



**FAKULTET FOR NATURVITENSKAP**

**Institutt for bioingeniørfag**

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

**Validering av primersett for påvisning av  
bakterier ved universell 16S rRNA-gen PCR**

**Validation of primer sets for the detection of  
bacteria by universal 16S rRNA gene PCR**

*Av / by*

Karoline Ruud Dahlen og Guro Kristin Kirkaune Bonesmo

**Trondheim, 2021**

## Forord

Bacheloroppgaven ble gitt av Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital i Trondheim i forbindelse med faget HBIO3001 Bacheloroppgave i bioingeniørfag. Oppgaven er skrevet ved Institutt for Bioingeniørfag ved Fakultet for Naturvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Arbeidet med oppgaven foregikk i perioden mars til mai 2021.

I tilknytning til arbeid med bacheloroppgaven ønsker vi å takke fagansvarlig bioingeniør Elisabeth Westerhus, spesialbioingeniør Janne Fossum Malmring og overlege/professor Kåre Bergh for god faglig hjelp og en helhetlig veiledning under arbeidsprosessen med bacheloroppgaven. I tillegg vil vi takke de for all hjelp og tips i tilknytning til tolkning av oppnådde resultater. Vi ønsker også å rette en takk til førsteamanuensis Randi Utne Holt (NTNU) og universitetslektor Kine Husteli Kristiansen (NTNU) for veiledning og hjelp under skriving av oppgaven. I tillegg vil vi takke Avdeling for medisinsk mikrobiologi for bruk av reagenser, utstyr og lokaler under arbeidsperioden. En takk rettes også til øvrige ansatte ved AMM for all hjelp underveis i prosessen.

Trondheim, 20.05.2021

Guro K.K. Bonesmo

GURO KRISTIN KIRKAUNE BONESMO

Karoline Ruud Dahlen

KAROLINE RUUD DAHLEN

## Sammendrag

Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital i Trondheim benytter en universell 16S rRNA-gen PCR-analyse på pasientprøver for identifisering av bakterier som i mindre grad lar seg påvise ved dyrkning. Kjente problemer ved denne metoden er kontaminasjon av bakterier i reagenser og uønsket amplifisering av humant DNA. Disse problemene kan påvirke metodens spesifisitet og sensitivitet, og gjøre det vanskelig å tolke resultatene. Primersettet som avdelingen for medisinsk mikrobiologi benytter i dag ved 16S rRNA-gen PCR viser kryssreaktivitet med humant DNA, og avdelingen ønsker å ta i bruk nye primersett som unngår denne kryssreaktiviteten. Det ble kjøpt to nye primersett (966F og DPO) som ble sammenliknet med rutineprimerne som i dag benyttes ved avdelingen. Ti pasientprøver ble analysert ved 16S rRNA-gen PCR med de tre primersettene. Ved kapillær gelelektroforese ble det undersøkt om primersettene ga kryssreaktivitet med humant DNA, før prøvene ble sekvensert for å bestemme PCR-produktenes baseparasekvens. Resultatene fra analysering med rutineprimerne viste kryssreaktivitet med humant DNA i seks av ti prøver, mens bruk av 966F- og DPO-primersett ikke ga kryssreaktivitet i noen av prøvene. 966F-primersettet detekterte derimot bakterien *Cutibacterium acnes* i reagenser, noe de andre primersettene ikke gjorde. Ved bruk av DPO-primersettet var det mulig å påvise bakterien *Streptococcus dysgalactiae* i én prøve som de andre primersettene ikke detekterte noen bakterier i. DPO-primersettet viser en høy grad av spesifisitet ved å unngå amplifisering av humant DNA. DPO-primere viste også en høyere sensitivitet sammenliknet med de to andre primersettene, da de dette primersettet detekterte lavere konsentrasjoner av *S. aureus*. Dette er noe som bør undersøkes ytterligere med tanke på mulig fortynningsfeil. En overgang til å benytte DPO-primere i avdelingens 16S rRNA-gen PCR-analyser ser ut til å minimere risikoen for kryssreaktivitet med humant DNA i prøven. Primere med høy spesifisitet vil forbedre kvaliteten av sekvenseringsresultatene, og derved øke muligheten for å kunne identifisere bakterier. Bruk av DPO-primere vil ha særlig betydning ved analyse av pasientprøver med bakterier som er utfordrende å påvise med andre analysemetoder.

## Abstract

A broad-range 16S rRNA-gene PCR, used on clinical samples, is an applied method at The Department of medical microbiology at St. Olavs hospital in Trondheim. Known problems associated with this method include PCR-contamination from reagents, as well as cross reactivity from human DNA in samples. These problems may affect the specificity and sensitivity of the method, making it more complicated to interpret the results. The currently used primer set at the Department of medical microbiology shows cross reactivity with human DNA. The department therefore wants to include new primer sets that avoids this cross reactivity. Two new primer sets (966F and DPO) were bought and compared with the currently used primer set. Using the three primer sets, a total of ten samples were analysed by 16S rRNA-gene PCR. The PCR products were then checked for cross reactivity with human DNA by capillary gel electrophoresis before sequencing. The sequencing determined the base pair sequence of the product. The currently used primer set showed cross reactivity with human DNA in six out of ten samples, whereas the 966F primer set and DPO showed no signs of cross reactivity at all. On the other hand, the 966F primer set showed amplification of the bacteria *Cutibacterium acnes* due to contamination of the reagents. In addition, DPO detected *Streptococcus dysgalactiae* in a sample defined as negative by the other two primer sets. The DPO primer set showed high specificity by avoiding reactivity with human DNA in the clinical samples. DPO also showed better sensitivity compared to the two other primer sets, by detecting lower concentrations of *S. aureus*. However, this is something that should be more thoroughly investigated due to possible dilution errors. Transitioning to the DPO primers will minimize the risk of cross reactivity and thereby improve the quality of the sequencing results. The use of DPO primers will be of particular importance in the analysis of clinical samples containing bacteria that are challenging to identify using other methods.

# Innholdsfortegnelse

FORORD .....	I
SAMMENDRAG.....	II
ABSTRACT.....	III
FORKORTELSER OG BEGREPER.....	VI
1 INNLEDNING.....	1
1.1 EN UNIVERSELL METODE FOR Å PÅVISE BAKTERIELT DNA .....	1
1.1.1 Oppbygning av 16S rRNA-genet.....	1
1.1.2 Utfordringer med å benytte 16S rRNA-genet til identifikasjon av bakterier .....	2
1.2 OPPFORMERING AV DNA VED BRUK AV PCR.....	3
1.2.1 Deteksjon av PCR produkt ved bruk av SYBR Green .....	4
1.2.2 Amplifikasjon av DNA og dannelse av fluorescenssignal under real time PCR.....	4
1.2.3 Bruk av smeltepunktsanalyse for å vurdere PCR-produkt .....	5
1.3 PRIMERE; KONVENSJONELLE PRIMERE OG DUAL PRIMING OLIGONUCLEOTIDE (DPO) .....	6
1.3.1 Fordeler med DPO-primere.....	7
1.4 BRUK AV KAPILLÆR ELEKTROFORESE FOR EVALUERING AV PCR-PRODUKT.....	8
1.5 IDENTIFISERING AV BAKTERIER FRA 16S RRNA-GEN PCR .....	9
1.6 HENSIKT MED OPPGAVEN.....	10
2 MATERIALE OG METODE.....	11
2.1 PRØVE- OG KONTROLLMATERIALE .....	11
2.2 PCR-PRIMERE .....	13
2.3 REAGENSER.....	14
2.4 KRAV TIL POSITIV PRØVE VED 16S RRNA-GEN PCR OG SEKVENSERING.....	14
2.5 PRØVEOPPARBEIDELSE .....	15
2.5.1 Enzymbehandling og ekstraksjon av bakteriekulturer .....	15
2.5.2 Enzymbehandling og ekstraksjon av humant prøvemateriale tilsatt bakterier .....	16
2.6 PCR-PROGRAM BENYTTET VED 16S RRNA-GEN PCR .....	16
2.7 KAPILLÆR ELEKTROFORESE OG SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT .....	17
2.7.1 Rensing av PCR-produkt og sekvenseringsreaksjonen .....	17
2.7.2 Rensing av sekvenseringsprodukt .....	18
2.7.3 Sekvensering av PCR-produkt .....	18
2.8 EVALUERING AV PRIMERSETTENES SENSITIVITET .....	18

3	RESULTATER .....	19
3.1	OPTIMALISERING AV PCR-PROGRAM .....	19
3.2	PRIMERSETTENES EVNE TIL Å DETEKTERE 16S rRNA-GENET I ET BREDT SPEKTER AV BAKTERIEARTER.....	19
3.3	PRIMERSETTENES SENSITIVITET.....	22
3.4	KAN TILSTEDEVÆRELSE AV PASIENTMATERIALE PÅVIRKE PRIMERSETTENES DETEKSJON AV BAKTERIER? .....	22
3.5	PRIMERSETTENES SPESIFISITET .....	25
	3.5.1 <i>Elektroforeseresultat</i> .....	26
	3.5.2 <i>Sekvenseringsresultat</i> .....	27
4	DISKUSJON.....	29
4.1	OPTIMALISERING AV PCR-PROGRAM .....	29
4.2	PRIMERSETTENES EVNE TIL Å DETEKTERE ET BREDT SPEKTER AV BAKTERIEARTER .....	30
4.3	PRIMERSETTENES SENSITIVITET.....	31
4.4	INHIBISJON VED TILSTEDEVÆRELSE AV HUMANT PRØVEMATERIALE.....	33
4.5	PRIMERSETTENES SPESIFISITET .....	34
	4.5.1 <i>Konsekvenser ved kryssreaktivitet med humant DNA og bakteriell forurensning av reagenser</i> .....	35
	4.5.2 <i>Problematikk tilknyttet krav til identifikasjon av bakteriearter</i> .....	36
4.6	KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID .....	37
5	KILDER.....	39
6	VEDLEGG.....	42
	VEDLEGG 1 – ENZYMBEHANDLING AV GRAM POSITIVE BAKTERIER FØR EKSTRAKSJON.....	42
	VEDLEGG 2 – ENZYMBEHANDLING AV GRAM NEGATIVE BAKTERIER FØR EKSTRAKSJON.....	43
	VEDLEGG 3 – TABELL MED OVERSIKT OVER REAGENSER OG TILHØRENDE LOT NUMMER .....	44
	VEDLEGG 4 – RESULTATER FRA OPTIMALISERING AV PCR-PROGRAM .....	45
	VEDLEGG 5 – RESULTAT FRA SENSITIVITETSANALYSE UTFØRT PÅ <i>S. AUREUS</i> OG <i>E. COLI</i> .....	47

## Forkortelser og begreper

16S rRNA-gen: Gen som koder for lille subenhet av RNA i ribosomer

AMM: Avdeling for medisinsk mikrobiologi

ATCC: American Type Culture Collection

Bp: Basepar

CCUG: Culture Collection University of Gothenburg/Gøteborg

CFU: Colony forming units (= antall bakterier)

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

Ct: Cycle threshold, angir antall sykluser der fluorescenssignalet fra PCR-reaksjonen krysser terskellinjen (threshold).

DNA: Deoxyribonukleinsyre

dNTP: Deoxyribonukleotid trifosfater, basene A, T, C og G

ddNTP: Dideoxynukleotid, mangler to OH-grupper i ribosen.

DPO: Dual Priming Oligonucleotide

dsDNA: Double-stranded DNA (dobbeltrådet DNA)

Konserverte gener: Gener med minimal endring i baserekkefølgen hos ulike bakteriearter

LNA: Locked Nucleic Acid

MGW: Molecular Grade Water

Mismatch: Ikke komplett homologi mellom to sekvenser

MYCO1+: *Mycobacterium tuberculosis* (intern kvalitetskontroll hos AMM)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase Chain Reaction

RFU: Relative Fluorescence Units (Relative fluorescensenheter)

RNA: Ribonukleinsyre

rRNA: Ribosomalt RNA

Sek: Sekunder

ssDNA: Single-stranded DNA (enkeltrådet DNA)

V1-V3: Angivelse av variable områder på 16S rRNA-genet. Her innebærer det variabelt område 1 til 3.

# 1 Innledning

## 1.1 En universell metode for å påvise bakterielt DNA

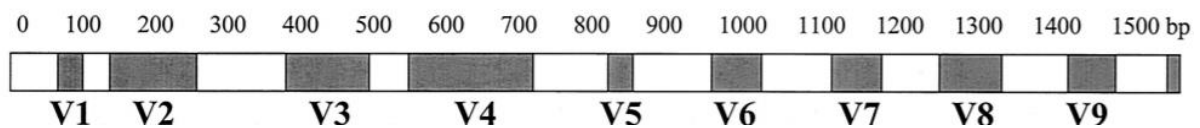
Bruken av Polymerase Chain Reaction (PCR) har blitt en veldig vanlig metode i mikrobiologiske analyser. Vanligvis benyttes det spesifikke primere til å detektere spesifikke bakterier. Grunnen til dette er at det finnes konserverte områder på DNA som er spesifikke for den enkelte bakterie. Dersom det ikke er mistanke om en spesifikk bakterieart, kan det benyttes primere som binder seg til konserverte genområder som finnes hos alle bakterier. Et slikt aktuelt genområde er genet som koder for 16S ribosomalt RNA (rRNA). 16S rRNA-genet er et gen som koder for den lille subenheten i ribosomer (Rajendhran & Gunasekaran, 2011; Yarza et al., 2014). På Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital utnyttet 16S rRNA-genet i en universell PCR-metode for å identifisere bakterier i klinisk prøvemateriale. 16S rRNA-genet finnes i genomet til alle bakterier, og dette gjør genet til et egnet mål i en universell PCR-metode. Benyttelsen av primere rettet mot 16S rRNA-genet, og derav alle bakteriearter, gir en utvidet påvisning av bakterielle infeksjoner hvor det på forhånd ikke er noen formening om infeksjonsagens eller hvor etiologisk agens ikke har latt seg påvise ved dyrkning eller andre metoder (Jill E Clarridge III, 2004).

### 1.1.1 Oppbygning av 16S rRNA-genet

16S rRNA-genet er et av de mest konserverte bakterielle genene, og genet finnes hos alle bakteriearter (Woese, 1987). Genet består av omtrent 1500 basepar (bp), med vekselvis variable og konstante områder med nukleotidsekvenser (Figur 1) (Brosius et al., 1981). De konstante områdene er i stor grad konserverte, og her er det minimal variasjon på nukleotidsekvensene mellom ulike bakteriearter. I de variable sekvensområdene er det en større grad av variasjon mellom bakterieartene. De variable områdene er mer artsspesifikke, og benyttes for klassifisering og differensiering mellom ulike bakteriearter. 16S rRNA-genets oppbygning av konserverte områder med lav grad av artsvariasjon, samt at genet finnes hos alle bakteriearter, gjør 16S rRNA-genet til et egnet mål for en universell PCR-metode (Woese, 1987). Ved å benytte primere rettet mot 16S rRNA-genet sine konstante områder vil også variable områder på genet amplifiseres ved en PCR-analyse. PCR-produktet består til slutt av store mengder amplifiserte gensekvenser som inkluderer både variable og konstante områder av 16S rRNA-genet. Amplifiserte gensekvenser, som da også inkluderer de artsspesifikke variable genområdene, kan så sekvenseres og sammenliknes med



databasemateriale for å klassifisere og identifisere spesifikke bakteriearter (Jill E Clarridge III, 2004).



*Figur 1: 16S rRNA-genet. Genet består av vekselvis konstante (hvite) og variable (grå) genområder. (Lawrence M Gillman et al., 2001)*

Antall repeterende sekvenser av 16S rRNA-genet hos en bakterie kan variere fra 1 og opp til 15 kopier, noe som kan påvirke primernes sensitivitet ovenfor ulike bakterier (Klappenbach et al., 2001). Et stort antall repeterende 16S rRNA-gensekvenser i en bakterie vil gi høyere sensitivitet, sammenliknet med en bakterie med et lavere antall repeterende gensekvenser. National Center for Biotechnology Information (NCBI) kan benyttes for å finne antall repeterende sekvenser av 16S rRNA-genet i genomet til en bakterie.

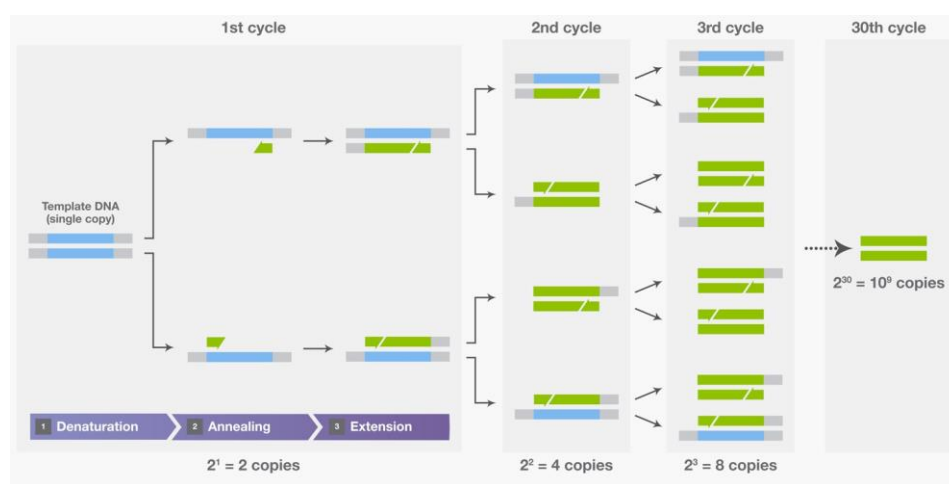
### **1.1.2 Utfordringer med å benytte 16S rRNA-genet til identifikasjon av bakterier**

Universell 16S rRNA-gen PCR er en analysemetode som har en rekke kjente fallgruver, og metoden er svært sensitiv for forurensing av humant DNA eller tilstedeværelse av bakterier i reagenser og vann. Siden metoden benytter primere rettet mot konstante områder av 16S rRNA-genet vil alt av bakterielt DNA til stede i prøven kunne amplifiseres, uavhengig av om det stammer fra selve pasientmaterialet (Sune et al., 2020). Dette skaper problemer når det kommer til forurensning av prøvemateriale eller reagenser, ved at det blir en amplifisering av gensekvenser fra bakterier som ikke er av klinisk interesse. 16S rRNA-genet finnes ikke kun hos bakterier, men er også til stede i humant DNA. Dermed er det en risiko for at humant DNA i pasientprøven også kan amplifiseres under PCR-reaksjonen og gi falsk positive resultater ved 16S rRNA-gen PCR. På grunnlag av at 16S rRNA-gen PCR er en uspesifikk universell PCR-metode, kan det altså oppstå problemer i situasjoner med bakteriell PCR-forurensing, forurensing under prøvetaking eller tilstedeværelse av humant DNA i prøvematerialet (David A Relman, 1999).

## 1.2 Oppformering av DNA ved bruk av PCR

PCR er en teknikk som benyttes for å amplifisere gensekvenser. Real-time PCR kombinerer selve PCR-reaksjonen og deteksjonen av produkt. For at PCR-reaksjonen skal fungere er den avhengig av en reaksjonsmiks bestående av et primersett (forward og reverse), en DNA polymerase, deoxynukleotider av hver base (dNTP), en gensekvens det er ønskelig å amplifisere, probe/fluorofor og et PCR-instrument. En primer er en kort nukleotidsekvens med 18-25 baser som hybridiserer til templattråden for å danne nye kopier av gensekvensen. Primerne som benyttes i PCR-reaksjonen er komplementære til gensekvensen som er av interesse (Alberts et al., 2019; Rifai et al., 2019a). I en universell 16S rRNA-gen PCR benyttes primere rettet mot de konstante områdene av 16S rRNA-genet.

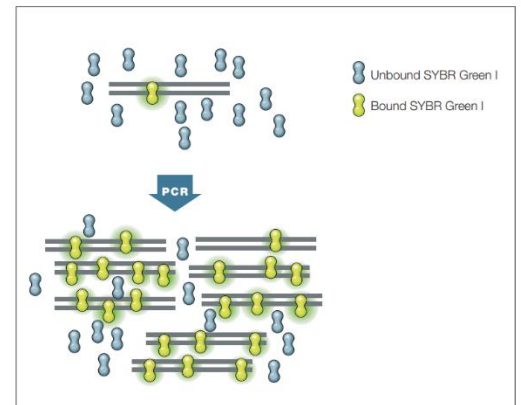
PCR-reaksjonen foregår i tre trinn som repeteres i et bestemt antall sykluser. Disse tre trinnene består av denaturering, hybridisering og elongering. I det første trinnet, denaturering, økes temperaturen slik at bindingen mellom baseparene på de komplementære trådene denatureres og trådene separeres. I det neste trinnet, hybridisering, senkes temperaturen slik at primerne kan hybridiseres til sine komplementære sekvenser på de to DNA-trådene. Etter at primerne er hybridisert blir trinn tre, elongering, satt i gang. Dette gjøres ved at temperaturen økes litt igjen slik at DNA polymerase kan syntetisere to nye DNA-tråder ved å forlenge de to primersekvensene. Hele denne prosessen blir så repetert ved å gjenta syklusen i flere omganger, slik at store mengder DNA blir amplifisert (Figur 2) (Alberts et al., 2019; Rifai et al., 2019a).



**Figur 2: Amplifisering av DNA under en PCR-reaksjon.** Figuren illustrerer prosessen i en PCR-reaksjon, der den første syklusen viser de tre trinnene i PCR-reaksjonen (denaturering, hybridisering og elongering). I hver syklus vil hvert templat gi opphav til to kopier, slik at det blir en eksponentiell økning av PCR-produkt for hver syklus i PCR-reaksjonen. (PCR Basics - NO, u.å.)

### 1.2.1 Deteksjon av PCR produkt ved bruk av SYBR Green

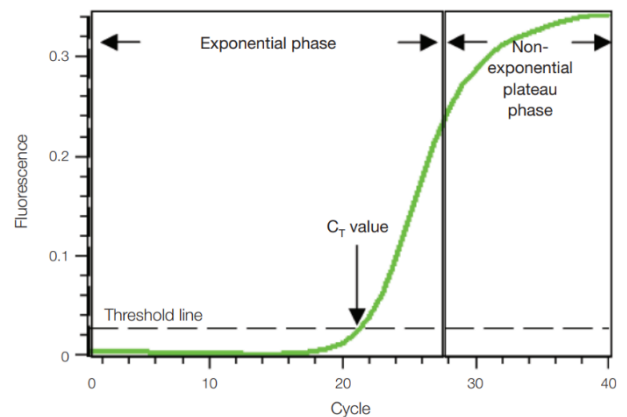
Gensekvenser som har blitt amplifisert ved real time PCR kan bli detektert ved at gensekvensene binder fluorescerende fargestoff, eller ved bruk av fluorescensgenererende prober (James, 2010). I 16S rRNA-gen PCR benyttes som oftest det fluorescerende fargestoffet SYBR Green. Dette fargestoffet binder seg til dobbeltrådet DNA (dsDNA). Når fargestoffet befinner seg fritt i reaksjonsmiksen vil det avgi lite fluorescens, mens når SYBR Green binder seg til dsDNA vil fluorescensen øke betraktelig (Figur 3). Fluorescenssignalet fra reaksjonen er proporsjonal med mengden dsDNA til stede i løsningen, slik at fluorescenssignalet øker under amplifiseringen av dsDNA i PCR-reaksjonen. (*Real-Time PCR - Applications Guide*, 2006)



**Figur 3: SYBR Green som fluorofor i PCR.** Viser virkemåten til det DNA-bindende fargestoffet SYBR Green og hvordan fluorescensen øker når fargestoffet binder seg til dsDNA. (*Real-Time PCR - Applications Guide*, 2006)

### 1.2.2 Amplifikasjon av DNA og dannelse av fluorescenssignal under real time PCR

Under real-time PCR kan dannelsen av PCR-produkt fremstilles i en amplifikasjonskurve (Figur 4). En amplifikasjonskurve har to faser; en eksponentiell fase og en platå-fase (*Real-Time PCR - Applications Guide*, 2006). Effektiviteten til en PCR-analyse kan variere, men dersom effektiviteten for hver syklus er perfekt (effektivitet på 100%) så vil mengden PCR-produkt omtrent dobles ved hver syklus i den eksponentielle fasen. Effektiviteten av PCR-analysen vil variere med tanke på ulike faktorer, slik som primere, temperaturbetingelser og eventuelle inhibitorer som kan begrense amplifiseringen av produktet (Rifai et al., 2019a).



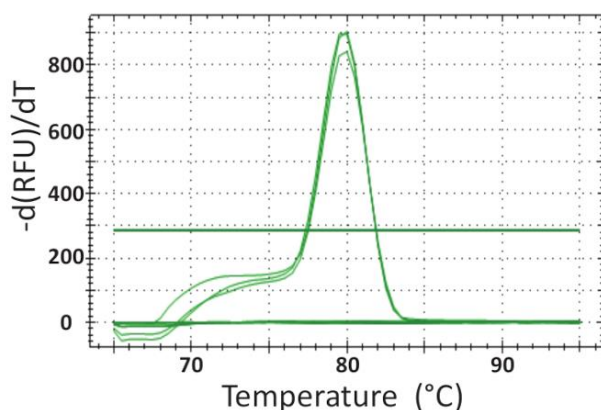
**Figur 4: Generell amplifikasjonskurve for real time-PCR.** Figuren viser amplifikasjonskurvens (grønn) to faser; den eksponentielle fasen (t.v.) og platåfasen (t.h.). Den stiplede linjen indikerer fluorescenssterkselen, som angir signalmengden nødvendig for å overskride bakgrunnsstøy. (*Real-Time PCR - Applications Guide*, 2006)

Etter hvert som reaksjonen går vil reaksjonskomponenter bli oppbrukt, og det fører til at en eller flere av komponentene kan være begrensende for videre amplifikasjon. Dermed vil reaksjonen gå saktere, og den går inn i det som kalles platå-fasen (*Real-Time PCR - Applications Guide*, 2006).

I løpet av de første syklusene av PCR-reaksjonen vil det være liten endring i fluorescenssignalet, men etter hvert som reaksjonen utvikler seg vil fluorescensnivået øke til et detekterbart nivå. Den stiplede linja i Figur 4 kalles terskellinjen, og denne benyttes for å tilordne hver PCR-reaksjon en Cycle Threshold (Ct)-verdi, i tillegg til at den skiller ut bakgrunnsstøy. En Ct-verdi angir ved hvilken PCR-syklus fluorescenssignalet krysser terskellinjen. Videre kan Ct-verdien benyttes til å beregne den opprinnelige mengden av templat som er til stede i reaksjonen. Dette kan gjøres da Ct-verdien måles i den eksponentielle fasen og sammenliknes med en standardkurve med kjente templatkonsentrasjoner. Mengden templat som er til stede ved begynnelsen av PCR-reaksjonen er med på å bestemme reaksjonens Ct-verdi. Dersom det er mye templat i starten av reaksjonen vil det ikke være nødvendig med så mange sykluser før amplifikasjonen gir nok produkt til at fluorescenssignalet blir sterkt nok til å krysse terskellinjen. Dermed får produktet en lav Ct-verdi. Dette vil være motsatt dersom det er lite templat. Ct-verdien vil bli høyere, da det kreves flere sykluser for å få amplifisert nok produkt til at fluorescenssignalet krysser terskellinjen (*Real-Time PCR - Applications Guide, 2006; Real-time PCR handbook, 2012*).

### **1.2.3 Bruk av smeltepunktsanalyse for å vurdere PCR-produkt**

SYBR Green er en uspesifikk deteksjonsmetode ved Real-time PCR, da SYBR Green vil binde seg til alt av dsDNA og avgi fluorescens. Forskjellige PCR-produkter kan kjennetegnes ved deres spesifikke smeltepunkt. Dette utnyttes for å vurdere om ønsket PCR-produkt er dannet. Smeltepunktet til PCR-produktet sammenliknes med smeltepunktet til en kjent positiv kontroll. En smeltepunktsanalyse går ut på å øke temperaturen slik at dsDNA med SYBR Green dissosieres til enkeltrådet DNA (ssDNA). Når temperaturen øker til smeltepunktet, vil det skje en reduksjon i fluorescens. Årsaken til fluorescensreduksjonen er at DNA-trådene blir splittet slik at SYBR Green frigjøres. Fluorescensreduksjonen kan matematisk omberegnes (reduksjon i fluorescens delt på endring i temperatur,  $-\Delta(\text{RFU})/\Delta T$ ) og plottes mot temperatur i en smeltekurve (Figur 5). Smeltepunktsanalyser kan også benyttes for å undersøke spesifisiteten til en PCR-reaksjon. Ulike faktorer som antall basepar, innhold av basene guanin (G) og cytosin (C), og tilstedeværelsen av mismatches i basene kan påvirke smeltepunktet (*Real-time PCR handbook, 2012*).



**Figur 5: Smeltekurve.** Figuren viser en smeltekurve fra en PCR-analyse, med temperatur på x-aksen og reduksjon i fluorescens delt på endring i temperatur ( $-\Delta(\text{RFU})/\Delta T$ ) på y-aksen. Kurvetoppen i en smeltekurve indikerer PCR-produktets smeltetemperatur. Smeltekurven er av god kvalitet da den er smal og høy. (Nicholson et al., 2018)

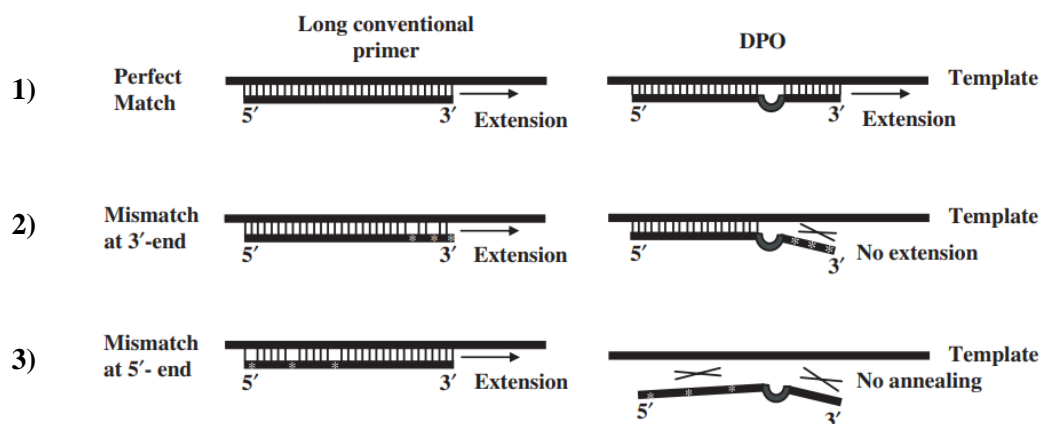
### 1.3 Primere; konvensjonelle primere og Dual Priming Oligonucleotide (DPO)

To av primersettene som undersøkes i denne oppgaven er såkalte konvensjonelle primere, mens det siste primersettet er et såkalt Dual Priming Oligonucleotide (DPO) primersett. Konvensjonelle primere er primere bestående av nukleotider med vekselvis basene adenin (A), tymin (T), cytosin (C) og guanin (G) i en bestemt lengde på 18-25 bp. Primerne binder seg til templattråden, slik at DNA polymerase kan sørge for en elongering av primeren og amplifisering av aktuell gensekvens. Det første primersettet er rutineprimerne som i dag benyttes i 16S rRNA-gen PCR ved AMM. Det andre primersettet er et primersett som er tatt med for å undersøke variable områder på 16S rRNA-genet som ikke dekkes med de to andre primersettene. Det tredje og siste primersettet som undersøkes i oppgaven er DPO, som er primere designet for å unngå uspesifikke bindinger til alt annet DNA enn målsekvensen. For DPO-primere laget for 16S rRNA-gen PCR er det spesielt viktig å unngå uspesifikke bindinger til humant DNA, da dette er et kjent problem ved denne PCR-metoden (Kommedal et al., 2012). Sekvensering, og derved identifisering, av bakterielt DNA vanskeliggjøres ved tilstedeværelse av humant DNA. DPO-primere skiller seg fra konvensjonelle primere både strukturelt og funksjonelt. I motsetning til de konvensjonelle primerne, består en DPO-primer av to nukleotidsegmenter forbundet via en polydeoxyinosine-bro (Figur 6). Deoxyinosine (I) har en lavere smeltetemperatur sammenliknet med basene A, T, C og G i primeren, da deoxyinosine danner svakere hydrogenbindinger til templattråden (Bergstrom et al., 1997). De svake hydrogenbindingene fører til at polydeoxyinosine-delen av primeren får en buet form. Denne polydeoxyinosine-broen tar ikke del i selve hybridiseringen med templattråden, men fungerer som en forbindelse mellom de to primersegmentene i DPO-primeren.

Primersegmentene i DPO-primere er av ulik lengde. 5'-segmentet består av 18-25 bp, og 3'-segmentet er 6-12 bp langt (Chun et al., 2007).

### **1.3.1 Fordeler med DPO-primere**

Et kjent problem med konvensjonelle primere i 16S rRNA-gen PCR er dannelse av uspesifikke produkt. Konvensjonelle primere baserer seg på én hybridisering mellom den sammenhengende primersekvensen og en gensekvens. Det er erfart at lange, konvensjonelle PCR-primere av og til binder seg til en gensekvens som ikke er en 100% komplementær match. Elongering vil da starte, og det blir en amplifisering av gensekvenser som ikke er av interesse (Figur 6). DPO-primere har en strukturell oppbygning for å forhindre dette. DPO-primere består av to segmenter, et relativt langt og et kortere, forbundet med en polydeoxyinosin-bro (Figur 6). For at elongeringen skal starte må begge disse primersegmentene binde seg perfekt til ønsket gensekvens (Chun et al., 2007). Det lengste segmentet, 5'-segmentet, binder seg først til gensekvensen og initierer en stabil hybridisering. Det korte segmentet, 3'-segmentet, er såpass kort (6-12 bp) at det selektivt vil binde seg til den bestemte gensekvensen (Kommedal et al., 2012). 3'-segmentet trenger med andre ord 100% match for å binde seg, slik at elongering og DNA-amplifisering gjennomføres. Segmentet vil alene ha en for lav smeltetemperatur (ca. 30°C) til å kunne binde seg til gensekvensen ved de mest brukte hybridiseringstemperaturene på 55-65°C (Chun et al., 2007). DPO-primere vil derfor spesifikt gi amplifisering av kun ønsket gensekvens. Med andre ord er DPO-primere mer spesifikke enn konvensjonelle primere. En annen fordel med DPO-primere er at de viser en større grad av temperaturstabilitet, som fører til at det kan benyttes et bredere spekter av hybridiseringstemperaturer uten at det går ut over spesifisiteten (Chun et al., 2007).



**Figur 6: Konvensjonell primer VS DPO-primer.** Figuren viser en skjematiske oversikt over konsekvensene av mismatch ved bruk av konvensjonelle primere og DPO-primere. (1) Perfekt match både for konvensjonell primer og for DPO-primer, slik at elongering og dannelse av PCR-produkt skjer i begge tilfellene. (2) Mismatch i 3'-ende. Konvensjonell primer vil fortsatt hybridiseres til templattråd, og elongering vil ikke gjennomføres. Mismatch fører til at kort 3'-segment i DPO-primer ikke vil hybridiseres til templattråd, og elongering vil ikke gjennomføres. (3) Mismatch i 5'-ende. Konvensjonell primer vil fortsatt hybridiseres til templattråd, og elongering gjennomføres. Mismatch fører til at 5'-segment i DPO-primer ikke vil hybridiseres til templattråd, og elongering vil ikke gjennomføres da DPO-primer generelt ikke vil bindes til templattråd (Chun et al., 2007).

#### 1.4 Bruk av kapillær elektroforese for evaluering av PCR-produkt

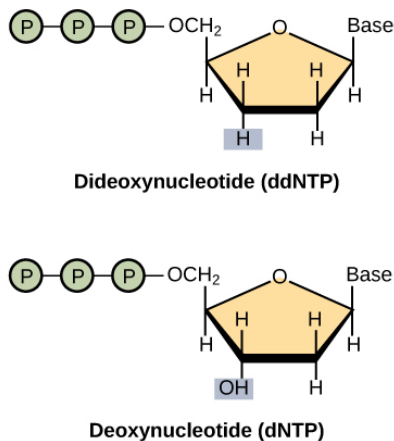
Ved å undersøke om PCR-produktet har riktig baseparstørrelse, kan det avgjøres om PCR-produktet er fra bakterielt DNA eller humant DNA. 16S rRNA-gen PCR-fragmentene har en kjent konstant lengde. Dette gjør at disse fragmentene kan skilles fra andre uspesifikke PCR-produkter av ulike lengder, f.eks. humant DNA. For å bestemme lengden og konsentrasjonen (molariteten) til PCR-produktet benyttes kapillær gelelektroforese. Elektroforese baserer seg på at ulike fragmenter i løsning vil migrere ved forskjellige hastigheter under påvirkning av et elektrisk felt. Hvert ion i løsningen vil bevege seg mot elektroden med motsatt ladning. Hastigheten hos de ulike fragmentene varierer ut ifra molekylstørrelse, spenning, buffer (pH) og komponentenes konfigurasjon (Weston, 1997). Kationer vil migrere mot den negativt ladde katoden, anioner migrerer mot den positivt ladde anoden mens nøytrale fragmenter ikke vil migrere (Harvey, 2016). Ettersom fosfatgruppene i nukleotider er negativt ladet ved nøytral pH, vil PCR-produktene vandre mot anoden. Tradisjonelt har elektroforese blitt utført på et støtte-medium, som gel eller papir. Kapillær elektroforese har blitt til som en alternativ form for vanlig elektroforese. Ved denne typen elektroforese vil den ledende bufferen holdes inne i et kapillærrør (Weston, 1997). En fordel med kapillær elektroforese er at metoden kan skille på størrelser helt ned til ett basepar, og det trengs kun små prøvevolum, noe som igjen minsker sjansen for at tilstedeværelsen av andre analytter og forurensning i prøven kan virke inn på resultatet (Rifai et al., 2019b). Konsentrasjonen/styrken til båndene dannet ved

elektroforese kan oppgis i molaritet. Ved kapillær gelelektroforese benyttet etter 16S rRNA-gen PCR, sier molariteten noe om hvor mye DNA som er amplifisert under PCR-reaksjonen.

### **1.5 Identifisering av bakterier fra 16S rRNA-gen PCR**

16S rRNA-gen PCR vil i teorien kunne amplifisere DNA fra alle bakterier til stede i en prøve. Derfor er det nødvendig å sekvensere PCR-produktet for å identifisere den enkelte bakterien ved hjelp av bakteriens DNA. Sekvensering går ut på å bestemme basesekvensen til PCR-produktet, for så å sammenlikne denne sekvensen med andre sekvenser i ulike databaser. På AMM benyttes Sangersekvensering, også kalt dideoxy-sekvensering, til dette formålet. Sangersekvensering benytter i første steg konvensjonell PCR for å amplifisere det genområdet som er av interesse (Rifai et al., 2019c). Deretter følger en kjedeterminerende metode som ble utviklet i 1977 av Frederick Sanger (F Sanger et al., 1977). Metoden benytter spesifikt fluorescensmerkede dideoxynukleotider (ddNTP), kalt fargerterminatorer, samt umerkede deoxynukleotider til amplifisering av gensekvenser ved konvensjonell PCR (Jill E Clarridge III, 2004). Dideoxynukleotidene skiller seg fra deoxynukleotidene ved at de mangler 3'-hydroksylgruppe på pentoseringen (Figur 7). Dette hindrer videre elongering av DNA-sekvensen, fordi det ikke kan dannes en ny fosfodiesterbinding mellom nukleotidene (Rifai et al., 2019c). Resultatet av sekvenseringen er en blanding av PCR-produkter med varierende lengde. Disse PCR-produktene begynner i samme primersete og avsluttes med en fluorescensmerket ddNTP i ulike posisjoner. Under kapillærelektroforese separeres fragmentene etter lengde, da de korte og negativt ladde fragmentene beveger seg raskere mot den positivt ladde elektroden. DNA-fragmentene vil i nærheten av den positive elektroden bevege seg gjennom en laserstråle. De fire fargerterminatorene er merket med forskjellige fluorescensmerkede baser, og vil dermed avgi hver sine karakteristiske spektre når de blir truffet av laseren. Signalspekteret til de ulike DNA-fragmentene fremstilles i et elektroferogram, og kan benyttes for å bestemme hele basesekvensen til PCR-produktet (Jill E Clarridge III, 2004).





*Figur 7: Forskjellen på ddNTP og dNTP. Figuren viser hvordan ddNTP skiller seg fra dNTP, ved at ddNTP mangler 3'-hydroksylgruppen (OH-gruppen) på pentoseringen. (Rye et al., 2016)*

## 1.6 Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å undersøke to nye primersett som kan være av interesse å benytte i den universelle 16S rRNA-gen PCR-analysen ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) på St. Olavs hospital. Disse to primersettene ble vurdert opp mot rutineprimerne som har blitt benyttet i avdelingens rutinediagnostikk siden 2007. Resultatet fra denne oppgaven er av interesse for AMM som benytter 16S rRNA-gen PCR i sin identifisering av bakterier i pasientprøver hvor bakteriell infeksjon i mindre grad lar seg påvise ved dyrkning. Laboratoriet ønsker å benytte primere som har en høy grad av sensitivitet og spesifisitet. Med spesifisitet menes det at primerne kun binder seg til bakterielt DNA, og ikke noe annet i prøven. Dette har vært et problem med rutineprimerne på grunn av kryssreaktivitet med humant DNA. Humant DNA kan virke interfererende ved elektroforese og sekvensering slik at det kan bli vanskeligere å identifisere den spesifikke bakterien i prøven. Det er også ønskelig med primere som reagerer minst mulig med bakterielt DNA i reagenser, da DNA-frie reagenser er vanskelig å garantere. De to andre primersettene som omtales i oppgaven er primersett som er beskrevet i litteratur, og som i tidligere studier har vist liten grad av kryssreaksjoner med humant DNA (Bjerkan et al., 2012; Kommedal et al., 2012). Sensitiviteten til et primersett omhandler i hvor stor grad primersettet kan detektere lave konsentrasjoner av bakterielt DNA. Laboratoriet stiller krav til at de nye primersettene skal være minst like gode som rutineprimerne, men helst bedre enn rutineprimerne de benytter i dag.

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Prøve- og kontrollmateriale

Følgende pasientmateriale ble benyttet i oppgaven: 10 eluat fra tidligere pasientprøver (Tabell 1), 2 leddvæskeprøver og 2 vevsprøver (Tabell 2). Oppgaven er en del av Sykehuslaboratoriets arbeid med kvalitetssikring. Prosjektet er derfor fritatt fra å søke regional etisk komité (REK) om godkjenning, og informert samtykke fra pasientene er derfor ikke nødvendig å innhente her. Av kvalitetskontroller ble følgende benyttet: 22 interne kvalitetskontroller, 26 bakteriestammer og 2 gjærsoppkulturer (AMM, Tabell 3). *Mycobacterium tuberculosis* («MYCO1+», ATCC 25177) ble benyttet som intern positiv kvalitetskontroll. Som negativ kontroll ble det benyttet PCR-reaksjonsmiks med aktuelt primersett. Det ble også benyttet enzymkontroller, som besto av alle enzymer og reagenser som ble benyttet under forbehandlingen og ekstraksjon av prøvematerialet.

**Tabell 1: Humant prøvemateriale.** Oversikt over humant prøvemateriale benyttet i oppgaven. Fire av prøvene var ut ifra tidligere analysering definert som negative, mens seks av prøvene var definert som positive med hensyn til tilstedeværelse av bakterier. Seks av prøvene (indikert med b) viste i tillegg tilstedeværelse av humant DNA. Disse ti prøvene ble analysert uforynnet og fortynnet 1:10. Dette er rutine ved AMM, da høy konsentrasjon av humane komponenter i prøven kan føre til inhibisjon av PCR-reaksjonen.

Prøve nr.	Prøvemateriale	Tidligere funn ved sekvensering <sup>a</sup>
Prøve 1	Abscessinnhold, nyre	<i>Ureaplasma parvum</i>
Prøve 2	Beinmarg	Negativ
Prøve 3	Abscess, hode	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Prøve 4	Puss, uterus	<i>Mycoplasma hominis</i>
Prøve 5 <sup>b</sup>	Vev, aorta	<i>Borrelia afzelii</i>
Prøve 6 <sup>b</sup>	Leddvaske, kne	Negativ
Prøve 7 <sup>b</sup>	Aortaklaff (implantat)	<i>Enterococcus faecalis</i>
Prøve 8 <sup>b</sup>	Leddvaske, albue	Negativ
Prøve 9 <sup>b</sup>	Vev, hjerteklaff	Negativ
Prøve 10 <sup>b</sup>	Vev, mitralklaff	<i>Corynebacterium species</i>

<sup>a</sup>utført med rutinemetode på AMM

<sup>b</sup>funn av fragmenter rundt 700 bp ved kapillær gelelektroforese (indikerer humant DNA)

**Tabell 2: Prøvemateriale for undersøkelse av inhibisjon.** Oversikt over prøvemateriale benyttet ved undersøkelse av humane komponenters inhiberende effekt.

Prøve nr.	Prøvemateriale
Prøve A	Vev, hjerteklaff
Prøve B	Vev, bekken
Prøve C	Leddvaske, ukjent lokalisasjon
Prøve D	Leddvaske, hofte

**Tabell 3: Kvalitetskontroller.** Oversikt over positive kvalitetskontroller benyttet for å undersøke primersettene evne til å detektere bakterier, samt kontrollenes referanse-stammenummer.

<b>Mikrobe</b>	<b>Referanse-stammenummer</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCUG 19096
<i>Aeromonas veronii</i>	CCUG 27821T
<i>Bacillus cereus</i>	CCUG 36925
<i>Bacteroides fragilis</i>	CCUG 4856T
<i>Bartonella henselae</i>	MBC 005
<i>Burkholderia cepacia</i>	CCUG 12691
<i>Campylobacter jejuni</i>	MBC 008
<i>Candida albicans</i>	CCUG 19915
<i>Candida albicans</i>	CCUG 32723
Enzymkontroll <i>Candida albicans</i>	tilhører CCUG 32723
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	CCUG 53895
<i>Clostridium difficile</i>	CCUG 4938
<i>Clostridium perfringens</i>	CCUG 1795T
<i>Corynebacterium renale</i>	CCUG 27542T
<i>Coxiella burnetti</i>	*
<i>Cutibacterium acnes</i>	*
<i>Egerthella lenta</i>	CCUG 34779
<i>Eikenella corrodens</i>	CCUG 2138
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCUG 6323T
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCUG 9997
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 37382
<i>Escherichia coli (EIEC)</i>	CCUG 4606
<i>Francisella tularensis</i>	CCUG 2112
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CCUG 9994T
<i>Granulibacter bethesdensis</i>	ATCC BAA-1260
<i>Haemophilus influenzae</i>	CCUG 33775
<i>Hafnia alvei</i>	ACC A2-60***
<i>Heliobacter pylori</i>	ATCC 43504
<i>Kingella kingae</i>	CCUG 352T
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233
<i>Kluyvera georgiana</i>	A2-36***
<i>Legionella pneumophila</i>	CCUG 33058
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCUG 33058
<i>Moraxella catarrhalis</i>	CCUG 353
<i>Mycobacterium tuberculosis (+ktr)</i>	ATCC 25177
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 49226
<i>Neisseria meningitidis gr. B</i>	CCUG 23101
<i>Pasteurella multocida</i>	CCUG 43504

**Fortsettelse tabell 3: Kvalitetskontroller**

Mikrobe	Referanse-Stamnummer
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCUG 17619
<i>Salmonella enteritidis</i>	CCUG 27021
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCUG 15915
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCUG 23118
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13636
<i>Streptococcus agalactica</i>	CCUG 4208
<i>Streptococcus anginosus</i>	CCUG 223
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CCUG 33061
<i>Vibrio cholerae</i>	MBC 118
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CCUG 25567

\*Ekstrahert fra pasientmateriale,

\*\*Kommer fra stammebanken hos AMM, St. Olavs hospital

## 2.2 PCR-primere

PCR-amplifikasjon av 16S rRNA-genet ble utført ved å benytte tre ulike primersett som dekket ulike variable og konstante områder av 16S rRNA-genet. Videre i oppgaven vil disse tre primersettene refereres til som rutineprimere (341F, 927 R), 966F (966F, 1405R) og DPO (DPO-F, DPO-R). Rutineprimersettet benyttes per dags dato i rutinediagnostikken ved AMM, mens 966F- og DPO-primersettene er beskrevet i litteratur (Bjerkkan et al., 2012; Kommedal et al., 2012). Basesekvensene til primersettene er vist i Tabell 4. Genposisjonene som de ulike primerne er rettet mot, refererer til 16S rRNA-gensekvensen til *Escherichia coli* (Accession number AB035926), hentet fra databasen GENBANK (*Escherichia Coli O157*, 2016).

Primersettene benyttet i denne oppgaven ble kjøpt fra TIB MOLBIOL (Tyskland).

**Tabell 4: Primersekvenser.** Tabellen gir en oversikt over primersekvensene til de tre primerparene som her benyttes i 16S rRNA-gen PCR: Rutineprimere, 966F og DPO. Hvert primersett består av en forward og revers sekvens, og de dekker ulike variable områder av 16S rRNA-genet. DPO-primere inneholder Locked Nucleic Acid; modifiserte RNA-nukleotider som blant annet gir økte hybridiseringssegenskaper.

Primer navn	Forward primer sekvens	Revers primer sekvens	Produkt-lengde	Variabelt område
<b>Rutineprimer</b>	5' – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3'	5' – CCCGTCAATTCATTTGAGTTT – 3'	580 bp	V3-V5
<b>966F</b>	5' – GCAACGCGAAGAACCTTAC – 3'	5' – CGGGCGGTGTGTACAAG – 3'	440 bp	V5-V8
<b>DPO</b>	5' – AGAgTTTgATCMTGGCTCAIIIIAACGCT – 3'	5' – CGCGGCTGCTGGCAIIIIAITTRGC – 3'	520 bp	V1-V3

g indikerer en «Locked Nucleic Acid», I er deoxyinosine, R er A eller G, M er A eller C.

## 2.3 Reagenser

Tabell 5 gir en oversikt over reagenser (produsent, land) som ble benyttet i forbindelse med valideringen av primere til 16S rRNA-gen PCR. Tilhørende lot nr. kan finnes i Vedlegg 3.

Tabell 5: *Reagenser. Tabellen viser en oversikt over reagenser (produsent, land) benyttet i oppgaven.*

Analyse	Reagenser	Produsent (firma, land)
Reaksjonsmiks ved 16S rRNA-gen PCR	Quanta PerfeCTa® SYBR Green FastMix	Quantabio, USA
	PCR Grade H <sub>2</sub> O	Roche diagnostics, Sveits
Enzymbehandling	Tris EDTA(TE)-buffer (pH 7,5)	Laget av substratenhet, AMM St. Olavs Hospital
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	
	Proteinase K	Qiagen, Tyskland
	Lysozyme	Sigma Aldrich, Tyskland
	Mutanolysin	
	Lysostaphin	
	NS-buffer/Nuclisens Lysis buffer	Biomérieux, USA
Ekstraksjon ved Nuclisens easyMAG	Nuclisens Extraction buffer 1-3	Biomérieux, USA
	Nuclisens Lysis buffer	
	Nuclisens Magnetic silica	
Kapillær gelelektroforese	DNA 7500 Chip	Agilent, USA
	GelDye Mix	
	DNA 7500 Markør	
	DNA Ladder	
Rensetrinn 1	Illustra ExoProStar 1-step	Cytiva, USA
Reaksjonsmiks ved sekvensreaksjon	BigDye Terminator	Thermo Fisher Scientific, USA
	BigDye Terminator Sequencing Buffer	
Rensetrinn 2	BigDye Xterminator Solution Buffer	
	SAM Solution	
Benyttet ved flere anledninger	Molecular Grade Water (MGW)	G-biosciences, USA

## 2.4 Krav til positiv prøve ved 16S rRNA-gen PCR og sekvensering

For å avgjøre om en prøve er positiv eller negativ for bakteriefunn ble det tatt utgangspunkt i baseparstørrelsen til PCR-produktet. Tabell 4 viser hvilke baseparlengder det forventes at PCR-produktene har. Vurderingen ble gjort ved å studere elektroforeseresultater.

Enzymkontroll og negativ kontroll skal normalt ikke ha dannelse av PCR-produkt og derav heller ikke ha bånd etter kapillær gelelektroforese (=negativ). Dersom enzymkontroll eller negativ kontroll derimot hadde bånd under elektroforesen, måtte dette bli tatt i betraktning

ved vurderingen av prøven. Hvis prøven hadde bånd av samme størrelse (bp) og molaritet (nmol/L) som enzymkontroll og negativ kontroll ble prøven vurdert som negativ, da utslaget i prøven ble tolket som bakteriell forurensning i reagenser. Dersom enzymkontroll og negativ kontroll var negative ved elektroforese og PCR-produktet til prøven hadde bånd av forventet baseparstørrelse, ble prøven vurdert som positiv og sekvensert for å identifisere tilstedeværende bakterieart. Sekvenser funnet i prøven ble sammenliknet med sekvenser funnet i GenBank-databasen National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). I denne oppgaven ble kriteriet  $\geq 99\%$  lik ID benyttet for bakteriespecies, og  $\geq 97\%$  ID for bakteriegenus. Et annet kriterium for speciesidentifikasjon er at det skal være 0,5% avstand i ID til neste foreslåtte bakteriespecies i BLAST (Ref. AMM, St. Olavs hospital).

## **2.5 Prøveopparbeidelse**

### **2.5.1 Enzymbehandling og ekstraksjon av bakteriekulturer**

Ut ifra gram-egenskap og morfologi ble det gjennomført ulik forbehandling av bakteriekulturene før ekstraksjon, som vist i flytskjema i Vedlegg 1 og Vedlegg 2. Enzymbehandlingen gikk ut på å riste en bakteriekoloni av gram positive bakterier i en enzymblanding (Tabell 6). Bakterieløsningen ble inkubert på Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Tyskland) ved 37°C i 15 min, deretter ved 65°C i 15 min før ekstraksjon. Gram-negative bakterier til PCR av 16S rRNA-gen trengte ingen enzymbehandling. 1 bakteriekoloni ble ristet i 100  $\mu$ L PBS (pH 7,2, laget av substratenhet St. Olavs hospital), og inkubert på Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Tyskland) ved 95°C. Etter enzymbehandling ble bakteriesuspensjon i enzymløsning ekstrahert på instrumentet NucliSens easyMAG (bioMérieux, USA). Dette er et instrument som ekstraherer nukleinsyrer ved å benytte magnetiske silicakuler for rensing av nukleinsyrene i prøvematerialet. Se Tabell 5 for reagenser benyttet under ekstraksjon.

**Tabell 6: Innhold i enzymblanding.** Oversikt over innhold i enzymblanding benyttet til forbehandling av gram positive bakterier til 16S rRNA-gen PCR.

Reagenser/Enzymer	Volum (µL)
Tris EDTA-buffer (pH 7,5)	267
Lysozyme	15
Proteinase K	6
Mutanolysin	6
Lysostaphin	6

### 2.5.2 Enzymbehandling og ekstraksjon av humant prøvemateriale tilsatt bakterier

To vevsprøver og to leddvæskeprøver ble benyttet for å undersøke hvordan tilstedeværelse av humant prøvemateriale påvirket deteksjonen av bakteriearter. Prøvene måtte enzymbehandles før ekstraksjon, for å frigjøre DNA gjennom destruksjon av celleveggen til potensielle bakterier. Enzymbehandlingen ble utført ved å tilsette reagenser og enzymer, samt bakteriesuspensjon av *S. aureus* (CCUG 15915) og *E. coli* (CCUG 17620) til prøvematerialet (Tabell 7). Ved vev som prøvemateriale ble enzymblandingen inkubert ved 37°C i 15 minutter, etterfulgt av 55°C over natt på Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Tyskland). Leddvæsker ble inkubert ved 37°C i 15 minutter, etterfulgt av 65°C i 15 minutter på Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Tyskland). Prøvene ble etter enzymbehandling ekstrahert på NucliSens easyMAG (bioMérieux, USA).

**Tabell 7: Forbehandling av pasientprøver.** Innhold i enzymblanding til forbehandling av klinisk prøvemateriale tilsatt en bestemt mengde bakterier.

Reagenser/Enzymer	Volum (µL)
Vev: NS-buffer + 25 mg prøvemateriale	180
Leddvæske: Prøvemateriale	180
Proteinase K	20
Lysozyme	15
Lysostaphin	6
Bakteriesuspensjon m/ 150 000 bakterier	10

## 2.6 PCR-program benyttet ved 16S rRNA-gen PCR

16S rRNA-gen PCR-programmet som ble benyttet er beskrevet i Tabell 8. Dette programmet ble optimalisert ved å undersøke primersettene ved ulike hybridiseringstemperaturer (55-65°C), elongeringstid (10, 20 og 30 sek) og antall sykluser (35 og 45 sykluser). Instrumentet som ble benyttet ved alle PCR-analysene var CFX96 Real-Time system C1000 Touch Thermal Cycler

(BioRad, USA). Se Tabell 5 for beskrivelse av reaksjonsmiks benyttet ved 16S rRNA-gen PCR. Det ble for hvert av primersettene benyttet en konsentrasjon på 3  $\mu$ M.

*Tabell 8: PCR program. Tabellen gir en oversikt over de metodiske betingelsene som ble benyttet ved 16S rRNA-gen PCR.*

Trinn		Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Tid
Initiell polymeraseaktiverting		95	3 min
Denaturering	35 PCR-sykluser	95	10 sek
Hybridisering		58	15 sek
Elongering		72	20 sek

## 2.7 Kapillær elektroforese og sekvensering av PCR-produkt

PCR-produktene ble analysert på Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent, USA) med Agilent DNA 7500 kit (Agilent, USA), som har et måleområde fra 100 til 7500 basepar. Dette er et instrument som ved bruk av kapillær elektroforese kan analysere nukleinsyrer, proteiner og celler. Prøvematerialet ble tilsatt en 12-brønns DNA 7500 Chip, tilsatt GelDye Mix og DNA 7500 Markør (Tabell 5). En egen brønn i DNA 7500 Chip ble tilsatt DNA Ladder, som fungerte som en størrelsesmarkør under elektroforesen.

### 2.7.1 Rensing av PCR-produkt og sekvenseringsreaksjonen

Etter analysering med Agilent 2100 Bioanalyser ble PCR-produktet rensert med Illustra ExoProStar 1-step (Cytiva, USA) på Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Denne rensingen ble utført for å bryte ned overflødige primere og nukleotider uten tap av selve PCR-produktet. Etter rensing av PCR-produktene ble det utført en sekvenseringsreaksjon i form av konvensjonell PCR på CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, USA), se Tabell 9 for PCR-program og Tabell 5 for beskrivelse av reaksjonsmiks. Det ble for hvert av primersettene benyttet en konsentrasjon på 3,2  $\mu$ M.

*Tabell 9: PCR-program sekvenseringsreaksjon. Tabellen gir en oversikt over de metodiske betingelsene som ble benyttet ved sekvenseringsreaksjonen.*

Trinn		Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Tid
Initiell polymeraseaktiverting		96	1 min
Denaturering	25 PCR-sykluser	96	10 sek
Hybridisering		50	5 sek
Elongering		60	4 sek
Hold		4	$\infty$



### **2.7.2 Rensing av sekvenseringsprodukt**

Etter sekvensreaksjonen ble det utført et nytt rensetrinn for å fjerne overflødige fargeterminatorer og frie salter i sekvenseringsproduktet. Dette ble utført for å hindre påvirkning av kvaliteten på avlesningen av sekvensene. Det ble benyttet BigDye XTerminator® Purification kit (ThermoFisher Scientific, USA), som består av de to reagensene BigDye XTerminator Solution Buffer og SAM Solution. Big Dye XTerminator fjerner overflødige fargeterminatorer og frie salter fra sekvenseringsreaksjonen, mens SAM Solution forbedrer virkningen av XTerminator Solution og stabiliserer rensereaksjonen.

### **2.7.3 Sekvensering av PCR-produkt**

Etter rensingen ble prøvene analysert på sekvensatoren ABI 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA), som er et automatisert kapillærelektroforeseinstrument som separerer fluorescensmerket DNA i et elektroferogram. Elektroferogrammet ble videre behandlet i dataprogrammet BioNumerics versjon 7.6.1 (Applied Maths - a bioMèrieux company, USA). Kvaliteten til PCR-produktenes elektroferogram ble vurdert, og nukleotidsekvensene til produktene ble fremstilt i BioNumerics-programmet. PCR-produktenes sekvenser ble videre sammenlignet med DNA-sekvenser i GenBank-databasen ved hjelp av dataprogrammet NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Resultatet herfra kunne identifisere hvilken bakterie PCR-produktet stammet fra.

## **2.8 Evaluering av primersettens sensitivitet**

Sensitiviteten til primerne ble evaluert ut ifra en tifolds fortynningsrekke med utgangspunkt i 0,5 McFarland av *Staphylococcus aureus* (CCUG 15915) og *Escherichia coli* (CCUG 17620). 0,5 McFarland tilsvarer  $1,5 \cdot 10^8$  Colony forming units (CFU)/mL. Ved å kjenne den nøyaktige bakteriekonsentrasjonen i hver av prøvene som ble analysert på 16S rRNA-gen PCR, kunne resultatet benyttes til å si noe om primenes evne til å detektere bakterier ved lave konsentrasjoner. Det var ønskelig at primerne hadde høy sensitivitet for å minimere sannsynligheten for falsk negative resultater. NCBI ble benyttet for å finne antall repeterende sekvenser av 16S rRNA-genet i genomet til *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* benyttet i sensitivitetsforsøket. *S. aureus* har fem repeterende sekvenser (Accession number: NZ\_CP014383.1), mens *E. coli* har syv repeterende sekvenser (Accession number NZ\_CP054414.1).

## 3 Resultater

### 3.1 Optimalisering av PCR-program

Optimaliseringen av PCR-programmet ble utført for å undersøke hvilke PCR-betingelser som ga de mest optimale resultatene for hvert av primersettene ved 16S rRNA-gen PCR. I tillegg ble det undersøkt om det var mulig å benytte samme PCR-program for de tre primersettene. Optimaliseringen ble utført ved å undersøke påvirkningen forskjellige hybridiseringstemperaturer (55-65°C), elongeringstider (10 sek, 20 sek og 30 sek) og antall sykluser (35 og 45) hadde på dannelsen av PCR-produkt. Resultatene viste at alle primersettene kunne analyseres på samme PCR-program (Tabell 8). Ved optimaliseringen av hybridiseringstemperaturen viste resultatene at 966F-primersettet og DPO var temperaturstabile i hele det undersøkte temperaturområdet. Rutineprimersettet var derimot kun temperaturstabil i området 55-61°C. 58°C ble valgt som hybridiseringstemperatur. Undersøkelsen av elongeringstid viste at 20 sekunder var tilstrekkelig elongeringstid for amplifisering av PCR-produkt ved bruk av alle de tre primersettene. Resultatet ved bruk av 45 sykluser bar preg av mye bakgrunnsstøy for alle primersettene. Denne bakgrunnsstøyen ble derimot unngått ved å redusere antall sykluser til 35. Se Vedlegg 4 resultatene fra optimaliseringen.

### 3.2 Primersettene evne til å detektere 16S rRNA-genet i et bredt spekter av bakteriearter

Primersettene evne til å binde seg til og detektere 16S rRNA-genet i et bredt spekter av bakterier ble undersøkt. Dette ble utført ved å analysere et bakteriepanel bestående av 26 bakteriestammer, 2 gjærsoppkulturer og 22 interne kvalitetskontroller fra AMM (Tabell 3). Prøvene i bakteriepanelet ble analysert på 16S rRNA-gen PCR med de tre primersettene. Resultatet fra spesifisitetstesting viser at alle de tre primersettene detekterer alle bakterieartene i panelet (Tabell 10). Gjærsoppen *Candida albicans* (CCUG 19915 og CCUG 32723) har ikke 16S rRNA-genet og kan derfor betraktes som en negativ kontroll. Derfor kan Ct-verdiene trolig skyldes bakteriell forurensing av reagenser og ikke kryssreaktivitet med gjærsoppen, da enzymkontrollen har såpass like Ct-verdier som *C. albicans*. I tillegg viste smeltekurven til *C. albicans* dannelsen av produkter med annet smeltepunkt enn den positive kontrollen, samt en avvikende form med en sekundær (bred og uspesifikk) smeltetopp (Figur 8).

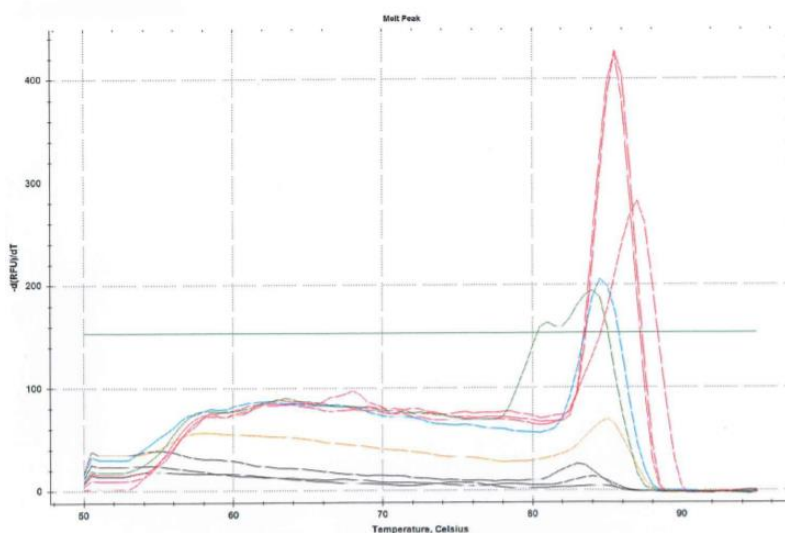
**Tabell 10: Bakteriepanel.** Oversikt over PCR-resultat fra analysering av bakteriepanelet på 16S rRNA-gen PCR med de tre primersettene.

Mikrobe	Ct-verdi		
	Rutine	966F	DPO
<i>Acinetobacter baumannii</i> (CCUG 19096)	16,19	16,27	18,38
<i>Aeromonas veronii</i> (CCUG 27821T)	17,70	18,03	19,18
<i>Bacillus cereus</i> (CCUG 36925)	14,16	14,44	15,46
<i>Bacteroides fragilis</i> (CCUG 4856T)	17,63	20,63	19,10
<i>Bartonella henselae</i> (MBC 005)	21,47	22,00	23,63
<i>Burkholderia cepacia</i> (CCUG 12691)	16,03	15,78	17,23
<i>Campylobacter jejuni</i> (MBC 008)	28,95	26,24	28,39
<i>Candida albicans</i> (CCUG 19915)	29,07	29,91	31,71
<i>Candida albicans</i> (CCUG 32723)	29,33	29,38	32,37
Enzymkontroll ( <i>C. albicans</i> CCUG 32723)	31,22	30,21	32,12
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> (CCUG 53895)	20,42	24,36	22,20
<i>Clostridium difficile</i> (CCUG 4938)	25,06	24,30	26,46
<i>Clostridium perfringens</i> (CCUG 1795T)	11,88	11,71	13,04
<i>Corynebacterium renale</i> (CCUG 27542T)	15,50	15,69	17,11
<i>Coxiella burnetti</i> (ekstrahert fra pasientmateriale)	29,48	24,33	26,31
<i>Cutibacterium acnes</i> (ekstrahert fra pasientmateriale)	17,90	17,78	19,67
<i>Egerthella lenta</i> (CCUG 34779)	19,10	19,39	21,03
<i>Eikenella corrodens</i> (CCUG 2138)	15,17	15,38	17,04
<i>Enterobacter cloacae</i> (CCUG 6323T)	13,25	13,65	14,62
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCUG 9997)	11,93	12,55	13,16
<i>Escherichia coli</i> (CCUG 37382)	12,19	12,70	13,76
<i>Escherichia coli, enteroinvasiv (EIEC)</i> (CCUG 4606)	17,16	17,41	19,12
<i>Francisella tularensis</i> (CCUG 2112)	18,58	18,59	20,54
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (CCUG 9994T)	15,04	15,25	16,45
<i>Granulibacter bethesdensis</i> (ATCC BAA-1260)	12,80	12,96	14,40
<i>Haemophilus influenzae</i> (CCUG 33775)	11,34	11,76	12,67
<i>Hafnia alvei</i> (ACC A2-60) *	13,04	13,21	14,21
<i>Heliobacter pylori</i> (ATCC 43504)	29,35	27,15	28,64
<i>Kingella kingae</i> (CCUG 352T)	28,43	28,25	30,91
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CCUG 56233)	17,70	17,03	18,92
<i>Kluyvera georgiana</i> (A2-36) *	13,51	13,50	14,88
<i>Legionella pneumophila</i> (CCUG 33058)	22,41	22,69	24,19
<i>Listeria monocytogenes</i> (CCUG 33058)	24,64	24,90	26,38
<i>Moraxella catarrhalis</i> (CCUG 353)	16,45	16,34	18,06
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> +ktr (ATCC 25177)	24,01	23,31	25,13
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 49226)	24,51	24,35	26,68
<i>Neisseria meningitidis</i> gr. B (CCUG 23101)	17,32	17,10	20,06
<i>Pasteurella multocida</i> (CCUG 43504)	14,52	14,75	16,16
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 35659)	12,82	12,85	14,28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCUG 17619)	13,03	13,70	14,56

Fortsettelse Tabell 10: Bakteriepanel

Mikobe	Ct-verdi		
	Rutine	966F	DPO
<i>Salmonella Enteritidis</i> (CCUG 27021)	25,64	25,65	27,32
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCUG 15915)	20,96	20,59	22,65
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CCUG 23118)	25,04	24,33	26,45
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ATCC 13636)	15,82	15,91	17,33
<i>Streptococcus agalactiae</i> (CCUG 4208)	24,47	24,44	26,03
<i>Streptococcus anginosus</i> (CCUG 223)	12,39	12,81	13,60
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CCUG 33638)	23,86	24,18	25,44
<i>Streptococcus pyogenes</i> (CCUG 33061)	13,48	13,83	14,47
<i>Vibrio cholerae</i> (MBC 118)	27,15	28,21	29,81
<i>Yersinia enterocolitica</i> (CCUG 25567)	27,40	27,61	29,51

\*kommer fra stammebanken hos AMM, St. Olavs hospital



**Figur 8: Smeltekurve *Candida albicans* (CCUG 19915).** Figuren viser smeltekurven til den ene *Candida albicans*-prøven i bakteriepanelet. De røde kurvene («MYCO1+») er av god kvalitet (smal og høy). Den grønne (rutine), blå (966F) og gule (DPO) kurven har en lavere kvalitet. Disse kurvene har bredere og lavere topper, i tillegg til at kurven til rutineprimerne to topper. Dette indikerer dannelsen av uspesifikke produkter.

### 3.3 Primersettene sensitivitet

Sensitivitetstesting ble utført for å undersøke primernes evne til å detektere lave konsentrasjoner av bakterier i en prøve. Sensitiviteten til de tre primersettene ble undersøkt ut ifra en tifolds fortynningsrekke av referansestammene *S. aureus* (CCUG 15915) og *E. coli* (CCUG 17620) med utgangspunkt i 0,5 McFarland (tilsvarende  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/mL). For å definere om en prøve var positiv eller negativ, ble den sammenliknet med enzymkontrollen, og det ble vurdert om det var en logaritmisk økning av Ct-verdi til neste fortynning (i prinsippet ca. 3,3 Ct-verdier). Ved bruk av rutineprimer og primersettet 966F, ble *S. aureus* påvist i prøven ved konsentrasjoner ned til og med  $1,5 \cdot 10^4$  CFU/mL. Teoretisk tilsvarende dette 273 CFU per PCR-reaksjon. Ved bruk av DPO ble bakterien *S. aureus* identifisert i prøven ved konsentrasjoner ned til  $1,5 \cdot 10^3$  CFU/mL. Teoretisk tilsvarende dette 27 CFU per PCR-reaksjon. Bruk av DPO-primersettet gir dermed en høyere sensitivitet enn de to andre primersettene. Ved 16S rRNA-gen PCR kunne hver av de tre primersettene påvise bakterien *E. coli* i prøven ved konsentrasjoner ned til  $1,5 \cdot 10^5$  CFU/mL. Teoretisk tilsvarende dette 2727 CFU per PCR-reaksjon. For *E. coli* kan det ha oppstått en fortynningsfeil, da det er en avvikende stor differanse mellom Ct-verdiene til konsentrasjonene  $1,5 \cdot 10^5$  CFU/mL og  $1,5 \cdot 10^4$  CFU/mL. Grunnet tidsmangel ble det ikke mulighet til å repetere forsøket. Se Vedlegg 5 for oversikt over alle Ct-verdier fra sensitivitetstestingen.

### 3.4 Kan tilstedeværelse av pasientmateriale påvirke primersettene deteksjon av bakterier?

Det ble undersøkt om tilstedeværelsen av pasientmateriale kunne interferere med primersettene og påvirke bakteriemengden som detekteres ved 16S rRNA-gen PCR. Fire bakterie-negative pasientprøver ble hver tilsatt 150 000 CFU av *S. aureus* eller *E. coli* før enzymbehandling og ekstraksjon ( $V_{\text{total}} = 200 \mu\text{L}$ ). I tillegg ble det analysert kontroller med *S. aureus* og *E. coli* som inneholdt det samme bakterieantallet som pasientprøvene. Tre av prøvene (A-C) som ble tilsatt *S. aureus*, oppnådde ved 16S rRNA-gen PCR Ct-verdier som var i nærheten av Ct-verdiene oppnådd for bakteriekontrollen (Tabell 11). Det samme gjaldt for prøve A-C tilsatt *E. coli* (Tabell 12). Den minimale forskjellen i Ct-verdier oppnådd mellom de tre prøvene og bakteriekontrollen indikerer at innhold av humant prøvemateriale ikke påvirker primersettene evne til å kunne detektere bakterier i disse prøvene.

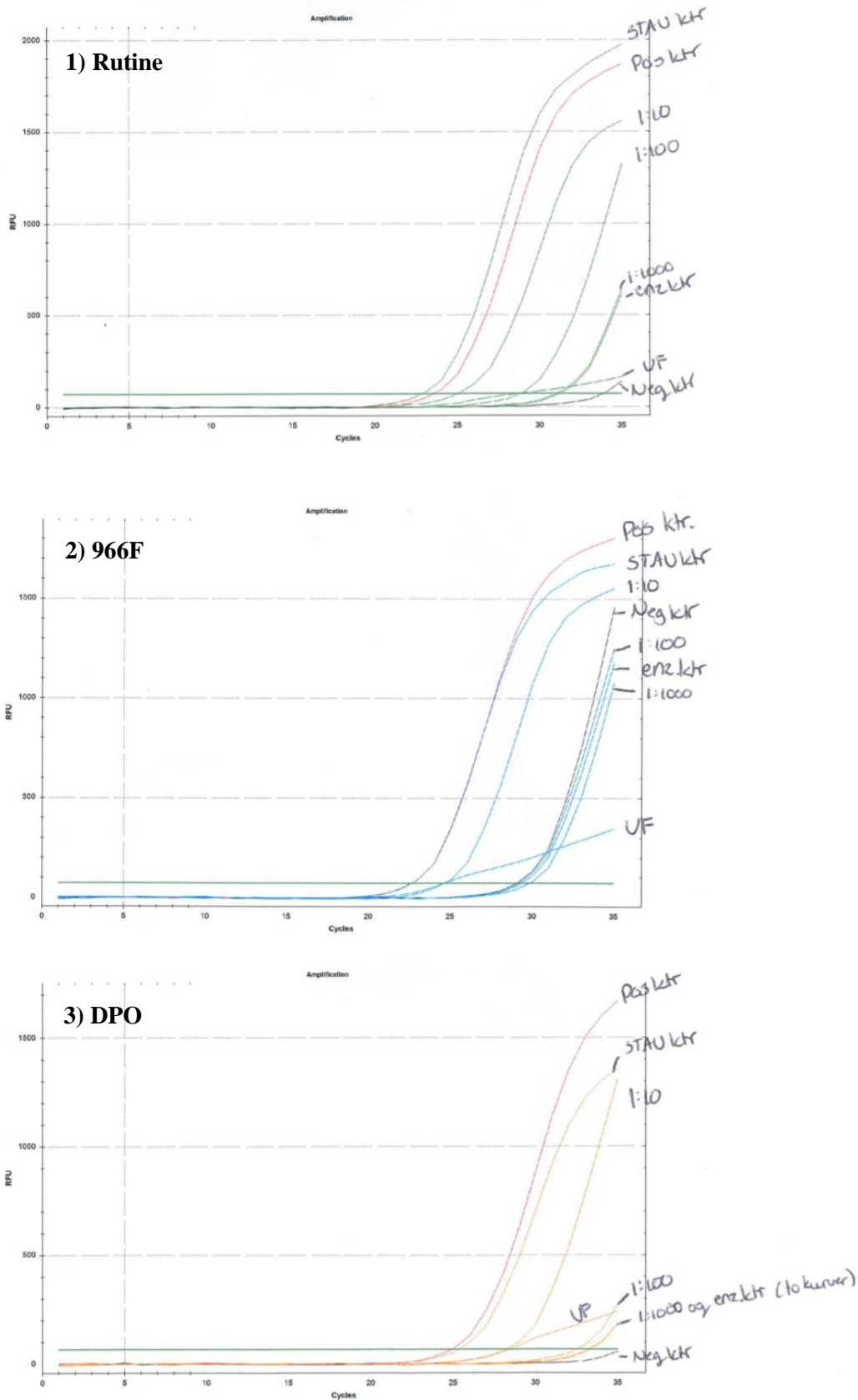
Prøve D viste en mer avvikende Ct-verdi i forhold til bakteriekontrollene. Prøve D viste også en avvikende kurve ved 16S rRNA-gen PCR med tilnærmet identisk Ct-verdi for 966F- og DPO-primersett og høyere Ct-verdi for rutineoppsett, og inhibisjon av PCR-reaksjonen ble mistenkt å være medvirkende. Dette skjedde for alle primersettene. Problemet ble undersøkt ved å lage tifolds fortyninger av prøvematerialet før PCR-analyse på 16S rRNA-gen (Vist for *S. aureus* i (Figur 9). Resultatet viser at fortykning 1:10 gir lavere Ct-verdi og en mer karakteristisk amplifikasjonskurve enn den ufortynnede prøven, noe som sannsynliggjør teorien om en inhiberende effekt av ett eller annet i prøvematerialet i PCR-amplifikasjonen.

**Tabell 11: Ct-verdier for humant prøvemateriale tilsatt *S. aureus***

Prøvemateriale	Ct-verdi		
	Rutine	966F	DPO
Prøve A (vev, hjerteklaff)	21,62	22,61	25,14
Prøve B (vev, bekken)	22,83	23,06	28,08
Prøve C (leddvæske)	22,21	22,73	24,97
Prøve D (leddvæske, hofte)	25,80	25,23	28,18
<i>S. aureus</i> kontroll	23,49	23,18	26,09
Enzymkontroll	31,66	33,06	34,02

**Tabell 12: Ct-verdier for humant prøvemateriale tilsatt *E. coli***

Prøvemateriale	Ct-verdi		
	Rutine	966F	DPO
Prøve A (vev, hjerteklaff)	19,13	19,29	21,42
Prøve B (vev, bekken)	19,73	20,33	23,03
Prøve C (leddvæske)	19,24	18,94	21,06
Prøve D (leddvæske, hofte)	21,32	22,07	24,43
<i>E. coli</i> kontroll	19,50	19,69	22,13
Enzymkontroll	31,66	33,06	34,02



**Figur 9: Amplifikasjonskurve prøve D.** Figuren viser amplifikasjonskurvene for prøve D tilsatt *Staphylococcus aureus* (STAU) og analysert med rutineprimere (1), 966F (2) og DPO (3). Ufortynnet (UF) prøve får en ukarakteristisk kurve som følge av inhibisjon. Ved å fortynne prøven 1:10 vil inhibitorene i prøven ha mindre påvirkning, og kurven får en mer normal form og stigning.

### 3.5 Primersettene spesifisitet

Et primersett sin spesifisitet vurderes som 100% god dersom primerne hybridiseres til ønsket gensekvens, samtidig som primerne unngår å hybridiseres til annet DNA i prøven. For denne oppgaven betyr det at primersettene kun skal hybridiseres til bakteriens 16S rRNA-gen. For å vurdere primersettene spesifisitet og finne ut hvilke av primersettene som har minst kryssreaktivitet med humant DNA, ble det benyttet ti pasientprøver som inneholdt både bakterielt og humant DNA. Disse ti pasientprøvene hadde tidligere blitt analysert med rutineprimerne som en del av rutineanalysene på AMM. Seks av prøvene var funnet positive og fire av prøvene var funnet negative for bakterielle funn, som vist i Tabell 1. De ti pasientprøvene ble analysert med hver av de tre primersettene med 16S rRNA-gen PCR. Etter 16S rRNA-gen PCR ble prøvene analysert med kapillær gelelektroforese for å vurdere lengden på dannede fragmenter under PCR-analysen. Prøvene ble deretter sekvensert for å bestemme hvilken bakterieart som eventuelt var til stede i prøven. De tre primersettene rutine, 966F og DPO ble vurdert etter i hvilken grad de spesifikt amplifiserte bakterielt DNA, uten å amplifisere humant DNA i prøven. Ved bruk av DPO-primersettet ble det detektert én bakterieart (*Streptococcus dysgalactiae*) i en av fire prøver (25%) som de to andre primersettene (rutine og 966F) ikke klarte å påvise (Prøve 6, Tabell 13). I tillegg kunne bakteriefunn i PCR-produkt dannet av DPO-primersettet identifiseres med en høy grad av sikkerhet (ca. 99% ID). Til sammenlikning kunne PCR-produktene fra de andre primersettene identifisere bakteriearter med mellom 89-99% ID sikkerhet. Videre kan det bemerkes av DPO-primersettet i stor grad dannet PCR-produkter med en basestørrelse som lå nært forventet størrelse (520 bp). De to andre primersettene ga PCR-fragmenter som ved sekvensering i større grad avvok fra forventet baseparstørrelse. Tabell 13 gir en oversikt over resultatet fra elektroforesen og sekvenseringen av de ti pasientprøvene (bakterieart, %ID score og baseparstørrelse), i tillegg til opprinnelige funn ved rutineanalysen på AMM.



**Tabell 13: Resultat ved analysering av ti pasientprøver.** Tabellen viser resultater fra vurdering av rutineprimerne, 966F- og DPO-primersett ved analysering av humant prøvemateriale på 16S rRNA-gen PCR. Disse resultatene inkluderer elektroforeseresultat (Pos: positiv, Neg: negativ) og funn ved sekvensering av PCR-produkt. Prøve 2 ble ikke sekvensert, da elektroforesen viste at det ikke var dannet noen PCR-fragmenter under 16S rRNA- gen.PCR.

Pr.nr.	Prøvemateriale	Opprinnelig funn i rutine	Resultat elektroforese			Sekvenseringsresultat		
			Rutine	966F	DPO	Rutine	966F	DPO
1	Abscessinnhold, nyre	<i>Ureaplasma parvum</i>	Pos	Neg	Pos	<i>Ureaplasma parvum</i> (99,15% ID) 586 bp	<i>Cutibacterium acnes</i> (100% ID) 286 bp	<i>Ureaplasma parvum</i> (98,99% ID) 507 bp
2	Beinmarg	Neg	Neg	Neg	Neg	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert	Ikke sekvensert
3	Abscess, hode	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pos	Pos	Pos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (99,15% ID) 591 bp	<i>S. mitis/orealis/pneumoniae/sp</i> (100% ID) 434 bp	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (99,03% ID) 514 bp
4	Puss, uterus	<i>Mycoplasma hominis</i>	Pos	Pos	Pos	<i>Mycoplasma hominis</i> (95,19%) 375 bp <sup>d</sup>	For kort sekvens <sup>c</sup> 31 bp <sup>c</sup>	<i>Mycoplasma hominis</i> (98,8% ID) 500 bp
5	Vev, aorta	<i>Borrelia afzeii</i>	Pos <sup>b</sup>	Pos	Pos	<i>Borrelia afzeii</i> (96,17% ID) 324 bp <sup>d</sup> , 339 bp <sup>e</sup>	<i>Borrelia afzeii</i> (97,04% ID) 445 bp	<i>Borrelia afzeii/burgdorferi</i> (99,19% ID) 502 bp
6	Leddvæske, kne	Neg	Pos <sup>a,b</sup>	?	Pos	Neg <sup>c</sup>	Neg <sup>c</sup>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (99,03% ID) 516 bp
7	Aortaklaff (implantat)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pos <sup>b</sup>	Pos	Pos	<i>Enterococcus faecalis</i> (88,92% ID) 380 bp <sup>d</sup> , 92 bp <sup>e</sup>	<i>Enterococcus faecalis</i> (100% ID) 429 bp	<i>Enterococcus faecalis</i> (100% ID) 473 bp
8	Leddvæske, albue	Neg	Neg <sup>b</sup>	Neg	Neg	Humant DNA (99,33% ID) 594 bp	Neg <sup>c</sup>	Neg <sup>c</sup>
9	Vev, hjerteklaff	Neg	Neg <sup>b</sup>	Pos	Neg <sup>a</sup>	Humant DNA (100% ID) 466 bp	Neg <sup>c</sup>	Neg <sup>c</sup>
10	Vev, mitralklaff	<i>Corynebacterium sp.</i>	Pos <sup>b</sup>	Pos	Pos	<i>Corynebacterium xerosis/freneyi/sp</i> (96,75% ID) 461 bp <sup>d</sup> , 336 bp <sup>e</sup>	<i>Corynebacterium freneyi /sp</i> (100% ID) 428 bp	<i>Corynebacterium freneyi</i> (99,37% ID) 484 bp

<sup>a</sup> Svakt bånd (ca 500 bp) ved elektroforese

<sup>b</sup> Kryssreaktivitet med humant DNA

<sup>c</sup> Ingen lesbar sekvens

<sup>d</sup> Kun forward sekvens

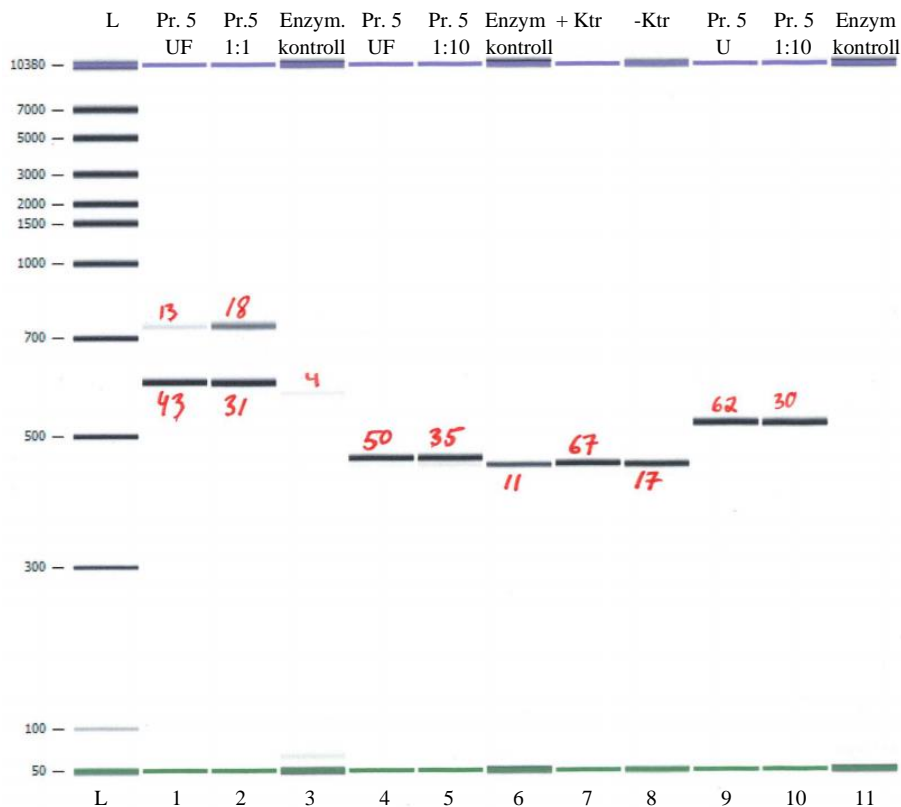
<sup>e</sup> Kun revers sekvens

? Vanskelig å vurdere på grunn av DNA-fragment i enzymkontroll og negativ kontroll

### 3.5.1 Elektroforeseresultat

For å bestemme lengden og molariteten til PCR-produkt ble kapillær gelelektroforese benyttet. Ved å se på lengden av fragmentene til PCR-produktene kunne det avgjøres om aktuelle PCR-produkt var av en baseparstørrelse forenelig med bakterielt DNA, eller om PCR-produktene skyldes DNA fra andre kilder (oftest ved amplifikasjon på grunn av kryssreaksjon med humant DNA). Molariteten til prøvens PCR-produkt ble vurdert opp mot molariteten til eventuelle bånd hos enzymkontroll og negativ kontroll, ettersom molariteten sier noe om hvor mye DNA som er amplifisert ved PCR-reaksjonen. Hver prøve ble analysert uforynnet og fortynt 1:10 på instrumentet Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA). Rutineprimerne viser tendenser til kryssreaktivitet med humant DNA, da primersettet danner DNA-fragmenter med lengder av både ca. 540 bp (bakterielt DNA) og ca. 700 bp (tolket som humant DNA) (Figur 10, brønn 1 og 2). 966F- og DPO-primersettet viser ingen tendenser til kryssreaktivitet med humant DNA, da de kun danner fragmenter av en bestemt størrelse for hvert primersett (966F; ca. 440 bp, DPO; ca. 520 bp). Dette indikerer en høyere spesifisitet

for disse to primersettene. 966F-primersettet har i tillegg dannelse av fragmenter i den negative kontrollen og i enzymkontrollen, noe som kan indikere at primersettet detekterer bakterielt DNA i reagenser. De interne kvalitetskontrollene ved bruk av DPO-primersett og rutineprimere ble som forventet (er ikke vist i Figur 10). DPO detekterer hverken humant DNA eller bakterier i reagenser.

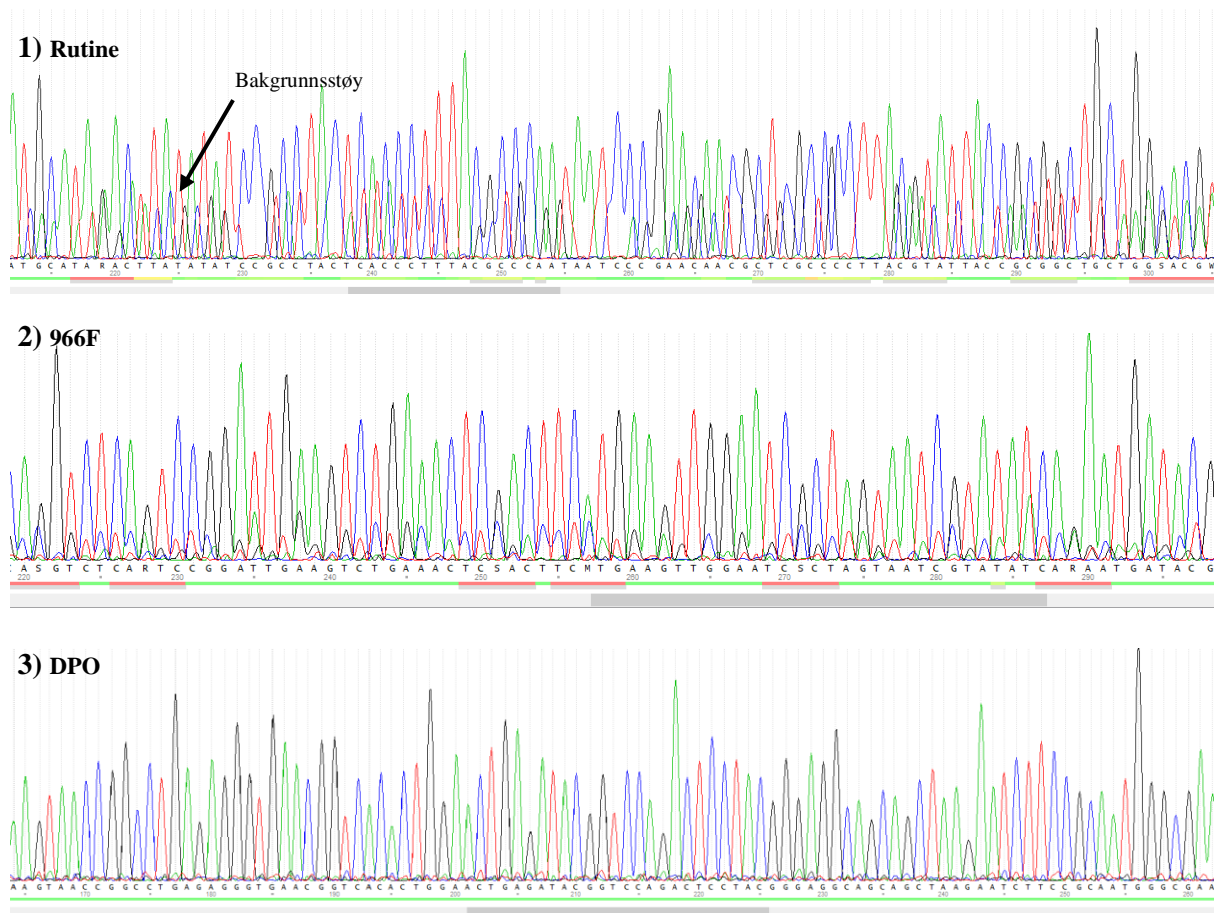


**Figur 10: Elektroforeseresultat Prøve 5 (vev, aorta).** Figuren viser størrelsen til DNA-fragmentene dannet under PCR-reaksjonen. L=størrelsesmarkør, Brønn 1-3 (Rutine), brønn 4-8 (966F), brønn 9-11 (DPO). Den røde skriften angir molaritet til fragmentene (nmol/L). UF=ufortynnet prøve.

### 3.5.2 Sekvenseringsresultat

Ved 16S rRNA-gen PCR er det nødvendig å sekvensere PCR-produktet for å identifisere den enkelte bakteriearten ved hjelp av bakteriens DNA. Dette må gjøres fordi 16S rRNA-gen PCR i teorien vil kunne amplifisere DNA fra alle bakteriearter til stede i en prøve. Ved sekvensering bestemmes basesekvensen til PCR-produktet, og denne sammenliknes deretter med andre sekvenser i ulike databaser. Prøver som viser tilstedeværelse av bakterielt DNA ved elektroforese ble sekvensert som beskrevet i kapittel 2.7.1-2.7.3. Figur 8 viser sekvenseringsresultatet av prøve 5. Bruk av rutineprimere gir mye bakgrunnsstøy ved sekvensering av PCR-produkt (Figur 11.1). Elektroferogrammet består her av overlappende signaler med tilstedeværelse av små underliggende topper (bakgrunnsstøy), som trolig kan

skyldes tilstedeværelse av humant DNA (Figur 10, brønn 1 og 2). Sammenliknet med rutineprimere gir bruk av 966F-primersettet et renere elektroferogram, men også her er det noe interfererende bakgrunnsstøy (Figur 11.2). Bruk av DPO-primere gir det reneste elektroferogrammet av de tre primersettene (Figur 11.3). Dette elektroferogrammet har jevne og smale signaltopper, med en tydelig separasjon mellom toppene. Det er liten grad av overlapp mellom signaltoppene, i tillegg til at det er fravær av bakgrunnsstøy.



**Figur 11: Elektroferogram.** Figuren viser elektroferogrammet fra sekvenseringen av prøve 5 (vev, aorta), ved benyttelse av rutineprimere (1), 966F (2) og DPO (3). Hver farget kurve indikerer en bestemt base: svart kurve indikerer basen guanin (G), rød indikerer tymin (T), blå indikerer cytosin (C) og grønn indikerer adenin (A). En topp i elektroferogrammet indikerer et signal ved avlesning i sekvenseringsreaksjonen, som følger av fluorescensmerkede terminale baser. Elektroferogrammet viser kun sekvensutsnitt fra forward primer. Den sorte pila viser til bakgrunnsstøy som kan oppstå ved uspesifikk amplifisering av blant annet humant DNA.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Optimalisering av PCR-program

Det ble utført en optimalisering av PCR-programmet til 16S rRNA-gen PCR av ressursmessige årsaker. Det var hensiktsmessig for AMM dersom analysen med hvert av de tre primersettene kunne utføres med samme PCR-program, og dermed samme PCR-instrument. Det at primersettene kan analyseres på samme PCR-program gjør arbeidsflyten ved 16S rRNA-gen PCR lettere, i tillegg til å redusere svartiden. Optimaliseringen ble utført ved å undersøke hvor stor påvirkning valg av hybridiseringstemperatur, elongeringstid og antall sykluser hadde å si for resultatet. Resultatene fra disse undersøkelsene viste at det kunne benyttes samme PCR-program ved bruk av alle de tre primersettene.

Ved optimalisering av hybridiseringstemperaturen var DPO-primersettet mest temperaturstabil, det vil si at det var minimal differanse i Ct-verdi for de ulike hybridiseringstemperaturene. Dette kan ha en sammenheng med DPO-primerens strukturelle oppbygning (Chun et al., 2007). 966F viste også en stabilitet i hele temperaturområdet. Rutineprimerne viste seg å være det minst temperaturstabile av de tre primersettene. Det ble derfor bestemt at hybridiseringstemperaturen på PCR-programmet skulle være 58°C, da det er denne hybridiseringstemperaturen som benyttes i 16S rRNA-gen PCR-programmet til AMM i dag. Elongeringstiden ble bestemt til å være 20 sek. 10 sek var trolig litt for kort tid til at DNA polymerasen fikk dannet PCR-produkter av riktig baseparlengde. Ved sammenlikning av elongeringstid på 20 og 30 sek ble det ikke observert store forskjeller. Det er viktig at analysetiden og PCR-programmet er så kort som mulig uten at det går utover kvaliteten på analysen, og dette førte til at elongeringstiden ble satt til 20 sek. Antall sykluser ble satt til 35 for å forhindre store mengder bakgrunnsstøy. 45 sykluser ga mye bakgrunnsstøy, da elektroforesen av disse PCR-produktene viste at enzymkontrollene til prøvene og de negative kontrollene fikk sterke bånd. Det at alle enzymkontrollene og negative kontrollene dannet PCR-produkter tyder på at det ved 45 sykluser vil kunne amplifiseres mer av DNA i reagensene, noe som gjør det vanskelig å vurdere hva som er positivt eller ikke. Dette vil trolig også gjøre det problematisk ved sekvensering, da det amplifiseres mye annet DNA som kan forstyrre avlesningen av basesekvensen til PCR-produktene. For å bekrefte de ulike resultatene oppnådd under optimalisering av PCR-programmet burde det blitt utført elektroforese og sekvensering på alle PCR-produkt, men på grunn av kostnader og tidsmangel ble ikke dette utført.

## 4.2 Primersettene evne til å detektere et bredt spekter av bakteriearter

Primersettene evne til å detektere et bredt spekter av bakteriearter ble undersøkt ved å analysere et bakteriepanel (Tabell 3) på 16S rRNA-genet PCR med hver av de tre primersettene som er beskrevet i Tabell 4. Resultatet viste at alle tre primersettene kunne detektere alle bakteriene i bakteriepanelet (Tabell 10). Det er ønskelig at primersettene detekterer flest mulig bakterier (helst alle), og at de nye primersettene ikke detekterer færre enn det rutineprimerne gjør.

Bakteriepanelet inkluderte også to prøver av gjærsoppen *Candida albicans*, en med tilhørende enzymkontroll og en uten. Gjærsoppen har ikke 16S rRNA-genet og betraktes derfor som en negativ kontroll. *C. albicans*-prøvene ser tilsynelatende positive ut på grunn av dannelse av PCR-produkt med Ct-verdi rundt 29-32 sykluser (Tabell 10). Det ble derfor i tillegg analysert en enzymkontroll tilhørende *C. albicans* (CCUG 32723). Denne enzymkontrollen har for alle de tre primersettene omtrent like Ct-verdier som *C. albicans*-prøven ( $\leq 2$  sykluser i differanse). I tillegg viste smeltekurven til *C. albicans* dannelsen av produkter med annet smeltepunkt enn den positive kontrollen, samt en avvikende form med en sekundær (bred og uspesifikk) smeltetopp (Figur 8). Vurderingene ut ifra enzymkontrollen og smeltekurven indikerer at Ct-verdi hos *C. albicans*-prøven trolig skyldes bakteriell forurensing fra reagenser, og ikke amplifisering av gjærsoppens DNA (kryssreaktivitet). Som tidligere nevnt så er det ikke ønskelig at primersettene gir kryssreaktivitet med humant DNA, men det er heller ikke ønskelig med kryssreaktivitet med andre mikrober slik som gjærsopp.

Alle resultatene fra bakteriepanelet burde ha blitt bekreftet ved sekvensering. Dette hadde gjort at primersettene evne til å hybridiseres til 16S rRNA-genet kunne kommet tydeligere fram. Det ville også kommet tydeligere fram om primersettene faktisk detekterer den aktuelle bakteriearten, og hvor god identifikasjon (%ID) de ulike primersettene ga. Sekvensering ble ikke utført på grunn av kostnader og for kort tidsrom til utførelse. Som erstatning ble det derfor valgt å kun vurdere primersettene evne til å identifisere bakterieartene ut ifra Ct-verdiene til prøvene, samt å undersøke om smeltekurven viste dannelse av uspesifikke produkter (Figur 8). I tillegg til sekvensering så vil det være aktuelt å utføre flere forsøk for å kontrollere resultatene.

### 4.3 Primersettene sensitivitet

Sensitiviteten til primersettene handler om i hvor stor grad primersettene detekterer lave konsentrasjoner av bakterielt DNA. Sensitivitetsforsøket ble utført på en tifolds fortynningsrekke av *S. aureus* og *E. coli*, med utgangspunkt i 0,5 McFarland. Det var ikke satt noen spesifikke krav til primersettene sensitivitet, annet enn at sensitiviteten måtte være minst like god eller bedre enn rutineprimernes sensitivitet.

På grunn av ressursmangel og store kostnader ble det ikke utført elektroforese av PCR-produktene fra sensitivitetsforsøket. Dette hadde vært nyttig for å få et tydeligere bilde av sensitiviteten til primerne. I samråd med faglige veiledere ble det i stedet bestemt at Ct-verdiene ga et tilstrekkelig sammenlikningsgrunnlag for å vurdere om aktuell fortynning var positiv eller negativ på PCR (Vedlegg 5). Prøven ble vurdert opp mot tilhørende enzymkontroll, der prøven ble definert som positiv dersom den hadde en Ct-verdi som var omtrent to Ct-verdier lavere enn enzymkontrollen. Det ble også vurdert når den logaritmiske økningen av Ct-verdier til neste fortynning (ca. 3,3 Ct-verdier) opphørte. Bruk av DPO-primersettet viste for *S. aureus* en høyere sensitivitet (27 bakterier per PCR-reaksjon) enn rutineprimerne og 966F-primersettet (273 bakterier per PCR-reaksjon). For *E. coli* viste alle tre primersettene like god sensitivitet (2727 bakterier per PCR-reaksjon). Disse resultatene indikerer at DPO-primersettet generelt har en høyere sensitivitet enn de to andre primersettene testet i oppgaven.

En viktig faktor som påvirker primersettene sensitivitet er at bakterier har et varierende antall repeterende gensekvenser av 16S rRNA-genet, og dette kan variere fra 1 kopi og opp til 15 kopier hos ulike bakteriearter (Klappenbach et al., 2001). Denne variasjonen kan gjøre det vanskelig å tolke resultater fra 16S rRNA-gen PCR, da primersettene vil ha ulik sensitivitet ovenfor ulike bakterier. Bakterier med flere repeterende sekvenser av 16S rRNA-genet vil kunne detekteres ved lavere konsentrasjoner, da det oppformes flere gensekvenser per PCR-syklus, sammenliknet med en bakterie med et mindre antall repeterende 16S rRNA-gensekvenser. Dette forutsetter at det er et likt antall bakterier som utgangspunkt i PCR-reaksjonen. Som beskrevet i 2.8 har *S. aureus* fem repeterende 16S rRNA-gensekvenser, mens *E. coli* har syv repeterende gensekvenser (NCBI). Dette vil i teorien bety at dersom to prøver inneholder en bestemt konsentrasjon av enten *S. aureus* eller *E. coli*, vil prøven som

inneholder *E. coli* få en lavere Ct-verdi enn prøven som inneholder *S. aureus*. Ved sensitivitetstests ble det analysert prøver med like store mengder av bakteriene *E. coli* og *S. aureus* (utgangspunkt i 0,5 McFarland). Resultatene fra sensitivitetstests viser at *S. aureus* detekteres ved en lavere konsentrasjon enn det *E. coli* gjør (Vedlegg 5) For *E. coli* kan det ha oppstått en fortynningsfeil som gjør at resultatene ikke er helt representative for teorien. Det er en avvikende stor differanse mellom Ct-verdiene til konsentrasjonene  $1,5 \cdot 10^5$  og  $1,5 \cdot 10^4$  CFU/mL (Vedlegg 5) og dette burde blitt undersøkt nærmere ved å analysere flere paralleller av prøvene.

Ved sensitivitetstests ble kun konsentrasjonen på 0,5 McFarland (tilsvarende  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/mL) ekstrahert, og deretter ble det utført en tifoldts fortynning av eluatene ned til  $1,5 \cdot 10^1$  CFU/mL. Ved fortynningen ble svært lave volum benyttet (på grunn av begrenset tilgang på PCR Grade H<sub>2</sub>O), og sjansen for at det skjer en fortynningsfeil er dermed stor. Det hadde vært mer riktig å ekstrahere hele fortynningsrekken for å få et mer realistisk bilde av ekstraksjonens evne til å trekke ut DNA fra prøvematerialet ved ulike konsentrasjoner. Dette ble ikke gjort på grunn av store kostnader. Eventuelle fortynningsfeil kunne på denne måten også ha blitt unngått.

For å undersøke sensitiviteten nærmere burde deteksjonsgrensen blitt beregnet. Deteksjonsgrensen kunne blitt benyttet for å si nøyaktig hvor lave konsentrasjoner av bakterien primersettene detekterer. I mer spesifikke analyser er det mer realistisk med en lav deteksjonsgrense, men ettersom 16S rRNA-gen PCR er en universell metode er det for denne metoden noe mer urealistisk. Ettersom antall repeterende sekvenser av 16S rRNA-genet varierer hos ulike bakteriearter er det vanskelig å beregne en bestemt deteksjonsgrense ved 16S rRNA-gen PCR, da ulike bakteriearter vil kunne ha ulike deteksjonsgrenser. Ideelt sett burde også forsøket gjentas ved at det benyttes flere konsentrasjoner i området rundt der tenkelig deteksjonsgrense ligger.

#### **4.4 Inhibisjon ved tilstedeværelse av humant prøvemateriale**

Det ble også undersøkt hvordan primersettens evne til å detektere en bestemt mengde bakterier ble påvirket ved tilstedeværelse av humant prøvemateriale (3.4). Dette ble gjort ved å analysere fire humane prøver som tidligere var funnet negative ved 16S rRNA-gen PCR. En bestemt mengde av bakteriene *S. aureus* og *E. coli* (150 000 CFU) ble tilsatt i alle prøvene. I tillegg ble det analysert bakteriekontroller som var tilsatt samme antall bakterier. Ved tilstedeværelse av humant prøvemateriale ble ikke PCR-reaksjonen påvirket i tre av fire tilfeller (75%). Ct-verdiene til disse tre prøvene indikerte at primerne påviser bakteriene i prøven uten å bli påvirket av det humane prøvematerialet, da Ct-verdiene er ganske lik Ct-verdien til bakteriekontrollen. For at denne undersøkelsen skulle vært mer nøyaktig burde DNA-konsentrasjonen i PCR-produktene blitt målt slik at det kunne blitt beregnet hvor mye bakterier som faktisk var til stede. På denne måten ville primersettens evne til å detektere bakterier blitt grundigere undersøkt, men på grunn av tidsmangel og kostnader ble det i samråd med faglige veiledere vurdert at dette ikke skulle utføres for denne oppgaven.

Én av prøvene viste tegn til at noe i pasientprøven inhiberte (hemmet) PCR-reaksjonen. Det kan være flere ulike årsaker til en slik inhibisjon, men fellestrekket er at det er en bestanddel i prøvematerialet som inhiberer amplifiseringen av gensekvenser under PCR-reaksjonen. Denne inhiberende virkningen ble redusert da prøven ble fortynnet, og PCR-resultatet viste en normal amplifisering av gensekvenser (Figur 9). Dette indikerer viktigheten av at pasientprøver også analyseres i en fortynning på 1:10, noe som også er en del av rutinen ved 16S rRNA-gen PCR ved AMM. Det kan fortsatt være en viss risiko for at noen prøver har så stor grad av inhibering at det ikke vil skje en amplifikasjon av gensekvenser under PCR-reaksjonen. På AMM gjelder dette spesielt blodkulturer med massiv bakterievekst. Ved en annen anledning kunne det dermed vært interessant å videre undersøke den inhiberende effekten på slike blodkulturprøver ved bruk av primersettene 966F og DPO. Ingen av primersettene viste seg å være noe bedre enn de andre med tanke på inhibisjon i prøven.



#### 4.5 Primersettene spesifisitet

Ved undersøkelse av primersettene spesifisitet var det vanskelig å sette bestemte krav til hvor spesifikk de aktuelle primersettene skulle være ved 16S rRNA-gen PCR. Det mest ønskelige hadde vært 100% spesifisitet. Det finnes derimot ingen gullstandard for en slik spesifisitetsundersøkelse, ettersom 16S rRNA-gen PCR er en universell metode hvor alt 16S rRNA-gen i prøven kan amplifiseres. Dette gjør at det lettere oppstår problemer med for eksempel reagenser, da det er vanskelig å garantere at disse er frie for bakterier. Det eneste kravet som det ble tatt hensyn til for å kunne validere de nye primersettene spesifisitet var at de skulle være minst like spesifikke som rutineprimerne benyttet ved AMM i dag. Med spesifisitet menes det i denne oppgaven at primerne kun binder seg til bakterielt DNA, og ikke noe annet i prøven (for eksempel humant DNA).

Ettersom 16S rRNA-gen PCR-metoden utføres på direktemateriale, altså humane pasientprøver, er det viktig at primerne som benyttes påvirkes i minst mulig grad av humant DNA i prøven, da humant DNA kan påvirke resultatet. Dette har i lengre tid vært et problem med rutineprimerne som benyttes i PCR-analysen av 16S rRNA-genet ved AMM. Det er svært viktig for AMM å få kvalitetssikre resultater ved bruk av 16S rRNA-gen PCR, ettersom det er en metode som benyttes på klinisk viktige prøver der andre identifikasjonsmetoder ikke er tilstrekkelige. Kvaliteten på resultatene er også viktig for pasienten da dette kan bidra til en raskere og mer spesifikk diagnose og behandling.

Universell 16S rRNA-gen PCR utnytter de konserverte genene i bakterienes 16S rRNA-gen til å amplifisere gensekvenser. Den aktuelle bakterien kan deretter identifiseres ved å sekvensere de variable og artsspesifikke genområdene som blir amplifisert (Woese, 1987). For å undersøke om spesifisiteten til de nye primersettene ble påvirket av tilstedeværelse av humant DNA, ble det analysert ti humane pasientprøver der det ved bruk av rutineprimerne tidligere har blitt detektert humant DNA i seks av prøvene. Resultatene fra kapillær gelelektroforese viste ikke utslag for humant DNA i noen av prøvene ved bruk av de to nye primersettene 966F og DPO (Tabell 13). Det ble heller ikke funnet bånd av annen størrelse enn det som var ønskelig, noe som vil si at det kun var bakterielt DNA som ble detektert. DPO-primerne rettet mot 16S rRNA-genet er kjent for at de i større grad skal hindre kryssreaksjon med humant DNA (Chun et al., 2007; Kommedal et al., 2012), noe som

stemmer godt overens med resultatene. Resultatet i oppgaven viser at primersettene 966F og DPO har bedre spesifisitet enn rutineprimerne benyttet ved AMM. Dermed blir det mindre problematisk å benytte disse primersettene på direktemateriale i 16S rRNA-gen PCR-metoden, sammenliknet med rutineprimerne som benyttes i dag.

#### **4.5.1 Konsekvenser ved kryssreaktivitet med humant DNA og bakteriell forurensning av reagenser**

Konsekvensene av at rutineprimersettet har kryssreaktivitet med humant DNA, er at bruk av dette primersettet kan føre til at bakterier som er til stede i pasientprøven ikke detekteres. Dette kan oppstå fordi humant DNA kan overskygge bakterielt DNA i prøven. Sannsynligheten for slike falske negative resultater kan reduseres ved å benytte primersett som ikke har denne kryssreaktiviteten med humant DNA. Som vist i resultatene i Tabell 13 er DPO og 966F to kandidater til dette, da ingen av primersettene viser kryssreaktivitet med humant DNA. Elektroforeseresultatet av prøve 6 indikerer at prøven ved bruk av rutineprimere er positiv (svakt bakterielt bånd), men at det også er tilstedeværelse av humant DNA. Dette humane DNA-et kan virke interfererende i sekvenseringsreaksjonen, slik at det blir vanskelig å identifisere bakterien i prøven. Ved bruk av DPO-primere ble det ved sekvensering av prøve 6 detektert funn av *Streptococcus dysgalactiae*, mens bruk av rutineprimerne ikke ga en lesbar sekvens. Elektroforeseresultatet av prøve 6 analysert med DPO viste kun gensekvenser som var av bakteriell baseparstørrelse. DPO har altså ingen kryssreaktivitet med humant DNA. Dette er en klar indikasjon på at DPO-primere var mer spesifikke enn de andre primerne benyttet i oppgaven. DPO-primernes høye spesifisitet kan ha en sammenheng med DPO-primernes oppbygning (1.3), da 3'-segmentet er av en kortere lengde og gir en økt spesifisitet. Dette segmentet må være fullstendig komplementært til aktuell gensekvens for at primeren skal hybridisere og initiere elongering (Bergstrom et al., 1997; Chun et al., 2007; Kommedal et al., 2012).

966F-primersettet viser ingen tendenser til kryssreaktivitet med humant DNA. Resultatet fra analysering med dette primersettet viser derimot elektroforesebånd i den negative kontrollen og enzymkontrollen, noe som indikerer funn av bakterier i reagensene. I slike tilfeller må prøvens molaritet vurderes opp mot enzymkontrollen og den negative kontrollen for å vurdere om det kan være andre bakterier til stede enn det som tilsynelatende kommer fra reagensene. For prøve 6 (Tabell 13) ble det ved elektroforese vanskelig å tolke om prøven var

positiv eller negativ, da molariteten til prøven hadde et lite avvik fra molariteten til enzymkontrollen (men ikke stort nok til å sikkert kunne defineres som positiv). Det antas at siden 966F detekterer bakterier i reagenser vil dette gjøre det vanskeligere å avlese elektroferogrammet og nukleotidsekvensen til prøven. Årsaken til dette er at det etter PCR-reaksjonen vil være amplifiserte gensekvenser fra både bakterier i prøven og i reagenser. Sekvenseringen av PCR-produkt fra prøve 6 analysert med 966F-primersettet gir ingen lesbar sekvens (Tabell 13), noe som kan indikere at PCR-produkt fra bakterier i reagenser virker forstyrrende under sekvensering. Ved sekvensering av enzymkontroll og negativ kontroll analysert med 966F-primersettet ble bakterien *Cutibacterium acnes* identifisert med 99,7% sikkerhet. Det ble ikke dannet PCR-produkter i enzymkontrollen og den negative kontrollen analysert med rutineprimerne og DPO, noe som kan tyde på at 966F-primersettet i større grad er sensitivt ovenfor bakterier i reagenser enn det de andre benyttede primersettene er. I en 16S rRNA-gen PCR er det ønskelig med minst mulig deteksjon av bakterier i reagenser, da bakteriefrie reagenser er tilnærmet umulig å oppnå.

En annen ting som er verdt å nevne er at de tre primersettene dekker ulike variable områder på 16S rRNA-genet. Som beskrevet i Tabell 4 så dekker DPO-primersettet V1-V3, rutineprimersettet dekker V3-V5, mens 966F dekker V5-V8. Det at primersettene dekker ulike variable områder av 16S rRNA-genet er en variabel som kan være viktig å tenke på når det er snakk om kryssreaktiviteten med humant DNA. Resultatene kunne muligens sett annerledes ut dersom primersettene hadde dekket samme variable områder i 16S rRNA-genet. Dette er en variabel som ikke er testet i denne oppgaven, men kan være en interessant faktor å undersøke ved andre anledninger. På en annen side kan primersettene utfylle hverandre ved å til sammen gi en lengre DNA-sekvens som kan gi en sikrere identifisering av bakterier. Også funn av *Cutibacterium acnes* ved bruk av 966F i ett tilfelle kan demonstrere at å dekke enhver bakterie kan være problematisk med 16S rRNA-gen PCR.

#### **4.5.2 Problematikk tilknyttet krav til identifikasjon av bakteriearter**

Gensekvenser funnet i prøvene ble sammenliknet med sekvenser funnet i GenBank-databasen NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). %ID benyttes som et uttrykk for hvor godt sekvensen i prøvene stemte overens med sekvenser i GenBank-databasen. Det er ønskelig med høyest mulig %ID, og kriteriet som ble benyttet i denne oppgaven var  $\geq 99\%$ .

DPO innfrir dette kravet for alle prøver med en positiv bakterieidentifikasjon. Rutineprimerne innfrir ikke dette kravet ved fire av de seks prøvene som hadde funn av bakterielt DNA, mens 966F-primersettet innfrir ikke dette kravet ved en av prøvene som opprinnelig inneholdt bakterielt DNA. Igjen kan dette ha sammenheng med problematikken tilknyttet 966F-primersettet sin tendens til å detektere bakterier i reagenser. 966F-primersettet detekterer ikke positive funn hos prøve 1 og 4, muligens på grunn av forurensing fra reagenser. I tillegg hadde PCR-produktene ved to av prøvene kortere sekvens enn forventet (Tabell 13). Dette kan være en indikasjon på at det kun var en liten andel av elektroferogrammet som var av god nok kvalitet til å si noe om baserekkefølgen til gensekvensen. Den korte baseparlengden vil også gi et svakt sammenlikningsgrunnlag mot sekvenser funnet i NCBI BLAST.

Det er viktig å påpeke at når det kommer til kriterium for %ID, så er ikke kravet på  $\geq 99\%$  for bakteriespecies entydig og universelt akseptert. Det er noen uenigheter om dette kravet er strengt nok, og av den grunn er det også noen som benytter seg av et krav på  $\geq 99,5\%$  ID. I denne oppgaven ble det i samråd med faglige veiledere ved AMM bestemt at kravet på  $\geq 99\%$  ID var tilstrekkelig for vurdering på speciesnivå, da det er dette kravet laboratoriet benytter i sin rutinediagnostikk. Et annet problem er at enkelte gensekvenser i offentlige databaser (slik som GenBank) ikke er kvalitetssikret (Jill E Clarridge III, 2004). Elektroferogrammene til sekvensene i GenBank er ikke tilgjengelige, og det gjør at det er vanskelig å undersøke kvaliteten til disse sekvensene. Det er derfor ikke mulig å se på separasjonen av signaltoppene, og heller ikke hvor mye bakgrunnsstøy sekvensene inneholder. Dette er to viktige faktorer å ta hensyn til når et elektroferogram vurderes. En annen måte å vurdere kvaliteten til sekvensen på dersom elektroferogrammet ikke er tilgjengelig, er ved å se om sekvensene inneholder nukleotider det ikke er mulig å bestemme, benevnt som N (enhver base). Det er derfor viktig å til en viss grad være noe kritisk til sekvensene det sammenliknes med i Genbank (Jill E Clarridge III, 2004).

#### **4.6 Konklusjon og videre arbeid**

Det opprinnelige primersettet som benyttes ved 16S rRNA-gen PCR hos AMM viser kryssreaktivitet med humant DNA, noe som kan gjøre sekvenseringsavlesningen vanskelig. Samtidig kan det øke risikoen for falsk negative resultater, da humant DNA i noen tilfeller kan dominere over bakterielt DNA. Bruk av DPO-primersettet kan øke analysens mulighet for å påvise og identifisere bakterier i klinisk viktige pasientprøver, der andre

identifikasjonsmetoder ikke er tilstrekkelige. DPO viser mindre tendenser til kryssreaktivitet og gir bedre %ID score for bakteriefunnene, og har dermed bedre spesifisitet enn rutineprimerne. Kvalitativt detekterte DPO-primersettet også én bakterieart mer i prøvematerialet enn det rutineprimerne og 966F gjorde. Sensitiviteten er tilsynelatende også bedre for DPO-primersettet, ettersom primersettet gir positivt resultat i en fortytning mer av *S. aureus*. Dette er derimot et forsøk som burde repeteres grunnet mulig fortynningsfeil. 966F-primersettet viste også mindre kryssreaktivitet med humant DNA, men primersettet detekterer i større grad bakterier i reagenser. Dette er ugunstig da det påvirker kvaliteten av elektroferogrammet fra sekvenseringsreaksjonen og %ID score. Ut ifra utført sensitivitetsforsøk var det ikke stor forskjell på sensitiviteten til rutineprimerne og 966F-primersettet for hverken *S. aureus* eller *E. coli*.

Det anbefales å forkaste 966F-primersettet, da dette primersettet tilsynelatende påviser bakterier i reagenser. Eventuelt kan det utføres flere forsøk med 966F-primersettet, for å undersøke dette nærmere. DPO-primersettet har derimot svært lovende resultater med hensyn til kryssreaktivitet med humant DNA. Det anbefales å teste ut DPO-primersettet på et større antall prøver, for å få et enda større sammenlikningsgrunnlag. Dette kan gjøres ved at DPO tas inn som en del av rutinen til AMM og at avdelingen analyserer DPO og rutineprimerne parallelt gjennom en løpende validering. I tillegg anbefales det ytterligere undersøkelser av primernes sensitivitet og beregning av deteksjonsgrense ved både CFU-telling og måling av nukleinsyrekonsentrasjon. Fortyninger bør da gjøres ved større volum for å forhindre fortynningsfeil, og det bør analyseres flere paralleller for et mer kvalitetssikret resultat.

## 5 Kilder

Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2019). DNA cloning by PCR. I *Essential Cell Biology* (Fifth edition, s. s. 341-343). W. W. Norton & Company Inc.

Bergstrom, D. E., Zhang, P., & Johnson, W. T. (1997). Comparison of the base pairing properties of a series of nitroazole nucleobase analogs in the oligodeoxyribonucleotide sequence 5'-d(CG CX AATT YGCG)-3'. *Nucleic Acids Research*, 25(10), 1935–1942. <https://doi.org/10.1093/nar/25.10.1935>

Bjerkan, G., Witsø, E., Nor, A., Viset, T., Løseth, K., Lydersen, S., Persen, L., & Bergh, K. (2012). A comprehensive microbiological evaluation of fifty-four patients undergoing revision surgery due to prosthetic joint loosening. *Journal of Medical Microbiology*, 61(4), 572–581. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036087-0>

Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., & Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148(2), 107–127. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90508-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90508-8)

Chun, J.-Y., Kim, K.-J., Hwang, I.-T., Kim, Y.-J., Lee, D.-H., Lee, I.-K., & Kim, J.-K. (2007). Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Research*, 35(6), e40–e40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm051>

David A Relman. (1999). The Search for Unrecognized Pathogens. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 284(5418), 1308–1310. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1308>

*Escherichia coli* O157:H7 *yaeD*, *rrsH*, *ileV*, *alaV*, *rrlH*, *rrfH*, *aspU*, *yafB* genes for phosphatase, 16S rRNA, isoleucine tRNA 1B, alanine tRNA 1B, 23S rRNA, 5S rRNA, aspartate tRNA 1, aldose reductase, complete and partial cds. (2016, juli 26). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB035926.1>

F Sanger, S Nicklen, & A R Coulson. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Harvey, D. (2016). Chapter 12: Chromatographic & Electrophoretic Methods (12G Electrophoresis). I *Analytical Chemistry 2.1* (2.1, s. 814). [http://dpuadweb.depauw.edu/harvey\\_web/eTextProject/version\\_2.1.html](http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.1.html)

James, G. (2010). PCR Basics. I M. Schuller, T. P. Sloots, G. S. James, C. L. Halliday, & I. W. J. Carter (Red.), *PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective* (s. 3–10). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3_1)

Jill E Clarridge III. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>

- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., & Schmidt, T. M. (2001). Rrndb: The ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 181–184. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.181>
- Kommedal, Ø., Simmon, K., Karaca, D., Langeland, N., & Wiker, H. G. (2012). Dual Priming Oligonucleotides for Broad-Range Amplification of the Bacterial 16S rRNA Gene Directly from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1289–1294. <https://doi.org/10.1128/JCM.06269-11>
- Lawrence M Gillman, James Gunton, Christine Y Turenne, Joyce Wolfe, & Amin M Kabani. (2001). Identification of Mycobacterium Species by Multiple-Fluorescence PCR–Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3085–3091. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3085-3091.2001>
- Nicholson, P., Rawiwan, P., & Surachetpong, W. (2018). Detection of Tilapia Lake Virus Using Conventional RT-PCR and SYBR Green RT-qPCR. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 141, e58596. <https://doi.org/10.3791/58596>
- PCR Basics—NO.* (u.å.). Hentet 22. april 2021, fra [www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html](http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html)
- Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*, 166(2), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.003>
- Real-Time PCR - Applications Guide.* (2006). Bio-Rad Laboratories, Inc. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5279.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf)
- Real-time PCR handbook.* (2012). <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Rifai, N., Horvath, A. R., & Wittwer, C. T. (2019a). Amplification Techniques. I *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (Eighth edition, s. 938–943). Elsevier, Inc.
- Rifai, N., Horvath, A. R., & Wittwer, C. T. (2019b). Capillary electrophoresis. I *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (Eighth Edition, s. 173–174). Elsevier, Inc.
- Rifai, N., Horvath, A. R., & Wittwer, C. T. (2019c). Dideoxy-Termination Sequencing (Sanger Sequencing). I *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (Eighth edition, s. 945–946). Elsevier, Inc.
- Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J., & Avissar, Y. (2016). 17.3 Whole-Genome Sequencing—Biology | OpenStax. I *Biology*. OpenStax. <https://openstax.org/books/biology/pages/17-3-whole-genome-sequencing>
- Sune, D., Rydberg, H., Augustinsson, Å. N., Serrander, L., & Jungeström, M. B. (2020). Optimization of 16S rRNA gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Microbiological Methods*, 170, 105854–105854. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105854>

Weston, A. (1997). Chapter 4—Capillary Electrophoresis. I *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices* (s. 134-). Elsevier Science.

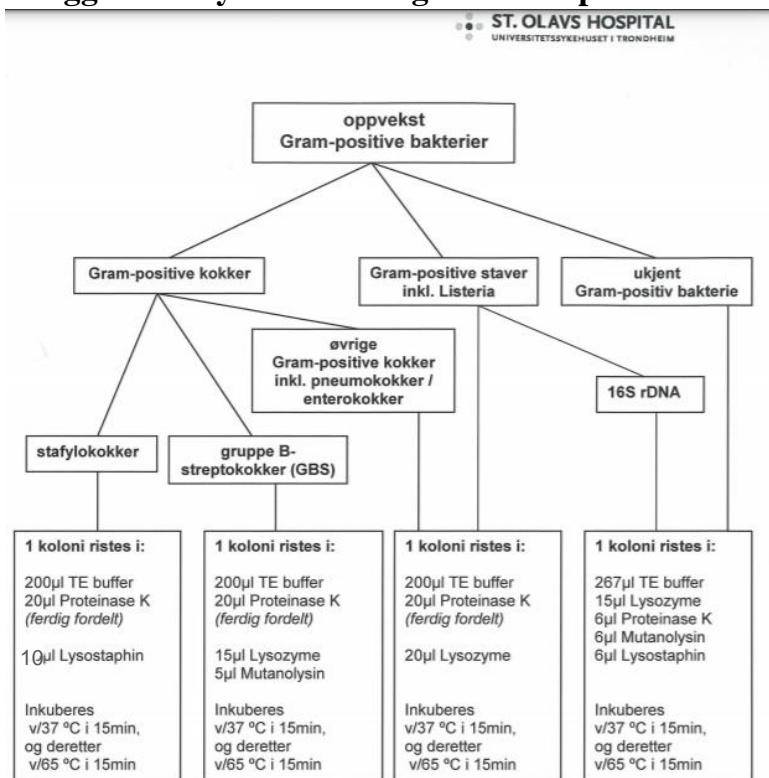
Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>



## 6 Vedlegg

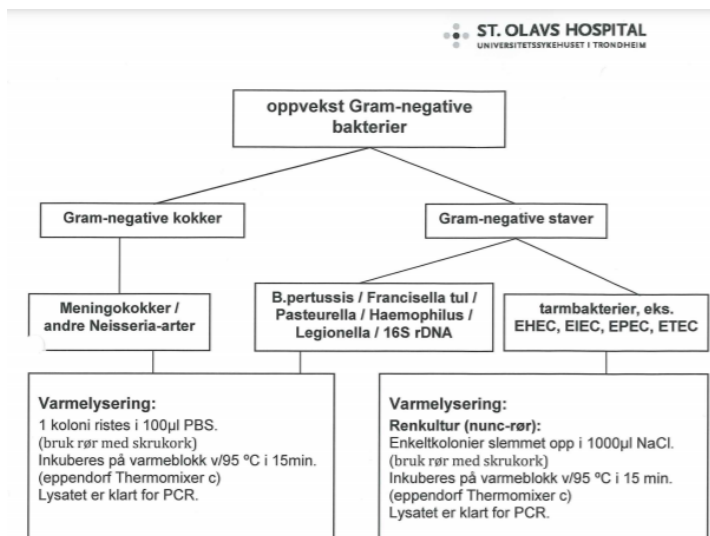
### Vedlegg 1 – Enzymbehandling av Gram positive bakterier før ekstraksjon



Enzymbehandling på eppendorf Thermomixer confort

Ekstraheres på NucliSens easyMAG

## Vedlegg 2 – Enzymbehandling av Gram negative bakterier før ekstraksjon



### Vedlegg 3 – Tabell med oversikt over reagenser og tilhørende lot nummer

Reagens	Lot.nr:
1405R	2084131
341F	2057570
927R	2057571
966F	2084130
BigDye Terminator	00975167
BigDye Terminator Sequencing Buffer	2012307
BigDye Xterminator Solution Buffer	2012110
DNA 7500 Chip	ZC10BK10
DNA 7500 Markør	2041
DNA Ladder	2041
DPO-F	2083344
DPO-R	2083345
GelDye Mix	2041
Illustra ExoProStar 1-step	17203165
Lysostaphin	0000085570
Lysozyme	SLBL 7146V
Molecular Grade Water (MGW)	203103
Mutanolysin	069M4035V
NS-buffer/Nuclisens Lysisbuffer	Z012EN1LB
Nuclisens Extraction buffer 1	Z012GF1EB
Nuclisens Extraction buffer 2	Z012BK2EB
Nuclisens Extraction buffer 3	Z011LC3EB
Nuclisens Lysis buffer	Z012GC1LB
Nuclisens Magnetic silica	Z011FD1MS
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Laget av substratenhet, St. Olavs hospital
PCR Grade H <sub>2</sub> O	32393600
Proteinase K	V02006893
Quanta PerfeCTa® SYBR Green FastMix	66141593
SAM Solution	2012103
Tris EDTA(TE)-buffer (pH 7,5)	Laget av substratenhet, St. Olavs hospital

## Vedlegg 4 – Resultater fra optimalisering av PCR-program

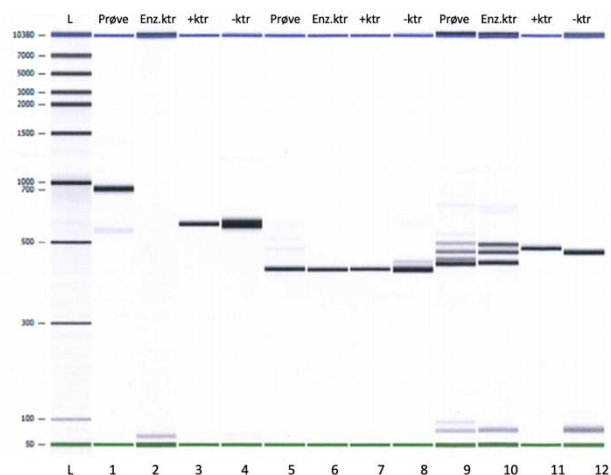
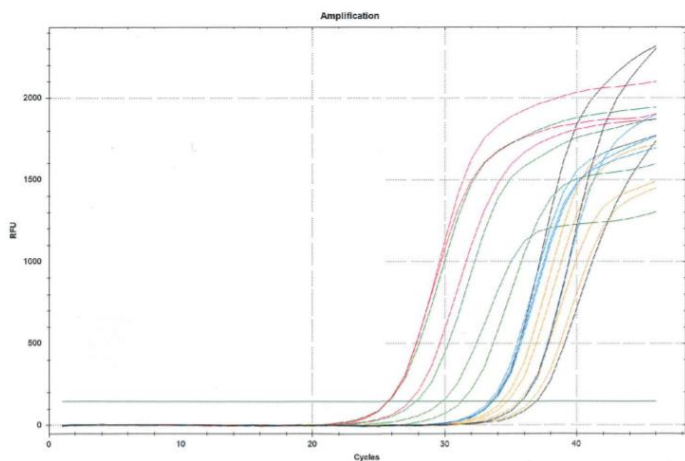
**Undersøkelse av hybridiseringstemperatur.** Tabellen angir Ct-verdier ved ulike temperaturer. Analyse er utført på «MYCO1+»- kontrollmateriale.

Hybridiseringstemperatur	Rutine		966F		DPO	
	1:10	1:1000	1:10	1:1000	1:10	1:1000
65,0°	32,93	39,06	27,29	31,15	29,09	34,17
64,5°	31,98	36,89	26,61	31,11	28,43	31,98
63,3°	29,51	34,71	26,72	31,22	28,57	33,36
61,4°	28,41	33,46	26,78	31,29	28,37	33,21
59,0°	27,85	33,70	26,90	31,35	28,73	33,83
57,0°	28,05	33,55	26,89	31,42	29,21	33,84
55,7°	28,18	33,84	27,03	30,26	29,61	34,19
55,0°	27,64	33,37	27,06	30,35	29,49	35,37

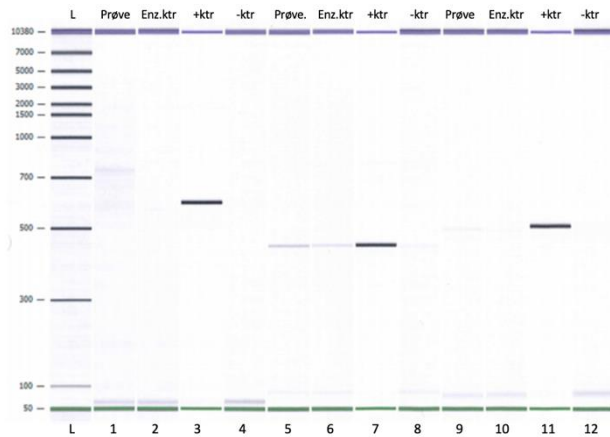
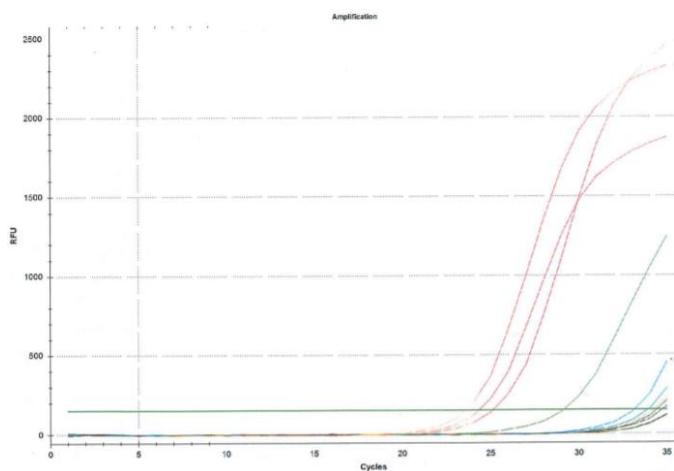
**Undersøkelse av elongeringstid.** Tabellen angir Ct-verdier ved ulike elongeringstider. Analysen er utført på kontrollmaterialet «MYCO1+».

Prøve	Rutine			966F			DPO		
	10 sek	20 sek	30 sek	10 sek	20 sek	30 sek	10 sek	20 sek	30 sek
<b>1:10</b>	27,75	26,95	28,27	26,66	26,99	27,35	28,71	28,97	29,84
<b>1:100</b>	30,90	31,16	31,74	30,45	30,69	31,80	33,01	33,14	33,28
<b>1:1000</b>	0,00	30,30	0,00	29,37	31,11	33,82	0,00	33,97	28,91

Amplifikasjonskurver og elektroforeseresultat for negativ prøve analysert med 45 sykluser (brønn 1-4; rutineprimer, brønn 5-8; 966F, brønn 9-12; DPO):



Amplifikasjonskurver og elektroforeseresultat for negativ prøve analysert med 35 sykluser (brønn 1-4; rutineprimer, brønn 5-8; 966F, brønn 9-12; DPO):



## Vedlegg 5 – Resultat fra sensitivitetsanalyse utført på *S. aureus* og *E.coli*

Ct-verdier fra sensitivitetsanalyse (PCR) på *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli*. Rød skrift angir om fortytning er positiv ved vurdering opp mot enzymkontroll. Grå felt angir siste positive fortytning når logaritmisk vurdering også er tatt i betraktning.

Mikrobe	Teoretisk konsentrasjon (CFU/mL)	Ct-verdi					
		Rutine	Rutine enz ktr	966F	966F enz ktr	DPO	DPO enz ktr
<i>S. aureus</i>	$1,5 \cdot 10^8$	9,38 (+)	25,39	9,63 (+)	25,03	11,89 (+)	27,39
	$1,5 \cdot 10^7$	14,41 (+)	28,80	14,29 (+)	29,63	16,18 (+)	31,33
	$1,5 \cdot 10^6$	18,50 (+)	32,00	18,43 (+)	31,32	20,37 (+)	0,00
	$1,5 \cdot 10^5$	22,28 (+)	31,30	22,09 (+)	31,23	24,89 (+)	33,05
	$1,5 \cdot 10^4$	26,39 (+)	31,35	25,92 (+)	31,52	28,70 (+)	34,29
	$1,5 \cdot 10^3$	31,07 (-)	31,23	30,31 (+)	32,16	33,18 (+)	34,44
	$1,5 \cdot 10^2$	31,09 (-)	32,22	32,10 (-)	32,13	34,80 (-)	32,03
	$1,5 \cdot 10^1$	31,15 (-)	31,91	31,37 (-)	32,14	33,86 (-)	32,76
<i>E. coli</i>	$1,5 \cdot 10^8$	10,67 (+)	31,89	11,03 (+)	30,69	12,02 (+)	34,41
	$1,5 \cdot 10^7$	14,77 (+)	33,73	14,51 (+)	0,00	15,98 (+)	0,00
	$1,5 \cdot 10^6$	17,63 (+)	31,89	18,12 (+)	0,00	20,02 (+)	0,00
	$1,5 \cdot 10^5$	21,69 (+)	33,53	22,35 (+)	32,22	24,32 (+)	0,00
	$1,5 \cdot 10^4$	27,07 (+)	32,40	28,83 (+)	32,03	32,24 (+)	0,00
	$1,5 \cdot 10^3$	29,57 (+)	32,42	29,63 (+)	33,49	33,38 (+)	34,91
	$1,5 \cdot 10^2$	31,72 (-)	32,19	31,65 (-)	32,10	34,45 (-)	34,96
	$1,5 \cdot 10^1$	30,95 (+)	33,38	32,51 (-)	32,39	32,47 (+)	0,00