



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

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

Etablering av Real-Time PCR for deteksjon av
Cutibacterium acnes

Establishment of Real-Time PCR for detection of
Cutibacterium acnes

Av / by

Marita Kupaen
Katrine Weilin Fredheim

Trondheim, 2021

Forord

Dette bachelorprosjektet ble gitt av avdeling for Medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital, og er et avsluttende prosjekt på bioingeniørutdanningen ved NTNU i Trondheim. Oppgaven ble utført i perioden mars til mai 2021.

Vi ønsker spesielt å rette en takk til spesialbioingeniør Sidsel Krokstad, fagansvarlig bioingeniør An-Magritt Stjern Flakne og overlege Kåre Bergh for praktisk og teoretisk bistand gjennom hele perioden. Vi ønsker også å takke professor Liv Thommesen for sitt engasjement og veiledning i den skriftlige delen av oppgaven.

Til slutt ønsker vi å rette en takk til AMM for deres gjestfrihet, og for tilgang til laboratorieutstyr og lokaler. Bachelorperioden har vært lærerik og spennende, og vi er svært takknemlige for å ha fått muligheten til å gjennomføre oppgaven ved AMM.

Sammendrag

Cutibacterium acnes er en gram positiv, anaerob stavbakterie som inngår i hudens normalflora.

Bakterien kan være årsak til postoperative infeksjoner, da bakterien fester seg til proteser og kirurgisk utstyr. Per i dag benyttes sekvensering og dyrkning til diagnostikk av *Cutibacterium acnes*. Dette er to tidkrevende metoder sammenlignet med real time-PCR, og det var derfor ønskelig å utvikle en hurtigere og spesifikk real-time PCR for deteksjon av *Cutibacterium acnes*.

For etablering av metoden ble et område på 16S rRNA-genet, i region V1-V2, benyttet for fastsettelse av probe- og primersekvenser. Primere ble levert fra leverandørene Invitrogen og TIB Molbiol. Det ble benyttet prober fra henholdsvis TIB Molbiol og Applied Biosystems UK, og kombinasjoner av primere og prober ble undersøkt i tre ulike metodeoppsett;

- Metodeoppsett 1: Primere og TaqMan probe fra TIB Molbiol
- Metodeoppsett 2: Primere fra Invitrogen og TaqMan probe fra Applied Biosystems.
- Metodeoppsett 3: Primere fra Invitrogen og TaqMan MGB probe fra Applied Biosystems.

Positiv kontroll ble hentet fra renkultur etter oppvekst fra pasientmateriale, hvor bakterien i forkant var blitt identifisert ved bruk av MALDI-TOF massespektrofotometri. For utprøvingen har det blitt benyttet 41 kliniske prøver.

Det ble utført blant annet gradientanalyse for temperaturoptimalisering, effektivitets-, spesifisitets- og sensitivitetsanalyse foruten kontroll av PCR-produkt ved kapillærelektroforese, og bestemmelse av metodens deteksjonsgrense. *Cutibacterium acnes* er kjent for å være til stede i luft og øvrig miljø. Det ble tidlig avdekket at kontaminasjon ikke kunne unngås, men måtte tas høyde for ved vurdering av resultatene. Vi fant at Metodeoppsett 3 viste god spesifisitet, en PCR-effektivitet på tilnærmet 100% og en akseptabel sensitivitet med en deteksjonsgrense på 171,2 kopier/PCR. Basert på våre resultater ble det konkludert med at Metodeoppsett 3 kan tas i bruk ved AMM. Det anbefales imidlertid ytterligere validering av Metodeoppsett 3 før det tas i bruk.

Abstract

Cutibacterium acnes is a gram positive, anaerobic rod-shaped bacterium which is normally present in human skin. The bacteria can cause post-operative complications, primarily by attaching to prostheses and surgical equipment. Today *Cutibacterium acnes* is identified by either cultivation or sequencing. Both methods are time consuming compared to a real-time PCR method. Thus, the aim of this study was to establish a specific real-time PCR method for detection of *Cutibacterium acnes*.

The target gene used to detect *Cutibacterium acnes* was localized in region V1-V2 on the 16S rRNA-gene. Primers were ordered from Invitrogen and TIB Molbiol. TaqMan-probes were ordered from TIB Molbiol and Applied Biosystems UK. The primers and probes were combined and constituted three different methodological setups:

- Setup 1: Primers and TaqMan-probe from TIB Molbiol
- Setup 2: Primers from Invitrogen and TaqMan-probe from Applied Biosystems.
- Setup 3: Primers from Invitrogen and TaqMan MGB-probe from Applied Biosystems.

The positive control was gathered from a bacterial culture containing *Cutibacterium acnes*. The culture originated from a patient sample and was identified by using MALDI-TOF mass spectrometry. 41 clinical specimens were examined.

The establishment of a new PCR-method includes a gradient analysis for temperature optimization, analysis of efficiency, specificity and sensitivity, control of obtained PCR-product by using capillary electrophoresis, and determination of the detection borderline. *Cutibacterium acnes* is known to be present in the environment. It was early discovered that the assays were contaminated by *Cutibacterium acnes*, and this had to be considered when the results were evaluated. Our results showed that Setup 3 is the most prominent for detection of *Cutibacterium acnes*. The assay is specific, has an efficiency of approximately 100% and an acceptable sensitivity. The detection borderline was found to be 171,2 copies/PCR. Based on our results, it was concluded that Setup 3 can be used for medical diagnostics. However, further validation of Assay 3 is recommended before use.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract.....	iii
1 Innledning.....	1
1.1 Cutibacterium acnes	1
1.2 16S ribosomalt RNA	2
1.3 Polymerase Chain Reaction.....	3
1.4 Taqman probe.....	5
1.5 Deteksjon med SYBR Green.....	6
1.6 Kapillærelektroforese	7
1.7 Oppgavens hensikt	8
2 Materiale og metode	9
2.1 Prøvemateriale og pasientprøver	9
2.2 Valg av primer- og probesekvenser.....	9
2.3 Kontroller	10
2.4 Forbehandling og ekstraksjon av nukleinsyrer.....	11
2.5 Reaksjonsblanding til PCR.....	12
2.6 Kontroll av PCR-produkt	13
3 Resultater	15
3.1 Utpøving av de ulike metodeoppsettene	15
3.2 Kontroll av første utpøving med kapillærelektroforese	17
3.3 Temperaturoptimalisering for Metodeoppsettene 1, 2 og 3	19
3.4 Effektivitetsanalyse	22
3.5 Temperaturoptimalisering for Metodeoppsett 3.....	23
3.6 Spesifisitetsanalyse.....	24
3.7 Analysens robusthet	25
3.8 Sensitivitet: Sammenligning med etablert metode.....	25

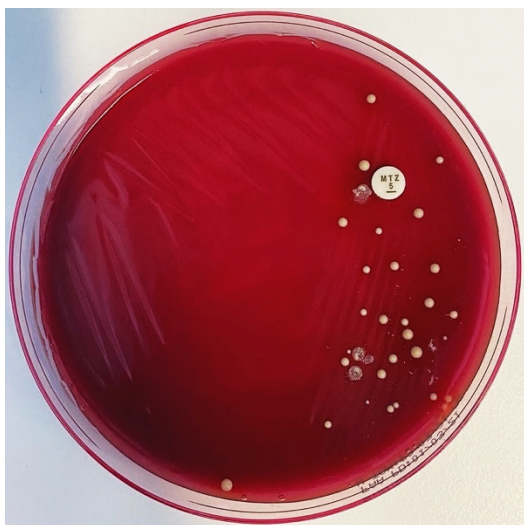
3.9 Kontaminering i reagenser	26
3.10 Analyse av tilfeldige utvalgte 16S-prøver.....	28
3.11 Analyse av pasientprøve med oppvekst av <i>Cutibacterium acnes</i>	32
3.12 Bestemmelse av deteksjonsgrense.....	33
4 Diskusjon	36
Referanseliste.....	38
Vedlegg.....	40

1 Innledning

1.1 *Cutibacterium acnes*

Cutibacterium (tidligere kjent som *Propionibacterium*) er en slekt under familien *Propionibacteriaceae*. *Cutibacterium acnes* er en fakultativ anaerob, gram positiv stavbakterie. Bakterien forekommer naturlig i huden og inngår i normalfloraen i kroppen. *Cutibacterium acnes* er blant bakteriene som er i stand til å gi akne, en tilstand hvor talgkjertlene i kroppen blir betente. *Cutibacterium acnes* er samtidig viktig for sunn hud, da bakterien koloniserer talgkjertler i huden og utkonkurrerer øvrige bakterier på huden. Når bakterien bryter ned talg i talgkjertlene, dannes frie fettsyrer som skilles ut gjennom talgkjertlene. Fettsyrene sørger for å gi et surere miljø på huden, noe som vil fungere inhiberende på patogene mikrober slik som *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes*, samtidig som det gir rette betingelser for den apatogene normalfloraen (1).

In vitro vokser *Cutibacterium acnes* best i anaerobt miljø. Optimal oppvekst skjer ved ca. 35°C på Fastidious Anaerobe Agar (FAA) og i anaerob buljong. De vanligste prøvematerialene med oppvekst av *Cutibacterium acnes* er vevsprøver, hvor det varierer om funnet er reelt eller et resultat av forurensning. Vanligvis tar det tre til fem dager før oppvekst kan observeres på dyrkningsmediene, men det kan ta opptil 14 dager å observere oppvekst dersom prøvematerialet er fra en protese eller et annet fremmedlegeme. Oppvekst av *Cutibacterium acnes* vil først mistenkes grunnet karakteristisk vekstmorfologi. Bakterien vokser som store, gule, kuppelformede kolonier, visualisert i Figur 1. Bakterien er også resistent ovenfor antibiotikumet Metronidazole. Bakterien identifiseres i dag ved hjelp av MALDI-TOF massespektrometri eller ved hjelp av sekvensering.

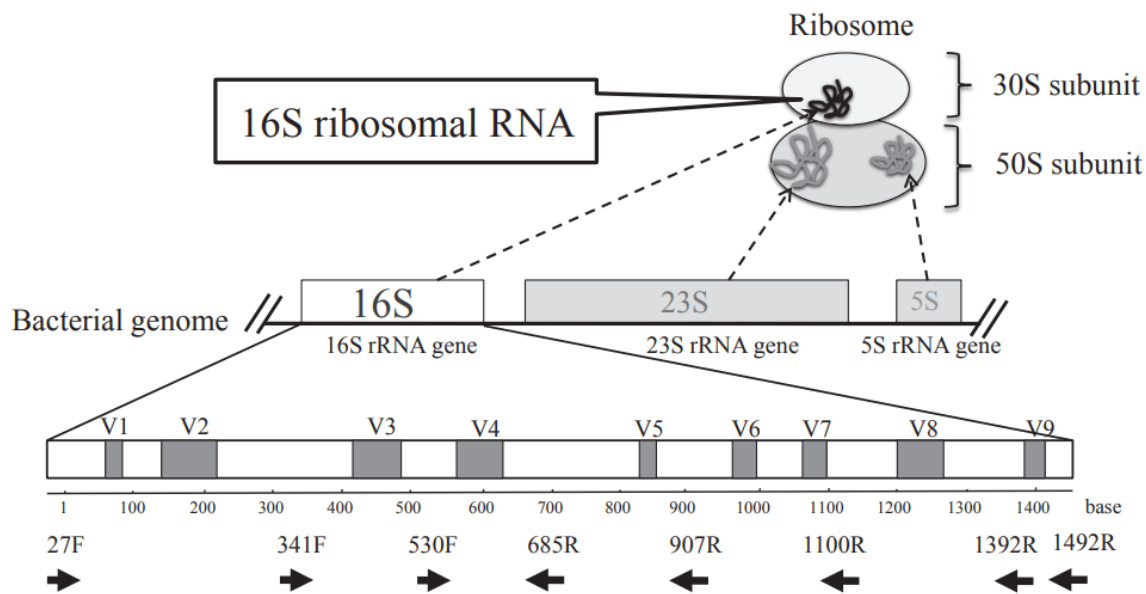


Figur 1: Oppvekst av *Cutibacterium acnes* på FAA med 5 mg metronidazole

Cutibacterium acnes er normalt ikke en patogen bakterie og fører ikke til infeksjoner under normale omstendigheter. Selv om bakterien inngår i normalfloraen, kan den likevel bli opportunistisk patogen. Dette vil si at bakterien kan gi opphav til sykdom dersom den får endrede miljø og omstendigheter. Bakterien har egenskapen til å feste seg til proteser og kirurgisk utstyr, og kan derfor føre til postoperative komplikasjoner, hvor protesene kan løsne over tid. *Cutibacterium acnes* er derfor assosiert med postoperative infeksjoner og kroniske sykdommer (2). *Cutibacterium acnes* anses å være en lavvirulent bakterie. Dette vil si at bakterien gir mindre betennelsesreaksjoner sammenlignet med andre bakterier, slik som *Staphylococcus aureus* og gruppe A-streptokokker. *Cutibacterium acnes* observeres ofte på laboratoriet, både som en forurensningsbakterie og som reelt funn. Ved påvisning av *Cutibacterium acnes* er det derfor viktig å vurdere pasientens tilstand og kliniske opplysninger, for å fastslå om funnet kan ha klinisk betydning eller skyldes forurensning.

1.2 16S ribosomalt RNA

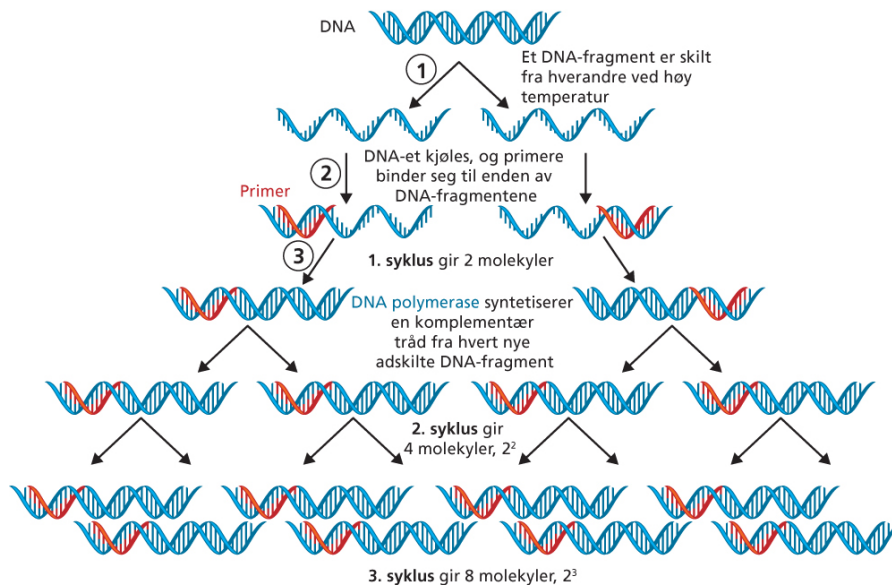
Ribosomer er store komplekser av proteinmolekyler og RNA som er essensielle i proteinsyntesen i celler. Ribosomet består av to subenheter, den lille (30S) og store subenhet (50S), som sammen danner en strukturell enhet som leser av mRNA og binder sammen aminosyrer til et protein (Figur 2). Hver subenhet inneholder ett eller flere ribosomale RNA (rRNA) molekyler. 16S-genet koder for et rRNA-molekyl i den lille subenhet som finnes i alle prokaryote celler, deriblant bakterier (3). Genet for 16S er på omtrent 1540 basepar og inneholder konserverte områder og ni hypervariable områder lokalisert mellom de konserverte områdene. De konserverte områdene er felles for alle bakterietyper, og de hypervariable områdene på genet varierer mellom ulike bakteriestammer. Dette gjør det mulig å differensiere mellom bakteriestammene, og 16S-genet kan derfor tas i bruk diagnostisk ved å benytte spesifikke primere som bindes til de konserverte områdene. PCR-produktet som amplifiseres vil være kopier av både konserverte og variable områder (4). PCR-produktet fra 16S-genet benyttes til sekvensering, slik at den aktuelle bakteriekulturen kan identifiseres. PCR av 16S anvendes særlig når det haster å identifisere bakterien med tanke på empirisk antibiotikabehandling ut fra artens kjente antibiotikafølsomhet og -resistens, eller dersom bakterien vokser dårlig på dyrkningsmedier. Innenfor molekylær diagnostikk er det et kjent problem at reagenser kan inneholde lavere konsentrasjoner av bakterielt DNA. Eksempelvis kan polymerase-enzymet oppformet ved hjelp av *Escherichia coli* i teorien være forurenset med lave konsentrasjoner av bakteriens genom. Dette blir særlig problematisk ved PCR av 16S, hvor bakterielt DNA som følge av kontaminering vil gi falskt positivt utslag.



Figur 2: Skjematiske struktur av store (50S) og lille (30S) ribosomale subenheert samt 16S-genet som koder for deler av lille subenhet. Hvite og grå områder indikerer henholdsvis konserverte og hypervariable områder på 16S rRNA-genet. Figur hentet fra (3).

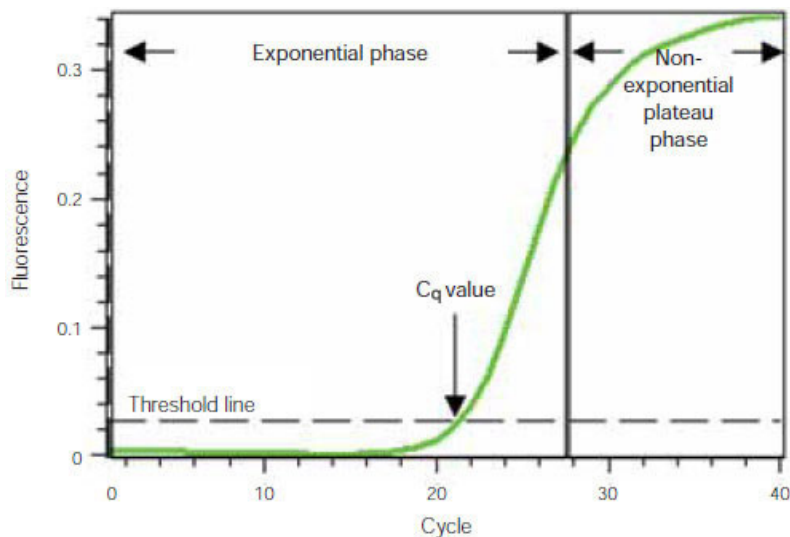
1.3 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) betegner en genteknologisk metode som amplifiserer DNA-sekvenser med svært lite arvemateriale som utgangspunkt. Ved bruk av unike primere, DNA-polymerase, nukleotider og en bestemt temperaturprofil, dannes en rekke kopier av et ønsket område på DNA-tråden (Figur 3). PCR-reaksjonen deles inn i tre trinn, denaturering, binding og kjedeforlengelse. Denaturering betegner prosessen hvor DNA-tråden går fra dobbeltrådet til enkeltrådet. Dette skjer når prøven varmes opp til 94-95°C. Når DNA er enkeltrådet, vil hver enkelt tråd fungere som templat for primere. Primere er oligonukleotider på mellom 15-30 basepar som hybridiserer spesifikt til sine komplementære sekvenser på DNA-tråden under gitte betingelser. Dette skjer ved 50-65°C, avhengig av hvilke primere som benyttes i metoden. Til slutt økes temperaturen til 72°C, som er optimumstemperaturen til DNA-polymerasen. DNA-polymerasen vil bruke primerne som utgangspunkt for kjedeforlengelsen og vil syntetisere en ny DNA-tråd komplementær til templatet. Prosessen med denaturering, binding og kjedeforlengelse repeteres i 20-40 sykluser, hvor de nysyntetiserte DNA-trådene i hver syklus vil fungere som nytt templat.



Figur 3: PCR-reaksjon i tre trinn, denaturering, binding og kjedeforlengelse. Reaksjonen gir en eksponentiell økning av antall molekyler for hver syklus. Figur hentet fra (5).

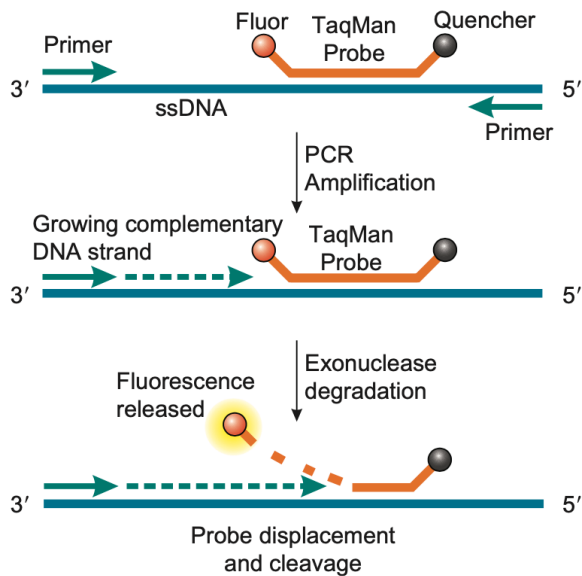
Real-time PCR baserer seg på de samme reaksjonsprinsippene som for konvensjonell PCR. Hovedforskjellen er at man ved real-time PCR kan følge amplifiseringen gjennom syklusene, da både PCR-reaksjonen og deteksjonen av PCR-produktet skjer samtidig. Fluorescerende forbindelser benyttes til deteksjon og måles under bindings-fasen for hver syklus. Med forutsetningen om at reagenser er i overskudd og prøven inneholder målgenet, vil det være en eksponentiell økning av PCR-produkt for hver syklus. Prøven vil derfor avgi fluorescens høyere enn bakgrunnsfluorescensen, og signalet dobles for hver syklus. Etter endt analyse vil prøveoppsettet visualiseres i et diagram, hvor hver enkelt prøve fremstilles som grafer. Signalet fra en positiv reaksjon angis med cycle threshold (Ct) (Figur 4), og viser til antall sykluser hvor fluorescensen fra prøven er høyere enn bakgrunnsfluorescensen. En threshold-linje kan justeres manuelt, og betegner terskelverdien som prøven må overstige for å tolkes som positiv. Når prøvene overstiger threshold-linjen vil prøvene angis med en Ct-verdi.



Figur 4: Amplifiseringskurve med antall sykler på x-aksen og målt fluorescens signal på y-aksen. Terskelverdien settes der fluorescenssignalet fra prøven er høyere enn bakgrunns-fluorescensen. Den grønne kurven representerer PCR-produktet. Figur hentet fra (6).

1.4 Taqman probe

For deteksjon av PCR-produkt i real-time PCR kan TaqMan probe benyttes. En probe er en kort basesekvens som binder spesifikt til komplementær sekvens i målgenet. Sekvensen ligger i et område mellom de to spesifikke primerne for den aktuelle analysen. Proben er merket med et fluorescerende molekyl (reporter) og et ikke-fluorescerende molekyl (quencher), bundet til henholdsvis 5'- og 3'-enden av proben (Figur 5). Quencher er et molekyl som hemmer fluorescens fra reporteren når proben er intakt. 3'-enden på proben er modifisert slik at det ikke er mulig med kjedeforlengelse. I polymeriseringstrinnet ved PCR-analyse starter syntese av DNA fra hver av primerne. Som følge av 5'-3' exonukleaseaktivitet til DNA-polymerasen vil TaqMan proben degraderes ved polymerisering. Dette fører til at reporter skilles fra quencher, og quencher mister dermed sin hemmende effekt slik at fluorescenssignalet øker. Fluorescenssignalet øker eksponentielt i takt med hver amplifiseringssyklus. Hybridiseringen av proben til den aktuelle basesekvensen er forutsatt at målsekvensen er til stede i prøven. TaqMan-probe gjør dermed analysen spesifikk, da proben ikke binder til andre sekvenser enn målsekvensen.

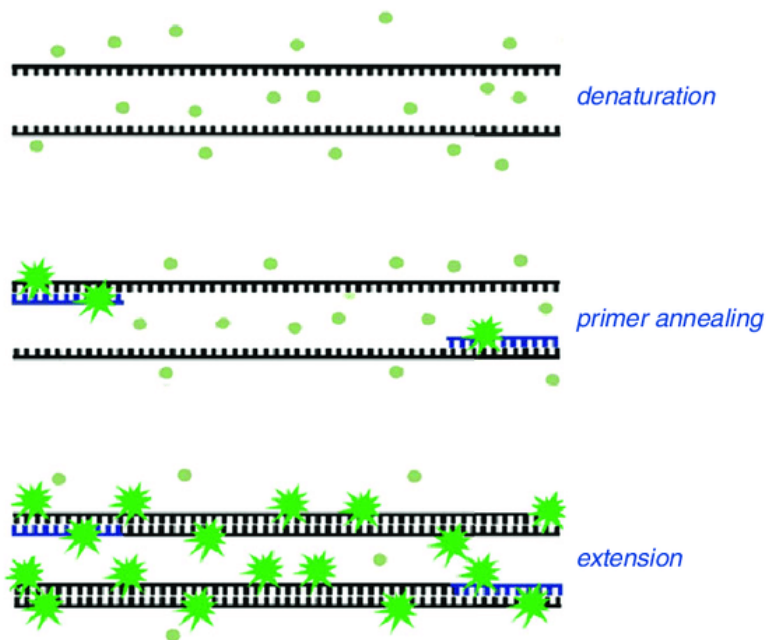


Figur 5: PCR-prinsipp ved bruk TaqMan probe. Figur hentet fra (7).

TaqMan Minor Groove Binder (MGB) er prober som i tillegg til reporter og quencher har en minor groove bindende del konjugert til 3'enden av proben. Bruk av MGB-konjugerte prober øker bindingstemperaturen samt stabiliteten til proben, da molekylet binder seg til minor groove i DNA-molekylet. Egenskapene til MGB gjør det også mulig å benytte prober av kortere basesekvens, samt bidrar til å forhindre uspesifikk binding (8).

1.5 Deteksjon med SYBR Green

Et PCR-produkt kan også detekteres ved hjelp av SYBR Green. SYBR Green er et fluorescerende molekyl som interkalierer med dobbeltrådet DNA, og muliggjør måling av mengden PCR-produkt som amplifiseres. Under denaturering vil fluorescenssignalet være lavt, da SYBR Green ikke binder seg til enkelttrådet DNA. For hver syklus vil mer DNA amplifiseres, og fluorescenssignalet vil derfor bli sterkere i takt med mengden PCR-produkt (doppeltrådet DNA) som befinner seg i prøven (Figur 6). En smeltepunktanalyse må utføres i etterkant, da PCR-produktet må sammenlignes mot en kontroll hvor smeltepunktstemperaturen er kjent. Dette er for å kontrollere uspesifikke PCR-produkter, som kan gi positiv PCR-reaksjon. Disse observeres som topper i smeltepunkt-grafen som avviker fra smeltetemperaturen til positiv kontroll.



Figur 6: PCR-prinsipp ved bruk av SYBR Green. Figur hentet fra (9).

1.6 Kapillærelektroforese

Amplifiserte DNA-fragmenter som produkt av PCR kan visualiseres ved kapillærelektroforese. Elektroforese er separasjon av ladede komponenter i en løsning under påvirkning av et elektrisk felt. Vandringshastigheten til fragmentene er proporsjonal med netto ladning, og omvendt proporsjonal med størrelsen på molekylet og bufferens viskositet. Kapillærelektroforese er en teknikk som benyttes ved analyse av svært små mengder DNA-fragmenter, hvor separasjonen foregår i kapillærkolonner. DNA-fragmenter, som er negativt ladet, drives av en spenningsgradient gjennom kapillærene mot positiv pol, fra katode mot anode (10). Mindre fragmenter, bestående av færre nukleotider, vil vandre raskere gjennom kapillærene enn større fragmenter. På denne måten kan kapillærelektroforese benyttes for å identifisere PCR-produkt med DNA-fragmenter av ulik størrelse.

Deteksjon av fragmentene er basert på laserindusert fluorescens deteksjon. Fragmentene i prøven er merket med et fluorescerende fargestoff før separasjon. Signalet som detekteres vises som topper i et elektroferogram. Et elektroferogram framstiller resultatet med fluorescenssignal på y-aksen og størrelse (basepar) på x-aksen. Ved elektroforese blir det i tillegg til prøver benyttet en størrelsesmarkør. For hver av toppene i elektroferogrammet beregnes størrelsen på fragmentene, konsentrasjon, renhet og molaritet. Resultatet fra elektroforesen blir også fremstilt som et densitometri-plott, som skaper et gel-lignende bilde av resultatet (11). Ved å sammenligne basestørrelsen på den analyserte prøven og kjent størrelse på *Cutibacterium acnes* genet kan elektroforese benyttes som en kontroll på at det er ønsket målgen som har blitt amplifisert ved PCR.

1.7 Oppgavens hensikt

Cutibacterium acnes er i utgangspunktet ikke en vanskelig bakterie å dyrke, men bakterien kan utsettes for oksygen og dø under transport til laboratoriet. Dette gjør at bakterien ikke kan påvises ved dyrkning. Påvisning av *Cutibacterium acnes* med 16S real-time PCR med påfølgende sekvensering er en tidkrevende metode som ikke detekterer bakterien spesifikt. Det var derfor ønskelig å etablere en real-time PCR med TaqMan probe for påvisning av bakterien, da metoden er spesifikk og ikke er avhengig av at bakterien er i live. Hensikten for denne oppgaven var å etablere en spesifikk real-time PCR-metode for påvisning av *Cutibacterium acnes*.

2 Materiale og metode

2.1 Prøvemateriale og pasientprøver

Det ble benyttet 42 pasientprøver som i forkant var ekstrahert til 16S real-time PCR-analyse. Disse omfattet prøver fra vev og leddvæsker, og i tillegg prøver tatt fra proteser fra ulike områder i kroppen. Det ble også benyttet en vevsprøve som hadde oppvekst av *Cutibacterium acnes*.

2.2 Valg av primer- og probesekvenser

Ved etablering av ny PCR for semikvantitativ påvisning av *Cutibacterium acnes* ble det foretatt søk i National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank database (12) for å konstruere spesifikke primere for amplifikasjon av egnet målsekvens. Dette ble utført av overlege Kåre Bergh ved AMM. Det er ønskelig at aktuelle sekvenser for primere ikke gir kryssreaksjoner med andre sekvenser enn målgenet. Et område på 16S rRNA-genet (region V1-V2) ble valgt som mål (target) for primere og probe. Egenskaper som smeltetemperatur og stabilitet til de valgte primer-sekvensene ble undersøkt ved hjelp av programvaren OLIGO 7 (13). Spesifisiteten til primere og probe ble kontrollert ved å sammenligne med andre gen-sekvenser ved hjelp av Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) i NCBI Genbank. Med de valgte primerne blir PCR produktet på 161 basepar (bp). Sekvensene for probe og primere er vist i Tabell 1. 16S rRNA sekvensen ble valgt fra en fullsekvensert stamme, ATCC6919, med GenBank accession CP023676.1 (region 597517-599053), og locus tag CP023676-03020 for nummerering av oligoer.

Det ble benyttet primere fra leverandørene Invitrogen og TIB Molbiol. Prober som har blitt benyttet er TaqMan-prober fra TIB Molbiol og Applied Biosystems UK. Kombinasjonen av primer og probe fra nevnte leverandører er videre i oppgaven omtalt som Metodeoppsett 1, 2 og 3. Disse er listet nedfor.

- Metodeoppsett 1: Primere og TaqMan probe fra TIB Molbiol
- Metodeoppsett 2: Primere fra Invitrogen og TaqMan probe fra Applied Biosystems.
- Metodeoppsett 3: Primere fra Invitrogen og TaqMan MGB probe fra Applied Biosystems.

Primere og prober mottas i tørrstoff, og fortynnes med nukleasefritt vann til 100 μ M ved mottak. Primere og prober ble videre fortynnet til bruksløsninger, med henholdsvis konsentrasjonene 12 μ M og 8 μ M. TaqMan proben benyttet til deteksjon av *Cutibacterium acnes* var merket med fluoroforen 6-karboksyfluorescein (FAM). 6-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) ble benyttet som quencher for Metodeoppsett 2 og 3, og Black Hole Quencher-1 (BHQ-1) ble benyttet for Metodeoppsett 1.

Tabell 1: Sekvenser for primere og probe, designet for spesifikk real-time PCR-analyse av *Cutibacterium acnes*

Primer/Probe	Posisjon i 16S rRNA genet	Sekvens (5'-3')
Sense	92-109	GGG TGC TCG AGT GGC GAA
Antisense	252-234	AAG CTG ATA AGC CGC GAG T
TaqMan Probe	130-151	AAC CTG CCC TTC GAC TTT GGG A

2.3 Kontroller

Alle PCR-analyseoppsett ble kvalitetssikret ved bruk av intern positiv kontroll, som behandles på samme måte som pasientprøvene. Positiv kontroll benyttet i optimaliseringen av real-time PCR for *Cutibacterium acnes* ble hentet fra renkultur etter oppvekst fra pasientmateriale, hvor bakterien i forkant hadde blitt identifisert ved bruk av MALDI-TOF massespektrometri. Nukleasefritt vann ble benyttet som negativ kontroll i de første utprøvingene, men ble raskt kuttet ut. Dette var fordi nukleasefritt vann i teorien kunne være kontaminert. For optimaliseringsanalyser for *Cutibacterium acnes* ble det derfor etter hvert benyttet kun reaksjonsblanding som negativ kontroll.

Ved utprøving av nye real-time PCR innenfor bakteriologi testes reagensblandingen med spesifikke primere og probe mot et generelt bakteriepanel, for å undersøke for uspesifikk reaksjon.

Bakteriepanelet er vist i Tabell 2.

Tabell 2: Bakteriestamme og stammenummer benyttet for spesifisitetsanalyse

Art	Stamme-nummer
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCUG 15915
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CCUG 33061
<i>Streptococcus agalacticae</i>	CCUG 4208
<i>Haemophilus influenzae</i>	CCUG 33775
<i>Candida albicans</i>	CCUG 19915
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 37382
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCUG 6323T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCUG 17619
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCUG 9997

<i>Streptococcus anginosus</i>	CCUG 223
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCUG 23118
<i>Neisseria meningitidis</i> (gr. B)	CCUG 23101
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CCUG 25177
<i>Legionella pneumophila</i>	CCUG 33058
<i>Bacillus cereus</i>	CCUG 36925
<i>Clostridium perfringens</i>	CCUG 1795T
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CCUG 9994T
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCUG 33058

For vurdering av kontaminasjon av *Cutibacterium acnes* i miljøet på laboratoriet, ble ulike reagenser benyttet som prøvemateriale, for å undersøke om det kunne være funn av bakterien i kommersielle reagenser. Reagensene som ble benyttet er listet opp nedenfor.

- Lightcycler® Faststar DNA Master Hybprobe H₂O PCR-grade
- Quantabio Perfecta® SYBR® Green Fastmix®
- Quantabio qScript™ 1-step Virus Toughmix®
- Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific Amplitaq Gold™ DNA Polymerase 1000U
- *Legionella pneumophila* PCR-reaksjonsblanding, ferdig tillagd
- Molecular grade water i triplikat, fra G-Biosciences

2.4 Forbehandling og ekstraksjon av nukleinsyrer

Forbehandling og ekstraksjon før PCR-analyser utføres for å isolere og rense nukleinsyrer fra prøvematerialet. Aktuelle prøvematerialer til analyse av *Cutibacterium acnes* vil i hovedsak være vevsprøver. For utprøving av PCR-metoden ble bakteriekolonier av *Cutibacterium acnes* fra pasientmateriale benyttet. For å frigjøre DNA benyttes enzymer som destruerer celleveggen til bakterien. *Cutibacterium acnes* ble enzymbehandlet ved å avsette én bakteriekoloni, høstet fra FAA, i en løsning bestående av TE-buffer, Proteinase K, Lysostaphin, Lysozyme og Mutanolysin (Tabell 3). Reagensene og enzymene vil sammen sørge for lysering av celleveggen, nedbrytning av interfererende proteiner, samt sørge for stabilisering av nukleinsyrene som frigjøres ved lysering. Prøven ble deretter inkubert med risting på Eppendorf Thermomixer comfort. 37°C og 65°C, ved henholdsvis 500 og 550 rpm (revolutions per minute) i 15 minutter ved respektive temperaturer.

Tabell 3: Reagenser og enzymer benyttet til forbehandling av *Cutibacterium acnes*.

Reagens	Konsentrasjon	Tillaging	Volum
TE-buffer	10 mM Tris(hydromethyl)-aminomethane 1 mM EDTA	1,21 g Tris(hydromethyl)aminomethane og 0,37 g EDTA løst i 1 L H ₂ O pH justert til 7,5±0,2. Sterilfiltrert med sterilfilter, posestørrelse 0,22 µm.	267 µL
Lysozyme L6876-1G	20 mg/ml	1 g løst i 50 ml nuklease fritt vann	15 µL
Proteinase K	20 mg/ml	Kommersielt reagens fra QIAGEN®	6 µL
Mutanolysin M9901-5K	10.000 U/ml	5000 Units løst i 500 µl nukleasefritt vann	6 µL
Lysostaphin L7386-1MG	1 mg/ml	1 mg løst i 1 ml nukleasefritt vann	6 µL

Nukleinsyreekstraksjon av både bakteriekulturer og pasientmateriale baserer seg på bruk av magnetpartikler for automatisert isolasjon og rensing av nukleinsyrer. Prinsippene for ekstraksjon omfatter lysering, binding, vask og eluering, hvor isolasjonen utnytter ioniserte fosfatgrupper i nukleinsyrene. Positivt ladede magnetpartikler belagt med silika tilsettes prøveløsningen og binder negativt ladede fosfatgrupper i nukleinsyrene. En magnet i instrumentet vil videre binde magnetpartiklene. Gjennom flere vaskeprosesser vil proteiner og celledbris fjernes, mens nukleinsyrene forblir bundet til magnetpartiklene. Nukleinsyrene blir så eluert ved hjelp av en buffer med egnet pH, og eluatet benyttes til PCR-analyse. Ekstraksjonen av bakteriekulturene ble utført på instrumentet Nuclisens EasyMag. Det ble forbrukt 200µL enzymbehandlet prøvemateriale, og ekstraksjonen ga 55µL oppkonsentrert eluat.

2.5 Reaksjonsblanding til PCR

Til PCR-analyser ble det laget reaksjonsblandinger tilhørende de tre ulike metodeoppsettene, beskrevet i punkt 2.2. Reaksjonsblandingen inneholdt primere, prober, nukleotider og polymerase-enzymmer. Aktuelt prøvemateriale for utprøvingen var fortyninger av renkultur fra *Cutibacterium acnes*. For analyseoppsettene ble 15 µL reaksjonsblanding blandet med 5 µL prøvemateriale. Tillaging av reaksjonsblanding for én prøve er vist i Tabell 4.

Tabell 4: Reaksjonsblanding for én prøve til PCR-analyse av *Cutibacterium acnes*.

Antall prøver	Custom Mastermix	Nukleasefritt vann	Primer Sense	Primer Antisense	Probe TaqMan
1	10 µL	3,5µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL

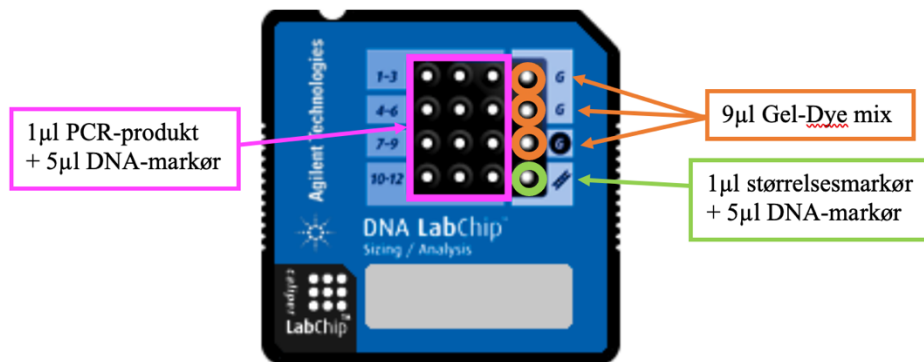
Metodeutprøvingen ble gjort på PCR-instrumentet Bio-Rad CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cycler. Instrumentet fremstiller temperaturprofilen, hvor temperaturene og tidsintervallene for hvert trinn i syklusene visualiseres (Vedlegg 7). Programmet som ble benyttet i utprøvingene var Perfecta 2-step 55. «Perfecta»-programmet er tilpasset analyseoppsett som benytter reagenset Perfecta™ Multiplex qPCR SuperMix. Reagenset inneholder nødvendige PCR-reaksjonskomponenter, med unntak av primere og prober. «2-step» viser til at både binding og kjedeforlengelse skjer ved samme temperatur, og derfor kutter ut et separat trinn for kjedeforlengelse. «55» betegner at bindingstrinnet og forlengelsen skjer ved 55°C. Perfecta 2-step 55 er et program med 40 sykluser.

2.6 Kontroll av PCR-produkt

Agilent 2100 Bioanalyzer ble benyttet til kontroll av PCR-produktene ved kapillærelektroforese. Metoden visualiserer lengden på DNA-fragmentene som er amplifisert, og blir benyttet som en indikasjon på at den forventede sekvensen har blitt amplifisert. I tillegg til dette vil uspesifikke bindinger som følge av primer-dimerisering være synlige. Dimerisering av primere skyldes områder med komplementære baser i primersettet hybridiserer til hverandre. Disse vil sees som svake bånd med lav molekylvekt. Et DNA 7500 LabChip-sett ble benyttet til analyse av PCR-produkt på Agilent 2100 Bioanalyzer. Settet består av en mikrobrikke (Figur 7), DNA-markør, Gel-Dye mix og størrelsesmarkør som ekstern standard, og gjør det mulig å kvantitere fragmenter fra 100 til 7500 basepar. Brikkene består av brønner koblet til elektroder med sin tilhørende strømforsyning (11). Hver mikrobrikke har 12 prøvebrønner, samt egne brønner for tilsatt av Gel-Dye mix og DNA-ladder. Gel-Dye mixen består av en polymer (DNA gel matriks) som danner en separasjonsmatrix, og et fluorescerende fargestoff (DNA dye concentrate) som binder til DNA-fragmentene i prøven. For tillaging av Gel-Dye mix ble DNA dye concentrate og DNA gel matrix romtemperert i 30 minutter. Reagensene ble deretter ristet og spunnet ned før 25µl av DNA dye concentrate ble overført til DNA gel matrix. Blandingen ble ristet og overført til spinnkolonne, og deretter sentrifugert i 10 minutter ved 1500g. Til analyse tilsettes 9µl Gel-Dye mix per mikrobrikke i tilhørende brønner.

DNA-markør er et reagens som inneholder en nedre og øvre markør, på henholdsvis 50 og 10380 bp. Markørene benyttes som standarder for å justere måleområdet. 5 µL DNA-markør ble tilsatt i alle brønner sammen med prøvemateriale, samt i brønner for størrelsesmarkør. Til analyse på Agilent Bioanalyzer ble 1µl PCR-produkt benyttet. Brønner uten prøvemateriale ble tilsatt 6 µL DNA-markør,

da volumet i hver brønn må være likt. 1 μ L størrelsesmarkør, hvor fragmentene har standardiserte størrelser, ble tilsatt i egen brønn og benyttes for identifikasjon av størrelse på DNA-fragmentene.



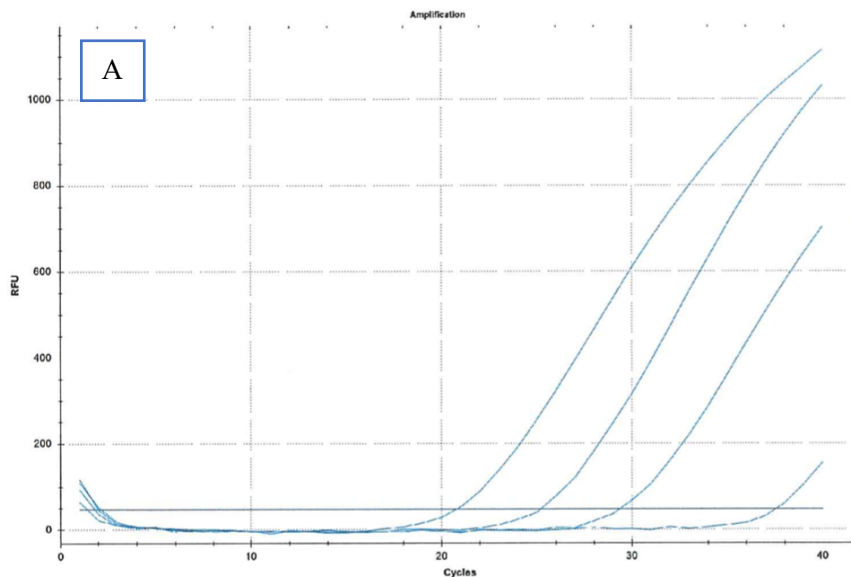
Figur 7: DNA 7500 LabChip benyttet til analyse av PCR-produkt på Agilent 2100 Bioanalyser

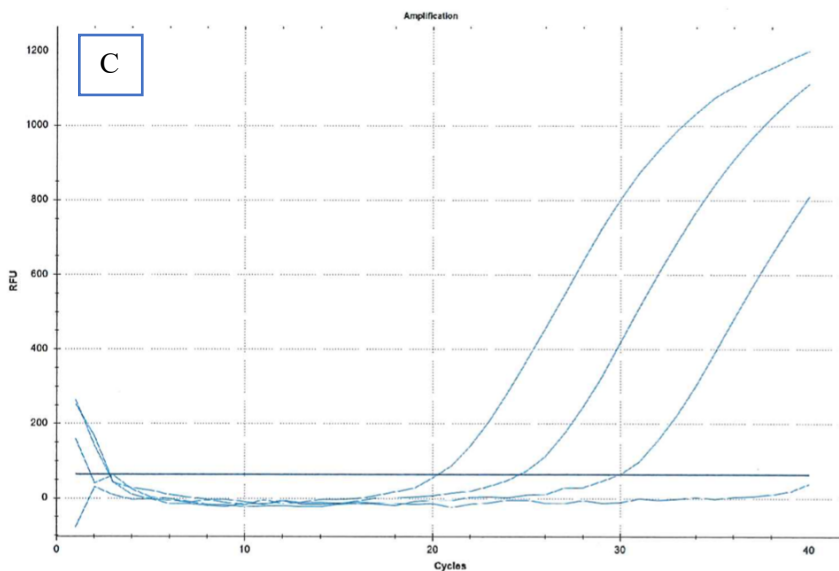
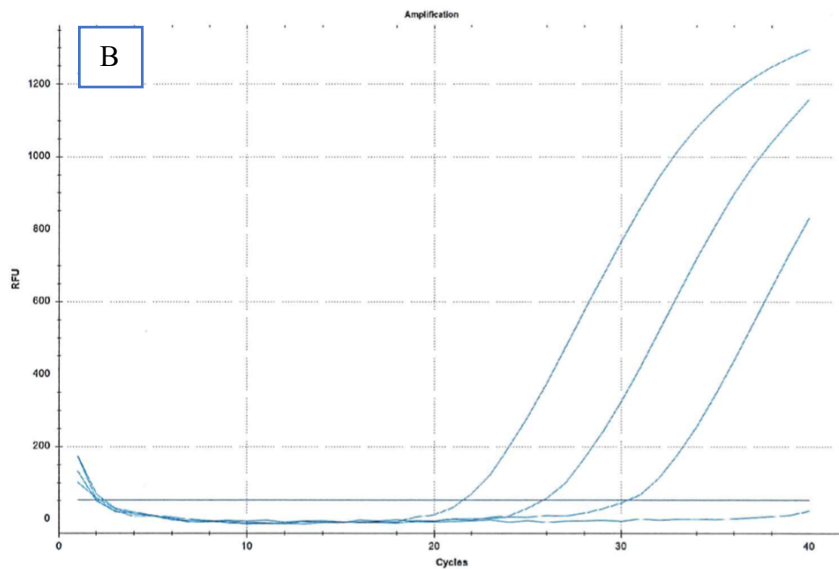
3 Resultater

For å etablere real-time PCR for *Cutibacterium acnes* ble det initialt prøvd ut tre ulike metodeoppsett, hvor hvert oppsett hadde primere og prober fra ulike leverandører (se Materiale og metode punkt 2.2).

3.1 Utprøving av de ulike metodeoppsettene

Ved oppstart av metodetilpasningen ble Metodeoppsett 1, 2 og 3 utprøvd med positiv og negativ kontroll. Det ble benyttet ti-folds fortykning av positiv kontroll, sammen med negativ kontroll bestående av nukleasefritt vann. Metodeoppsettene ble analysert med programmet Perfecta 2-step 55 på CFX96. Ved AMM benyttes Perfecta 2-step 55 på flere bakteriologiske real-time PCR-analyser, noe som tillater at flere PCR-oppsett for deteksjon av ulike bakterier kan analyseres samtidig. Ved å kombinere analyser med samme PCR-program, vil kostnadseffektiviteten økes for bruk av instrumenter og forbruksmateriale. Resultater fra denne utprøvingen er vist i Figur 8 (A-C). Tilhørende Ct-verdier fra alle tre metodeoppsettene er vist i Tabell 5.





Figur 8: Utpørning av Metodeoppsett 1 (A), Metodeoppsett 2 (B) og Metodeoppsett 3 (C) på CFX96. Figuren viser fortynninger 1:10, 1:100 og 1:1000, samt negativ kontroll.

Tabell 5: Ct-verdier for utpørning av Metodeoppsett 1,2 og 3 analysert på CFX96

Prøve	Metodeoppsett 1	Metodeoppsett 2	Metodeoppsett 3
1:10	20,76	21,52	20,27
1:100	25,18	25,78	24,61
1:1000	29,33	30,31	29,97
Negativ kontroll	37,52	-	-

Kurveformen og Ct-verdiene vil avgjøre om prøver tolkes som positiv eller negativ. Positive prøver vil ha en sigmoid kurveform, og angis med en Ct-verdi. Negative prøver har en vannrett kurve og ingen Ct-verdi. Den første signifikante økningen i PCR-produktet korrelerer til den opprinnelige mengden nukleinsyrer i prøven. Nukleinsyremengden i prøven er omvendt proporsjonal med Ct-verdien. Lav

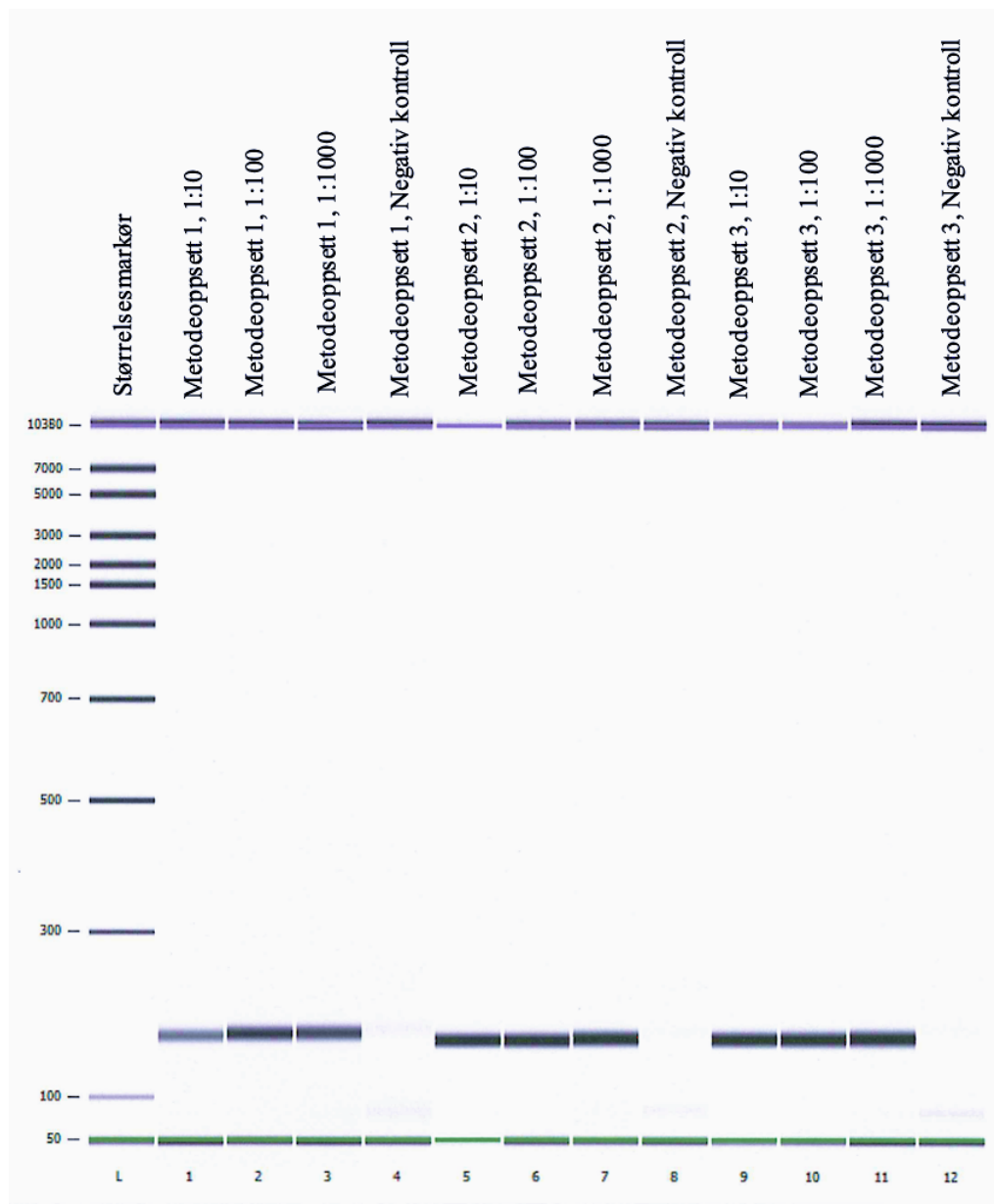
Ct-verdi viser til høyere signal og følgelig større mengde nukleinsyrer i prøven. Som vist i Figur 8 (A-C) er kurveformen for fortynningene 1:10, 1:100 og 1:1000 tilsynelatende like for de tre metodeoppsettene. Det kan observeres at negativ kontroll for Metodeoppsett 1 både får Ct-verdi og en kurveform som indikerer positiv reaksjon (Figur 8A). Dette står i kontrast til resultatene fra Metodeoppsett 2 og 3, hvor negativ kontroll hverken har Ct-verdi eller kurveform som indikerer positiv reaksjon. Ct-verdiene (Tabell 5) for hver fortynning viser tilnærmet lik verdi for de tre metodeoppsettene.

3.2 Kontroll av første utprøving med kapillærelektroforese

Resultatene fra PCR-reaksjonene for hvert metodeoppsett ble kontrollert ved utførelse av kapillærelektroforese av PCR-produktene på Bioanalyser. Dette ble gjort for å detektere eventuelle uspesifikke bindinger, som følge av eksempelvis primer-dimerisering. Elektroforesen vil også vise om fragmentene som ble amplifisert ved PCR er av riktig størrelse. Elektroforesen ble utført på Agilent Bioanalyser på programmet DNA 7500. Resultatene fra kapillærelektroforesen på de ulike metodeoppsettene er vist i Tabell 6 og i Figur 9. Figur 9 viser størrelsesmarkøren i kolonnen merket L og bånd for metodeoppsettene ved ulike fortynninger samt negativ kontroll i posisjonene 1-12. Nedre og øvre markør observeres som henholdsvis grønne og lilla bånd i nedre og øvre del av gel-bildet.

Tabell 6: Amplifisert produkt i antall bp ved bruk av Metodeoppsett 1, 2 og 3. Prøvene er analysert på Agilent 2100 Bioanalyser.

Prøve	Metodeoppsett 1	Metodeoppsett 2	Metodeoppsett 3
1:10	174	169	170
1:100	177	169	171
1:1000	178	170	172
Negativ kontroll	-	-	-



Figur 9: Kapillærelektroforese av PCR-produkt for Metodeoppsett 1, 2 og 3.

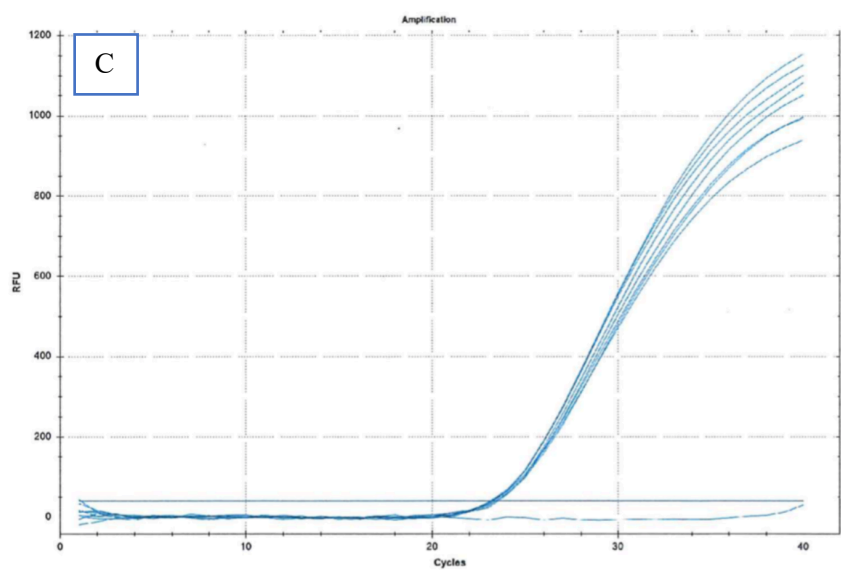
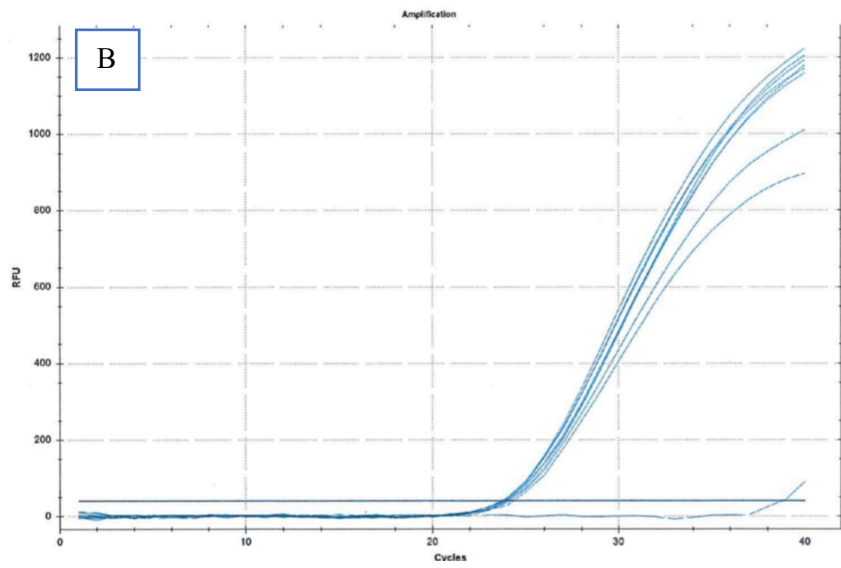
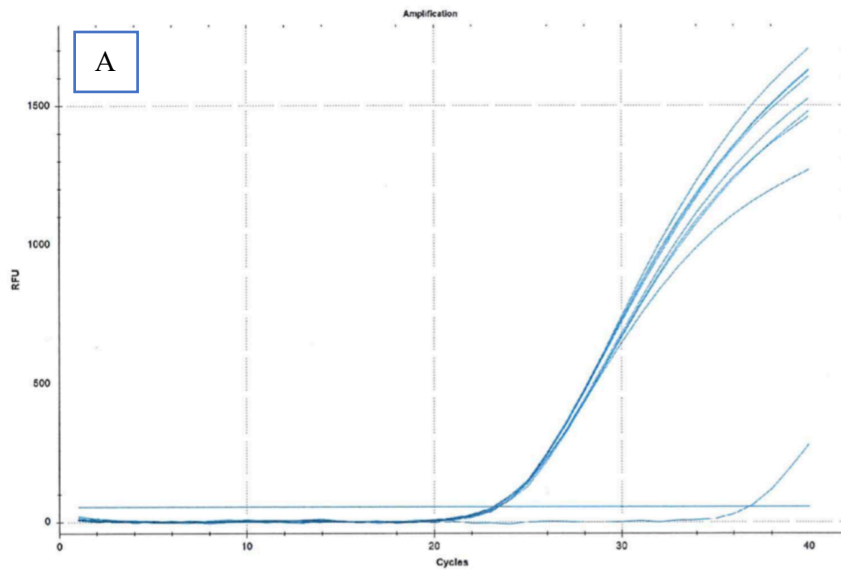
Det aktuelle målgenet har en størrelse på 161 basepar. Det var derfor forventet å få PCR-produkt med tilsvarende størrelse, men det er normalt å observere et avvik på $\pm 10\%$ fra den forventede størrelsen. Med avviket tatt i betraktning, ble det konkludert med at PCR-produktet fra alle metodeoppsettene var innenfor riktig størrelse. PCR-produktet ble oppformert med 40 sykluser. Når PCR-reaksjonen går over 40 sykluser vil reaksjonen være i platåfasen (Figur 4), og det vil være store mengder PCR-produkt amplifisert. På kapillærelektroforesen blir produktet derfor observert som tykke og mørke bånd, mellom 100 og 300 bp sett i forhold til størrelsesmarkøren. I posisjon 4, 8 og 12 på Figur 9 kan det observeres lyse bånd like under 100 bp. Dette skyldes primer-dimer. For prøve 4 kan det også observeres et svakt bånd i samme størrelsesorden som PCR-produktet. Dette ble tolket som en mulig kontaminasjon av *Cutibacterium acnes*.

3.3 Temperaturoptimalisering for Metodeoppsettene 1, 2 og 3

Binding av primere til målsekvens skjer vanligvis på en temperatur mellom 50,0 og 60,0°C, avhengig av primeren som benyttes (10). For å undersøke hvilken temperatur som gir optimal binding av primere ble det utført en temperaturgradientanalyse. Dette ble gjort ved å analysere de tre metodeoppsettene over åtte ulike bindingstemperaturer mellom 50,0 - 60,0 °C. Positiv kontroll ble fortynnet til 1:100 og analysert over hele temperaturintervallet. Negativ kontroll ble pipettert i triplikat og analysert ved 56,3°C. Temperaturintervallet 50,0 til 60,0°C ble lagt inn som øvre og nedre grense, mens resterende seks temperaturer ble automatisk satt av instrumentets programvare. Resultatene fra gradientanalysen er vist i Tabell 7, samt Figur 10 (A-C).

Tabell 7: Ct-verdier for Metodeoppsett 1, 2 og 3 ved smeltetemperatur 60,0-50,0°C. Prøvene er analysert på CFX96.

Temperatur (°C)	Metodeoppsett 1	Metodeoppsett 2	Metodeoppsett 3
60,0	23,12	24,35	23,24
59,4	23,26	24,13	23,24
58,3	23,39	23,92	23,35
56,3	23,11	24,01	23,51
53,9	23,37	23,91	23,20
52,0	23,21	23,77	23,43
50,7	23,13	23,68	23,14
50,0	23,43	23,82	23,10
Negativ kontroll	36,77	38,82	0,00



Figur 10: Temperaturgradientanalyse med temperaturer mellom 60,0-50,0°C. Metodeoppsett 1 (A), Metodeoppsett 2 (B) og Metodeoppsett 3 (C) analysert på CFX96.

Den laveste Ct-verdien gir en indikasjon på optimal temperatur. For lave temperaturer kan føre til uspesifikk binding, og det foreligger derfor forventning til bedre resultater ved høyere temperaturer. Basert på resultatene i Tabell 7, ble det observert at Ct-verdien ligger på omtrent 23 for alle metodeoppsett, uavhengig av bindingstemperaturen. Kurveformen for de tre metodeoppsettene ble tilnærmet like, med unntak av negativ kontroll som for Metodeoppsettene 1 og 2 ga positiv reaksjon, i motsetning til Metodeoppsett 3. Det var ingen signifikante forskjeller hverken i Ct-verdier eller kurveform i det angitte temperaturintervallet. Basert på resultatene fra temperaturgradientanalysen ble programmet Perfecta 2-step 55 benyttet videre. PCR-produktene fra gradientanalysen ble deretter analysert med kapillærelektroforese på Agilent 2100 Bioanalyzer (Tabell 8).

Tabell 8: Temperaturgradientanalyse, 60,0-50,0°C utført med Metodeoppsett 1, 2 og 3. Amplifisert produkt i antall bp, analysert på Agilent 2100 Bioanalyzer.

Temperatur (°C)	Metodeoppsett 1	Metodeoppsett 2	Metodeoppsett 3
60,0	162	183	186
59,4	162	185	187
58,3	162	184	187
56,3	162	185	187
53,9	162	186	189
52,0	162	189	191
50,7	163	190	193
50,0	164	189	193
Negativ Kontroll	166	-	-

Av Figur 9 ser vi at PCR-produktet fra alle metodeoppsett er innenfor samme størrelsesorden, men størrelsesavviket på Metodeoppsett 2 og 3 var større enn +10% fra forventet størrelse. PCR-produktet for hvert metodeoppsett ble likevel vurdert til å ha korrekt størrelse i det angitte temperaturintervallet. Det er usikkert hva avviket skyldes, men det har trolig ingen betydning for resultatene. Det ble observert positivt funn for negativ kontroll på Metodeoppsett 1 både på resultatene fra real-time PCR (Figur 10A), samt påfølgende kapillærelektroforese. Dette forsterker mistanken videre om at reagenser tilhørende Metodeoppsett 1 kan være kontaminert av *Cutibacterium acnes*.

3.4 Effektivitetsanalyse

Optimal PCR effektivitet oppnås dersom PCR-produktet fordobles for hver syklus.

Effektivitetsanalyser er nødvendig for å kunne vurdere kvaliteten på PCR-analysen. Effektiviteten avhenger av primerne, temperatur, og eventuelle inhibitorer som begrenser amplifiseringen (10).

Spesifisiteten og effektiviteten til PCR gjør det mulig å detektere og amplifisere svært små mengder målsekvens (14). Det vil være ønskelig at effektiviteten er på 100%, men effektivitet mellom 85% og 105% kan også godtas. Teoretisk sett vil antall kopier av målsekvensen dobles for hver syklus.

Dersom effektiviteten er 100% gir dette:

$$\log_2 10 = \frac{\log_{10} 10}{\log_{10} 2} = 3,32192$$

Forutsatt at produktet dobles for hver syklus, kan det forventes en økning på 3,32 Ct-verdier mellom hver tifoldsfortynning. Det vil si at etter 3,32 sykluser vil være amplifisert ti ganger så mye produkt.

For å undersøke metodens effektivitet ble det utført effektivitetsanalyse med Metodeoppsettene 1, 2 og 3. Ved utføring av effektivitetsanalyse lages det fortyninger av positiv kontroll i området 1:10 – 1:10⁷, hvor fortyningene skal være nylagde for at analysen skal anses som pålitelig. På instrumentet legges fortyningene inn som ulike standarder. Programvaren til instrumentet genererer en standardkurve, og beregner effektivitet (E), determinasjonskoeffisienten (R²) og stigningstallet basert på Ct-verdi og kjent konsentrasjon på fortyningene. Variablene plottes inn i et punktdiagram, med den logaritmiske konsentrasjonen på x-aksen og Ct-verdiene på y-aksen. Det tilpasses en trendlinje hvor stigningstallet på kurven vil være på -3,32 ved 100% effektivitet. Determinasjonskoeffisienten sier noe om hvor godt punktene er tilpasset trendlinjen. R² større enn 0,95 tilsier god korrelasjon mellom punktene. Resultatene fra effektivitetsanalysen vises i Tabell 9.

Tabell 9: Effektivitetsanalyse med Metodeoppsett 1, 2 og 3 utført med fortyningene 10⁻¹-10⁻⁶. Tabellen viser beregnet optimal effektivitet (E), determinasjonskoeffisienten (R²) og stigningstallet..

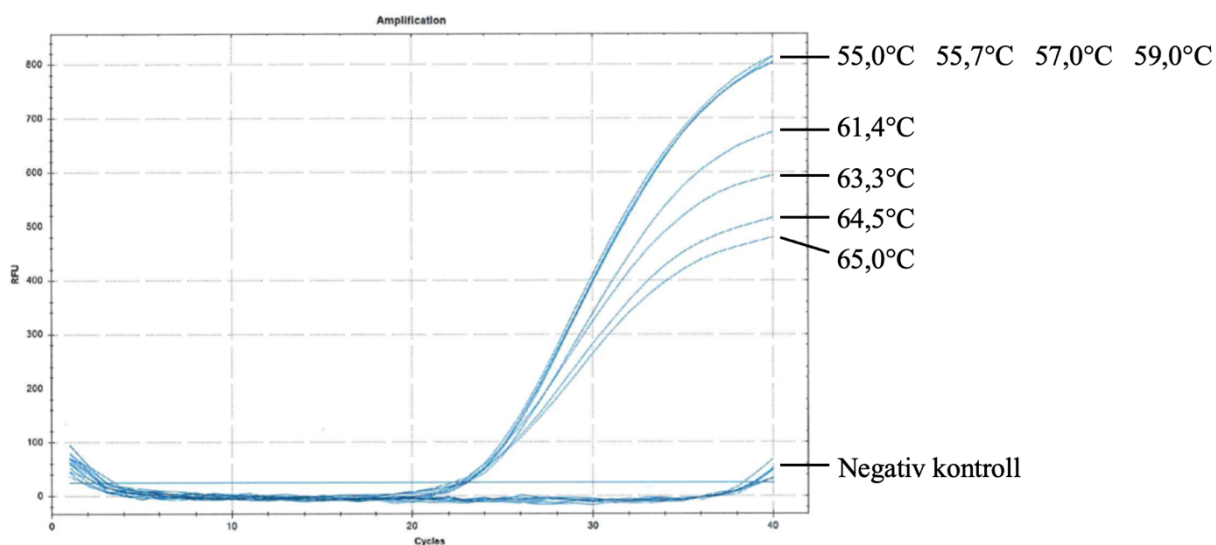
Metodeoppsett	E	R ²	Stigningstall
1	91,4%	0,999	-3,457
2	103,5%	0,999	-3,240
3	103,6%	0,994	-3,238

Det ble valgt å fjerne siste fortykning på 1:10⁷, da denne fortyningen trolig var negativ, og metoden kun amplifiserte forurensningen i oppsettet. Beregnet effektivitet for alle metodeoppsettene ligger innenfor området 85-105%, noe som indikerer at effektiviteten tilfredsstillende kravene for PCR-metoden. Effektiviteten til Metodeoppsett 1 er lavere enn Metodeoppsett 2 og 3, som har tilnærmet lik effektivitet. En korrelasjonskoeffisient nær 1 viser også til god linearitet på standardkurven for alle metodeoppsettene. Stigningstallet på Metodeoppsett 1 er høyere, sammenlignet med Metodeoppsett 2

og 3, hvor stigningstallet er nærmere 3,32 som ønsket. Etter effektivitetsanalysen konkluderte vi med at Metodeoppsett 1 og Metodeoppsett 2 ikke lenger skulle benyttes. Reagenser tilhørende Metodeoppsett 1 hadde gitt dårligere resultater hvor negativ kontroll gjentatte ganger ble positiv. Effektivitetsanalysen til Metodeoppsett 1 var også dårligere sammenlignet med de andre metodeoppsettene. I Metodeoppsett 3 ble negativ kontroll negativ for alle analyser. Det ble derfor besluttet å kun gå videre med Metodeoppsett 3.

3.5 Temperaturoptimalisering for Metodeoppsett 3

Det ble videre utført en ny temperaturgradientanalyse for Metodeoppsett 3 i et høyere temperaturintervall, mellom 55,0 og 65,0°C. Dette ble gjort for å undersøke om reaksjonen var mer spesifikk ved høyere temperatur. Resultatene fra gradientanalysen er vist i henholdsvis Figur 11 og Tabell 10.



Figur 11: Temperaturgradientanalyse med temperaturer mellom 65,0-55,0°C. Metodeoppsett 3 analysert på CFX96

I etterkant av gradientanalysen ble det deretter utført kapillærelektroforese på alle PCR-produktene fra både positiv og negativ kontroll.

Tabell 10: Gradientanalyse, 65,0-55,0°C med Metodeoppsett 3 på CFX96 og Agilent 2100 Bioanalyser.

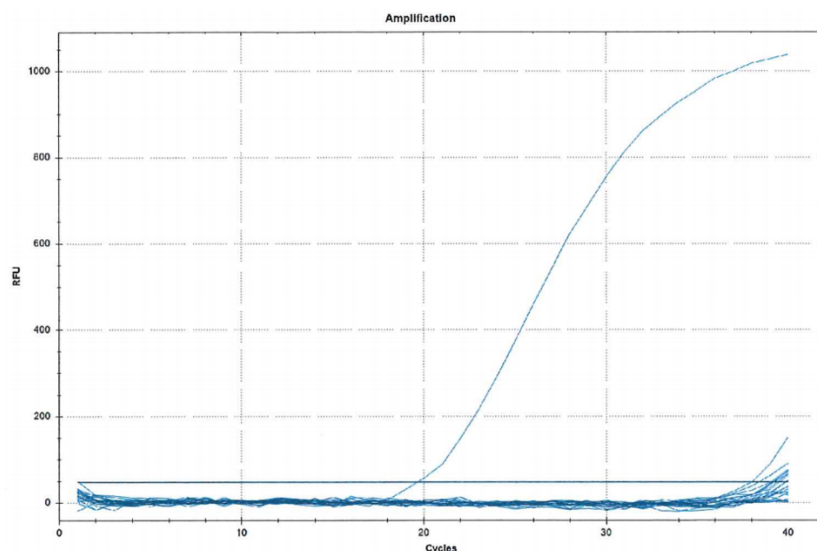
Temperatur (°C)	Ct-verdi	Størrelse [bp]
65,0	22,63	180
64,5	22,99	179
63,3	22,24	179

61,4	23,05	180
59,0	23,00	180
57,0	22,64	180
55,7	23,07	181
55,0	22,81	182
Negativ kontroll	39,01	-

Figur 11 viser at PCR kurvene er tilnærmet like, men fluorescenssignalet synker i takt med økende temperatur (fra og med 61,4 °C). Lavere fluorescenssignal har ingen betydning for optimal bindingstemperatur. Vi observerer også en svak positiv reaksjon med negativ kontroll i hele temperaturintervallet (Figur 11), med en gjennomsnittlig Ct-verdi på 39,01. Resultatene i Tabell 10 viser at Ct-verdiene ligger mellom 22,00 og 23,00 i hele temperaturintervallet. Resultatet fra elektroforese viser også at PCR-produktene ved temperaturer mellom 55,0-65,0°C var i samme størrelsesorden (Tabell 10). Basert på disse resultatene ble det konkludert at reaksjonen ikke var mer spesifikk ved høyere temperaturer. Perfecta 2-step 55 ble derfor fastslått som PCR-program for analysen.

3.6 Spesifisitetsanalyse

Ved utprøving av nye metoder er det viktig å kvalitetssikre at det ikke forekommer kryssreaksjoner med andre bakterier. En spesifisitetsanalyse er nødvendig for å kontrollere at reaksjonsblandingen ikke reagerer med, og gir positiv reaksjon med andre mikrober enn *Cutibacterium acnes*. Dette kan kontrolleres for ved å sette opp et generelt bakteriepanel, bestående av kjente stammer, sammen med reaksjonsblandingen for Metodeoppsett 3. Det generelle bakteriepanelet benyttet til spesifisitetsanalysen er vist i Tabell 2 i avsnitt 2.3. Negativ kontroll for analysen besto av reagensblanding for Metodeoppsett 3. Resultatet fra spesifisitetsanalysen er vist i Figur 12 og viser at reaksjonsblandingen for Metodeoppsett 3 kun amplifiserte positiv kontroll for *Cutibacterium acnes*. I noen få av bakteriestammene finner vi et svakt positivt signal, men dette ble ikke vurdert som signifikant. De svake positive kurvene ble tolket som negative, da dette ikke viser til amplifisering av andre bakteriestammer, men mest sannsynlig amplifisering av en mulig kontaminasjon. Spesifisiteten for Metodeoppsett 3 ble derfor godkjent.



Figur 12: Spesifisitetsanalyse for generelt bakteriepanel med Metodeoppsett 3 analysert på CFX96

3.7 Analysens robusthet

Robusthet kan defineres som en metodes evne til å motstå påvirkning fra ytre forhold. Det ble utført en robusthetsanalyse for å vurdere holdbarheten til reaksjonsblandingen etter tilsetning av prøvemateriale. Det er nødvendig å vite om prøven blir påvirket om den blir stående over tid dersom instrumentpark ved laboratoriet har begrenset kapasitet. For å undersøke dette ble det pipettert reaksjonsblanding tilhørende Metodeoppsett 3 og tilsatt *Cutibacterium acnes* fra kultur med fortyningene 1:10, 1:100 og 1:1000. Reaksjonsblandingen ble benyttet som negativ kontroll. Prøveoppsettene ble analysert straks etter pipettering og etter henholdsvis fire og 24 timers henstand. Prøveoppsettene ble oppbevart ved 4 °C. Resultatene er vist i Tabell 11 og viser at Ct-verdiene for de tre fortyningene ikke har noen signifikant endring over tid. Henstand i opptil 24 timer har dermed ingen betydning for analysen.

Tabell 11: Ct-verdier for utprøving av robusthet med Metodeoppsett 3 analysert på CFX96 etter 0, 4 og 24 timer.

Prøvefortynning	T ₀	T ₄	T ₂₄
1:10	20,01	20,75	20,25
1:100	23,83	24,45	23,56
1:1000	28,19	27,66	27,52

3.8 Sensitivitet: Sammenligning med etablert metode

Metodeoppsett 3 ble deretter sammenlignet med den etablerte metoden ved AMM for påvisning av 16S-RNA gen. 16S real-time PCR benytter SYBR Green og smeltepunktsanalyse som

deteksjonsprinsipp. Metodenes deteksjonsgrense ble sammenlignet for å vurdere sensitiviteten. En spesifikk PCR er en hurtigere metode for påvisning, da positive prøver på 16S-analysen må sekvenseres for å identifisere mikroben. Positiv kontroll med fortyninger i området 1:10 – 1: 10⁶ ble analysert i triplikat med Metodeoppsett 3 med og 16S real-time PCR. Reaksjonsblanding fra tilhørende metoder ble benyttet som negativ kontroll. Gjennomsnittet til Ct-verdiene ble beregnet for hver av fortyningene (Tabell 12).

Tabell 12: Ct-verdier ved Metodeoppsett 3 og 16S-PCR med fortyninger 10⁻¹-10⁻⁶. Prøven ble analysert på CFX96.

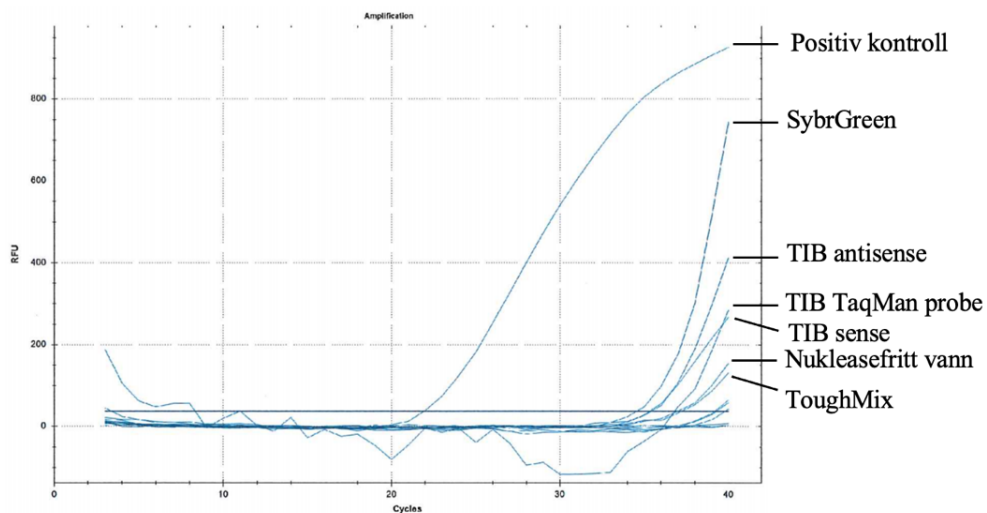
Prøvefortynning	Metodeoppsett 3	16S SYBR Green
1:10	19,91	14,33
1:10 ²	23,31	18,07
1:10 ³	26,76	22,11
1:10 ⁴	30,00	25,68
1:10 ⁵	33,58	29,24
1:10 ⁶	36,91	32,43
Negativ kontroll	39,13	32,06

Resultatene viser at 16S real-time PCR gir lavere Ct-verdier sammenlignet med Metodeoppsett 3 for de samme prøvene. Dette skyldes forskjellen i deteksjonsprinsipp mellom TaqMan probe og SYBR Green. SYBR Green-molekylene binder uspesifikt til dobbeltrådet DNA og avgir mer fluorescens enn TaqMan probe, som binder en spesifikk sekvens på DNA-tråden. Terskelverdien vil overskride tidligere ved SYBR Green, noe som resulterer i lavere Ct-verdier. Tabell 12 viser at Metodeoppsett 3 er i stand til å detektere prøvene i fortyning 1:10⁶, mens 16 real-time PCR detekterer prøvene i fortyning 1:10⁵. 16S real-time PCR hadde trolig ikke et reelt positivt funn ved fortyning 1:10⁶, da Ct-verdiene ble høyere enn negativ kontroll. Sensitiviteten til Metodeoppsett 3 var derfor høyere enn 16S real-time PCR, da Metodeoppsett 3 var i stand til å detektere en lavere konsentrasjon.

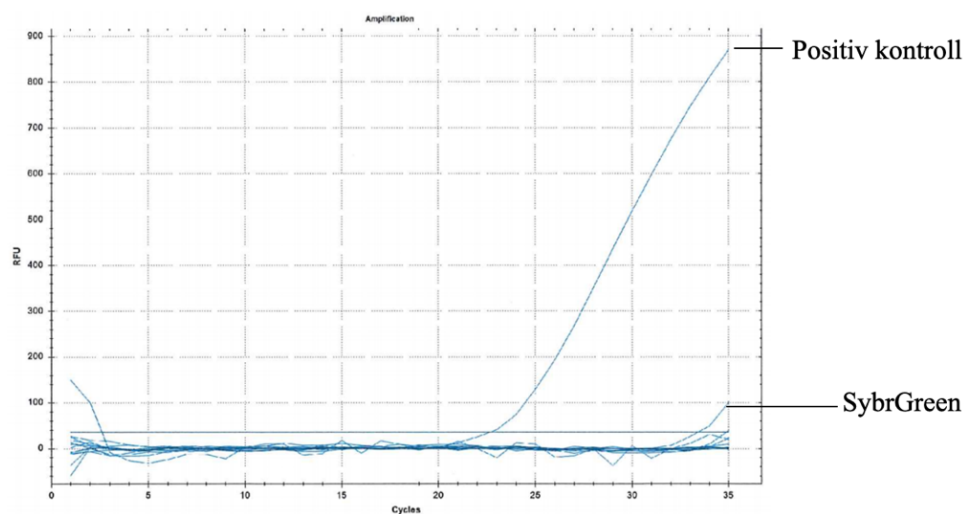
3.9 Kontaminering i reagenser

En tidligere studie viser at *Cutibacterium acnes* i stor grad befinner seg i miljøet. En steril vattpinne ble eksponert for luften i en operasjonssal hvor det ble gjennomført skulder-artroplastikk. Av 40 prøver ble 15% av prøvene positive for *Cutibacterium acnes*. Det var også funn av *Cutibacterium acnes* i samtlige negative kontrollprøver (15). Publikasjonen konkluderte med at oppveksten av *Cutibacterium acnes* enten hadde opphav fra luften i operasjonssalen, eller at prøvene ble kontaminert ved mottak på laboratoriet. Uavhengig av hvor bakterien kontaminerer prøvematerialet, gjør dette det vanskelig å skille mellom reelle funn og falske positive funn.

Basert på funnene gjort i studiet omtalt ovenfor og egne resultater ble det mistenkt at *Cutibacterium acnes* kontaminasjon stammer fra miljøet på laboratoriet eller reagenser fra kommersielle leverandører. Det ble undersøkt om reagenser fra ulike leverandører reagerer med reaksjonsblandingen for Metodeoppsett 3. Hensikten med utprøvingen var å undersøke forurensning av *Cutibacterium acnes* i reagenser fra kommersielle aktører. Det hadde foreligget mistanke om kontaminasjon, da negativ kontroll i repeterte oppsett har gitt positiv reaksjon med reaksjonsblandingen. Det ble derfor interessant å undersøke omfanget av kontaminering internt blant reagenser på laboratoriet, da reagenser fra kommersielle aktører normalt ikke skal ha forurensning. Det ble analysert et panel med ulike reagenser, hvor reagensene ble pipettert som prøvemateriale. For oppsettet ble positiv kontroll fortynnet til 1:10, og negativ kontroll bestod av kun reaksjonsblanding. De aktuelle reagenser er listet opp under punkt 2.2. Panelet ble analysert i to paralleller med Metodeoppsett 3 og utprøvd med 40 og 35 sykluser. Resultatene er vist i Figur 13a og b.



Figur 13a: Kontaminering i reagenser. Analysert med Metodeoppsett 3, 40 sykluser, på CFX96



Figur 13b: Kontaminering i reagenser. Analysert med Metodeoppsett 3, 35 sykluser, på CFX96.

Resultatene viser at det er positivt funn med flere reagenser fra reagenspanelet. Kurvene som ble positive ved nærmere 40 sykluser ble antatt å være et resultat av kontaminering av reagensene med lave konsentrasjoner av *Cutibacterium acnes*. Produktet fra PCR-analysen ble videre analysert på Bioanalyser, for å vurdere om amplifisert produkt faktisk skyldtes tilstedeværelse av *Cutibacterium acnes* i reagensene. Resultatene fra kapillærelektroforesen viste svake bånd i samme størrelsesorden som positiv kontroll i alle reagensene. Dette bekrefter mistanken om kontaminasjon av *Cutibacterium acnes* i miljøet. Ved bakteriell kontaminasjon av reagensene vil prøver som i utgangspunktet er negative tolkes som positive. Dette kan også gjelde reagenser som benyttes i analyseoppsettet. Kontaminasjon i reagenser fra kommersielle aktører er vanskelig å håndtere, da produksjonen av reagenser er utenfor AMMs kontroll. Kontaminasjon vil være et reelt problem og diagnostikken vil følgelig bli feil. Et mulig tiltak for å ta høyde for kontaminasjonen, er å benytte et PCR-program med færre antall sykluser. Ved å benytte et program med 35 sykluser vil analysen stanses før kontaminasjonen amplifiseres. Analyseoppsettet med 35 sykluser ble analysert på Bioanalyser, og sammenlignet med resultatet for oppsettet med 40 sykluser. Resultatet fra kapillærelektroforesen viste at svake bånd i samme størrelsesorden som positiv kontroll etter amplifikasjon over 40 sykluser, var fraværende ved 35 sykluser. Ved å fjerne de fem siste syklusene fra analysemetoden kan man dermed redusere faren for falske positive prøvesvar.

En annen metode som kan benyttes for å ta høyde for falske positive resultater er å sammenligne svakt positive prøver med negativ kontroll. Leverandøren Genesig har utviklet et kommersielt sett for påvisning av *Cutibacterium acnes*. I vedlegget tilhørende dette settet er det beskrevet at *Cutibacterium acnes* er kjent for å være til stede i luft og øvrig miljø. Negativ kontroll kan gi et sent positivt signal som følge av kontaminasjon fra miljøet. Leverandøren foreslår hvordan man skal tolke prøveresultater i analyseoppsett der miljøforurensning er tydelig. Når negativ kontroll er positiv med en Ct-verdi >30 , må prøver tolkes på nytt basert på prøvens kurve i forhold til negativ kontroll. Dersom prøven amplifiseres med > 3 Ct-verdier før negativ kontroll kan prøven tolkes som positiv og negativ kontroll verifiseres som negativ. Dersom prøven amplifiseres med < 3 Ct-verdier før negativ kontroll bør prøven tolkes som negativ (16). Basert på tidligere analyseoppsett, der det har blitt observert at negativ kontroll gir positivt funn, bør det vurderes om resultatene på positive prøver skal tolkes ved å sammenligne med negativ kontroll slik som settet fra Genesig foreslår.

3.10 Analyse av tilfeldige utvalgte 16S-prøver

Reaksjonsblandingen tilhørende Metodeoppsett 3 ble benyttet til analyse av 42 prøver som opprinnelig ble ekstrahert for analyse på 16S real-time PCR. Prøver som skal analyseres på 16S real-time PCR blir forbehandlet med enzymer som bidrar til nedbrytning av bakterier. Ved tilsetning av flere reagenser vil det være større sjanse for at prøven kontamineres. På denne bakgrunn var det interessant å

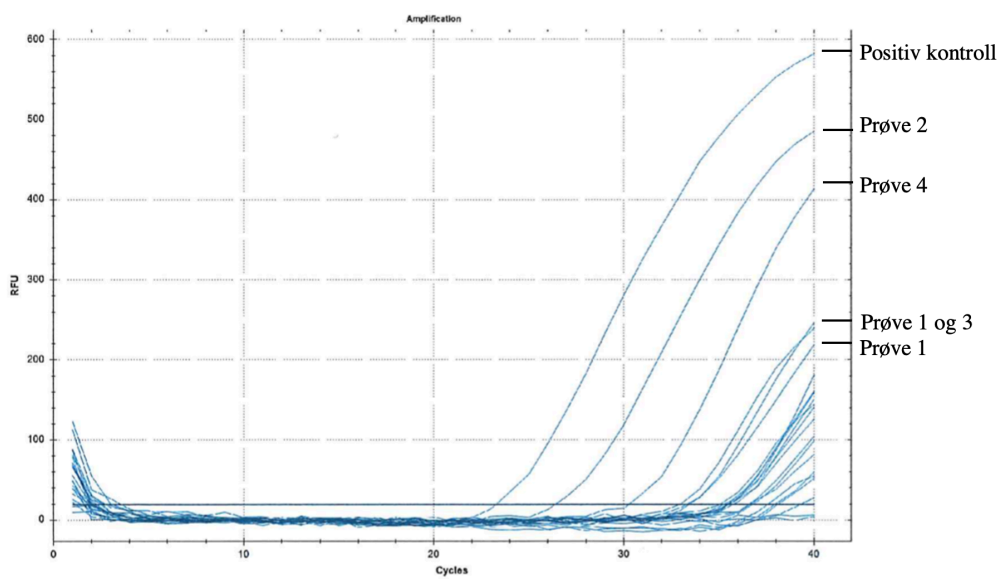
analysere 16S-prøvene med hensyn på *Cutibacterium acnes*. Sensitiviteten for 16S real-time PCR er også ukjent for enkelte bakterier. Det var derfor interessant å vurdere om en spesifikk PCR kunne påvise *Cutibacterium acnes* i prøver som tidligere hadde vist seg negative for 16S real-time PCR. Resultatene fra analysen er vist i Tabell 13, samt Figur 14a og b.

Tabell 13: Prøver som tidligere har blitt analysert ved 16S real-time PCR, med påviste mikrober ved dyrkning eller sekvensering. Prøvene er analysert med hensyn på *Cutibacterium acnes* med Metodeoppsett 3 på CFX96.

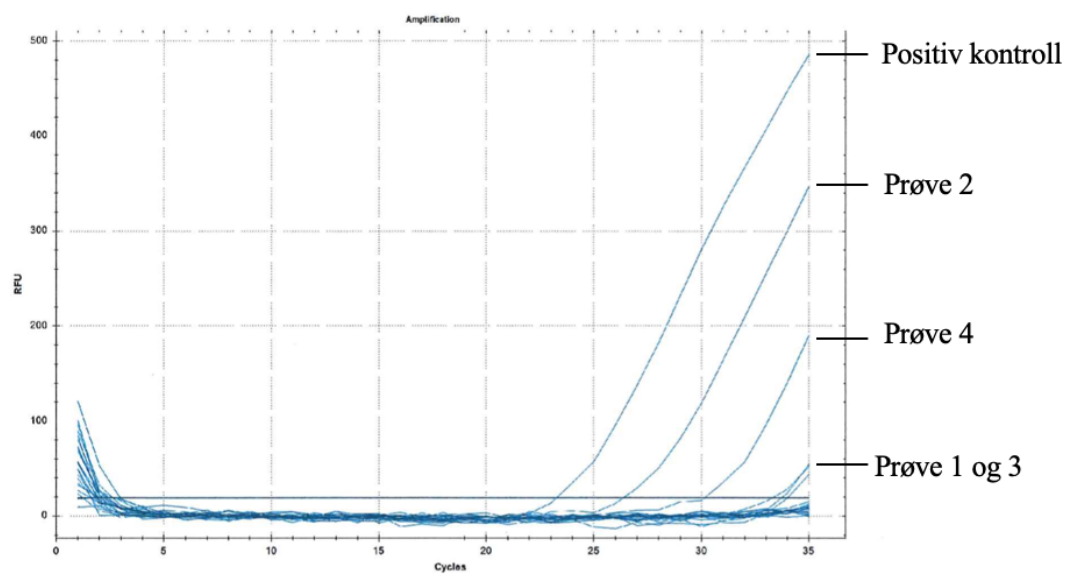
Prøve	Prøvemateriale	Resultat 16S	Funn	Ct-verdi Metodeoppsett 3, 40 sykluser
1	Perikardvæske (2 prøver)	Avbrutt	Dyrkning: <i>Streptococcus constellatus</i>	33,31 33,43
2	Vev, hud	Positiv	Sekvensering: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Corynebacterium</i>	26,37
3	Leddvæske	Negativ	Ingen funn	32,95
4	Rørprotese, aorta (2 prøver)	Inkonklusiv	Dyrkning: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Cutibacterium acnes</i>	30,26 35,25
5	Vev, ankel	Negativ	Ingen funn	35,74
6	Abscess, kne	Positiv	Sekvensering: <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia nematodiphila</i>	35,50
7	Vev, fot (4 prøver)	Negativ	Ingen funn	35,48 35,05 35,45 35,46
8	Protese Vev, aortaklaff	Positiv	Sekvensering: <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0,00 37,24
9	Abscess, kne	Negativ	Ingen funn	38,69

10	Leddvæske, kne	Negativ	Ingen funn	38,97
11	Vev, hjerte (8 prøver)	Negativ	Ingen funn	39,73 38,62 39,29 38,26 37,75 38,33 38,48 36,48
12	Spinalvæske (2 prøver)	Negativ	Ingen funn	37,24 39,58
13	Vev, finger (2 prøver)	Negativ	Ingen funn	35,40 38,46
14	Leddvæske, hofte	Avbrutt	Pneumolysin-positiv <i>(Streptococcus pneumoniae)</i>	0,00
15	Abscess	Negativ	Ingen funn	34,97
16	Vev, hjerteklaff	Negativ	Ingen funn	37,66
17	Implantat, aortaklaff	Positiv	Sekvensering: <i>Enterococcus faecalis</i>	38,59
18	Spinalvæske Spinalvæske/VP-shunt (2 prøver)	Inkonklusiv	Sekvensering: <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Prevotella oris</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i>	39,08 37,63
19	Abscess, Abdomen	Positiv	Sekvensering: <i>Proteus mirabilis</i>	36,62
20	Vev, ankel (2 prøver)	Negativ	Ingen funn	37,92 36,75

21	Fullblod, arteriekran	Positiv	Sekvensering: <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	0,00
22	Pleuravæske (2 prøver)	Positiv	Sekvensering: <i>Lactobacillus</i>	38,08 0,00
23	Vev, fot	Negativ	Ingen vekst	36,56
24	Leddvæske, albue	Negativ	Ingen vekst	37,55



Figur 14a: 16S prøver analysert med Metodeoppsett 3, 40 sykluser, på CFX96..



Figur 14b: 16S prøver analysert med Metodeoppsett 3, 35 sykluser, på CFX96.

De fleste pasientprøvene ble positive med 40 sykluser (Tabell 13), men med relativt høye Ct-verdier. Prøvene har i tillegg kurver som oppstår sent i reaksjonsløpet (Figur 14a). Til tross for positiv reaksjon, er det usikkert om funnene er reelle eller ikke. Grunnet mistenkt kontaminasjon bør prøvene sammenlignes med negativ kontroll, for å vurdere om det er et reelt positivt funn. Et annet alternativ er å benytte 35 sykluser, og da blir prøve 1, 2, 3 og 4 positive (Figur 14b). Ved sekvensering kan bakterier til stede i prøven bli «maskert» dersom andre bakterier er i høyere konsentrasjon. Dette kan være årsaken til at *Cutibacterium acnes* ikke ble funnet under sekvensering av vev fra hud (prøve 2, Tabell 12), men ved bruk Metodeoppsett 3 ble *Cutibacterium acnes* påvist i denne prøven. Prøve 4 (Tabell 12) ble positiv for *Staphylococcus aureus* og *Cutibacterium acnes* ved dyrkning. Det var god overensstemmelse med resultatene fremkommet ved spesifikk PCR. Prøve 1 og 3 fra henholdsvis perikardvæske og leddvæske ble svakt positive ved bruk av Metodeoppsett 3. Positivt funn i leddvæsken er særlig interessant, da denne prøven var negativ for 16S-PCR, og heller ikke hadde funn ved dyrkning.

3.11 Analyse av pasientprøve med oppvekst av *Cutibacterium acnes*

Det ble analysert en pasientprøve som ved dyrkning hadde moderat vekst av *Cutibacterium acnes*. Prøvematerialet var en dyp vevsprøve fra glutealregionen. Prøven var knust ved hjelp av en morter før dyrkning, og var tilnærmet en homogen væske. Forbehandlingen av vevsprøven før ekstraksjon omfattet tilsats av 800µl Animal Tissue Lysis buffer (ATL-buffer) og 80µl Proteinase K. Prøven ble videre forbehandlet og ekstrahert i henhold til prosedyren ved AMM (Vedlegg 8). Metoden for ekstraksjon ble vurdert som egnet selv om prosedyren i utgangspunktet var utviklet for *Helicobacter pylori*.

Tabell 14: Ct-verdier fra analyse av pasientprøve med oppvekst av *Cutibacterium acnes*. Analysert med Metodeoppsett 3 på CFX96.

Prøve	Metodeoppsett 3
Vev, sete	38,47
Negativ kontroll	38,57
Positiv kontroll	21,16

Pasientprøven som ble analysert hadde en Ct-verdi på 38,47 (Tabell 14). Ved å sammenligne med negativ kontroll, med Ct-verdi på 38,57, ble denne prøven tolket som negativ. Siden prøven hadde oppvekst av *Cutibacterium acnes* var det forventet at prøven også ville bli positiv på real-time PCR. Det er ukjent hvorfor prøven ble negativ, men det kan skyldes komponenter i prøven som virker inhiberende. PCR-inhibitorer omfatter kjemiske substanser som inngår i ulike prøvematerialer, avhengig av hvor prøven er hentet fra. Eksempelvis kan de kjemiske substansene inhibere

polymeraseaktiviteten eller danne komplekser med polymerase-enzymet (17). Det burde i tillegg vært utført real-time PCR på bakteriekolonien for å utelukke at primerne ikke detekterte stammen. Dette ble ikke gjennomført, da agarskålene tilhørende prøven hadde blitt kastet. For videre vurdering av metodens egnethet må det analyseres et større antall kliniske prøver.

3.12 Bestemmelse av deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen for metoden ble undersøkt for å kunne si noe om et minimum antall av bakterier i prøven som må til for å gi positivt utslag på PCR. Det ble satt opp en standardrekke av positiv kontroll med konsentrasjoner mellom 10^{-1} og 10^{-5} . Fortynningene ble tillaget ved tifolds fortynning og analysert ved bruk av PCR med reaksjonsblandingen tilhørende Metodeoppsett 3. Det ble analysert tolv paralleller av fortynningene 10^{-1} og 10^{-2} , og 20 paralleller med de resterende fortynninger ned til 10^{-6} . Basert på resultatet fra dette oppsettet var det forventet at deteksjonsgrensen ville ligge i området mellom 10^{-5} og 10^{-6} . Instrumentet NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer ble brukt for å måle DNA-konsentrasjonen og resultatet er vist i Tabell 15. Avlesningsbølgelengden ble satt til 260 nm, da nukleinsyrer har absorbansmaksimum ved denne bølgelengden. Ufortynnet eluat ble analysert i tre paralleller hvor det ble benyttet 1,5 µL for hver måling. Et estimat av antall molekyler i prøven ble beregnet ved hjelp av DNA-konsentrasjon og kjent størrelse på bakteriens genom. Genomstørrelsen på *Cutibacterium acnes* er 2,560,265 basepar (18) og målgenet for PCR reaksjonen finnes i én kopi i genomet. Gjennomsnittlig molekylvekt per basepar er 660 pg/pmol.

Tabell 15: DNA-konsentrasjon i ufortynnet *Cutibacterium acnes* eluat, analysert på NanoDrop 1000.

Parallell	Konsentrasjon
1	23,8 ng/µl
2	24,0 ng/µl
3	23,4 ng/µl
Gjennomsnitt	23,7 ng/µl

Det ble først funnet estimert molekylvekt for genomet basert på genomstørrelsen til *Cutibacterium acnes*. Deretter ble mengden molekyler (pmol) i én PCR-reaksjon med 5 µl eluat beregnet. Videre ble antall molekyler beregnet ved hjelp av Avogadros' tall (N_A). Dette ble gjort ved følgende beregninger:

$$2,6 \times 10^6 bp \times 660 pg / (pmol \times bp) = 17,16 \times 10^8 pg / pmol$$

$$5 \mu l \times 23,7 \times 10^3 pg / \mu l = 1,18 \times 10^5 pg$$

$$\frac{1,18 \times 10^5 \text{ pg}}{17,16 \times 10^8 \text{ pg/pmol}} = 6,876 \times 10^{-5} \text{ pmol}$$

$$6,876 \times 10^{-5} \text{ pmol} \times 10^{-12} = 6,876 \times 10^{-17} \text{ mol}$$

$$N_A = 6,0221415 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$6,876 \times 10^{-17} \text{ mol} \times 6,0221415 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 4,14 \times 10^7$$

Antall molekyler i én PCR-reaksjon ble benyttet for å beregne antall molekyler ved deteksjonsgrensen. Positiv kontroll i fortytning 1:10 ble benyttet som laveste fortytning. Basert på resultatet fra standardrekken ble det anslått at siste detekterbare prøve er ved fortytning mellom 1:10⁵ og 1:10⁶. Antall molekyler ved nevnte fortytningene ble beregnet:

Første fortytning, 1:10:

$$\frac{4,14 \times 10^7}{10^1} = 4,14 \times 10^6$$

Siste fortytning, mellom 1:10⁵ og 1:10⁶:

$$\frac{4,14 \times 10^7}{10^5} = 4,14 \times 10^{-2} = 414$$

$$\frac{4,14 \times 10^7}{10^6} = 4,14 \times 10^{-2} = 41,4$$

Basert på beregningene ble det funnet at deteksjonsgrensen for *Cutibacterium acnes* ligger i området mellom 41,4 og 414 molekyler per PCR-reaksjon. For å finne 95% konfidensintervall for deteksjonsgrensen ble det utført Probit analyse i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (19), som er en programvare for statistiske beregninger. Det ble utført tofolds fortytning med fem ulike konsentrasjoner mellom 10⁻⁵ og 10⁻⁶ for å anslå nedre deteksjonsgrense. Tolv paralleller av fortytningene 10⁻³ og 10⁻⁴, og 20 paralleller av fortytningene mellom 10⁻⁵ og 10⁻⁶ ble analysert med Metodeoppsett 3. Antall positive prøver for hver av fortytningene (Tabell 16) ble benyttet for å beregne deteksjonsgrensen ved hjelp av SPSS.

Tabell 16: Utprøving av deteksjonsgrense. Analysert med Metodeoppsett 3 på CFX96.

Fortynning	Antall positive	Antall replikater	Kopier/PCR
1:10 ³	12	12	40 000
1:10 ⁴	12	12	4 000
1:10 ⁵	20	20	400
1:0,25*10 ⁵	20	20	320
1:0,125*10 ⁵	19	20	160
1:0,062*10 ⁵	17	20	80
1:10 ⁶	13	20	40

Resultatet fra Probit-analysen er vist i Vedlegg 9. Med konfidensnivå på 95% har metoden en deteksjonsgrense på 171,2 kopier/PCR.

4 Diskusjon

Målet med denne oppgaven var å etablere en real-time PCR for påvisning av *Cutibacterium acnes*.

Den etablerte metoden for påvisning av bakterien er 16S real-time PCR etterfulgt av sekvensering eller dyrkning. Både dyrkning og sekvensering er tidkrevende metoder med sine svakheter. Ved lang transporttid eller feil oppbevaring av prøvematerialet, kan *Cutibacterium acnes* dø som følge av eksponering for oksygen i luft. Dette resulterer i manglende eller redusert vekst. Prøver som analyseres på 16S-real-time PCR blir positive dersom prøven inneholder bakterielt DNA, og metoden er derfor ikke spesifikk. Prøvene må videre sekvenseres for å artsbestemme bakterien. Ved sekvensering av en prøve som inneholder flere bakterier kan *Cutibacterium acnes* maskeres av bakteriene som finnes i høyere konsentrasjoner. En spesifikk real-time PCR for påvisning av *Cutibacterium acnes* vil dermed være gunstig tatt kostnadseffektivitet, spesifisitet og tidsbruk i betraktning.

Det ble utprøvd spesifikke primere og prober fra ulike leverandører, definert som Metodeoppsett 1, 2 og 3 (beskrevet under punkt 2.2). Metodeoppsett 3 hadde bedre resultater enn Metodeoppsett 1 og 2 ved flere av utprøvingene, og er derfor det mest egnede metodeoppsettet for påvisning av *Cutibacterium acnes*. Resultatene av utprøvingene som ble gjennomført viste at de valgte sekvensene for primere og probe var godt egnet for påvisning av bakterien. Med Metodeoppsett 3 påviste vi *Cutibacterium acnes* i en hudprøve, leddvæske og perikardvæske, som ikke var påvist tidligere ved sekvensering eller dyrkning. Våre resultater viser at metoden er sensitiv for *Cutibacterium acnes*. Ved 95% konfidensintervall ble deteksjonsgrensen satt til 171,2 kopier/PCR. Det hadde vært ønskelig å oppnå en lavere deteksjonsgrense. En svakhet i bestemmelsen av deteksjonsgrense er at vi kun har benyttet 20 paralleller, mens det ideelle hadde vært å benytte nærmere 100 paralleller ved bestemmelse av deteksjonsgrensen. Innenfor prosjektperioden var det ikke mulighet til å gjennomføre dette.

Cutibacterium acnes er en bakterie som er kjent for å være til stede i luft og øvrig miljø. Basert på våre resultater ble det konkludert med at kontaminasjon av reagenser og prøver vil være vanskelig å unngå, og må tas høyde for ved vurdering av resultater. Kontaminering kan føre til at en prøve som i utgangspunktet er negativ blir falsk positiv, og kan resultere i at pasienten feildiagnostiseres og derfor feilbehandles. Det er to måter å kompensere for falske positive resultater som følge av kontaminasjon. De fem siste syklene kan fjernes fra analysen, og på denne måten kamuflere kontaminasjon, eller resultatet kan sammenlignes med negativ kontroll.

Basert på resultatene i dette prosjektet kan det konkluderes med at metoden vår kan tas i bruk ved sykehuslaboratoriet. Det anbefales imidlertid ytterligere utprøving av metoden før den tas i bruk.

Utprøvingen kan inkludere sammenligning over tid mellom 16S real-time PCR og den spesifikke PCR-en, og/eller sammenligning med et annet laboratorium som utvikler en tilsvarende metode. Det bør analyseres flere pasientprøver for validering av metoden, da denne utprøvingen kun omfattet 43 pasientprøver. Det er også ønskelig med en lavere deteksjonsgrense enn det som ble oppnådd for å øke metodens sensitivitet. Videre arbeid bør omfatte bruk av flere paralleller for å fastslå deteksjonsgrensen. Vurdering av inhiberende stoffer i ulike prøvematerialer kan være aktuelt å utføre. Dette kan gjøres med å ekstrahere to like prøver parallelt, hvor en kjent mengde bakterier er tilsatt i én av prøvene. Interferensens betydning vurderes basert på resultatet fra analyse av begge prøvene. Denne bacheloroppgaven vil benyttes som grunnlag for videre validering.

Referanseliste

1. Elston MJ, Dupaix JP, Opanova MI, Atkinson RE. Cutibacterium acnes (formerly Propionibacterium acnes) and Shoulder Surgery. Hawaii J Health Soc Welf. november 2019;78(11 Suppl 2):3–5.
2. Felix Montero-Julian. Cutibacterium Acnes Gram Positive Bacteria Causing Infection | bioMérieux industrial microbiology [Internett]. 2020 [sitert 15. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.biomerieux-industry.com/pharma-healthcare/resources/pharma-microorganisms-library/2020-02-25-cutibacterium-acnes-gram>
3. Kazumasa Fukuda, Midori Ogawa, Hatsumi Taniguchi, Mitsumasa Saito. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. I: Journal of UOEH. Department of Microbiology, School of Medicine University of Occupational and Environmental Health; 2016.
4. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods. 1. mai 2007;69(2):330–9.
5. Heidi Kristine Grønlien, Leif Ryvarden, Cato Tandberg. Bi2: grunnbok biologi Vg3. 2 utg. Gyldendal Undervisning; 2014.
6. Bio-Rad Laboratories, Inc. What is Real-Time PCR (qPCR)? [Internett]. [sitert 10. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
7. Greg T. Hermanson. Bioconjugate Techniques. 3. utg. Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; 2013.
8. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, mfl. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res. 15. januar 2000;28(2):655–61.
9. Sean R. Gallagher, Emily A. Wiley. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
10. Agilent Technologies. Agilent 2100 Bioanalyzer System, 2100 Expert Software User's Guide [Internett]. ©Agilent Technologiess, Inc. 2000-2020; 2020. Tilgjengelig på: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/2100_Bioanalyzer_Expert_USR.pdf
11. United States National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [Internett]. [sitert 22. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
12. Primer Design with Oligo Primer Analysis Software v. 7 [Internett]. [sitert 22. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.oligo.net/>
13. Larry J. Kricka, Jason Y. Park. Tietz fundamentals of chlinical chemistry and molecular diagnostics. Chapter 48: Molecular Techniques. 8. utg. Elsevier; 2019.

14. Michael McPherson, Simon Møller. PCR, Second Edition. Second Edition. Taylor & Francis Group; 2006.
15. Namdari S, Nicholson T, Parvizi J. Cutibacterium acnes is Isolated from Air Swabs: Time to Doubt the Value of Traditional Cultures in Shoulder Surgery? Arch Bone Jt Surg. juli 2020;8(4):506–10.
16. Genesig, Kits by Primerdesign. Propionibacterium acnes, genesig Standard Kit handbok [Internett]. 2018. Tilgjengelig på: https://www.genesig.com/assets/files/p_acnes_std.pdf
17. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol. november 2012;113(5):1014–26.
18. Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, mfl. The Complete Genome Sequence of Propionibacterium Acnes, a Commensal of Human Skin. Science. 30. juli 2004;305(5684):671–3.
19. SPSS Statistics [Internett]. 2021 [sitert 10. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.ibm.com/no-en/products/spss-statistics>

Vedlegg

- Vedlegg 1: Reagensvedlegg forward primer fra TIB Molbiol
- Vedlegg 2: Reagensvedlegg, revers primer fra TIB Molbiol
- Vedlegg 3: Reagensvedlegg, TaqMan probe fra TIB Molbiol
- Vedlegg 4: Reagensvedlegg, forward og revers primere fra Invitrogen
- Vedlegg 5: Reagensvedlegg, TaqMan og TaqMan MGB probe fra Applied Biosystems UK
- Vedlegg 6: Reagensvedlegg, PerfeCta™ Multiplex qPCR SuperMix, UNG fra Quanta
- Vedlegg 7: PCR-programmer
- Vedlegg 8: Helicobacter Pylori, forbehandling og ekstraksjon til PCR
- Vedlegg 9: SPSS Probit analyse for deteksjonsgrense

Vedlegg 1: Reagensvedlegg forward primer fra TIB Molbiol

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



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

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

Orders, quotes
 dma@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2080468 **C.acnes_F**
 TIB reference no : 021103251 18-mer 17.02.2021

5'- ggg TgC TCg AgT ggC gAA

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

128,4 nmol / 128,4 µM

Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer 1yo

no

A: 3 G: 9 C: 3 T: 3 total 18

Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 66.7 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ε

200040 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH₄⁺

5910,2 g / mol

Molecular weight free acid :

5620,7 g / mol

Picomoles per OD₂₆₀

4999,0 pmol / OD

Micrograms per OD₂₆₀

29,5 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

25,7 OD

Molar amount :

128,4 nmol

Amount in µg mass units :

758,7 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

128,4 µM (pmol / µl)

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

6419 µl

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

2567 µl

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

1284 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

0,759 µg / µl

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

1 : 1517 dilution factor from a 1 ml solution

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

7587 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

62,0 °C

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

58,5 °C

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

60,0 °C

Melting point GC-content rule

57,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS -147,6 / -594,9 / -1501,0 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

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

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



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

Geschäftsführer (CEO): Olof Landt
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT-No.: DE 814 018 770 | IB code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 DUNS no. 312829815 | ILN 4260159330007 | EORI-No. DE 4806433

Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE56 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC COMDE33

Vedlegg 2: Reagensvedlegg, revers primer fra TIB Molbiol

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Ereshburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Ereshburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin

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

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2080469 **C.acnes_R**
 TIB reference no : 021103251 19-mer 17.02.2021

5' - AA_g CT_g ATA AgC C_gC gAg T

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

131,5 nmol / 131,5 µM

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

A : 6 G : 6 C : 4 T : 3 total 19

Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 52,6 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ

216660 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH₄

6168,5 g / mol

Molecular weight free acid :

5862,0 g / mol

Picomoles per OD₂₆₀

4615,5 pmol / OD

Micrograms per OD₂₆₀

28,5 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀

28,5 OD

Molar amount :

131,5 nmol

Amount in µg mass units :

811,4 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

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

131,5 µM (pmol / µl)

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

6577 µl

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

2631 µl (To prepare stock solutions of
 1315 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :

0,811 µg / µl

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

1 : 1623 dilution factor from a 1 ml solution

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

8114 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

57,1 °C

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

53,6 °C

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

58,0 °C

Melting point G/C-content rule

53,6 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -146,4 / -638,0 / -1649,4 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

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

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



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

Geschäftsführer (CEO): Olfert Land
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 | IS code: 2934 9990 / for kits 3812 0000
 DUNS no. 312829815 | ILN 426015930097 | EDI No. DE 4806435

Commerzbank, Kopenstrasse 95, D-10243 Berlin
 IBAN DE44 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC CODES DE 24 100

Vedlegg 3: Reagensvedlegg, TaqMan probe fra TIB Molbiol

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin

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

Product Description no. 2080470 **C.acnes_TM**
 TIB reference no : 021103251 22 - mer 17.02.2021

5' - 6FAM-AAC CTg CCC TTC gAC TTT ggg A--BHQ1

Amount / Concentration for product of 1 ml 22,7 nmol / 22,7 µM
 Synthesis scale and purification : Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TMA 5.0 OD ly
 no
 5-Modifications : A: 4 G: 5 C: 7 T: 6 total 22
 Number of bases : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 54,5 %
 Wobble bases and GC content :

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ 220600 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺ 7044,1 g / mol
 Molecular weight free acid : 6686,4 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 4533,1 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 31,9 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 5,0 OD
 Molar amount : 22,7 nmol
 Amount in µg mass units : 159,7 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution : 22,7 µM (pmol / µl)
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 1133 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 453 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 227 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,160 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 319 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 1597 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 63,4 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 59,9 °C
 Melting point G/C-content rule 68,0 °C
 Melting point G/C-content rule 59,2 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

ΔG / ΔH / ΔS -173,7 / -732,7 / -1875,8 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUP Code)

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



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

Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 | HS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 DUNS no. 312829815 | EIN 4260159350007 | EORI-No. DE 4806433

Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10245 Berlin
 IBAN DE56 1008 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC COBS DE 33

Vedlegg 4: Reagensvedlegg, forward og revers primere fra Invitrogen

ST OLAVS HOSPITAL HF
Order Number: 633025 87
Order Date: 15/02/2021

Invitrogen Custom Primers
Certificate of Analysis

Primer 1:

Primer Name: C.acnes_F
 Researcher: Sidsel
 Sequence (5' to 3'): GGG TGC TCG AGT GGC GAA
 Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 5621.6
 Micromolar Extinction Coeff($\text{OD}/\mu\text{mol}$): 202.2

Purity	Desalted
Tm (1 M Na+)	71
Tm (50 mM Na+)	50
% GC	67

Notes:

Primer Number: Y6235D08 (D08)
 Primer Length: 18
 Scale of Synthesis: 25n mol

μg per OD:	27.8
nmoles per OD:	5.0
OD's	9.00
$\mu\text{g's}^*$	250.22
nmoles	44.6
Coupling Eff.	99%

Primer 2:

Primer Name: C.acnes_R
 Researcher: Sidsel
 Sequence (5' to 3'): AAG CTG ATA AGC CGC GAG T
 Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 5862.8
 Micromolar Extinction Coeff($\text{OD}/\mu\text{mol}$): 220.1

Purity	Desalted
Tm (1 M Na+)	68
Tm (50 mM Na+)	46
% GC	53

Notes:

Primer Number: Y6235D09 (D09)
 Primer Length: 19
 Scale of Synthesis: 25n mol

μg per OD:	26.6
nmoles per OD:	4.5
OD's	10.20
$\mu\text{g's}^*$	271.70
nmoles	46.3
Coupling Eff.	98%

250 μg i 100 μmol .

FOR LABORATORY RESEARCH USE ONLY.

CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.


invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Using the nanomole quantity - to reconstitute to a given concentration, convert the nmole figure to umole, and then divide by the desired concentration in umole/litre. For example, to make a 100 umole primer stock solution, assuming 24nmole yield:

$24\text{nmole} \times 1\mu\text{mole}/1000\text{nmole} = 0.024\ \mu\text{mole}$
 $0.024\mu\text{mole}/100\mu\text{mole}/\text{litre} = 0.00024\ \text{L}$
 $0.00024\ \text{L} \times 1000\text{mL} = 0.24\text{ml}$ or 240ul

* Other supporting information available on-line.

Vedlegg 5: Reagensvedlegg, TaqMan og TaqMan MGB probe fra Applied Biosystems UK

	Applied Biosystems UK. 3 Fountain Drive Inchinnan Renfrewshire PA4 9RF	Page : 1
		Despatch Note Despatch Note No. 288556 Oligos this shipment 2 of 2
Customer Sidsel Krokstad Institute ST OLAVS HOSPITAL HF Customer No. 6601 Delivery Address 69038230 ERLING SKJALGSSONS GATE 1 TRONDHEIM NORWAY 7006	Purchase Order No. 49033508 Despatch Date : 22/02/2021 Order Received: 00/00/00 Delivery Method CUR AB Order No. 380104 0007467443	Urgency 7-10D

Oligo Ref.	Item No	Part No.	Delivered End Product	Dye	MS QC Passed*	HPLC	Lyoph	Length	Mol Wt	Concn/Amount
C.acnesMGB 2654341	10 1.1	4316033	MGB PROBE, 20nmol Sequence AAC CTG CCC TTC GAC TTT GGG A	6-FAM MGBNFG	Yes	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	22	8344	100 µM
C.acnesTM 2654342	20 2.1	450024	TAMRA PROBE, 20nmol Sequence AAC CTG CCC TTC GAC TTT GGG A	6-FAM	Yes	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	22	7831	100 pmol/µL

Vedlegg 6: Reagensvedlegg PerfeCta™ Multiplex qPCR SuperMix, UNG fra Quanta



PerfeCta™ Multiplex qPCR SuperMix, UNG

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

Store at -20°C protected from light

Description

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

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

Instrument Compatibility

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

Components

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

Storage and Stability

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

Guidelines for Multiplex qPCR:

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

Vedlegg 7: PCR-programmer

PCR-programmer

Merket med * der avlesning av fluorescens avleses

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

Roche programmer for hybridiseringsprober (FRET) er lagt inn på hver analyse.

Vedlegg 8: Helicobacter Pylori, forbehandling og ekstraksjon til PCR

Helicobacter pylori, forbehandling og ekstraksjon til PCR.

Forfatter: Elise Størvold Damås, An-Magritt Stjern Flakne
Godkjent av: Vibeke Lystad

Gyldig fra: 13.08.2020
Revisjonsfrist: 12.08.2025

Revisjon: 1.10
ID: 9350

Hensikt og omfang

Prosedyren gjelder bioingeniører som jobber i prøvemottak AMM ved seksjon diagnostikk, og skal sikre riktig forbehandling og ekstraksjon av biopsier til Helicobacter pylori PCR.

Arbeidsbeskrivelse

Reagenser

- Nuclisense Lysisbuffer (Guanidine thiocyanate)
- Proteinase K (20mg/ml)
- Saltvann (0,9 % NaCl)

Lysering

Lysering før ekstraksjon utføres hver mandag og torsdag (eller etter behov).

- Prøvematerialet tines og ristes på vortex-mixer
- Sentrifuger i 5 min v/2060 rcf (tilsvarer 2000g) på eppendorf centrifuge 5417R
- Supernatanten tas av og kastes
- Tilsett 500µl Nuclisens lysisbuffer + 50µl Proteinase K
- Vortex
- Sentrifuger kort
- Inkuber v/55 °C med resting over natt på varmeblokk Eppendorf ThermoMixerC
- Signer på sjekklisten ([Prøvemottak AMM, sjekkliste](#)). Sjekklisten henger på kjøleskap i prøvemottak AMM (rom 232.03.018).
- Dokumenter forbehandlingen i *resultatoppføring*
 - Scann aktuelle prøver
 - Klikk på *X-forbehandling og ekstraksjon* under maler til venstre i bildet
 - Klikk på rediger
 - På linjen til *forbehandling* skrives U for utført, trykk deretter på kommentarfeltet tilhørende linjen. Skriv inn .fbpyl etterfulgt av enter.
 - Klikk på lagre, sjekk at alle prøvene er haket av, klikk deretter på godta.

Ekstraksjon

Ekstraksjon for PCR utføres hver tirsdag og fredag (eller etter behov) på NucliSENS easyMAG ekstraktor.

- Prøvematerialet sentrifugeres kort ned. Dette for å fjerne eventuell prøvemateriale fra korken.
- Bland prøvematerialet godt med pipettespissen før det overføres 500µl til brønn i prøvekassetten.
- Følg videre prosedyre for [NucliSens easyMAG](#)
- Elueringsvolum: 55µl
- Eluatkork merkes med HP

Vedlegg 9: SPSS Probit analyse for deteksjonsgrense

	Probability	95% Confidence Limits for Kopier		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	1.426	.002	6.880
	.020	1.981	.005	8.456
	.030	2.441	.008	9.641
	.040	2.855	.012	10.643
	.050	3.244	.017	11.536
	.060	3.616	.022	12.357
	.070	3.977	.029	13.126
	.080	4.331	.036	13.856
	.090	4.680	.044	14.556
	.100	5.027	.053	15.233
	.150	6.755	.115	18.404
	.200	8.543	.212	21.414
	.250	10.450	.358	24.414
	.300	12.523	.572	27.499
	.350	14.809	.883	30.744
	.400	17.363	1.332	34.230
	.450	20.253	1.978	38.049
	.500	23.565	2.911	42.324
	.550	27.420	4.272	47.228
	.600	31.983	6.280	53.033
	.650	37.499	9.287	60.196
	.700	44.345	13.869	69.577
	.750	53.140	20.949	83.020
	.800	65.003	31.863	105.180
	.850	82.211	48.008	149.956
	.900	110.477	70.500	267.239
	.910	118.650	76.040	312.577
	.920	128.216	82.113	372.579
	.930	139.627	88.882	454.315
	.940	153.576	96.602	569.915
.950	171.194	105.680	741.902	
.960	194.491	116.819	1016.765	
.970	227.521	131.380	1506.521	
.980	280.271	152.550	2557.983	
.990	389.319	191.158	5950.653	