

JÄMFÖRANDE STUDIE AV PCR- METODER FÖR IDENTIFIERING AV ICKE-TUBERKULÖSA MYKOBAKTERIER

REBECCA BERGGREN

JÄMFÖRANDE STUDIE AV PCR-METODER FÖR IDENTIFIERING AV ICKE-TUBERKULÖSA MYKOBAKTERIER

REBECCA BERGGREN

Berggren, R. Jämförande studie av PCR-metoder för identifiering av icke-tuberkulösa mykobakterier. *Examensarbete i Biomedicinsk Laboratorievetenskap 15 högskolepoäng*. Malmö universitet: Fakulteten för hälsa och samhälle, institutionen för biomedicinsk vetenskap, 2019.

Den mest välkända arten i släktet *Mycobacterium* som kan orsaka sjukdom hos människan är *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Infektioner av andra mykobakterier ökar världen över. Dessa benämns icke-tuberkulösa mykobakterier (NTM) och orsakar ofta liknande symtom som de vid MTB-infektion. Vanligtvis krävs dock olika behandlingar beroende på om infektionen är orsakad av MTB eller av NTM. Nuvarande diagnostik bygger på odling och mikroskopi, men analyser som innefattar molekylärbiologiska metoder för undersökning av mykobakteriers DNA blir allt vanligare. I denna studie jämfördes olika PCR-metoder för identifiering av NTM, där metoderna baserades på två tidigare publicerade artiklar. Tester gjordes på DNA från sex NTM-stammar med MTB-DNA som referens. För påvisning av hela släktet *Mycobacterium* användes primers riktade mot *hsp65* och *16S*, och för att kunna urskilja MTB från NTM användes primers riktade mot *IS6110*, *IS1081* och *ITS-MTC*. Undersökningarna visade lägre Ct-värden och högre PCR-effektivitet för *hsp65* än för *16S* men tester med avseende på MTB-specifika primers visade samtliga amplifiering även för NTM.

Nyckelord: Diagnostik, Icke-tuberkulösa mykobakterier, *Mycobacterium tuberculosis*, NTM, PCR

COMPARATIVE STUDY OF PCR-METHODS FOR IDENTIFICATION OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA

REBECCA BERGGREN

Berggren, R. Comparative study of PCR-methods for identification of non-tuberculous mycobacteria. *Degree project in Biomedical Science 15 credit points*. Malmö University: Faculty of Health and Society, Department of biomedical science, 2019.

The most well-known species of the genus *Mycobacterium* that can cause human disease is *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Infections caused by other mycobacteria is an increasing problem worldwide. These mycobacteria are known as non-tuberculous mycobacteria (NTM) and they often cause similar symptoms as those in MTB-caused infections. Usually different treatments are required depending on if the infection is caused by NTM or MTB. Current diagnostic methods are based on culture and microscopy, though molecular methods are becoming more common. In this study different PCR-methods for identification of NTM's were compared. The different methods were based on two earlier published articles. Experiments were made with DNA from six NTM-species and with DNA from MTB as reference. To detect all mycobacteria primers targeting *hsp65* and *16S* were used, and primers targeting *IS6110*, *IS1081* and *ITS-MTC* were used to separate MTB from NTM. This study showed lower Ct-values and higher PCR-efficiency for *hsp65* than for *16S*, but comparative tests regarding MTB-specific primers showed, with all three primer pairs, amplification of NTM as well.

Keywords: Diagnostics, *Mycobacterium tuberculosis*, Non-tuberculous mycobacteria, NTM, PCR

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

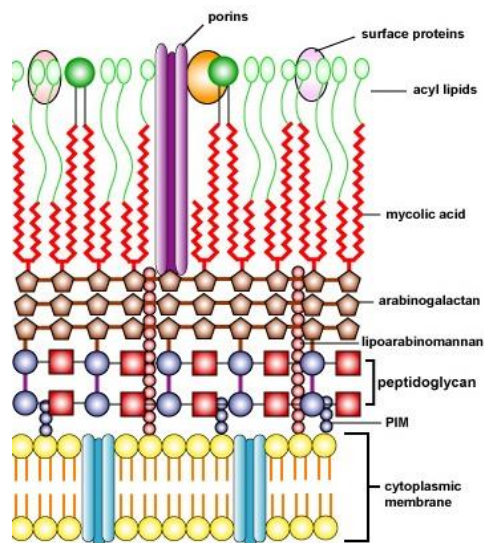
| | |
|---|----|
| BAKGRUND | 4 |
| Mykobakterier | 4 |
| Polymerase Chain Reaction (PCR) | 5 |
| Nuvarande diagnostik | 6 |
| Syfte | 7 |
| | |
| MATERIAL OCH METOD | 7 |
| Bakteriestammar | 7 |
| <i>Etik</i> | 7 |
| Primers | 7 |
| Konventionell PCR och fragmentanalys | 8 |
| Realtids-PCR med smältkurvsanalys | 8 |
| Spädningsserier | 9 |
| | |
| RESULTAT | 9 |
| Optimering med konventionell PCR | 9 |
| Realtids-PCR med <i>hsp65</i> och <i>16S</i> -primers | 10 |
| Fastställande av kvantifieringsgräns | 11 |
| Tester med MTB-specifika primers | 12 |
| | |
| DISKUSSION | 13 |
| | |
| KONKLUSION | 14 |
| | |
| REFERENSER | 15 |

BAKGRUND

Infektioner orsakade av mykobakterier är vanliga orsaker till sjukdom hos människor. Det finns upp emot 190 olika mykobakteriearter [1–2] varav många är patogena. Den mest välkända mykobakteriearten är *Mycobacterium tuberculosis*. Resten av arterna benämns som icke-tuberkulösa mykobakterier (eng. non-tuberculous mycobacteria, NTM).

Mykobakterier

Mycobacterium är ett släkte av bakterier under ordningen *Actinomycetales* och familjen *Mycobacteriaceae*. Det består av grampositiva, aeroba och stavformiga bakterier som är 0,2–0,6 x 1,0–10 µm stora [1–2]. *Mycobacterium* fick sitt namn 1896 (Lehman och Neumann) då man trodde att bakteriesläktet bestod av något som gränsade mot svampar (grek. *myco*=svamp), detta på grund av vissa mykobakteriers förmåga att bilda förgrenade filament, hyfer, likt svampar [1]. Typiskt för mykobakterier är deras hårda, hydrofoba och lipidrika cellväggar, vars uppbyggnad kan ses i figur 1. Cellväggarna har en komplex struktur och består till stor del av långa fettsyror som kallas mykolsyror. Dessa mykolsyror ligger som ett tjockt lager runt cellen och är förankrade i kedjor av arabinogalaktan, lipoarabinomannan samt andra proteiner och lipider, som i sin tur är förankrade i den annars, för grampositiva bakterier, enkla cellväggen bestående av ett inre plasmamembran täckt av ett lager av peptidoglykan. Den totala lipidsammansättningen utgör cirka 60 % av cellväggens vikt [2].



Figur 1. Schematisk bild över uppbyggnaden av mykobakteriens cellvägg [3].

Mykobakteriernas komplexa cellvägg bidrar till ett starkt försvar mot rengörings- och desinfektionsmedel, många antibakteriella antibiotikabehandlingar och mot immunreaktioner hos värdorganismen. Cellväggarnas uppbyggnad gör också att de är resistenta mot många vanliga typer av histologiska färgningsmetoder som använder sig av sura lösningar som avfärgningsmedel. Mykobakterier benämns därför syrafasta, vilket är en egenskap de endast delar med ett fåtal andra bakterier, till exempel vissa arter av aktinobakterier (*Actinomycetes*) [2, 4].

Den vanligaste och mest omtalade mykobakterien som orsakar sjukdom hos människan är *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), som orsakar tuberkulos. Tuberkulos angriper vanligtvis lungorna, men kan även drabba andra delar av

kroppen, så som centrala nervsystemet, skelettet och lederna. Det är en väldigt smittsam sjukdom och smittar genom aerosoler, som sprids då en person med aktiv sjukdom hostar eller nyser. Typiska symtom vid tuberkulos är feber, nattliga svettningar, viktnedgång och kronisk hosta, ofta med blodtillblandat sputum [2]. Enligt World Health Organization (WHO) bär mellan 25 och 35 % av världens befolkning på en tuberkulosmitta, och den klassas internationellt som en av de tio vanligaste dödsorsakerna [2, 4–5]. Av alla som smittas är det cirka 90 % som aldrig utvecklar en aktiv form av sjukdomen, utan infektionen ligger latent och är asymtomatisk. Incidensen är som högst i utvecklingsländer och de populationer som löper störst risk att utveckla en aktiv form av sjukdomen är rökare, alkohol- och drogmissbrukare, diabetiker och immunsupprimerade, främst de personer som har en samtidig HIV-infektion. Tuberkulos går att bota med viss form av antibiotika, men på grund av bakteriernas motståndskraft mot många läkemedel är behandlingstiden lång, minst sex månader. Ett växande problem vid behandling av tuberkulos är dock antibiotikaresistens. Bidragande faktorer till den uppkomna resistensen är bland annat för tidigt avbrutna antibiotikakurer, mediciner med låg kvalitet och feldiagnostiseringar [1–2, 5]. Dessa feldiagnostiseringar sker främst när en mykobakterieinfektion fastställs och då antas vara orsakad av *M. tuberculosis*, men den i själva verket är orsakad av en annan mykobakterie, som ofta kräver en annan behandling än den för MTB [1, 6–8]. Mykobakterier som inte innefattar *M. tuberculosis* kallas för icke-tuberkulösa mykobakterier, NTM (eng. non-tuberculous mycobacteria).

De flesta icke-tuberkulösa mykobakterierna är allmänt förekommande i vår miljö, som till exempel i jord och vattendrag, där de agerar som saprofyter. Många av dessa bakterier kan orsaka sjukdom hos människan, främst genom att bidra till opportunistiska infektioner hos personer med redan nedsatt immunförsvar eller som har en underliggande kronisk lungsjukdom, till exempel cystisk fibros [1, 7, 9–10]. Infektioner orsakade av NTM uppvisar ofta liknande symtom som vid MTB-infektion, vilket gör att det är svårt att vid första anblick skilja dem åt.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR är en välbeprövad molekylärbiologisk metod för att amplifiera korta sekvenser av DNA och skapa tusentals, upp till miljontals identiska DNA-fragment. Metoden bygger på att det värmetåliga enzymet Taq-polymeras med hjälp av fria nukleotider bygger nya DNA-strängar. Korta nukleotidsekvenser, så kallade primers, utgör ändarna på det DNA-fragment man önskar, då de binder in som startpunkter varifrån Taq-polymeraset sedan utgår. I metoden använder man sig av termiska cykler som består av tre steg; 1) denaturering, då temperaturen går upp till över 90°C för att separera dubbelsträngat DNA (dsDNA), 2) annealing, då temperaturen sänks till 40–60°C och primers kan binda till enkelsträngat DNA (ssDNA) och 3) elongering, då temperaturen ökar till 72°C, vilket är den temperatur då Taq-polymeras är som mest effektivt, och då syntetisering av DNA utförs [11]. Konventionell PCR innebär att endast amplifieringssteget utförs, och att andra metoder, till exempel gelelektrofores eller annan typ av fragmentanalys, tillämpas för avläsning av resultat. Med realtids-PCR kan man följa amplifiering av DNA i realtid. Detektion görs med hjälp av infärgningsmetoder där fluorescerande molekyler, till exempel EvaGreen® eller SYBRgreen®, tillsätts och binder in till allt dubbelsträngat DNA som bildas [11–12].

Ett prov med en viss DNA-koncentration behöver ett visst antal cykler i en PCR-reaktion för att uppnå en särskild mängd amplifierat DNA. Ett prov innehållande

tio gånger mer DNA ska ta 3,32 färre cykler för att uppnå samma mängd slutprodukt när ingen inhibition föreligger. Detta motsvarar 100% effektivitet. Med hjälp av 10-faltiga spädningsserier av DNA-templat kan PCR-effektiviteten således räknas ut. Effektiviteten kan påverkas av bland annat kvaliteten på, och koncentrationen av, reagenser, primers och Taq-polymeras samt olika molekyler som kan inhibera PCR-reaktionen. Detta kan vara detergent, olika proteiner eller joner. Logaritmerad DNA-koncentration plottas på X-axeln mot Ct-värden på Y-axeln, lutningen på trendlinjen kan därefter användas för att räkna ut effektiviteten med ekvationen:

$$\text{Effektivitet} = 10^{(-1/\text{lutning})-1} \quad [12]$$

En effektivitet på mellan 90–110 % anses acceptabel. Detta motsvarar en lutning på mellan -3,58 och -3,10 [12]. Den punkt i spädningsserien där förhållandet inte längre förhåller sig linjärt bedöms vara utanför kvantifieringsgränsen (Limit of Quantification, LoQ). Detta betyder att mätningen inte längre går att lita på i kvantitativa analyser [13].

Nuvarande diagnostik

Diagnostik av mykobakterier sker idag främst med hjälp av mikroskopi och odling. Inför mikroskopi används färgningstekniker som bygger på detektion av syrafasta bakterier. Den vanligaste färgningen som används är Ziehl-Neelsen, där bakterier med hjälp av hög värme färgas in med karbolfuchsin, avfärgas med en alkalisk alkohol och sedan motfärgas med metylenblått. Eftersom mykobakterier är syrafasta avfärgas de inte av den alkaliska alkoholen, utan behåller en röd färg mot en, efter motfärgning, blå bakgrund. Detta är en bra metod för att detektera syrafasta bakterier, men den ger ingen information om vilken typ av mykobakterie som ett prov innehåller [2, 4].

På grund av sina komplexa cellväggar växer mykobakterier väldigt långsamt, vilket gör att odling av dem ofta tar mycket lång tid. Mykobakterier delas in i snabbt växande mykobakterier och långsamt växande mykobakterier, dit MTB tillhör. Icke sterila kliniska prover, till exempel sputum, måste primärt behandlas med en svag lösning av natriumhydroxid, eller annan typ av bakteriedödande reagens, för att eliminera snabbare växande bakterier i provet. Tidigare användes ägg- eller agarbaserade medium för odling av mykobakterier. Det kunde då ta upp till åtta veckor för långsamt växande bakterier att kunna detekteras [1–2, 4]. Numera finns det medium som är mer specifikt anpassade för just mykobakterier, och detektionstiden har därmed kunnat kortas ner till mellan 10 och 21 dagar [2].

Eftersom diagnostiken som bygger på odling och mikroskopi är tidskrävande har undersökningar som innefattar nukleinsyrebaserade metoder, där mykobakteriers DNA analyseras, blivit allt mer användbara.

Vid Klinisk Mikrobiologi i Lund finns etablerade metoder för att identifiera MTB från färskt prov, till exempel sputum, men för NTM har en enkel lösning ännu inte hittats. De flesta publicerade studierna som rör ämnet är riktade mot specifika mykobakteriearter och endast några få täcker hela genus för *Mycobacterium*. Under november 2018 publicerade Michelet *et al.* en in house-applikation som baseras på amplifiering av ett 131 baser långt fragment av genen som kodar för ett heat shock protein (*hsp65*) [14]. Tidigare har Keerthirathne *et al.* (2016) publicerat en annan in house-applikation som baseras på amplifiering av ett 149

baser långt fragment i bakteriers ribosomala RNA (*16S*) specifikt för syrafasta bakterier [8]. För identifiering av MTB i ej färsk prov, alltså formalinfixerade paraffinbäddade vävnader (FFPE), utövas just nu PCR-baserade analyser för detta hos Klinisk Patologi i Lund. På grund av bristfällig medicinsk mikrobiologisk kompetens för detta önskar Klinisk Patologi att detta verifieringssteg istället övertas av Klinisk Mikrobiologi. För att kunna identifiera olika formalinfixerade bakterier behandlas proverna för att frigöra DNA från formalinkomplexet, men åtgärden ger inte komplett DNA utan detta återfinns i kortare fragment [15]. För att en PCR-applikation skall påvisa mykobakterier krävs att metoden är utformad för amplifiering av korta fragment. De två publikationerna ovan (Keerthirathne *et al.*, Michelet *et al.*) uppfyller båda detta krav.

Syfte

Syftet med denna studien är att, baserat på två tidigare in house-publiceringar, utvärdera och jämföra olika PCR-metoder för att identifiera NTM och urskilja dessa från MTB, något som väntas kunna användas som ett underlag för vidareutveckling av en differentieringsmetod vid mykobakteriediagnostik hos kliniken.

MATERIAL OCH METOD

Denna studie genomfördes på Klinisk Mikrobiologi på Skånes universitetssjukhus i Lund, där både de instrument och det material som behövdes för att utföra undersökningen fanns att tillgå.

Bakteriestammar

Fyra etablerade NTM-stammar samt två artidentifierade NTM-stammar från kliniska prover (visas i tabell 1) användes som känt positivt material i studien. Som referens användes även MTB-DNA som bestod av poolade MTB-positiva patientprover. Extraherat DNA från dessa stammar erhöles från tuberkulosavdelningen på Klinisk Mikrobiologi, där extraktionsarbetet gjordes enligt avdelningens rutiner.

Tabell 1. Information om det biologiska material som användes i studien.

| Mykobakterie | Källa |
|------------------------|--------------------------------|
| <i>M. fortuitum</i> | ATCC 6841 |
| <i>M. avium</i> | ATCC 25291 |
| <i>M. kansasii</i> | ATCC 12478 |
| <i>M. gordonae</i> | ATCC 14470 |
| <i>M. chelonae</i> | Aidentifierat patientprov |
| <i>M. abscessus</i> | Aidentifierat patientprov |
| <i>M. tuberculosis</i> | Poolade positiva patientprover |

Etik

Allt biologiskt material som ingick i studien var avdödat. De kliniska proverna som användes var aidentifierade och endast information om arttillhörighet fanns att tillgå. Proverna kunde därför inte spåras tillbaka till patienten. Resterande

prover bestod av DNA från kända, etablerade stammar. Ingen etikprovning behövde därför göras inför studiearbetet.

Primers

Alla primers som användes i projektet beställdes från Eurofins Genomics (Ebersberg, Tyskland och Galten, Danmark) och presenteras i tabell 2. Det mykobakteriespecifika primerparet riktat mot *hsp65* och de MTB-specifika primerna riktade mot *IS6110* och *IS1081* användes med publikationen av Michelet *et al.* som källa [13]. De två andra primerparen, *AFB16S* som var specifikt för syrafasta bakterier, och *MTC-ITS* som även det var specifikt för MTB, togs ur publikationen av Keerthirathne *et al* [8].

Tabell 2. Nukleotidsekvenser för använda primers i projektet.

| Primers | | Nukleotidsekvens (5'-3') |
|----------------|---|--------------------------------|
| <i>hsp65</i> | F | GCC AAG GAG GTC GAG ACC AA |
| | R | CTC CTC GAC GGT GAT GAC |
| <i>AFB16S</i> | F | CCG CAA GRC TAA AAC TCA AA* |
| | R | TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA |
| <i>IS6110</i> | F | GGT AGC AGA CCT CAC CTA TGT GT |
| | R | AGG CGT CGG TGA CAA AGG |
| <i>IS1081</i> | F | CCG CCA CCG TGA TTT CGA |
| | R | GCC AGT CCG GGA AAT AGC T |
| <i>MTC-ITS</i> | F | GCG AGA GCC GGG TGC ATG |
| | R | AAC AGT GTG TTG GTG GCC AA |

*Variant. Bokstaven R kan i en nukleotidsekvens representeras av antingen A eller G [16].

Konventionell PCR och fragmentsanalys

Primära tester för jämförelse av *hsp65* och *16S* gjordes med hjälp av konventionell PCR (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad/100 16 1428). Inför detta blandades stormixar av de båda primerparen (0,5 µM av vardera primer) tillsammans med dubbeldestillerat vatten (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Alla DNA-stammar späddes inledningsvis, oberoende av respektive originalkoncentration (39,6–77,6 ng/µl), 1:1000. Stormix fördelades tillsammans med KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Wilmington, USA), som PCR-buffert, och DNA (spätt 1000x) av *M. gordonae* till PCR Tube Strips med en slutvolym av 20 µL/brunn. Två parallella tester utfördes, ett för *hsp65* och ett för *16S*. Primerkoncentrationen 0,25 µM användes i de båda testerna.

Första PCR-utförandet gjordes med åtta brunnar per primertest. Ett gradientprogram användes, där annealingtemperaturen var olika för de olika brunnarna. Programmet innefattade 95°C i 5 minuter, sedan 34 cykler av denaturering 95°C i 15 sekunder, annealinggradient mellan 45–55°C i 15 sekunder och elongering 72°C i 15 sekunder, och efterföljande 5 minuter i 72°C. Därefter gjordes ännu en gradient-PCR. Detta test utfördes på samma sätt, dock med ett temperaturspann på 55–60°C i annealingsteget. Efter dessa första tester späddes originalkoncentrationerna av DNA från alla NTM-stammar även 1:100. Spädningarna 1:1000 blandades tillsammans med PCR-buffert och stormix för *hsp65*, och de 1:100 spädda eluaten blandades tillsammans med PCR-buffert och stormix för *16S*, i PCR Tube Strips med slutvolym 20 µL/brunn. En ny PCR utfördes på dessa prov. Programmet till denna var 95°C i 5 min, 30 cykler av

95°C i 15 s, 60°C i 15 s, och 72°C i 15 s, sedan 72°C i 5 min. Som negativ kontroll i båda testerna användes dubbeldestillerat vatten.

Efter varje PCR-utförande gjordes en fragmentanalys av PCR-produkterna på fragmentanalysatorn QIAxcel/100 16 1407 från QIAGEN (Hilden, Tyskland).

Realtids-PCR med smältkurvsanalys

Vidare tester för jämförelse av *hsp65*- och *16S*-primers utfördes med hjälp av realtids-PCR med smältkurvsanalys på instrumentet CFX96-Bio-Rad/100 16 1394 (Hercules, USA). Som PCR-buffert för tester med realtids-PCR användes SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Foster City, USA). Detta blandades tillsammans med DNA samt stormix av respektive primerpar till en slutvolym av 25 µL/brunn. Primerkoncentration var 0,3 µM. DNA-spädningar 1:1000 användes till *hsp65* och spädningar 1:100 användes till *16S*. Programmet som användes var ett tvåstegsprogram som innefattade 95°C i 5 min, sedan 45 cykler av 95°C i 15 s och 60°C i 30 s.

För att utvärdera specificiteten hos primers riktade mot MTB gjordes ett första test med *IS6110*. Stormix med forward- och reverse-primer av *IS6110* blandades tillsammans med dubbeldestillerat vatten. Denna fördelades sedan tillsammans med PCR-buffert och poolade patientprov innehållande MTB-DNA i en spädningsserie i sju steg mellan 10 ng/µL och 10 fg/µL, respektive tre NTM-stammar (*M. gordonae*, *M. chelonae* och *M. abscessus*) med koncentrationen 10 ng/µL, samt dubbeldestillerat vatten som negativ kontroll.

Till vidare tester introducerades ytterligare två MTB-specifika primers, *IS1081* och *MTC*. Stormixar för dessa samt för *IS6110* blandades tillsammans med PCR-buffert. Tre tester, ett för respektive MTB-primerpar, utfördes parallellt och utgjordes av 10 pg DNA av MTB samt av de sex NTM-stammarna i duplikat. Primerkoncentration som användes var 0,3 µM av *IS6110* och *IS1081*, och 0,5 µM av *MTC* enligt referensstudier (Michelet *et al.* och Keerthirathne *et al.*), och programmet som användes var 95°C i 5 min, sedan 50 cykler av 95°C i 15 s och 60°C i 30 s.

Spädningsserier

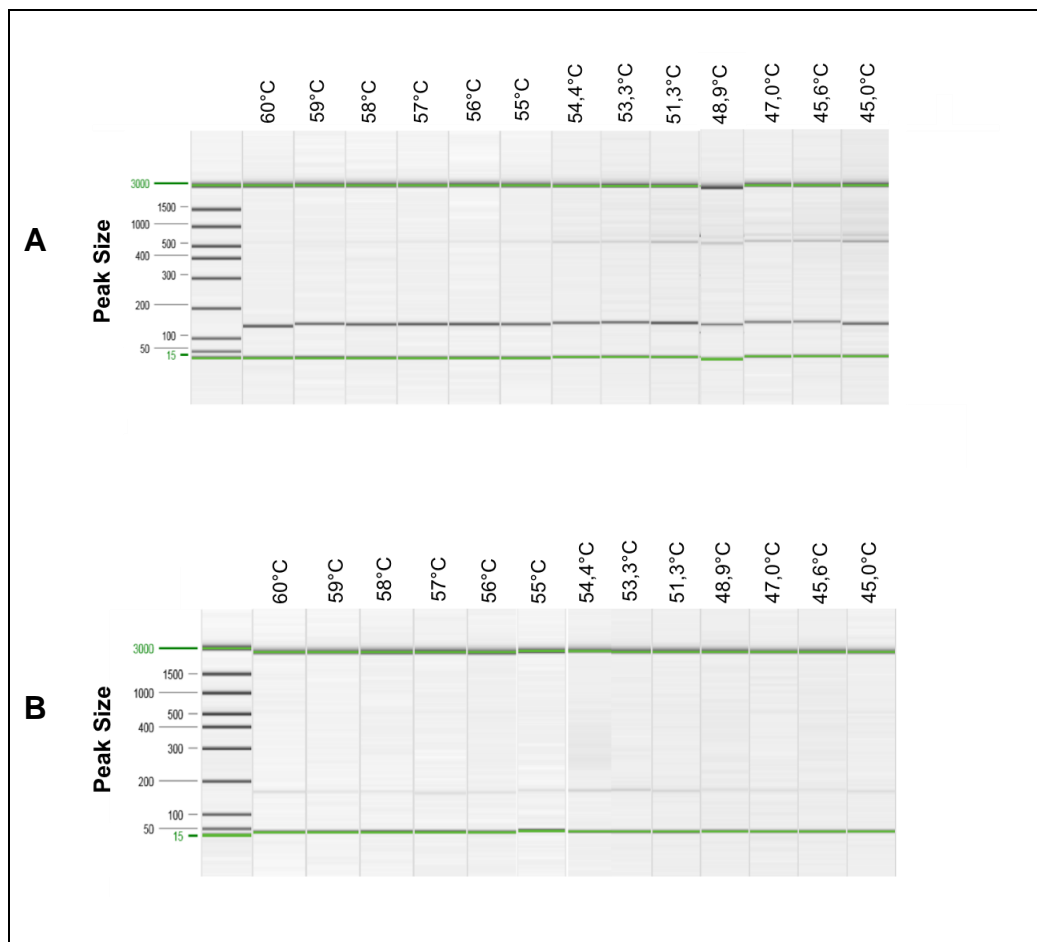
DNA från de olika NTM-stammarna koncentrerades bestämdes med hjälp av en BioDrop µLITE-spektrofotometer (BioDrop, Storbritannien). DNA normaliserades sedan till 10 ng/µL för varje NTM. Från 10 ng/µL gjordes för varje NTM en spädningsserie i sju steg med koncentrationerna 1,0 ng/µL, 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1,0 pg/µL, 100 fg/µL, 10 fg/µL samt 1,0 fg/µL. Duplikat av dessa spädningsserier genomgick därefter realtids-PCR tillsammans med primers för *hsp65* respektive *16S*. PCR-programmet som användes innefattade 95°C i 5 min, samt 50 cykler av 95°C i 15 s och 60°C i 30 s.

RESULTAT

I studien jämfördes PCR-metoder för att identifiera NTM och skilja dessa från MTB, baserade på två tidigare publikationer. Resultat av försöken listas nedan.

Optimering med konventionell PCR

Fragmentanalys efter primära tester med konventionell PCR med temperaturgradient, med avseende på amplifiering av *hsp65* respektive *16S* i DNA från *M. gordonae* visas i figur 2. Tester med *hsp65*-primers visade starka band vid den förväntade fragmentstorleken (131 bp) redan vid 45°C, men ytterligare ett band av oönskad produkt syntes vid storleksmarkören 500 bp. Konventionell PCR med temperaturgradienten 45–55°C visade band för denna oönskade produkt i varje temperatursteg, dock blev bandet svagare, alltså blev produkten mindre, vid ökande temperatur. Nästa temperaturgradient, 55–60°C, visade liknande resultat där bandet för den ospecifica produkten med ökande temperatur blev svagare tills den inte längre kunde detekteras vid 60°C. Tester med *16S*-primers visade mycket svaga band, vilket tydde på väldigt lite produkt, genom båda temperaturintervallen, 45–55°C och 55–60°C.



Figur 2. Fragmentanalysresultat efter konventionell gradient-PCR med temperatur mellan 45°C och 60°C för **A)** *M. gordonae* med primers för *hsp65* och **B)** *M. gordonae* med primers för *16S*.

En separat undersökning gjordes där 1:100-spädningen av *M. gordonae* tillsammans med *16S*-primers testades med två olika annealingtemperaturer: 55°C och 60°C. Detta test visade vid fragmentanalys ingen synlig skillnad mellan de två temperaturerna. Spädningen 1:100 genererade däremot en något större produkt jämfört med spädningen 1:1000, men bandet som syntes var fortfarande svagt. Annealingtemperaturen 60°C användes vid fortsatta undersökningar. Första undersökningen med alla NTM-DNA tillsammans med *hsp65*- respektive *16S*-primers gjordes med konventionell PCR med 30 termiska cykler, och visade svaga eller inga band med både *hsp65* och *16S*.

Realtids-PCR med *hsp65* och *16S*-primers

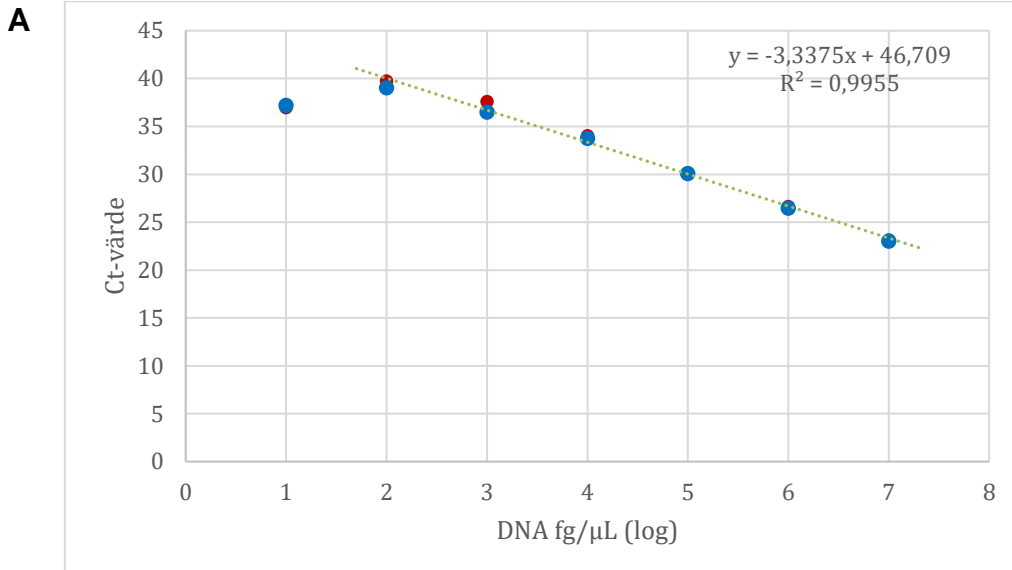
I första testet med realtids-PCR testades primers för *hsp65* och för *16S* gentemot varandra tillsammans med alla NTM-DNA i samma spädning som föregående test med konventionell PCR, alltså 1:1000 till *hsp65* och 1:100 till *16S*. Resultatet visade god amplifiering och liknande Ct-värden för både *hsp65* och *16S*.

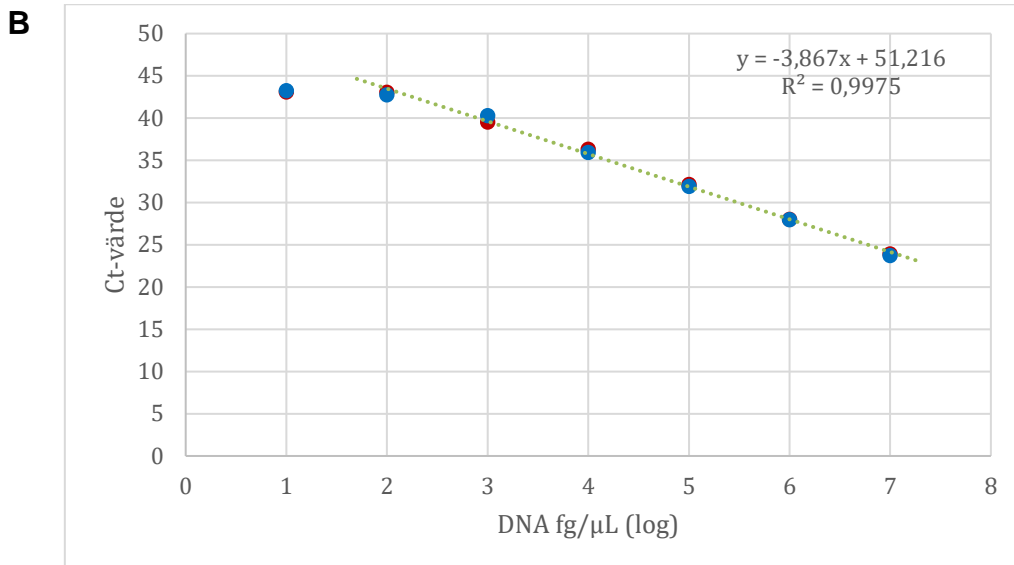
Smältkurvsanalys visade en klar skillnad på smältpunkt mellan de båda primerparen. Amplifierade produkter med alla NTM-DNA och *hsp65* hade smältpunkter mellan 87,5°C och 89,0°C medan amplifierade produkter med *16S* hade smältpunkter mellan 83,5°C och 85,0°C.

Överensstämmande smältpunkter visades vid realtids-PCR av spädningsserier av NTM-DNA.

Fastställande av kvantifieringsgräns

Realtids-PCR med duplikat av 10-faldiga seriespädningar av alla NTM-DNA tillsammans med *hsp65*- respektive *16S*-primers utfördes. Resultaten av dessa kunde omvandlas till grafer, med avseende på uppmätt Ct-värde och logaritmerad DNA-koncentration (fg/μL), för varje NTM och primerpar. Dessa grafer kunde användas för att räkna ut PCR-effektivitet. Grafen för spädningsserie med *M. abscessus* och *hsp65* i exemplet i figur 3 visar medel-Ct-värden 23,10; 26,56; 30,13; 33,89; 37,06; 39,41; 37,41 med sjunkande DNA-koncentration. Ett tydligt linjärt samband kunde ses i koncentrationerna 10⁶–10² fg/μL, därefter blev mätningarna osäkra. Detta samband kunde ses hos alla NTM-DNA i spädningsserier, både i försök med *hsp65* såväl som för *16S*. 10² fg/μL anses därför vara kvantifieringsgränsen (LoQ) för amplifikation med både *hsp65* och *16S*.





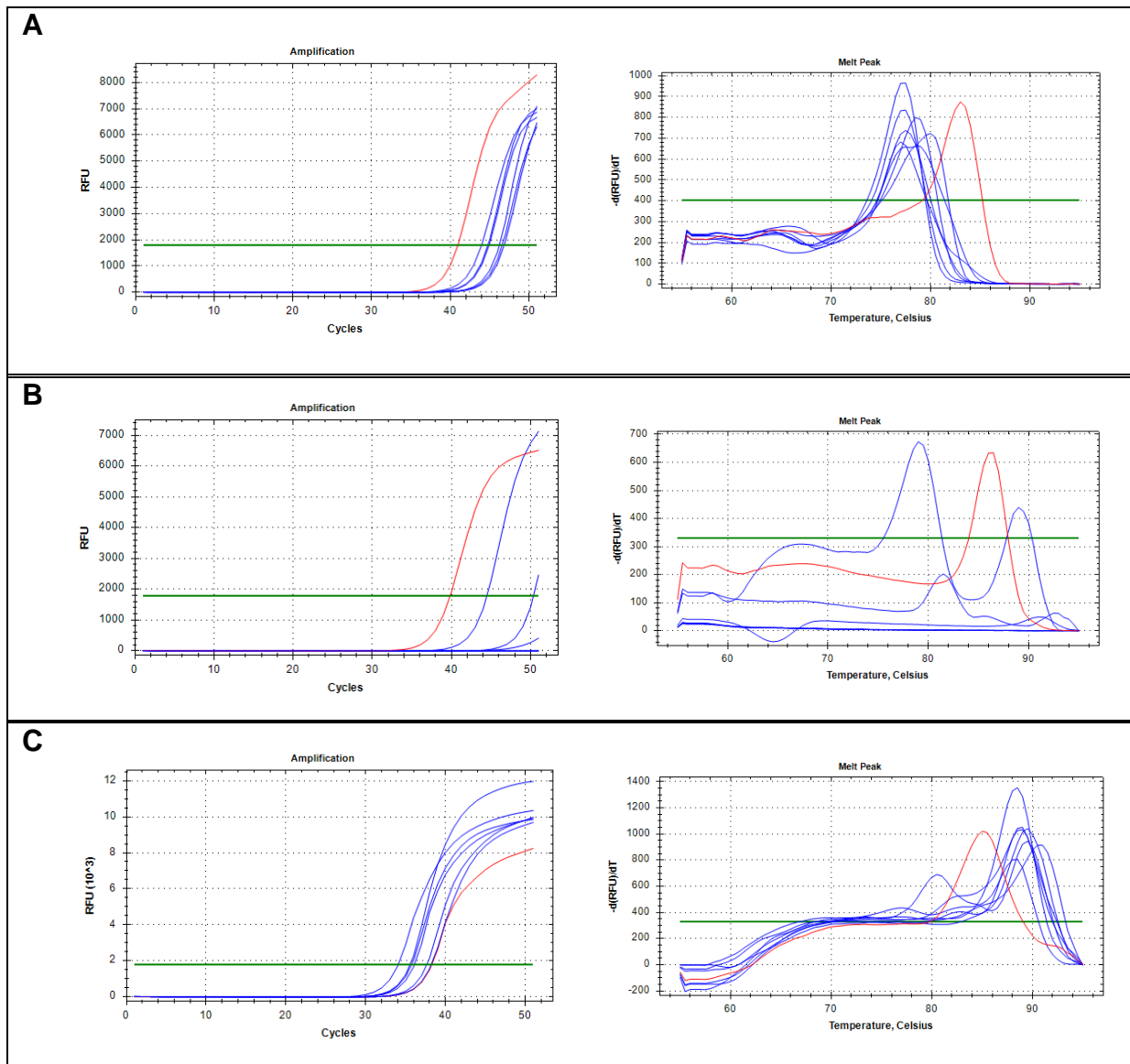
Figur 3. Erhållna Ct-värden efter realtids-PCR med spädningsserie av *M. abscessus*-DNA i duplikat plottat mot DNA-koncentration (log₁₀). En trendlinje representerar medel-Ct-värden och visar det linjära sambandet fram till LoQ. **A)** Amplifiering med *hsp65*. **B)** Amplifiering med *16S*.

Det linjära spannet i grafen för *hsp65* i exemplet ovan visar en lutning på -3,3375 vilket ger en PCR-effektivitet på 99,4 %. I grafen för *16S* är lutningen -3,867 vilket ger en PCR-effektivitet på 81,4 %. R^2 -värden blev för *hsp65* 0,9955 och för *16S* 0,9975. Liknande resultat erhöles för alla NTM i spädningsserie med respektive primerpar.

Tester med MTB-specifika primers

Det första jämförande testet med MTB- och tre olika NTM-DNA tillsammans med primers för *IS6110* visade amplifiering av samtliga prover. Primer-dimer bildades i negativ kontroll samt i de tre lägsta koncentrationerna, 10^{-1} – 10^3 fg/μL, av MTB. De fyra högsta koncentrationerna, 10^4 – 10^7 fg/μL, hade en smältpunkt på 87,5°C, medan NTM-DNA hade smältpunkter på mellan 88,5°C och 90,0°C.

I vidare tester visades amplifiering av både MTB- och NTM-DNA med samtliga primers, vilket visas i figur 4. Primers för *IS6110* visade för MTB ett Ct-värde på 40,94, medan det för NTM visade Ct-värden mellan 43,96 och 46,82.



Figur 4. Ct- och smältkurvor efter amplifiering med realtids-PCR av sex NTM- och ett MTB-DNA tillsammans med primers för A) *IS6110*, B) *IS1081* och C) *MTC*. Blå kurvor representerar NTM och röda kurvor representerar MTB i respektive diagram.

Smältpunkter för samma primers visade 83,0°C för MTB och mellan 77,0°C och 80,0°C för NTM. Primers för *IS1081* visade ett Ct-värde på 39,81 för MTB medan Ct-värdena för NTM varierade stort. I exemplet ovan amplifierades endast *M. gordonae* och *M. chelonae*, men detta skilde sig i duplikat. Smältpunkt för MTB var 86,5°C. Primers för *MTC* visade ett Ct-värde på 38,26 för MTB och för NTM varierade Ct-värden mellan 34,06 och 38,19. Smältpunkt för MTB var 85,0°C medan NTM visade en variation på 88,5–90,5°C med en oönskad produkt i *M. avium* vid 80,5°C.

DISKUSSION

Syftet med studien var att jämföra och utvärdera olika PCR-metoder för att detektera NTM och för att kunna särskilja dessa från MTB. PCR-metoderna som användes i arbetet var baserade på två tidigare publicerade studier där primers

riktade mot *hsp65* och *16S* skulle påvisa alla typer av mykobakterier och där primers riktade mot *IS6110*, *IS1081* och *ITS-MTC* skulle kunna användas för att specifikt påvisa MTB.

Primära tester med konventionell PCR användes för att optimera efterföljande arbete med realtids-PCR. Gradient-PCR med olika annealingtemperaturer användes för att hitta en annealingtemperatur som skulle vara optimal för både *hsp65* och *16S* eftersom de planerades att analyseras parallellt. Gradient-PCR-reaktioner visade på oönskad, ospecifik produkt. Ospezifika produkter kan uppstå om tiderna för annealing och elongering är för långa, om annealingtemperaturen är för låg, om det används för många cykler eller om det på något sätt kommit in orenheter i reaktionen [17]. I det här fallet minskade den oönskade produkten med ökande temperatur och kunde inte längre detekteras vid 60°C med *hsp65*, vilket tydde på att det här handlade om för låg annealingtemperatur där primers kunde binda in ospecifikt till ssDNA. Samma reaktion visade på ytterst lite produkt under hela intervallet med *16S*, där produkten önskades bli större med högre temperatur. När alla NTM-DNA testades med *hsp65* respektive *16S* erhöles svaga eller inga band alls i fragmentanalys. DNA med *16S* var då spätt 1:100 mot *hsp65*-reaktionens spädning 1:1000, ändå gav *16S* ingen produkt hos något DNA. Skillnaden på tidigare gradient-PCR och PCR-reaktionen med olika NTM var de termiska cyklerna som var 34 i gradient-PCR och endast 30 i NTM-test. Originalmetoderna i de tidigare publicerade artiklarna innefattade 50 cykler med *hsp65* [14] och 40 cykler med *16S* [8]. Anledningarna till att färre cykler användes vid inledande försök var att 30 cykler ansågs räcka samt att begränsa tidsåtgång.

I tester med realtids-PCR ökades antalet termiska cykler för att undersöka om problemet med testerna gjorda med konventionell PCR berodde på otillräckligt antal cykler för att uppnå detektionsnivå. Realtids-PCR bekräftade detta då Ct-värden för *16S* visade sig vara mellan cirka 22 och 29, och Ct-värden för *hsp65* var cirka 28–34. Reaktionen med *16S* hade dock 10 gånger högre DNA-koncentration än den med *hsp65*, vilken gjorde det svårt att jämföra sensitiviteten för de båda primerparen just i detta steg, då DNA ännu inte hade koncentrationsbestämts och någon PCR-effektivitet hade ännu inte kunnat beräknas. Smältkurvan visade på god specificitet för både *hsp65* och *16S*, då smältpunkterna för alla NTM med respektive primerpar liknade varandra och inga toppar skiljde sig nämnvärt från de andra.

Med hjälp av spädningsserier av NTM kunde PCR-effektiviteten räknas ut för *hsp65* och *16S*. Detta visade på en bättre effektivitet i PCR-reaktioner med *hsp65* än de med *16S*, vilket tyder på att PCR-metoden med *hsp65* är bättre optimerad för att identifiera mykobakterier och ger mer pålitliga resultat än den med *16S*.

Tester med primers riktade mot *IS6110*, *IS1081* och *MTC* visade sig inte vara specifika mot MTB, vilket studierna de baserades på hade visat. *IS6110* har länge ansetts vara MTB-specifik, men har enligt vissa studier visat att sektioner av denna gen också kan påvisas hos andra mykobakteriearter [18]. *IS1081* visade amplifiering endast i några få reaktioner i denna undersökning. Dock skiljde sig dessa amplifieringar väldigt mycket i duplikat. En serie visade exempelvis ingen amplifiering i provet med *M. gordonae*, medan den andra serien visade en stor produkt i motsvarande prov. Detta tolkades som att *IS1081* bildade mycket ospezifika produkter och ansågs inte vara användbar i framtida studier. Undersökning med *MTC* visade låga Ct-värden, vilket visar på att det är det

primerparet som har högst sensitivitet. Med *MTC* bildades det dock ospecifik produkt i *M. avium*. Smältpunkten för MTB i metoden med *IS6110* var i genomsnitt 4,5°C högre än smältpunkterna för NTM som sträckte sig över ett temperaturspann på 3,0°C. MTB kunde där enkelt särskiljas från NTM, vilket visar på att sammansättningen av PCR-produkten för MTB skiljer sig avsevärt jämfört med PCR-produkterna för NTM. Detsamma sågs i metoden med *MTC* där smältpunkten för MTB i genomsnitt var 4,5°C lägre än de för NTM som där sträckte sig över ett spann på 2,0°C.

KONKLUSION

Studien visar att primers som kodar för *hsp65* och *16S* båda är goda kandidater för identifiering av mykobakterier. Studien visar även att primers som är riktade mot *IS6110*, *IS1081* och *MTC* inte är specifika för MTB, utan även visar amplifiering hos NTM. Bland de tre verkar *IS6110* och *MTC* vara de som trots detta kan användas för att, med hjälp av smältkurvsanalys, urskilja MTB från NTM. Denna information kan användas som grund för ytterligare utveckling av en enkel diagnostiseringsmetod hos Klinisk Mikrobiologi.

REFERENSER

1. Akbar Velayati A, Farnia P. (2019) *Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Microbiological, Clinical and Geographical Distribution*. 1:a upplagan, ELSEVIER.
2. Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller M A. (2013) *Medical Microbiology*. 7:e upplagan, ELSEVIER, 235-240.
3. Biology LibreTexts (2019) The acid fast cell wall <JPG (2019-08-03)
4. Willey J M, Sherwood L M, Woolverton C J (2008) *Prescott's Microbiology*. 7:e upplagan, McGraw-Hill, 596.
5. World Health Organization (WHO) (2018) Tuberculosis < HTML (2019-08-03)
6. Richardson E T, Samson D, Banaei N. (2009) Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by multiplex, real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1497-1502.
7. Mortazavi Z, Bahrmand A, Sakhaee F, Hosseini R D, Vaziri F, Siadat S D, Fateh A (2019) Evaluating the clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory samples in Iran: an often overlooked disease. *Infection and Drug Resistance*, 2019(12), 1917-1927.
8. Keerthirathne T P, Magana-Arachchi N, Madegedara D, Sooriyapathirana S S. (2016) Real time PCR for the rapid identification and drug susceptibility of mycobacteria present in bronchial washings. *BMC Infectious Diseases*, 16(607).
9. Katoch V M. (2004) Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res*, 2004(120), 290-304.
10. Kotilainen H, Järvinen A. (2006) Miljömykobakterier som patogener vid lung- och hudinfektioner. *Finska läkaresällskapets handlingar*, 166(1), 37-45.
11. Wilson K, Walker J (2015) *Principles and techniques of Biochemistry and molecular biology*. 7:e upplagan, Cambridge University Press.
12. Thermo Fisher Scientific Inc. (2014) Real-time PCR handbook. <PDF (2019-08-10)
13. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögren B, Linz L, Kubista M (2017) Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*, 29(12), 1-6
14. Michelet L, de Cruz K, Karoui C, Tambosco J, Moyen J, Hénault S, Bosciroli M (2018) Second line molecular diagnosis for bovine

tuberculosis to improve diagnostic schemes. *PLoS ONE*, 13(11)

15. Lagheden C, Eklund C, Nordqvist Kleppe S, Unger, ER, Dillner J, Sundström K (2016) Validation of a standardized extraction method for formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Journal of Clinical Virology*, 80, 36-39.
16. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970) Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides, and their constituents. *Biochemistry*, 9(20), 4022-4027.
17. Bio-Rad (2020) PCR Troubleshooting <HTML (2020-02-23)
18. McHugh t D, Newport L E, Gillespie S H (1997) *IS6110* homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1769-1771.