynning. Utfra dette ble det beregnet antall kopier av genene per PCR. Antall paralleller som viste positivt resultat for de ulike fortynningene ble brukt til å regne ut deteksjonsgrensen ved hjelp av en statistisk probitanalyse med IBM SPSS Statistics versjon 23 med 95% konfidensnivå.

3 Resultater

3.1 Opprinnelig konvensjonell PCR

Den konvensjonelle PCR-metoden brukt i rutinen på avdelingen ble testet ut i forhold til spesifisitet og sensitivitet. Ved bruk av programmet Oligo versjon 7,57 ble optimal annealingtemperatur estimert til 48,3 °C for *eta* og 51,0 °C for *etb* vist i Tabell 4. Metodens spesifisitet ble testet med analyse av vevsprøve på 44 °C, som brukt i rutinen, og 50 °C etter estimert optimal annealingtemperatur. Figur 4 viser sammenlikning av uspesifikke bånd ved annealingtemperaturene 44 og 50 °C. Positiv kontroll viste bånd på litt under 100 bp for *eta* og litt over 200 bp for *etb*. Dette stemmer med lengden på sekvensene bestemt av primerne, hvor PCR-produktene skal være 93 bp for *eta* og 226 bp for *etb*. Resultatet viser ikke veldig tydelig forskjell på de to temperaturene. Det kommer imidlertid frem at humant DNA i form av vevsprøve gir bånd i samme størrelsesområde som positiv kontroll for *etb*, dette båndet er noe svakere ved annealingtemperatur på 50 °C.

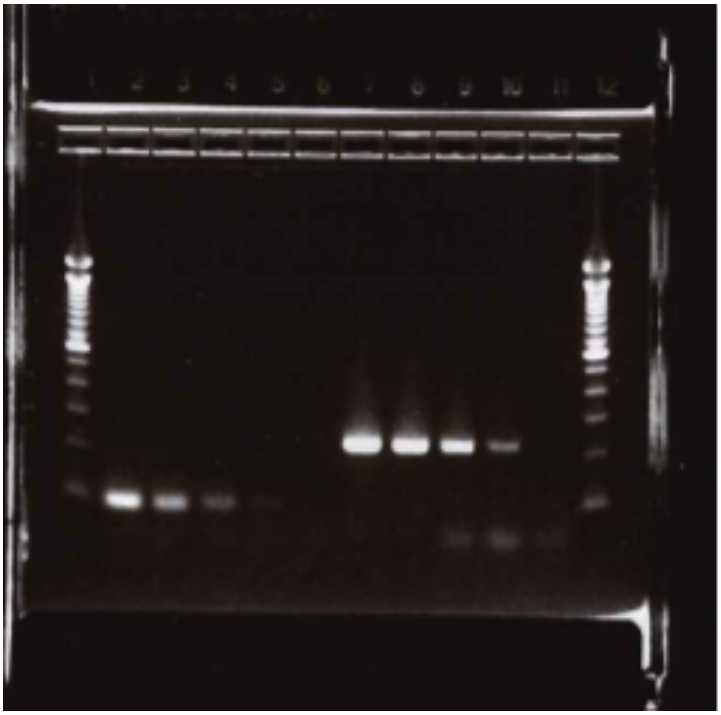


Brønn		Prøve
1	-	Ladder 100 bp
2	44 °C	*eta* pos. ktr.
3		*eta* vevsprøve
4		*eta* neg. ktr.
5		*etb* pos. ktr
6		*etb* vevsprøve
7	50 °C	*eta* pos. ktr.
8		*eta* vevsprøve
9		*etb* pos. ktr.
10		*etb* vevsprøve
11		*etb* neg. ktr.
12	-	Ladder 100 bp

Figur 4: Agarosegel etter analysering av eta og etb med opprinnelig konvensjonell PCR. Test av humant DNA ved ulike temperaturer for å undersøke om økning i annealingtemperatur kan gi økt spesifisitet. Oversikt over innhold i de ulike brønnene og annealingtemperatur er oppgitt i tabellen til høyre. Ladderen i den første brønnen har ikke blitt separert normalt.

Sensitiviteten ble testet ut med fortynning av positiv kontroll vist i Figur 5. Annealingtemperaturen ble satt til 50 °C på grunnlag av tidligere forsøk. Positiv kontroll har

bånd i riktig størrelsesorden for både *eta* og *etb*. Resultatet viser at metoden er sensitiv opp til fortynning 1:10^4 for *eta* og opp til fortynning 1:10^5 for *etb*.

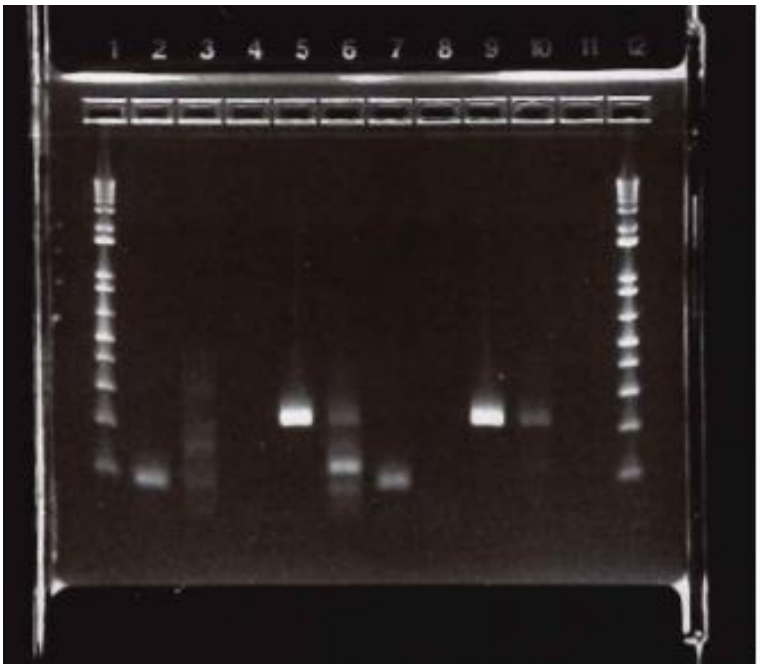


Brønn	Prøve
1	Ladder 100 bp
2	*eta* ktr. 1:10^2
3	*eta* ktr. 1:10^3
4	*eta* ktr. 1:10^4
5	*eta* ktr. 1:10^5
6	*eta* ktr. 1:10^6
7	*etb* ktr. 1:10^2
8	*etb* ktr. 1:10^3
9	*etb* ktr. 1:10^4
10	*etb* ktr. 1:10^5
11	*etb* ktr. 1:10^6
12	Ladder 100 bp

Figur 5:Gelelektroforese etter sensitivitetsanalyse for eta og etb med opprinnelig konvensjonell PCR med annealingtemperatur på 50 °C. Tabellen til høyre viser oversikt over plassering av ulike fortynninger og hvilket gen som ble analysert.

3.2 Fast PCR

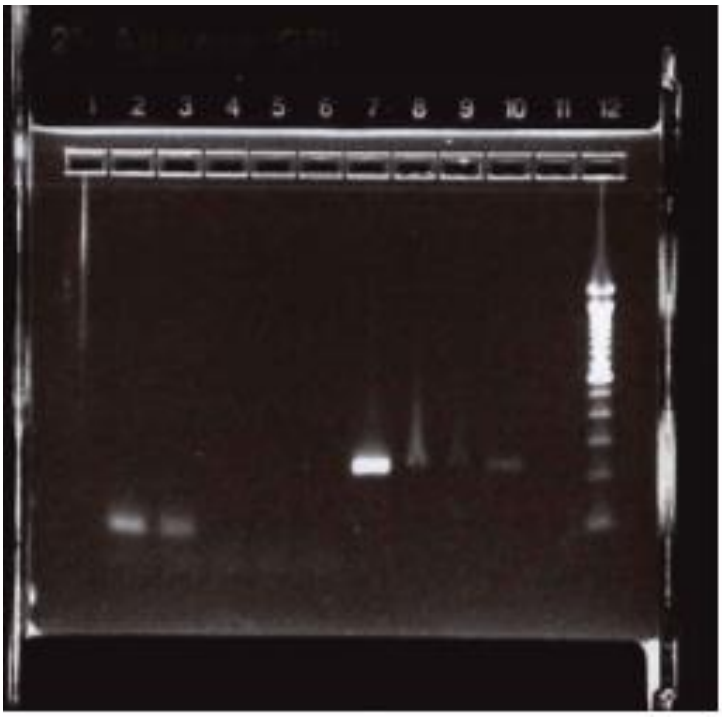
Ved bruk av Fast PCR ble det utført samme spesifisitet- og sensitivitetstesting som for opprinnelig konvensjonell PCR. Resultat fra spesifisitetsforsøket med humant DNA i form av vevsprøve vises i Figur 6. Positiv kontroll har bånd i riktig størrelsesorden. Her vises tydeligere forskjell på dannelse av uspesifikke bånd sammenliknet med opprinnelig konvensjonell metode. Båndene fra vevsprøven blir nesten borte ved 50 °C annealingtemperatur. Ved analyse av vevsprøve fremkommer likevel et uønsket produkt i samme størrelsesorden som ved *etb* positiv kontroll i likhet med den opprinnelige konvensjonelle metoden.



Brønn		Prøve
1	-	Ladder 100 bp
2	44 °C	*eta* pos. ktr.
3		*eta* vevsprøve
4		*eta* neg. ktr.
5		*etb* pos. ktr
6		*etb* vevsprøve
7	50 °C	*eta* pos. ktr.
8		*eta* vevsprøve
9		*etb* pos. ktr.
10		*etb* vevsprøve
11		*etb* neg. ktr.
12	-	Ladder 100 bp

Figur 6: Agarosegel fra spesifisitetsanalyse for fast PCR med humant DNA i form av vevsprøve neagtiv på 16S. Tabell til høyre anngir plassering av PCR-produkt.

Resultat fra sensitivitetsanalysen for Fast PCR er oppgitt i Figur 7. Begge kontrollene har bånd i riktig størrelsesområde. Ved sammenlikning med sensitivitetsanalysene for opprinnelig konvensjonell PCR, som oppgitt i Figur 5, har Fast PCR noe dårligere sensitivitet enn den opprinnelige metoden. Her er *eta* positiv til og med fortynning $1:10^3$, hvor opprinnelig metode gir positivt resultat frem til fortynning på $1:10^4$. *Etb* er positivt til og med fortynning $1:10^5$ med Fast PCR og frem til og med fortynning $1:10^6$ for opprinnelig konvensjonell PCR. Videre optimalisering av denne metoden ble ikke prioritert.



Brønn	Prøve
1	Ladder 100 bp
2	*eta* ktr. $1:10^2$
3	*eta* ktr. $1:10^3$
4	*eta* ktr. $1:10^4$
5	*eta* ktr. $1:10^5$
6	*eta* ktr. $1:10^6$
7	*etb* ktr. $1:10^2$
8	*etb* ktr. $1:10^3$
9	*etb* ktr. $1:10^4$
10	*etb* ktr. $1:10^5$
11	*etb* ktr. $1:10^6$
12	Ladder 100 bp

Figur 7: Agarosegel etter sensitivitetsanalyse for eta og etb med Fast PCR og annealingtemperatur på 50 °C. Tabellen til høyre anngir oversikt over plassering av PCR-produkt med fortynning. Ladderen i den første brønnen og PCR-produktene i brønn 8 og 9 har ikke blitt separert normalt. Resultatene for etb benyttes likevel ettersom brønn 10 fortsatt gir et svakt bånd

3.3 Real-time PCR med SYBR Green

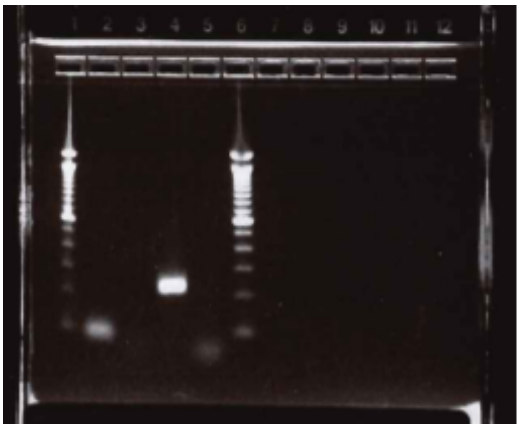
De opprinnelige og de nye primerne ble sammenliknet i forhold til sensitivitet og spesifisitet ved bruk av real-time PCR med SYBR Green som markør. Ved bruk av programmet Oligo versjon 7,57 ble den optimale annealingtemperaturen estimert og resultatet er vist i Tabell 4. Resultatet viser at optimal annealingtemperatur ligger på litt under 50 °C for begge primerpar.

Tabell 4: Resultater fra estimering av optimal annealingtemperatur for opprinnelige og nye primerpar til analyse av eta og etb ved bruk av programmet Oligo versjon 7,57.

Primer	Optimal annealingtemp.	Max annealingtemp.
***Eta* opprinnelig**	48,3 °C	62,4 °C
***Etb* opprinnelig**	51,0 °C	66,4 °C
***Eta* ny**	47,9 °C	66,6 °C
***Etb* ny**	48,2 °C	64,5 °C

For å teste den optimale annealingtemperaturen for opprinnelige og nye primerpar ble det utført en gradientanalyse fra 50 til 65 °C. Den negative kontrollen for *etb* gav utslag på slutten av programmet for både opprinnelige og nye primerpar. Ct-verdien var høyere for de

nye primerne enn de opprinnelige. PCR-produktene fra opprinnelige og nye primerpar for *etb* ble analysert i gelelektroforese vist i Figur 8. For de nye primerne skal positiv kontroll gi et produkt på 89 bp for *etb* som stemmer med resultatet. Den negative kontrollen for *etb* med nye primere ikke har dannet nok produkt til at dette er synlig i gelen, i motsetning til de opprinnelige primerne som viser et bånd på langt under 100 bp. Mindre produkt for nye primere i forhold til de opprinnelige primerne stemmer overens med amplifikasjonskurven.

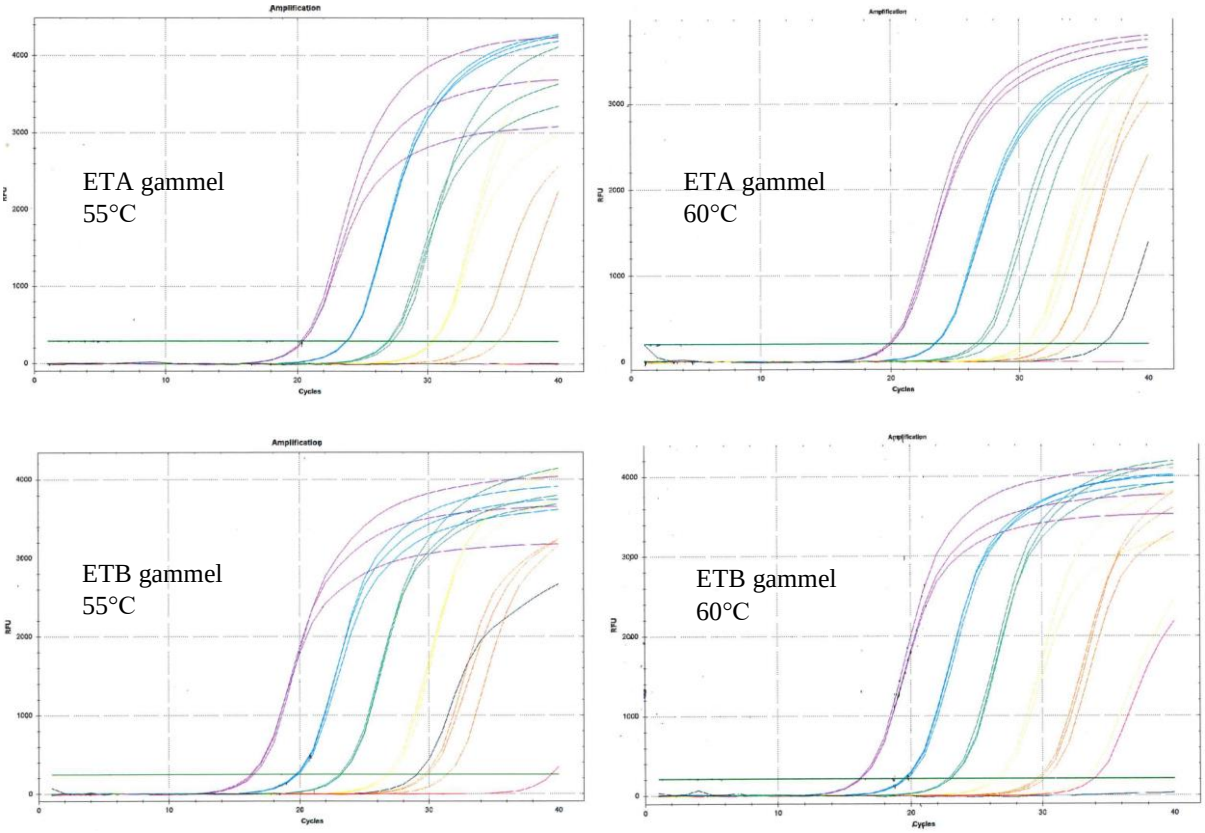


Brønn	Prøve
1	Ladder 100 bp
2	*etb* ny pos. ktr.
3	*etb* ny neg. ktr.
4	*etb* opprinnelig pos. ktr.
5	*etb* opprinnelig neg. ktr.
6	Ladder 100 bp

Figur 8: Resultat fra gelelektroforese fra gradientanalyse av eta og etb real-time med SYBR Green med opprinnelige og nye primerpar. Tabellen til høyre viser oversikt over plassering av produktene i gelen.

Gradientanalysen viste at for begge primerpar ble Ct-verdiene ganske like på alle temperaturene, men brattheten på kurven varierer. Brattere kurve vil si at fordoblingen av PCR-produkt er mer effektiv. Beste effektivitet vises for temperatur 53,0, 55,9 og 59,5 °C for både opprinnelige og nye primerpar. Det ble derfor bestemt å gjennomføre sensitivitetsanalyse på 55 og 60 °C for å se om sensitiviteten på de to temperaturene var forskjellig.

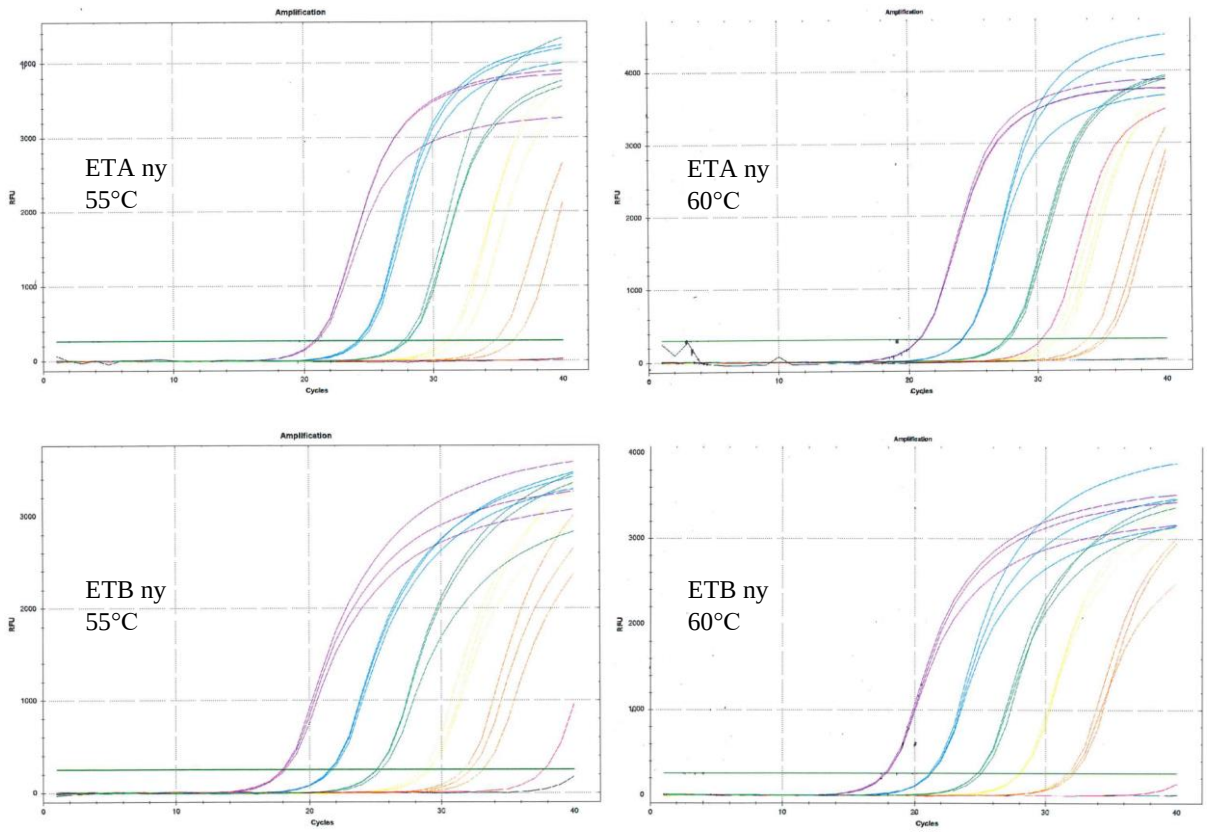
Resultat fra sensitivitetsanalysen for *eta* og *etb* med opprinnelige primerpar med annealingtemperatur på 55 og 60 °C vises i Figur 9. Kurvene for begge temperaturer ser nokså like ut for både *eta* og *etb*. For *eta* er det bare er to av fortynningene på $1:10^6$ som har gitt utslag ved 55 °C, mens alle tre parallellene har gitt utslag ved 60 °C annealingtemperatur. *Etb* viser ikke forskjell i sensitivitet på 55 og 60 °C ettersom alle fortynningene helt opp til $1:10^6$ har gitt utslag for begge temperaturene. Det har blitt dannet produkt i negativ kontroll for *etb* med større utslag på 60 °C enn 55 °C. Spesifisitet ble testet med vesprøve hvor *eta* har gitt utslag ved 60 °C, men ikke ved 55 °C. For *etb* er det motsatt, hvor 55 °C gir utslag for vevsprøve, men ikke 60 °C. Under utførelsen av analysen ble det laget for lite mix og det ble derfor tilsatt mindre mix i brønnene med vevsprøve. Resultatet fra disse kan derfor variere.



Figur 9: Amplifikasjonskurver fra real-time PCR med SYBR Green for analyse av eta og etb med opprinnelige primere ved henholdsvis 55 og 60 °C. Fortynningsrekke av positiv kontroll med fortynning 1:10^2 (lilla), 1:10^3 (blå), 1:10^4 (grønn), 1:10^5 (gul), 1:10^6 (oransje) samt negativ kontroll (rød) og vevsprøve (svart).

Resultat fra sensitivitetsanalysen med nye primerpar med annealingtemperatur på 55 og 60 °C vises i Figur 10. Kurvene for de ulike temperaturene for *eta* og *etb* fremstår ganske like. For *eta* ble en av fortynningene 1:10^6 negativ ved 55 °C, mens alle tre ble positive ved 60 °C i likhet med de opprinnelige primerne. For *etb* er sensitiviteten lik for begge temperaturer da alle fortynningene har gitt utslag. Negativ kontroll for *eta* er ok ved 55 °C, men gir utslag ved 60 °C. Negativ kontroll for *etb* har amplifikasjonsøkning mot slutten på programmet ved 55 °C. Det har ikke blitt noen positive resultat for vevsprøven for noen av de nye primerparene ved verken 55 eller 60 °C. I likhet med de opprinnelige primerparene ble

det ikke tilsatt like mye mix i brønnene med vevsprøve, og resultatene kan derfor være upålitelige.



Figur 10: Amplifikasjonskurve fra real-time PCR med SYBR Green fra analyse av eta og etb med nye primere ved henholdsvis 55 og 60 °C. Fortynningsrekke av positiv kontroll med fortynning 1:10^2 (lilla), 1:10^3 (blå), 1:10^4 (grønn), 1:10^5 (gul), 1:10^6 (oransje) samt negativ kontroll (rød) og vevsprøve (svart).

Tabell 5 viser resultater fra standardkurven som ble laget på grunnlag av amplifikasjonskurvene. På avdelingen vurderes resultatene av effektivitet som godkjent mellom 90-110%. Resultatene viser at for opprinnelige primere for *eta* og nye primere for *eta* og *etb* opprinnelig øker effektiviteten ved å øke temperaturen. For *etb* opprinnelige primere reduseres effektiviteten ved temperaturøkning fra 55 til 60 °C.

Tabell 5: Resultater fra standardkurve ved analyse at eta og etb med opprinnelige og nye primerpar ved bruk av SYBR Green i tifolds fortynning fra 1:10 til 1:10^7 av positiv kontroll på henholdsvis 55 og 60 °C.

Primer	Annealingtemperatur	Effektivitet
***Eta* opprinnelig**	55 °C	95,1%
	60 °C	100,3%
***Etb* opprinnelig**	55 °C	93,3%
	60 °C	87,9%
***Eta* ny**	55 °C	89,2%
	60 °C	92,7%
***Etb* ny**	55 °C	90,2%
	60 °C	92,5%

3.4 Real-time PCR med TaqMan™-probe

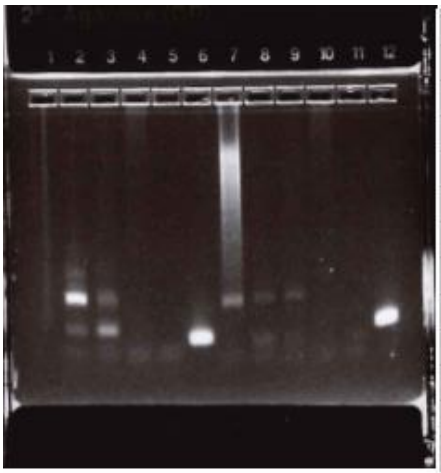
For testing av real-time PCR med TaqMan™-probe ble det utført gradientanalyse for å finne optimal annealingtemperatur, samt spesifisitets- og sensitivitetsanalyser. Smeltepunkt for primere og prober ble beregnet av produsenten som vist i Tabell 6. Som beskrevet i kapittel 2.2.3 ble probene modifisert med LNA, ettersom de hadde veldig lavt smeltepunkt. Probene hadde opprinnelig en smeltepunktstemperatur lavere enn primerne og det ble derfor besluttet å bestille prober med LNA-modifikasjon. Probene med LNA-modifikasjon har 4-5 °C høyere smeltepunkt enn primerne.

Tabell 6: Oversikt over beregnede smeltepunktstemperaturer fra produsent TIB MOLBIOL for de nye primerne og probene for både eta og etb.

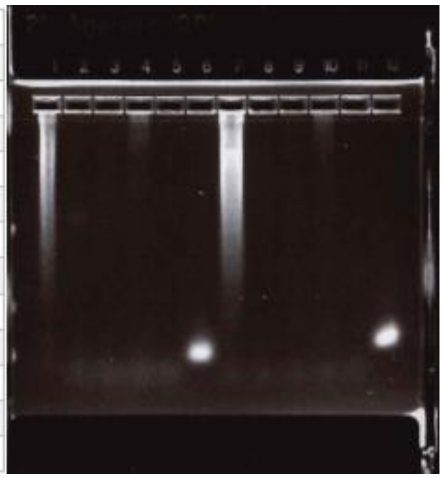
Primer/probe	Smeltepunkt (°C)
ETA-F1	57,2
ETA-R1	57,5
ETA-P	42,9
ETA-P LNA	62
ETB-F1	57,7
ETB-R1	58,6
ETB-P	51,3
ETB-P LNA	62

Resultatene fra gradientanalysen viste at annealingtemperaturer mellom 50,0 og 56,3 °C generelt gir amplifikasjonskurver med bra effektivitet for både *eta* og *etb*. Temperaturer opp mot 60,0 °C viste dårligere effektivitet. Det ble derfor besluttet å teste spesifisitet og sensitivitet ved 50 og 55 °C.

Spesifisitetsanalyse ble utført ved å analysere humant DNA prøve 1-5 ved 50 og 55 °C. Alle prøvene ble negative. PCR-produkt fra humant DNA prøve 2-5 ble analysert i gelelektroforese for å undersøke dannelsen av uspesifikke produkter med ulik annealingtemperatur. Resultatene i Figur 11 viser at annealingtemperatur på 55 °C eliminerer mesteparten av de uspesifikke produktene som vises ved annealingtemperatur på 50 °C.

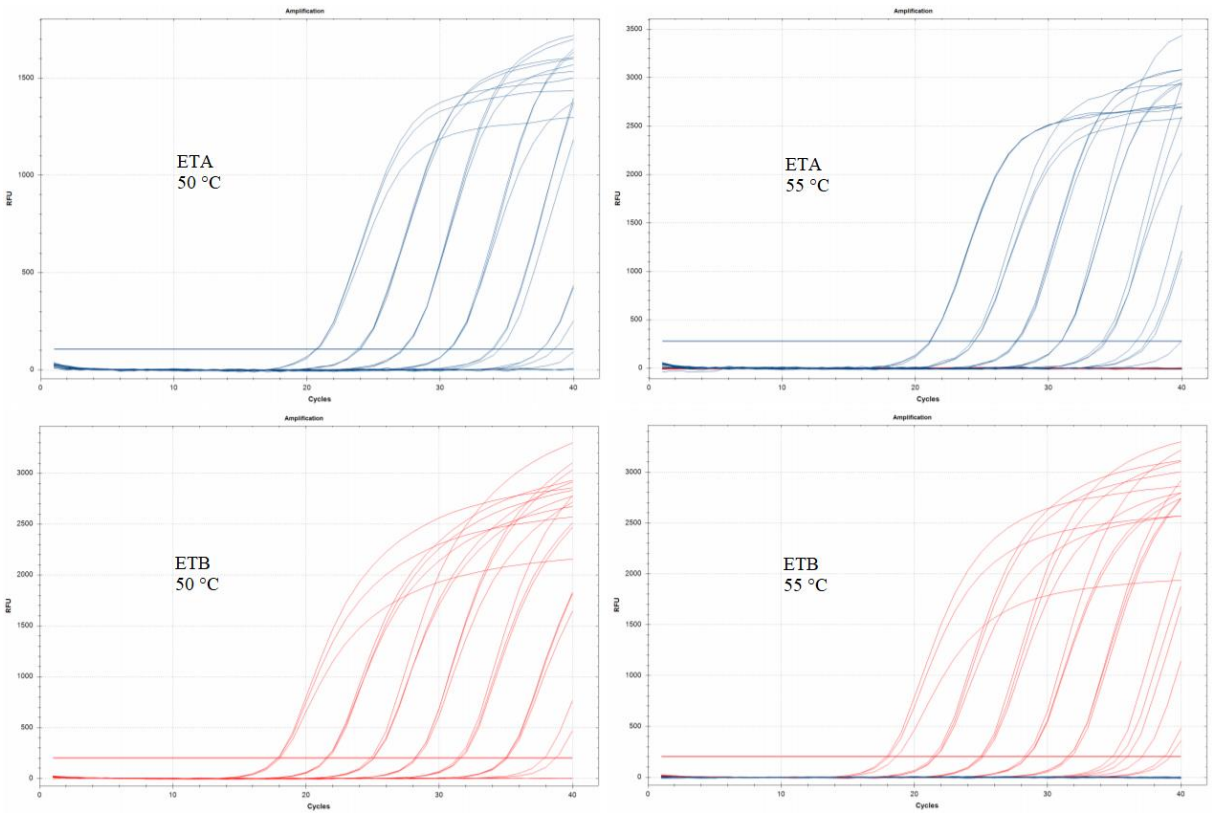


Brønn	Prøve
1	H-DNA prøve 2
2	H-DNA prøve 3
3	H-DNA prøve 4
4	H-DNA prøve 5
5	Negativ kontroll
6	Positiv kontroll
7	H-DNA prøve 2
8	H-DNA prøve 3
9	H-DNA prøve 4
10	H-DNA prøve 5
11	Negativ kontroll
12	Positiv kontroll



Figur 11: Gelelektroforese av PCR-produkt fra real-time PCR med probe. Spesifisitetsanalyse med annealingtemperatur på 50 °C (venstre) og 55 °C (høyre). Plassering til PCR-produkt er fremstilt i tabell der H-DNA står for humant DNA.

Videre ble sensitiviteten til analysen undersøkt gjennom en tifolds fortynning med annealingtemperatur på 50 og 55 °C. Figur 12 viser at annealingtemperatur på 55 °C gir best sensitivitet for både *eta* og *etb*. For *eta* er alle parallellene positive til fortynning $1:10^6$ og $1:10^5$ ved henholdsvis 55 og 50 °C. For *etb* er alle parallellene positive til fortynning $1:10^7$ og $1:10^6$ ved henholdsvis 55 og 50 °C.



Figur 12: Amplifikasjonskurver fra real-time PCR fra sensitivitetsanalyse av eta og etb med nye primere og TaqMan™-probe ved henholdsvis 50 og 55 °C. Fortynningsrekke av positiv kontroll med fortynninger fra 1:10^2 til 1:10^7 samt negativ kontroll.

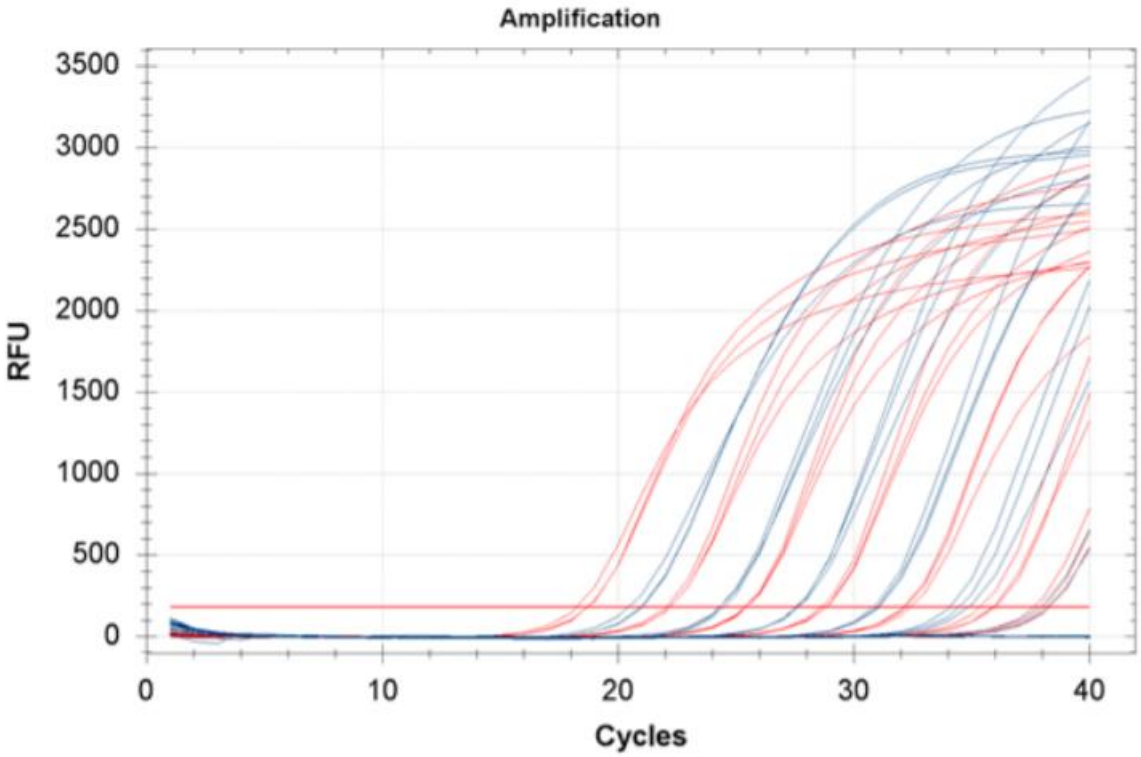
I Tabell 7 vises effektiviteten til standardkurven laget på grunnlag av amplifikasjonskurvene fra fortynningsrekken. Effektiviteten for 50 og 55 °C er nesten den samme. Ettersom det ble færre uspesifikke PCR-produkt for humant DNA ved 55 °C, og økning i temperatur ikke gir dårligere sensitivitet ble annealingtemperaturen for metoden valgt til 55 °C.

Tabell 7: Resultater fra standardkurve ved analyse at eta og etb med probe. Analysert i tifolds fortynning fra 1:10 til 1:10^7 av positiv kontroll på henholdsvis 50 og 55 °C.

Analyse	Annealingtemperatur	Effektivitet
Eta	50 °C	103,5%
	55 °C	105,1%
Etb	50 °C	97,6%
	55 °C	97,5%

3.4.1 Multiplex

Mulitplexanalyse for *eta* og *etb* ble utprøvd for å redusere reagens- og tidsbruk per PCR-oppsett. Sensitivitet ble testet med tifolds fortynningsrekke av positiv kontroll fra 1:10 til $1:10^7$ i tre paralleller vist i Figur 13. *Eta* PCR var positiv på to av tre paralleller ved fortynning $1:10^6$, og ingen utslag ved fortynning $1:10^7$. *Etb* PCR var positiv på alle paralleller i alle fortynningene. Dette betyr at multiplex PCR har lik sensitivitet for *etb* og litt lavere sensitivitet for *eta* sammenliknet med singleplex. Den negative kontrollen gav ikke utslag. På grunn av at sensitiviteten ikke har blitt redusert betraktelig ble det besluttet å benytte multiplex analysemetode ettersom metoden foreløpig blir utført på kultur.



Figur 13: Amplifikasjonskurve fra fortynningsrekke for eta (blå) og etb (rød) analysert i multiplex. Den negative kontrollen har ikke krysset terskellinjen.

Resultatene fra fortynningsrekka ble brukt til å lage en standardkurve i likhet med tidligere forsøk. Tabell 8 viser oversikt over effektiviteten i multiplex sammenliknet med singleplex. Utfra resultatene er det ikke grunnlag for å si at singleplex har bedre effektivitet sammenliknet med multiplex ettersom begge er innenfor kravet.

Tabell 8: Resultater fra standardkurve ved analyse at eta og etb med probe i både singleplex og multiplex. Analysert i tifolds fortynning fra 1:10 til 1:10^7av positiv kontroll på henholdsvis 50 og 55 °C.

Analyse	Annealingtemperatur	Effektivitet
Singleplex *eta*	55 °C	105,1%
Singleplex *etb*	55 °C	97,5%
Multiplex *eta*	55 °C	96,1%
Multiplex *etb*	55 °C	101,0%

Spesifisiteten til metoden ble testet ut ved å analysere prøver med stafylokokker samt andre bakteriestammer som spesifisert i kapittel 2.2.5.1. Ingen av prøvene fra bakteriepanelet eller TSST-1 positive prøver gav utslag for verken *eta* eller *etb*. EXFO prøve 1-10 var tidligere positive pasientprøver for *eta* og/eller *etb* analysert med opprinnelig konvensjonell PCR og resultatene ble sammenliknet med multiplexmetode vist i Tabell 9. Ved analyse av MSSA og MRSA ble *eta* påvist i to prøver for MSSA og en prøve for MRSA. De positive prøvene for MSSA og MRSA ble analysert i gelelektroforese for å bekrefte at størrelsen på PCR-produktene var riktig. PCR-produktene for de *eta* positive MRSA- og MSSA-prøvene viste produkt på litt under 100 bp i samsvar med positiv kontroll. Negativ kontroll viste ingen bånd i området for *eta* eller *etb*. Ingen av prøvene fra stafylokokkpanelet gav utslag på verken *eta* eller *etb*. Det ble også analysert 10 prøver fra direktemateriale. Analyse av direkteprøve 1-10 gav ingen utslag på verken *eta* eller *etb*.

Tabell 9: Resultater på EXFO prøve 1-10 for opprinnelig konvensjonell metode og real-time PCR med probe utført i multiplex.

Prøve	Konvensjonell metode		Real-time PCR (Ct-verdi)	
	eta	*etb*	*eta*	*etb*
EXFO 1	+	-	15,75	-
EXFO 2	+	+	14,62	13,12
EXFO 3	+	-	17,54	-
EXFO 4	+	-	16,61	-
EXFO 5	-	+	-	14,84
EXFO 6	+	+	15,11	13,24
EXFO 7	-	+	-	13,79
EXFO 8	+	-	15,56	-
EXFO 9	+	-	16,18	-
EXFO 10	+	-	17,01	-

3.4.2 Deteksjonsgrense i multiplex

Deteksjonsgrensen for metoden ble funnet ved bruk av probit regresjonsanalyse for resultater fra fortynninger av bakteriesuspensjon av DSM19048. Tabell 10 viser telling av antall kolonier på blodagar for beregning av antall CFU/mL i bakteriesuspensjonen. Analyseresultatene fra fortynningene er presentert i Tabell 11. Både *eta* og *etb* gav positivt resultat for alle paralleller ned til 860 CFU/mL, noe som tilsvarer 16 kopier per PCR. De laveste verdiene som fortsatt gav utslag på PCR var 86 CFU/mL, eller 1,6 kopier per PCR. Regresjonsanalysen resulterte i en deteksjonsgrense på 6,564 kopier per PCR for *eta* og 3,219 kopier per PCR for *etb* med 95% konfidensnivå. Rådata fra probitanalysene er oppgitt i vedlegg 11-12. Dette tilsvarer 361,0 kopier per mL prøvemateriale for *eta* og 177,0 kopier per mL prøvemateriale for *etb*.

Tabell 10: Resultat av CFU på blodagar etter 24 timer inkubasjon.

Estimert CFU/mL	Volum avsatt på skål (µL)	Koloni-telling	Gjennomsnitt kolonitelling	CFU/mL etter telling
$1{,}5\times10^3$	50	88	86	1720
		86		
		84		

Tabell 11: Resultater fra analyse av eluat fra bakteriesuspensjoner. Kopier/mL prøvemateriale er beregnet ut fra CFU på blodagar etter 24 timer inkubasjon fra bakteriesuspensjonen med estimert konsentrasjon $1,5 \times 10^3$ CFU/mL.

Estimert CFU/mL	**Kopier/mL prøvemateriale**	**Kopier per PCR**	**Antall replika testet i PCR**	**Antall positive i PCR**	
				eta	*etb*
15000	17200	313	3	3	3
1500	1720	31	20	20	20
750	860	16	20	20	20
150	172	3,1	20	13	18
75	86	1,6	20	6	15
15	17	0,3	20	0	0

4 Diskusjon

4.1 Konvensjonell PCR

Den opprinnelige konvensjonelle metoden brukt i rutinen hadde en lav annealingtemperatur på 44 °C, og var vesentlig lavere enn estimert optimal annealingtemperatur på litt under 50 °C. Ved å øke annealingtemperaturen fra 44 °C til 50 °C ble det litt færre uspesifikke bånd ved analyse av humant DNA, men det er vanskelig å konkludere ut ifra den ene vevsprøven som ble analysert. Det ble analysert vevsprøve med humant DNA for å se på muligheten for å utføre metoden på direktemateriale. I prøver der humant DNA er tilstede, som ved direktemateriale, er det viktig at metoden ikke gir mye uspesifikke PCR-produkt. Analyse av vevsprøve viste at humant DNA dannet et uspesifikt PCR-produkt med samme størrelse som *etb* positiv kontroll vist i Figur 4. Dette betyr at opprinnelig konvensjonell PCR ikke er egnet for direktemateriale ettersom humant DNA kan gi falskt positivt resultat for *etb*. Båndet på samme størrelse som *etb* positiv kontroll ble litt svakere med annealingtemperatur på 50 °C enn på 44 °C. Det ble besluttet å øke temperaturen under sensitivitetsforsøket for å redusere uspesifikke PCR-produkt. Sensitivitetsanalysen av positiv kontroll viste at metoden var sensitiv for *eta* opptil fortynning $1:10^4$ og *etb* opptil fortynning $1:10^5$. At metoden ikke er like sensitiv for begge genene utgjør ikke et stort problem ettersom metoden utføres på eluat fra koloni der *S. aureus* DNA-konsentrasjonen er høy.

Utprøving av Fast PCR ble utført for å se om det var mulig å redusere analysetiden på den opprinnelige konvensjonelle metoden, som ikke hadde blitt modifisert i takt med nye og bedre PCR-instrumenter og enzymer på avdelingen. Utprøving var vellykket, men viste dårligere sensitivitet enn den opprinnelige konvensjonelle metoden. Ved analyse av vevsprøve ble dannelsen av uspesifikke bånd nesten eliminert ved 50 °C sammenliknet med 44 °C. Det viste fortsatt et produkt i samme størrelsesorden som *etb* positiv kontroll ved analyse av humant DNA. Dette tyder på at metoden ikke er egnet for analyse av direktemateriale, i likhet med den opprinnelige konvensjonelle metoden. En overgang til Fast PCR vil redusere analysetiden betraktelig og kan være et godt alternativ. Den nedsatte sensitiviteten gjør at metoden detekterer små konsentrasjoner dårligere enn den opprinnelige konvensjonelle metoden. Dette er imidlertid uten betydning ettersom metoden ikke er egnet for analyse fra direktemateriale, men kun skal benyttes på eluat fra koloni. Dersom man skulle gått videre med denne metoden anbefales det å forsøke justeringer i PCR-program for ytterligere optimalisering av metoden.

4.2 Sammenlikning av opprinnelige og nye primere med SYBR Green

For å utvikle en real-time PCR-metode ved bruk av TaqMan™-probe ble det tatt utgangspunkt i primere fra en tidligere studie (31). For å kunne sammenlikne primerne til den opprinnelige og den nye metoden ble det utført tester med real-time PCR ved bruk av SYBR Green. Gradientanalysen for begge primerpar resulterte i best annealingtemperatur med høyest effektivitet på 55 og 60 °C, mens estimert optimal temperatur var på litt under 50 °C. Programmet Oligo versjon 7,57 bruker nearest-neighbor (N-N) algoritme til estimering av optimal annealingtemperatur (33). N-N baserer seg på at liknende sekvenser har liknende verdier og sammenlikner sekvenser med hverandre. Algoritmen er designet for å ta høyde for ulike variabler i et PCR-oppsett, men er likevel bare en tilnærming til virkeligheten (28). Dette kan være noe av grunnen til at estimert verdi ikke har blitt den samme som den reelle optimale annealingtemperaturen. Negativ kontroll av *etb* viste utslag i gradientanalysen og ble analysert i gelelektroforese (Figur 8). Det ble ikke utført smeltepunktanalyse av PCR-produkt, men gelelektroforesen tilsier at produktet som har blitt dannet er så lite at primerdimerer er en mulig forklaring.

Ved sensitivitetsanalyse for real-time PCR med SYBR Green med annealingtemperaturene 55 og 60 °C viste resultatene at både de opprinnelige og de nye primerne hadde best sensitivitet med 60 °C. Resultatene viste også at økning av temperaturen til 60 °C øker effektiviteten. Sensitiviteten ble testet opp til fortynning $1:10^6$ og viste positivt resultat på alle parallellene for både *eta* og *etb* ved 60 °C annealingtemperatur. Dette viser at ved bruk av real-time PCR med SYBR Green som markør viser de opprinnelige primerne høyere sensitivitet sammenliknet med opprinnelig konvensjonell metode. Ettersom det ikke ble testet ytterligere fortynninger er det ikke grunnlag for å si at de nye primerne har ulik sensitivitet sammenliknet med de opprinnelige primerne. Ideelt sett burde det gjøres videre fortynninger helt til negativt resultat for å ha grunnlag for å sammenlikne sensitiviteten på de ulike primerparene.

I tillegg til fortynningsrekken ble det også tatt med analyse av vevsprøve for å se på forskjellen i spesifisitet på 55 og 60 °C. Det ble imidlertid ikke laget tilstrekkelig med mastermix og prøvesvarene er derfor ikke pålitelige. Utfra resultater for opprinnelig konvensjonell og Fast PCR metode for de opprinnelige primerne kan det ventes positivt utslag for vevsprøve for *etb*. Med opprinnelige primere for *etb* gir vevsprøven positivt resultat med annealingtemperatur på 55 °C, men ikke noe utslag med annealingtemperatur på 60 °C. Dette kan skyldes at økning i temperaturen hindrer uspesifikk binding av primere, men det kan også

være tilfeldig ettersom volum av reagenser ikke var optimalt. For de nye primerne viste vevsprøve negativt resultat for *eta* og *etb* for begge temperaturer. Dette kan bety at de nye primerne ikke danner uspesifikke PCR-produkter ved analyse av humant DNA, men dette kan også være tilfeldig. Ettersom det bare er testet en vevsprøve med humant DNA og volum av reagenser ikke var optimalt anbefales det videre testing for å si noe om hvorvidt de nye primerne er bedre ved analyse av humant DNA med SYBR Green. Fordi SYBR Green er en markør som detekterer alt dobbelttrådet DNA er metoden derfor mindre spesifikk enn en real-time metode med probe.

4.3 Real-time med probe

Primere og prober ble bestilt og proben ble modifisert med LNA for å øke smeltepunkttemperaturen. LNA-modifisering av proben førte til økning av Tm med omtrent 20 °C for *eta* og 10 °C for *etb*. Dette gjorde at smeltepunkttemperaturen ble 4-5 °C høyere enn smeltepunkttemperaturen til primerne. Utfra teorien bør probens Tm være 5-10 °C høyere enn Tm til primere (28). Dette gjorde det usikkert om proben kom til å fungere optimalt ved etablering av metoden. Utprøving av real-time PCR-metode ved bruk av TaqMan™-prober var vellykket og viste at selv om Tm for probene er litt lav bindes de fortsatt til DNA før polymerisering.

Ved utprøving av annealingtemperatur for de nye primerne i real-time PCR med TaqMan™-probe viste estimering av optimal annealingtemperatur litt under 50 °C, mens utført gradientanalyse viste best resultat mellom 50,0 og 56,3 °C. I likhet med forsøk med SYBR Green kan avviket mellom estimert og reell optimal annealingtemperatur ha en sammenheng med begrensningene til formelen Oligo bruker ved beregning.

På grunnlag av resultatene fra gradientanalysen ble spesifisiteten testet med annealingtemperatur på 50 og 55 °C. I forhold til mulig analysering av direktemateriale var det viktig at metoden ikke gav falskt positivt resultat for humant DNA. Spesifisitetsanalysen ble utført ved å analysere 5 prøver med humant DNA. Resultatene viste ikke noe utslag for humant DNA i real-time PCR, men ved å analysere PCR-produktet i gelelektroforese viste det mange uspesifikke bånd. Her var det betraktelig færre bånd ved bruk av 55 °C (Figur 11). At real-time PCR med probe ikke gir utslag for humant DNA gjør det mulig å analysere direktemateriale dersom metoden er sensitiv nok. Selv om real-time PCR ikke gir utslag fremkommer uspesifikke produkt ved analyse i gelelektroforese. Dette betyr at det brukes unødvendig reagens ved dannelse av uspesifikke PCR-produkt. Det er ønskelig å ha så lite av

dette som mulig slik at det ikke går ut over sensitiviteten hvis det skal utføres analyse på direktemateriale.

Sensitiviteten til analysen ble testet og resulterte i at 55 °C annealingtemperatur gav best resultat. Generelt sett kan økning i annealingtemperatur føre til nedsatt sensitivitet. I dette forsøket sees forskjellene i sensitivitet ved høy fortynningsfaktor og med få paralleller. Dette gjør at forskjellen i sensitivitet kan være tilfeldig. For å fastslå en eventuell forskjell i sensitivitet kan man gjenta forsøket og benytte seg av flere paralleller. *Eta* var positiv på alle paralleller opp til fortynning $1:10^6$ og *etb* opp til fortynning $1:10^7$. Ved analyse av effektiviteten utfra standardkurvene for 50 og 55 °C viste resultatene lite forskjell på 50 og 55 °C. Begge verdiene er godt innenfor kravet på 90-110%.

På grunnlag av resultatene fra analyse av temperaturgradient, spesifisitet og sensitivitet ble annealingtemperaturen for metoden valgt til 55 °C. Dette fordi det ble færre uspesifikke PCR-produkt for humant DNA ved høyere annealingtemperatur og fordi sensitiviteten og effektiviten ikke ble dårligere sammenliknet med 50 °C. Det er også flere analyser på avdelingen som bruker samme program med 55 °C annealing og flere analyser kan derfor bli satt opp samtidig.

4.3.1 Multiplex

Real-time PCR for *eta* og *etb* med TaqMan™-probe ble også prøvd ut i multiplex. Dette er fordelaktig med tanke på besparing av reagens og prøvemateriale samt gir færre analyseoperasjoner. Sensitivitetsanalysen viste at sensitiviteten for *eta* ble litt dårligere ved overgang fra singleplex til multiplex. For *etb* ble det ikke observert noen endring i sensitivitet. Effektiviteten til metoden er innenfor kravet for både single- og multiplex, men det ser ut til at effektiviteten har blitt noe bedre i multiplex. Som forventet har sensitiviteten blitt litt dårligere ved bruk av multiplex, men opprettholder høy sensitivitet sammenliknet med opprinnelig konvensjonell metode. Det ble derfor besluttet å gå over til multiplex ettersom dette er enklere og gir besparing av tid, utstyr og reagens. At sensitiviteten er lavere med multiplex kan utgjøre en forskjell dersom metoden skal benyttes på direktemateriale ettersom det er lavere konsentrasjon av bakterielt DNA i prøven. Dette er imidlertid ikke noe problem ved analyse på DNA ekstrahert fra koloni. Ettersom det bare ble utført analyse av 3 paralleller kan det være ønskelig å repetere sensitivitetsforsøket med flere paralleller for å avklare om forskjellen i sensitivitet er reell.

Spesifisiteten for multiplexmetoden ble testet ved å analysere ulike bakteriearter og stammer av *S. aureus*. Resultatet gav negativt utslag for bakteriepanel, dette antyder at tilstedeværelse av andre bakterier i sårprøven ikke vil gi falskt positivt resultat. Kjente positive pasientprøver på *eta* og/eller *etb* ble analysert og resultatet stemte overens med tidligere resultat fra den konvensjonelle metoden vist i Tabell 9. Det var bare 10 prøver som ble testet ettersom SSSS er en sjelden sykdom og avdelingen får inn få prøver. Det anbefales derfor å teste flere prøver for å kunne konstatere at den opprinnelige konvensjonelle metoden og den nye metoden gir samme resultat. Resultat fra prøvene som har blitt testet med den nye metoden virker likevel lovende.

MSSA- og MRSA-prøver ble testet som en slags negativ kontroll ettersom det er kjent at bare 5% av *S. aureus* produserer eksfoliative toksiner (10). Det er da forventet at bare en liten andel av disse prøvene vil gi positive resultat. Av totalt 94 prøver viste 3 prøver positivt resultat på *eta*. Hvis mange prøver hadde blitt positive for *eta* og/eller *etb* hadde dette vært noe som burde undersøkes nærmere. Siden det var så få prøver som testet positivt og amplifikasjonskurvene var normale virker det sannsynlig at dette er et reelt svar ettersom det stemmer med prevalensen i teorien. Det kan likevel være ønskelig å analysere de samme prøvene med den opprinnelige konvensjonelle metoden for å bekrefte at resultatene er sammenfallende.

Ved analyse av direkteprøve 1-10 viste alle prøvene negativt resultat for *eta* og *etb*. Resultatene ble ikke bekreftet med opprinnelig metode fra koloni på blodagar, og det er derfor ikke grunnlag for å si at resultatene ikke var falske negative. Denne analysen ble i hovedsak utført for å undersøke om det er noe i direkteprøver som kan interferere og gi falskt positivt resultat ved real-time PCR. Analyseresultatene til de 10 prøvene antyder mulighet for å benytte metoden på direktemateriale dersom sensitiviteten er tilstrekkelig god. Det anbefales å analysere flere prøver av direktemateriale for å bekrefte funnene.

For å teste sensitiviteten i direktemateriale ble det laget fortynning av stamme positiv for *eta* og *etb* (DSM19048) i en 0,9% NaCl-løsning. Ideelt sett burde fortynningene blitt utført ved bruk av sårprøve positiv for *eta* og *etb*. Dette var ikke mulig ettersom det ikke var tilgjengelig i prosjektperioden. Alternativt kan tilføring *eta* og *etb* positiv stamme i negativt prøvemateriale (ESwab™) benyttes. NaCl-løsning ble benyttet fordi dette gjorde analysen enklere å utføre. Ettersom det allerede er testet negative direkteprøver kan en anta at de ikke inneholder noe som interfererer med analysen. Regresjonsanalysen resulterte i en deteksjonsgrense på 6,564 kopier per PCR for *eta* og 3,219 kopier per PCR for *etb*, som vist i

vedlegg 11-12. Dette tyder på at analysen er meget sensitiv og at den kan brukes på direktemateriale. For å bekrefte muligheten for å analysere på direktemateriale bør det gjøres videre testing på kliniske prøver.

4.4 Konklusjon og videre arbeid

Den opprinnelige konvensjonelle metoden er veldig tidkrevende og Fast PCR kan gjøre analysetiden litt kortere. Disse metodene kan ikke benyttes på direktemateriale ettersom humant DNA gir falskt positivt resultat for *etb*. Ved hjelp av real-time PCR ved bruk av SYBR Green ble opprinnelige og nye primere sammenliknet og viste liten forskjell i sensitivitet. Real-time PCR med TaqMan-probe gav gode resultater og ingen falske positive resultater for *eta* eller *etb*, hvilket gjorde det mulig å analysere direktemateriale. Metoden ble prøvd ut i multiplex da dette er mye enklere og analysene alltid utføres sammen. Multiplexmetoden viste lav deteksjonsgrense i 0,9% NaCl-løsning og antyder at analyse av direktemateriale kan være mulig. Overgang fra konvensjonell PCR på oppvekstkultur til multiplex real-time med probe på direktemateriale forkorter analysetiden betraktelig. Fordi dyrkningstrinnet utgår, PCR-programmet er kortere og antall PCR-prøver per oppsett halveres vil metoden være tidsbesparende i rutinearbeidet og medfører at rekvirenten får svar raskere. Ved bruk av probe blir spesifisiteten høyere ettersom dannelse av signal ikke bare krever at primeren fester seg, men også at proben finner sin komplementære sekvens i PCR-produktet. Dette gjør at bare en prøve som inneholder et gen med denne sekvensen vil gi signal. Alle undersøkelser utført tyder på at den nye metoden er god nok til å tas i bruk i rutinen på oppvekstkulturer og trolig også på direktemateriale.

Det anbefales imidlertid en ytterligere testing av sensitivitet for multiplexmetode dersom metoden skal utføres på direktemateriale. Dette kan inkludere analyse av deteksjonsgrense i prøvemateriale. Alternativt kan det vurderes å benytte singleplexmetode for å øke sensitiviteten. Det bør også analyseres flere *eta* og/eller *etb* positive prøver. Ettersom analyse av direktemateriale ikke utelukker muligheten for falske negative resultater kan avdelingen ha en overgangsperiode hvor negativt resultat på direktemateriale bekreftes med analyse av koloni fra oppvekstkultur neste dag.

5 Referanser

1. Folkehelseinstituttet. Stafylokokkinfeksjoner (inkl. MRSA-infeksjoner) [Internett]. Folkehelseinstituttet; 2010 [sitert 11. april 2019]. Tilgjengelig på: http://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/stafylokokkinfeksjoner-inkl.-mrsa-i/

2. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host Defense and Pathogenesis in Staphylococcus aureus Infections. Infectious disease clinics of North America; mars 2009

3. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. Current Opinion in Microbiology; februar 2014.

4. Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. Clinical and Experimental Immunology; september 2003.

5. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, Microbial, and Biochemical Aspects of the Exfoliative Toxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. Clinical Microbiology Reviews; 1. april 1999.

6. Handler MZ, Schwartz RA. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology; 2014

7. Melish ME, Glasgow LA, Turner MD. The Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome: Isolation and Partial Characterization of the Exfoliative Toxin. The Journal of Infectious Diseases; 1972.

8. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative Toxins of Staphylococcus aureus. Toxins; mai 2010.

9. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. Nature Medicine; november 2000.

10. Ladhani S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. Clinical Microbiololy and Infection; 1. juni 2001.

11. Oliveira D, Borges A, Simões M. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins; juni 2018.

12. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. The Journal of Clinical Investigation; 15. februar 1999.

13. Botka T, Růžičková V, Konečná H, Pantůček R, Rychlík I, Zdráhal Z, mfl. Complete genome analysis of two new bacteriophages isolated from impetigo strains of Staphylococcus aureus. Virus Genes; august 2015.

14. UiO Institutt for biovitenskap. Bakteriofag [Internett]. UiO; 4. februar 2011 [sitert 10. april 2019]. Tilgjengelig på: https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/b/bakterfa.html

15. UiO Institutt for biovitenskap. Prokaryot [Internett]. UiO; 4. februar 2011 [sitert 8. mai 2019]. Tilgjengelig på: https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/prokaryot.html

16. Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, Bullous Impetigo, and the Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. New England Journal of Medicine. 26. oktober 2006.

17. ThermoFisher Scientific. PCR Cycling Parameters—Six Key Considerations for Success [Internett]. ThermoFisher Scientific; [sitert 18. mai 2019]. Tilgjengelig på: https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html

18. UiO Institutt for biovitenskap. PCR [Internett]. UiO; 4. februar 2011 [sitert 19. mars 2019]. Tilgjengelig på: https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html

19. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. Genome Research; 1. desember 1993.

20. Alfandary R. 4 Tips for an Efficient Primer Design [Internett]. Genome Compiler Corporation; 26. oktober 2015 [sitert 11. april 2019]. Tilgjengelig på: http://www.genomecompiler.com/tips-for-efficient-primer-design/

21. Whitman M. The importance of melting temperature in molecular biology applications [Internett]. Integrated DNA Technologies; 11. april 2012 [sitert 24. mars 2019]. Tilgjengelig på: https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/the-importance-of-tm-in-molecular-biology-applications

22. Integrated DNA Technologies. Calculation of Tm for oligonucleotide duplexes [Internett]. Integrated DNA Technologies; 2011 [sitert 24. mars 2019] Tilgjengelig på: http://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/technical-report/calculating-tm-for-oligo-duplexes.pdf?sfvrsn=46483407_4

23. Roche Molecular Biochemicals. Optimization of Reaction to Reduce Formation of Primer Dimers [Internett]. Roche Molecular Biochemicals; [sitert 1. mai 2019]. Tilgjengelig på: https://www.gene-quantification.de/roche-primer-dimer.pdf

24. Garibyan L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. Journal of Investigative Dermatology; 1. mars 2013.

25. Sjøberg N O. Molekylær genetikk: genteknologi, humant DNA. 5. utg. Høvik: Vett & viten; 2013.

26. Tietz N W, Burtis C A, Ashwood E R, Bruns D E. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008.

27. Bio-Rad. Real-Time PCR Applications Guide [Internett]. Bio-Rad; [sitert 8. mai 2019]. Tilgjengelig på: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf

28. Dorak M T. Real-time PCR. New York: Taylor & Francis; 2006.

29. Sigma Life Science. Primer and Probe Design [Internett]. Sigma Life Science; [sitert 28. mars 2019]. Tilgjengelig på: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_qpcr_techguide03.pdf

30. Sauer P mfl. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. Journal of Medical Microbiology; 1. april 2008.

31. Shi D mfl. Staphylococcal scalded skin syndrome in an extremely low-birth-weight neonate: Molecular characterization and rapid detection by multiplex and real-time PCR of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Pediatrics International; 2011.

32. Nuclisens Easymag. How Can You Improve Your Automated Nucleic Acid Extraction? [Internett]. Biomérieux; 2006 [sitert 10. april 2019]. Tilgjengelig på: https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/nuclisens_easymag_brochure-1.pdf

33. Afset J E, Mæland J A. Susceptibility of Skin and Soft-tissue Isolates of Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes to Topical Antibiotics: Indications of Clonal Spread of Fusidic Acid-resistant Staphylococcus aureus. Scandinavian Journal of Infectious Diseases; februar 2003.

34. Kim M, Chun J. Chapter 4 - 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. I: Goodfellow M, Sutcliffe I, Chun J, red. Methods in Microbiology. Academic Press; 2014. s. 61–74.

35. Agarwala R mfl. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research; 13. november 2017.

36. Dalynn Biologicals. McFarland Standard [Internett]. Dalynn Biologicals; desember 2002 [sitert 14. mai 2019]. Tilgjengelig på: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf

6 Vedlegg

Vedlegg 1 – Reagensvedlegg opprinnelige primere for *eta* 39
Vedlegg 2 – Reagensvedlegg opprinnelige primere for *etb* 40
Vedlegg 3 – Reagensvedlegg nye primere for *eta* 41
Vedlegg 4 – Reagensvedlegg nye primere for *etb* 42
Vedlegg 5 – Reagensvedlegg prober 43
Vedlegg 6 – Forbehandling av biopsi til 16S 44
Vedlegg 7 – Generelt bakteriepanel 45
Vedlegg 8 – Stafylokokkpanel 46
Vedlegg 9 – Reagensvedlegg til AmpliTaq Gold Fast PCR MasterMix 47
Vedlegg 10 – Reagensvedlegg til Perfecta®SYBR®Green SuperMix 48
Vedlegg 11 – Probitanalyse *eta* 49
Vedlegg 12 – Probitanalyse *etb* 52

Vedlegg 1 – Reagensvedlegg opprinnelige primere for *eta*

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

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

MOLBIOL

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

Product Description no. **1929844** **ETA sense** 06.03.2019
TIB reference no : 019103113 20 - mer

5' - gCA ggT gTT gAT TTA gCA TT

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 13.2 nmol / 13.2 µM
Synthesis: 0.02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
5'-Modifications : no
Number of bases : A: 4 G: 6 C: 2 T: 8 total 20
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 40.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	214160	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	6501.7	g / mol
Molecular weight free acid :	6178.1	g / mol
Picomoles per OD 260	4669.4	pmol / OD
Micrograms per OD 260	30.4	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	2.8	OD
Molar amount :	13.2	nmol
Amount in µg mass units :	85.9	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	13.2	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	661	µl (To prepare stock solutions of
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	264	µl different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	132	µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in1 ml :	0.086	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0.5 µg/ml :	1 : 172	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0.1 µg / µl solution dissolve the product in :	859	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL) 51.9 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3.5 °C) 48.4 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 56.0 °C
Melting point G/C-content rule 50.2 °C
Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :
ΔG / ΔH / ΔS -135.9 / -1610.5 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)
S = G/C Y = C/T M = A/C 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 (GD): Gilert Landt
Handelsregister HRB 93163 B
Bankverbindung: Commerzbank, Kaiserstrasse 93, D-10243 Berlin
BIC/SWIFT: DRESDEFF100 · IBAN: DE 87 1008 0000 0565 8830 01
USt-IDNr. DE 814 018 770 · IB code: 2934-9990 / for kds 5822 0000
IBAN no. 41838815 · IDN: 2601933000 · 1 · DUNS no. DE-8836434

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

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

MOLBIOL

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

Product Description no. **1929845** **ETA as** 06.03.2019
TIB reference no : 019103113 20 - mer

5' - AgA TgT CCC TAT TTT TgC Tg

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 12.0 nmol / 12.0 µM
Synthesis: 0.02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
5'-Modifications : no
Number of bases : A: 3 G: 4 C: 4 T: 9 total 20
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 40.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	197440	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	6412.6	g / mol
Molecular weight free acid :	6089.0	g / mol
Picomoles per OD 260	5064.8	pmol / OD
Micrograms per OD 260	32.5	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	2.4	OD
Molar amount :	12.0	nmol
Amount in µg mass units :	77.0	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	12.0	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	600	µl (To prepare stock solutions of
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	240	µl different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	120	µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in1 ml :	0.077	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0.5 µg/ml :	1 : 154	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0.1 µg / µl solution dissolve the product in :	770	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL) 50.8 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3.5 °C) 47.3 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 56.0 °C
Melting point G/C-content rule 50.2 °C
Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :
ΔG / ΔH / ΔS -135.1 / -619.9 / -1626.9 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)
S = G/C Y = C/T M = A/C 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 (GD): Gilert Landt
Handelsregister HRB 93163 B
Bankverbindung: Commerzbank, Kaiserstrasse 93, D-10243 Berlin
BIC/SWIFT: DRESDEFF100 · IBAN: DE 87 1008 0000 0565 8830 01
USt-IDNr. DE 814 018 770 · IB code: 2934-9990 / for kds 5822 0000
IBAN no. 41838815 · IDN: 2601933000 · 1 · DUNS no. DE-8836434

Vedlegg 2 – Reagensvedlegg opprinnelige primere for *etb*

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

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

Product Description no. ***1929846***
TIB reference no : 019103113
ETB sense 20 - mer 06.03.2019

5' - ACA AgC AAA AgA ATA CAg Cg

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 12,3 nmol / 12,3 µM
Synthesis: 0.02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
5'-Modifications : no
Number of bases : A: 11 G: 4 C: 4 T: 1 total 20
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 40.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	251840	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	6484.8	g / mol
Molecular weight free acid :	6161.3	g / mol
Picomoles per OD 260	3970.8	pmol / OD
Micrograms per OD 260	25.7	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	3.1	OD
Molar amount :	12.3	nmol
Amount in µg mass units :	80.0	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	12.3	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	617	µl (To prepare stock solutions of
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	247	µl different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	123	µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,080	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 160	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	800	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	52,9	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	49,4	°C
Melting point G/C-content rule	56,0	°C
Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :	50,2	°C
ΔG / ΔH / ΔS	-138.6 / -629.8	kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)
S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T X = Modif.
W = A/T R = A/G K = 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 (GD): Oliver Lauth
Handelsregister HRB 93163 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 / HS code: 2934 9990 / fax kds. 3822 0000
DUNS no.: 418280815 / IBA: 24601934300/7 / GMBHNo.: 01-4806443

Commerzbank, Kaiserallee 93, D-10245 Berlin
IBAN 100% 1008 0000 0565 3836 01
SWIFT/BIC: DRESDEFF100

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Eresburgstraße 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. ***1929847***
TIB reference no : 019103113
ETB as 20 - mer 06.03.2019

5' - gTT TTT ggC TgC TTC TCT Tg

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 13,2 nmol / 13,2 µM
Synthesis: 0.02 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo
5'-Modifications : no
Number of bases : A: 0 G: 5 C: 4 T: 11 total 20
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 45.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	180650	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	6410.5	g / mol
Molecular weight free acid :	6086.9	g / mol
Picomoles per OD 260	5535.6	pmol / OD
Micrograms per OD 260	35.5	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	2.4	OD
Molar amount :	13.2	nmol
Amount in µg mass units :	84.8	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	13.2	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	662	µl (To prepare stock solutions of
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	265	µl different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	132	µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,085	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 170	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	848	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	54,7	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	51,2	°C
Melting point G/C-content rule	58,0	°C
Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :	52,2	°C
ΔG / ΔH / ΔS	-141.9 / -631.8	kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)
S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T X = Modif.
W = A/T R = A/G K = 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 (GD): Oliver Lauth
Handelsregister HRB 93163 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 / HS code: 2934 9990 / fax kds. 3822 0000
DUNS no.: 418280815 / IBA: 24601934300/7 / GMBHNo.: 01-4806443

Commerzbank, Kaiserallee 93, D-10245 Berlin
IBAN 100% 1008 0000 0565 3836 01
SWIFT/BIC: DRESDEFF100

Vedlegg 3 – Reagensvedlegg nye primere for *eta*

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

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

TIB MOLBIOL

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

Product Description no. **1930993** **ETAR-F1**
TIB reference no : 019103482 27 - mer 16.03.2019

5' - AgATggAgACAAACTCgAATTAATAgg

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 122,6 nmol / 122,6 µM
Synthesis: 0.20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5-Modifications :
Number of bases : A: 12 G: 7 C: 3 T: 5 total 27
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 37.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	329620	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	8832,5	g / mol
Molecular weight free acid :	8389,7	g / mol
Picomoles per OD 260	3033,8	pmol / OD
Micrograms per OD 260	26,8	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	40,4	OD
Molar amount :	122,6	nmol
Amount in µg mass units :	1082,8	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	122,6	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6130	µl (To prepare stock solutions of
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2452	µl different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1226	µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in1 ml :	1,083	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 2166	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	10828	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	57,2	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	53,7	°C
Melting point G/C-content rule	74,0	°C
Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :	57,7	°C
Δ G / Δ H / Δ S	-178,5 / -824,1 / -2166,4	kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)
S = G/C Y = C/T H = A/C D = A/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

Certified Quality System mdc ISO 13485 ISO 9001

Geschäftsführer (CEO): Gilert Laith
Handelsregister HRB 93413 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

USt-IdNr.: DE 814 018 779 | HS code: 2934 9999 / for Kts: 8522 0000
DUNS nr: 312-528-815 | BIA 4260195 0000 7 | EORI-No. DE 496 033

Commerzbank, Kto.-Nr.: 5 000 000 / BLZ 100 400 00 / Swift-Code: COBADEFF
SWIFT/BIC: DEUTDEDB110 / IBAN: DE 43 1004 0000 0500 0000 00

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

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

TIB MOLBIOL

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

Product Description no. **1930994** **ETAR-R1**
TIB reference no : 019103482 23 - mer 16.03.2019

5' - CAATTTCACTTCTgTgCATTTgg

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 128,2 nmol / 128,2 µM
Synthesis: 0.20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5-Modifications :
Number of bases : A: 4 G: 4 C: 5 T: 10 total 23
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 39.1 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	228090	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	7370,3	g / mol
Molecular weight free acid :	6995,6	g / mol
Picomoles per OD 260	4384,2	pmol / OD
Micrograms per OD 260	32,3	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	29,3	OD
Molar amount :	128,2	nmol
Amount in µg mass units :	945,2	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	128,2	µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6412	µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2565	µl (To prepare stock solutions of
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1282	µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in1 ml :	0,945	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1890	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	9452	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	57,5	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	54,0	°C
Melting point G/C-content rule	64,0	°C
Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :	54,2	°C
Δ G / Δ H / Δ S	-157,5 / -690,9 / -1789,7	kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)
S = G/C Y = C/T H = A/C D = A/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

Certified Quality System mdc ISO 13485 ISO 9001

Geschäftsführer (CEO): Gilert Laith
Handelsregister HRB 93413 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

USt-IdNr.: DE 814 018 779 | HS code: 2934 9999 / for Kts: 8522 0000
DUNS nr: 312-528-815 | BIA 4260195 0000 7 | EORI-No. DE 496 033

Commerzbank, Kto.-Nr.: 5 000 000 / BLZ 100 400 00 / Swift-Code: COBADEFF
SWIFT/BIC: DEUTDEDB110 / IBAN: DE 43 1004 0000 0500 0000 00

Vedlegg 4 – Reagensvedlegg nye primere for *etb*

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

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

TIB MOLBIOL

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

Product Description no. **1930995** **ETBR-F1**
TIB reference no : 019103482 25 - mer 16.03.2019

5' - CggACAACATAATCTTCCAATAggA

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 121,5 nmol / 121,5 µM
Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5'-Modifications :
Number of bases : A: 10 G: 4 C: 6 T: 5 total 25
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 40,0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	284340	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	8051,9	g / mol
Molecular weight free acid :	7643,2	g / mol
Picomoles per OD 260	3516,9	pmol / OD
Micrograms per OD 260	28,3	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	34,6	OD
Molar amount :	121,5	nmol
Amount in µg mass units :	978,7	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	121,5 µM	(pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6077 µl	
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2431 µl	(To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1215 µl	

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in1 ml :	0,979	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1957	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	9787	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	57,7	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	54,2	°C
Melting point GC-content rule	70,0	°C
	56,9	°C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :
ΔG / ΔH / ΔS -171,5 / -768,8 / -2004,1 kJ / mol

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

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

We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsführer (CEO): Oliver Laub
Handelsregister HRB 91163 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT-No: DE 814138770 / HS-code: 2934 9990 / for kits: 3822 9000
BANK-No: 31828815 / IBAN 26015535007 / BIC-No. DE 48861435

Commerzbank, kontonummer: 93.B104.58.00
BANK-No: 1008 0000 / IBAN: DE 48861435
SWIFT-BIC: DRESDEFF100

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

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

TIB MOLBIOL

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

Product Description no. **1930996** **ETBR-R1**
TIB reference no : 019103482 24 - mer 16.03.2019

5' - TCCCCAAAgTgTCTCCAAAAgTAT

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 126,6 nmol / 126,6 µM
Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo no
5'-Modifications :
Number of bases : A: 8 G: 3 C: 7 T: 6 total 24
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 41,7 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε	257380	l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4	7672,6	g / mol
Molecular weight free acid :	7280,9	g / mol
Picomoles per OD 260	3885,3	pmol / OD
Micrograms per OD 260	29,8	µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD 260	32,6	OD
Molar amount :	126,6	nmol
Amount in µg mass units :	971,2	µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :	126,6 µM	(pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6329 µl	
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2532 µl	(To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1266 µl	

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in1 ml :	0,971	µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1942	dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	9712	µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	58,6	°C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	55,1	°C
Melting point GC-content rule	68,0	°C
	56,5	°C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :
ΔG / ΔH / ΔS -166,8 / -742,9 / -1933,2 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.

We accept VISA, Eurocard, Mastercard

Geschäftsführer (CEO): Oliver Laub
Handelsregister HRB 91163 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT-No: DE 814138770 / HS-code: 2934 9990 / for kits: 3822 9000
BANK-No: 31828815 / IBAN 26015535007 / BIC-No. DE 48861435

Commerzbank, kontonummer: 93.B104.58.00
BANK-No: 1008 0000 / IBAN: DE 48861435
SWIFT-BIC: DRESDEFF100

Vedlegg 5 – Reagensvedlegg prober

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

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

TIB MOLBIOL

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

Product Description no. ***1930999*** **ETA-P**
TIB reference no : 01910348 2 19 - mer 16.03.2019

5' - 6FAM-ATCCATT+C+gAT+CATAAA+gT--BHQ1

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 23,9 nmol / 23,9 µM Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TMA 5.0 OD ly
5'-Modifications : no
Number of bases : A: 7 G: 2 C: 4 T: 6 total 19
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 31.6 %

Chemical properties and constant factors of the product :
Molar extinction coefficient ε 209020 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4 6077,4 g / mol
Molecular weight free acid : 5770,9 g / mol
Picomoles per OD 260 4784,2 pmol / OD
Micrograms per OD 260 29,1 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)
Amount in optical units OD 260 5,0 OD
Molar amount : 23,9 nmol
Amount in µg mass units : 145,4 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution : 23,9 µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 1196 µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 478 µl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 239 µl

Mass concentration (for hybridization) :
Concentration, if dissolved in1 ml : 0,145 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 291 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 1454 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 42,2 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 38,7 °C
Melting point GC-content rule 50,0 °C
44,9 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :
ΔG / ΔH / ΔS -118.2 / -569.5 / -1514.5 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 = 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): Oliver Landt
Handelsregister HRB 93163 B
Registergericht Berlin-Charlottenburg
USt-IdNr. 31282815 · FIX-426015938001 · EORI No. DE 4806133
Commerzbank, Kurfürstenstr. 33, D-10623 Berlin
IBAN DE97 1004 0000 0565 8830 01
SWIFT/BIC: DRESDEFF100

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

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

TIB MOLBIOL

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

Product Description no. ***1931000*** **ETB-P**
TIB reference no : 01910348 2 23 - mer 16.03.2019

5' - TEX-TAAgTTCACTCTATTC+ggTTgAT--BHQ2

Amount / Concentration for product of 1 ml
Synthesis scale and purification : 21,2 nmol / 21,2 µM Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TME 5.0 OD ly
5'-Modifications : no
Number of bases : A: 5 G: 4 C: 4 T: 10 total 23
Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 34.8 %

Chemical properties and constant factors of the product :
Molar extinction coefficient ε 236240 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH 4 7394,3 g / mol
Molecular weight free acid : 7019,6 g / mol
Picomoles per OD 260 4233,0 pmol / OD
Micrograms per OD 260 31,3 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)
Amount in optical units OD 260 5,0 OD
Molar amount : 21,2 nmol
Amount in µg mass units : 156,5 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution : 21,2 µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 1058 µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 423 µl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 212 µl

Mass concentration (for hybridization) :
Concentration, if dissolved in1 ml : 0,157 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 313 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 1565 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 49,4 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 45,9 °C
Melting point GC-content rule 62,0 °C
52,4 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :
ΔG / ΔH / ΔS -140.3 / -669.1 / -1774.5 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 = 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): Oliver Landt
Handelsregister HRB 93163 B
Registergericht Berlin-Charlottenburg
USt-IdNr. 31282815 · FIX-426015938001 · EORI No. DE 4806133
Commerzbank, Kurfürstenstr. 33, D-10623 Berlin
IBAN DE97 1004 0000 0565 8830 01
SWIFT/BIC: DRESDEFF100

Vurdering av prøvematerialet

Rekvisisjonen legges i kassett merket «Vurdering av lege – HASTER» med mindre den allerede er sett på av lege. Behov for 16S PCR må vurderes i lys av hvilke andre analyser som er bestilt, og hva som eventuelt er gjort av dyrkningsforsøk og PCR tidligere, samt eventuell pågående antibiotikabehandling.
Hjerteklaffer kan automatisk gå til 16S PCR uten at det diskuteres med lege i forkant, men rekvisisjon må legges i kassett merket «Vurdering av lege – HASTER» etter forbehandlingen.

Dersom det er biopsi, så vurderes den makroskopisk før forbehandlingen starter. Når vi får tilsendt hjerteklaffer/aortaklaffer ses ofte vegetasjoner på overflaten av biopsien. Ved skjæring av biopsi, må man sørge for at man får med vegetasjonen(e). De er bakteriekolonier som ligger på overflaten av biopsien. Kontakt erfaren bioingeniør/lege før man begynner med forbehandlingen.

Se vedlegg under relatert i EQS prosedyre Enzymbehandling av klinisk prøvemateriale og bakteriekultur før PCR for enzymbehandling av bakteriekultur som skal til SEKV. Det er ikke nødvendig med enzymkontroll på bakteriekulturer.

Forbehandling av prøvematerialet

Lag enzymmixene i eppendorfrør ferdig før biopsien skjæres i. Biopsi skjæres i mindre biter med steril skalpell i petriskål (ca. 25 mg mengde biopsi), og overføres til eppendorfrøret. Biopsien mortres ikke pga. kontaminasjonsfare.
Enzymkontroll behandles likt som prøvematerialet. Det vil si at enzymkontrollen skal inneholde de samme reagensene som blir brukt på prøvematerialet og skal inkuberes samtidig på samme temperaturer.

Væsker (blodkulturer, spinal-, ascites- og ledd-) pipetteres rett fra originalrøret, og over til et eppendorfrør, hvor enzymene tilsettes etterpå. Dersom man har større volum av spinalvæsker/ascitesvæsker m.m. kan man med fordel sentrifugere materialet ved 3000 g i 30 min. Pipetter da 180 µl av bunnfallet til ekstraksjon.

Dersom det er ønskelig å benytte en større mengde biopsi/ større volum blod/spinalvæske/leddvæske/ascites til isolering, kan man øke enzymmengdene og lysismengden proporsjonalt.

Prøve (væsker)	Prøve (biopsi)	Enzymkontroll
180 µl prøvematr.	180 µl ATL-lysisbuffer	180 µl ATL-lysisbuffer
20 µl Proteinase K	20 µl Proteinase K	20 µl proteinase K
15 µl lysozyme	15 µl lysozyme	15 µl lysozyme
6 µl lysostaphin	6 µl lysostaphin	6 µl lysostaphin
	Biopsi (ca 25 mg)	

- **Væsker** settes på risting i 15 min ved 37 °C og 65 °C i 15 min, deretter vortex og spin ned. Svært viskøse væsker eller væsker med klumper i kan man vurdere å forbehandle på samme måte som biopsier.
- **Biopsier** settes på risting i 15 min. ved 37 °C og ved 55 °C på risting over natt. Neste dag vortexes blandingen og spinnes ned.

Hvilken forbehandling prøven har fått, noteres på rekvisisjon, signeres og dateres.

Ekstraksjon av prøvematerialet

Følg videre prosedyre for ekstraktor EZ1 Advanced XL, Bruk og vedlikehold . Prøvevolum 200 µl og elueringsvolum 60 µl. Enzymkontroll settes på samtidig med prøven på EZ1.
Enzymkontrollen skal ha sort topp. Skriv pr.nr + Enz.ktr. på røret.

Etter ekstraksjon legges rekvisisjonen i kassett merket «16SP/SEKV». Rekvisisjonen skal hentes av bioingeniør som har ansvaret for å utføre analysen. Hvis en rekvisisjon blir liggende må det etterspørres om analysen er satt i gang.

Eluatet settes i kjøleskap (03-012-21) på PCR-setup rom (232.03.012).

Innledning

16S rDNA-PCR er aktuelt å utføre ved mistanke om bakteriell infeksjon i normalt sterile områder i kroppen (f.eks. hjerteklaffer, hjernebiopsier, spinalvæsker m.m). Dette er spesielt aktuelt i tilfeller hvor pasienten har fått antibiotika-behandling, og det forventes dårlig eller ingen vekst i prøven ved konvensjonell dyrkning. Andre tilfeller er ved bakterier som er ekstremt kresne og vokser dårlig, evt ikke er dyrkbare. Gram negative og gram positive bakterier har ulik oppbygning av celleveggen. Da det letes etter ukjent bakterie, må det benyttes enzymer som potensielt kan destruere bakterieveggen til alle bakterier, og dermed frigjøre bakterielt DNA slik at 16S rDNA-PCR kan bli utført.
Bakteriell kontaminasjon av reagenser og utstyr er kjent. For 16S rDNA PCR representerer enzymene til celleveggslysering den største kontaminasjonskilden. For å kunne anslå mengde bakterielt DNA som ikke kommer fra pasientprøven, benyttes en enzymkontroll. Enzymkontrollen inneholder samme mengde enzymer og lysisbuffer som prøven, og behandles identisk og parallelt med pasientprøven gjennom hele isoleringsprosessen.

Arbeidslistekode: 16SP / SEKV
Undersøkelseskode: 16SP / SEKV

Relaterte dokumenter

- Enzymbehandling av klinisk prøvemateriale og bakteriekultur før PCR.
- Enzymbehandling av klinisk prøvemateriale og bakteriekultur før PCR. (*Under utforming*)
- Enzymer, preparering og oppbevaring.
- EZ1 Advanced XL, Bruk og vedlikehold

Relaterte lenker

- Artikkel 16S rDNA
- Lysostaphin
- Lysozyme

Vedlegg 7 – Generelt bakteriepanel

Art	Stammenummer
S. aureus	CCUG 15915
S. pyogenes	CCUG 33061
S. agalactica	CCUG 4208
H. influenzae	CCUG 33775
S. pneumoniae	CCUG 33638
E. coli	CCUG 37382
K. pneumoniae	CCUG 56233
E. cloacae	CCUG 6323T
P. aeruginosa	CCUG 17619
E. faecalis	CCUG 9997
S. anginosus	CCUG 223
S. epidermidis	CCUG 23113
N. meningitidis (gr. B)	CCUG 23101
M. tuberculosis	CCUG 25177
L. pneumophila	CCUG 33058
Bacillus cereus	CCUG 36925
Clostridium perfringens	CCUG 1795T
Fusobacterium necrophorum	CCUG 9994T

Vedlegg 8 – Stafylokokkpanel

Prøve	Stamme	Bakterie
1	CCUG 35600	*S. aureus* (MRSA)
2	Pasientprøve	*S. epidermis*
3	Pasientprøve	mecC pos
4	Pasientprøve	*S. aureus* (MSSA)
5	KS462	*S. epidermis*
6	CCUG 21989	*S. epidermis*
7	CCUG 7323T	*S. haemolyticus*
8	Pasientprøve	mecC pos
9	ATCC 700698	*S. aureus* (MU3)
10	ATCC BAA-44	*S. aureus* (MRSA)
11	Pasientprøve	*S. aureus* (MSSA)
12	Pasientprøve	*S. epidermis*
13	A5-22	*S. epidermis*
14	I-1478	*S. epidermis*
15	CCUG 7326	*S. capitis*
16	CCUG 33638	*S. pneumoniae*
17	Pasientprøve	*S. aureus* (MSSA)
18	Pasientprøve	*S. epidermis*
19	Pasientprøve	*S. lugdunesis* (mecA-pos)
20	Pasientprøve	*S. lugdunensis* (mecA-pos)

Vedlegg 9 – Reagensvedlegg til AmpliTaq Gold Fast PCR MasterMix

AmpliTaq Gold® Fast PCR Master Mix

Package Contents

Catalog Number	Size
4390937	25 rxns
4390939	250 rxns
4390941	2,500 rxns

Kit Contents

Storage Conditions
- Store all contents at 4°C.

Required Materials
- Template: gDNA, cDNA
- Forward and reverse gene-specific primers
- MicroAmp® Adhesive Seal Applicator (Cat. no. 4333183)
- MicroAmp® Clear Adhesive Film (Cat. no. 4306311)
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Cat. no. 4306737)
- ProFlex™ 96-well PCR System (Cat. no. 4484075)
- Centrifuge with plate holders
- Autoclaved, distilled water

Timing
Varies depending on amplicon length

Selection Guide
PCR Enzymes and Master Mixes
Go online to view related products.

Product Description
- The AmpliTaq Gold® Fast PCR Master Mix contains a hot-start polymerase chain reaction, optimized to increase the overall PCR amplification speed.
- Each 2X Master Mix contains AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP; PCR Buffer; dNTP; $MgCl_2$; and stabilizers.
- Optimized for use in sequencing applications, this kit provides specific, high-yield, and high-quality amplicons that can be easily and robustly sequenced.
- The mix can be used to amplify either complementary DNA (cDNA) or genomic DNA (gDNA) samples.
- Assembled reactions are stable up to 18 hours at room temperature.

Important Guidelines
- Select the correct polymerase, PCR instrument, and cycling conditions for your application.
- Take precautions to avoid cross-contamination by using aerosol-resistant barrier tips and analyzing PCR products in an area separate from PCR assembly.

Online Resources
Visit our product page for additional information and protocols. For support, visit www.lifetechnologies.com/support.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Enzyme Characteristics

Hot-start:	Chemical
Length:	Up to 1.5 kb
Fidelity vs. *Taq*:	1X
Format:	Master mix

CLOSE

Print Options

Print Protocol

Print Pop-Ups

PCR Reaction Setup

Use the measurements below to prepare your PCR experiment. The recommended reaction volume is 20 µL for the MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate with Barcode, when using the ProFlex™ 96-well PCR System.

Component	20-µL rxn	Final Conc.
Autoclaved, distilled water	to 20 µL	–
AmpliTaq Gold® Fast Master Mix	10 µL	1X
10 µM forward primer	0.4–1.0 µL	0.2–0.5 µM
10 µM reverse primer	0.4–1.0 µL	0.2–0.5 µM
Template DNA	varies*	< 200 ng/20-µL rxn*

* > 100 copies of template but < 0.2 µg gDNA per reaction. Adjust reaction volumes for your experimental design, keeping the concentrations constant.

PCR Protocol

See page 2 to view a procedure for preparing and running your PCR experiment.

Optimization Strategies

Refer to the pop-up for guidelines to optimize your PCR reactions.

Limited Warranty, Disclaimer, and Licensing Information

life technologies™

CLOSE >>

Optimization Strategies

Primer Design

- Design 18- to 30-mers with a similar primer melting temperature (T_m) (55–65°C).
- Avoid internal secondary structures.
- Avoid self-complementary primers and pairs complementary at 3' ends.
- Ensure a balanced distribution of AT and GC-rich domains.
- Design the primer with a 3' GC clamp.
- Primers for GC-rich content templates should have a similar GC content to that of the target sequence and a T_m of at least 70°C, as calculated using the nearest neighbor algorithms.
- Primer design programs are available online.
- Optimal final primer concentrations range from 0.1–0.5 µM each. Start with 0.2 µM.

Template Source

cDNA: Use 2 µL of the first-strand reaction for PCR. Increasing the amount of first-strand reaction up to 10 µL in PCR may result in increased product yield for some targets.

Genomic DNA: High quality, purified template is required. Use 1 ng to 1 µg in PCR.

λ or viral DNA: High quality, purified template is required. Use 1 pg to 1 ng of template in PCR. Use higher DNA concentrations when fewer cycles are required.

Optimization for Higher PCR Product Yields and Specificity

[Mg]: Allows polymerase to function.
Vary final concentration from 1.0–4.0 mM.

Annealing temperature: Affects product yield and specificity.
- Start with an annealing temperature that is 5°C lower than your primer T_m.
- Estimate the correct annealing temperature using a T_m calculator.
- Use a gradient thermal cycler, such as the ProFlex™ PCR System or Veriti® Thermal Cycler, to determine the optimal annealing temperature for your amplicon.

Cycling parameters: Affects product yield and specificity.
- Vary total PCR cycles from 20–40; 35 cycles is typical.
- Lengthen extension times from 1 min/kb to 1.5 min/kb for difficult templates.
- If desired, use touchdown PCR to increase specificity, starting with an annealing temperature higher than the primer T_m in early cycles, which then decreases 1°C every cycle until the desired temperature is reached.

GC-rich or problematic targets: PCR optimization can include adjusting the incubation times and temperature, magnesium, primers, dNTP, *Taq* DNA polymerase, and/or DNA template, and potentially, altering the design of multiple primer sets.
- GC-rich or problematic targets work better with $MgSO_4$ instead of $MgCl_2$.
- Consider using Platinum® *Taq* PCR DNA Polymerase.
- Test your target by varying the enhancer solution from 0.5–4X. The co-solvent and amplification buffer offer higher primer specificity, broader [Mg] and annealing temperature optima, as well as improved *Taq* thermostabilization.
- Use 2.5 U of Platinum® *Taq* for each 50-µL reaction.
- Denature at 95°C for 45 seconds.

Quanta
BIOSCIENCES™

PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix

Cat. No. 95054-100 Size: 100 x 50-µL reactions (2 x 1.25 mL) **Store at -20°C protected from light**
95054-500 500 x 50-µL reactions (10 x 1.25 mL)
95054-02K 2000 x 50-µL reactions (1 x 50 mL)

Description

PerfeCTa SYBR Green SuperMix is a 2X concentrated, ready-to-use reaction cocktail that contains all components, except primers and template for real-time quantitative PCR systems that do not require an internal reference dye. The proprietary buffer and stabilizers have been optimized exclusively for SYBR Green I qPCR to deliver maximum PCR efficiency, sensitivity, and robust fluorescent signal. This supermix provides the highest level of specificity to reduce the occurrence or delay the detection of primer-dimer and other non-specific artifacts. Highly specific amplification is crucial to successful qPCR with SYBR Green I technology since this dye binds to and detects any dsDNA generated during amplification. 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.

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 SYBR Green SuperMix does not contain an internal reference dye. Please consult the following table, or visit our web site at www.quantabio.com to find the optimal kit for your instrument platform.

Reagent	Cat Nos	Compatible Real-Time PCR Systems
PerfeCTa SYBR Green SuperMix, ROX	95055-100, 95055-500, 95055-02K	Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™
PerfeCTa SYBR Green SuperMix, Low ROX	95056-100, 95056-500, 95056-02K	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7 Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™
PerfeCTa SYBR Green SuperMix for iQ	95053-100, 95053-500, 95053-02K	Bio-Rad iCycler iQ®, iQ™5, MyiQ™
PerfeCTa SYBR Green SuperMix	95054-100, 95054-500, 95054-02K	Bio-Rad CFX96™, CFX384™, Opticon™, MiniOpticon™, Chromo4™ Cepheid Smart Cycler®; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Eppendorf Mastercycler® ep realplex Roche Applied Science LightCycler® 480

Components

PerfeCTa SYBR Green SuperMix (2X): 2X reaction buffer containing optimized concentrations of $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), AccuStart Taq DNA Polymerase, SYBR Green I dye, and stabilizers.

Storage and Stability

PerfeCTa SYBR Green SuperMix 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. However, the product demonstrated no loss of performance after 20 freeze-thaw cycles or 2 months at +20°C.

Guidelines for SYBR Green qPCR:

- The design of highly specific primers is the single most important parameter for successful real-time PCR with SYBR Green I dye. 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 and the primer pair. PerfeCTa SYBR Green SuperMix can readily amplify fragments between 400 and 500 bp; however, for best results, amplicon size should be limited to 80 - 200 bp. Optimal results may require titration of primer concentration between 100 and 500 nM. A final concentration of 300 nM for each primer is effective for most reactions.
- 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-µL volumes will improve assay precision.
- Suggested input quantities of template are: cDNA corresponding to 1 pg to 100 ng of total RNA; 100 pg to 100 ng 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-µL rxn.	Final Concentration
PerfeCTa SYBR Green SuperMix (2X)	25 µL	1x
Forward primer	variable	100 – 500 nM
Reverse primer	variable	100 – 500 nM
Nuclease-free water	variable	
Template	5 – 10 µL	variable
Final Volume (µL)	50 µL	

Note: For smaller reaction volumes (i.e. 25-µL reactions), scale all components proportionally.

Reaction Protocol

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

Initial denaturation:	95°C, 2 to 3 min
PCR cycling (30-45 cycles:)	95°C, 10 to 15 s 55 - 65°C, 30 to 45 s (collect and analyze data)
Melt Curve (dissociation stage)	Refer to instrument instructions (optional)

Full activation of AccuStart Taq DNA polymerase occurs within 30 seconds at 95°C. Initial denaturation times greater than 3 minutes are usually not required when amplifying cDNA template. However, amplification of genomic DNA or supercoiled plasmid DNA 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.

Some primer sets may require a 3-step cycling protocol for optimal performance. Optimal annealing temperature and time may need to be empirically determined for any given primer set. A 68 to 72°C extension step of 30 seconds is suitable for most applications. However, amplicons greater than 200 bp may require longer extension times. The use of an elevated temperature (80°C) for data collection is not recommended. While this technique can be used to mask the detection of primer-dimer and/or other non-specific products, it does little to improve assay specificity or sensitivity and is not a substitute for effective primer design.

Quality Control

Kit components are free of contaminating DNase and RNase. PerfeCTa SYBR Green SuperMix is functionally tested in qPCR. Kinetic analysis must demonstrate linear resolution over six orders of dynamic range ($r^2 > 0.995$) and a PCR efficiency > 90%.

Limited Label Licenses

This product is provided under an agreement between Molecular Probes, Inc. (a wholly owned subsidiary of Invitrogen Corporation) and Quanta Biosciences, Inc., and the manufacture, use, sale or import of this product is subject to one or more of U.S. Patent Nos. 5,436,134; 5,658,751 and corresponding international equivalents, owned by Molecular Probes. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer, where such research does not include testing, analysis or screening services for any third party in return for compensation on a per test basis. The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, nontransferable 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 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 by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

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. LightCycler is a registered Trademark of Roche. Applied Biosystems, StepOne, StepOnePlus, ViiA, and ROX are trademarks Life Technologies Corporation. Stratagene, MX3000P, MX3005P and MX4000 are trademarks of Agilent Technologies, Inc. Mastercycler is a trademark of Eppendorf. Rotor-Gene is a registered trademark of Qiagen GmbH. SmartCycler is a trademark of Cepheid. CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, Opticon, MiniOpticon and Chromo4 are trademarks of Bio-Rad Laboratories. SYBR is a registered Trademark of Molecular Probes, Inc.

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

Probit Analysis

Notes

Output Created		02-MAY-2019 10:05:25
Input	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	6
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 Antall_positive OF Ant_repl_test WITH Kopier_pr_PCR /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00:00:01,36
	Elapsed Time	00:00:01,03

[DataSet1]

Data Information

		N of Cases
Valid		6
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	19	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% ... Lower Bound
PROBIT[a]	Kopier pr. PCR	3,597	1,156	3,112	,002	1,331
	Intercept	-1,294	,451	-2,873	,004	-1,745

Parameter Estimates

	Parameter	95% Confidence Upper Bound
PROBIT[a]	Kopier pr. PCR	5,862
	Intercept	-,844

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

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df[b]	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	,070	4	,999[a]

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	2,496	3	3	3,000	,000
	2	1,491	20	20	20,000	,000
	3	1,204	20	20	19,976	,024
	4	,477	20	13	13,268	-,268
	5	,204	20	6	5,754	,246
	6	-,523	20	0	,015	-,015

Cell Counts and Residuals

	Number	Probability
PROBIT	1	1,000
	2	1,000
	3	,999
	4	,663
	5	,288
	6	,001

Confidence Limits

		95% Confidence Limits for Kopier pr. PCR			95% Confidence Limits for log[a]...	
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound
PROBIT	,010	,516	,042	,941	-,287	-1,382
	,020	,615	,066	1,052	-,211	-1,179
	,030	,687	,089	1,130	-,163	-1,051
	,040	,747	,111	1,193	-,127	-,954
	,050	,799	,133	1,248	-,098	-,876
	,060	,846	,155	1,296	-,072	-,810
	,070	,890	,177	1,341	-,050	-,751
	,080	,931	,200	1,382	-,031	-,699
	,090	,971	,223	1,422	-,013	-,652
	,100	1,008	,246	1,459	,004	-,609
	,150	1,179	,371	1,630	,072	-,431
	,200	1,336	,511	1,788	,126	-,292
	,250	1,487	,668	1,949	,172	-,175
	,300	1,637	,844	2,121	,214	-,073
	,350	1,789	1,038	2,317	,253	,016
	,400	1,947	1,246	2,555	,289	,096
	,450	2,113	1,461	2,857	,325	,165
	,500	2,290	1,674	3,256	,360	,224
	,550	2,482	1,879	3,787	,395	,274
	,600	2,693	2,075	4,498	,430	,317
	,650	2,931	2,266	5,451	,467	,355
	,700	3,204	2,458	6,749	,506	,391

Confidence Limits

		95% Confidence
	Probability	Upper Bound
PROBIT	,010	-,026
	,020	,022
	,030	,053
	,040	,077
	,050	,096
	,060	,113
	,070	,127
	,080	,141
	,090	,153
	,100	,164
	,150	,212
	,200	,252
	,250	,290
	,300	,326
	,350	,365
	,400	,407
	,450	,456
	,500	,513
	,550	,578
	,600	,653
	,650	,737
	,700	,829

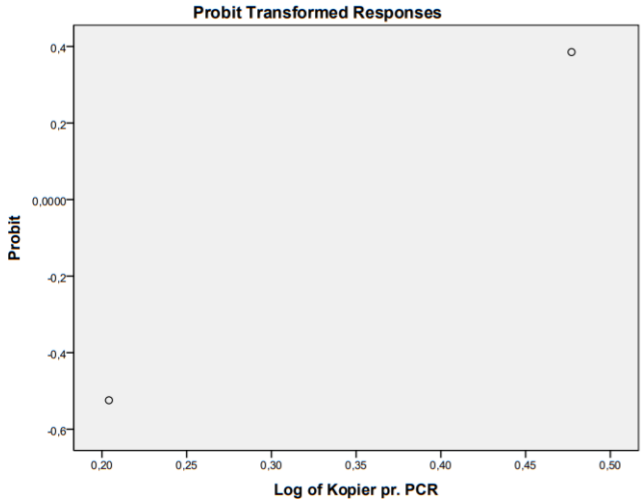
Confidence Limits

	95% Confidence Limits for Kopier pr. PCR			95% Confidence Limits for log[a]...	
Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound
,750	3,527	2,663	8,570	,547	,425
,800	3,925	2,891	11,253	,594	,461
,850	4,447	3,165	15,544	,648	,500
,900	5,202	3,528	23,460	,716	,548
,910	5,403	3,620	25,928	,733	,559
,920	5,630	3,722	28,910	,751	,571
,930	5,891	3,836	32,593	,770	,584
,940	6,196	3,966	37,273	,792	,598
,950	6,564	4,120	43,447	,817	,615
,960	7,024	4,306	52,036	,847	,634
,970	7,635	4,545	64,980	,883	,658
,980	8,529	4,881	87,351	,931	,689
,990	10,155	5,456	139,377	1,007	,737

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits[a] Upper Bound
,750	,933
,800	1,051
,850	1,192
,900	1,370
,910	1,414
,920	1,461
,930	1,513
,940	1,571
,950	1,638
,960	1,716
,970	1,813
,980	1,941
,990	2,144

a. Logarithm base = 10.



```
PROBIT Antall_positive OF Ant_repl_test WITH Kopier_pr_PCR
 /LOG 10
 /MODEL PROBIT
 /PRINT FREQ CI
 /CRITERIA P(.15) ITERATE(100) STEPLIMIT(.1).
```

Probit Analysis

Notes

Output Created		02-MAY-2019 10:18:11
Input	Active Dataset	DataSet2
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	6
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 Antall_positive OF Ant_repl_test WITH Kopier_pr_PCR /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(.15) ITERATE(100) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00:00:00,33
	Elapsed Time	00:00:00,25

Data Information

		N of Cases
Valid		6
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	23	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% ... Lower Bound
PROBIT[a]	Kopier pr. PCR	3,825	,946	4,042	,000	1,970
	Intercept	-,297	,322	-,921	,357	-,619

Parameter Estimates

	Parameter	95% Confidence Upper Bound
PROBIT[a]	Kopier pr. PCR	5,679
	Intercept	,025

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

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df[b]	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	1,058	4	,901[a]

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	2,496	3	3	3,000	,000
	2	1,491	20	20	20,000	,000
	3	1,204	20	20	20,000	,000
	4	,477	20	18	18,735	-,735
	5	,204	20	15	13,715	1,285
	6	-,523	20	0	,216	-,216

Cell Counts and Residuals

	Number	Probability
PROBIT	1	1,000
	2	1,000
	3	1,000
	4	,937
	5	,686
	6	,011

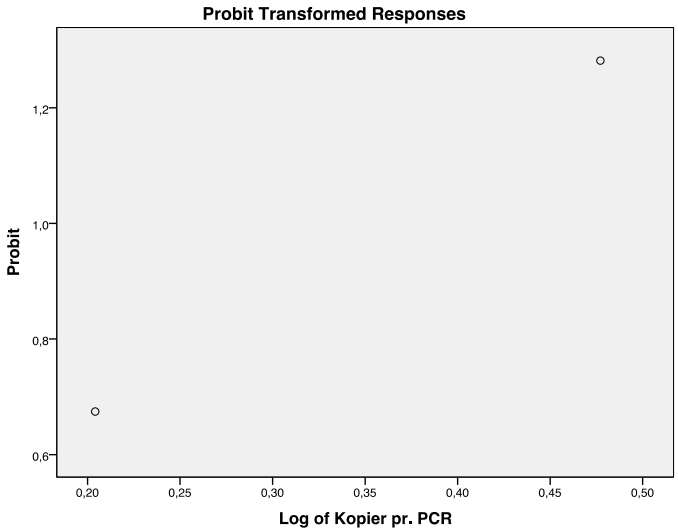
Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Kopier pr. PCR			95% Confidence Limits for log[a]...	
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound
PROBIT	,010	,295	,054	,547	-,531	-1,270
	,020	,347	,073	,614	-,459	-1,134
	,030	,385	,090	,661	-,414	-1,047
	,040	,417	,104	,698	-,380	-,983
	,050	,444	,118	,731	-,352	-,930
	,060	,469	,130	,759	-,329	-,885
	,070	,492	,143	,786	-,308	-,846
	,080	,513	,155	,810	-,290	-,811
	,090	,533	,166	,833	-,273	-,779
	,100	,553	,178	,855	-,257	-,750
	,150	,641	,235	,953	-,193	-,629
	,200	,720	,292	1,040	-,142	-,534
	,250	,797	,352	1,123	-,099	-,453
	,300	,872	,415	1,206	-,059	-,382
	,350	,948	,483	1,290	-,023	-,316
	,400	1,027	,557	1,379	,011	-,254
	,450	1,109	,637	1,474	,045	-,196
	,500	1,196	,724	1,579	,078	-,140
	,550	1,290	,821	1,698	,110	-,086
	,600	1,393	,928	1,837	,144	-,033
	,650	1,508	1,046	2,005	,178	,020
	,700	1,640	1,178	2,216	,215	,071
	,750	1,795	1,326	2,493	,254	,123
	,800	1,985	1,495	2,877	,298	,175
	,850	2,232	1,695	3,449	,349	,229
	,900	2,586	1,951	4,406	,413	,290
	,910	2,680	2,015	4,685	,428	,304
	,920	2,786	2,084	5,011	,445	,319
	,930	2,907	2,161	5,401	,463	,335
	,940	3,049	2,249	5,878	,484	,352
	,950	3,219	2,351	6,479	,508	,371
	,960	3,430	2,474	7,273	,535	,393
	,970	3,710	2,631	8,395	,569	,420
	,980	4,117	2,849	10,178	,615	,455
	,990	4,851	3,220	13,833	,686	,508

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence [a]
		Upper Bound
PROBIT	,010	-,262
	,020	-,212
	,030	-,180
	,040	-,156
	,050	-,136
	,060	-,120
	,070	-,105
	,080	-,091
	,090	-,079
	,100	-,068
	,150	-,021
	,200	,017
	,250	,051
	,300	,081
	,350	,111
	,400	,139
	,450	,168
	,500	,198
	,550	,230
	,600	,264
	,650	,302
	,700	,346
	,750	,397
	,800	,459
	,850	,538
	,900	,644
	,910	,671
	,920	,700
	,930	,732
	,940	,769
	,950	,812
	,960	,862
	,970	,924
	,980	1,008
	,990	1,141

a. Logarithm base = 10.


Probit Transformed Responses
Probit
1,2
1,0
0,8
0,6
0,20
0,25
0,30
0,35
0,40
0,45
0,50
Log of Kopier pr. PCR

NTNU

Kunnskap for ei betre verd