



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Bruk av Liquid array diagnostics teknologien for å evaluere oral mikrobiota i en diagnostisk setting

Application of the Liquid array
diagnostics technology to evaluate the oral
microbiota in a diagnostic setting

Marja Støle Hagane

Master i bioteknologi

Forord

Denne oppgaven vil markere avslutningen på min mastergrad i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskaplige universitet. Oppgaven var skrevet ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Laboratoriearbeid ble utført ved bioteknologifirmaet Genetic Analysis AS (GA) på Økern i Oslo.

Jeg er dypt takknemlig for alle som har bidratt til å gjøre denne masteroppgaven til en berikende læringsopplevelse. Først vil jeg takke min veileder Knut Rudi som introduserte meg til dette spennende prosjektet og ga meg muligheten til å samarbeide med GA. Jeg setter pris på dine grundige tilbakemeldinger og tålmodighet under skriveprosessen. En spesiell takk går til min eksterne veileder Pranvera Hiseni, for all hjelp og oppmuntring som har vært uvurderlig for arbeidet. Jeg er dypt takknemlig for det trivelige oppholdet jeg hadde hos GA denne våren. Det var en glede å få jobbe med et så dyktig og engasjert team.

En stor takk må rettes til mine venner, familie og kjæreste for alle behjelpende handlinger og oppmuntrende ord. Denne skriveperioden ble mye bedre takket være dere. Til slutt ønsker jeg å takke alle medstudenter som jeg fikk gleden av å treffe i løpet av mine studieår på Ås. Jeg var heldig som fikk oppleve universitetslivet med en så god gjeng, dere gjorde studietida uforglemmelig.

Sommer 2023

Marja Støle Hagane

Abstrakt

En balansert oral mikrobiota er viktig for å opprettholde oral og generell helse. Svekkelse av mikrobiell homeostase kan føre til en dysbiotisk tilstand i munnen. Det er blitt stadig mer anerkjent at oral mikrobiota har evnen til å gjenspeile kroppens generelle helsetilstand. Og i de siste årene har det vært en økt interesse rundt bruken av oral mikrobiota som et screening- og diagnostiseringsverktøy. Dette har ført til et behov for rimelige og tidseffektive deteksjonsmetoder som kan brukes for rutinemessig screening. Den nyutviklede teknologien Liquid array diagnostics (LAD) kan potensielt være nyttig i screening av oral mikrobiota. Hovedmålet med denne oppgaven var å validere om en LAD-basert test kan være anvendbar for oral mikrobiota screening.

For å oppnå dette ble først deteksjonsevnen til spesialdesignede probepar vurdert i separate LAD reaksjoner. Deretter ble LAD utført for å vurdere markeringsprobenes sekvensdesign. Probene ble så testet mot 63 forskjellige bakterieisolater, for å validere probenes ytelse i multiplekse reaksjoner. Til slutt ble en LAD-basert test utført med 66 spyttprøver fra friske mennesker. Hovedfunnet fra denne oppgaven er at orale bakterier ble suksessfullt detektert med en LAD-basert test. Funn fra samtlige LAD-forsøk viste at probenes ytelse var generelt bra og ga en suksessfull deteksjon av de fleste målbakteriene. Resultatene fra denne oppgaven virker lovende for fremtidig utvikling av et praktisk og informativt LAD-basert screeningsverktøy. Med denne oppgaven har vi synliggjort behovet for ytterligere forskning på bruk av LAD-teknologi for oral mikrobiotascreening.

Abstract

A balanced oral microbiota is important for maintaining oral and general health. Disturbance of microbial homeostasis can lead to a dysbiotic condition in the mouth. It has become increasingly recognized that the oral microbiota has the ability to reflect the body's general state of health. And in recent years there has been an increased interest in the use of oral microbiota as a screening and diagnostic tool. This has led to a need for affordable and time-efficient detection methods that can be used for routine screening. The newly developed technology Liquid array diagnostics (LAD) could potentially be useful in screening oral microbiota. The main aim of this thesis was to validate whether an LAD-based test can be used for oral microbiota screening.

To achieve this, the detection ability of specially designed probe pairs was first assessed in separate LAD reactions. Next, LAD was performed to assess the labelling probes' sequence design. The probes were then tested against 63 different bacterial isolates, to validate the probes' performance in multiplex reactions. Finally, a LAD-based test was performed with 66 saliva samples from healthy people. The main finding from this thesis is that oral bacteria were successfully detected with an LAD-based test. Findings from the LAD experiments showed that the performance of the probes was generally good and provided a successful detection of most of the target bacteria. The findings from this thesis seem promising for the future development of a practical and informative LAD-based screening tool. With this thesis, we have highlighted the need for further research into the use of LAD technology for oral microbiota screening.

Liste over forkortelser

ddCTP	Dideoksy-cytidintrifosfat
ddCTP-Q	Quencher-markert dideoksy-cytidintrifosfat
dH ₂ O	Destilert vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ds	Dobbeltråd
FPQ	Falsk positiv quenching
G	Guanin
g+	Flere slekter
GA	Genetic Analysis AS
gDNA	Genomisk DNA
LAD	Liquid array diagnostics
Mkon	Markeringskontrollprobe
MP	Markeringsprobe
NK	Negativ kontroll
P	Probepar
PCR	Polymerase kjedereaksjon
QP	Quenchingkontroll-probepar
qPCR	Kvantitativ polymerase kjedereaksjon
RFU	Relativ fluorescens-enhet
RNA	Ribonukleinsyre
RP	Reporterprobe
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
T _m	Smeltetemperatur

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Abstrakt	II
Abstract	III
Liste over forkortelser	IV
1 Introduksjon	1
1.1 Samspill mellom mikroorganismer og mennesker	1
1.2 Menneskets orale mikrobiota	1
1.2.1 Mikrobielle nisjer	2
1.2.2 Utvikling av oral mikrobiotasammensetning	2
1.2.3 Fellestrekk mellom individuelle mikrobiota.....	3
1.2.4 Oral mikrobiota og munnens immunologi.....	4
1.2.5 Oral dysbiose	5
1.2.6 Oral mikrobiota og systemiske sykdommer	6
1.2.7 Forebyggende tiltak mot oral dysbiose.....	8
1.3 Studere oral mikrobiotasammensetning	8
1.3.1 Saliva som screening- og diagnostiseringsverktøy.....	8
1.3.2 Etablerte deteksjonsmetoder.....	9
1.3.3 Liquid array diagnostics	10
1.4 Målet med masteroppgaven	13
2 Materialer & metoder	14
2.1 Overtagelse og preparering av prøber	15
2.2 Vurdering av probepar i separate LAD-reaksjoner	17
2.2.1 Markeringsreaksjon	17
2.2.2 Dupleksformasjon og smeltekurvanalyse.....	17
2.3 Vurdering av sekvensdesignet til markeringsprobene	18
2.4 Validere prøber opp mot målbakterier	18
2.5 Spyttanalyse	20
2.5.1 Prøvetakning.....	20
2.5.2 Ekstraksjon	20
2.5.3 Amplifikasjon	21
2.5.4 Kvantifikasjon	21
2.5.5 ExoSAP rensing.....	21
2.5.6 LAD-basert oral mikrobiota test.....	22
2.5.7 Databehandling og visualisering av positive LAD-signaler.....	22

3	Resultater	23
3.1	Vurdering av probepar i separate LAD-reaksjoner.....	23
3.1.1	Vurdering av markeringskontroll-prober som templat	23
3.1.2	Vurdering av quenchingkontroll-prober	24
3.1.3	Falsk positiv quenching	25
3.2	Vurdering av sekvensdesignet til markeringsprobene	26
3.3	Validere prober opp mot renkultur av målbakterier	27
3.3.1	Probens deteksjonsytelse i multiplekse reaksjoner	27
3.3.2	Probenes spesifisitet og sensitivitet	29
3.4	Spyttanalyse.....	30
3.4.1	Qubit kvantifisering	30
3.4.2	LAD-basert oral mikrobiota test.....	31
4	Diskusjon.....	33
4.1	Vurdering av probenes ytelse	33
4.1.1	Prober egnet for LAD-basert test.....	33
4.1.2	Prober som ikke virket som planlagt	34
4.2	Drøfting av funn fra spyttanalysen	35
4.2.1	Evaluering av ekstraksjonsprotokollen.....	35
4.2.2	Bakterieartene oppdaget med LAD-basert test.....	36
4.2.3	Effekten av rensebehandlinger	36
4.3	Anvendbarheten av LAD	37
4.3.1	Muligheter for optimalisering.....	37
4.3.2	Potensialet til LAD-basert test for oral mikrobiota screening	37
4.4	Utfordringer knyttet til oppgaven.....	38
4.4.1	Teknisk begrensing grunnet ulike tannbørstingsmetoder	38
4.4.2	Feiltolkning av LAD-signaler i smeltekurver.....	39
4.5	Konklusjon	40
Kilder	41
Vedlegg	45

1 Introduksjon

1.1 Samspill mellom mikroorganismer og mennesker

Mikroorganismer, også kalt mikrober, omfatter alt mikroskopisk liv som er usynlig for det blotte øye. Til tross for deres lille størrelse, har mikrober hatt en viktig rolle under menneskets evolusjon. Mikrober og mennesker har påvirket hverandres egenskaper og dratt nytte av hverandres tilstedeværelse. Kontinuerlig sameksistens har ført til at mikrober kan leve i et tett symbiotisk forhold med mennesker (Gupta, Gupta, & Singh, 2017). Menneskekroppen er bestående av mange fordelaktige levesteder for mikrober. Eksponerte overflater som hud og slimhinner er spesielt utsatt for mikrobekolonisering. Det humane mikrobiota (normalflora) er bestående av mikrober som evner å etablere seg i kroppen på lang sikt (Wade, 2013). En sunn normalflora vil hovedsakelig være bestående av kommensale mikrobearter som lever i en likevekt med vertens immunsystem (Gaonkar, Patankar, Tripathi, & Sridharan, 2018; Ivanov & Honda, 2012). Mesteparten av det humane mikrobiota er etablert i tarmkanalen, det finnes også særegne mikrobielle samfunn på huden og i munnen (Dominguez-Bello, Godoy-Vitorino, Knight, & Blaser, 2019; Robinson & Pfeiffer, 2014).

1.2 Menneskets orale mikrobiota

Alle næringsmidler som skal ned i fordøyelseskanalen må først passere munnen. Den jevnlige eksponeringen fra det eksterne miljøet har ført til at munnen inneholder en av kroppens mest mangfoldige mikrobiota. Oral mikrobiota er et diverse samfunn av mikroorganismer (bakterier, sopp, arker og protister) samt virus, som eksisterer i munnhulen. Bakterier utgjør den mest utbredte mikrobepopulasjonen i munnen, med over 700 identifiserte arter. Forskning innen oral mikrobiota omhandler for det meste de bakterielle komponentene, da de andre mikrobene har blitt studert i mindre omfang (Carpenter, 2020; Marsh, 2018; Mosaddad et al., 2019).

1.2.1 Mikrobielle nisjer

Orale mikrober lever enten som fritt flytende planktoniske celler eller kolonisert på biotiske og abiotiske overflater. Mange planktoniske mikrober har evnen til å aggregere og forme komplekse samlinger av mikrober, kalt biofilmer. En veletablert biofilm vil kunne innkapsle mikrober i en matriks av ekstracellulært polymer. Denne biofilmstrukturen vil kunne øke interaksjonsegneskaper mellom mikrobene og skjerme dem fra vertens immunforsvar. Distinkte mikrobepopulasjoner akkumuleres i ulike nisjer på slimhinneepitelet og tennene, samt på tannregulering og andre abiotiske materialer. Majoriteten av de orale mikrobene lever i aerobe nisjer i munnen, det finnes også mikrober i områder uten tilgang til oksygen (i plakk og sprekker på tungen). Menneskespytt inneholder et stort antall fritt flytende mikrober fra alle munnens nisjer. Det er estimert at en milliliter spytt fra et gjennomsnittlig menneske kan inneholde opptil 100 millioner mikrober (Bertolini et al., 2022; Carpenter, 2020; Curtis, Zenobia, & Darveau, 2011; Dongari-Bagtzoglou, 2008).

1.2.2 Utvikling av oral mikrobiotasammensetning

Menneskers individuelle mikrobiotasammensetninger er dynamisk og vil tilpasse seg etter interne og eksterne faktorer. Det taksonomiske innholdet i mikrobiota vil derfor variere fra person til person. Alder, spyttproduksjon, kosthold, genetikk, munnhygiene og livsstil er noen av faktorene som kan påvirke utviklingen av mikrobiotasammensetningen (Marsh & Percival, 2006).

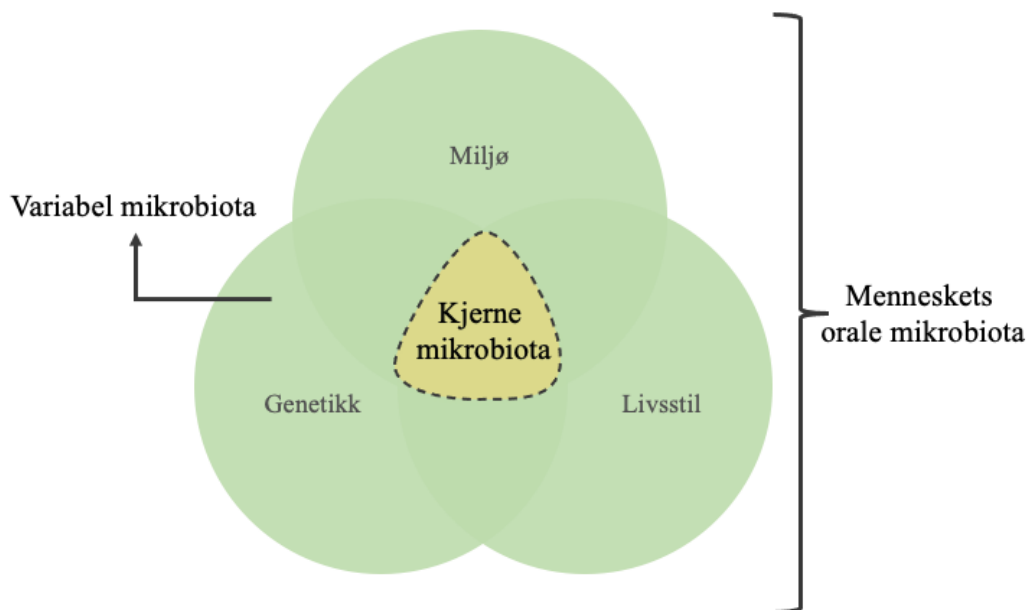
Miljøeksponering tidlig i livet har en stor påvirkning på mikrobiotasammensetning i munnen. Den første koloniseringen av munnhulen oppstår ved fødselen, når spedbarn blir eksponert til morens normalflora og luftbårne mikrober. De første mikrobene som etablerer seg i munnen spiller en viktig rolle under videreutvikling av oral mikrobiota. Metabolske produkter lagd av de første mikrobene vil kunne påvirke munnens miljø og fremtidig etablering av bakteriearter. Forskning har vist at spedbarns orale mikrobiota kan bli sterkt påvirket av kosthold (Oba, Holscher, Mathai, Kim, & Swanson, 2020). I studien Holgerson et al. ble det oppdaget at ammende spedbarn og spedbarn med morsmelkerstatning hadde distinktive mikrobielle koloniseringsmønstre. Funn fra denne studien viste at ammende spedbarn hadde en høyere forekomst av *Lactobacillus*, og at *Lactobacillus* hadde en inhiberende effekt på patogene mikrober (Holgerson et al., 2013).

Det er forventet et stort skifte i mikrobiotasammensetningen etter utbrudd av de første tennene. Tannfrembrudd gir en økning av forskjellige koloniseringsoverflater som tilrettelegger for større mikrobiell diversitet. Tennene har ikke den samme selvrensende effekten som slimhinnene, og blir derfor utsatt for biofilmformasjon i form av plakk (Deo & Deshmukh, 2019). Som følge av de nye nisjene som oppstår mellom tennene og tannkjøttet, forventes det en økning av anaerobe bakterier, inkludert *Prevotella* og *Fusarium*. Forskning har vist at mikrobiotasammensetningen på slektsnivå forblir relativt stabil gjennom voksenlivet dersom oral homeostase opprettholdes (David et al., 2014; Marcotte & Lavoie, 1998; Sharma, Bhatia, Sodhi, & Batra, 2018).

Mennesker i alle aldre er avhengig av en stabil spyttproduksjon for å opprettholde en god oral helse. Spyttets sammensetning og funksjon har en stor påvirkning på mikrobiotasammensetningen i munnen. Og det er kjent at spyttet kan ha både en stimulerende og en hemmende effekt på mikrobeetablering. Spyttets bufferkapasitet skaper en stabil pH på 6,5-7 som mange fordelaktige bakterier foretrekker. Spyttets antimikrobielle enzymer og sekretorisk immunglobulin A, samt regelmessig svelging, forhindrer overflødig kolonisering av mikrober (Carpenter, 2020; Pedersen & Belstrøm, 2019; Tiwari, 2011).

1.2.3 Fellestrekk mellom individuelle mikrobiota

Mennesker har individuelle mikrobiotasammensetninger som deler noen fellestrekk. Friske individer deler noen felles mikrobielle komponenter, også kjent som kjerne mikrobiota. Disse mikrobielle komponentene er hovedsakelig bestående av kommensale bakteriepopulasjoner som forblir relativt stabile over tid (Deo & Deshmukh, 2019; Jia et al., 2018). Funn fra Bik et al. viste at bakterieslektene *Streptococcus*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Propionibacterium* og *Actinomyces* dominerer hos friske mennesker (Bik et al., 2010). Det er forventet en høy tilstedeværelse av streptokokkarter, deriblant *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius* og *Streptococcus sanguis* (Gaonkar et al., 2018).



Figur 1: Inndeling av orale mikrobiota. De mikrobielle komponentene ble inndelt i kjerne eller variabel mikrobiota. Kjerne mikrobiota, markert gult, er de mikrobielle komponentene som forblir felles mellom individer. Variabel mikrobiota, markert grønt, er individuelle for hver person avhengig av påvirkningsfaktorer (Deo & Deshmukh, 2019; Jia et al., 2018).

1.2.4 Oral mikrobiota og munnens immunologi

Den konstante eksponeringen fra eksterne miljø har gjort munnen til et sentralt område for immunaktivitet. Slimhinnene utskiller en rekke forskjellige immunceller som forbygger kolonisering av eksogene mikroorganismer, likevel vil orale slimhinnene tolerere tilstedeværelse av kommensale mikrober. Utvikling av oral mikrobiota er avhengig av immun-tolerogene mekanismer som aktivt nedregulerer inflammasjon. Tilstedeværelse av tolerogene immunceller med immundepende egenskaper bidrar til å opprettholde toleranse i munnen. Immun toleranse kan redusere vertens immunresponser mot antigener fra kommensale mikroorganismer (Tordesillas & Berin, 2018). Denne toleranse tilstanden forebygger inflammasjon når immunceller eksponeres til kommensale mikrober under oral homeostase (Pelaez-Prestel, Sanchez-Trincado, Lafuente, & Reche, 2021).

De kommensale mikrobene i munnen kan til gjengjeld utføre funksjoner som er til fordel for vertsorganismen. Normalfloraen kan forebygge infeksjoner av uønskede mikrober ved å virke som en barriere mellom det ytre miljøet og slimhinner. Dette fenomenet, kjent som koloniseringsresistens, gjør at kommensale mikrober kan utkonkurrere fremmede mikroorganismer ved å blokkere deres tilgang av næring og koloniseringsplass (Wade, 2013).

Noen kommensale mikrober bidrar til å opprettholde oral helse ved å produsere hydrogenperoksid, som kan skade celleveggen til patogene mikrober og føre til celledød. Forskning har også vist at normalflora også kan fremme oral helse ved å oppregulere vertens immunrespons (Baty, Stoner, & Scoffield, 2022; Zenobia et al., 2013).

1.2.5 Oral dysbiose

En veletablert normalflora er viktig for å opprettholde en dynamisk balansetilstand mellom vert og oral mikrobiota. Store endringer i mikrobiotasammensetning kan forstyrre den mikrobielle homeostasen. Avtagende oral homeostase er forbundet med en rekke negative helsekonsekvenser. Dysbiose er en mikrobiell ubalanse som dannes ved reduksjon av fordelaktige mikrober og/eller tap av artsdiversitet. Denne tilstanden endrer den funksjonelle aktiviteten i mikrobiotaen og forstyrrer samspillet mellom vert og mikrober. Dysbiose kan forårsake en dysregulert lokal immunrespons og nedsatt immunforsvar i munnen (Idris, Hasnain, Huat, & Koh, 2017). Noen faktorer som kan føre til oral dysbiose er dårlig munnhygiene, overflødig sukkerinntak, antibiotikakur og redusert spyttproduksjon, samt skadelige vaner som røyking (Sudhakara, Gupta, Bhardwaj, & Wilson, 2018).

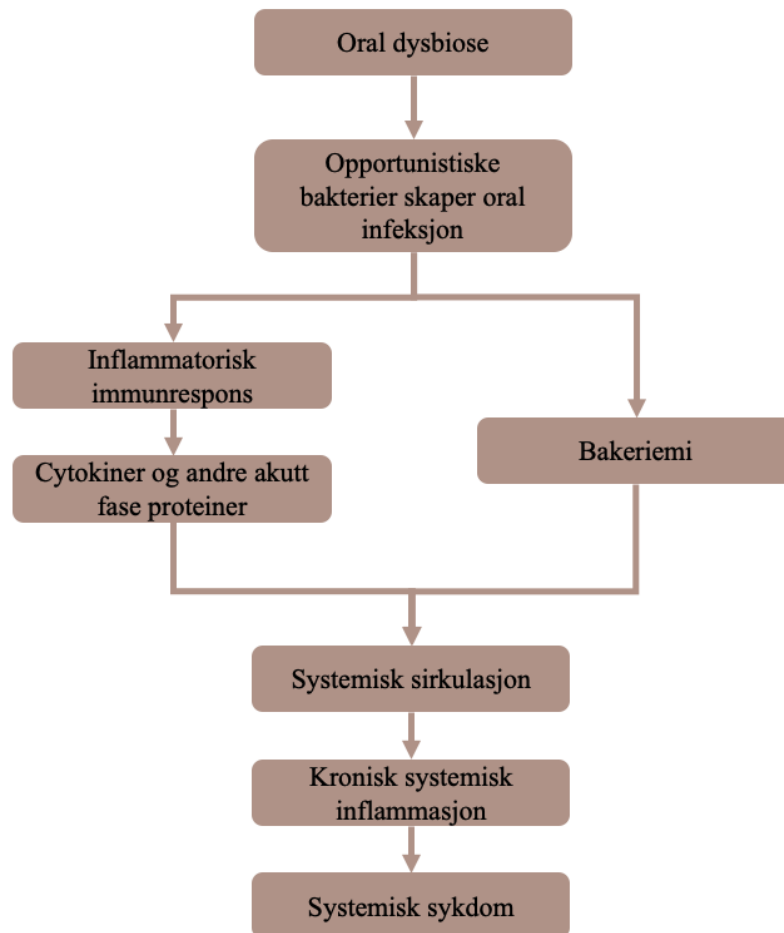
I løpet av siste årene har mange studier demonstrert hvordan mikrobiell dysbiose påvirker utviklingen av orale sykdommer og helseplager. Store kvalitative forandringer i mikrobiotaen kan føre til at verten blir mer mottagelig til infeksjoner. Opportunistiske bakterier som vanligvis ikke gir sykdom, kan begynne å skape infeksjoner om immunsystemet er svekket. Det er mange forskjellige opportunistiske og patogene mikroorganismer som er assosiert med lokale sykdommer i munnen. Dette inkluderer bakteriearter som *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus* og *Porphyromonas gingivalis* (Fernandes et al., 2023). Karies og tannkjøttbetennelse er blant de vanligste orale infeksjonene. Forskning har vist at utvikling av karies kan være assosiert med økende antall syre-produserende bakterier, som *Streptococcus mutans* eller spesifikke bakteriearter fra *Lactobacillus* slekta (Chen et al., 2022; Han et al., 2022; He, Li, Cao, Xue, & Zhou, 2015; Wade, 2013; Wang et al., 2017).

Tilstedeværelse av opportunistiske og patogene mikroorganismer i munnen gir økt risiko for uønsket mikrobiellspredning til andre steder i kroppen. Orale mikrober kan enten transporteres via fordøyelseskanalen (den enterale veien) eller via blodsirkulasjonen (den hematogene veien). Vanligvis er blodet bakteriefritt, men spesifikke orale infeksjoner kan føre til at levedyktige bakterier spres via blodsirkulasjonen, også kalt bakteriemi. Om farlige orale bakterier etablerer seg i andre vev eller organer i kroppen kan det få alvorlige konsekvenser for vertens generelle helse (Khor et al., 2021).

1.2.6 Oral mikrobiota og systemiske sykdommer

Stadig mer kunnskap har blitt etablert om oral mikrobiotas evne til å påvirke generell helse. I nyere tid har det blitt dannet teorier om hvordan oral dysbiose kan være assosiert med systemiske sykdommer. Systemiske sykdommer tar for seg alle sykdomstilstander som rammer flere organer og vev samtidig, i verste fall kan hele kroppen bli utsatt (Sudhakara et al., 2018). Forskning har vist at noen systemiske sykdommer kan være forbundet med dysbiotisk mikrobiota og orale infeksjoner. Dette inkluderer systemiske sykdommer som diabetes mellitus (Long et al., 2017), overvekt (Wu, Chi, Zhang, Chen, & Deng, 2018), Alzheimers sykdom (Liu, Dashper, & Zhao, 2023) og tarmsykdommer (Said et al., 2014).

Det har blitt antatt at orale infeksjoner kan føre til utvikling eller forverring av systemiske sykdommer via immun-inflammatoriske prosesser. To av de foreslåtte prosessene, spredning av inflammatoriske mediatorer og bakteriemi, blir presentert i figur 2. Figuren nedenfor viser hvordan dysbiotisk mikrobiota kan føre til bakteriemi og systemisk spredning av aktive inflammatoriske mediatorer (tumornekrosefaktor- α , interleukin- 1β etc.). Dersom disse skadelige komponentene ikke forsvinner fra blodomløpet, etter flere dager med immunrespons, kan hele kroppen bli rammet. Det kan føre til utvikling av systemisk inflammasjon med langvarig betennelsesløp som kan vare opptil flere år. Under en inflammatorisk tilstand vil kroppen være mer utsatt for diverse sykdommer og utvikling av systemiske sykdommer (Li, Kolltveit, Tronstad, & Olsen, 2000; Lu, Xuan, & Wang, 2019; Sedghi, DiMassa, Harrington, Lynch, & Kapila, 2021).



Figur 2: Figuren viser hvordan oral dysbiose kan føre til systemisk sykdom. Inspirert av figur 2 i oversiktsartikkelen Niazi & Bakhsh (Niazi & Bakhsh, 2022).

Noen systemiske sykdommer kan påvirke den orale helsen ved å manifestere seg i munnen. Som følge av denne manifestasjonen kan mikrobiotasammensetningen gjennomgå endringer. Oral mikrobiota har i slike tilfeller evnen til å gjenspeile kroppens generelle helsetilstand (Varoni & Rimondini, 2022). Forskning har vist at oral mikrobiota hos pasienter med systemiske sykdommer oftere har redusert diversitet og økning av patogene mikrober. Funn fra studiene Wu et al. og Liu et al. viste at oral mikrobiota hos individer med systemiske sykdommer har lavere diversitet sammenlignet med friske individer (S. Liu et al., 2023; Wu et al., 2018).

1.2.7 Forebyggende tiltak mot oral dysbiose

Det kan være krevende å behandle dysbiotisk mikrobiota. Antibiotikakurer og andre tradisjonelle behandlinger vil ofte være ineffektive for opprettholdelse av mikrobiell homeostase. Derfor kan den enkleste måten å kontrollere tilstanden og unngå oral dysbiose være via forebyggende tiltak. Oral homeostase kan opprettholdes ved å unngå faktorer som forårsaker mikrobiell ubalanse, samt aktivt promotere den naturlige mikrobiota. Preventive strategier med pre-/probiotika kan promotere oral helse ved å inhibere tilvekst av flere mikrober. Dette ble vist i studien Archambault et al., da laktobasiller med probiotiske egenskaper forhindret etablering av *S. oralis* (Archambault et al., 2023; Thomas et al., 2021).

Dårlig munnhygiene er en av de vanligste årsakene til oral dysbiose. Regelmessig tannpussing er en viktig rutine for å opprettholde god oral helse. Biofilmformasjon på tannoverflater kan føre til akkumulering av patogene mikrober. Fysisk fjerning av biofilm kan redusere risikoen for orale infeksjoner. Tannkremer og munnskyll har antimikrobielle egenskaper som bidrar til å redusere bakteriemengden i munnen betraktelig. Oral hygieniske produkter, som tannbørster, kan være en kilde for mikrobiell kontaminering. Det er derfor viktig med riktig oppbevaring av tannbørster, samt regelmessig utbytting av hygieniske produkter (Berger, Rakhimimova, Pollack, & Loewy, 2018; Sedghi et al., 2021; Sudhakara et al., 2018).

1.3 Studere oral mikrobiotasammensetning

1.3.1 Saliva som screening- og diagnostiseringsverktøy

Diagnostisering og overvåking av sykdomsprogresjon har ofte blitt gjort via prøvetakning av blod og andre invasive prosedyrer. Slike prosedyrer kan oppleves som smertefulle eller ubehagelige for pasienten. Saliva har blitt betraktet som et lovende alternativ til tradisjonelle diagnostiske materialer. Saliva-basert diagnostikk har fordelen av at prøvetakning kan utføres selvstendig, uten hjelp fra kvalifisert personell. Saliva er et relativt trygt materiale å håndtere, med relativt lav risiko for virusoverføring (Zhang et al., 2016). Saliva-basert diagnostikk kan bli en kostnadseffektiv tilnærming, fordi spyttprøver er enkle å innsamle og oppbevare (Yoshizawa et al., 2013).

I likhet med andre diagnostiske materialer, inneholder spytt forskjellige biomarkører. Innen forskning og klinisk praksis har biomarkører blitt anvendt som målbare indikatorer som kan reflektere menneskets lokale og generelle helsetilstand (Strimbu & Tavel, 2010).

Spyttbiomarkører inkluderer DNA, RNA, protein og orale mikrober. Mikrobeinnholdet i saliva er for det meste bestående av bakterier fra alle munnens nisjer, og kan derfor virke som en god representasjon av oral mikrobiota. Ved å ta i bruk presise bakterielle biomarkører kan spesifikke orale og ikke-orale sykdommer detekteres (Zhang et al., 2016). Biomarkører i spytt har blitt ansett som en lovende screening- og diagnostiseringsverktøy for en rekke systemiske sykdommer (Chojnowska et al., 2018; Rezasoltani et al., 2022; Thomas et al., 2021).

1.3.2 Etablerte deteksjonsmetoder

Tradisjonelt ble oral mikrobiota studert via dyrkningsavhengige metoder. I munnen finnes det derimot mange orale mikrober som er ikke-dyrkbare. Anvendelse av dyrkningsavhengige metoder har derfor gitt en feilaktig fremstilling av den mikrobielle diversiteten i munnen. Nyutviklede deteksjonsmetoder har gjort det mulig å identifisere ikke-dyrkbare bakteriearter (Xiao et al., 2023).

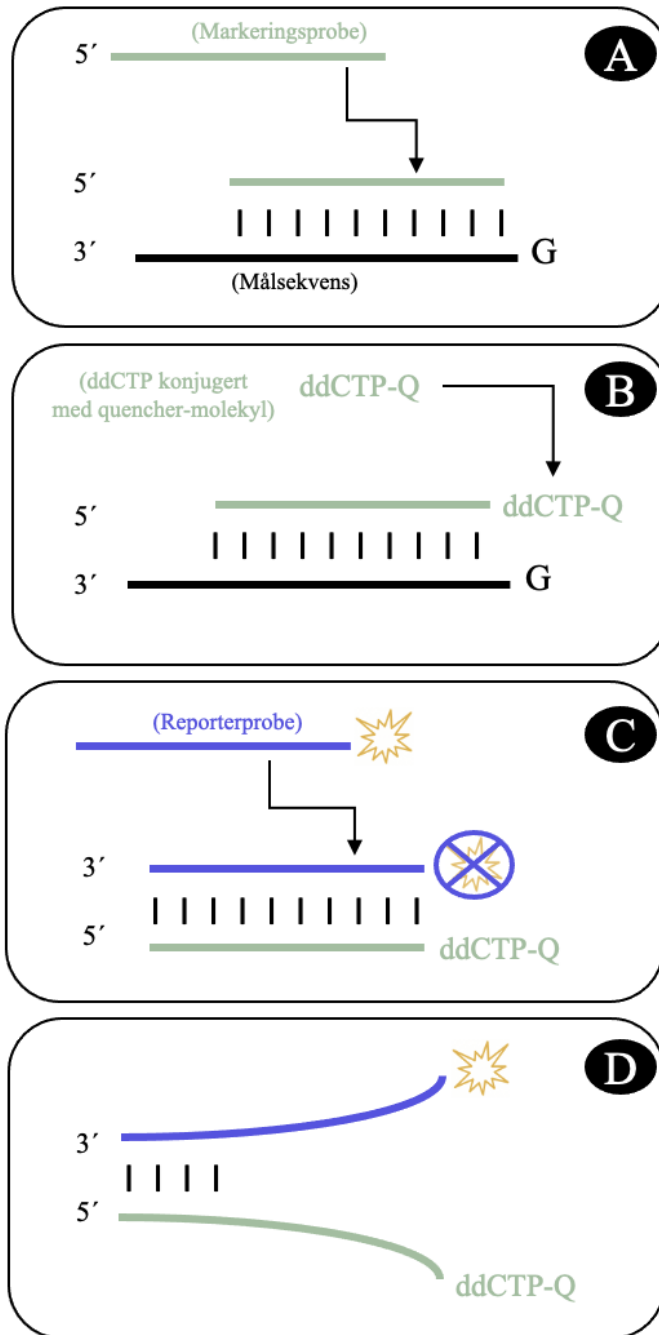
16S ribosomal RNA (rRNA) genet blir ofte benyttet for identifisering og kvantifisering av orale bakterier. Genet inneholder genetiske konserverte regioner og ni hypervariable regioner (V1-V9). Denne kombinasjonen gjør 16S rRNA genet til en god genetisk markør. Det 1500 basepar lange genet finnes i alle bakterier og gir tilstrekkelig informasjon for slekt-/artsidentifikasjon (Chakravorty, Helb, Burday, Connell, & Alland, 2007; Xiao et al., 2023).

Klinisk praksis og forskning tar i bruk mange forskjellige 16S rRNA gen-baserte deteksjonsmetoder, inkludert Illumina sekvensering og qPCR-baserte tester. Slike metoder tillater identifikasjon av mange bakteriearter som tidligere ikke har vært studert (Budding, Hoogewerf, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2016; Xiao et al., 2023).

1.3.3 Liquid array diagnostics

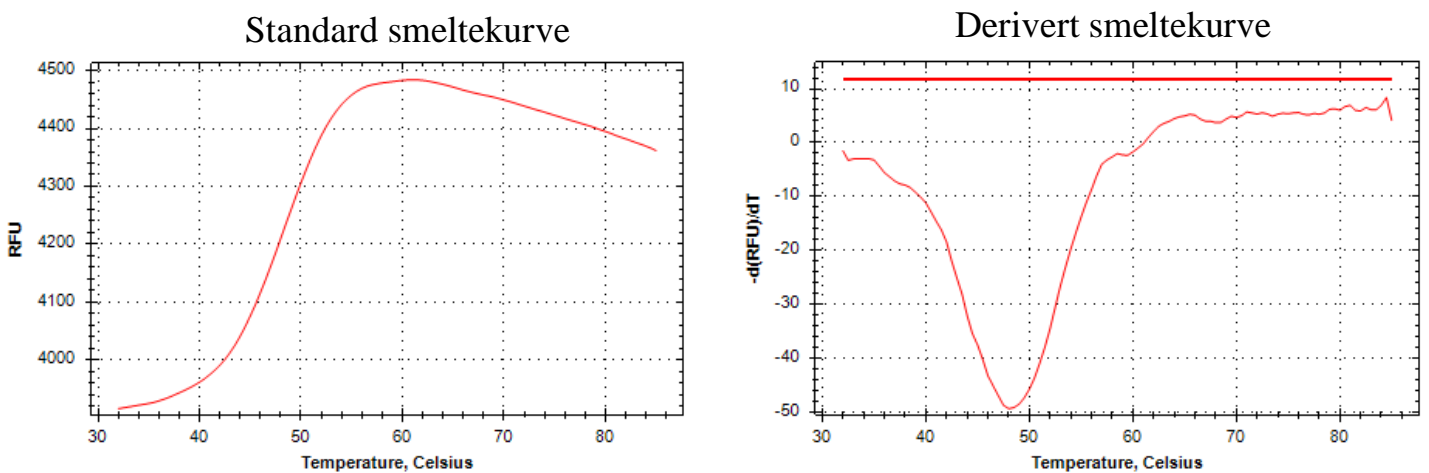
«Liquid array diagnostics», forkortet LAD, er en nyutviklet teknologi for deteksjon av mikrobielle biomarkører. LAD metoden kan tilby multipleks deteksjon, hvor opptil 50 målsekvenser kan bli oppdaget samtidig i en enkeltrørsreaksjon. Hele prosessen finner sted i en flytende løsning som bidrar til å forenkle prøveprosessering. LAD-prosessen, som visualiseres i figur 3, består av markeringsreaksjon (A og B), dupleksformasjon (C) og smeltekurveanalyse (D). Markeringsreaksjon kan utføres i en termosyklus, mens de resterende prosessstrinnene utføres i qPCR-instrument (Hiseni et al., 2019).

LAD er en probe-basert metode som tar i bruk spesialdesignede markeringsprober (MP) og reporterprober (RP). RP blir produsert ferdigmarkert med en fluorofor, mens MP kan bli quencher-markert dersom målsekvenser er til stede i prøven. MP-RP dupleksformasjon kan resulterer i demping av fluorescens (quenching), som varer til dupleksets smeltetemperatur er nådd. Tilstedeværelse av målsekvenser oppdages ut ifra fluorescens signaler og eventuell quenching. Under smeltekurveanalysen vil fluorescens signaler bli målt jevnlig gjennom en temperaturøkning, resultatet blir presentert som smeltekurver (dissosiasjonskurver). En LAD-basert test kan oppdage mange målsekvenser samtidig ved å skille fluorescens signalene fra hverandre ved ulike fluoroforer og spesifikke smeltetemperatur til MP-RP dupleksene (Hiseni et al., 2019).



Figur 3: Oversikt over hele LAD prosessen. A) Markeringsreaksjon: markeringsprober (MP) vil hybridisere til tilhørende målsekvens. B) Markeringsreaksjon: Dersom hybridiseringen var vellykket vil DNA polymerase inkorporere quencher-markert dideoxycytidin (ddCTP-Q) i 3-enden av MP. C) Dupleksformasjon: reporterprober (RP) med fluorofor på 5-enden danner duplekser med tilhørende MP. Det bli redusert fluorescens emisjon dersom RP dannet dupleks med quencher-markert MP. D) Smeltekurveanalyse: Hver RP-MP dupleks vil ha en spesifikk smeltetemperatur (T_m), når T_m blir nådd vil duplekset skiller lag. RP vil igjen emittere fluorescens når quencher-molekylet ikke er i nærheten.

Figur 4 viser hvordan duplekssmeltetemperatur kan bli presentert i to ulike smeltekurver (standard og derivert). For tydelig visualisering av dupleksenes smeltetemperaturer blir smeltekurveanalyseresultatene presentert i deriverte smeltekurver. Negative topper i deriverte smeltekurver er forårsaket av brå temperaturavhengige endringer i fluorescens. Disse brå endringene av fluorescens kommer fra oppløsning av MP-RP dupleksene og redusert quenching, som er et tegn på tilstedeværelse av målsekvens (Hiseni et al., 2019).



Figur 4: Grafene viser smeltekurver med fluorescenssignaler fra samme prøve. I standard smeltekurven er målt fluorescens (RFU) plottet på y-aksen, mens derivert smeltekurve viser den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) på y-aksen. Derivert smeltekurve viser en tydelig negativ topp ved 48 °C. Den rette linjen over derivert smeltekurve representerer den høyeste verdi på y-aksen for gitt graf. Denne linjen ble justert for optimal visualisering av data. Denne justeringen ble gjort for alle grafer med deriverte smeltekurver i denne oppgaven.

1.4 Målet med masteroppgaven

Det har blitt stadig mer anerkjent at oral mikrobiota har evnen til å reflektere individets helsetilstand. Denne kunnskapen har ført til økt interesse rundt bruken av oral mikrobiota som et screening- og diagnostiseringsverktøy. Med en økt interesse kommer også et behov for utvikling av rimelige og tidseffektive deteksjonsmetoder, som kan bidra med å fremme videre forskning. LAD er en nyutviklet teknologi som potensielt kan være nyttig for screening av orale mikrobiota. LAD metoden har tidligere blitt brukt for å suksessfullt detektere tarmbakterier fra fekale prøver (Hiseni et al., 2019). Hittil har det ikke vært noen publiserte studier om LAD metodens evne til å detektere orale bakterier fra spytt. Hovedmålet med denne oppgaven ble derfor å undersøke om en LAD-basert test kan anvendes for oral mikrobiota screening.

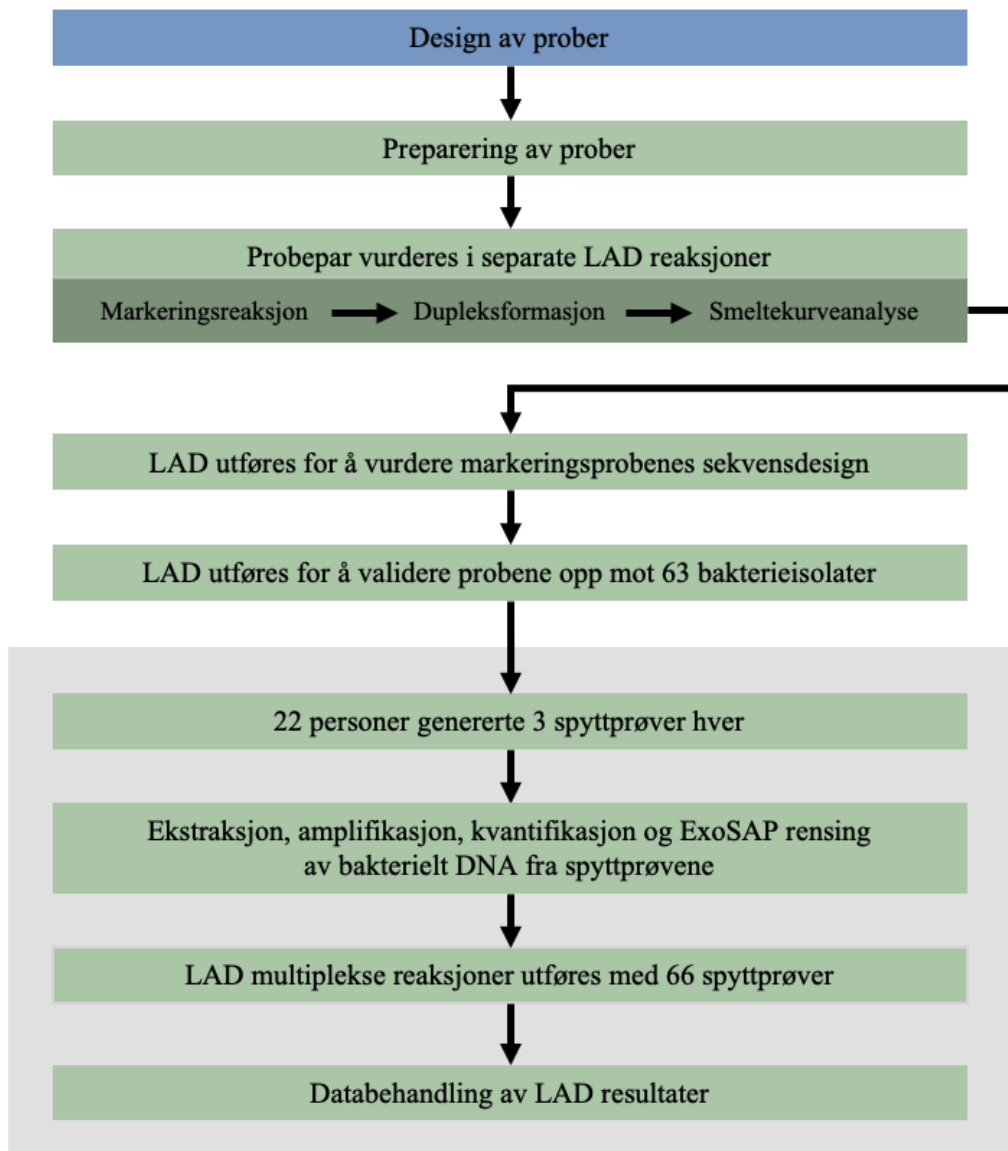
For å kunne oppnå dette hovedmålet ble det utarbeidet noen tilhørende delmål:

- Undersøke om probene hadde uventede utfordringer.
- Validere probenes ytelse i multiplekse LAD-reaksjoner.
- Vurdere om ekstraksjonsprotokollen for fekalprøver kan fungere for spyttprøver.
- Undersøke om LAD kunne oppdage endringer i mikrobiotasammensetning hos friske mennesker før tannpuss, etter tannpuss og etter munnskyll.

Probene som ble brukt i dette prosjektet har per nå ikke blitt offentliggjort av Genetic Analysis AS (GA). Det ble besluttet at probesekvensene skal hemmeligholdes i denne masteroppgaven.

2 Materialer & metoder

Arbeidsflyten til denne masteroppgaven er beskrevet i figur 5. Masteroppgaven omfatter alle prosesstrinnene etter anskaffelse av prober, markert i grønne bokser. De siste prosesstrinnene i arbeidsflyten var del av en større spyttanalyse.



Figur 5: Arbeidsflyten til prosjektet. Hver boks beskriver forskjellige prosesstrinn i prosjektet. Masteroppgaven omhandler de grønne boksene, trinnet fremhevet i blått ble utført av Genetic Analysis AS før oppstart av masteroppgaven. Prosesstrinnene til LAD metoden oppgis i mørkegrønn boks. Pilene beskriver retningen på arbeidsflyten. Spyttanalysen, markert i grått, er bestående av flere prosesstrinn.

2.1 Overtagelse og preparering av prober

Før oppstart av masteroppgaven ble spesialtilpassede prober for bakteriedeteksjon designet og anskaffet av Genetic Analysis AS (GA). Probene skulle detektere 15 målsekvenser fra signaturbakterier i munnen. Det ble designet en MP og en RP per målsekvens, totalt ble det 15 probepar. I tabell 1 oppgis alle probeparene og hva de var designet til å detektere.

MP var spesifikt designet for å bli markert av en ddCTP-DYQ660 i 3-enden, dersom proben var hybridisert til en målsekvens. RP-ene var designet for å oppnå deteksjon av 15 distinktive probe-signaler samtidig. For å kunne skille probe-signalene fra hverandre ble RP-ene produsert med ulike fluorescerende forbindelser i 5-enden. RP-ene var markert med FAM, ROX, Cy5 og Quasar som vist i tabellen nedenfor. RP-ene var også designet for å kunne hybridisere med tilhørende MP. MP-RP dupleksene hadde en spesifikk smeltetemperatur mellom 30-70 °C.

Tabell 1: Oversikt over probepar brukt under masteroppgaven og hva de var designet for å detektere. I tillegg vises probenes forbundne fluorescerende forbindelse og teoretiske smeltetemperatur på MP-RP dupleksene. Probene fikk egendefinerte forkortelser, hvert probepar ble nummerert (1-15) utenom quencherparet (QP).

Målbakterier (+ quenching)	Nummererte probepar	Teoretisk smeltetemperatur (°C)	Fluorescerende forbindelse
<i>Porphyromonas pasteri</i>	P1	40,2	FAM
<i>Neisseria</i> spp.	P2	50	
Bacilli*	P3	60,1	
<i>Bifidobacterium</i> *	P4	34,9	ROX
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	P5	44,4	
<i>Haemophilus</i> *	P6	53,6	
<i>Streptococcus</i> spp.	P7	62,8	
<i>Veillonella atypica</i>	P8	41	Cy5
<i>Veillonella dispar</i> og <i>Veillonella parvula</i>	P9	50,4	
<i>Actinomycetia</i> *	P10	58,6	
<i>Prevotella</i> spp.	P11	69,2	
<i>Streptococcus sanguinis</i> **	P12	38,6	Quasar
<i>Streptococcus mitis</i> **	P13	50,6	
<i>Streptococcus salivarius</i> **	P14	60,2	
<i>Fusobacterium</i> spp.	P15	68,3	
Quenching	QP	56,7	HEX

*Proben er for det meste spesifikk for den gitte målbakterie, inkludert noen andre bakterieslekter/-klasser

**Proben er for det meste spesifikk for den gitte bakteriearten, inkludert noen andre bakteriearter fra samme slekt

2.2 Vurdering av probepar i separate LAD-reaksjoner

I dette forsøket skulle MP-RP dupleksenes faktiske smeltetemperatur undersøkes. For å kunne studere smeltetemperaturen til hvert enkelt MP-RP dupleks var det viktig å unngå påvirkning fra andre duplekser. LAD-forsøket ble derfor satt opp med uniplekse reaksjoner, hvor kun et probe-signal skulle detekteres per enkeltrør. Det var også ønsket å undersøke funksjonen til markeringskontrollprobene og quenchingkontrollprobene, for å se om de oppførte seg som forventet.

2.2.1 Markeringsreaksjon

Markeringsreaksjonsoppsettet var bestående av 30 uniplekse reaksjoner, med en enkel MP per prøverør. Hvert prøverør skulle ha et totalt reaksjonsvolum på 25 ul. 15 reaksjoner ble lagd med 3,4 ul MP (10 uM) og 10 ul av tilhørende Mkon (1 uM). Det ble i tillegg lagd 15 negative kontroller (NKer), en for hver MP. Hver NK inneholdt 3,4 ul MP (10 uM) og 10 ul destillert vann istedenfor Mkon. De resterende reagensene i hver reaksjon var 1X buffer C, 0,3 U/ul HOT TERMIpol DNA polymerase, 1 mM MgCl₂ og 1,2 uM ddCTP-DYQ660. Oversikt over probenes plassering i plateoppsettet vises i vedlegg B. Markeringsreaksjon ble utført i Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Termosykler-programmet startet på 95 °C i 12 minutter deretter gjentas 40 sykluser med denaturering på 96 °C i 20 sekunder og forlengelse/elongering på 60 °C i 40 sekunder.

2.2.2 Dupleksformasjon og smeltekurvanalyse

Dissosiasjonsreaksjon ble preparert i qPCR-plater med 20 ul mastermiks og 20 ul av produktet fra markeringsreaksjonen, total reaksjonsvolumet ble 40 ul. Hver reaksjon inneholdt 1% natriumdodecylsulfat (SDS) og 5 mM MgCl₂, 0,27 ul QMP (10 uM), 0,9 ul RP-blanding (15 RP og QRP med 10 uM). Smeltekurveanalysen ble utført i CFX96™ Touch Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) med et program som startet med 95 °C i 5 minutter, 50 °C i 30 sekunder og 32 i 5 minutter. qPCR instrumentet detekterer fluorescenssignaler hver 0,5 °C frem til temperaturen hadde nådd 85 °C, til sammen ble det gjort målinger fra 107 forskjellige temperaturer. qPCR instrumentet tok i bruk alle deteksjonskanalene, som førte til at hver reaksjon fikk 5 smeltekurver, en per fluorofor (ROX, FAM, Cy5, Quasar og HEX).

Positive probe-signaler observeres som distinkte negative topper i smeltekurvene. Det er forventet å finne probe-signaler ved dupleksernes teoretiske smeltetemperatur som er oppgitt i tabell 1. qPCR-instrumentet produserer smeltekurver som viser den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring.

2.3 Vurdering av sekvensdesignet til markeringsprobene

Sekvensdesignet til MP-ene skulle undersøkes for å vurdere om det var uønsket interaksjon dem imellom. OligoAnalyzerTM Tool (Integrated DNA Technologies) ble tatt i bruk for å undersøke sekvensdesignet til MP-ene. Det ble sjekket om MP-ene kunne danne hetero-dimer, hairpin-struktur og annen selv-hybridisering.

Et LAD-forsøk ble satt opp for å undersøke interaksjon mellom MP-par. Hver prøvereksjon skulle inneholde to ulike MP, til sammen ble 15 MP-par undersøkt. Vedlegg C viser hvilke MP som ble testet mot hverandre. Markeringsreaksjonen ble preparert med total reaksjonsvolumet på 25 ul. Det ble ikke tilsatt templat i markeringsreaksjonen, i stedet ble 3,4 ul av to ulike MP (1 uM) ble tilført i hvert prøverør. De resterende reagensene var 1X buffer C, 0,3 U/ul HOT TERMIpol DNA polymerase, 1 mM MgCl₂ og 0,8 uM ddCTP-DYQ660. Markeringsreaksjonen ble utført med termosyklus-programmet beskrevet i delkapittelet 2.1.1.

Etter markeringsreaksjon ble 20 ul av reaksjonsvolumet tilsatt 0,9 ul RP-blanding (15 RP og QRP med 10 uM) og 0,27 ul QMP (10 uM). Hver reaksjon inneholdt 1% SDS og 5 mM MgCl₂. Smeltekurveanalysen ble utført i CFX96TM Touch Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) med qPCR-programmet beskrevet i delkapittel 2.1.2. Det ble gjort observasjoner av smeltekurvene, for å se etter uforventede negative topper som kunne indikere hetero-dimer fra MP-par.

2.4 Validere prober opp mot målbakterier

Et multipleks LAD-forsøk ble satt opp for å utforske probenes evne til å detektere målsekvenser. Det ble utvalgt 63 forskjellige bakterieisolater fra GAs samling av ferdigpreparerte mikrobeisolater. De utvalgte bakterieisolatene dekket mesteparten av probenes målbakterier, med unntak av målbakteriene til P1 og P5. For å enklere kunne utføre en LAD multipleks ble det preparert probeblandinger. Det ble laget en MP-probeblending

med 14 ulike MP-er og en RP-probeblending med 14 RP-er og QRP. Det ble valgt å ekskludere probene som detekterte *Actinomycetia* (P10) fra probeblendingene i dette forsøket.

For markeringsreaksjon ble det preparert reaksjonsrør med 25 ul totalt reaksjonsvolum. Hver reaksjon inneholdt 1,03 uM ddCTP-DYQ660, 1X buffer C, 0,3 U/ul HOT TERMIpol DNA polymerase, 1 mM MgCl₂, 7,2 ul MP-probeblending (10 uM) og 10 ul templat. Det ble i tillegg preparert tre NKer med 10 ul destillert vann istedenfor templat. Markeringsreaksjon ble utført med termosyklus-programmet beskrevet i delkapittel 2.1.1. Hver dissosiasjonsreaksjon inneholdt 1,2 ul RP-probeblending (10 uM), 0,4 ul QMP (10 uM), 0,1% SDS og 5 mM MgCl₂. Smeltekurveanalysen ble utført i CFX96™ Touch Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) med qPCR-programmet som beskrevet i delkapittel 2.1.2.

For å lage en oversiktlig visualisering av smeltekurvene (FAM, ROX, Cy5 og Quasar) ble dataene bearbeidet med statistiske metoder i Microsoft Excel. Det ble utført sentrering («centering») og glatting («flattening») av rådataene til smeltekurvene. Sentrering ble gjort for å fjerne eventuelle systematiske forskjeller i dataene, slik at de faktiske mønstrene i smeltekurvene ble tydelige. Sentrering ble gjort ved å trekke gjennomsnittet av hvert datapunkt. Dette transformerte dataen slik at gjennomsnittet ble nært null. Glatting ble gjort for å redusere støy i dataene og enklere kunne observere større trender. Glatting av data ble utført ved å utregne gjennomsnittet fra fire NKer i hver temperaturmåling. Dette gjennomsnittet ble trukket fra hvert datapunkt i gitt temperaturmåling.

Observasjoner av negative topper i smeltekurvene ble gjort for å finne probenes evne til å detektere forventede bakterieisolater. Tydelige negative topper ved probenes forventede smeltetemperatur ble tydet som positive LAD-signaler. De positive LAD-signaler fra dette muliplekse LAD-forsøket ble brukt for å finne probenes spesifisitet og sensitivitet. Formelen som ble brukt for utregning av spesifisitet og sensitivitet vises nedenfor (Trevethan 2017):

$$\text{Sensitivitet} = \frac{\text{antall sanne positive}}{\text{antall sanne positive} + \text{antall falske negative}} * 100$$

$$\text{Spesifisitet} = \frac{\text{antall sanne negative}}{\text{antall sanne negative} + \text{antall falske positive}} * 100$$

2.5 Spyttanalyse

2.5.1 Prøvetakning

Det ble innhentet spyttprøver fra 22 frivillige donorer og hver person donerte 3 ulike spyttprøver. Til sammen ble det opparbeidet en samling på 66 spyttprøver. Hver donor fikk utdelt en prøvetakningsprotokoll med detaljerte instruksjoner og det nødvendige utstyret til spyttinnsamlingen. Prosedyren bestod av tre prøvetakninger: en før tannbørsting, en etter tannbørsting og en etter munnskyll. Den første prøvetakningen skulle utføres to timer etter middag. Umiddelbart etter den første prøvetakingen skulle tenner og tunge pusses i 2,5 minutter med Colgate sugar acid neutralizer tannkrem, deretter skylles munnen tre ganger med vann. Den andre prøvetakning ble utført 5 minutter etter skylling. Til slutt skulle munnen skylles med Listerine i 30 sekunder. Munnen skylles 3 ganger med vann, etter 5 minutter kan den siste prøvetakning utføres. Spyttstrømmen skulle bli oppfanget i et Falcon™ (Corning) rør. Med en Pasteur-pipette ble 1 ml saliva overført til et eNAT™ (Copan Diagnostics) rør med 2 ml buffer med conserveringsmedium for nukleinsyre. Saliva skulle homogeniseres med bufferen før lagring på 5 °C til videre prosessering.

2.5.2 Ekstraksjon

Templat preparasjon ble utført i henhold til GAs etablerte ekstraksjonsprotokoll for fekale prøver. Under ekstraksjonsprosessen ble det brukt reagenser fra ekstraksjonssettet mag™ maxi (LGC Biosearch Technologies). Ekstraksjonsprosessen var bestående av mekanisk lysis, kjemisk lysis og magnetisk separasjon av produktene. Saliva ble overført til MP Biomedicals Lysing Matrix E rør med keramiske, glass og silika kuler. Mekanisk lysis ble oppnådd med kraftig risting i FastPrep-96™ (MP Biomedicals) på 1800 rpm i 40 sekunder i to intervaller med 40 sekunder pause. Prøverørene ble så sentrifugert på 3500 rpm i 5 minutter, deretter overført til en 96 deep well plate. To NKer ble tillaget med lysis buffer BLM istedenfor spyttprøve. Kjemisk lysis ble oppnådd via varmebehandling med protease på 65 °C i 15 minutter. Siste del av ekstraksjonsprosessen ble utført i en magnetisk separator med automatisk rensing, kalt MagMAX™ Express 96 (Thermo Fisher Scientific). Ekstraksjonen var bestående av flere rensetrinn som utføres i multibrønnplater. Multibrønnplatene ble tilført reagenser fra mag™ maxi ekstraksjonssettet. De lyserte prøvene overføres til en preparert 96 deep well plate preparert med MagMax™ partikler og etanol. Platene plasseres i MagMAX™ Express 96 (Thermo Fisher Scientific) som renser prøvene med et ferdiginnstilt program fra

GA. Programmet renser lysatet en gang med vaskebuffer 1 og to ganger med vaskebuffer 2, til slutt frigjøres rensset gDNA i elueringsbuffer.

2.5.3 Amplifikasjon

Før videre prosessering ble det lagd en 1:5 fortykning av ekstraherte spyttprøver og NKer med destillert vann. Det skulle utføres en PCR-amplifikasjon av 16S rRNA genet til fortynnende prøvene. Hver PCR-reaksjon skulle inneholde PCR mastermiks, polymerase og DNA templat. Reagensene i mastermiksen var bestående av 1X B1 buffer, 2,5 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTP, 1,25 μM GA-mapTM forwardprimer og 1,25 μM GA-mapTM reverseprimer. 19,25 ul mastermiks, 0,75 ul GA-map[®] PCR polymerase og 5 ul gDNA ble til sammen totalvolum per brønn ble 25 ul. Det ble i tillegg lagd to NKer ved å blande mastermiks og polymerase med 5 ul destillert vann. gDNA ble amplifisert i Applied Biosystems VeritiTM 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). PCR programmet startet med 95 °C i 15 minutter, deretter begynte 30 sykluser med denaturering-, forlengelse- og elongeringstrinn. Denatureringstrinnene var på 95 °C i 30 sekunder, hvert forlengelsestrinn var 55 °C 30 sekunder og elongeringstrinnene var 72 °C i 1 minutt og 20 sekunder. Programmet avsluttet med en elongering på 72 °C i 7 minutter.

2.5.4 Kvantifikasjon

Det ble utført en kvantifikasjon for å undersøke konsentrasjonen av amplifisert DNA. Kvantifikasjon ble utført med Quant-iT 1X dsDNA HS (high sensitivity) Assay settet og InvitrogenTM QuBit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). 2 ul amplifisert DNA ble preparert med Load Working Solution før konsentrasjonen ble målt.

2.5.5 ExoSAP rensing

Det ble utført en enzymatisk rensing av det resterende PCR-produktet. ExoI/rSAP blanding var bestående av 20 U/ml Exonuclease I (ExoI) produsert av New England Biolabs og Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) produsert av ArcticZymes. Volum av ExoI og rSAP ble justert utafra antall prøver og prøvevolum. Det ble tilført 7,36 ul SAP (1U/ul) og 0,15 ul ExoI (20U/ul) per reaksjon. Opprensingen utføres i Applied Biosystems VeritiTM 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) med et program som starter på 37 °C i 1,5 timer og ender med 80 °C i 15 minutter.

2.5.6 LAD-basert oral mikrobiota test

Det skulle utføres 70 separate LAD-reaksjoner: 66 reaksjoner med DNA templatere og 4 NKer. Det ble lagd RP- og MP-probeblending likt som beskrevet i delkapittel 2.3. P10 ble også ekskludert fra probeblendingene i dette LAD-forsøket.

For å utføre markeringsreaksjon ble følgende komponenter tilført i hver reaksjon: 10 ul preparert templat (eller NK), 7,2 ul MP-blanding (10 uM), 1,03 uM ddCTP-DYQ660, 1X buffer C, 0,3 U/ul HOT TERMIpol DNA polymerase og 1 mM MgCl₂. Hver reaksjon skulle ha et totalt reaksjonsvolum på 25 ul. Markeringsreaksjon ble utført med termosyklusprogrammet beskrevet i delkapittel 2.1.1. Etter markeringsreaksjon ble det preparert til dissosiasjonsreaksjon med: 1,2 ul RP-blanding (14 RP-er og QRP med 10 uM), 0,4 ul QMP (10 uM), 0,1% SDS og 5 mM MgCl₂. 20 ul av markeringsreaksjonsvolum ble overført til dissosiasjonsreaksjon, totalt reaksjonsvolum ble 40 ul. Smeltekurveanalysen ble utført som beskrevet i delkapittel 2.1.2. For å forsikre at alle bobler i prøverørene var fjernet ble smelteanalysen kjørt en ekstra gang.

2.5.7 Databehandling og visualisering av positive LAD-signaler

For å lage en oversiktlig visualisering av LAD-signaler fra dette forsøket, ble rådataene fra smeltekurvene (FAM, ROX, Cy5 og Quasar) bearbeidet ved hjelp av statistiske metoder i Microsoft Excel. Det ble først utført sentrering og glatting av smeltekurvedataene til ROX og FAM, som beskrevet i delkapittel 2.4.

NKer ble brukt for å sette deteksjonsgrenser for probenes positive signaler. Hver probe fikk en individuell grense satt ved å bruke de minste NK-verdiene innenfor probens forventede smeltetemperaturområdet. Gjennomsnittet til NK-verdiene ble ansett som verdien for ingen signal, og grensen ble satt tre ganger standardavviket. Data som kom under denne grensen, ble ansett som positive signaler. Positive LAD-signaler har negative verdier i smeltekurver. Alle dataene multiplisert med -1 for å best kunne visualisere positive signaler.

3 Resultater

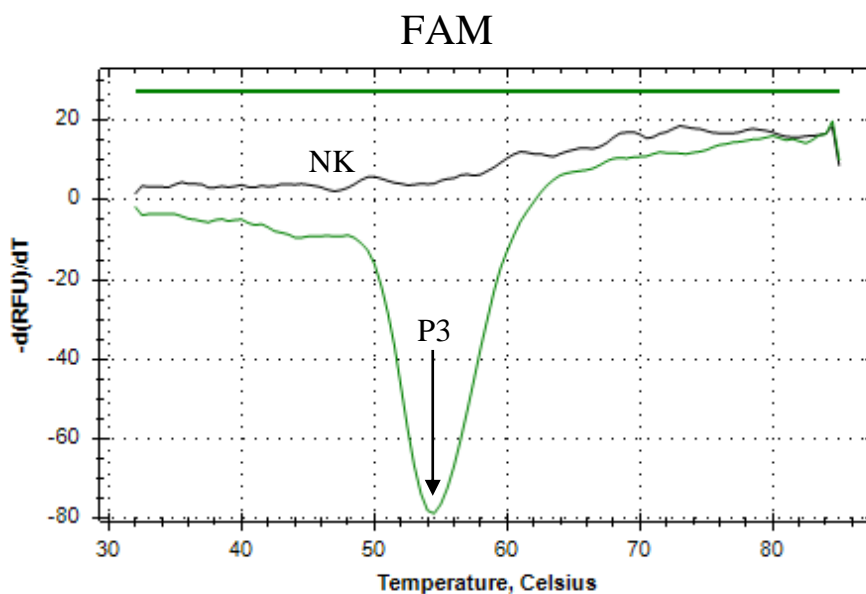
3.1 Vurdering av probepar i separate LAD-reaksjoner

Et unipleks LAD-forsøk ble utført for å undersøke hvert enkelt probepar i separate prøvereksjoner. Resultater fra dette forsøket skulle gi innsikt i probenes ytelse og eventuelle utfordringer, samt sikre at probene fungerte optimalt før videre analysering.

3.1.1 Vurdering av markeringskontroll-prober som templat

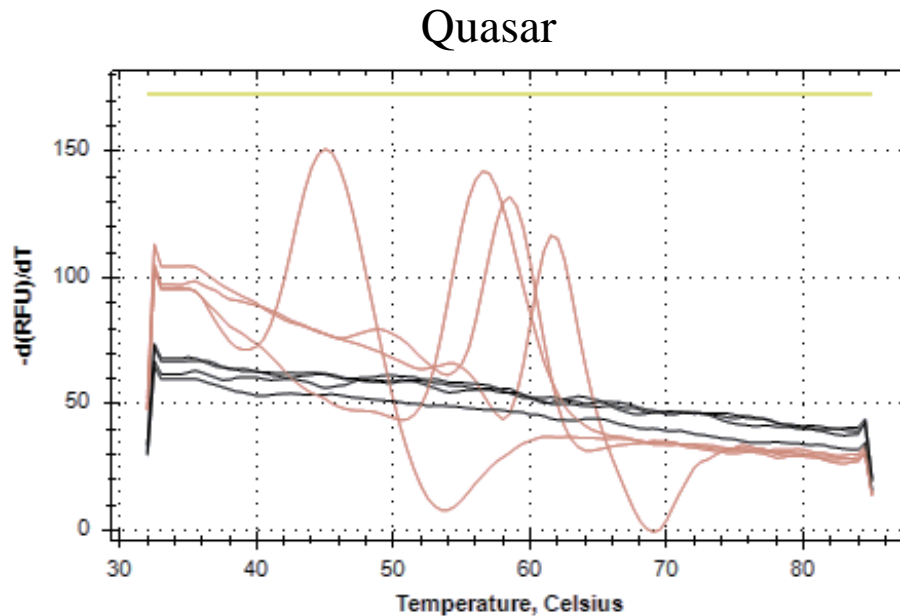
Resultatene fra LAD-forsøket skulle kontrollere hvordan Mkon-ene virket som templat. Probenes funksjon ble vurdert ved å studere smeltetemperaturene til MP-RP dupleksene. Observasjoner fra smeltekurvene (FAM, ROX, Cy5 og Quasar) viste at smeltetemperaturene for dupleksene var nær de forventede temperaturene. Vedlegg D viser de observerte smeltetemperaturene fra alle smeltekurvene i dette forsøket.

Et eksempel på en smeltekurve med tydelig positivt LAD-signal er presentert i figur 7. Figuren viser smeltekurvene for P3 presentert i FAM-grafen. Grønn smeltekurve viser en tydelig negativ topp som representerer positivt signal fra prøvereksjonen med Mkon. Smeltekurven viste negativ topp rundt 54°C, som er 6 grader lavere enn den teoretiske smeltetemperaturen.



Figur 7: FAM-grafen viser en smeltekurve med et tydelig positivt LAD-signal nær forventet T_m til P3. Den grønne kurven representerer reaksjon med P3 og tilhørende Mkon, mens den svarte kurven representerer negativ kontroll. Den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) er plottet på y-aksen.

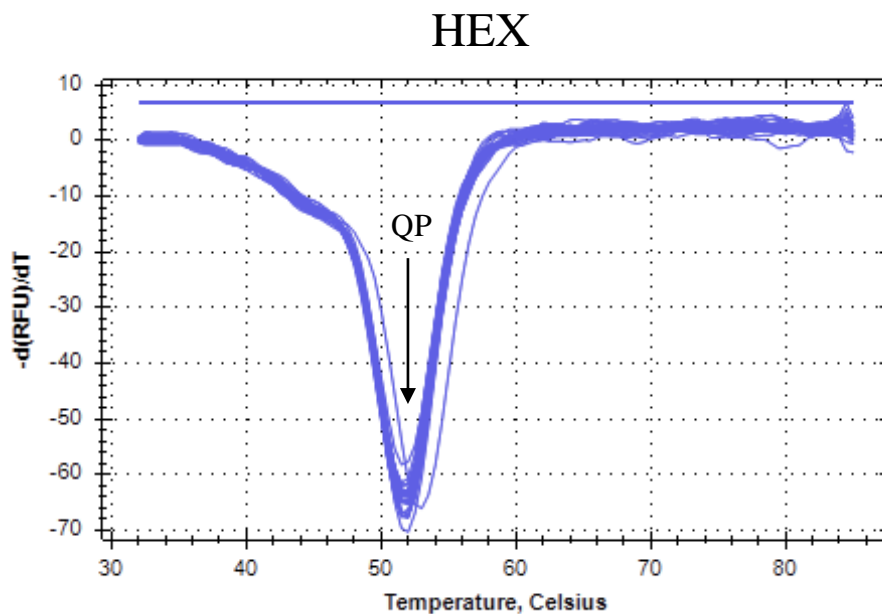
Mange prøvereaksjoner fra dette forsøket hadde smeltekurver med utydelige LAD-signaler. LAD-signalene i Quasar-grafen, vist i figur 8, var spesielt vanskelige å avlese. De negative kontrollene, prøvereaksjonene uten Mkon, viste jevne smeltekurver uten tydelige positive eller negative toppen. Mens prøvereaksjonene som inneholdt Mkon hadde både negative og positive toppen, noe som gjorde avlesning av probeparenes smeltetemperaturer utfordrende.



Figur 8: Quasar-grafen viser LAD-signaler fra 8 smeltekurver: 4 oransje kurver (prøver med Mkon) og 4 svarte kurver (tilhørende NKer). På y-aksen er den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) plottet.

3.1.2 Vurdering av quenchingkontroll-prober

I figur 9 presenteres HEX smeltekurvene for alle reaksjonene med QP. Det ble observert tydelige positive LAD-signaler i hver reaksjon der QP var til stede. Figur 9 viser at alle smeltekurvene hadde negativ topp nær 52°C, som er 4°C lavere enn teoretiske smeltepunkt. Det ble i tillegg lagt merke til at QP ikke krevde like høy konsentrasjon som de andre probene for å oppnå tilstrekkelig LAD-signaler.



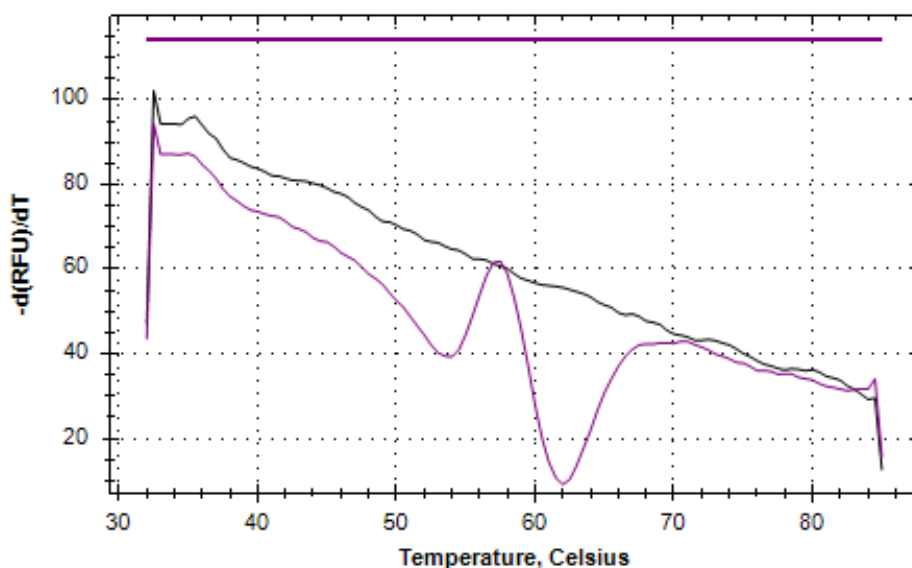
Figur 9: HEX-grafen viser smeltekurvene til 30 prøver med quenchingkontroll-probepar (QP). Den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) er plottet på y-aksen.

3.1.3 Falsk positiv quenching

Resultatene fra unipleks LAD-forsøket viste at noen prober muligens kan gi falsk positiv quenching (FPQ). Observasjoner av flere negative topper kan indikere uønskede interaksjoner mellom probene, noe som kan gi opphav til FPQ. Flere toppe ble observert fra smeltekurvene til P2, P7 og P10, som var designet for å detektere *Streptococcus* ssp., *Neisseria* ssp. og *Actinomyces*. I vedlegg E vises smeltekurver med flere toppe fra prøvene med P2 og P7.

Cy5-grafen i figur 10 viser resultatet fra uniplekse LAD-reaksjoner med P10. Den lilla smeltekurven representerer en prøve med Mkon, mens den svarte viser tilhørende NK. To negative toppe ble observert på den lilla kurven, noe som kan indikere tilstedeværelse av FPQ.

Cy5

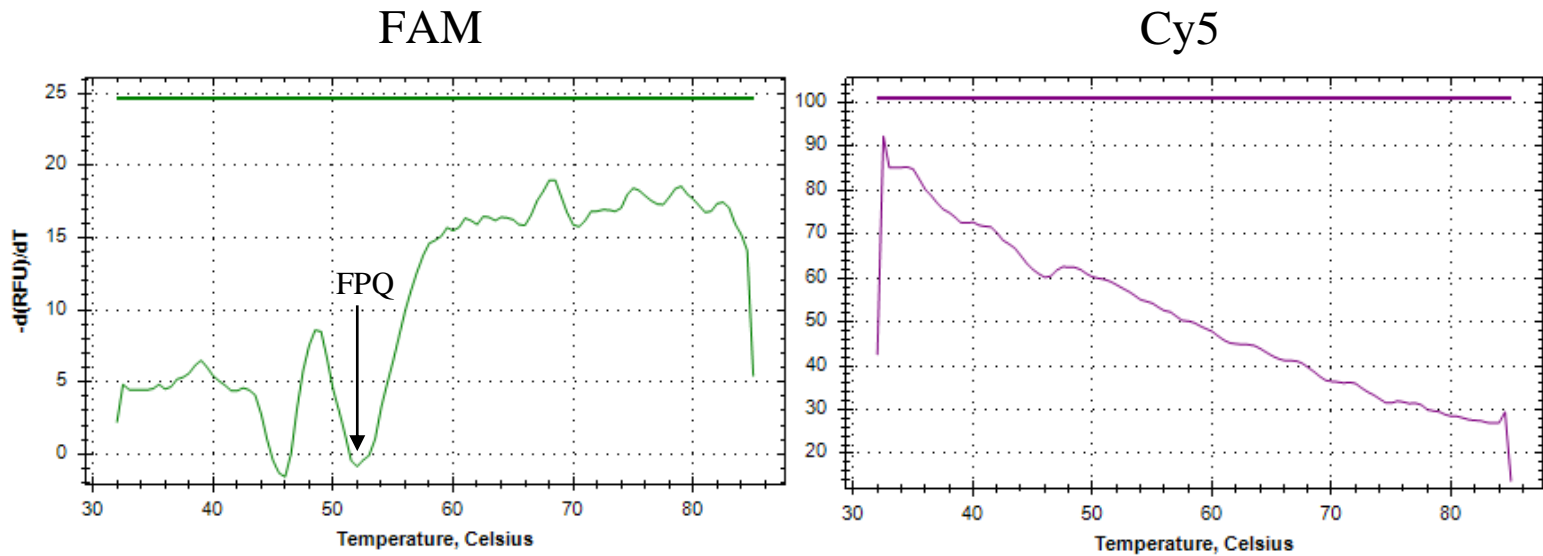


Figur 10: Cy5-grafen viser smeltekurver fra prøver med P10. Lilla kurve representerer prøven med Mkon og viste uforventet LAD-signal. Kurven markert svart representerer negativ kontroll. Den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) er plottet på y-aksen.

3.2 Vurdering av sekvensdesignet til markeringsprobene

Med bruk av OligoAnalyzer™ Tool ble det oppdaget at det var svært usannsynlig at MP-ene kunne danne noen form for selv-hybridisering og hairpin-strukturer. Hovedfokuset under analysen ble derfor å finne MP-par som potensielt kunne danne hetero-dimer under LAD-prosessen. MP-ene som hadde vist antydning til FPQ i uniplekse LAD-reaksjoner ble testet mot resten av MP-ene. 15 ulike MP-par, vist i vedlegg C, utpekte seg som de mest sannsynlige kombinasjonene for hetero-dimer dannelse.

Det ble satt opp et LAD-forsøk for å undersøke interaksjoner mellom de utvalgte MP-ene. MP2, MP7 og MP10 ble testet mot MP-er som de hadde størst sjanse for å hybridisere med. Hetero-dimer dannelse kunne oppdages ved observasjoner av uventete negative toppe fra smeltekurvene (FAM, ROX, Cy5 og Quasar). Det ble oppdaget flere smeltekurver med distinkte negative toppe rundt samme temperaturområdet, ofte forårsaket av systematiske feil under måling. Funn fra reaksjonsprøven med P10 og P3 utskilte seg fra resten av smeltekurvene, da det ble oppdaget en negativ topp som ikke gjentok seg i samtlige smeltekurver. I figur 11 vises FAM- og Cy5-smeltekurvene fra reaksjonsprøven som inneholdt P10 og P3. Det ble oppdaget en negativ topp ved 52°C i FAM-grafen som ikke gjentok seg i Cy5-grafen. Denne negative toppen kan ha indikert heterodimer dannelse og FPQ.



Figur 11: Grafene viser smeltekurver fra prøven med P3 og P10. FAM-grafen viser eventuelle LAD-signaler fra RP3, mens Cy5-grafen viser fra RP10. Den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) er plottet på y-aksen.

3.3 Validere prober opp mot renkultur av målbakterier

3.3.1 Probens deteksjonsytelse i multiplekse reaksjoner

Resultatene fra multipleks LAD-førsøket ble bruk til å lage oversikten i tabell 2. Oversikten viser hvilke bakterieisolater som ble oppdaget av hver probe. Totalt ble 63 ulike bakterierenkulturer testet, inkludert flere stammer av samme art. De opprinnelige stammenavnene ble ikke oppgitt i utlevert materiale fra GA, bakteriestammene ble derfor nummerert for å skille dem fra hverandre. De avkryssede boksene indikerer positive LAD-signaler. Resultatene i tabell 2 ble utarbeidet fra smeltekurvene vist i vedlegg F.

Tabell 2 viser at mesteparten av probene detekterte de forventede bakterieartene de var designet for å oppdage. P2, P4, P8, P9, P11, P12, P14 og P15 hadde vellykket deteksjon av alle sine forventede bakterieisolater. Probene som var designet for å detektere en bakterieart med to stammer klarte å oppdage begge stammene. P1, P3 og P5 oppdaget ingen signaler fra noen av målbakteriene. P1 og P5 hadde ingen bakteriemål til stede i dette forsøket. Deteksjon med P3 skulle vært bredt dekkende for bakteriearter innen klassen Bacilli, som inkluderer *Streptococcus*. Ingen *Streptococcus* bakteriearter ble oppdaget med dette probeparet.

Tabell 2: Oversikten viser probenes deteksjonstest i multiplekse reaksjoner. Bakteriartene som probene var designet for å detektere er markert med blå. Grå bokser indikerer ikke forventet deteksjon. Kryss indikerer bakteriartene som probene faktisk detekterte i dette forsøket. Stammenummer er egnetfjernet.

15	14	13	12	11	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Probepar	
														Forventet målbakterie	
															Bifidobacterium adolescentis
															Bifidobacterium angulatum
															Bifidobacterium animalis ssp. lactis
															Bifidobacterium breve (stamme 1)
															Bifidobacterium breve (stamme 2)
															Bifidobacterium catenulatum
															Bifidobacterium dentium
															Bifidobacterium gallicum
															Bifidobacterium pseudocatenulatum
															Fusobacterium gonidiaformans
															Fusobacterium mortiferum
															Fusobacterium necrophorum ssp. necrophorum
															Fusobacterium nucleatum
															Fusobacterium periodonticum
															Fusobacterium ulcerans
															Fusobacterium varium
															Haemophilus influenzae (stamme 3)
															Haemophilus influenzae (stamme 4)
															Haemophilus parainfluenza (stamme 5)
															Haemophilus parainfluenza (stamme 6)
															Haemophilus paraphrophilus
															Neisseria subflava
															Peptostreptococcus stomatis
															Porphyromonas gingivalis
															Prevotella amnii
															Prevotella bivia (stamme 7)
															Prevotella bivia (stamme 8)
															Prevotella buccae
															Prevotella buccalis
															Prevotella copri
															Prevotella corporis
															Prevotella disiens
															Prevotella marshii
															Prevotella melaninogenica
															Prevotella nigrescens
															Prevotella oralis
															Prevotella oris
															Prevotella stercorea
															Prevotella tanneriae
															Prevotella timonensis
															Prevotella veroralis
															Prevotella zooglyphiformans
															Propionibacterium acidipropionici
															Rothia dentocariosa
															Ruminococcus albus
															Streptococcus agalactiae
															Streptococcus anginosus
															Streptococcus equinus
															Streptococcus infantarius
															Streptococcus mitis
															Streptococcus oralis
															Streptococcus pneumoniae (stamme 9)
															Streptococcus pneumoniae (stamme 10)
															Streptococcus pyogenes (stamme 11)
															Streptococcus pyogenes (stamme 12)
															Streptococcus salivarius ssp. thermophilus
															Streptococcus sanguinis (stamme 13)
															Streptococcus sanguinis (stamme 14)
															Veillonella atypica (stamme 15)
															Veillonella atypica (stamme 16)
															Veillonella dispar (stamme 17)
															Veillonella dispar (stamme 18)
															Veillonella parvula

* Forkortelse for probens målbakterie, se tabell 1 for mer informasjon om probenes målbakterier.

3.3.2 Probenes spesifisitet og sensitivitet

Resultatene fra multipleks LAD-førsøket, oppsummert i tabell 3, ble brukt for å finne probenes spesifisitet og sensitivitet. Tabell 3 viser probenes evne til å korrekt identifisere sanne negative resultater (spesifisitet) og sanne positive resultater (sensitivitet). I dette forsøket detekterte ingen prober noen uforventete bakteriearter. Alle probene hadde dermed en høy spesifisitet på 100 prosent, inkludert P2 og P5. Det ble også oppdaget at ni probepar hadde en høy sensitivitet, over 87 prosent. Prosentverdiene i tabell 3 viser at P3, P6 og P13 hadde en lav sensitivitet sammenlignet med resten av probene. Sensitiviteten til P1 og P5 kunne ikke beregnes siden de ikke ble testet mot sine egne målbakterier.

Tabell 3: Oversikt over probenes sensitivitet og spesifisitet. Prosentverdiene ble utregnet med LAD-resultatene fra tabell 2.

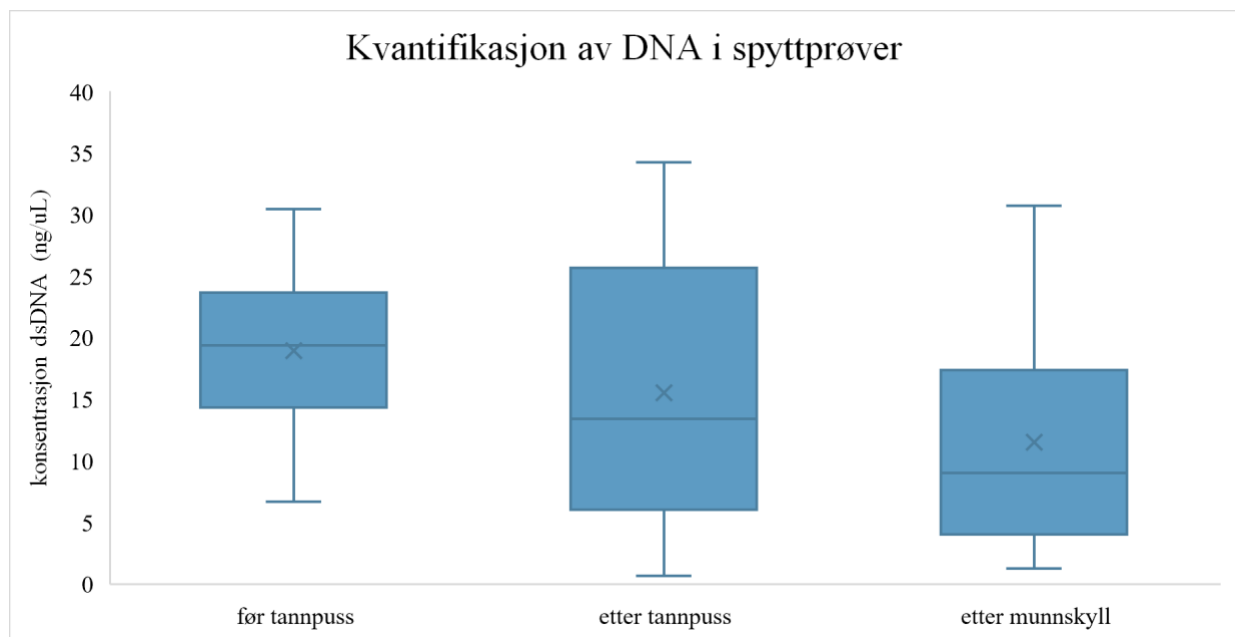
Probepar	Probenes målbakterier	Sensitivitet (%)	Spesifisitet (%)
P2	<i>P. pastei</i>	N/A	100
P2	<i>Neisseria</i>	100	100
P3	Bacilli	0	100
P4	<i>Bifidobacterium</i>	100	100
P5	<i>P. acidifaciens</i>	N/A	100
P6	<i>Haemophilus</i>	40	100
P7	<i>Streptococcus</i>	87,5	100
P8	<i>V. atypica</i>	100	100
P9	<i>V. dispar</i> og <i>V. parvula</i>	100	100
P11	<i>Prevotella</i>	100	100
P12	<i>S. sanguinis</i>	100	100
P13	<i>S. mitis</i>	50	100
P14	<i>S. salivarius</i>	100	100
P15	<i>Fusobacterium</i>	100	100

3.4 Spyttanalyse

3.4.1 Qubit kvantifisering

Før videre analysering skulle DNA mengden i spyttprøver og negative kontroller undersøkes via Qubit-målinger. Funn fra denne kvantitative undersøkelsen viste at det var DNA i alle 66 spyttprøvene, mens de fire negative kontrollene hadde ikke-detekterbare DNA mengder (<1 ng/uL). En oversikt over spyttprøvenes tilgjengelige DNA konsentrasjon presenteres i figur 12. Etter hver rensebehandling ble det observert en reduksjon av DNA konsentrasjon.

Gjennomsnittlig DNA konsentrasjonen fra 23 prøver var 19 ng/uL før tannpuss, 16 ng/uL etter tannpuss og 12 ng/uL etter munnskyll. Det var stor variasjon mellom prøvene fra samme rensebehandling, særlig etter tannpuss.



Figur 12: Plottet viser median, gjennomsnitt og interkvartilområde av dsDNA konsentrasjon til spyttprøvene tatt før tannpuss, etter tannpuss og munnskyll.

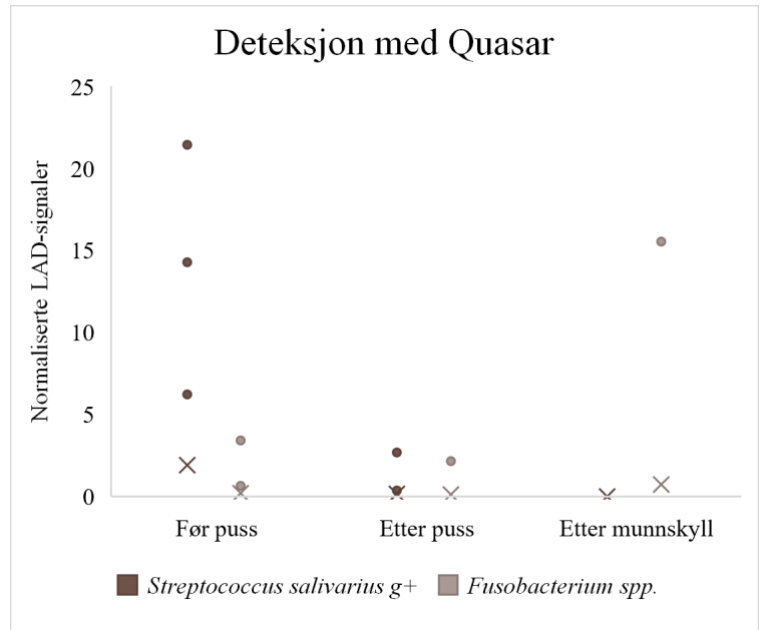
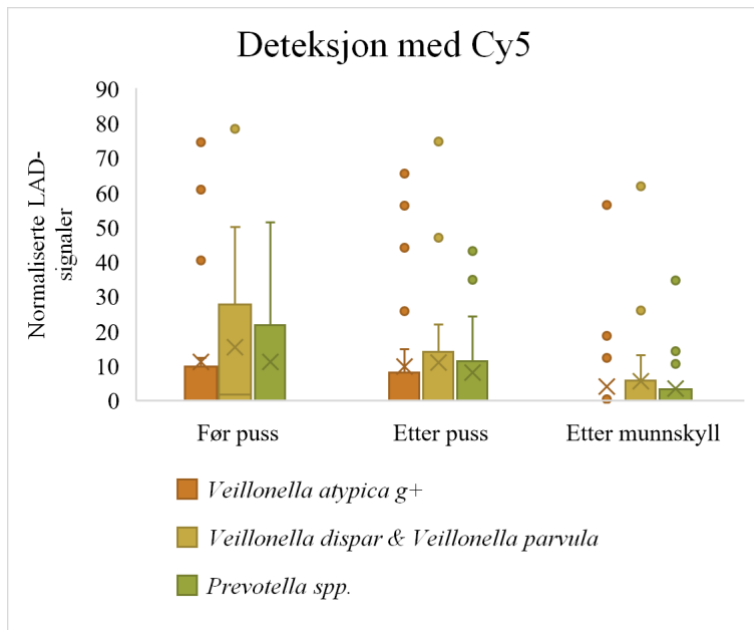
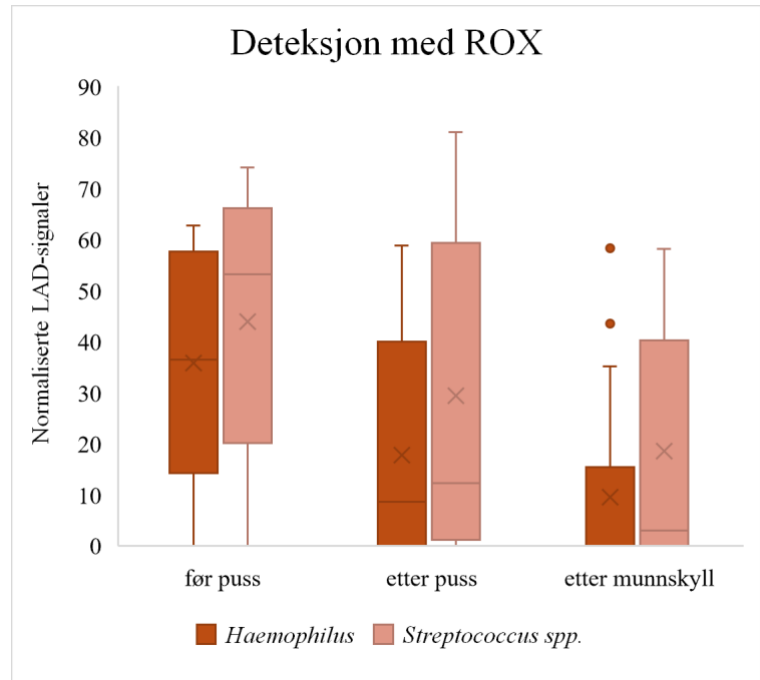
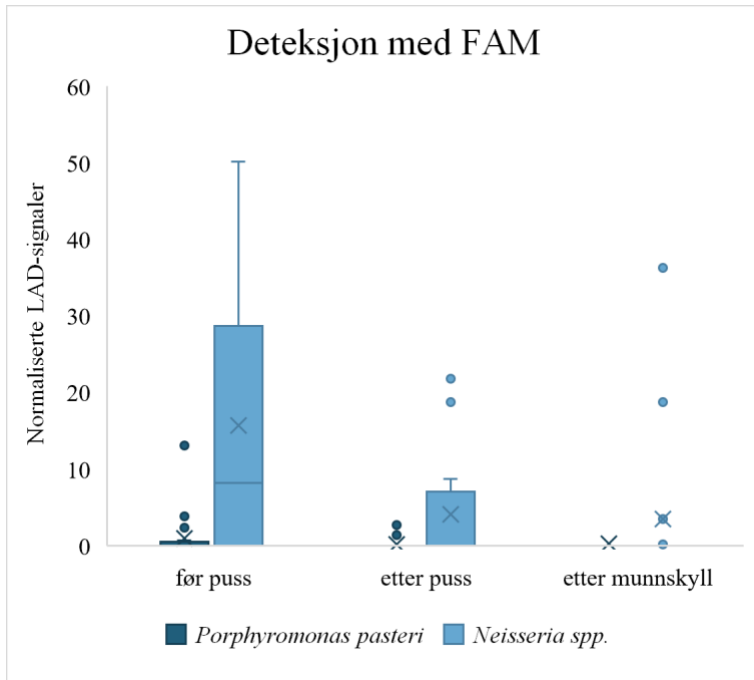
3.4.2 LAD-basert oral mikrobiota test

Resultatene fra det siste multipleks LAD-forsøket er presentert i de fire plottene i figur 13. Plottene viser normaliserte LAD-signaler fra 66 spyttprøver, detektert med de fluorescerende forbindelsene FAM, ROX, Cy5 og Quasar. Dataen som ble brukt til å utarbeide plottene er vist i vedlegg G.

Figur 13 viser at 9 probepar ga positive LAD-signaler i spyttprøvene. Målbakteiene som ikke ble oppdaget under dette forsøket var Bacilli, *Propionibacterium acidifaciens*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Bifidobacterium*. Det ble observert en generell trend over alle plottene, der gjennomsnittlig LAD-signaler ble redusert etter hver rensebehandling.

I plottet med FAM smeltekurveresultater ble det oppdaget langt flere LAD-signaler fra *Neisseria spp.* enn fra *Porphyromonas pasteri*. Det ble også vist at detektere *Neisseria spp.* LAD-signaler varierte betydelig mellom spyttprøvene før tannpuss. Etter tannpuss viste derimot spyttprøvene mindre variasjon, samt en betydelig reduksjon i deteksjon av *Neisseria spp.* sammenlignet med prøvene før tannpuss. I ROX-plottet ble det observert en relativt høy forekomst av bakteriearter fra både *Streptococcus* og *Haemophilus*.

For de fleste målbakteriene i plottene FAM og ROX ble gjennomsnittlige LAD-signaler fra spyttprøvene før tannpuss halvert i spyttprøvene etter tannpuss. Sammenlignet med *Haemophilus* og *Neisseria spp.* viste *Streptococcus* mindre variasjon mellom rensebehandlingene før og etter tannpuss. Målbakteiene i Cy5-plottet hadde også variasjon mellom rensebehandlingene, men ikke like tydelig som målbakteiene i FAM og ROX plottene. Hver målbakterie i Cy5-plottet har stor variasjon i LAD-signaler, dette vises som mange uteliggende data («outliers»). Quasar-plottet viser betydelig lavere LAD-signaler i forhold til de andre plottene. Lave LAD-signaler gjør det utfordrende å tyde noen klare mønstre. I Quasar-plottet ble det i tillegg observert flere uteliggende dataverdier som hadde svært høye verdier sammenlignet med gjennomsnittlige LAD-signaler.



Figur 13: Plottene viser median, gjennomsnitt og interkvartilområde av normaliserte LAD-signaler fra spyttprøver. Spyttprøvene ble gruppert ut ifra rensebehandling. Probenes målbakterier er fordelt i fire plott og skilt fra hverandre ved hjelp av kolonrefargene. Normaliserte LAD-signaler, utledet fra fluorescensderivat-data, vises i y-aksen. g+ er en forkortelse for flere slekter inkludert. Dataene i FAM- og ROX-plottet var bearbeidet via glatting og sentring.

4 Diskusjon

4.1 Vurdering av probenes ytelse

I denne oppgaven ble probe-basert LAD teknologi brukt for å studere oral mikrobiota. For å oppnå nøyaktighet og pålitelighet identifikasjon av målbakterier var det viktig å ta hensyn til probenes ytelse. Validering og feilsøking av prober ble derfor en nødvendig del av denne oppgaven. For å sikre konkret bakterieidentifikasjon i spyttanalysen skulle det etableres et probe-sett med god ytelse, hvor probenes spesifisitet ble satt i fokus.

4.1.1 Prober egnet for LAD-basert test

Mesteparten av probene testet i valideringsforsøket hadde en suksessfull deteksjon av bakterieartene de var designet for å oppdage. Selv om noen prober hadde dårligere evne til å identifisere sine forventede målbakterier, var spesifisiteten til probe-settet meget høy. Fra valideringsforsøket ble det vist at alle probene hadde høy spesifisitet. Probene hadde en god evne til å ikke reagere med uforventede bakteriearter, noe som resulterte i ingen falske positive signaler. Mesteparten av probene detekterte også få falske negative signaler og viste derfor høy sensitivitet. Hele ni probepar viste både høy spesifisitet og sensitivitet. Probene med høy spesifisitet og sensitivitet hadde større sjanse for å gi pålitelig og nøyaktig identifikasjon av tilstedeværelse av målbakterier.

Sensitiviteten til P1 og P5 kunne ikke utregnes, fordi probene ikke ble testet mot sine egne målbakterier. Imidlertid ble det oppdaget at probenes spesifisitet var høy. I tillegg ble det oppdaget at P1 og P5 hadde forventede LAD-signaler uten FPQ i uniplekse reaksjoner. Disse funnene kan samlet sett tyde på at P1 og P5 ikke ville interagere med andre komponenter og var egnet for spyttanalysen.

QP var designet som positiv kontroll for quenching. Resultatene fra det uniplekse LAD-forsøket viste at QP oppnådde ønsket effekt, og at QP var effektive til å påvise quenching ved relativt lave konsentrasjoner. Unipleks LAD-forsøket viste at QP kan være en effektiv og pålitelig quenchingkontroll uten å ha unødvendige høye probe-konsentrasjoner. QP kan brukes for å sikre påliteligheten til LAD-resultatene, da positiv quenchingkontroll styrket troverdighet i tolkning av resultatene.

4.1.2 Prober som ikke virket som planlagt

Oppdagelse og fjerning av problematiske prober var viktig for å etablere et egnet probe-sett til spyttanalysen. Uspesifikke prober har større sjanse for å oppdage uønskede målbakterier og kan gi falsk positive signaler. Probene gjennomgikk en valideringsprosess for å forsikre at hver probe binder spesifikt til tilhørende målsekvens. Resultatene viste at det var flere prober som ikke hadde tilfredsstillende LAD-signaler.

Resultater fra valideringsforsøket viste at P3 ikke oppdaget noen av sine forventede målbakterier. Det ble derfor antatt at P3 hadde en lav sensitivitet. P3 hadde derimot en høy spesifisitet, siden det ikke ble oppdaget noen falske positive signaler. Det ble derfor antatt at P3 kunne bli inkludert i spyttanalysen uten å introdusere falsk positive signaler. Resultatene fra spyttanalysen viste at P3 heller ikke oppdaget noen bakteriearter fra spyttprøvene. Samlet sett kan resultatene tyde på at P3 ga ikke ønsket signaler til forventet målbakterie. Til fremtidig forskning kunne det vært fordelaktig å designe et nytt probeparet for deteksjon av Bacilli.

Resultatene fra det uniplekse LAD-forsøket viste at Mkon-ene ikke virket som planlagt. Det var mye støy og uforventet topper i smeltekurvene, som gjorde LAD-signaler vanskelige å tyde. LAD-signaler fra Quasar-smeltekurverene var spesielt vanskelig å tyde, da uforventede positive topper forstyrret avlesningen. Disse utydelige LAD-signalene er sannsynlig forårsaket av uønsket interaksjoner fra Mkon-ene under dupleksformasjon. Mkon-ene kan ha forstyrret LAD-prosessen ved å hybridisere med komponenter under dupleksformasjon. Denne interaksjonen kunne blitt unngått dersom Mkon-ene hadde blitt fjernet fra prøvereaksjonene etter markeringsreaksjon.

Det ble allikevel utarbeidet nyttig informasjon fra det uniplekse LAD-forsøket, selv om Mkon-ene hadde uønskede interaksjoner. De fleste MP-RP dupleksenes smeltetemperatur ble observert fra de uniplekse reaksjonene med Mkon som templat. Disse resultatene viser at de fleste Mkon utførte sin rolle som templat og var suksessfull til å hybridisere med tilhørende MP under markeringsreaksjonen. Samlet sett tyder resultatene på at Mkon-ene ikke var egnet som markeringskontroll. Ytterligere vurderinger og redesign vil være nødvendig før Mkon kan brukes i LAD-baserte tester.

Under denne oppgaven ble det utført flere undersøkelser for å finne problematiske prøber med upålitelige LAD-signaler. Fra disse undersøkelsene ble det oppdaget at P2, P7 og P10 ga uforventede signaler i uniplexe LAD-reaksjoner. Det var kun forventet et positivt LAD-signal per prøvereksjon. Siden det var et probepar til stede i hver prøvereksjon og hvert probepar var designet for å ha en smeltetemperatur. Smeltekurvene til P2, P7 og P10 viste derimot flere negative toppen enn forventet. Flere positive LAD-signaler kan i dette tilfelle indikere FPQ, sannsynligvis forårsaket av uønskede interaksjoner mellom komponentene i prøvereksjonen. Oppdagelse av FPQ tydeliggjorde behovet for feilsøking av probene.

For å sikre at videre LAD-førsøk ble pålitelige skulle MP-er med uønskede interaksjoner oppdages og fjernes. Sekvensdesignene til MP-ene ble undersøkt med OligoAnalyzer™ Tool. En høy sannsynlighet for MP-selvhybridisering ble ikke funnet. Imidlertid ble det oppdaget en relativt stor sjans for at MP10 kunne hybridisere med MP3. I et LAD-førsøk ble det også funnet antydning til interaksjon mellom MP10 og MP3. Denne antydningen ble tatt da smeltekurven til P3 viste en uforventet negativ topp, som kan tolkes som hetero-dimer dannelse. Dersom MP-ene ikke hadde interagert hadde smeltekurve vært jevne uten toppen. De samlede funnene kan tydes som at MP10 kan ha interferert med MP3. For å redusere sannsynligheten for FPQ ble P10 ekskludert fra videre LAD-førsøk.

4.2 Drøfting av funn fra spyttanalysen

4.2.1 Evaluering av ekstraksjonsprotokollen

En utfordring med spyttbaserte tester kan være at spytt har lavere forekomst av biomolekyler sammenlignet med blod og andre prøvematerialer. I denne oppgaven ble det derfor valgt å undersøke spyttets DNA konsentrasjon før videre analysering. Funn fra Qubit kvantifikasjon viste at ekstraksjonsprosessen suksessfullt tilgjengeliggjorde gDNA i spyttprøvene. Dette kan bety at ekstraksjonsprotokollen for fekalt materiale også kan fungere for ekstraksjon av gDNA fra spyttprøver. Spytt er for det meste bestående av vann og inneholder ikke like mye faste materialer som fekale prøver. Celler i spytt kan være enklere å lysere sammenlignet med celler i fekalt materiale. Dette kan bety at spyttanalysens ekstraksjonsprosess ble overdreven for behandling av saliva. Bruk av en saliva-basert ekstraksjonsprotokoll med færre prosessstrinn hadde muligens vært mer tidseffektiv og rimeligere (Lim, Totsika, Morrison, & Punyadeera, 2017).

4.2.2 Bakterieartene oppdaget med LAD-basert test

Probene brukt under dette prosjektet var designet for å detektere bakterier som vanligvis finnes i munnen hos friske individer (Bik et al., 2010). Imidlertid var det også inkludert en probe som kunne detektere bakterier assosiert med oral dysbiose. P15 var designet for å detektere *Fusobacterium* bakteriearter. Deriblant *Fusobacterium nucleatum* som har vært assosiert med orale infeksjoner og dysbiose (Hernández, Mayer, & Santi-Rocca, 2022). Funn fra spyttanalysen viste at det oppdaget få LAD-signaler fra P15. Dette funnet kan ha vist at det var en lav forekomst av *Fusobacterium nucleatum* hos friske individer.

Noen prober var designet for å dekke mange bakteriearter mens andre være mer spesifikt rettet mot en spesifikk art. Det var forventet at de bredt dekkende probene detekterte flere bakterielle komponenter enn prober designet for å detektere få bakteriearter. Funn fra spyttanalysen styrket denne påstanden, da det ble oppdaget mest LAD-signaler fra de bredt dekkende probene (P6 og P7). Ut ifra de normaliserte LAD dataene ble det oppdaget høy forekomst av bakteriearter fra *Streptococcus*, *Haemophilus* og *Neisseria*. Samtidig ble det detekterte få *S. salvarius*, *P. pasteri* og *Fusobacterium* bakteriearter.

4.2.3 Effekten av rensbehandlinger

Det er kjent at tannbørsting og munnskyll har en positiv effekt på oral helse ved å fjerne overflødig bakteriemengder fra munnen. Studier som Liu et al. og Guven et al. har støttet denne påstanden ved å vise at munnskylling og tannpuss kan ha en reduserende effekt på flere bakteriearter (Guyen, Ustun, Tuna, & Aktoren, 2019; T. Liu et al., 2023). Spyttprøver med forskjellige rensbehandlinger ble brukt under spyttanalysen. Resultatene fra spyttanalysen viste en reduksjon av gjennomsnittlig LAD-signaler fra spyttprøvene etter rensbehandling. Resultatene kan tyde på at de bakterielle komponentene i spyttprøvene ble påvirket av både tannbørsting og munnskyll. Og at de fleste bakterieartene ble redusert i antall etter rensbehandling. LAD-metoden var også effektiv nok for å skille mellom disse forskjellene i mikrobiotasammenheng.

Denne trenden ble også observert i kvantifikasjonsresultatene. Qubit målingene viste at den gjennomsnittlig DNA konsentrasjon ble endret avhengig av rensbehandling. DNA mengden som ble målt kunne stamme fra både mikrobielle- og menneskeceller i spyttet.

Funn fra LAD-testen viste en større reduksjon av *Neisseria* ssp. etter tannpuss sammenlignet med *Streptococcus* ssp.. Dette funnet kan tyde på at rensebehandling kan ha varierende effekt på ulike bakteriearter. Denne variasjonen kan ha vært forårsaket at mikrobens evne til å motstå antimikrobielle komponentene i tannkrem og selve tannbørstningen. I studien Obiazi et al. er det vist hvordan tannkrem kan ha varierende effekt på forskjellige bakteriearter (Obiazi & Oseremen, 2018).

4.3 Anvendbarheten av LAD

4.3.1 Muligheter for optimalisering

Optimalisering er nødvendig for å etablere en god LAD-basert test med pålitelige deteksjonsresultater. LAD-baserte tester har den fordel at de enkelt kan optimaliseres for å forbedre reaksjonseffektiviteten og sluttresultatet. Optimalisering av LAD kan utføres ved å endre konsentrasjoner av komponentene i markeringsreaksjonen og dissosiasjonsreaksjonen. En ønskelig mengde quencher-markerte MP kan bli produsert ved å justere mengden ddCTP-Q i markeringsreaksjonen, samt endre antall markeringsreaksjonssykluser.

Dissosiasjonsreaksjonen kan optimaliseres ved å justere SDS og magnesium forholdet. Under dissosiasjonsreaksjonen er det fordelaktig å fjerne polymerase aktivitet. SDS har en inhiberende effekt på polymerase aktivitet. Siden magnesium er en polymerase kofaktor, kan lave magnesium konsentrasjoner også være inhiberende (Bessetti, 2007).

4.3.2 Potensialet til LAD-basert test for oral mikrobiota screening

Under denne oppgaven ble det erfart at spytt kan være et brukervennlig prøvemateriale for LAD-baserte tester. Spyttprøvene var enkle å innsamle, lagre og analysere. I tillegg inneholdt spyttprøvene tilstrekkelig mengder med orale bakterier for å kunne utføre en LAD-basert test. Med disse fordelene kan spyttet få en viktig rolle i fremtidig forskning. Det mangfoldige bakterielle innholdet gjør spyttet nyttig til flere diagnostiske formål. Orale mikrober virker som et lovende verktøy i screening av systemiske sykdommer. Og har blant annet blitt brukt i som et screeningverktøy for kreft (Zhou et al., 2021).

LAD-baserte tester er designet for å være enklere å utføre og mer tidseffektive sammenlignet med andre eksisterende mikrobiota tester. Etter utførelse av gjentatte LAD-forsøk ble det erfart at metoden var svært tidseffektiv med et godt etablert probe-sett. Hele LAD prosessen kunne gjennomføres innen en arbeidsdag. Metoden ble spesielt effektiv da det ble detektert et stort antall målsekvenser per brønn og mange LAD-reaksjoner kunne kjøres samtidig. LAD metoden har fordelen av at all prøveprosessering kan utføres i flytende løsning. Selve deteksjonstrinnet kan også utføres i flytende fase, som bidrar til å forenkle metodeutførelsen. Utenom LAD prosessen ville ekstraksjon og annet forarbeid ta over et dagsarbeid å utføre. Men med en forbedret ekstraksjonsprotokoll rettet mot spyttprøver kan dette prosesstrinnet muligens forkortes (Hiseni et al., 2019).

For å studere mikrobiota har sekvenseringsmetoder blitt mer vanlig i klinisk praksis. Sekvenseringsteknologier, som Illumina, er kjent for å være raske og effektive, men relativt dyre med hensyn til anskaffelse av sekvenseringsmaskin. LAD-baserte tester kan potensielt bli et rimelig alternativ til andre deteksjonsmetoder, da metoden ikke krever dyre instrumenter eller reagenser. Hele LAD-prosessen kan utføres i en vanlig termosyklus og qPCR-maskin, ofte tilgjengelig på sykehus og andre molekylære laboratorier. LAD-baserte tester tilbyr rimeligere mikrobiota deteksjon sammenlignet med andre kjente screeningsmetoder på markedet (Hiseni et al., 2019).

LAD metoden tilbyr gi tidseffektiv og pålitelig deteksjon, samt tar i bruk allerede tilgjengelig laboratorieutstyr. Disse fordelene kan gjøre en LAD-basert test godt egnet for rutinemessig oral mikrobiota screening. Imidlertid er det viktig å merke seg at bruken av oral mikrobiota som et screeningverktøy for systemiske sykdommer for tiden på forskningsstadiet. Det er fortsatt behov for ytterligere studier for å bekrefte sammenheng mellom oral mikrobiotasammensetning og forskjellige helsetilstander.

4.4 utfordringer knyttet til oppgaven

4.4.1 Teknisk begrensning grunnet ulike tannbørstingsmetoder

Resultatene fra spyttanalysen kan ha blitt påvirket av deltakernes forskjellige måter å pusse tennene på. Siden deltakernes tannbørstingsmetode ikke ble kontrollert, er det usikkert hvilke påvirkningsvariabler som ble introdusert. For eksempel kan deltakerne ha brukt elektriske eller manuelle tannbørster. Forskning har vist at ulike tannbørster kan ha forskjellige effekter

på den orale mikrobiotaen. Elektriske tannbørster har blitt dokumentert som mer effektive til å redusere plakk og mikrobe mengden enn manuelle tannbørster (Vandana, Tatuskar, & Valavalkar, 2020; Yaacob et al., 2014). Dersom deltakerne i spyttanalysen tok i bruk eldre tannbørster kan resultatene potensielt ha blitt påvirket. I Naik et al. ble det oppdaget at det var et stort antall bakterier i tannbørster, inkludert patogener. Funn fra denne studien fremhever risikoen forbundet med bruk av eldre tannbørster og hvordan de kan være potensielle kontamineringskilder (Naik, Ahmed Mujib, Telagi, Anil, & Spoorthi, 2015).

Interessant nok viste funn fra Qubit kvantifikasjonen at spyttprøvene før tannpuss hadde mindre variasjon i DNA konsentrasjon enn etter tannpuss. Fra spyttanalysen ble det også observert at *Streptococcus* hadde en stor variasjon av LAD-signaler etter tannpuss. Deltagernes forskjellige tannbørstingsmetoder kan potensielt ha påvirket disse resultatene og forårsaket en økt variasjon mellom spyttprøvene etter tannpuss.

Spyttprøvene etter munnskyll viste ikke like stor variasjon. Dette kan være på grunn av færre påvirkningsvariabler med munnskyll sammenlignet med tannbørsting. Siden alle deltakerne fikk utdelt samme munnskyll og ble rensebehandlingen utført relativt likt. Dersom en tannbørste hadde blitt lagt til i prøvetaknings-settet kunne påvirkningsvariablene for prøvene etter tannpuss blitt redusert.

4.4.2 Feiltolkning av LAD-signaler i smeltekurver

LAD-signaler fra smeltekurver kan være utfordrende å tolke dersom signalene er svake eller utydelige. LAD-signaler som var utfordrende å avlese kan i større grad ha blitt påvirket av uintendert skjevhet («bias»). Valideringsforsøket kan ha vært spesielt utsatt for bekreftelsesskjevhet, siden det var en viss forventning knyttet til hver probe. Som et forsøk på å redusere sjansen for feiltolkning, ble avlesning gjort objektivt uten påvirkning fra egne oppfatninger.

Under spyttanalysen ble positive LAD-signaler utarbeidet ved hjelp av deteksjonsgrenser. Den fastsatte grensen bestemte hvilke signaler som var beregnet som positive. Grensen var satt som 3 ganger standardavvik til de negative kontrollene og alle verdier under grensen ble beregnet som positive LAD-signaler. Denne grensesettingen kan ha redusert sannsynligheten for egne feiltolkninger, men kunne også introdusert nye utfordringer. Deteksjonsgrenser kan

ha vært satt relativt lavt dersom standardavviket til de negative kontrollene var stort. En lav deteksjonsgrense kan bli en utfordring dersom flere positive signaler ble ekskludert.

4.5 Konklusjon

I denne oppgaven ble LAD teknologien anvendt for screening av oral mikrobiota. Med en LAD-basert test ble det suksessfullt detektert et bredt spekter av bakterier fra et stort utvalg spyttprøver. Funn fra samtlige LAD-forsøk viste at probenes ytelse var generelt bra og spesifisiteten til probe-settet svært høy. De fleste probeparene ga en suksessfull deteksjon av målbakteriene de var designet for å detektere. Dette arbeidet fremhever nytten av en LAD-basert test i en diagnostisk setting. Denne teknologien tilbyr rimelig og rask deteksjon av mikrobielle samfunn. Og krever kun utstyr som allerede er tilgjengelig på de fleste laboratorier. Funnene fra denne oppgaven virker lovende for utviklingen av et praktisk og informativt LAD-basert screeningverktøy. Med denne oppgaven har vi synliggjort behovet for ytterligere forskning på bruk av LAD teknologi for oral mikrobiotascreening.

Kilder

- Archambault, L., Koshy-Chenthittayil, S., Thompson, A., Dongari-Bagtzoglou, A., Laubenbacher, R., & Mendes, P. (2023). Corrected and Republished from: "Understanding *Lactobacillus paracasei* and *Streptococcus oralis* Biofilm Interactions through Agent-Based Modeling". *mSphere*, 8(2), e0065622. doi:10.1128/msphere.00656-22
- Baty, J. J., Stoner, S. N., & Scofield, J. A. (2022). Oral Commensal Streptococci: Gatekeepers of the Oral Cavity. *J Bacteriol*, 204(11), e0025722. doi:10.1128/jb.00257-22
- Berger, D., Rakhimova, A., Pollack, A., & Loewy, Z. (2018). Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High Throughput*, 7(3). doi:10.3390/ht7030024
- Bertolini, M., Costa, R., Barão, V., Villar, C. C., Retamal-Valdes, B., Feres, M., & Silva Souza, J. (2022). Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases. *Microorganisms*, 10(12), 2413. doi:10.3390/microorganisms10122413
- Bessetti, J. (2007). An introduction to PCR inhibitors. *J Microbiol Methods*, 28, 159-167.
- Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., . . . Relman, D. A. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J*, 4(8), 962-974. doi:10.1038/ismej.2010.30
- Budding, A. E., Hoogewerf, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2016). Automated Broad-Range Molecular Detection of Bacteria in Clinical Samples. *J Clin Microbiol*, 54(4), 934-943. doi:10.1128/jcm.02886-15
- Carpenter, G. H. (2020). Salivary Factors that Maintain the Normal Oral Commensal Microflora. *Journal of Dental Research*, 99(6), 644-649. doi:10.1177/0022034520915486
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69(2), 330-339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005
- Chen, Y., Huang, Z., Tang, Z., Huang, Y., Huang, M., Liu, H., . . . Zhao, J. (2022). More Than Just a Periodontal Pathogen -the Research Progress on *Fusobacterium nucleatum*. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 815318. doi:10.3389/fcimb.2022.815318
- Chojnowska, S., Baran, T., Wilińska, I., Sienicka, P., Cabaj-Wiater, I., & Knaś, M. (2018). Human saliva as a diagnostic material. *Advances in medical sciences*, 63(1), 185-191.
- Curtis, M. A., Zenobia, C., & Darveau, R. P. (2011). The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe*, 10(4), 302-306. doi:10.1016/j.chom.2011.09.008
- David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., . . . Alm, E. J. (2014). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology*, 15(7), R89. doi:10.1186/gb-2014-15-7-r89
- Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*, 23(1), 122-128. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, 68(6), 1108-1114. doi:10.1136/gutjnl-2018-317503
- Dongari-Bagtzoglou, A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6(2), 201-208. doi:10.1586/14787210.6.2.201
- Fernandes, M., Azevedo, M. J., Campos, C., Ferreira, A. F., Azevedo, Á., Falcão-Pires, I., . . . Sampaio-Maia, B. (2023). Potential Pathogenic and Opportunistic Oral Bacteria in

- Early Life: The Role of Maternal Factors in a Portuguese Population. *Pathogens*, 12(1). doi:10.3390/pathogens12010080
- Gaonkar, P. P., Patankar, S. R., Tripathi, N., & Sridharan, G. (2018). Oral bacterial flora and oral cancer: The possible link? *J Oral Maxillofac Pathol*, 22(2), 234-238. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_89_16
- Gupta, A., Gupta, R., & Singh, R. L. (2017). Microbes and Environment. In (pp. 43-84): Springer Singapore.
- Guvan, Y., Ustun, N., Tuna, E. B., & Aktoren, O. (2019). Antimicrobial Effect of Newly Formulated Toothpastes and a Mouthrinse on Specific Microorganisms: An In Vitro Study. *Eur J Dent*, 13(2), 172-177. doi:10.1055/s-0039-1695655
- Han, Y., Wang, B., Gao, H., He, C., Hua, R., Liang, C., . . . Xu, J. (2022). Insight into the Relationship between Oral Microbiota and the Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*, 10(9), 1868. doi:10.3390/microorganisms10091868
- He, J., Li, Y., Cao, Y., Xue, J., & Zhou, X. (2015). The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica*, 60(1), 69-80. doi:10.1007/s12223-014-0342-2
- Hernández, M., Mayer, M. P. A., & Santi-Rocca, J. (2022). Editorial: The Human Microbiota in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 952205. doi:10.3389/fcimb.2022.952205
- Hiseni, P., Wilson, R. C., Storrø, O., Johnsen, R., Øien, T., & Rudi, K. (2019). Liquid array diagnostics: a novel method for rapid detection of microbial communities in single-tube multiplex reactions. *BioTechniques*, 66(3), 143-149. doi:10.2144/btn-2018-0134
- Holgerson, P. L., Vestman, N. R., Claesson, R., Ohman, C., Domellöf, M., Tanner, A. C., . . . Johansson, I. (2013). Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 56(2), 127-136. doi:10.1097/MPG.0b013e31826f2bc6
- Idris, A., Hasnain, S. Z., Huat, L. Z., & Koh, D. (2017). Human diseases, immunity and the oral microbiota—Insights gained from metagenomic studies. *Oral Science International*, 14(2), 27-32.
- Ivanov, I., Ivaylo, & Honda, K. (2012). Intestinal Commensal Microbes as Immune Modulators. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 496-508. doi:10.1016/j.chom.2012.09.009
- Jia, G., Zhi, A., Lai, P. F. H., Wang, G., Xia, Y., Xiong, Z., . . . Ai, L. (2018). The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. *British Dental Journal*, 224(6), 447-455. doi:10.1038/sj.bdj.2018.217
- Khor, B., Snow, M., Herrman, E., Ray, N., Mansukhani, K., Patel, K. A., . . . Machida, C. A. (2021). Interconnections Between the Oral and Gut Microbiomes: Reversal of Microbial Dysbiosis and the Balance Between Systemic Health and Disease. *Microorganisms*, 9(3). doi:10.3390/microorganisms9030496
- Li, X., Kolltveit, K. M., Tronstad, L., & Olsen, I. (2000). Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*, 13(4), 547-558. doi:10.1128/cmr.13.4.547
- Lim, Y., Totsika, M., Morrison, M., & Punyadeera, C. (2017). The saliva microbiome profiles are minimally affected by collection method or DNA extraction protocols. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-07885-3
- Liu, S., Dashper, S. G., & Zhao, R. (2023). Association Between Oral Bacteria and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*, 91(1), 129-150. doi:10.3233/jad-220627
- Liu, T., Chen, Y. C., Jeng, S. L., Chang, J. J., Wang, J. Y., Lin, C. H., . . . Wang, J. L. (2023). Short-term effects of Chlorhexidine mouthwash and Listerine on oral microbiome in hospitalized patients. *Front Cell Infect Microbiol*, 13, 1056534. doi:10.3389/fcimb.2023.1056534

- Long, J., Cai, Q., Steinwandel, M., Hargreaves, M. K., Bordenstein, S. R., Blot, W. J., . . . Shu, X. O. (2017). Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *Journal of Periodontal Research*, *52*(3), 636-643. doi:10.1111/jre.12432
- Lu, M., Xuan, S., & Wang, Z. (2019). Oral microbiota: A new view of body health. *Food Science and Human Wellness*, *8*(1), 8-15.
- Marcotte, H., & Lavoie, M. C. (1998). Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(1), 71-109. doi:10.1128/membr.62.1.71-109.1998
- Marsh, P. D. (2018). In Sickness and in Health—What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. *Advances in Dental Research*, *29*(1), 60-65. doi:10.1177/0022034517735295
- Marsh, P. D., & Percival, R. S. (2006). The oral microflora--friend or foe? Can we decide? *International dental journal*, *56* 4 Suppl 1, 233-239.
- Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdani, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdani, M., & Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *38*(11), 2005-2019. doi:10.1007/s10096-019-03641-9
- Naik, R., Ahmed Mujib, B. R., Telagi, N., Anil, B. S., & Spoorthi, B. R. (2015). Contaminated tooth brushes-potential threat to oral and general health. *J Family Med Prim Care*, *4*(3), 444-448. doi:10.4103/2249-4863.161350
- Niazi, S. A., & Bakhsh, A. (2022). Association between Endodontic Infection, Its Treatment and Systemic Health: A Narrative Review. *Medicina*, *58*(7), 931. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1648-9144/58/7/931>
- Oba, P. M., Holscher, H. D., Mathai, R. A., Kim, J., & Swanson, K. S. (2020). Diet Influences the Oral Microbiota of Infants during the First Six Months of Life. *Nutrients*, *12*(11). doi:10.3390/nu12113400
- Obiazi, H., & Oseremen, D.-I. E. (2018). Effect of Toothpaste on Oral Microbial Flora (Bacteria and Fungi).
- Pedersen, A. M. L., & Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent*, *80* Suppl 1, S3-s12. doi:10.1016/j.jdent.2018.08.010
- Pelaez-Prestel, H. F., Sanchez-Trincado, J. L., Lafuente, E. M., & Reche, P. A. (2021). Immune Tolerance in the Oral Mucosa. *Int J Mol Sci*, *22*(22). doi:10.3390/ijms222212149
- Rezasoltani, S., Aghdaei, H. A., Jasemi, S., Gazouli, M., Dovrolis, N., Sadeghi, A., . . . Feizabadi, M. M. (2022). Oral Microbiota as Novel Biomarkers for Colorectal Cancer Screening. *Cancers (Basel)*, *15*(1). doi:10.3390/cancers15010192
- Robinson, C. M., & Pfeiffer, J. K. (2014). Viruses and the Microbiota. *Annual Review of Virology*, *1*(1), 55-69. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085550
- Said, H. S., Suda, W., Nakagome, S., Chinen, H., Oshima, K., Kim, S., . . . Hattori, M. (2014). Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res*, *21*(1), 15-25. doi:10.1093/dnares/dst037
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S. V., & Kapila, Y. L. (2021). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontol 2000*, *87*(1), 107-131. doi:10.1111/prd.12393
- Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A. S., & Batra, N. (2018). Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol*, *4*(1), 42-66. doi:10.3934/microbiol.2018.1.42
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, *5*(6), 463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177

- Sudhakara, P., Gupta, A., Bhardwaj, A., & Wilson, A. (2018). Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dentistry Journal*, 6(2), 10. doi:10.3390/dj6020010
- Thomas, C., Minty, M., Vinel, A., Canceill, T., Loubières, P., Burcelin, R., . . . Laurencin-Dalieux, S. (2021). Oral Microbiota: A Major Player in the Diagnosis of Systemic Diseases. *Diagnostics (Basel)*, 11(8). doi:10.3390/diagnostics11081376
- Tiwari, M. (2011). Science behind human saliva. *J Nat Sci Biol Med*, 2(1), 53-58. doi:10.4103/0976-9668.82322
- Tordesillas, L., & Berin, M. C. (2018). Mechanisms of Oral Tolerance. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 55(2), 107-117. doi:10.1007/s12016-018-8680-5
- Vandana, K. L., Tatuskar, P. V., & Valavalkar, N. N. (2020). A comparative evaluation of manual and powered brushing on oral health and microbial status of mentally challenged individuals. *J Indian Soc Periodontol*, 24(4), 362-368. doi:10.4103/jisp.jisp_340_19
- Varoni, E. M., & Rimondini, L. (2022). Oral Microbiome, Oral Health and Systemic Health: A Multidirectional Link. *Biomedicines*, 10(1). doi:10.3390/biomedicines10010186
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*, 69(1), 137-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.11.006
- Wang, Y., Zhang, J., Chen, X., Jiang, W., Wang, S., Xu, L., . . . Chen, H. (2017). Profiling of Oral Microbiota in Early Childhood Caries Using Single-Molecule Real-Time Sequencing. *Front Microbiol*, 8, 2244. doi:10.3389/fmicb.2017.02244
- Wu, Y., Chi, X., Zhang, Q., Chen, F., & Deng, X. (2018). Characterization of the salivary microbiome in people with obesity. *PeerJ*, 6, e4458. doi:10.7717/peerj.4458
- Xiao, X., Liu, S., Deng, H., Song, Y., Zhang, L., & Song, Z. (2023). Advances in the oral microbiota and rapid detection of oral infectious diseases. *Front Microbiol*, 14, 1121737. doi:10.3389/fmicb.2023.1121737
- Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. (2013). Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*, 26(4), 781-791. doi:10.1128/cmr.00021-13
- Yaacob, M., Worthington, H. V., Deacon, S. A., Deery, C., Walmsley, A. D., Robinson, P. G., & Glenny, A. M. (2014). Powered versus manual toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(6), Cd002281. doi:10.1002/14651858.CD002281.pub3
- Zenobia, C., Luo, X. L., Hashim, A., Abe, T., Jin, L., Chang, Y., . . . Darveau, R. P. (2013). Commensal bacteria-dependent select expression of CXCL2 contributes to periodontal tissue homeostasis. *Cellular Microbiology*, 15(8), 1419-1426. doi:10.1111/cmi.12127
- Zhang, C.-Z., Cheng, X.-Q., Li, J.-Y., Zhang, P., Yi, P., Xu, X., & Zhou, X.-D. (2016). Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science*, 8(3), 133-137. doi:10.1038/ijos.2016.38
- Zhou, X., Hao, Y., Peng, X., Li, B., Han, Q., Ren, B., . . . Cheng, L. (2021). The Clinical Potential of Oral Microbiota as a Screening Tool for Oral Squamous Cell Carcinomas. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 728933. doi:10.3389/fcimb.2021.728933

Vedlegg

Vedlegg A: Oversikt over alle probene brukt under masteroppgaven.

Tabell A1: Oversikten viser hver enkelt probe og hva de var designet for å detektere.

Målbakterier (+ quenching)	Markeringsprober	Reporterprober	Markeringskontrollprober
<i>Porphyromonas</i>	MP1	RP1	Mkon1
<i>Neisseria</i> spp.	MP2	RP2	Mkon2
Bacilli*	MP3	RP3	Mkon3
<i>Bifidobacterium</i> *	MP4	RP4	Mkon4
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	MP5	RP5	Mkon5
<i>Haemophilus</i> *	MP6	RP6	Mkon6
<i>Streptococcus</i> spp.	MP7	RP7	Mkon7
<i>Veillonella atypica</i>	MP8	RP8	Mkon8
<i>Veillonella dispar</i> og <i>Veillonella parvula</i>	MP9	RP9	Mkon9
<i>Actinomycetia</i> *	MP10	RP10	Mkon10
<i>Prevotella</i> spp.	MP11	RP11	Mkon11
<i>Streptococcus sanguinis</i> **	MP12	RP12	Mkon12
<i>Streptococcus mitis</i> **	MP13	RP13	Mkon13
<i>Streptococcus salivarius</i> **	MP14	RP14	Mkon14
<i>Fusobacterium</i> spp.	MP15	RP15	Mkon15
Quenching	QMP	QRP	

Vedlegg B: Markeringsreaksjon-oppsettet i unipleks LAD-forsøket.

Tabell B1: Oversikt over komponentene i prøvereksjonene til markeringsreaksjonen i Mkon-forsøket. Viser probene og reaksjonskomponentene brukt. Komponenter i 30 reaksjoner. Mastermiks er med i alle reaksjonene, selv om det ikke vises i tabellen

Plateoppsettet til markeringsreaksjon			
MP + Mkon		Negative kontroller	
MP1 + Mkon1	MP9 + Mkon9	MP1 + dH ₂ O	MP9 + dH ₂ O
MP2 + Mkon2	MP10 + Mkon10	MP2 + dH ₂ O	MP10 + dH ₂ O
MP3 + Mkon3	MP11 + Mkon11	MP3 + dH ₂ O	MP11 + dH ₂ O
MP4 + Mkon4	MP12 + Mkon12	MP4 + dH ₂ O	MP12 + dH ₂ O
MP5 + Mkon5	MP13 + Mkon13	MP5 + dH ₂ O	MP13 + dH ₂ O
MP6 + Mkon6	MP14 + Mkon14	MP6 + dH ₂ O	MP14 + dH ₂ O
MP7 + Mkon7	MP15 + Mkon15	MP7 + dH ₂ O	MP15 + dH ₂ O
MP8 + Mkon8		MP8 + dH ₂ O	

Vedlegg C: Oversikt over markeringsprobe-kombinasjoner.

Tabell C1: Liste over markeringsprobe-kombinasjoner fra LAD-forsøk. Gruppe A viser MP-er som hadde antydning til falsk positiv quenching, gruppe B viser MP-er med størst sannsynlighet for å danne hetero-dimer med MP-er fra gruppe A.

MP-kombinasjoner som kan danne hetero-dimer	
Gruppe A	Gruppe B
MP2	MP5
MP2	MP7
MP2	MP9
MP2	MP14
MP7	MP1
MP7	MP6
MP7	MP9
MP7	MP10
MP7	MP11
MP7	MP13
MP7	MP15
MP10	MP1
MP10	MP3
MP10	MP13
MP10	MP15

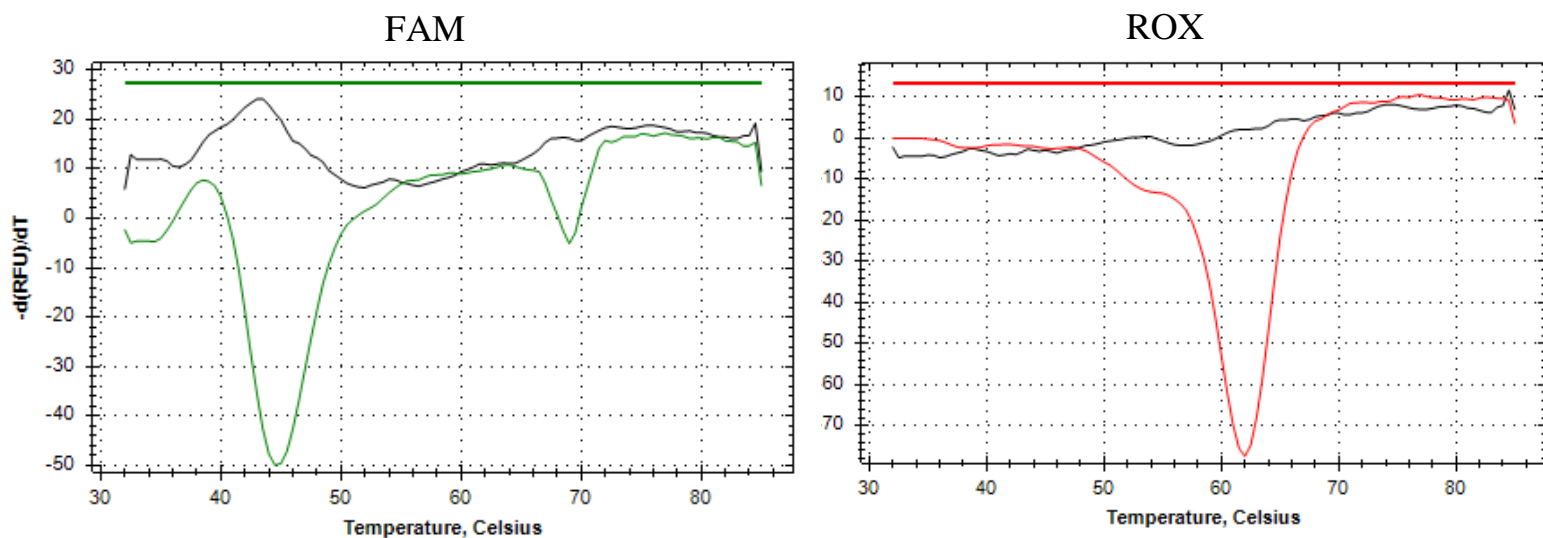
Vedlegg D: Probenes smeltetemperatur observert fra uniplekse LAD-reaksjoner.

Tabell D1: Oversikten viser hver MP-RP dupleksteoretiske og faktiske smeltetemperatur.

Målbakterie	Teoretisk smeltetemperatur (°C)	Faktisk smeltetemperatur (°C)
<i>Porphyromonas</i>	40,2	35
<i>Neisseria</i> spp.	50	46
<i>Bacilli</i> +	60,1	54
<i>Bifidobacterium</i> +	34,9	35
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	44,4	48
<i>Haemophilus</i> +	53,6	55
<i>Streptococcus</i> spp.	62,8	62
<i>Veillonella atypica</i>	41	44
<i>Veillonella dispar & parvula</i>	50,4	51
<i>Actinomycetia</i> +	58,6	62
<i>Prevotella</i> spp.	69,2	68
<i>Streptococcus sanguinis</i> g+	38,6	45*
<i>Streptococcus mitis</i> g+	50,6	53*
<i>Streptococcus salivarius</i> g+	60,2	64*
<i>Fusobacterium</i> spp.	68,3	68*

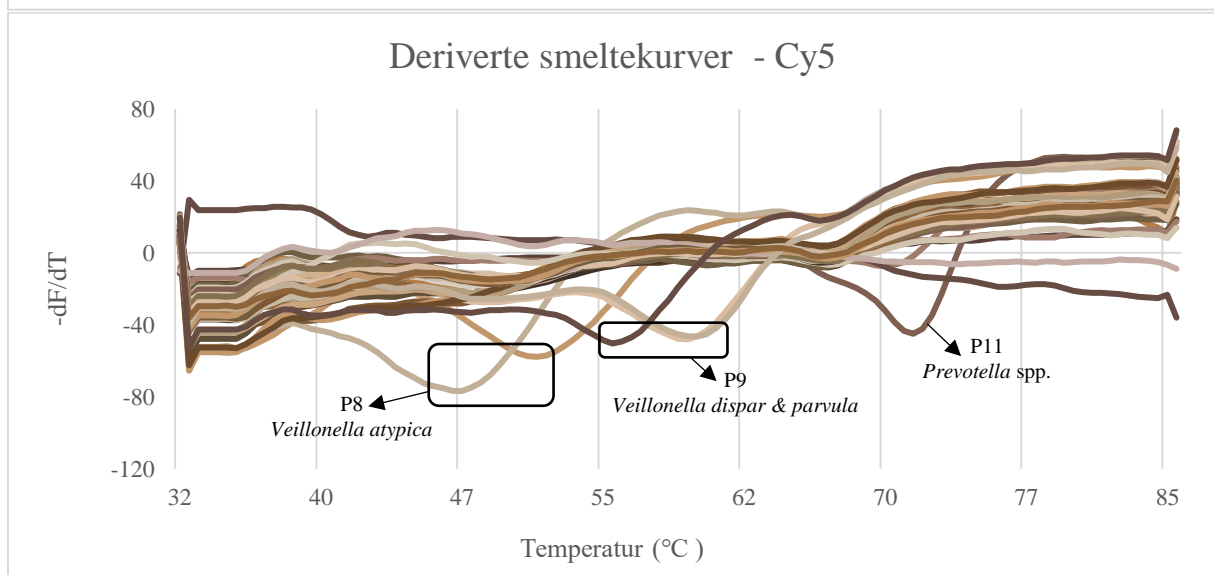
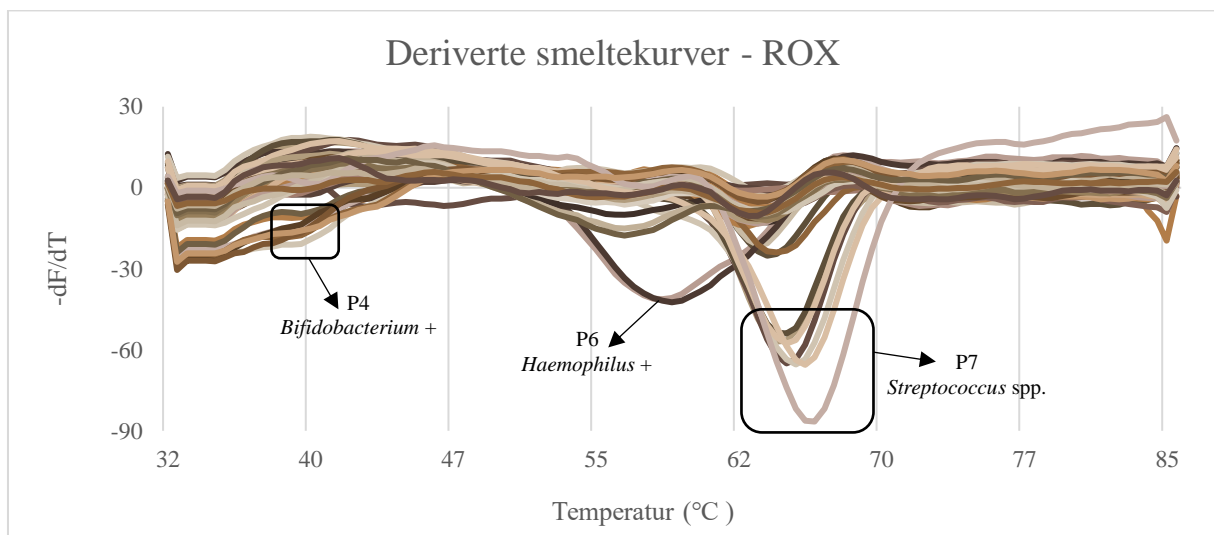
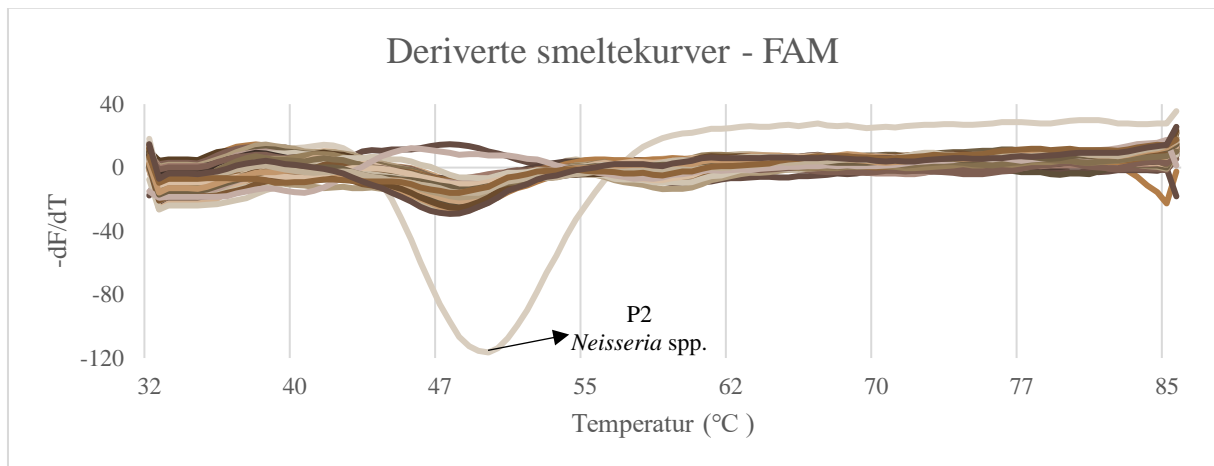
*usikker data, svake signaler

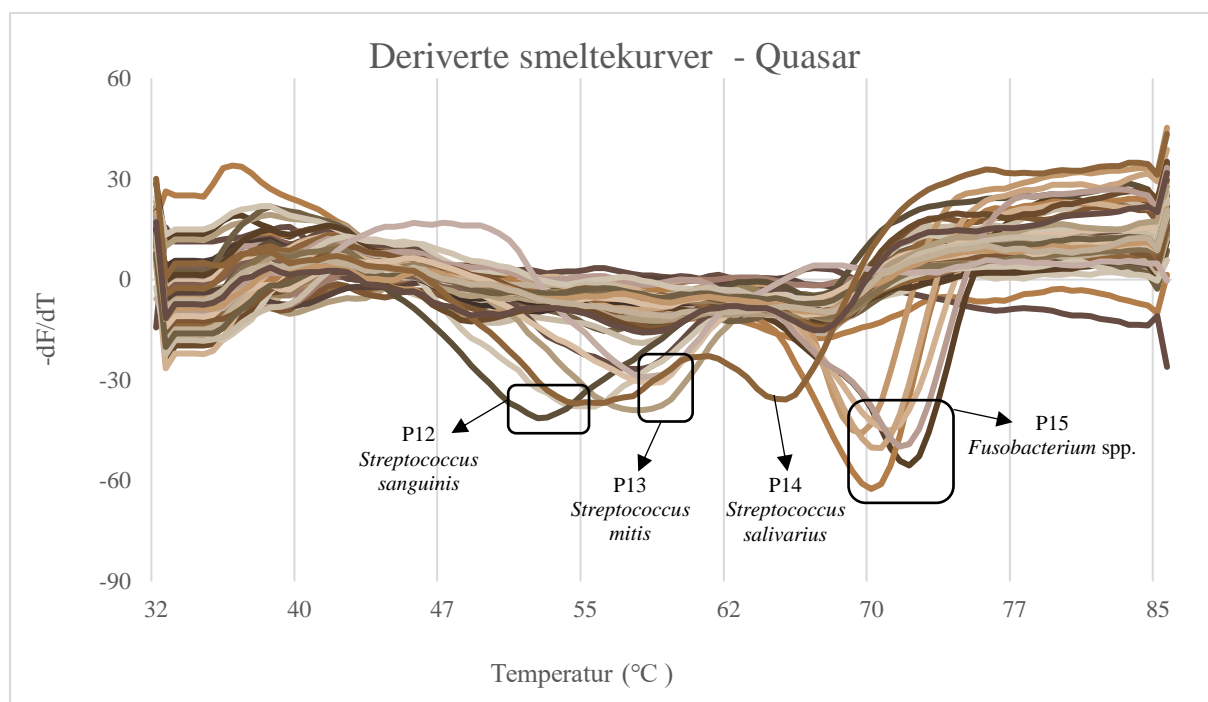
Vedlegg E: Falske signaler fra uniplekse reaksjoner.



Figur E1: Grafene viser smeltekurvene til P2 (grønn kurve i FAM-graf) og P7 (rød kurve i ROX-graf). I begge grafene er den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) plottet på y-aksen. Kurvene markert i svart representerer negativ kontroll.

Vedlegg F: Smeltekurver fra testing av prober opp mot bakterie.





Figur F1: Grafene viser smeltekurvene til FAM, ROX, Cy5 og Quasar. Den negative deriverte av fluorescens med hensyn til temperaturendring ($-d(RFU)/dT$) plottet på y-aksen. Alle smeltekurve-rådata ble databehandlet ved sentring og glatting av fluorescensderivat.

Vedlegg G: Spyttanalyse-data brukt til å utarbeide normaliserte plott

Tabell G1: Oversikt over LAD-signaler fra alle spyttprøvene og deteksjonsgrense til probene. Prøvene markert i rødt indikerer verdier under deteksjonsgrense. Disse verdiene ble brukt i videre utarbeide av normaliserte plott. FAM og ROX ble databehandlet med sentring og glatting, for å hente ut mest mulig positive LAD signaler fra smeltekurvene. Denne bearbeidingen ble ikke utført for Cy5 og Quasar siden det ikke var like fordelaktig.

Probepaar	FAM		ROX		Cy5			Quasar	
	P1	P2	P6	P7	P8	P9	P11	P14	P15
Målbakterier	<i>Porphyromonas pasteri</i>	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Haemophilus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Veillonella atypica</i>	<i>Veillonella dispar</i> & <i>Veillonella parvula</i>	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Streptococcus salivarius</i> g+	<i>Fusobacterium</i> spp.
	-3,2	-38,3	-39,9	-33,4	80,3	56,3	57,8	56,1	56,8
	-9,9	-32,5	-66,6	-68,9	62,9	45,9	39,1	49,4	33,8
	-2,9	-2,3	-11,8	-18,4	105,6	89,9	66,4	75,0	64,3
	-4,2	-6,0	-16,5	-23,5	88,4	78,4	61,3	72,7	63,1
	-7,3	-2,3	0,9	-4,1	90,5	80,3	59,5	72,2	61,4
	-20,6	-23,8	-59,7	-52,3	107,9	90,2	58,1	77,5	63,4
	-5,2	-34,1	-52,5	-68,0	22,0	9,7	-4,1	29,2	54,3
	-8,2	-0,7	-3,1	-3,2	88,5	78,8	60,6	71,7	63,8
	-4,7	0,3	-29,7	-54,9	100,2	89,0	61,0	64,0	64,9
	-3,5	-12,0	-25,5	-38,9	85,9	78,2	58,7	64,7	60,0
prøver før tannpuss	-7,9	-8,7	-29,7	-29,0	74,2	67,2	52,5	68,4	51,2
	-11,4	-34,8	-59,8	-69,4	55,8	33,4	4,0	49,8	31,0
	0,4	-6,8	-18,6	-77,0	3,7	14,3	19,5	22,1	53,9
	-5,9	0,5	-40,7	-73,4	-9,9	-18,6	22,0	56,1	57,5
	-4,8	-34,5	-60,9	-70,7	66,1	33,6	25,8	68,7	56,8
	-0,6	-0,6	-0,9	-10,7	92,2	79,4	59,7	66,3	58,3
	-5,4	-56,0	-63,1	-79,4	63,2	50,5	24,8	51,9	59,2
	-3,9	-6,9	-35,1	-26,1	97,6	81,8	59,0	71,2	59,1
	-3,1	-51,1	-64,5	-78,3	62,7	38,2	29,8	51,8	54,2
	-8,1	-50,5	-64,0	-73,8	52,3	27,8	32,0	66,9	52,0
	3,5	-16,1	-63,3	-64,9	85,2	77,7	55,8	62,4	38,7
	0,4	-27,9	-59,2	-62,2	24,2	28,4	33,6	37,3	49,9

	-3,6	-4,4	-0,5	3,4	85,1	76,7	58,1	69,0	59,4
	-10,2	-28,1	-62,7	-68,2	67,9	48,5	50,5	48,7	32,2
	0,5	1,1	-6,6	-3,5	95,9	84,1	63,0	71,9	59,0
	-6,0	-3,2	-2,0	1,2	92,0	81,6	61,2	75,7	64,0
	-6,8	0,4	3,6	-2,2	92,9	82,2	60,2	74,3	62,1
	-0,2	6,2	-5,5	-6,9	102,5	88,1	64,0	73,3	62,4
	-4,5	-10,5	-18,3	-64,4	20,5	12,8	12,4	43,1	50,4
	-7,2	0,6	1,6	-8,1	93,4	82,1	58,9	74,2	61,8
	-3,2	-2,0	-30,1	-65,1	8,4	37,8	4,2	44,6	51,5
	-5,7	-2,6	-5,1	-8,5	86,3	77,4	59,2	66,0	61,0
	-5,2	-12,8	-52,9	-62,7	58,8	51,7	38,9	67,0	48,8
	-0,7	3,0	2,9	-5,4	101,3	88,7	63,0	70,7	59,1
	-4,2	-1,6	-3,3	-44,2	49,8	51,6	47,2	61,6	60,1
	-8,9	2,4	-22,8	-79,4	-0,8	-14,8	23,1	51,7	57,1
	-4,9	-13,6	-53,0	-86,3	63,0	38,0	38,3	63,6	35,8
	-3,9	-0,6	-3,3	-16,7	85,5	75,8	61,1	65,6	62,5
	-6,8	-24,7	-46,5	-48,4	70,0	57,0	28,7	62,4	49,7
	-0,9	-4,4	-27,2	-18,4	92,3	81,3	62,1	67,8	58,8
	-3,7	-27,7	-44,9	-84,5	38,9	12,9	12,0	40,8	46,8
	-3,6	-14,6	-43,4	-50,2	76,5	61,1	45,1	64,3	49,8
	1,5	-5,6	-26,1	-14,1	89,2	79,3	55,6	66,2	51,6
	-1,0	0,2	-3,1	-9,4	76,8	71,1	53,8	60,6	52,7
	-4,6	0,1	-0,4	-2,6	87,7	79,2	61,0	56,1	63,2
	-6,9	-24,7	-62,1	-62,9	76,0	60,5	53,8	49,4	18,9
	0,5	2,9	-1,9	-2,9	95,6	83,6	63,4	75,0	62,6
	-6,1	2,3	0,3	1,6	92,9	81,0	61,0	72,7	63,8
	-5,2	4,0	2,6	-2,5	93,2	81,7	59,6	72,2	60,8
	0,2	2,6	-5,5	-8,1	102,4	88,0	65,2	77,5	64,9
	-10,3	-6,0	-7,7	-8,6	64,3	54,5	33,1	29,2	54,3
	-5,9	-1,9	3,3	-1,9	86,4	78,8	56,9	71,7	60,5
	-2,8	2,2	-2,4	-23,0	89,9	83,0	60,3	64,0	61,5
	-5,1	-4,8	-0,4	-0,7	82,0	74,3	57,5	64,7	61,6
	-5,5	-3,5	-18,6	-31,9	73,1	67,1	48,9	68,4	56,9
	-1,0	3,7	-1,8	-31,5	108,6	88,0	63,8	49,8	58,1
	-3,4	-3,1	-8,6	-47,2	52,3	51,5	44,0	22,1	61,1
	-10,0	-0,6	-19,9	-53,7	8,2	-2,1	44,0	56,1	55,8
	-4,2	-2,5	-19,1	-35,7	82,4	69,8	47,6	68,7	51,6
	-4,5	-0,3	-1,1	-4,7	88,4	78,6	61,2	66,3	62,9
	-4,0	-42,2	-38,9	-63,5	45,9	33,9	12,6	51,9	37,4
	-2,1	1,4	-1,2	-3,0	94,4	82,3	61,3	71,2	59,8
	-3,9	-9,3	-19,8	-45,1	73,1	52,8	36,7	51,8	54,1
	-5,8	-24,7	-47,3	-60,0	64,0	46,7	36,7	66,9	42,2
	0,9	1,8	-3,4	-2,7	89,8	79,6	58,0	62,4	55,6
	0,5	0,7	-0,2	-4,5	86,3	74,6	56,2	56,1	53,4
Deteksjonsgrense	-7,5	-5,9	-3,8	-5,3	64,6	59,8	47,3	43,5	34,4



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway