



NTNU - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2021

20 studiepoeng

Metodeutvikling for påvisning av *Aeromonas spp.* ved bruk av Real-Time PCR

Method development for detection of *Aeromonas spp.* by Real-time PCR



Utført av

Malin Elise Jensen

Hanna Kristine Johansen

Olav Smedstad

Dette arbeidet er gjennomført som ledd i bachelorutdanningen i matteknologi ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Bruk av oppgavens innhold skjer på eget ansvar.

Sammendrag

Hensikten med bacheloroppgaven var å utvikle en metode for påvisning av presumptive *Aeromonas* etter oppdyrking på stivelse ampicillin agar (SSA), ved bruk av real-time PCR. Metoden vil benyttes som et supplement til tidkrevende konfirmeringstester i NMKL metode 150.

PCR-analyser ble satt opp for 20 ulike *Aeromonas* stammer og 30 «non-targets». Utfordringen var å finne optimale reaksjonsbetingelser for amplifisering av DNA fra *Aeromonas*, uten å amplifisere DNA fra andre bakterier. Endringer i primerpar og temperatur for annealing utgjorde de viktigste parameterne som ble endret for å optimalisere metoden.

Et utvalg av 20 stammer fra totalt 9 forskjellige *Aeromonas*-arter, og 30 stammer fra totalt 26 forskjellige «ikke-*Aeromonas*»/«non-targets» ble dyrket opp og DNA ble isolert fra alle stammene. En rekke forsøk ble utført for å teste ut og optimalisere reaksjonsbetingelsene for en real-time PCR.

Primerparene gyrB_F/gyrB_R og gyrB7F/gyrB9R ble testet som *Aeromonas*-spesifikke primere. Temperaturer for annealing i reaksjonen ble testet fra 60 °C til henholdsvis 66 °C og 64 °C for de to primerparene, der målet med økt temperatur var å øke spesifisiteten til primerene. SYBR Green ble brukt som fargestoff for å detektere mengden dobbeltrådet DNA i løpet av PCR-analysen.

Forsøkene med gyrB_F og gyrB_R resulterte i amplifisering av alle *Aeromonas*-stammene, men også amplifisering av en høy andel «non-targets». Ved 60 °C annealing ble 28 av 30 «non-targets» amplifisert, 25 av 30 ble amplifisert ved 62 °C, 22 av 22 ble amplifisert ved 64 °C, mens for 66 °C ble 20 av 22 stammer amplifisert.

Forsøkene med gyrB7F og gyrB9R ga en mindre optimal amplifisering av *Aeromonas*, ved at stammene ble amplifisert med en høyere CT-verdi enn for det første primerparet. Ved 60 °C annealing fikk *Aeromonas*-stammene en gjennomsnittlig CT-verdi på 13,45 for primerpar gyrB_F og gyrB_R, mens med primerpar gyrB7F og gyrB9R ble gjennomsnittlig CT-verdi på 20,33. Analysene med primerpar gyrB7F og gyrB9R resulterte i en betydelig lavere andel amplifiserte «non-targets», spesielt ved en høyere annealing-temperatur. Ved 60 °C

annealing ble 10 av 27 «non-targets» amplifisert, mens ved 64 °C annealing ble kun 4 av 11 stammer amplifisert. Det ble tatt utgangspunkt i at stammene som ikke ble amplifisert ved 60 °C heller ikke ville bli amplifisert ved 64 °C annealing, og ble derfor utelukket fra videre forsøk.

Ut fra PCR-analysene kan det konkluderes med at en reaksjon med primerne gyrB7F og gyrB9R, med 64 °C annealing og en «cut-off» i CT-verdi på 30 sykluser kan benyttes for å påvise presumptive *Aeromonas*, med 2 % falske positive påvisninger og 4,5 % falske negative påvisninger. Videre utvikling av metoden er nødvendig for en mer spesifikk deteksjon for *Aeromonas*.

Abstract

The purpose of this bachelor thesis was to develop a method for detection of presumptive *Aeromonas* after cultivation on ampicillin agar (SSA), by using real-time PCR. The method will supplement the time-consuming confirmation tests in NMKL method 150.

PCR analyses were set up for 20 different *Aeromonas* strains and 30 "non-targets". It proved challenging to find optimal reaction conditions for amplifying *Aeromonas*, without also amplifying DNA from other bacteria. Changes in the primer pair and the annealing temperature were the most important parameters that were varied to optimise the method.

A selection of 20 strains from a total of 9 different *Aeromonas*-species, and 30 strains from 26 different "non-*Aeromonas*"/"non-targets" were cultivated and their DNA isolated. A series of experiments were conducted to test and optimise the reaction conditions for a real-time PCR.

The primer pairs gyrB_F/gyrB_R and gyrB7F/gyrB9R were tested as *Aeromonas*-specific primers. Temperatures for the annealing stage of the reaction were tested from 60 °C to respectively 66 °C and 64 °C for the two primer pairs, with the goal of increasing their specificity. SYBR Green was used as a dye to detect the amount of double stranded DNA during the PCR analysis.

The experiments with gyrB_F and gyrB_R resulted in amplification of all *Aeromonas* strains, but also amplification of a large part of the "non-targets". At 60 °C annealing, 28 out of 30 "non-targets" were amplified, 25 out of 30 were amplified at 62 °C, 22 out of 22 were amplified at 64 °C, and at 66 °C 20 out of 22 strains were amplified.

The experiments with gyrB7F and gyrB9R resulted in a less optimal amplification of *Aeromonas*, giving the strains a higher CT value than what they reached with the first primer pair. Annealing at 60 °C gave the *Aeromonas* strains an average CT value of 13,45 for primer pair gyrB_F and gyrB_R, while primer pair gyrB7F and gyrB9R gave an average CT value of 20,33. The analyses with primer pair gyrB7F and gyrB9R resulted in amplification of a significant lower share of the "non-targets", especially at a higher annealing temperature. At 60 °C annealing, 10 out of 27 "non-targets" were amplified, while at 64 °C annealing only 4

out of 11 strains were amplified. An assumption was made that the strains that were not amplified at 60 °C would not be amplified at 64 °C either, therefore they were excluded from later experiments.

From the PCR analyses a conclusion can be made that a reaction with the primers gyrB7F and gyrB9R, with annealing at 64 °C and a “cut-off” I CT value at 30 cycles, can be used to detect presumptive *Aeromonas*, with 2 % false positive and 4,5 % false negative detections. Further development of the method is necessary for a more specific detection of *Aeromonas*.

Forord

Denne bacheloroppgaven er en del av bachelorprogrammet Matvitenskap, teknologi og bærekraft, ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap (IBT), og dekker 20 studiepoeng.

Det praktiske arbeidet ved oppgaven fant sted ved IBTs mikrobiologiske laboratorium på Kalvskinnet, NTNU. Oppgaven ble utført i vårsemesteret 2021.

Vi vil gjerne rette en stor takk til vår hovedveileder Sunniva Hoel for all hjelp under hele oppgaven, både ved det praktiske og det teoretiske arbeidet. Vi vil også takke Ida Smedstad for illustrasjonen til forsiden.

Trondheim, 20 mai 2020

Malin Elise Jenssen



Hanna Kristine Johansen



Olav Smedstad



Innholdsfortegnelse

1 Innledning	1
2 Teoretisk bakgrunn	2
2.1 <i>Aeromonas</i>	2
2.1.1 Symptomer og patogenitet.....	2
2.1.2 Påvisning.....	3
2.1.3 Vekstvilkår.....	4
3 Metodisk teori	6
3.1 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	6
3.1.1 Agarose gelelektroforese.....	7
3.1.2 Real-time PCR.....	8
3.2 Kvalitativ metode.....	9
3.3 Kvantitativ metode.....	10
4 Materialer og metoder	12
4.1 Oppdyrking av bakterier.....	12
4.2 DNA-isolering.....	15
4.3 Kvantifisering av DNA.....	15
4.4 Preparering av mastermiks til PCR.....	16
4.5 Primere.....	16
4.6 PCR reaksjonsbetingelser.....	17
4.7 Gelelektroforese.....	20
4.8 Validering av metode.....	21
4.8.1 Effektivitet.....	21
4.8.2 Spesifisitet og sensitivitet.....	22
4.8.3 Metodens repeterbarhet.....	22
5 Resultater	24
5.1 Positiv og negativ kontroll.....	24
5.2 Kvantifisering av bakterievekst og DNA-isolering.....	24
5.3 Testing av primerpar <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i>	26
5.3.1 Amplifisering av <i>Aeromonas</i> -stammer med <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i> og 60 °C annealing.....	27
5.3.2 Amplifisering av non-targets med <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i> og 60 °C annealing.....	28
5.3.3 Amplifisering non-targets med <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i> og 62 °C annealing.....	29
5.3.4 Amplifisering av non-targets med <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i> og 64 °C annealing.....	29
5.3.5 Amplifisering av non-targets med <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i> og 66 °C annealing.....	29
5.4 Testing av <i>gyrB7F</i> & <i>gyrB9R</i>	29
5.4.1 Amplifisering av <i>Aeromonas</i> -stammer med <i>gyrB7F</i> og <i>gyrB9R</i> og 60 °C annealing.....	29
5.4.2 Amplifisering av <i>Aeromonas</i> -stammer med <i>gyrB7F</i> og <i>gyrB9R</i> og 64 °C annealing.....	30
5.4.3 Amplifisering av non-targets med <i>gyrB7F</i> og <i>gyrB9R</i> og 60 °C annealing.....	30
5.4.4 Amplifisering av non-targets med <i>gyrB7F</i> og <i>gyrB9R</i> og 62 °C annealing.....	30
5.4.5 Amplifisering av non-targets med <i>gyrB7F</i> og <i>gyrB9R</i> og 64 °C annealing.....	31

5.5 Verifisering av PCR-produkt.....	31
5.6 Validering av metode	33
5.6.1 Effektivitet.....	33
5.6.2 Sensitivitet	34
5.6.3 Spesifisitet.....	34
5.6.4 Repeterbarhet mellom ulike forsøksoppsett	34
5.7 Sammenheng mellom DNA-konsentrasjon og CT-verdi.....	34
6 Vurdering.....	36
6.1 Utvalg av bakteriestammer.....	36
6.2 DNA-konsentrasjon og CT-verdi	36
6.3 <i>Aeromonas</i> -spesifisitet for <i>gyrB_F</i> og <i>gyrB_R</i>	37
6.4 <i>Aeromonas</i> -spesifisitet for <i>gyrB7F</i> og <i>gyrB9R</i>	38
6.5 Validering av metode	39
7 Konklusjon	42
8 Referanseliste	43
Vedlegg.....	1
Vedlegg 1.....	1
Vedlegg 2.....	1
Vedlegg 3.....	1

1 Innledning

Aeromonas spp. er en bakterie som finnes i miljøet og i vann og påvises derfor ofte i mat. Noen arter av bakterien kan være sykdomsfremkallende, og noen av artene kan forårsake forringelse av mat. Taksonomien til *Aeromonas spp.* har vært under stadig endring de siste 20-30 årene. *Aeromonas* tilhører i dag familien Aeromonadaceae, men frem til 1986 tilhørte bakterien en annen familie, nemlig Vibrionaceae. I følge «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» var det 17 beskrevne arter i 2005 (Martin-Carnahan & Joseph, 2005), men i dag er antallet økt og det er beskrevet 36 ulike arter av *Aeromonas spp.* (Fernández-Bravo & Figueras, 2020).

En metode for påvisning av *Aeromonas* er beskrevet i «*Aeromonas*, mesofile arter. Bestemmelse i næringsmidler og fôr. (NMKL 150, 3. utg., 2004)» og er utarbeidet av Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL). Metoden baserer seg på oppdyrking og isolering på stivelse ampicillin agar (SAA). Da mediet ikke er 100 % selektivt for *Aeromonas* er det nødvendig å bekrefte funn av typiske kolonier, men utfordringen er at dagens metode beskriver en rekke tidkrevende og ikke nødvendigvis nøyaktige konfirmeringstester av presumptive *Aeromonas*. Det er behov for en raskere og mer pålitelig metode for konfirmering av denne bakterieslekten. Real-time PCR kan benyttes som et supplement til de eksisterende konfirmeringstestene, som vil gi en mulighet til å påvise bakterien i sanntid.

Hovedmålet med bacheloroppgaven var å utvikle en kvalitativ metode for å påvise presumptive *Aeromonas*. Hovedmålet ble delt inn i flere delmål:

- Isolere og kvantifisere et utvalg av *Aeromonas*- og ikke-*Aeromonas*-stammer
- Teste spesifisiteten til *Aeromonas*-spesifikke primere, som er publisert i tidligere studier
- Finne optimale reaksjonsbetingelser for PCR-reaksjonen

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 *Aeromonas*

Aeromonas spp. er en gram negativ, fakultativ anaerob stavformet bakterie som tilhører familien Aeromonadaceae. Bakterien er oksidase- og katalase positiv og glukosefermentativ (Daskalov, 2006). *Aeromonas* blir ofte klassifisert i to hovedgrupper som er bevegelige mesofile arter og ikke-bevegelige psykrofile arter, etter vekstvilkår og egenskaper (Grim, 2013). I 2005 var det kun beskrevet 17 ulike arter av *Aeromonas spp.* (Martin-Carnahan & Joseph, 2005), mens i 2020 er antallet økt til 36 beskrevne arter (Fernández-Bravo & Figueras, 2020).

Artene av *Aeromonas* er utbredt i naturen, spesielt i vann og jord. Ettersom bakterien er fakultativ anaerob vokser flere av artene godt ved mangel på oksygen, og i tillegg godt ved kjøleskapstemperatur (Awan, et al., 2018). Bakterien påvises som oftest i vann, både saltvann og ferskvann, marine produkter og fisk (Lee, Hoel, Lunestad, Lerfall, & Jakobsen, 2020).

Aeromonas kan være til stede i de fleste typer matprodukter, siden vann med *Aeromonas*-bakterien kan forurense matvarene. Ettersom *Aeromonas* er utbredt i naturen, og særlig vannkilder, er det kilden til de fleste tilfeller av sykdom forårsaket av bakterien. Funnene av bakterien i vann er som regel grunnet fekal forurensning (Percival & Williams, 2014).

Det er få dokumenterte utbrudd av *Aeromonas* med informasjon om inntatt dose (Teunis & Figueras, 2016). Infeksjonsdosen av bakterien er usikker, men ligger mest sannsynlig høyt mellom 10^6 - 10^8 , med en inkubasjonstid på 6-48 timer (Granum, 2015, s. 18). Det er særlig i Asia og Afrika bakterien er utbredt, men den opptrer også i Norge (FHI, 2019). I 1994 ble tre personer syke i Norge grunnet rakfisk fra bekkevann med innhold av *Aeromonas* (Granum, 2015, s. 57). Det er svært få dokumenterte utbrudd i Norge, men mørketallene antas å være høyere. Ettersom symptomene er milde for de aller fleste, kan *Aeromonas*-relaterte infeksjoner gå under radaren. I tillegg testes det sjeldent for *Aeromonas* ved gastroenteritter. På verdensbasis derimot er bakterien mye mer utbredt.

2.1.1 Symptomer og patogenitet

Symptomer som kan oppstå av *Aeromonas* er magesmerter, diare, mild feber og hodepine, og noen ganger oppkast. Mer sjeldne symptomer er urinveisinfeksjon, øreinfeksjon, sårinfeksjon, nekrotiserende fasciitt og sepsis (Igbinosa, Igumbor, Agdasi, Tom, & Okoh,

2012). Ved mer alvorlig sykdom kan bakterien forårsake dysenteri med blodig avføring, noe som oftest skjer hos immunsupprimerte. Symptomene varer vanligvis i 1-3 døgn (Isonhood & Drake, 2002). Det trengs som regel ingen behandling av gastroenteritt fra *Aeromonas*, men ved mer alvorlig sykdom som sårinfeksjon eller sepsis kan antibiotika være aktuelt (Igbinosa et al., 2012).

A. veronii er en av de mest virulente artene som kan gi alvorlig sykdom ved svekket immunforsvar (Levin, 2014). *Aeromonas* kan produsere toksiner og enzymer som er involvert i invasjon av vertsceller, blant annet cytotoxiske enterotoksiner, cytotoniske enterotoksiner, proteaser og lipaser. Cytotoksisk enterotoksin (Act) er produsert med hemolytisk, enterotoksisk og cytolytisk aktivitet (Tang, Liu, Schwartzman, Sussman, & Poxton, 2015). Toksinet kan bidra til økt nedbryting av tarmepitel og gi blodig diare. Cytotonisk enterotoksin kan forekomme i to forskjellige toksiner fra *Aeromonas*-arter, både varmemestabil (Ast) og varmelabil (Alt). Det varmestabile toksinet kan degraderes ved 100 °C i 30 minutter, mens det varmelabile toksinet kan degraderes ved 56 °C i 10 minutter (Fernández-Bravo et al., 2020). I motsetning til cytotoxiske toksiner, vil ikke cytotoniske toksiner bryte ned epitelceller i tarmen, men de kan forårsake vandig diare (Tang, et al., 2015).

2.1.2 Påvisning

For å kunne påvise de forskjellige *Aeromonas*-artene finnes det ingen gode selektive medier. Isolering av *Aeromonas* er beskrevet i «*Aeromonas*, mesofile arter. Bestemmelse i næringsmidler og fôr» (NMKL 150, 3. utg., 2004). Påvisningen blir utført som en platespredningsmetode med et selektivt dyrkningsmedium Stivelse-Ampicillin- Agar (SAA) for kvantitativ bestemmelse av bakterien. Platespredningsmetoden innebærer at en fortynnet næringsmiddelprøve strykes ut på et fast dyrkningsmedie og inkuberes ved 37 °C i 24 timer. Kolonier regnes som presumptive *Aeromonas spp.* hvis de er gule/honningfargede, har en størrelse på omtrent 2-3 mm i diameter og er omringet av en lys sone. Metoden krever at fem typiske kolonier plukkes og konfirmeres. (NMKL no. 150, 2004) Ved isolering av *Aeromonas* benyttes de fleste ingredienser som også benyttes ved isolering av Enterobacteriaceae og *Vibrio*-arter, som dermed kan vokse i tillegg til *Aeromonas* på mediet og påvirke deteksjonen av *Aeromonas*. Tilsetning av «2,4 diamino-6,7-diisopropyl-pteridine phosphate», også kalt O/129 eller vibriostatikum, vil forhindre vekst av *Vibrio*-arter, mens

Aeromonas vil være resistent (Martin-Carnahan & Joseph, 2005, s. 557). Resistens for O/129 er en av konfirmeringstestene i NMKL 150. For å hemme vekst av bakterier fra Enterobacteriaceae brukes ampicillin, et antibiotikum som alle *Aeromonas*-arter er resistent mot, med unntak av *A. trota* (Corry, Gordon, & Rosamund, 2012, ss. 458-459). Dette antibiotikumet benyttes ikke i SAA, der er det ampicillin som hemmer en rekke gram negative bakterier. Et annet problem ved isolering av *Aeromonas* er at *Pseudomonas* også vil kunne bli isolert, ettersom bakterieartene er nært beslektet og er vanskelig å skille fra hverandre på petriskål (Brenner, Krieg, & Staley, 2005).

2.1.3 Vekstvilkår

Aeromonas har mekanismer som bidrar til å beskytte og tilpasse seg til ulike miljø- og stressfaktorer. Det gjør bakterien tolerant for både varme og kulde, lav næringstilgang og ulike pH-verdier (Awan, et al., 2018). I tillegg vokser de fleste *Aeromonas*-arter godt i flere ulike atmosfærer og temperatur fra 0 °C til over 40 °C. Bakterien er salttolerant og kan vokse i opptil 3,5 % saltkonsentrasjon, samt ved pH fra 4,5 til 5,5 (Granum, 2015, s. 58). Dermed er *Aeromonas spp.* en bakterie som lett kan bederve mange typer matvarer, og verken vakuumpakking eller kjøling vil kunne hemme bakterien, men det er sannsynligvis forskjell i toleranse for lav temperatur blant ulike arter. En studie gjort av Jakobsen, Shumilina, Lied & Hoel (2020) viser at *A. salmonicida* er en potensiell kvalitetsforringende organisme i vakuumpakket laks under kjølelagring. Studien viste også at kombinasjon av MAP (med 60/40 % CO₂/N₂) og kjølelagring ikke var tilstrekkelig til å hemme veksten fullstendig, men forhindret dannelse av trimellittsyreanhydrid (TMA) som bidrar til kvalitetsforringelse i fisk.

Aeromonas spp. er et potensielt problem for mattryggheten i spiseklar mat som ikke skal varmebehandles, da bakterien, som nevnt, er tolerant for både lav temperatur, fravær av oksygen og høye saltkonsentrasjoner. Bakterien drepes lett ved oppvarming, som koking eller steking. I tillegg kan *Aeromonas spp.* påvirke næringsmidler på en ugunstig måte enten ved å redusere kvaliteten. Bakterien kan føre til forringelse av mat, som først og fremst påvirker kvaliteten, men som også kan føre til matforgiftning (Granum, 2015, s. 61).

Aeromonas spp. har i tillegg evnen til å danne biofilm (Hem, Wennberg, Thorvaldsen, & Skaar, 2013, s. 231), som gjør bakterien i stand til å overleve i ekstreme miljøer. Evnen til å danne biofilm øker beskyttelsen mot kjemikalier og desinfeksjon som benyttes i

vaskerutiner for matproduksjon (Flemming & Wingender, 2010). Biofilmen kan dermed bli en kilde til sykdomsutbrudd med gastroenteritter.

For å forebygge vekst av bakterien er det å unngå kontaminasjon det aller viktigste, ettersom lav temperatur og fravær av oksygen ikke er tilstrekkelig for å hindre vekst av mange arter av *Aeromonas spp.* Videre vil god varmebehandling av sjømat fra områder med høy forekomst av *Aeromonas* forebygge videre vekst av bakterien. Importert sjømat bør unngås å spises rått. I tillegg er det særdeles viktig med god hygiene på kjøkkenet og ved behandling av mat. *Aeromonas* har hatt en økning i resistens mot antimikrobielle stoffer, som en konsekvens fra høy bruk av det for behandling av både mennesker og dyr (Stratev & Odeyemi, 2015).

3 Metodisk teori

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode som er mye brukt for påvisning av matbårne bakterier, som erstatning for eller som supplement til kulturbaserte metoder. For å identifisere *Aeromonas* kan PCR benyttes. Analysen kan massekopiere DNA i bakterier og er den mest sensitive og effektive analysemetoden som kan produsere millioner av kopier av DNA i løpet av noen få minutter (Labora, u.d.).

3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode som benyttes for å amplifisere spesifikke segmenter av DNA ved å benytte to komplementære primere, deoksynukleotider (dNTP), enzymet DNA-polymerase og magnesium (Mg^{2+}) (Thermo Fisher Scientific, 2012a). En PCR-reaksjon består normalt av en syklus på tre ulike faser med denaturering, annealing og extension, som blir gjentatt 30-40 ganger. I første fase, denaturering, er temperaturen høy, normalt 95 °C, som gjør at dobbeltrådet DNA separeres til enkelt tråder. Den høye temperaturen vil denaturere DNA polymerase med mindre et varmestabilt enzym er til stede. Enzymet bidrar til at det ikke er nødvendig å tilsette ny DNA polymerase for hver syklus. Annealing er neste steg i PCR-syklusen der primerene hybridiseres til hver enkelt tråd. Temperaturen som benyttes i trinnet blir bestemt ut fra smeltetemperaturen til primerne som brukes, som regel mellom 40-65 °C. Vanligvis settes temperaturen til omtrent 5 °C lavere enn smeltetemperaturen (Fykse, Olsen, & Skogan, 2004). Ved annealing vil to enkeltråder danne et dobbeltrådet produkt som er nøyaktig like langt som lengden mellom primerendene. Hver av trådene i dette produktet er komplementær til en av primerne som brukes, og kan derfor benyttes som et templat i senere syklus (Ausubel, et al., 2003, s. 15.0.2). Det siste steget i analysen er extension, hvor temperaturen stiger til rundt 70-72 °C. Aktiviteten av DNA polymerase er optimal og forlengelse av primer kan skje med en hastighet opp mot 100 basepar i sekundet (Applied Biosystems, 2014, s. 3). DNA blir replikert fra 3'-enden av primer og DNA polymerase lager DNA kun i 5' til 3' retning, og dermed er det to nye like DNA tråder fra starttråden. Prosessen gjentas med en dobling av DNA i hver syklus.

En PCR-analyse er avhengig av to parametere: kvantitet og kvalitet. Mengden DNA templat bør tilpasses reaksjonsbetingelsene for reaksjonen, hvor kun noen få kopier av DNA templat

er tilstrekkelig om metoden er sensitiv nok (Applied Biosystems, 2014). Den andre parameteren, kvalitet, bestemmes ut fra en A260/A280 ratio. Absorbansen av prøvene måles i et spektrofotometer med bølgelengde 260 nm og 280 nm (Ausubel, et al., 2003, s. 10.1.8). En A260/A280 ratio på rundt 1,8 er generelt akseptert som «rent» DNA, og avvikende verdier kan indikere kontaminering, eller kan oppstå ved lave DNA-konsentrasjoner (< 10 ng/μl) (Thermo fisher Scientific, 2012b).

Primere, også kalt oligonukleotider, er en enkelttrådet DNA-sekvens som brukes i PCR. Sekvensen til primeren bør være kort, mellom 18-24 basepar, og den må være komplementær til en sekvens på målsekvensen. Primere kommer i par hvor den ene amplifiserer fra 5' til 3' retning, altså sense-tråden/forward-strand og den andre amplifiserer motsatt vei på antisense-tråden/reverse-strand. Ved hjelp av primerne blir det syntetisert nytt DNA. (Loftus, u.d.)

Primerne skal være spesifikk for målsekvensen og uten andre elementer som kan ødelegge spesifisiteten. For PCR analyser blir det benyttet et primerpar med en forward- og reverse primer. Paret skal ha så likt smeltepunkt som mulig for å kunne ha en felles temperatur på annealing, og ha omtrent 50 % GC-innhold (Thermo Fisher Scientific, 2019). Høyt innhold av GC gir sterkere bindinger og det kan bli nødvendig med høyere temperatur. Forskjellen i bindingsstyrke skyldes at det er tre hydrogenbindinger mellom guanin og cytosin, i motsetning til to hydrogenbindinger for adenin og thymin. I tillegg kan primerne danne stabile ufullkomne hybridiseringer. Analyse av primerparet vil bidra til å unngå komplementaritet og hybridisering mellom primerne, primer-dimer (Applied Biosystems, 2014, s. 5).

3.1.1 Agarose gelelektroforese

Elektroforese separerer fragmenter av DNA i en gel laget av agarose, som oftest rundt 1-2% konsentrasjon. Resultatet av et enkelt produkt i en PCR-analyse kan bekreftes ved å utføre en elektroforese av prøven (Ausubel, et al., 2003, s. 15.8.12). Endene av gelen er i kontakt med hver sin elektrode, hvor en elektroforesebuffer holder en jevn pH gjennom analysen, slik at DNA holdes negativt og dermed trekkes mot den positive polen (Hokstad, 2021). Et fargestoff, som regel GelRed, tilsettes løsningen for å farge DNA-trådene på vei gjennom porene i gelen. Hensikten med å separere og visualisere PCR-produkter i en gel er for å avgjøre lengden på DNAet, hvor en DNA standard, også kalt ladder, brukes for å

sammenligne prøven med forhåndsbestemte størrelser (Corthell, 2014, ss. 21-25). Dette er den eneste muligheten til å kontrollere resultatene fra en konvensjonell (endepunkts) PCR (Corthell, 2014, s. 30).

3.1.2 Real-time PCR

Real-time PCR er en variant av PCR, der data samles inn underveis, slik at resultatene kan leses av i sanntid, mens reaksjonen foregår. Dannelse av PCR produktet vil bli detektert i hver syklus. Dette i motsetning til PCR med endepunktsanalyse, der data kun kan hentes inn når reaksjonen er ferdig (Applied Biosystems, u.å.). Riktig primer for en gitt analyse er en av de viktigste parameterne i real-time PCR. Lengden på PCR-produktet bør være rundt 50-150 basepar (Thermo Fisher Scientific, 2019).

Det finnes to prinsipielt forskjellige måter å detektere dannelsen av PCR-produkt: SYBR Green og spesifikke TaqMan[®] prober. Ved å tilsette fargestoffet SYBR Green kan data samles inn kontinuerlig. Real-time PCR instrumentet måler endringen i fluorescens gjennom de termiske syklusene, og setter opp et amplifikasjonsdiagram for hele reaksjonen. Real-time PCR gir en nøyaktig oversikt over mengden amplifisering i hver syklus. Hvis det er mye av en bestemt sekvens DNA i prøven vil amplifiseringen tidlig komme over en grenseverdi som bekrefter amplifisering (Applied Biosystems, 2014, s. 2). Denne grenseverdien settes automatisk av programvaren til PCR-instrumentet og skal skille amplifisering fra bakgrunnsstøy. Hver prøve blir registrert med en CT-verdi (Cycle of Threshold), som forteller ved hvilken syklus den nådde grenseverdien. I en real-time PCR analyse vil også en smeltekurve kunne leses av etter endt syklus. Endringen i temperatur og fluorescerende signaler blir overvåket over en viss tid. Reduksjonen i fluorescens relateres til dissosiasjonen av dobbeltrådet PCR-produkt som frigjør SYBR Green fluorescens. Programvaren til instrumentet benytter en algoritme som setter første negative fluorescerende signal opp mot temperatur. (Ausubel, et al., 2003, s. 15.8.12) Et toppunkt i smeltekurven indikerer ett enkelt PCR-produkt med en bestemt smeltetemperatur. Inneholder smeltekurven flere toppunkt viser det enten ikke-spesifikke produkter eller at primer-dimer har oppstått (Wang, et al., 2019).

En annen type sekvensdetektering er TaqMan[®] hvor en fluorgen probe brukes for å påvise et bestemt PCR-produkt under syklusene. Det er både fordeler og ulemper ved både TaqMan[®] og SYBR Green når det gjelder spesifisitet og følsomhet. TaqMan[®] prober vil

kunne gi ekstra sekvensspesifisitet i tillegg til forward- og reverse primere, fordi det ikke detekteres signal med mindre den spesifikke proben har bundet seg til et gitt sted i målsekvensen.. Fordelen ved å benytte SYBR Green er at det kan overvåkes amplifiseringer av alle dobbeltrådet DNA-sekvenser. I tillegg er det ikke nødvendig med prober, som for TaqMan®, noe som reduserer analyseoppsettet og kostnadene for analysen. SYBR Green vil dermed gi CT-verdier (Cycle Threshold) tidligere og bedre følsomheten (Whittwer, Herrmann, Moss, & Rasmussen, 1997). Ulempen ved å benytte SYBR Green er at den kan gi falske positive signaler. Fargestoffet binder seg til alle dobbeltrådet DNA og kan derfor også binde seg til ikke-spesifikke dobbeltrådet DNA-sekvenser. En annen ulempe ved å benytte fargestoff kan være at det øker følsomheten for å oppdage amplifiseringsprodukter, ettersom flere fargestoff binder seg til samme ampikon. Konsekvensen er at signalet er avhengig av mengden dobbeltrådet DNA som er i reaksjonen. (Applied Biosystems, u.å., ss. 3-4)

3.2 Kvalitativ metode

En kvalitativ metode undersøker om en bestemt analytt er til stede eller ikke i en prøve. Sensitiviteten til en metode angir den laveste mengden analytt som kan påvises. Om en metode ikke er sensitiv nok, er det mulig at det finnes en liten mengde analytt i prøven, men ikke nok til å gi positivt svar. For å måle sensitivitet til en metode må det defineres en deteksjonsgrense (LOD). LOD beskrives som konsentrasjonen av DNAet der PCR-produktet detekteres med en sannsynlighet på minst 95 %. Ved hjelp av en fortynningsrekke med target-DNA kan LOD bestemmes. Hver fortykning utføres med 12 replikater og nivået med lavest antall kopier der alle 12 replikatene er positive, anses å være en omtrentlig verdi for LOD95% (U.S. Food and Drug Administration, 2020, s. 12). Sensitivitet til en PCR-metode defineres ved at en lav mengde templat DNA amplifiseres tilsvarende standardkurven, og med god effektivitet (Applied Biosystems, 2014, s. 33).

Spesifisitet til en metode vil si sannsynligheten for å gi positive utslag for prøver som ikke inneholder analytten det undersøkes for. Spesifisiteten til et primerpar bør kontrolleres for å garantere at metoden kun reagerer med den ønskede sekvensen. Det valgte primerparet kan testes eksperimentelt ved å teste de mot så mange positive prøver, targets, som mulig. Hver prøve må minimum testes i duplikat og testresultatene bør gi 95 % konfidens. For metoder utviklet ved bruk av SYBR Green må smeltetemperaturen (T_m) tas med som en

parameter. Spesifisiteten til en kvalitativ metode kan videre kontrolleres ved å bekrefte lengden til PCR-produktet ved bruk av gelelektroforese (Broeders, et al., 2014, ss. 117-118).

Hvis prøven er positiv i PCR-analysen, men egentlig er klassifisert som negativ, defineres det som et falskt positivt resultat. Den statistiske formelen under gir et resultat på falsk positiv/negativ rate. Svaret angis i prosent og bør være mindre enn 5 % (U.S. Food and Drug Administration, 2020, s. 13).

$$\text{false pos/neg rate} = \frac{\text{number misclassified known neg/pos samples}}{\text{tot number known neg/pos samples}} \times 100 \%$$

Ved å regne falsk positiv/negativ rate undersøkes forholdet mellom falske positive/negative og det totale antallet kjente negative/positive prøver. Falske positive svar angir hvor spesifikk metoden er mens falske negative svar angir hvor sensitiv metoden er.

3.3 Kvantitativ metode

En kvantitativ metode undersøker mengden analytt som er til stede i en prøve. For PCR-analyser kan det defineres en kvantifiseringsgrense (LOQ), den laveste nukleinsyrekonsentrasjonen som kan kvantifiseres. Ved å analysere prøver med en kjent mengde DNA kan LOQ bestemmes. Kvantifiseringen kan uttrykkes i flere enheter, som for eksempel prosent, mg/kg eller ppm (U.S. Food and Drug Administration, 2020, ss. 15-16).

Effektiviteten til PCR-metoden er også en viktig parameter. Effektiviteten, i PCR-sammenheng, vil si evnen til å amplifisere alt DNA som er til stede i hver prøve. En effektivitet på 100 % vil si at mengden DNA dobles for hver syklus. Ved å lage en seriefortynning av en positiv referansestamme kan effektiviteten måles. Det må utføres minst tre analyser av en fortynningsrekke med minst fire paralleller av hver fortynning. Deretter lages en standardkurve hvor CT-verdien plottes mot log-verdien av kde/ml. Sammenhengen mellom punktene blir analysert ved lineær regresjon, der CT-verdien går langs y-aksen, og Log (kde/ml) går langs x-aksen. (Broeders, et al., 2014, s. 119). Ved bruk av disse verdiene kan effektiviteten regnes ut med en egen formel.

$$\text{Effektivitet} = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Stigningstall}}\right)}$$

Stigningstallet bør ligge mellom -3,6 til -3,1 som gir effektivitet fra 90 % til 110 %. En kvantitativ PCR-analyse bør ha så høy effektivitet som mulig, for å gi et riktig estimat for startmengden med templat DNA. Som nevnt over bør det komme tydelig frem hvorfor det

er viktig med en høy effektivitet for en kvantitativ PCR. Standardkurven gir også en korrelasjonskoeffisient (R^2), som forteller hvor reproduserbart forsøket er (Applied Biosystems, 2014, s. 33), og angir hvor lineær en standardkurve er. R^2 -verdien til standardkurven bør være ≥ 0.98 (Broeders, et al., 2014, s. 120).

Ved å regne på standardavviket til repeterbarhet (RSD) gir det et relativt standardavvik til resultatene oppnådd med bruk av samme metode, av samme analytiker, i samme laboratorium, med samme utstyr og på de samme prøvene. RSD bør ikke overstige 25 % over hele analysens dynamiske område. (U.S. Food and Drug Administration, 2020, s. 16)

For at en metode skal kunne bli brukt internasjonalt er det ikke nok å validere den «innomhus». Da må en full validering organiseres som involverer flere laboratorier, gjerne 12 ulike laboratorier. Til dette må det forberedes blindprøver av targets og non-targets, i tillegg til «no template control». Resultatene blir vurdert som akseptable når ingen avvik eller tekniske problemer har oppstått. Eventuelle avvikende resultater kan utelukkes ved hjelp av statistikk (Broeders, et al., 2014, ss. 120-121).

4 Materialer og metoder

4.1. Oppdyrking av bakterier

Det ble tilberedt Tryptic Soy Broth (TSB) og Tryptic Soy Agar (TSA) fra henholdsvis Oxoid og VWR Chemicals. Mediene ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter og deretter temperert ved 48 °C vannbad. *Aeromonas*-artene (Tabell 1) og ikke-*Aeromonas*-artene (Tabell 2) ble hentet fra frysede ampuller (-80°C) og opptint før utstrykningen, med unntak av *Pseudomonas spp.* *Pseudomonas*-stammene var allerede dyrket opp på petriskåler. Ved bruk av en podeøse ble hver enkelt stamme strøket ut med fortynningsutstryk for å oppnå enkeltkolonier for isolering på hver petriskål. Skålene ble inkubert i 24 timer ved 30 °C.

For å dyrke opp en tett bakteriekultur for DNA-isolering ble én koloni fra alle prøvene inokulert i et 15 mL sentrifugerør med 10 mL TSB. Det var noen skåler der det ikke var mulig å skille enkeltkolonier fra hverandre, der ble det podet cellemasse fra området med minst vekst. Rørene med TSB ble inkubert i 24 timer ved 30 °C.

Tabell 1: 20 *Aeromonas*-stammer brukt i analysene.

Art (targets)	Kilde
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Referansestamme (CCUG 14551)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (A538)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 328)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 900)
<i>Aeromonas caviae</i>	Referansestamme (CCUG 25939)
<i>Aeromonas caviae</i>	Miljøisolat (A507)
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>veronii</i>	Referansestamme (CCUG 27821)
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i>	Referansestamme (CCUG 30360)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU2)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 868)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 897)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (HLE oyster-58)
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (SU14-3)
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (HLE salmon-22)
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (A539)
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE sushi-4)
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE oyster-8)
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE scallop-44)
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Miljøisolat (A536)
<i>Aeromonas piscicola</i>	Miljøisolat (SU58-3)

Tabell 2: 31 ikke-Aeromonas stammer brukt i analysene.

Art (non-targets)	Kilde
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referansestamme (CCUG 2080)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Referansestamme (CCUG 1253)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Miljøisolat (LJP 316)
<i>Pseudomonas fragi</i>	Referansestamme (CCUG 556)
<i>Pseudomonas putida</i>	Referansestamme (CCUG 12690)
<i>Pseudomonas putida</i>	Miljøisolat (LJP 760)
<i>Pseudomonas lundensis</i>	Miljøisolat (LJP 788)
<i>Pseudomonas veronii</i>	Miljøisolat (LJP 895)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Miljøisolat (LJP 312)
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Miljøisolat (LJP 841)
<i>Proteus mirabilis</i>	Referansestamme (CCUG 29299)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Referansestamme (CCUG 13452D)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 41582)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Referansestamme (CCUG 15605)
<i>Staphylococcus epidemisis</i>	Ukjent kilde
<i>Bacillus cereus</i>	Ukjent opphav (NMKL 2007)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 1431)
<i>Serratia marcesens</i>	Ukjent kilde
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Referansestamme (CCUG 1429)
<i>Escherichia coli</i>	Referansestamme (CCUG 38068)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ukjent kilde
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Referansestamme (CCUG 35132)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat (RFM 068)
<i>Leuconostoc lactis</i>	Miljøisolat (RFM 126)
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Miljøisolat (RFM 384)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat (RFM 299)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Miljøisolat (RFM 008)
<i>Weisella hellenica</i>	Miljøisolat (RFM 312)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Miljøisolat (RFM 007)
<i>Lactobacillus sakei</i>	Miljøisolat (RFM 309)

Etter 24 timer ble det målt optisk tetthet (OD) med bølgelengde 600 nm på UV1800 Shimadzu UV Spectrophotometer. Spektrofotometeret ble nullstilt mot en blankprøve med ren TSB buljong. Prøvene ble vortexmikset og det ble pipettert 1 mL fra hvert sentrifugerør over i kyvetter og plassert i spektrofotometeret. De første prøvene fikk OD > 0,6, noe som kan føre til unøyaktig måling av den faktiske tettheten. Det ble antatt at samtlige prøver ville ha for høy tetthet, og de ble derfor fortynnet 1:5 i TSB før avlesning.

4.2 DNA-isolering

For å isolere DNA må celledmassen til bakteriene skilles fra dyrkningsmediet. 1 mL bakteriekultur i TSB ble pipettert til 1,5 mL mikrosentrifugerør. Mikrosentrifugerørene ble sentrifugert ved 8000 rpm i 5 minutter. Ved endt sentrifugering hadde en hvit pellet med celledmasse samlet seg i bunnen av rørene. Supernatanten ble fjernet ved hjelp av pipette og forkastet.

For å isolere DNA fra cellepelletene ble det brukt «Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific). Prosedyre D «Gram-Negative Bacteria Genomic DNA Purification Protocol» ble fulgt for gram negative bakterier, mens prosedyre E «Gram-Positive Bacteria Genomic DNA Purification Protocol» ble benyttet for alle gram positive bakterieisolater. For de gram positive bakteriene ble det benyttet en ekstra lysing med en enzymatisk lysisbuffer. Bufferen inneholdt 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA (pH 8), 1,2 % Triton-X100 og 20 mg/mL lysozyme. Løsningen med det ferdig isolerte DNAet ble satt i kjøleskap for oppbevaring.

4.3 Kvantifisering av DNA

Konsentrasjonen av DNA ble bestemt ved å måle den optiske tettheten (OD) til løsningen, med spektrofotometeret PowerWave XS (BioTek). Det ble benyttet en «Take3»-mikrospot plate fra samme produsent. Spektrofotometeret ble nullstilt mot en blankprøve med fire paralleller «Elution Buffer», fra kitet til DNA-isolering, den samme væsken som DNAet var løst i.

For å måle DNA-konsentrasjon ble det pipettert ut to paralleller á 2 µL av hver prøve. For kvantifisering av dobbeltrådet DNA ble følgende bølgelengder benyttet: 260 nm (DNA), 280 nm (proteiner) og 320 nm som referansebølgelengde. Den tilhørende programvaren, Gen 5

Take 3 Nucleic Acid Quantification, beregner konsentrasjonen av dobbeltrådet DNA i ng/ μ L, samt A260/A280-ratio basert på den målte absorpsjonen.

4.4 Preparering av mastermix til PCR

Det ble tillaget en mastermix (Tabell 3) som besto av «PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)» (Thermo Fisher Scientific), forward primer og reverse primer (begge fra Sigma Aldrich) og nukleasefritt vann (Thermo Fisher Scientific). Det ble blandet en stor mengde av denne reaksjonsløsningen, før 8 μ L ble fordelt i hvert PCR-prøverør og blandet med 2 μ L templat DNA per reaksjon. Optimal mengde templat er 10-100 ng/ μ L genomisk DNA i hver reaksjon (Applied Biosystems, 2016, s. 10). To prøver med DNA, *Carnobacterium maltaromaticum* (RFM 384) og *Carnobacterium divergens* (RFM 008), ble fortynnet 1:2 med nukleasefritt vann for ikke å overskride grensen.

Tabell 3: Innholdet og mengdene i mastermixen.

«Ingrediens»	Volum (1 reaksjon)	Sluttkonsentrasjon
SYBR Green Mastermix (2x)	5 μ L	1x
Forward Primer	0,5 μ L	0,5 μ M
Reverse Primer	0,5 μ L	0,5 μ M
Nukleasefritt vann	2 μ L	
DNA templat (2,80 - 41,45 ng/ μ L)	2 μ L	5,60 - 82,90 ng DNA/reaksjon
Total	10 μL	

4.5 Primere

Det ble benyttet to ulike primerpar (Tabell 4) for å amplifisere sekvenser på 198 og 188 basepar fra det proteinkodende husholdningsgenet *gyrB*. *GyrB* koder for B-underenheten til DNA-gyrase, en type II DNA topoisomerase (Yáñez, Catalán, Apráiz, Figueras, & Martínez-Murcia, 2003).

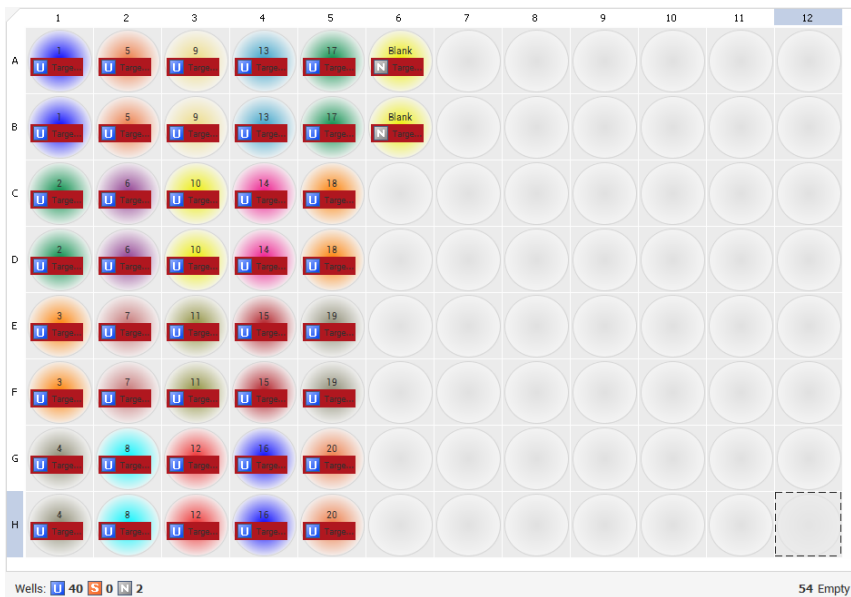
Tabell 4: Primere brukt for å amplifisere deler av *gyrB* genen i *Aeromonas*. Primerparene blir beskrevet som forward (F) og reverse (R) for om de amplifiserer henholdsvis sense- eller antisense-tråden. Produktlengden forteller hvor mange basepar PCR-produktet forventes å ha.

Primer	Sekvens (5' – 3')	Lengde	Produktlengde	Referanse
gyrB_F	GAAGGCCAAGTCGGCCGCCAG	21bp	198bp	(Tacao, et al., 2005)
gyrB_R	ATCTTGGCATCGCCGGGTTTTTC	23bp	198bp	
gyrB7F	GGGGTCTACTGCTTCACCAA	20bp	188bp	(Yáñez et al., 2003)
gyrB9R	ACCTTGACGGAGATAACGGC	20bp	188bp	

4.6 PCR reaksjonsbetingelser

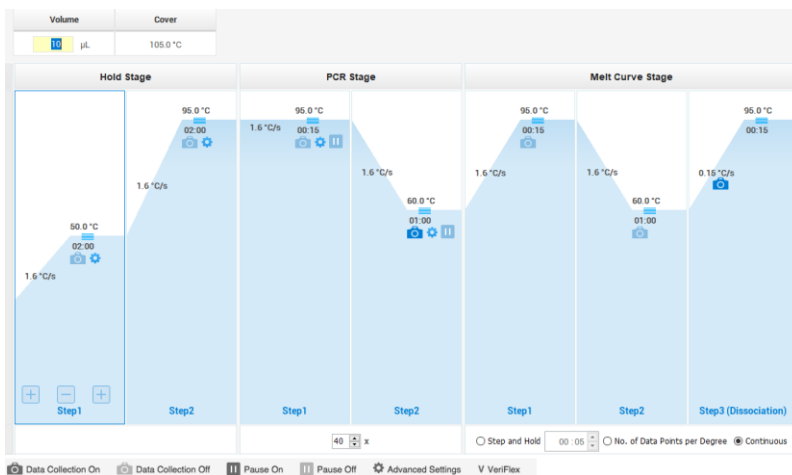
Til PCR-analysen ble det benyttet 0,1 mL PCR-rør i strips (Applied Biosystems™ MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, produktnummer 4358293) og tilhørende lokk (MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips, produktnummer 4323032). Mikrosentrifugerøret med templat DNA ble mikset med vortexmikser før pipettering, for å sørge for en homogen blanding. Alle PCR-analyser ble utført som duplikater i ett oppsett. Nukleasefritt vann ble benyttet som non-template control (NTC) og ble alltid utført som duplikat i ett oppsett. Som positiv kontroll ble det benyttet DNA fra referansestammen *A. hydrophila* (CCUG 14551). PCR-rørene ble sentrifugert ved 4400 rpm i 1 minutt etter at alle brønnene var ferdig fylt, for å samle løsningen i bunnen av brønnene.

På forhånd ble det laget et platedesign (Figur 1) som holdt oversikt over hvilke prøver som ble utført for hver PCR-analyse. Instrumentet som ble benyttet var «QuantStudio 5 Real-Time PCR instrument» (Applied Biosystems) med tilhørende programvare «QuantStudio Design & Analysis Software v. 1.5.1» (Applied Biosystems).



Figur 1: Eksempel på plateoppsett ved en PCR-analyse med duplikater av 20 ulike prøver i ett oppsett, i tillegg til duplikat av NTC.

PCR-instrumentet ble programmert til å ha riktige reaksjonsbetingelser, som temperaturer for denaturering og «annealing», antall sykluser, og temperatur for måling av smeltepunkt for PCR-produktene (Figur 2).



Figur 2: Eksempel på reaksjonsbetingelsene (hold stage, PCR stage og melt curve stage) som ble brukt i ett av forsøkene.

Temperaturen for denaturering ble satt til 95 °C i 15 sekunder for alle de gjennomførte forsøkene. Temperaturen for «annealing-steget» («Step 2» under «PCR-Stage», Figur 2) varierte mellom ulike forsøk (Tabell 5).

Tabell 5: Forsøksoppsett for metodeutvikling av real-time PCR. Primerpar 1 viser til gyrB_F og gyrB_9 og primerpar 2 viser til gyrB7F og gyrB9R.

Forsøksnummer	Primerpar	Annealing temperatur i °C	Stammer	Hensikt/formål
1	1	60	Alle <i>Aeromonas</i>	Undersøke om <i>Aeromonas</i> blir amplifisert
2	1	60	Alle non-targets	Undersøke om non-targets blir amplifisert
3	1	62	5 <i>Aeromonas</i> , alle non-targets	Undersøke om færre non-targets amplifiseres ved høyere temperatur
4	1	64	<i>A. hydrophila</i> , 22 non-targets	Undersøke om færre non-targets amplifiseres ved høyere temperatur
5	1	66	<i>A. hydrophila</i> , alle non-targets	Undersøke om færre non-targets amplifiseres ved høyere temperatur
6	2	60	Alle stammer, unntatt 4 non-targets	Teste et nytt primerpar
7	2	62	<i>A. hydrophila</i> , Alle non-targets som ble amplifisert i forsøk 6	Undersøke om færre non-targets amplifiseres ved høyere temperatur
8	2	64	<i>A. hydrophila</i> . Alle non-targets som ble amplifisert i forsøk 6	Undersøke om færre non-targets amplifiseres ved høyere temperatur
9	2	64	Alle <i>Aeromonas</i> . Alle non-targets som ble amplifisert i forsøk 6	Ikke smeltepunktanalyse med PCR. Videre med gelelektroforese
10	2	64	<i>Aeromonas hydrophila</i> , alle non-targets unntatt to	Fortynningsrekke og standardkurve

Som en del av metodeutviklingen ble annealing-temperaturen variert mellom 60 °C til 66 °C i de ulike forsøkene med primerpar 1 (Tabell 6) og primerpar 2 (Tabell 7). PCR-analysen består av tre ulike steg, hvor det første og siste steget er likt for alle analysene. Det første steget, «Hold Stage», består av to steg med 50 °C i to minutter og 95 °C i to minutter. Smeltekurve er det siste steget, der det videre deles inn i tre steg. Her varierer temperaturen fra 95 °C ned til 60 °C, før den igjen øker til 95 °C. Alle temperaturendringene skjer med en hastighet på 1,6 °C/sek, med unntak av siste steg i smeltekurven, hvor den går fra 60 °C til 95 °C med en hastighet på 0,15 °C/sek.

Tabell 6: Reaksjonsbetingelser for primerpar *gyrB_F* og *gyrB_R* (primerpar 1).

Forsøksnummer	PCR Stage – Denaturering	PCR Stage – Annealing og Extension	Antall sykluser
1	95 °C, 15 sek	60 °C, 1 min	40
2	95 °C, 15 sek	60 °C, 1 min	40
3	95 °C, 15 sek	62 °C, 1 min	40
4	95 °C, 15 sek	64 °C, 1 min	40
5	95 °C, 15 sek	66 °C, 1 min	40

Tabell 7: Reaksjonsbetingelser Primerpar 2 *gyrB_7F* og *gyrB_9R*

Forsøksnummer	PCR Stage - Denaturering	PCR Stage – Annealing og Extension	Antall sykluser
6	95 °C, 15 sek	60 °C, 1 min	40
7	95 °C, 15 sek	62 °C, 1 min	40
8	95 °C, 15 sek	64 °C, 1 min	40
9	95 °C, 15 sek	64 °C, 1 min	35
10	95 °C, 15 sek	64 °C, 1 min	35

4.7 Gelelektroforese

For å verifisere lengden ble PCR-produktene fra ett forsøksoppsett med primerpar 2 analysert med elektroforese i en agarosegel. Alle *Aeromonas*-stammene og 11 non-targets ble analysert. Først ble DNA amplifisert ved 64 °C og 35 sykluser uten smeltepunktanalyse,

og deretter analysert med gelelektroforese. Det var 31 prøver fra PCR-analysen, med to paralleller av hver stamme, men det ble kun analysert én av parallellene.

Det ble laget en 1,2 % agarosegel ved å blande 150 mL 1xTAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA), 1,8 g agarosegel «SeaKem LE Agarose» (Lonza) og 7,5 µL GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) i en 250 mL Erlenmeyerkolbe. Løsningen ble satt i mikrobølgeovn og varmet opp til rett under kokepunktet. Deretter ble kolben avkjølt under rennende vann, før gelen ble helt over i form til støpning. Da gelen stivnet ble den flyttet over til et kar med 1xTAE buffer.

10 µL PCR-produkt ble tilsatt 6,70 µL «Loading buffer» bestående av DNA Gel Loading dye (6x) (Thermo Fisher Scientific) fortynnet 1:2 med nukleasefritt vann. Fra denne blandingen ble 15 µL pipettert over i gelbrønnene. I de ytterste brønnene ble det tilsatt en størrelsesmarkør, GelPilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen). Det ble til slutt koblet strøm lik 400 mA til lokket av karet med en spenning på 90 V i 60 minutter. DNA-fragmentene ble dratt mot den positive polen gjennom den porøse gelen. For å visualisere DNAet ble gelen fotografert med UV-lys i G-Box (SynGene), med programvaren Genesys 1.5.6.0 (SynGene).

4.8 Validering av metode

4.8.1 Effektivitet

For å undersøke metodens effektivitet ble det lagd en fortynningsrekke av DNA isolert fra referansestammen *Aeromonas hydrophila* (CCUG 14551). Konsentrasjonen av bakterier som ble brukt som utgangspunkt ble estimert ved formelen $OD_{600} \times 1.0 = 8 \times 10^8 \text{ kde/mL}$.

Formelen viser til den optiske tettheten til en bakteriekultur målt spektrofotometrisk ved 600 nm. For å lage en 10-fold fortynningsrekke ble det tilsatt 90 µL nukleasefritt vann i alle 1,5 mL mikrosentrifugerørene. I det første fortynningsrøret ble det tilsatt 10 µL DNA. Videre ble det pipettert 10 µL fra forrige fortynning til neste rør, totalt ni ganger.

I brønnene ble det fylt 8 µL mastermiks (reaksjonsløsning) og 2 µL av hver av fortynningene som beskrevet i avsnitt 4.4, «Preparering av masteriks til PCR». Det ble lagd fire paralleller av hver fortynning. PCR-rørene ble sentrifugert på samme måte som beskrevet tidligere. Analysen ble utført med samme reaksjonsbetingelser som tidligere, med 64 °C i annealing-steget.

Ut fra fortynningsrekken ble det utarbeidet en standardkurve hvor lineær regresjon benyttes til å bestemme stigningstallet. Stigningstallet til standardkurven forteller om effektiviteten til amplifisering, og kan finnes ved formelen for effektivitet (Formel 1) (Applied Biosystems, 2014, s. 7).

$$Effektivitet = 10^{\left(-\frac{1}{Stigningstall}\right)} \quad (\text{Formel 1})$$

4.8.2 Spesifisitet og sensitivitet

Spesifisiteten til real-time PCR detektering av *Aeromonas spp.* ble gjort ved å teste så mange bakteriestammer som mulig. Alle *Aeromonas*-stammene som var tilgjengelig ble testet i duplikat med primer gyrB_F og gyrB_R på 60 °C. Ved bytte til primer gyrB7F og gyrB9R ble alle stammene testet på nytt. Ved begge primerparene ble det gjort forsøk på å optimalisere temperaturen, hvor kun referansestamme *A. hydrophila* (CCUG 14551) ble brukt som positiv kontroll. I tillegg ble det utført smeltepunktanalyse for å undersøke smeltetemperaturen til alle PCR-produktene. Videre ble alle *Aeromonas*-prøvene kontrollert ved å bekrefte lengden til PCR-produktet i en gelelektroforese.

For å måle sensitiviteten ble det analysert en fortynningsrekke med target-DNA av referansestamme *A. hydrophila* (CCUG 14551) med fire replikater. Fortynningsrekken ble lagd fra den allerede isolert DNA fra denne stammen, med utgangspunkt i en bakteriekultur, med en estimert konsentrasjon på $7,6 \times 10^8$ kde/ml. Fra denne løsningen ble det fortynnet helt ned til $7,6 \times 10^0$ kde/ml. Prøvene ble fortynnet med nukleasefritt vann. Ved spektrofotometri av referansestammen i TSB, ble det målt en OD på 0,95. Ved bruk av en cellekalkulator for *E. coli* ble det estimert kimtall basert på OD. En OD på 0,95 ble estimert til $7,6 \times 10^8$ kde/mL (LabTools, 2020).

En formel som regner ut falsk positiv/negativ rate gir en indikasjon på positivt/negativt resultat, selv om prøven er klassifisert som negativ/positiv (Formel 2).

$$false\ pos/neg\ rate = \frac{\text{number misclassified known neg/pos samples}}{\text{tot number known neg/pos samples}} \times 100 \% \quad (\text{Formel 2})$$

4.8.3 Metodens repeterbarhet

For å teste metodens repeterbarhet, evnen til å gi samme CT-verdi i uavhengige oppsett, ble det benyttet amplifiseringskurver fra referansestammen *A. hydrophila* (CCUG 14551) som

hadde blitt analysert flest ganger ved samme temperatur (64 °C). Det ble beregnet en gjennomsnittlig CT-verdi og standardavvik basert på fire forsøk.

5 Resultater

5.1 Positiv og negativ kontroll

A. hydrophila (CCUG 14551) ble benyttet som positiv kontroll og nukleasefritt vann ble benyttet som NTC i alle eksperimentelle oppsett. Dersom ikke annet er oppgitt er oppsettene vurdert som pålitelige ved at positiv kontroll ble amplifisert og negativ kontroll ikke ble amplifisert i hvert enkelt forsøk.

5.2 Kvantifisering av bakterievekst og DNA-isolering

Alle *Aeromonas*-stammene vokste i TSB og oppnådde en OD ved 600 nm mellom 0,59 og 1,69 (Tabell 8).

Tabell 8: Optisk tetthet (OD 600 nm) for *Aeromonas*-stammene dyrket i TSB ved 30 °C i 24 timer.

Bakteriestamme	Kilde	OD (600 nm)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Referansestamme (CCUG 14551)	0.95
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (A538)	1.54
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 328)	0.59
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 900)	1.18
<i>Aeromonas caviae</i>	Referansestamme (CCUG 25939)	0.67
<i>Aeromonas caviae</i>	Miljøisolat (A507)	0.99
<i>Aeromonas veronii biovar veronii</i>	Referansestamme (CCUG 27821)	0.46
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	Referansestamme (CCUG 30360)	0.74
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU2)	1.20
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 868)	1.31
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 897)	1.69
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (HLE oyster-58)	1.02
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (SU14-3)	1.17
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (HLE salmon-22)	0.69
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (A539)	0.71
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE sushi-4)	0.70
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE oyster-8)	0.61
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE scallop-44)	0.69
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Miljøisolat (A536)	1.45
<i>Aeromonas piscicola</i>	Miljøisolat (SU58-3)	1.20

Kvantifisering av isolert DNA fra hver stamme ga en konsentrasjon fra 4,45 til 65,40 ng/ μ L, A260/A280 raten ga verdier fra 1,13 til 2,94 (Tabell 9).

Tabell 9: DNA-konsentrasjon og A260/A280 raten til bakteriestammene. Oppgitte verdier er et gjennomsnitt av to paralleller.

Bakteriestamme	Kilde	DNA (ng/ μ L)	A260/A280
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Referansestamme (CCUG 14551)	14.40	1.97
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (A538)	17.61	1.92
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 328)	15.80	1.93
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 900)	27.99	1.73
<i>Aeromonas caviae</i>	Referansestamme (CCUG 25939)	9.09	2.04
<i>Aeromonas caviae</i>	Miljøisolat (A507)	21.42	2.00
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>veronii</i>	Referansestamme (CCUG 27821)	15.54	1.77
<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i>	Referansestamme (CCUG 30360)	14.13	1.59
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU2)	28.29	1.87
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 868)	21.93	1.79
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 897)	41.45	1.82
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (HLE oyster-58)	28.26	1.69
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (SU14-3)	22.74	1.88
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (HLE salmon-22)	15.82	1.82
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (A539)	19.69	1.81
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE sushi-4)	17.27	1.66
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE oyster-8)	16.67	1.98
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE scallop-44)	22.43	1.92
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Miljøisolat (A536)	40.93	1.80
<i>Aeromonas piscicola</i>	Miljøisolat (SU58-3)	19.88	1.74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referansestamme (CCUG 2080)	23.49	1.90
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Referansestamme (CCUG 1253)	6.37	1.92
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Miljøisolat (LJP 316)	17.87	1.78
<i>Pseudomonas fragi</i>	Referansestamme (CCUG 556)	6.02	1.36
<i>Pseudomonas putida</i>	Referansestamme (CCUG 12690)	7.32	2.01
<i>Pseudomonas putida</i>	Miljøisolat (LJP 760)	22.19	1.85

<i>Pseudomonas lundensis</i>	Miljøisolat (LJP 788)	22.55	1.79
<i>Pseudomonas veronii</i>	Miljøisolat (LJP 895)	18.05	1.69
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Miljøisolat (LJP312)	6.82	2.10
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Miljøisolat (LJP 841)	26.78	1.91
<i>Proteus mirabilis</i>	Referansestamme (CCUG 29299)	24.09	1.75
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Referansestamme (CCUG 13452D)	10.72	1.41
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 41582)	5.81	2.64
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Referansestamme (CCUG 15605)	10.45	1.95
<i>Staphylococcus epidemisis</i>	Ukjent kilde	14.76	1.54
<i>Bacillus cereus</i>	Ukjent opphav (NMKL 2007)	33.75	1.87
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 1431)	11.87	2.47
<i>Serratia marcesens</i>	Ukjent kilde	16.07	1.80
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Referansestamme (CCUG 1429)	18.39	1.65
<i>Escherichia coli</i>	Referansestamme (CCUG 38068)	14.39	1.49
<i>Bacillus subtilis</i>	Ukjent kilde	10.35	2.21
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Referansestamme (CCUG 35132)	14.03	1.90
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat (RFM 068)	11.15	1.76
<i>Leuconostoc lactis</i>	Miljøisolat (RFM 126)	4.45	1.13
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Miljøisolat (RFM 384)	65.40	2.22
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat (RFM 299)	7.90	1.84
<i>Carnobacterium divergens</i>	Miljøisolat (RFM 008)	51.56	2.14
<i>Weisella hellenica</i>	Miljøisolat (RFM 312)	6.02	1.36
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Miljøisolat (RFM 007)	3,79	2.94
<i>Lactobacillus sakei</i>	Miljøisolat (RFM 309)	2,80	1.57

For å vurdere hvor effektiv DNA-isolasjonen var, ble OD-verdiene plottet mot DNA-konsentrasjonen for *Aeromonas*-isolatene (Vedlegg 3).

5.3 Testing av primerpar gyrB_F og gyrB_R

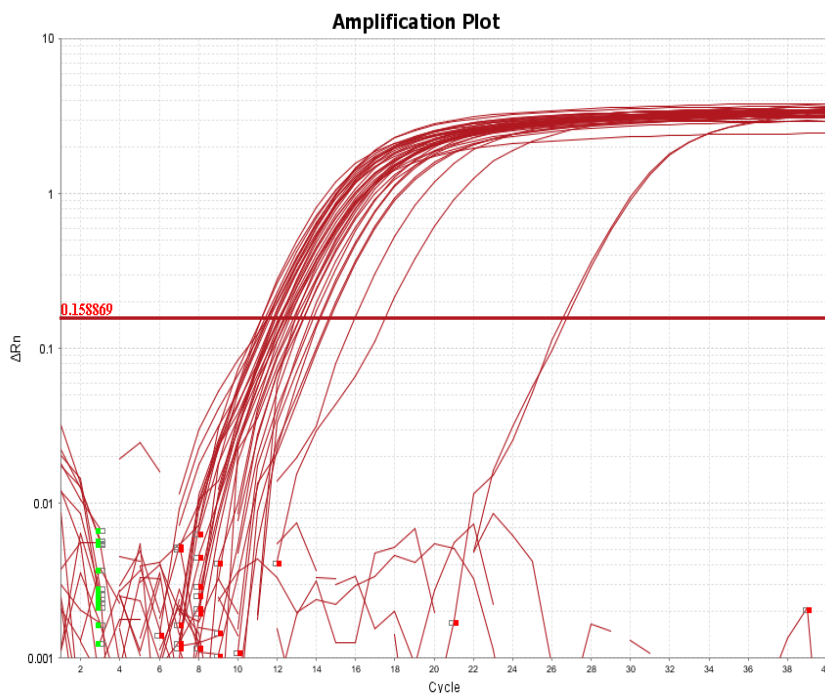
Det ble utført fem ulike forsøk med primerpar gyrB_F og gyrB_R (primerpar 1) med forskjellige reaksjonsbetingelser. CT-verdien til de forskjellige stammene ved amplifisering med primerpar 1 og ulike annealing-temperaturer kan leses av i Vedlegg 1.

5.3.1 Amplifisering av *Aeromonas*-stammer med gyrB_F og gyrB_R og 60 °C annealing

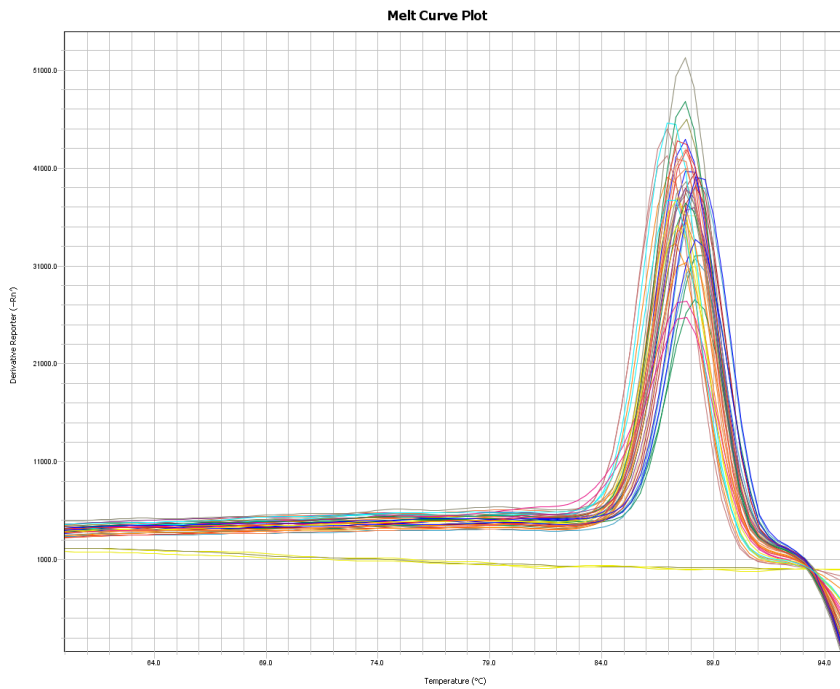
Ved amplifisering av *Aeromonas*-stammene med primerpar 1 og 60 °C annealing ble 20 av 20 stammer amplifisert (Figur 3). Den horisontale linjen på figurene av amplifisering viser til grenseverdien som må nås for å bekrefte amplifisering. CT-verdien (Cycle Threshold) viser til hvilken syklus en prøve hadde da den gikk over grenseverdien. CT-verdiene varierte fra 11,38 til 26,68, med et gjennomsnitt på 13,45.

Aeromonas bestarum (HLE salmon-22) hadde en betydelig høyere CT-verdi enn gjennomsnittet og alle de andre *Aeromonas*-stammene. CT-verdien på 26,68 var nesten 10 sykluser høyere enn den nest høyeste verdien på 16,76.

Smeltepunktanalysen viste en uniform smeltekurve for alle *Aeromonas*-stamme med en topp på ca. 87 °C (Figur 4).



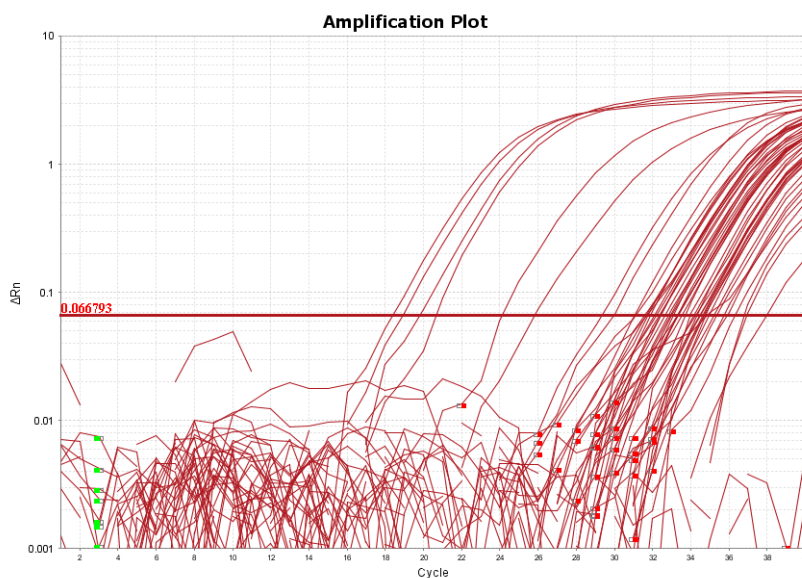
Figur 3: Amplifisering av 20 *Aeromonas*-stammer med gyrB_F og gyrB_R og 60 °C annealing.



Figur 4: Smeltepunktsanalyse for *Aeromonas*-stammene med *gyrB_F* og *gyrB_R* og annealing ved 60 °C. Den gule, rette linjen uten topp er NTC.

5.3.2 Amplifisering av non-targets med *gyrB_F* og *gyrB_R* og 60 °C annealing

Ved amplifisering av alle non-targets med primerpar 1 og 60 °C annealing ble 28 av 30 stammer amplifisert (Figur 5). De to stammene som ikke ble amplifisert var *Brochothrix thermosphacta* (CCUG 35132) og *Lactobacillus sakei* (RFM 309). CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 18,70 til 36,85, med et gjennomsnitt på 32,34.



Figur 5: Amplifisering av 30 non-target stammer med *gyrB_F* og *gyrB_R* og annealing ved 60 °C.

5.3.3 Amplifisering non-targets med gyrB_F og gyrB_R og 62 °C annealing

Ved amplifisering av alle non-targets med primerpar 1 og 62 °C annealing ble 25 av 30 stammer amplifisert. CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 24,32 til 37,14, med et gjennomsnitt på 33,30.

5.3.4 Amplifisering av non-targets med gyrB_F og gyrB_R og 64 °C annealing

Ved amplifisering av non-targets med primerpar 1 og 64 °C annealing ble 22 av 22 stammer amplifisert. Ved denne analysen ble *P. fluorescens* (LJP 316), *P. putida* (LJP 760), *P. veronii* (LJP 895), *Staphylococcus aureus* (CCUG 41582), *Staphylococcus aureus* (CCUG 1431), *Enterobacter aerogenes* (CCUG 1429), *Leuconostoc mesenteroides* (RFM 068) og *Carnobacterium divergens* (RFM 008) utelukket. CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 20,77 til 35,86, med et gjennomsnitt på 32,49.

5.3.5 Amplifisering av non-targets med gyrB_F og gyrB_R og 66 °C annealing

Ved amplifisering av non-targets med primerpar 1 og 66 °C annealing ble 20 av 22 stammer amplifisert. Ved denne analysen ble *P. fluorescens* (LJP 316), *P. putida* (LJP 760), *P. veronii* (LJP 895), *Staphylococcus aureus* (CCUG 41582), *Staphylococcus aureus* (CCUG 1431), *Enterobacter aerogenes* (CCUG 1429), *Leuconostoc mesenteroides* (RFM 068) og *Carnobacterium divergens* (RFM 008) utelukket. CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 24,95 til 37,98, med et gjennomsnitt på 33,21.

5.4 Testing av gyrB7F & gyrB9R

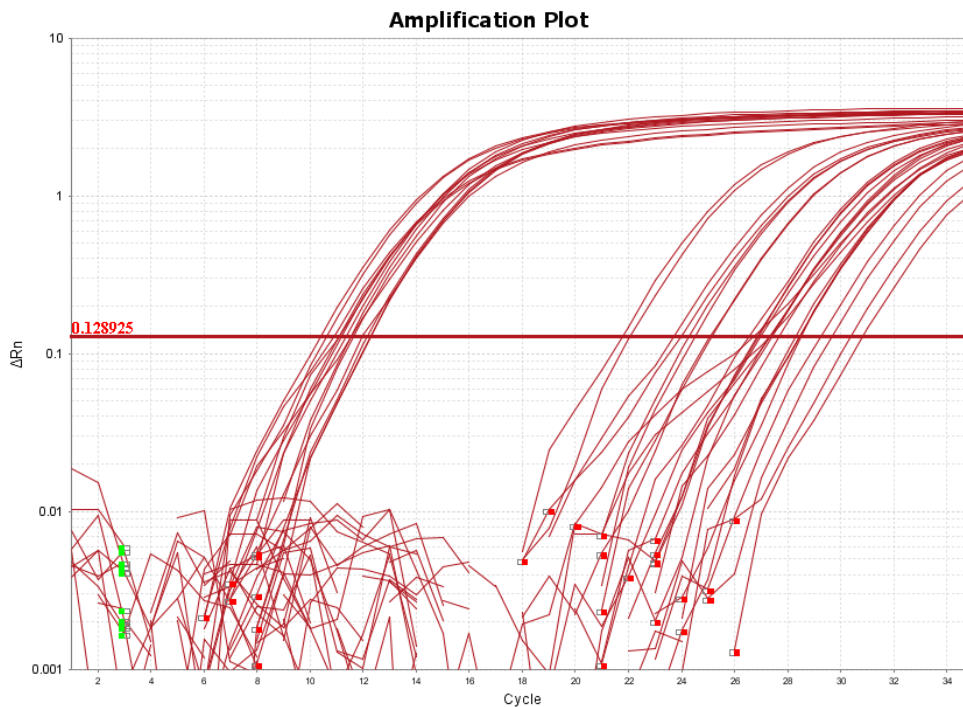
Det ble utført fem ulike forsøk med primerpar gyrB7F og gyrB9R (primerpar 2) med variasjon i temperatur for annealing og antall sykluser. CT-verdien til de forskjellige stammene ved amplifisering med primerpar 2 og ulike annealing-temperaturer kan leses av i Vedlegg 2.

5.4.1 Amplifisering av *Aeromonas*-stammer med gyrB7F og gyrB9R og 60 °C annealing

Ved amplifisering av *Aeromonas*-stammene med primerpar 2 og 60 °C annealing ble 20 av 20 stammer amplifisert. CT-verdiene varierte fra 10,77 til 29,82, med et gjennomsnitt på 20,33.

Smeltepunktanalysen viste en uniform smeltekurve for alle *Aeromonas*-stamme med en topp på ca. 87 °C, men også en liten topp ved 80 °C for noen av prøvene.

5.4.2 Amplifisering av *Aeromonas*-stammer med gyrB7F og gyrB9R og 64 °C annealing
Ved amplifisering av *Aeromonas*-stammene med primerpar 2 og 64 °C annealing ble 20 av 20 stammer amplifisert (Figur 6). CT-verdiene varierte fra 10,51 til 30,62, med et gjennomsnitt på 21,40.



Figur 6: Amplifisering av *Aeromonas*-stammer med gyrB7F og gyrB9R og annealing ved 64 °C.

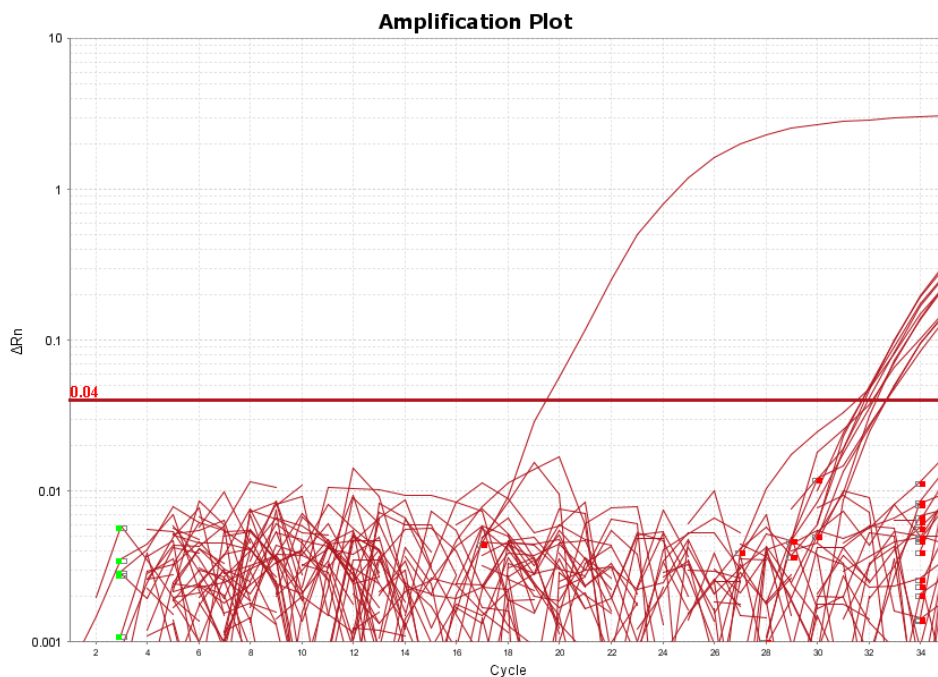
5.4.3 Amplifisering av non-targets med gyrB7F og gyrB9R og 60 °C annealing
Ved amplifisering av non-targets med primerpar 2 og 60 °C annealing ble 10 av 27 stammer amplifisert. Fra denne analysen ble *Staphylococcus aureus* (CCUG 1431), *Leuconostoc mesenteroides* (RFM 299) og *Lactobacillus sakei* (RFM 309) utelukket. CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 28,12 til 34,24, med et gjennomsnitt på 32,49.

5.4.4 Amplifisering av non-targets med gyrB7F og gyrB9R og 62 °C annealing
Ved amplifisering av non-targets med primerpar 2 og 62 °C annealing ble 4 av 11 stammer amplifisert. Stammene som ble amplifisert var *Bacillus subtilis* (ukjent kilde), *Leuconostoc lactis* (RFM 126), *Weishella hellenica* (RFM 312) og *Lactobacillus curvatus* (RFM 007). Stammene som ble utelukket fra analysen var non-target stammene som ikke ble amplifisert ved 60 °C annealing. CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 33,00 til 35,98, med et gjennomsnitt på 34,72.

5.4.5 Amplifisering av non-targets med gyrB7F og gyrB9R og 64 °C annealing

Ved amplifisering av non-targets med primerpar 2 og 64 °C annealing ble 4 av 11 stammer amplifisert. Stammene som ble amplifisert var *Lactobacillus curvatus* (RFM 007), *Weishella hellenica* (RFM 312), *Bacillus cereus* (NMKL 2007) og *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (LJP 312). Stammene som ble utelukket fra denne analysen var non-target stammene som ikke ble amplifisert ved 60 °C annealing. CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 31,83 til 34,21, med et gjennomsnitt på 33,52.

En ny analyse med amplifisering av flere non-targets med primerpar 2 og 64 °C annealing resulterte i at 10 av 30 stammer amplifisert (Figur 7). CT-verdien til de amplifiserte prøvene varierte fra 19,65 til 32,69, med et gjennomsnitt på 32,24.

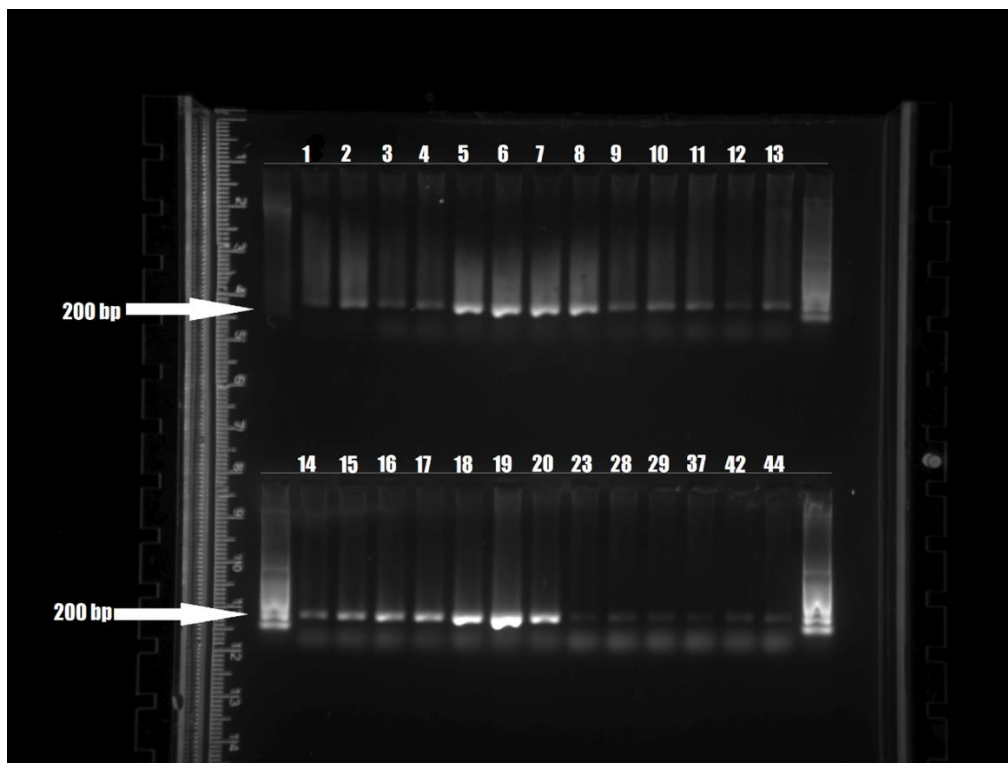


Figur 7: Amplifisering av 30 non-targets med gyrB7F og gyrB9R og annealing ved 64 °C.

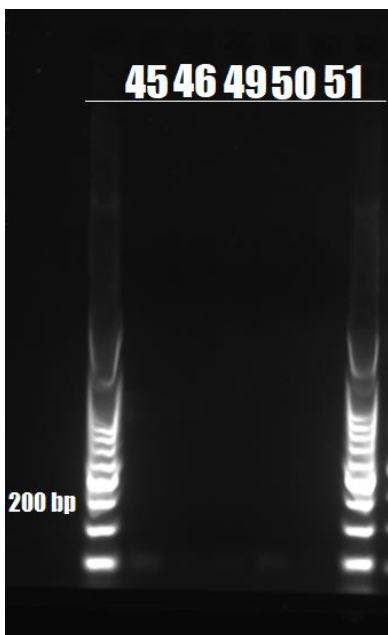
5.5 Verifisering av PCR-produkt

Lengden på ampliconene fra amplifisering med primerpar gyrB7F og gyrB9R (primerpar 2) og 64 °C annealing for 20 *Aeromonas*-stammer og 11 non-targets ble analysert med gelelektroforese. Figur 8 viser UV-bilde av prøvene som ble satt på agarose-gel. Prøvene viser bånd tilsvarende omtrent 200 basepar i lengde.

a)



b)

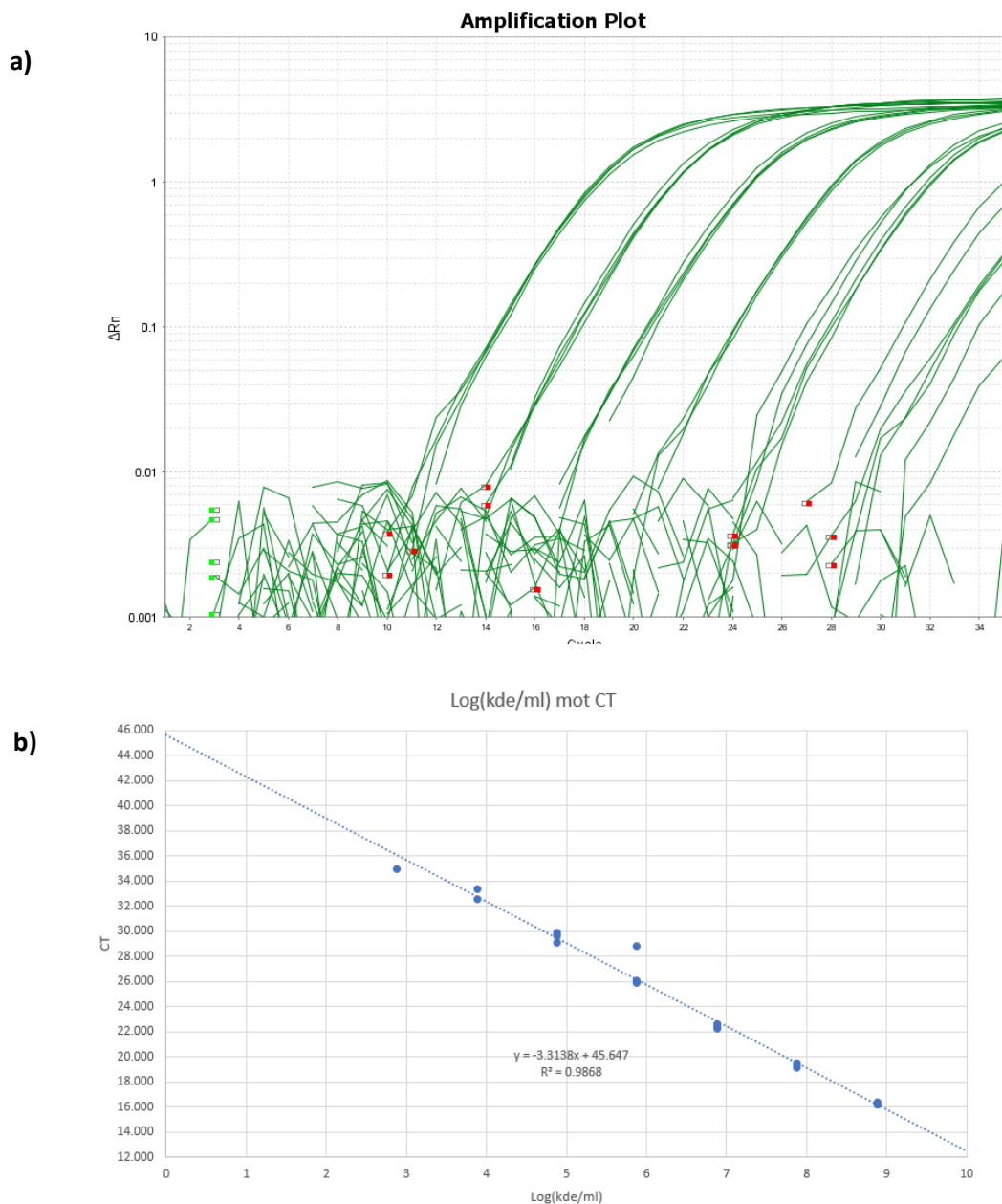


Figur 8: UV-bilde av 20 *Aeromonas*-stammer og 11 non-targets. Brønn merket 1- 20 er *Aeromonas*, og 23-51 er non-targets. **(a)** 20 *Aeromonas*-stammer og seks non-targets. **(b)** fem non-targets.

5.6 Validering av metode

5.6.1 Effektivitet

Det ble plottet en standardkurve med logaritmen til de estimerte kimtallene (kde/mL) for *A. hydrophila* (CCUG 14551) for hver konsentrasjon i fortynningsrekken mot den gjennomsnittlige CT-verdien (Figur 9). Stigningstallet bestemt ved lineær regresjon, ble - 3.31, og korrelasjonskoeffisienten (R^2) lik 0.987. Det gir en teoretisk effektivitet på 100,5 %.



Figur 9: Fortynningsrekke for *Aeromonas hydrophila* (CCUG 14551). **(a)** Amplifisering av fortynningsrekken **(b)** Standardkurve fra CT-verdi til fortynningsrekken mot estimerte kimtall (log kde/ml).

5.6.2 Sensitivitet

4 av 4 paralleller i fortynningsrekken (Figur 9) ble amplifisert i konsentrasjonsområde $7,6 \times 10^8$ til $7,6 \times 10^4$ kde/ml (estimert kimtall basert på målt OD). Den laveste konsentrasjonen hvor alle parallellene ble amplifisert var $7,6 \times 10^4$. Neste konsentrasjon i rekken (estimert til $7,6 \times 10^3$ kde/ml) hadde kun amplifisering av to paralleller. Den parallellen med lavest konsentrasjon av DNA som ble amplifisert var én parallell av $7,6 \times 10^2$, og den fikk en CT-verdi som avviker fra resten av standardkurven. De to laveste konsentrasjonene hadde ingen amplifisering (estimert til $7,6 \times 10^1$ kde/ml og $7,6 \times 10^0$ kde/ml).

5.6.3 Spesifisitet

Ved amplifisering av non-targets med primerpar gyrB7F og gyrB9R (primerpar 2), og 60 °C annealing ble 10 av 30 prøver amplifisert. Det ble antatt at non-targets som ikke ble amplifisert på annealing 60 °C heller ikke ville bli amplifisert på annealing 64 °C. Raten ble regnet ut fra stammene som ble amplifisert i et PCR-forsøk med primer gyrB7F og gyrB9R, og annealing-temperatur på 64 °C. Av de ti bakteriestammene som ble amplifisert ved 60 °C, ble kun fire amplifisert ved 64 °C. De amplifiserte stammene var; *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (LJP 312), *Bacillus cereus* (NMKL 2007), *Weisella hellenica* (RFM 312) og *Lactobacillus curvatus* (RFM 007).

Det ble derfor tatt utgangspunkt i 4 av 30 amplifiseringer for utregning av andel falske positive prøver. Andelen falske positive ble beregnet til 13,3 %.

5.6.4 Repeterbarhet mellom ulike forsøksoppsett

Referansestamme *A. hydrophila* (CCUG 14551) var den prøven som det ble utført flest PCR-analyser av, med annealing 64 °C. I tre forskjellige forsøk med annealing 64 °C og primerpar gyrB7F og gyrB9R, ble de gjennomsnittlige CT-verdiene 12,85, 11,82 og 10,11, som gir et gjennomsnitt over tre forsøk på CT $11,59 \pm 1,13$ (9,75 %).

5.7 Sammenheng mellom DNA-konsentrasjon og CT-verdi

Det ble målt DNA-konsentrasjon i spektrofotometer og verdiene varierte fra 4,45 til 65,40 ng/μL. DNA-konsentrasjonen skal helst ligge mellom 5 ng/μL og 50 ng/μL. Begge ytterpunktene var melkesyrebakterier, *Leuconostoc lactis* (RFM 126) og *Carnobacterium maltaromaticum* (RFM 384). Alle 50 stammer lå innenfor 5-50 ng/μL med unntak av de to ytterpunktene og en melkesyrebakterie til, *Carnobacterium divergens* (RFM 008) med

konsentrasjonen 51,56 ng/ μ L. Plottet (Figur 12) viser CT-verdien til alle prøvene mot DNA-konsentrasjonen, ved tre forsøk med primerpar gyrB7F og gyrB9R, og annealing på henholdsvis 60 °C, 62 °C og 64 °C (Vedlegg 2).

6 Vurdering

6.1 Utvalg av bakteriestammer

Ved utprøving av en *Aeromonas* slektsspesifikk PCR-metode er det viktig å ha et så stort utvalg av mulige targets som mulig. Utvalget av stammer ble valgt ut fra det som var tilgjengelig ved NTNU. Av totalt 36 arter av *Aeromonas spp.* beskrevet hittil i slekten (Fernández-Bravo & Figueras, 2020, s. 1), ble det i denne oppgaven benyttet 20 stammer av *Aeromonas*. De representerer ni ulike arter av *Aeromonas*, med en blanding av innkjøpte referansestammer og stammer som er isolert fra ulike sjømatprodukter (Hoel, Vadstein, & Jakobsen, 2017; Lee et al., 2020).

For non-targets ble det testet 30 stammer, hvor det var representert 26 ulike arter. Mange av non-target stammene er nært beslektet med *Aeromonas spp.*, som *Pseudomonas spp.* (Brenner et al., 2005). Ved å benytte nært beslektede arter gir det en god indikasjon på hvor spesifikk metoden er for å påvise *Aeromonas spp.* Åtte non-target stammer var melkesyrebakterier fra syv ulike arter. Det var omtrent like mange gram positive som gram negative stammer blant non-targets.

6.2 DNA-konsentrasjon og CT-verdi

Startkonsentrasjonen av DNA i en prøve er omvendt proporsjonal med CT-verdien (Oswald, 2020), dermed ble det antatt at det finnes en sammenheng mellom DNA-konsentrasjonen til de ulike bakteriestammene og CT-verdiene de fikk i PCR-reaksjonene. Spesielt *Aeromonas*-stammene bør kunne vise en sammenheng, siden alle skal være passende til å bli amplifisert via *gyrB*-genet, som PCR-reaksjonen er bygd rundt. En like klar sammenheng mellom DNA-konsentrasjonen og CT-verdien til non-targets virker mindre sannsynlig, fordi PCR-reaksjonen er blitt designet til å være spesifikk for *Aeromonas*. Det ble derimot ikke funnet en sammenheng mellom DNA-konsentrasjon og CT-verdi i forsøkene, på tvers av ulike bakteriestammer.

DNA-konsentrasjonen til de ulike stammene varierte fra 4,45 ng/μL til 65,40 ng/μL. En korrelasjonsanalyse mellom DNA-konsentrasjon og CT-verdi viste at de ikke hadde en systematisk sammenheng. For eksempel ble det observert at en lav DNA-konsentrasjon for *Leuconostoc lactis* (RFM 126) (4,45 ng/μL), ikke ga en spesielt høy CT-verdi (32,92) for non-targets. Tilsvarende ble det ikke observert noen sammenheng mellom *Carnobacterium*

maltaromaticum (RFM 384) med en høy DNA-konsentrasjon (65,40 ng/ μ L) og en CT-verdi på 32,97.

6.3 *Aeromonas*-spesifisitet for gyrB_F og gyrB_R

GyrB_F og gyrB_R (primerpar 1) var det første primerparet som ble testet. Studier fra Tacao et al. (2005) viser at primer gyrB_F og gyrB_R er spesifikke for *Aeromonas*. Andre studier som Hoel et al. (2017) og Robertson, Harden, Selvaraju, Pradhan, & Yadav (2014) har også brukt gyrB_F og gyrB_R og benyttet dem som om de var spesifikke for *Aeromonas*. Det proteinkodende husholdningsgenet *gyrB* er et mye brukt gen til å studere slektskap for å identifisere *Aeromonas* da det har vist seg å ha bedre oppløsning enn det mer tradisjonelle 16S rRNA gen (Soler, et al., 2004). GyrB_F og gyrB_R amplifiserte alle *Aeromonas*-stammene slik at de fikk en forholdsvis lav CT-verdi (< 16,76), med unntak av én stamme (*Aeromonas bestarum*, HLE salmon-22) (Figur 3). Videre PCR-reaksjoner viste at primerparet også amplifiserte mange non-targets (Figur 5). Det var et klart skille med to grupperinger av CT-verdi: lav (ca. 11-17) og høy (ca. 30-37), uavhengig av DNA-konsentrasjon. Alle prøvene i gruppering med lav CT var *Aeromonas*-stammer, mens i gruppering for høy CT er det kun non-targets.

Ved annealing 60 °C ble alle *Aeromonas*-stammer og en stor andel non-targets amplifisert. Noe som tyder på at primerparet ikke er spesifikt for *gyrB*-sekvensene til *Aeromonas*, siden de binder seg til de samme *gyrB*-sekvensene hos non-targets. På grunn av den tydelige grupperingen i lav og høy CT-verdi mellom targets og non-targets, kan det tyde på at det ikke er optimale bindingsforhold mellom primere og sekvenser i non-targets. Det ble derfor besluttet å øke annealing-temperaturen for å undersøke om det ga en økning i spesifisiteten til PCR-analysen. Temperaturen for annealing ble økt til 62, 64 og 66 °C over en rekke forsøk. Temperaturøkningen påvirket ikke amplifiseringen til *Aeromonas*, men ga heller ikke ønskede resultater for non-targets. Dette tydet på at primerparet var for lite spesifikt ettersom omtrent like mange non-target stammer, som *Aeromonas*-stammer, ble amplifisert, til tross for høyere CT-verdier hos non-target stammene. Derfor ble valget tatt om å forkaste primerparet og teste et nytt primerpar som allerede var kjøpt inn i forbindelse med et annet forsøk. GyrB7F og gyrB9R (primerpar 2), som er brukt i forbindelse med sekvensering av *gyrB* gen i *Aeromonas spp.* (Yáñez et al., 2003), ble testet videre. Det finnes ikke publiserte studier der primerparet (gyrB7F og gyrB9R) brukes i real-time PCR

metode for påvisning av *Aeromonas spp.*, men det ble besluttet å teste primerne da det første primerparet ikke fungerte som forventet.

6.4 *Aeromonas*-spesifisitet for gyrB7F og gyrB9R

Ved bytte av primerpar til gyrB7F og gyrB9R ble fortsatt 20 av 20 stammer av *Aeromonas spp.* amplifisert ved både 60 °C og 64 °C annealing. Gjennomsnittlig CT-verdi ble henholdsvis 20,33 og 21,40. CT-verdi for amplifisering av *Aeromonas spp.* med primerpar 1 hadde gjennomsnittlig CT-verdi på 13,45. Primerpar gyrB7F og gyrB9R amplifiserer *Aeromonas spp.*, men senere enn primerpar gyrB_F og gyrB_R. Dette tyder på at primerpar 1 (gyrB_F og gyrB_R) amplifiserer *Aeromonas* raskere enn primerpar 2 (gyrB7F og gyrB9R). Bindingen mellom *gyrB*-sekvensen i *Aeromonas* og primerpar 1 er mer optimal enn bindingen med primerpar 2.

Smeltepunktanalysen av *Aeromonas*-stammer ved 60°C annealing viste i tillegg til en smeltetemperatur på 87 °C, en liten topp for noen av prøvene på 80 °C. En jevn smeltekurve tyder på at amplikonene har lik lengde for alle reaksjonene. Den lille toppen kan tyde på en sekundærstruktur hos primerne, såkalte primer-dimers (Wang, et al., 2019). Ekstra topper på smeltekurven betyr dog ikke alltid at det er på primer-dimers til stede. Ettersom resultatene fra gelelektroforesen ikke viste tegn til primer-dimers, og at toppen på 80 °C var relativt lav, ble det vurdert som ubetydelig. Bildene fra gelelektroforesen (Figur 8) viser bånd på de 20 *Aeromonas*-stammene som ble testet, samt for seks non-targets. Prøvene for både *Aeromonas* og non-targets viser kun bånd tilsvarende omtrent 200 basepar i lengde, noe som stemmer godt overens med produktlengden på 188 basepar. PCR-produktene ble dermed verifisert med riktig størrelse.

Ved optimalisering av temperatur fra 60 °C annealing til 62 °C og 64 °C ble kun et utvalg av non-target stammer analysert, som forklart i avsnitt 5.6.3. For både 62 °C og 64 °C annealing var det en forbedring av amplifiseringen hvor kun 4 av 11 stammer ble amplifisert. Videre ble det vurdert hvilken temperatur analysene skulle fortsette med. Ved primerpar 1 viste det seg at amplifisering av non-target forbedret seg ved 64 °C i forhold til 62 °C. Denne erfaringen gjorde at det ble valgt å gå videre med primerpar 2 på 64°C, i stedet for 62 °C. Ved en ny amplifisering av flere stammer ble optimaliseringen bekreftet ved primerpar 2 fra 60 °C til 64 °C. Ved amplifisering av non-targets på 64 °C (Figur 7) var det én parallell av

Lactobacillus sakei (RFM 309) som ble amplifisert. Parallellen fikk en lav CT-verdi på ca. 19 sykluser, og vurderes som en pipetteringsfeil.

6.5 Validering av metode

Selv om primerpar gyrB7F og gyrB9R som ble benyttet til metoden, ikke var optimalt med tanke på spesifisitet, ble det likevel valgt å undersøke et utvalg kvalitetsparametere som kan si noe om metodens ytelse under gitte forhold.

Effektiviteten til reaksjonen kan angis med stigningstallet til en standardkurve.

Standardkurven fikk et stigningstall på -3,31, som gir en effektivitet til amplifiseringen på 100,5 %. En effektivitet på 100,5 % vil si at templat-DNAet dobles for hver syklus og oppgis som et tegn på en god reaksjon (Applied Biosystems, 2014, s. 7). For standardkurven til metoden ble $R^2 = 0,987$. En korrelasjonskoeffisient lik 1 betyr at alle punktene ligger helt på linje. Grunnen til at en lavere R^2 ble oppnådd er delvis at en parallell i fortynningsrekken, ved fortynningen $7,6 \times 10^5$, fikk en betydelig høyere CT-verdi enn de tre andre parallellene ved samme fortynning. Det antas at det skyldes en feil ved pipettering av akkurat denne prøven. Det ble kun testet for én *Aeromonas*-stamme, *A. hydrophila* (CCUG 14551).

Ettersom det ikke er en systematisk sammenheng mellom mengde DNA inn i reaksjonen og oppnådd CT-verdi, kan det være lurt å teste metodens ytelse for flere av de vanligste *Aeromonas*-artene.

Sensitiviteten til metoden kan analyseres ut fra standardkurven. Standardkurven er plottet som Log (kde/ml) mot CT-verdi for hver konsentrasjon i fortynningsrekken. «OD₆₀₀-metoden» er en anerkjent metode for å finne kde/ml, men resultatet anses til å være et relativt unøyaktig estimat. Det er viktig å teste metodens ytelse i et bredt konsentrasjonsområde. Resultatene viser en metode som ikke er veldig sensitiv, med laveste påviste konsentrasjon estimert til log 4.

Referansestamme *A. hydrophila* (CCUG 14551) ble fortynnet i en 10-fold fortynningsrekke. Den amplifiserte parallellen med lavest konsentrasjon av DNA fikk en CT-verdi som avviker fra resten av standardkurven. Det er ikke godt å si hva dette skyldes siden det kun er én prøve, men det kan tyde på enten en pipetteringsfeil, eller det kan være et tegn på at standardkurven begynner å avta i det området. Det vil også bety at skjæringspunktet for standardkurven ikke er et godt estimat for den laveste mulige påvisbare mengden kde/ml.

Ut fra standardkurven defineres deteksjonsgrensen (LOD), som i forsøket viser seg å være i konsentrasjonsområdet 10^4 kde/ml. Men for å si noe sikkert om deteksjonsgrensen burde det blitt fortynnet og lagd en standardkurve minst tre ganger. I denne oppgaven ble det kun lagd én fortynningsserie. Derfor er det ikke nok data til å konstatere deteksjonsgrensen. Ved å fortynne en 6-folds fortynning ville det gitt et kortere intervall mellom hver fortynning og forhåpentligvis flere amplifiseringer på de nedre nivåene.

En korrelasjonsanalyse mellom OD_{600} og DNA-konsentrasjon (Vedlegg 3) viser en relativt god korrelasjon ved $R^2 = 0,934$ som indikerer at DNA-ekstraksjonen har vært jevn for alle bakteriestammene. I tillegg burde selve DNA-isoleringen blitt testet ved å se om DNA-isolering fra for eksempel en 10-fold fortynningsrekke av bakteriekultur ga sammenlignbare resultater.

Alternativt kunne standardkurven blitt plottet ut fra logaritmen til DNA-konsentrasjonen i stedet for estimatet kde/ml. Standardkurven kunne da gitt et estimat for den laveste DNA-konsentrasjonen som er mulig å påvise med metoden. Det ble vurdert som mer hensiktsmessig å relatere CT-verdier til et estimert kimtall i dette forsøket, da metoden er ment for en kvalitativ påvisning (konfirmering av presumptive *Aeromonas* renkulturer).

For å vurdere metodens repeterbarhet mellom uavhengige forsøksoppsett ble det regnet et standardavvik for CT-verdien til *A. hydrophila* (CCUG 14551) over tre forsøk med reaksjonsbetingelsene som er definert i metoden. Et avvik på 9,75 % i oppnådd CT-verdi mellom oppsettene ble vurdert som akseptabelt, men det er sannsynlig at standardavviket kan forbedres med mer trening og erfaring. Tidlig i prosessen ble det bestemt at det kun var én person som skulle foreta alle pipetteringene for å unngå variasjoner, men samtidig er det viktig at en metode er så robust at arbeidet ikke er personavhengig, men kan utføres av alt trent laboratoriepersonell.

Med antagelsen om at non-targets som ikke ble amplifisert ved 60 °C annealing heller ikke ville amplifiseres ved 64 °C annealing, ble det regnet andel falske positive til 13,3 %. Andelen falske positive skal helst være under 5 % for at metoden skal være spesifikk (U.S. Food and Drug Administration, 2020, s. 13). Det ble besluttet å innføre en cut-off verdi, med utgangspunkt i at non-targets med høye CT-verdier ble amplifisert uavhengig av startkonsentrasjon av DNA. En betydelig andel uønskede positive svar kan elimineres med et cut-off. Å velge en cut-off verdi kan argumenteres ut fra hva metoden skal brukes til og

hvilken metode som er ønsket for DNA-isolering. DNA blir isolert fra 1 ml tett kultur som er dyrket opp under optimale forhold i ett døgn. Dersom en raskere metode skal utvikles, som PCR rett fra en koloni på skål, må det testes om de samme valgene kan la seg forsvare med lavere startkonsentrasjon av *Aeromonas*.

Alle prøver som går over cut-off verdien regnes som negative, altså ikke *Aeromonas*, og alle prøver som får en lavere CT-verdi leses som positive. Ved å analysere forsøkene som er utført med primerpar gyrB7F og gyrB9R (primerpar 2) og 64 °C annealing kan et cut-off settes til CT = 30 sykluser. Ved å definere et cut-off i CT-verdi på 30 sykluser vil metoden resultere i færre falske prøvesvar. Ut fra alle forsøkene som er gjennomført vil andelen falske positive bli 2 %, men det vil resultere i én falsk negativ. Andelen falske negative vil øke fra 0 til 4,5 %. Et slik cut-off kan vurderes, tross økningen i falske negative vil det være en drastisk reduksjon av falske positive. Metoden vil med et slikt cut-off bli mer spesifikk, og selv om sensitiviteten reduseres er den fortsatt akseptabel under 5 %.

7 Konklusjon

I denne bacheloroppgaven ble det forsøkt å utvikle og teste en real-time PCR metode for påvisning av bakterier i slekten *Aeromonas* basert på kjente primerpar som var antatt spesifikke for *Aeromonas*. Påvisning av alle *Aeromonas*-stammene fungerte som forventet, uavhengig av primerpar og PCR-betingelser. Det var en utfordring med at hele 83,3 % av non-target stammene ble amplifisert i forsøkene med primerpar gyrB_F og gyrB_R, noe som førte til at primerparet ble forkastet. Forsøk med primerpar gyrB7F og gyrB9R resulterte i kun 2 % falske positive prøvesvar, gitt at det ble brukt en cut-off i CT-verdi på 30 sykluser.

Den korte tiden og utfordringene som oppsto underveis gjorde at det ikke ble utviklet en fullverdig kvalitativ metode. Ut fra de utførte PCR-analysene kan det konkluderes med at å benytte primerpar gyrB7F og gyrB9R med en annealing ved 64 °C og 35 sykluser, med et cut-off på 30 sykluser kan være en metode for å påvise presumptive *Aeromonas* isolert ved utplating på selektiv agar. Videre undersøkelser med andre primerpar og/eller ulike konsentrasjoner av primerne er nødvendig for å utarbeide en standardisert metode for kvalitativ påvisning av *Aeromonas spp.*

8 Referanseliste

- Applied Biosystems. (2014). *Real-time PCR handbook*. Life technologies.
- Applied Biosystems. (2016). *PowerUp SYBR Green Master Mix*. Carlsbad: ThermoFisher Scientific.
- Applied Biosystems. (u.å.). *Essentials of Real Time PCR*.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J., Smith, J. A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Awan, F., Dong, Y., Wang, N., Liu, J., Ma, K., & Liu, Y. (2018). The fight for invincibility: Environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Two The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria*. East Lansing: Springer.
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., . . . Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in food science & technology*, ss. 115-126.
- Corry, J. E., Gordon, C. D., & Rosamund, B. M. (2012). *Culture Media for the Isolation of Aeromonas spp. and Plesiomonas shigelloides*. Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology: Edition 3.
- Corthell, J. T. (2014). *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*. Academic Press.
- Daskalov, H. (2006). *The importance of Aeromonas hydrophila in food safety*. *Food Control* 17 (2006) 474-483.
- Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. (2020). *An Update on the Genus Aeromonas: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity*. Microorganisms.
- FHI. (2019, Juli 20). *Folkehelseinstituttet*. Hentet fra *Aeromonas- og Plesiomonasinfeksjoner - veileder for helsepersonell*.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010, August 2). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*.
- Fykse, E. M., Olsen, J. S., & Skogan, G. (2004). *Påvisning av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR*. Kjeller: Forsvarets forskningsinstitutt.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning*. Cappelen Damm.
- Grim, C. J. (2013). *Foodborne Infections and Intoxications. Chapter 14 Aeromonas and Plesiomonas*. Food Science and Technology.
- Hem, L. J., Wennberg, A. C., Thorvaldsen, G., & Skaar, I. (2013). Biofilmdannelse i VAVs ledningsnett med nye Oset vannbehandlingsanlegg. *Niva - Norwegian Institute for Water Research*, ss. 230-238.
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2017). Species Distribution and Prevalence of Putative Virulence Factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from Fresh Retail Sushi. *Frontiers in microbiology, Vol.8*, s. 931.

- Hokstad, I. (2021, Februar 22). Elektroforese. *Den norske legeforening*.
- Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U., Agdasi, F., Tom, M., & Okoh, A. I. (2012). *Emerging Aeromonas Species Infections and Their Significance in Public Health*. P. Cos.
- Isonhood, J. H., & Drake, M. (2002). *Aeromonas species in food*. Journal of Food Protection.
- Jakobsen, A. N., Shumilina, E., Lied, H., & Hoel, S. (2020). *Growth and spoilage metabolites production of a mesophilic Aeromonas salmonicida strain in Atlantic salmon (Salmo salar L.) during cold storage in modified atmosphere*. sfam.
- Labora. (u.d.). *Laboratorieanalyser*. Hentet fra PCR - den mest effektive metoden på markedet: <https://labora.no/laboratorieanalyser/pcr/>
- LabTools. (2020). *Bacterial cell number OD600*. Hentet fra LabTools.us: <http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/od600/>
- Lee, H. J., Hoel, S., Lunestad, B. T., Lerfall, J., & Jakobsen, A. N. (2020). *Aeromonas spp. isolated from ready-to-eat seafood on the Norwegian market: prevalence, putative virulence factors and antimicrobial resistance*. sfam.
- Levin, R. E. (2014). *Micobiological safety of meat*. Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition).
- Loftus, S. (u.d.). *National Human Genome Research Institute*. Hentet fra Primer: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Primer>
- Martin-Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2005). Aeromonadales ord. nov. I *Bergey's Manual og Systematic Bacteriology* (ss. 556-587). Springer, Boston, MA.
- NMKL NordVal International. (2004). *Mesophilic Aeromonas species. Determination in foods and feeds*.
- Oswald, N. (2020, November 17). *BiteSizeBio*. Hentet fra What is a Cq (Ct) Value?: <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Chapter three - Aeromonas. I S. L. Percival, D. W. Williams, N. F. Gray, M. V. Yates, & R. M. Chalmers, *Microbiology of Waterborne Diseases* (ss. 49-64). Academic Press.
- Robertson, B. K., Harden, C., Selvaraju, S. B., Pradhan, S., & Yadav, J. S. (2014). *Molecular Detection, Quantification, and Toxigenicity Profiling of Aeromonas spp. in Source- and Drinking-Water*. The Open Microbiology Journal.
- Soler, L., Yáñez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalan, V., Figueras, M. J., & Martinez-Murcia, A. J. (2004, September 1). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Volume 54, Issue 5.
- Stratev, D., & Odeyemi, O. A. (2015). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources. *Journal of Infection and Public Health*, 535-544.
- Tacao, M., Moura, A., Alves, A., Henriques, I., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2005). Evaluation of 16S rDNA- and gyrB-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters* 246, ss. 11-18.

- Tang, Y.-W., Liu, D., Schwartzman, J., Sussman, M., & Poxton, I. (2015). *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press.
- Teunis, P., & Figueras, M. J. (2016). *Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic Aeromonas Species*. National Library of Medicine.
- Thermo Fisher Scientific. (2012a). *Components of the Reaction Mixture*.
- Thermo fisher Scientific. (2012b). *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. Wilmington, Delaware USA: Thermo Scientific NanoDrop Products.
- Thermo Fisher Scientific. (2019). *PCR Primer Design Tips*.
- U.S. Food and Drug Administration. (2020, Oktober). Guidelines for the validation of analytical methods for nucleic acid sequence-based analysis of food, feed, cosmetics and veterinary products.
- Wang, L., Zhao, P., Si, X., Li, J., Dai, X., Zhang, K., . . . Dong, J. (2019). Rapid and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* With an Isothermal Amplification and Lateral Flow Strip Combined Method That Eliminates False-Positive Signals From Primer-Dimers. *Frontiers in microbiology*, Vol.10, s. 2959.
- Whittwer, C., Herrmann, M., Moss, A., & Rasmussen, R. (1997). *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. BioTechniques.
- Yáñez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J., & Martínez-Murcia, A. J. (2003, Mai 1). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.

Vedlegg

Vedlegg 1

Oversikt over DNA-konsentrasjon for bakteriestammene og CT-verdier ved ulike anealing-temperatur, for primerpar gyrB_F og gyrB_R.

Gule felt markerer at stammen ikke ble analysert. Grønne felt med «x» markerer at stammen ble analysert, men ikke amplifisert.

Bakteriestamme	Kilde	CT 60 °C	CT 62 °C	CT 64 °C	CT 66 °C
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Referansestamme (CCUG 14551)	13.34	12.07	11.16	11.31
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (A538)	12.30			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP328)	13.69			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 900)	12.57			
<i>Aeromonas caviae</i>	Referansestamme (CCUG 25939)	16.74	18.01		
<i>Aeromonas caviae</i>	Miljøisolat (A507)	14.68			
<i>Aeromonas veronii biovar veronii</i>	Referansestamme (CCUG 27821)	13.25	12.31		
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	Referansestamme (CCUG 30360)	12.49			
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU2)	11.35	10.97		
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 868)	12.95			
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 897)	11.41			
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (HLE oyster-58)	11.58			
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (SU14-3)	12.08	10.67		
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (HLE salmon-22)	26.68			
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (A539)	11.69			
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE sushi-4)	13.99			
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE	12.17			

	oyster-8)				
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE scallop-44)	12.14			
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Miljøisolat (A536)	12.23			
<i>Aeromonas piscicola</i>	Miljøisolat (SU58-3)	11.59			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referansestamme (CCUG 2080)	36.85	35.36	35.86	37.98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Referansestamme (CCUG 1253)	18.70	27.63	25.90	31.81
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Miljøisolat (LJP 316)	33.45	36.54		
<i>Pseudomonas fragi</i>	Referansestamme (CCUG 556)	25.03	29.14	28.35	33.03
<i>Pseudomonas putida</i>	Referansestamme (CCUG 12690)	20.22	24.32	20.77	24.95
<i>Pseudomonas putida</i>	Miljøisolat (LJP 760)	32.13	35.69		
<i>Pseudomonas lundensis</i>	Miljøisolat (LJP 788)	32.10	37.14	35.60	36.98
<i>Pseudomonas veronii</i>	Miljøisolat (LJP 895)	32.35	x		
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Miljøisolat (LJP312)	35.86	35.28	35.38	33.07
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Miljøisolat (LJP 841)	32.16	35.23	34.37	34.63
<i>Proteus mirabilis</i>	Referansestamme (CCUG 29299)	33.89	34.41	33.80	33.03
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Referansestamme (CCUG 13452D)	33.29	33.17	33.81	34.63
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 41582)	35.80	x		
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Referansestamme (CCUG 15605)	33.49	33.99	33.15	32.55
<i>Staphylococcus epidemisis</i>	Ukjent kilde	30.85	33.01	35.09	33.64
<i>Bacillus cereus</i>	Ukjent opphav (NMKL2007)	32.74	32.12	31.85	32.39
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCUG 1431	34.72	x		
<i>Serratia marcesens</i>	Ukjent kilde	32.31	36.20	33.01	32.66

<i>Enterobacter aerogenes</i>	Referansestamme (CCUG 1429)	33.49	x		
<i>Escherichia coli</i>	Referansestamme (CCUG 38068)	29.42	32.34	30.55	35.20
<i>Bacillus subtilis</i>	Ukjent kilde	35.88	33.60	33.07	33.61
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Referansestamme (CCUG 35132)	x	33.88	34.74	32.34
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat RFM 068	34.89	x		
<i>Leuconostoc lactis</i>	Miljøisolat (RFM 126)	33.16	32.95	34.36	33.83
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Miljøisolat (RFM 384)	34.65	35.44	34.25	x
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat RFM299	34.92	33.04	33.26	33.15
<i>Carnobacterium divergens</i>	Miljøisolat (RFM 008)	34.72	31.47		
<i>Weissella hellenica</i>	Miljøisolat (RFM 312)	33.40	33.44	31.97	32.44
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Miljøisolat (RFM 007)	34.99	33.03	31.65	32.27
<i>Lactobacillus sakei</i>	Miljøisolat (RFM 309)	x	34.19	33.99	x

Vedlegg 2

Oversikt over DNA-konsentrasjon for bakteriestammene og CT-verdier ved ulike annealing-temperatur, for primerpar gyrB7F og gyrB9R.

Gule felt markerer at stammen ikke ble analysert. Grønne felt med «x» markerer at stammen ble analysert, men ikke amplifisert.

Bakteriestamme	Kilde	DNA-konsentrasjon	CT 60 °C	CT 62 °C	CT 64 °C
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Referansestamme (CCUG 14551)	14.40	11.50	12.85	10.51
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (A538)	17.61	10.98		10.96
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP328)	15.80	19.99		11.11
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (LJP 900)	27.99	27.39		11.44
<i>Aeromonas caviae</i>	Referansestamme (CCUG 25939)	9.09	11.51		11.82
<i>Aeromonas caviae</i>	Miljøisolat (A507)	21.42	10.77		11.89
<i>Aeromonas veronii biovar veronii</i>	Referansestamme (CCUG 27821)	15.54	11.73		12.25
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	Referansestamme (CCUG 30360)	14.13	10.89		21.93
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU2)	28.29	25.43		23.83
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 868)	21.93	27.05		24.41
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (LJP 897)	41.45	26.58		25.15
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (HLE oyster-58)	28.26	29.82		26.80
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (SU14-3)	22.74	27.33		26.87
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (HLE salmon-22)	15.82	29.10		27.06
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (A539)	19.69	23.15		27.38
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE sushi-4)	17.27	23.36		27.52
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE oyster-8)	16.67	23.02		28.39

<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (HLE scallop-44)	22.43	21.39		28.47
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Miljøisolat (A536)	40.93	12.07		29.49
<i>Aeromonas piscicola</i>	Miljøisolat (SU58-3)	19.88	23.63		30.62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referansestamme (CCUG 2080)	23.49	x		x
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Referansestamme (CCUG 1253)	6.37	x		x
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Miljøisolat (LJP 316)	17.87	33.05	x	31.64
<i>Pseudomonas fragi</i>	Referansestamme (CCUG 556)	6.02	x		32.63
<i>Pseudomonas putida</i>	Referansestamme (CCUG 12690)	7.32	x		x
<i>Pseudomonas putida</i>	Miljøisolat (LJP 760)	22.19	x		x
<i>Pseudomonas lundensis</i>	Miljøisolat (LJP 788)	22.55	x		x
<i>Pseudomonas veronii</i>	Miljøisolat (LJP 895)	18.05	28.12	x	32.19
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Miljøisolat (LJP312)	6.82	31.44	x	x
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Miljøisolat (LJP 841)	26.78	x		x
<i>Proteus mirabilis</i>	Referansestamme (CCUG 29299)	24.09	x		32.01
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Referansestamme (CCUG 13452D)	10.72	x		x
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 41582)	5.81	x		x
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Referansestamme (CCUG 15605)	10.45	x		x
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ukjent kilde	14.76	x		x
<i>Bacillus cereus</i>	Ukjent opphav (NMKL2007)	33.75	34.24	x	32.02
<i>Staphylococcus aureus</i>	Referansestamme (CCUG 1431)	11.87			
<i>Serratia marcesens</i>	Ukjent kilde	16.07	x		32.00

<i>Enterobacter aerogenes</i>	Referansestamme (CCUG 1429)	18.39	x		x
<i>Escherichia coli</i>	Referansestamme (CCUG 38068)	14.39	x		x
<i>Bacillus subtilis</i>	Ukjent kilde	10.35	31.53	35.98	31.80
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Referansestamme (CCUG 35132)	14.03	x		32.60
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat RFM 068	11.15	33.20	x	x
<i>Leuconostoc lactis</i>	Miljøisolat (RFM 126)	4.45	32.92	34.93	32.69
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Miljøisolat (RFM 384)	32.70	32.97	x	x
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Miljøisolat RFM299	7.90			
<i>Carnobacterium divergens</i>	Miljøisolat (RFM 008)	25.78	x		x
<i>Weisella hellenica</i>	Miljøisolat (RFM 312)	6.02	33.89	32.98	x
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Miljøisolat (RFM 007)	3.79	33.55	34.98	x
<i>Lactobacillus sakei</i>	Miljøisolat (RFM 309)	2.80		x	19.65

Vedlegg 3

DNA-konsentrasjonen (ng/ μ l) plottet mot OD₆₀₀ for *Aeromonas*-isolatene.

