Bacheloroppgave

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Sigrid Marie Dyrkorn

Ylva Kvendbø

Påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces ved PCR: Litteraturstudie

Detection of *Cryptosporidium parvum* in human faeces by PCR: Literature study

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

Sigrid Marie Dyrkorn

Ylva Kvendbø

Påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces ved PCR: Litteraturstudie

Detection of *Cryptosporidium parvum* in human faeces by PCR: Literature study

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Margareth Nupen
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

Forord

Den opprinnelige bacheloroppgaven ble gitt av Avdeling for medisinsk mikrobiologi. Avdelingen er en av seks avdelinger ved Laboratoriemedisinsk klinikk ved St. Olavs hospital i Trondheim. Avdelingen er en av landets største avdelinger for medisinsk mikrobiologi og har særlig kompetanse innen molekylærbiologisk diagnostikk av smittsomme agens.

Bacheloroppgaven ble omgjort til en teoretisk litteraturstudie på grunn av koronapandemien. Litteraturstudien omhandler PCR-metoder for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

Oppgaven ble skrevet som avsluttende hovedprosjekt ved Institutt for bioingeniørfag, Fakultet for naturvitenskap, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Arbeidet med oppgaven ble påbegynt mars 2020, og avsluttet i mai 2020.

Vi vil gjerne takke alle som har hjulpet oss med oppgaven. Først vil vi takke vår prosessveileder førstelektor Margareth Nupen ved NTNU for god hjelp med skriveprosessen. Vi vil også rette en stor takk til Kine Husteli Kristiansen og Wenche Slettahjell Prestvik ved NTNU for gode svar på spørsmålene våre. Til slutt vil vi takke Mona Irene Dyrkorn for hjelp med korrekturlesing under innspurten av oppgaven.

Undertegnet 10.05.2020, Kristiansund

Ylva Kvendbø

Ylva Kvendbø

Sigrid Dyrkorn

Sigrid Marie Dyrkorn

Sammendrag

Metodebeskrivelser for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i fæcesprøver ved bruk av ulike PCR-metoder har blitt studert. Artiklene fra litteratursøket er hentet fra databasene Oria, Pubmed og Google Scholar. Søket ble begrenset til tidsperioden 2010-2020. Artiklene som er benyttet i litteraturstudien er Laude et al. (2016), Shin et al. (2018), Das et al. (2020), Mary et al. (2013), Lalonde et al. (2013), Vejdani et al. (2014), Bairami Kuzehkanan et al. (2011) og Hadfield et al. (2011).

PCR er en spesifikk og sensitiv metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum*. Mulitpleks real-time PCR, dupleks real-time PCR og nested PCR ble vurdert og sammenlignet med vekt på ekstraksjonsreagenser, PCR-reagenser og PCR-betingelser, samt valideringsparametrene deteksjonsgrense, sensitivitet, spesifisitet, repeterbarhet og reproduserbarhet.

Real-time PCR-metodene som er undersøkt tar 48-79 min, og det benyttes prober eller smeltekurveanalyse for å påvise PCR-produktet. De undersøkte nested PCR-metodene tar 3,6-5,6 timer, og PCR-produktet visualiseres ved gelelektroforese. De undersøkte PCR-metodene har deteksjonsgrense (200-1000 oocyster/g fæces), sensitivitet (96-100%), spesifisitet (99,1-100%), repeterbarhet (97-100%) og reproduserbarhet (90,9%) for påvisning av *Cryptosporidium parvum*.

Som supplementær PCR-metode til screeninganalyse foreslås det å benytte en kvalitativ real-time PCR med 18S rRNA som målgen for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. PCR-metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) er forenlig med dette. Metoden har god analytisk sensitivitet (200 oocyster/g fæces), klinisk sensitivitet (100%) og spesifisitet (99,1%) for påvisning av *Cryptosporidium parvum*. For ekstrahering av DNA fra fæcesprøvene foreslås QIAamp® Stool Mini Kit (Qiagen) fordi dette er en rask og enkel metode ((Shin et al., 2018), (Lalonde et al., 2013), (Vejdani et al., 2014) og (Bairami Kuzehkanan et al., 2011)).

Det foreslås en to-trinns PCR med inkubering (95°C, 10 min), etterfulgt av 55 sykluser med denaturering (95°C, 15 sek), hybridisering og polymerisering (60°C, 1 min). (Hadfield et al., 2011). Til deteksjon av amplifisert PCR-produkt foreslås bruk av TaqMan MGB VIC/NFQ probe (Hadfield et al., 2011).

Før den foreslåtte real-time PCR-metoden kan tas i bruk i diagnostikken må den valideres med hensyn til deteksjonsgrense, klinisk sensitivitet, diagnostisk spesifisitet, repeterbarhet, reproduserbarhet og riktighet.

Abstract

Method descriptions for detection of *Cryptosporidium parvum* in faecal samples using different PCR methods were studied. The articles were obtained in a literature search by using the databases Oria, Pubmed and Google Scholar. The literature search was limited to the time period 2010-2020. The articles used in the literature study are Laude et al. (2016), Shin et al. (2018), Das et al. (2020), Mary et al. (2013), Lalonde et al. (2013), Vejdani et al. (2014), Bairami Kuzehkanan et al. (2011) and Hadfield et al. (2011).

PCR is a sensitive and specific method for detection of *Cryptosporidium parvum*. Multiplex real-time PCR, duplex real-time PCR and nested PCR were evaluated and compared with emphasis on extraction reagents, PCR reagents and PCR conditions, as well as the validation parameters limit of detection, sensitivity, specificity, repeatability and reproducibility.

The Real-time PCR-methods that were studied have a timespan between 48-79 min, and their methods for detection of PCR-product were probes or melt curve analysis. The nested PCR-methods have a timespan between 3,6-5,6 hours, and their method of detection is gel electrophoresis. The published articles presented the following validation results for the studied PCR-methods; limit of detection (200-1000 oocysts/g faeces), sensitivity (96-100%), specificity (99,1-100%), repeatability (97-100%) and reproducibility (90,9%).

Qualitative real-time PCR targeting the 18S rRNA-gene is proposed as a complementary PCR for detection of *Cryptosporidium parvum* in human feaces. The PCR-method described by Hadfield et al. (2011) is compatible with this and has good results regarding analytical sensitivity (200 oocysts/g feaces), clinical sensitivity (100%) and specificity (99,1%) for detection of *Cryptosporidium parvum.* For extraction of DNA from feacal samples, QIAamp® Stool Mini Kit (Qiagen) is proposed because it is a rapid and simple method ((Shin et al., 2018), (Lalonde et al., 2013), (Vejdani et al., 2014) og (Bairami Kuzehkanan et al., 2011)).

A two-step PCR with the following conditions: incubation (95°C, 10 min), followed by 55 cycles of denaturation (95°C, 15 sek), annealing and polymerization (60°C, 1 min), for detection of *Cryptosporidium parvum* is proposed (Hadfield et al., 2011). For detection of amplified product, TaqMan MGB FAM/NFQ probe is proposed (Hadfield et al., 2011).

The complementary PCR-method must be validated concerning limit of detection, clinical sensitivity, diagnostic specificity, repeatability, reproducibility and accuracy of the method prior to use in a diagnostic laboratory.

Innholdsfortegnelse

Forord i
Sammendrag ii
Abstract iii
1. Innledning 1
1.1 Bakgrunn for oppgaven 1
1.2 *Cryptosporidium parvum* og cryptosporidiose 2
1.3 Påvisning av Cryptosporidium parvum 4
1.4 Polymerase Chain Reaction 5
1.4.1 Real-time PCR 9
1.4.2 Nested PCR 10
1.4.3 PCR-smeltekurveanalyse 11
1.4.4 PCR-Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 12
1.5 Validering og verifisering 13
1.6 Validering av analytisk kvalitet for PCR 14
1.7 Problemstilling 18
2. Materialer og metode 19
2.1 Kvalitativ metode 19
2.2 Materialer 20
2.3 Metode 22
3. Resultater og diskusjon 23
3.1 Multipleks Real-time PCR-metoder 24
3.2 Dupleks Real-time PCR-metoder 28
3.3 Nested PCR-metoder 32
3.4 Valideringsparametre for de ulike PCR-metodene 36
3.5 Forslag til en supplementær PCR-metode 40
4. Konklusjon 45
5. Referanser 47
Vedlegg 51
Vedlegg 1 52
Vedlegg 2 53
Vedlegg 3 54

1. Innledning

1.1 Bakgrunn for oppgaven

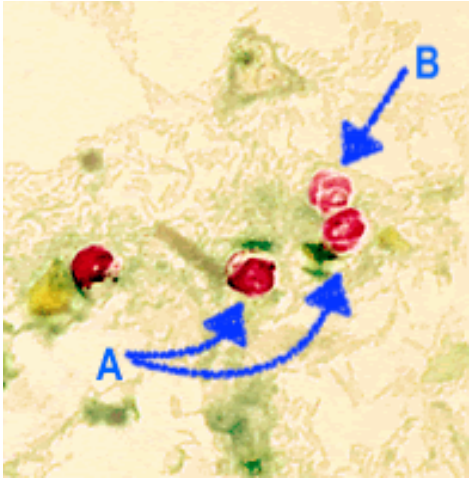
Ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital benyttes syndromdiagnostikk, der avføringsprøver blir screenet for en rekke bakterier, virus og parasitter ved påvisning av genmateriale med Polymerase chain reaction (PCR). Dette er en kommersiell PCR-metode.

Avdelingen ønsker å ha en supplementær PCR-metode for kvalitativ påvisning av *Cryptosporidium parvum* i pasientprøver som er positive for *Cryptosporidium species* (spp.) ved primærscreeningen. Dette er fordi den kommersielle metoden er svært kostbar, og ikke spesifikk for *Cryptosporidium parvum*. Det er dermed ønskelig med en supplementær metode som kan benyttes for påvisning av kun *Cryptosporidium parvum*, og som vil være mer sensitiv og billigere å bruke til påvisning av *Cryptosporidium parvum* enn den kommersielle PCR-metoden. Den supplementære metoden skal også kunne benyttes til å kontrollere tidligere funn og usikre funn på den kommersielle metoden.

Målet for oppgaven er å gjøre et litteratursøk for å finne relevant litteratur for påvisning av *Cryptosporidium parvum* ved bruk av PCR. Litteratursøket skal også omfatte metodevalidering av en supplementær PCR-metode. Litteraturen som blir funnet i litteratursøket skal undersøkes gjennom en litteraturstudie.

1.2 *Cryptosporidium parvum* og cryptosporidiose

Parasitter er dyr som lever i celler eller på en vertsorganisme. De deles inn i to hovedgrupper basert på om de er encellet eller flercellet. Encellede parasitter tilhører hovedgruppen protozoer, mens flercellede parasitter tilhører metazoer. Protozer kan videre deles inn i flagellater, amøber, ciliater og sporozoer. Sporozoer danner sporozitter, som er strukturer som bidrar til overføring av cellene til en ny vertsorganisme (Rolf Schøyen, 2002). I naturen finnes disse vanligvis i en cysteform kalt oocyster (*Cryptosporidiose*, u.å.). Oocyster og sporozytter kan sees i mikroskop, som vist i figur 1.



Figur 1: *Cryptosporidium parvum* oocyster (A) farget med modifisert syrefast teknikk. I de to oocystene til høyre kan man tydelig se sporozitter (B). Bildet er hentet fra (*Cryptosporidiosis- ClinicalKey*, u.å.).

Cryptosporidium parvum er en liten protozo i gruppen sporozoer, og finnes i tarmen hos dyr. Den kan også smitte til mennesker, og er en av de viktigste parasittene som er forbundet med infeksjon i tarm og diaré hos mennesker. *Cryptosporidium spp*. ble oppdaget i 1907, og funnet som årsak til sykdom hos mennesker i 1976. I 1984 ble vannbårne utbrudd av sykdommen beskrevet for første gang (*Cryptosporidiose*, u.å.).

Ifølge Folkehelseinstituttet (FHI) ble det første utbruddet av cryptosporidiose i Norge beskrevet i april 2005, da *Cryptosporidium parvum* ble funnet i avføringsprøver fra 4 mennesker og 3 kalver (*Cryptosporidiose*, u.å.).

Sykdom som skyldes *Cryptosporidium spp.* kalles cryptosporidiose, og opptrer ofte asymptomatisk. Den viktigste smittekilden for mennesker ser ut til å være drikkevann. *Cryptosporidium spp.* smitter ved vehikkelsmitte gjennom kontaminert vann, og matvarer som frukt, bær, grønnsaker og kjøttvarer, som er forurenset med avføring fra smittebærende mennesker eller dyr. *Cryptosporidium spp.* kan også smitte ved kontaktsmitte gjennom

seksuell kontakt eller kontakt med avføring fra smittebærende dyr eller mennesker. For vanlig, friske personer er smittedosen satt til 100 oocyster, mens den kan være lavere for personer med nedsatt immunforsvar. Ifølge FHI er sekundærtilfeller blant familiemedlemmer vanlig (*Cryptosporidiose*, u.å.). Parasitten har en inkubasjonstid på 1-12 dager.

Cryptosporidium spp. kan angripe slimhinner i tarmen, og gi magesmerter, diaré, vekttap og brekninger. Ifølge FHI kan aidssyke og andre pasienter med meget dårlig immunforsvar få alvorlig diaré med stort væsketap dersom de utsettes for smitte. Friske personer kvitter seg gjerne med parasitten i løpet av 3-4 uker, og trenger ingen behandling. Immunsupprimerte kan bli bedre av å behandle immunsvikten. Immunsvekkede kan behandles med det svært dyre bredspektrede antiparasittære midlet Nitazoxanid (*Cryptosporidiose*, u.å.).

1.3 Påvisning av *Cryptosporidium parvum*

Tidligere har *Cryptosporidium parvum* blitt påvist mikroskopisk i utstryk fra fæces. Ved slik undersøkelse kan en rekke ulike fargeteknikker benyttes, deriblant den syrefaste teknikken modifisert Ziehl-Neelsen (mZN), Kinyoun og Giemsa. Dette er en billig undersøkelse som ved funn av *Cryptosporidium parvum* oocyster indikerer aktiv infeksjon (*Cryptosporidiosis-ClinicalKey*, u.å.). Ulemper er at fargingen er arbeidskrevende, mikroskoperingen krever en viss konsentrasjon av oocyster og den har lav sensitivitet. Dette er fordi identifikasjonen av parasitten avhenger av erfaringen og ferdighetene til den som undersøker fæces-utstryket i mikroskopet (Verweij et al., 2004).

Det er utviklet serologiske metoder som ELISA til påvisning av parasitten, og slike metoder benyttes hovedsakelig til epidemiologiske studier. Til ELISA-metoden benyttes monoklonale antistoff, rettet mot antigen på *Cryptosporidium parvum*, som påvises med fluorescens. Det testes for IgA- og IgG-antistoff, og dette gjør det mulig å skille mellom nye, historiske og tilbakevendende infeksjoner (*Cryptosporidiosis- ClinicalKey*, u.å.). Uspesifikke bindinger av antistoff og lav sensitivitet er rapportert som problemer ved bruk av denne metoden (Verweij et al., 2004).

Polymerase chain reaction (PCR) har vist seg å ha god sensitivitet og spesifisitet for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i fæcesprøver (Verweij et al., 2004). PCR detekterer både levedyktige og ikke-levedyktige organismer, og amplifisering av DNA gir flere mål i en og samme reaksjon. PCR er tilgjengelig for de fleste laboratorier, men er en mer kostbar metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum* enn mikroskopering (*Cryptosporidiosis-ClinicalKey*, u.å.).

Ved PCR til påvisning av *Cryptosporidium spp*. kan ulike gener detekteres. De mest vanlige genene som detekteres er 18s rRNA, Cryptosporidium Oocyst Wall Protein (COWP), Heat Shock Protein 70 (HSP 70), Laxer locus og Mikrosatelitt loci (Mary et al., 2013). Sistnevnte benyttes også til differensiering, eller subtyping, mellom ulike *Cryptosporidium*-arter. Også glykoprotein 60 genet og ekstrakromosomale dobbelttrådet RNA-elementer benyttes til subtyping av *Cryptosporidium* (Khurana & Chaudhary, 2018).

PCR-metoder som detekterer 18S rRNA-genet har vist seg å gi høy sensitivitet ved påvisning av *Cryptosporidium spp*. (Jothikumar et al., 2008). Også COWP anses som et svært sensitivt målgen for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces (Shin et al., 2018).

1.4 Polymerase Chain Reaction

PCR er en laboratorieteknikk der egenskapen til enzymet DNA-polymerase utnyttes til å oppformere DNA etter ønske (Nils Olav Sjøberg, 2006). Klinisk brukes PCR på flere måter, blant annet til å påvise og kvantitere tilstedeværelse av DNA. Innen mikrobiologi brukes PCR til å påvise og kvantitere ulike mikrober (*Brukerhåndbok i mikrobiologi*, u.å.). Denne litteraturstudien er rettet mot PCR for påvisning av parasitten *Cryptosporidium parvum*.

Ved påvisning av *Cryptosporidium parvum* som årsak til infeksjon i tarm er fæces prøvematerialet. Fæces inneholder mengder med varierende substanser som kan forstyrre analysereaksjonen, og derfor ekstraheres alt DNA fra prøvematerialet over til en eluent. Dersom det er parasitt-DNA fra *Cryptosporidium parvum* til stede vil dette bli oppformert og økningen i dobbelttrådet DNA vil detekteres.

Reagensene som er nødvendig for en PCR er DNA-polymerase, to primere, kofaktoren Mg^{2+} og deoksynukleotidene dATP, dCTP, dGTP og dTTP.

DNA-polymerase er et enzym som katalyserer syntese av DNA. DNA syntesen skjer fra 5'-enden til 3'-enden. Det vil si at et nytt deoksynukleotid bindes på en åpen 3'-ende på den voksende DNA-tråden. En åpen 3'-ende vil si en ledig hydroksylgruppe på karbon nummer 3 i sukkergruppen i forrige deoksynukleotid.

Primere er oligonukleotider, korte enkelttrådede DNA-tråder, som fungerer som startpunkt for enzymet ved å gi en åpen 3'-ende som DNA-polymerase kan bygge videre på (Nils Olav Sjøberg, 2006). Primerne vil dermed også bestemme hvilket område av DNA som skal kopieres og sekvensenene velges derfor spesifikt. Det brukes to primere, en tilpasset hver av de to komplemetære trådene i DNA. Primerne skal være komplementær til området rett før den delen av templat som skal kopieres, slik at DNA-polymerasen virker over det området. Det velges en primer som er spesifikk til akkurat det området slik at den ikke fester seg uspesifikt. Følgelig må genomet eller sekvensen til genmaterialet være kjent for at det skal kunne velges ut primere (Bruce Alberts et al., 2014).

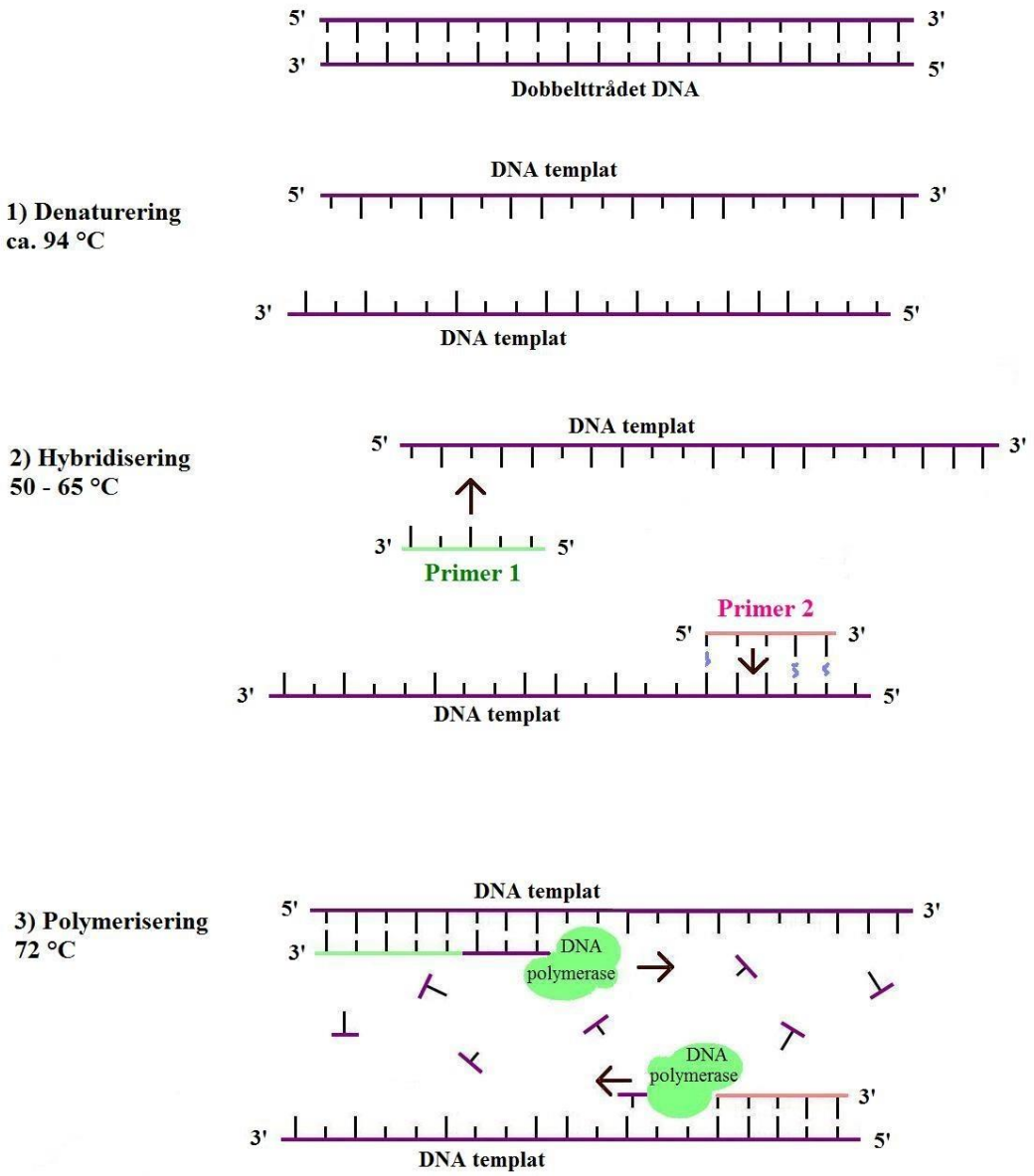
Mg^{2+} er en kofaktor til DNA-polymerase. Kofaktoren er nødvendig for at enzymet skal være aktivt. Deoksynukleotidene er byggesteinene til DNA og er nødvendig for at syntesen skal skje (Nils Olav Sjøberg, 2006).

PCR-reaksjonen er en prosess som består av flere sykluser. En syklus består av 3 trinn. Trinnene er denaturering, hybridisering og polymerisering (Nils Olav Sjøberg, 2006). Disse trinnene er illustrert i figur 2.

Trinn 1, Denaturering: DNA består av to tråder. I PCR skjer det en kopiering der begge trådene fungerer som templat. Templat betyr at tråden er mal for syntese av komplementært DNA (Bruce Alberts et al., 2014). For at det skal kunne skje en kopiering må de to trådene skilles. Dette kalles denaturering. Det gjøres ved at reaksjonsblandingen varmes opp. Temperaturen som er nødvendig for å bryte 50% av hydrogenbindingene mellom de to DNA-trådene kalles smeltepunktet til DNA-tråden. Smeltepunktet avhenger av deoksynukleotidsammensetningen til sekvensen og lengden på DNA-molekylet. Det er to hydrogenbindinger mellom dATP og dTTP, mens det mellom dCTP og dGTP er tre hydrogenbindinger. En DNA-sekvens med overvekt av dCTP og dGTP vil derfor ha høyere smeltepunkt enn en sekvens med samme lengde som har overvekt av dATP og dTTP (Nils Olav Sjøberg, 2006). I denatureringstrinnet er det vanlig å heve temperaturen til 94 °C for å være sikker på at DNA-et blir denaturert uansett sekvens.

Trinn 2, Hybridisering: Dette er et trinn der temperaturen senkes slik at primer klarer å binde seg til templat. For fullstendig binding senkes temperaturen til 50-65 °C. Temperaturen på dette trinnet er også avhengig av DNA-sekvens og lengden på primerne (Nils Olav Sjøberg, 2006).

Trinn 3, Polymerisering: Polymerasen bruker de tilsatte nukleotidene til å bygge opp nye DNA-molekyl (Nils Olav Sjøberg, 2006).



Figur 2: Figuren illustrerer de tre trinnene en PCR-syklus består av. Prinsippet er hentet fra (Nils Olav Sjøberg, 2006).

DNA templat, polymerase, primere, nukleotider og kofaktor er tilsatt i et reaksjonsrør der hele reaksjonen skjer. Syklusene styres ved å heve og senke temperaturen på reaksjonsblandingen (Nils Olav Sjøberg, 2006). Det brukes et PCR-instrument til å styre temperaturen. Instrumentet kalles en termosykler.

In vitro denaturering foregår ved høye temperaturer. De fleste in vivo-enzymer blir denaturert i form av tap av konformasjon og aktivitet ved høye temperaturer. Dette gjelder DNA-polymerase fra mennesker og de fleste bakterier. I utviklingen av PCR ble det brukt

DNA-polymerase fra bakterien *Escherichia coli*. Da ble det tilsatt nytt enzym for hver syklus fordi enzymet ikke var varmestabilt. For å unngå dette brukes i dag isolert enzym fra den varmestabile bakterien *Thermus aquaticus* som lever i varme kilder. DNA-polymerase fra *Thermus aquaticus* kalles Taq Polymerase. Taq polymerase har optimal aktivitet ved 72 °C og halvparten av maksimal aktivitet ved 60-65 °C ((Nils Olav Sjøberg, 2006) og (Innis et al., 1995)).

Når det skal settes opp en deteksjonsanalyse med bruk av PCR må det velges ut en målsekvens for PCR-reaksjonen. Målsekvensen er en del av genomet til organismen som detekteres. Reaksjonsblandingen og trinnene tilpasses den bestemte målsekvensen som skal amplifiseres. Det er også nødvendig å ha en metode for å detektere DNA-amplifiseringen. Det velges to primere som bindes rett før målsekvensen, en tilpasset hver tråd. Temperatur og tid i de ulike trinnene må optimaliseres til hver enkelt metode. Dette er som nevnt fordi temperatur og tid for trinnene avhenger av basesekvens og lengde på DNA. Dersom templat er meget stort kan temperaturen på det første trinnet heves og tiden forlenges slik at en er sikker på at DNA-trådene skilles fra hverandre. Dette gjøres også ofte helt i starten før første syklus fordi lengden på det ekstraherte DNA-et til analytten ofte er mye lengre enn målsekvensen som blir amplifisert videre i syklusene. Det er ofte et helt genom som er utgangspunktet og det kan behøve lengre tid til å denaturere. Derfor er vanlig å starte opp med et ekstra langt denatureringstrinn. For eksempel på 10-15 minutter. Dette blir ofte kalt inkubering.

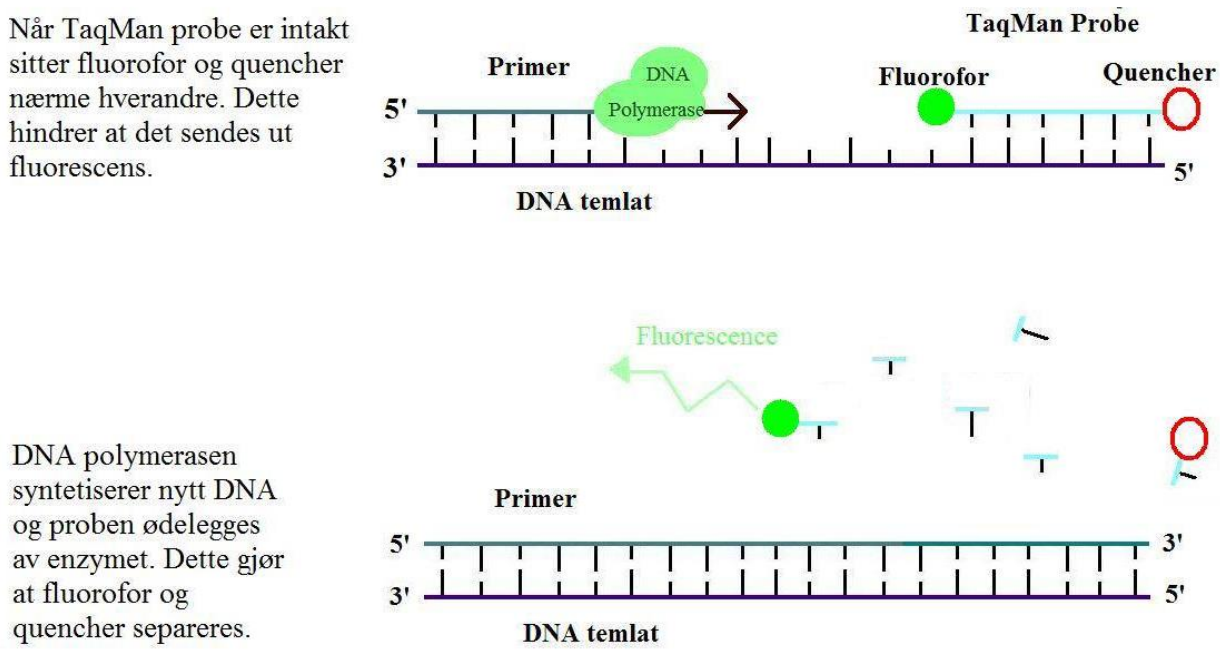
Noen ganger kan det være mulig å slå sammen trinn 2 og 3 slik at hybridisering og polymerisering skjer i samme trinn. Da skjer hybridisering og polymerisering ved ca. 60 °C. Dette kalles to-trinns PCR (Nils Olav Sjøberg, 2006).

Det er mulig å påvise flere gener samtidig ved å tilsette flere par med primere til samme reaksjonsblanding. Dette kalles dupleks dersom det påviser to gensekvenser, og multipleks dersom det påviser flere enn to gensekvenser. Dette krever ekstra hensyn på valg av primersekvenser, men er svært nyttig diagnostisk til screeninganalyser.

PCR kan som sagt brukes på mange måter. I forbindelse med påvisning av *Cryptosporidium parvum* er det noen aktuelle modifikasjoner som er mye brukt. Omtalt i denne litteraturstudien er real-time PCR med bruk av prober eller avlesning ved hjelp av smeltekurveanalyse, og nested PCR der produktet visualiseres vha. agarosegel i kombinasjon med Restriction fragment length polymorphism (RFLP).

1.4.1 Real-time PCR

Real-time PCR er en metode med kontinuerlig avlesning under amplifiseringen av DNA. Dette er mulig ved hjelp av spesiallagde prober. Prober er, i likhet med primere, korte enkelttrådede DNA-biter. De har signalmolekyl bundet til seg. Noen laboratorier lager prober selv, da kalles de in-house-prober. Det finnes også kommersielle prober, for eksempel TaqMan-prober. TaqMan probe er en kort DNA-sekvens med en bundet fluorofor sammen med en quencher, som vist øverst til høyre på figur 3. En fluorofor er en sidegruppe som kan sende ut fluorescens. En quencher er en sidegruppe som hindrer fluoroforen fra å sende ut fluorescens. Probens sekvens velges slik at den er komplementær til et område i den gensekvensen som skal oppformeres. Proben skal binde seg til DNA-tråden samtidig som primer, og er "i veien" til polymerasen når den syntetiserer DNA. Polymerasen fjerner proben og erstatter den med syntetisert DNA. Dette gjør at proben brytes opp slik at fluorofor og quencher separeres, og fluoroforen sender ut fluorescence. Dette prinsippet er illustrert i figur 3 (Arya et al., 2005).



Figur 3: Figuren viser avlesningsprinsippet til TaqMan probe. Prinsipp er hentet fra (Arya et al., 2005).

1.4.2 Nested PCR

Nested PCR er en metode der en anvender PCR i to runder. Metoden går ut på å først gjennomføre en vanlig PCR (PCR-1) og få oppformert en mengde DNA. Deretter tas det ut en del av det oppformerte DNA-et, som tilsettes et nytt primersett. Dette primersettet har et mål innenfor det oppformerte DNA-et. Den andre runden vil gi et kortere PCR-produkt. Man gjør altså en ny PCR (PCR-2) på produktet fra PCR-1.

Nested PCR vil gi mer produkt og dermed økt sensitivitet. I tillegg gir det lavere risiko for amplifisering av feil produkt, og derfor økt spesifisitet. Siden det dannes så mye amplifisert produkt i denne metoden er det vanlig å ha med et ekstra steg etter siste syklus som fungerer som en forlengelse av det siste polymeriseringstrinnet. Dette steget kalles ofte ekstensjonssteg. Formålet med dette steget er å være sikker på at polymerasen er ferdig med å kopiere alle amplikonene.

1.4.3 PCR-smeltekurveanalyse

Smeltekurveanalyse er basert på baseseksensens-påvirkning av smeltetemperaturen til dobbelttrådet DNA. Det er vanlig å bruke fluoroforer til å detektere prosessen. SYBR-green og EvaGreen er eksempler på fluoroforer som kan benyttes til dette. Fluoroforene sender ut fluorescens ved kontakt med dobbelttrådet DNA. Dermed er det mulig å bruke det synkende fluorescens-signalet til å lage en kurve med fluorescens som funksjon av temperaturen. Av formen og plasseringen til kurven er det mulig å skille amplikon med ulik lengde og sekvens.

Ved å generere en kurve for amplikon fra hver prøve kan kurvene brukes til å skille amplikon med ulik sekvens fra hverandre. Dette gir mulighet til å skille ut eventuelle uønskede amplikon (Ririe et al., 1997). Ved å bruke positive kontroller kan amplikonene og DNA-ets opprinnelse identifiseres ved å sammenligne resultatkurver med kontrollenes kurve.

Samtidig er det mulig å skille underarter av en art. Dersom en har brukt primere som amplifiserer et gen som er felles for *Cryptoporidium spp.*, men som har noen variasjoner mellom underartene, kan smeltekurve brukes til å skille dem (Lalonde et al., 2013).

1.4.4 PCR-Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP er forskjeller i lengden av restriksjonsfragmenter som dannes når DNA-molekyler kuttes med samme restriksjonsenzym. Det er ofte en nukleotidendring i DNA-sekvensen som påvirker avstanden mellom restriksjonsseter, enten ved å skape eller eliminere et restriksjonssete. Dette resulterer i at restriksjonsenzymet kutter DNA-molekylet inn i fragmenter av ulik lengde (*Restriction Fragment Length Polymorphism - an overview | ScienceDirect Topics*, u.å.).

Gelelektroforese benyttes for å visualisere RFLP. Ved gelelektroforese blir en positiv og en negativ kontroll, samt en 100bp-ladder som viser molekylærvekt, og prøvertilsatt brønnene i en agarosegel. For gelelektroforese i forbindelse med PCR vil prøvene være amplifisert PCR-produkt, eller amplikon. Under gelelektroforesen vandrer amplikonet i gelen mot den positive polen. Hastiheten amplikonet vandrer i er basert på amplikonets størrelse og ladning. Vandringshastigheten varierer for de ulike amplikonene. Dette vil vise seg som bånd på ulike steder i gelen. Sammenfallende bånd mellom brønnen med prøve og brønnen med positiv kontroll indikerer at prøven er positiv.

RFLP kan gjøres i kombinasjon med PCR, og kalles PCR-RFLP. PCR-RFLP går ut på at PCR-produktet, amplifisert DNA, inkuberes i en reaksjonsblanding som inneholder restriksjonsenzymer. Her vil restriksjonsenzymene kutte DNA-molekylene i restriksjonsfragmenter. Videre vil restriksjonsfragmentene fraksjoneres ved gelelektroforese. Det benyttes gjerne agarosegel, som farges med etidiumbromid for å visualisere DNA-fragmenetenes “vandring” i gelen.

RFLP kan benyttes for å påvise variasjoner både mellom arter og innen arter (Berg, 2012). Det vil si at RFLP kan benyttes for å genotype ulike arter innen *Cryptosporidium spp.* ved å se på variasjoner i genmaterialet. Dermed kan RFLP benyttes til påvisning av *Cryptosporidium parvum*.

1.5 Validering og verifisering

En ny analysemetode må valideres eller verifiseres før den tas i bruk, for å sikre at metoden oppfyller kvalitetskravene som gjelder for det enkelte laboratoriet.

Dersom en analysemetode er validert av noen andre, gjøres en verifisering av metoden av laboratoriet som ønsker å ta den i bruk. Kommersielle metoder er gjerne validert av produsenten, men må verifiseres før de kan tas i bruk på laboratoriet. Hensikten med en verifisering er å dokumentere at metoden fungerer som forventet i eget laboratorium (Dagny Haug Dorenberg et al., 2017).

Validering er definert som bekreftelsen fra en undersøkelse og fremskaffing av objektivt bevis på at de spesielle kravene for en bestemt tiltenkt anvendelse tilfredsstilles (*NA Dok. nr. 48a Klinisk kjemi*, u.å.). En metodevalidering gjøres ved innføring av en ny metode der valideringsdokumentasjon ikke foreligger, eller ved endring av analysemetode, analyseutstyr eller andre omfattende endringer. En metodevalidering er en omfattende undersøkelse av metoden, og hensikten er å bekrefte at kvalitetskravene til metoden innfris. Hvor omfattende metodevalideringen er, avhenger av hvilken type analyse det dreier seg om, hvordan den skal benyttes i klinikken og hva slags valideringsdokumentasjon som foreligger for metoden fra før.

En fullstendig validering omfatter klinisk nytteverdi, praktisk egnethet og analytisk kvalitet. Klinisk nytteverdi er analysens evne til å hjelpe legen til riktig behandling (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002), og henger sammen med hvordan metoden er tenkt benyttet i klinikken. Vurdering av klinisk nytteverdi foretas av en person med medisinsk kompetanse, ofte en overlege ved avdelingen. Praktisk egnethet er konsekvenser av å innføre/endre analysemetode eller analyseinstrument i laboratoriet, med hensyn til arbeidsressurser, miljø og kostnader (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002). Analytisk kvalitet vurderes ved å se på ulike valideringsparametre, og disse velges ut fra analytten som skal måles og metoden som skal benyttes. Riktighet, presisjon, måleområde og måleusikkerhet er valideringsparametre som ofte inngår i vurderingen av metodens analytiske kvalitet.

1.6 Validering av analytisk kvalitet for PCR

Ved metodevalidering av PCR er det en rekke valideringsparametre som skal vurderes for å kunne si noe om den aktuelle metodens analytiske kvalitet. Disse parametrene er linearitet (kun relevant for kvantitative metoder), deteksjonsgrense, klinisk sensitivitet, diagnostisk spesifisitet, riktighet og presisjon (Andreas Christensen et al., 2018).

Linearitet

Linearitet er en metodes evne til å gi resultater som er direkte proporsjonal med konsentrasjonen av analytten i prøven. For å finne lineariteten for kvantitative PCR-metoder benyttes prøver med kjent DNA-konsentrasjon for å generere en lineær standardkurve. Disse prøvene fortynnes 5-10 ganger per prøve, og settes opp i en fortynningsrekke. Fortynningsrekken skal ha konsentrasjoner som starter litt under nedre og går litt over øvre måleområde, eller metodens antatte måleområde. Prøvene i fortynningsrekken analyseres, og resultatene settes opp i et spredningsplott. Det gjøres en lineær regresjonsanalyse for å vurdere korrelasjonskoeffisienten, som bør være nært 1.

Ved bruk av polynomisk regresjonsanalyse kan prøvene med høyest eller lavest konsentrasjon elimineres helt til en får en lineær sammenheng. Laveste og høyeste gjenværende konsentrasjon vil være henholdsvis nedre og øvre kvantiteringsgrense (Andreas Christensen et al., 2018).

Deteksjonsgrense

Den analytiske sensitiviteten for en analysemetode er definert som evnen metoden har til å oppdage svært lave konsentrasjoner av en gitt analytt i en prøve. Analytisk sensitivitet blir gjerne omtalt som deteksjonsgrense (Burd, 2010). Deteksjonsgrensen er den minste mengden eller konsentrasjonen av en analytt som pålitelig kan skilles fra 0, altså en negativ prøve (Jennings et al., 2009). Jo lavere deteksjonsgrensen til metoden er, jo bedre analytisk sensitivitet har den (Burd, 2010).

For å finne metodens deteksjonsgrense benyttes prøver med kjent DNA-konsentrasjon til å lage en fortynningsrekke som går over det forventede målområdet. Det er ønskelig å ha konsentrasjoner både over og under den forventede deteksjonsgrensen. Det er anbefalt å bruke 20 målinger ved, over og under den forventede deteksjonsgrensen. For eksempel kan det benyttes 5 prøvefortynninger i hvert område, som alle måles 4 ganger (Burd, 2010). Målingene settes opp i en standardkurve (Verweij et al., 2004). Kurven vil vise den laveste konsentrasjonen av analytten som analysen klarer å detektere.

Sensitivitet

Den kliniske sensitiviteten for en analysemetode er definert som sannsynligheten for at metoden kan påvise en sykdom hos en pasient som faktisk har sykdommen. Sannsynligheten for at metoden gir falske negative svar er mindre jo høyere sensitiviteten til metoden er (Malt & Stoltenberg, 2020).

Sensitiviteten for en ny metode kan beregnes ut fra positiv prediktiv verdi (PPV) ved å sammenligne metoden med en gullstandard. Gullstandarden er den beste analysen som regnes som den foretrukne metoden for å diagnostisere en bestemt sykdom. Ved bruk av PCR for påvisning av cryptosporidiose grunnet *Cryptosporidium parvum* er gullstandarden gjerne mikroskopi, eller en annen PCR-metode. PPV er prosentandelen av pasienter som gir utslag på analysen som faktisk har sykdommen. PPV regnes ut for den nye metoden etter beregningsformel 1. Prøvene som testes tas fra pasienter som allerede har fått påvist/utelukket sykdommen ved bruk av gullstandarden. Dersom PPV er nært 100, antyder det at den nye metoden er like sensitiv som gullstandarden (Parikh et al., 2008).

$$PPV = \frac{Sanne\ positive}{(Sanne\ positive + falske\ positive)} \times 100 \qquad [1]$$

PPV kan også beregnes ved å analysere prøver med kjent DNA-konsentrasjon. Her vil man analysere både kjente positive og kjente negative prøver, og regne ut PPV basert på antall prøver som ga sanne positive og falske positive resultater.

Spesifisitet

Diagnostisk spesifisitet er en analysemetodes evne til å gi utslag på bare analytten, og ikke gi falskt positivt svar. Falskt positivt svar kan komme av kryssreaksjoner og interferenter. For PCR-metoder skyldes kryssreaksjoner mikroorganismer med lignende DNA-strukturer som analytten.

Laboratoriet kan vurdere en metodes spesifisitet både elektronisk (in silico) ved bruk av bioinformatikk, og praktisk ved å undersøke kryssreaksjoner. Den bioinformatiske måten går ut på å vurdere grad av sekvenslikhet mellom primere/prober og målsekvens ved hjelp av databasesøk i en genbank (Andreas Christensen et al., 2018). Det kan for eksempel gjøres et BLAST-søk. BLAST-programmet sammenligner protein- eller nukleotidsekvenser med sekvensdatabaser, og beregner den statistiske betydningen (*BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*, u.å.).

Kryssreaksjoner undersøkes ved å analysere prøver med mikrober som har lignende DNA-strukturer som analytten. Både mikrober som er vanlig i normalflora, og andre patogene mikrober som kan gi lignende symptomer, undersøkes. Dette er analytter som kan gi falske positive svar i analysen. Alle prøvene som analyseres må være kjent negative for analytten som skal detekteres ved bruk av metoden. Spesifisiteten til metoden regnes ut etter beregningsformel 2 (Parikh et al., 2008), ved å se på antall sanne negative og falske positive prøveresultater som ble funnet i undersøkelsen av kryssreaksjoner.

$$Spesifisitet(\%) = \frac{Sanne\ negative}{(Sanne\ negative + falske\ positive)} \times 100 \qquad [2]$$

Riktighet

Riktighet er hvor nært analysert verdi (resultatet metoden gir) ligger sann verdi (konvensjonell sann verdi eller akseptert referanseverdi). Hvor nære disse verdiene er avhenger av systematiske feil og tilfeldige feil. Disse utgjør til sammen totalfeil.

Systematisk feil er metodens evne til å konsekvent overvurdere eller undervurdere den sanne verdien, altså konsekvent gi verdier som er enten under eller over sann verdi. Slike feil kan ofte fjernes ved rekalibrering.

Tilfeldige feil er uforutsigbare feil som uttrykkes ved metodens presisjon. Riktighet vurderes ved å sammenligne resultat, eller analysert verdi, med sann verdi til prøver med kjent DNA-konsentrasjon. Deretter regnes %BIAS, etter beregningsformel 3, mellom sann verdi og resultatene (Carl A. Burtis, David E. Bruns, 2015). For å kunne si noe om metodens riktighet bør det analyseres 40-100 prøver i 3 nivå: ⅓ negative, ⅓ lavt positive og ⅓ høyt positive prøver (Burd, 2010).

$$\%BIAS = \%Avvik\ fra\ sann\ verdi = \frac{(C_{Målt} - C_{Sann})}{C_{sann}} \times 100 \qquad [3]$$

Presisjon

Presisjon er metodens evne til å produsere samme resultat gjentatte ganger. Presisjonen deles inn i reproduserbarhet og repeterbarhet. Reproduserbarheten er metodens presisjon for vesentlige endringer av forhold, for eksempel forskjellige laboratorier, kalibreringer eller måleinstrumenter. Repeterbarheten er presisjon innen kjøring, altså presisjon når det analyseres flere alikvoter på samme prøve under samme forhold.

Repeterbarhet testes ved å analysere prøver, med kjent konsentrasjon, som dekker hele måleområdet. Det analyseres 20 paralleller for hver prøve, med prøver i 3 ulike nivå; en sterk

positiv prøve, en svak positiv prøve og en så nært deteksjonsgrensen som mulig. Det er viktig at dette gjøres under konstante forhold, ved at prøvene analyseres på samme instrument, med samme målemetode, i samme laboratorium og ved samme bruksbetingelser. I tillegg bør det være én operatør som analyserer prøvene, og analyseringen bør foregå over en kort tidsperiode, gjerne i løpet av samme dag.

Reproduserbarheten testes ved å analysere prøver i de samme 3 nivåene; en sterk positiv, en svak positiv og en så nært deteksjonsgrensen som mulig, men over minst 20 dager. Disse prøvene analyseres med to paralleller. For at reproduserbarhet skal si noe om metodens måleusikkerhet, er det viktig å teste flere ulike variable. Også bruk av reagenser med ulike lotnummer, og at forskjellige operatører utfører analysen, bør testes (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002).

1.7 Problemstilling

Bakgrunnen for oppgaven er å undersøke analytisk kvalitet til en supplementær PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. Oppgavens målsetting var å gjennomføre en litteraturstudie basert på metodeartikler for identifisering av *Cryptosporidium parvum* i human fæces ved bruk av PCR. Litteraturen ble undersøkt med følgende problemstillinger i fokus:

- Hvilke PCR-metoder kan benyttes for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces?
- Hvilke gener benyttes som målgen ved påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces?
- Hvilke reagenser er benyttet i PCR-metodene?
- Hvilke PCR-betingelser er benyttet for de ulike PCR-metodene?
- Hva viser valideringsparametrene (deteksjonsgrense sensitivitet, spesifisitet, repeterbarhet, reproduserbarhet) for påvisning av *Cryptosporidium parvum* ved bruk av PCR-metodene?

På bakgrunn av litteraturstudien vil vi komme med et eget forslag til oppsett av en supplementær PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. Til dette har vi tatt utgangspunkt i følgende problemstillinger:

- Hva slags PCR ville vi benyttet?
- Hvilke reagenser ville vi valgt til ekstraheringen?
- Hvilke PCR-reagenser ville vi benyttet?
- Hvordan ville vi satt opp temperaturprofilen til PCR-metoden?
- Hvilke valideringsparametre vil vi vektlegge ved validering av denne metoden?

2. Materialer og metode

2.1 Kvalitativ metode

Kvalitativ metode er en forskningsmetode som benyttes ved innsamling og analyse av kvalitative data, som er data i form av tekst som for eksempel vitenskapelige artikler (Grønmo, 2020). I kvalitative studier fordyper man seg i data, med formål å bidra med kunnskap som kan ha nytte og overføringsverdi. Slik kunnskap kan ha nytte også i andre kontekster enn den studien er utført i (januar 2010, u.å.).

Det ble benyttet kvalitativ metode for datainnsamling i form av et litteratursøk.

2.2 Materialer

Databaser som ble benyttet for å finne litteratur ved litteratursøk er Google Scholar, ORIA og Pubmed. Nedenfor er de ulike databasene listet opp sammen med artiklene som ble funnet i databasen.

Google Scholar

1 Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of Giardia intestinalis, Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis and Entamoeba histolytica from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review (Laude et al., 2016).

- Artikkelen beskriver en multipleks real-time PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* i human fæces.

ORIA

2 Development of Molecular Diagnosis Using Real-Time PCR and T4 Phage Internal Control to Simultaneously Detect *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Cyclospora cayetanensis* from Human Stool Samples (Shin et al., 2018).

- Artikkelen beskriver en multipleks real-time PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

3 Studies on occurrence, molecular detection and genotyping of Cryptosporidium parvum along with associated risk factors in cattle and human from Aizawl district, Mizoram, India (Das et al., 2020).

- Artikkelen beskriver en nested PCR-metode, i kombinasjon med RFLP, for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

Pubmed

4 Multicentric Evaluation of a New Real-Time PCR Assay for Quantification of *Cryptosporidium* spp. and Identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* (Mary et al., 2013).

- Artikkelen beskriver en dupleks real-time PCR-metode for kvantifisering av *Cryptosporidium spp.* og identifisering av *Cryptosporidium parvum* og *Cryptosporidium hominis* i human fæces.

5 Application of a qPCR Assay with Melting Curve Analysis for Detection and Differentiation of Protozoan Oocysts in Human Fecal Samples from Dominican Republic (Lalonde et al., 2013).

- Artikkelen beskriver en multipleks real-time PCR for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

6 Immunofluorescence Assay and PCR Analysis of *Cryptosporidium* Oocysts and Species From Human Feacal Specimens (Vejdani et al., 2014).

- Artikkelen beskriver en nested PCR-metode, i kombinasjon med RFLP, for for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

7 A Sensitive and Specific PCR Based Method for Identification of *Cryptosporidium* Sp. Using New Primers from 18S Ribosomal RNA (Bairami Kuzehkanan et al., 2011).

- Artikkelen beskriver en nested PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium spp* i human fæces.

8 Detection and Differentiation of *Cryptosporidium spp*. in Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR (Hadfield et al., 2011).

- Artikkelen beskriver en dupleks real-time PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum* og *Cryptosporidium hominis* i human fæces.

2.3 Metode

For å finne litteratur ble det gjort søk i vitenskapelige databaser, som nevnt i avsnitt 2.2. Det ble først gjort enkle søk i Google Scholar og Pubmed ved hjelp av søkeord i søkefeltet. Søkeord som ble brukt var "*Cryptosporidium parvum*", "Quantitativ PCR", "Real-time PCR", "Cryptosporidiose" og "Validation". Dette ble gjort for å innhente et bredt overblikk over feltet. Senere ble det gjort mer avanserte søk ved bruk av ulike filter. En oversikt over søksstrategien for de mer avanserte litteratursøkene er vist i tabell 1.

I Google Scholar ble det gjort søk med søkeord "Real-time PCR cryptosporidium parvum" og egendefinert tidsperiode 2010-2020 på søket. Det ble 6430 treff, men kun en artikkel ble valgt ut som relevant. Det ble sett etter artikler som omhandlet påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces ved bruk av PCR. At artiklene ikke er gamle og utdaterte ble vektlagt. Derfor ble kun artikler fra de siste 10 årene valgt ut.

I ORIA ble det gjort litteratursøk med søkeord "Cryptosporidium parvum OG PCR", med innstilling for at kun artikler fra de siste 10 år dukker opp i søket. Søket ga 3959 treff, og av disse ble 2 artikler som omhandlet bruk av PCR for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i humant prøvemateriale valgt ut.

I pubmed ble det gjort søk ved hjelp av builderfunksjon der det ble lagt til kriterier for søket slik at søket ble mer spesifikt. Det ble valgt meSH-term som står for medical subject headings. Det ble lagt til "PCR" og "*Cryptosporidium parvum*" som meSH-term. Det ble krysset av for "free full text". Dette søket ga 198 treff, og 5 artikler ble valgt ut som relevante fordi de omhandlet PCR-analyse av humant prøvemateriale.

Tabell 1: Søksstrategi for litteratursøket, og resultatene (artiklene som ble funnet).

Database	Søkeord	Relevante artikler [nr]
Google Scholar	Real-time PCR cryptosporidium parvum	1
ORIA	Cryptosporidium parvum OG PCR	2 og 3
Pubmed	Cryptosporidium parvum PCR	4, 5, 6, 7 og 8

3. Resultater og diskusjon

Det er undersøkt fem metodebeskrivelser av real-time PCR for påvisning av *Cryptosporidium parvum*, beskrevet av Laude et al. (2016), Shin et al. (2018), Lalonde et al. (2013), Mary et al. (2013) og Hadfield et al. (2011). I tillegg er tre metodebeskrivelser av nested PCR som påviser *Cryptosporidium spp*,, beskrevet av Das et al. (2020), Vejdani et al. (2014) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011), undersøkt i litteraturstudien. Videre presenteres ulike variasjoner i reagenser, PCR-betingelser, målgen og valideringsparametre for disse PCR-metodene. PCR-metodene er for ordens skyld delt inn i multipleks real-time PCR, dupleks real-time PCR, og nested PCR.

3.1 Multipleks Real-time PCR-metoder

Tre multipleks real-time PCR-metoder ble undersøkt i litteraturstudien. PCR-metodene er beskrevet av Laude et al. (2016), Shin et al. (2018) og Lalonde et al. (2013). Primere som er benyttet for disse multipleks real-time PCR-metodene er vedlagt i tabell A, vedlegg 1.

Tabell 2 viser analysebetingelsene for de tre multipleks real-time PCR-metodene.

PCR-metodene er screening-analyser som påviser flere parasitter. Metodene som er beskrevet av Shin et al. (2018) og Lalonde et al. (2013) har spesifikt *Cryptosporidium parvum* som en av parasittene som påvises. Metoden beskrevet av Laude et al. (2016) påviser *Cryptosporidium parvum* og/eller *Cryptosporidium hominis* ved å detektere et gen som er felles for disse to artene. Dette tilsvarer tilnærmet påvisning av *Cryptosporidium spp*. fordi *Cryptosporidium parvum* og *Cryptosporidium hominis* er de to vanligste artene av *Cryptosporidium spp.* som er å finne ved cryptosporidiose. De utgjør omtrent 90% av tilfellene av cryptosporidiose, men dette varierer i ulike områder av verden (Mary et al., 2013).

Tabell 2: Analysebetingelser for tre publiserte multipleks real-time PCR-metoder som påviser *Cryptosporidium parvum* med flere parasitter i human fæces.

Parasitt	Målgen	PCR-reagens	Produsent	PCR betingelser						Deteksjon av PCR-produkt	Referanse
				Inkubering	I	II	III	Antall sykluser	Tid totalt		
Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis m.fl	18S rRNA	G-DiaParaTrio	Diagenode Diagnostics	-	-	-	-	-	-	Double-Dye Probe, Texas Red	Laude et al. (2016)
Cryptosporidium parvum, m.fl	COWP	◦ DNA templates ◦ TOP-real™ qPCR 2×Premix ◦ Primermix ◦ Probemix ◦ HPLC-vann	-	95°C, 15 min	95°C, 10 sek	60°C, 1 min		40	62min	TaqMan Probe FAM™/BHQ-1®	Shin et al. (2018)
Cryptosporidium parvum, m.fl.	18S rRNA	-	-	98°C, 2 min	98°C, 30 sek	65°C, 30 sek	72°C, 30 sek	40	62 min	Smeltekurve-analyse	Lalonde et al. (2013)

I: denaturering, II: hybridisering, III: polymerisering, sammen utgjør de èn syklus. I rutene med - foreligger det ikke informasjon om faktoren.

PCR- reagens

For multipleks real-time PCR-metodene beskrevet av Laude et al. (2016), Shin et al. (2018) og Lalonde et al. (2013) er variasjonen i PCR-reagens vist i tabell 2.

Metoden beskrevet av Laude et al. (2016) benytter kommersielle reagenser i form av kittet G-DiaParaTrio. Kittet er designet for å detektere de tre vanligste parasittene som gir diare hos mennesker; *Entamoeba histolytica, Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. Kittet beskrives av produsenten, Diagenode diagnostics, som lett å bruke i kvalitativ diagnostisk analyse. Kittet inneholder en blanding med prober og primere, en flaske H_2O, en positiv kontroll, en negativ kontroll og en internkontroll. Internkontrollen analyseres sammen med prøven for å teste for PCR-inhibitorer (diagnostics, u.å.). Kriteriet for å godkjenne prøveresultatet er at resultatet til den negative kontrollen er negativt, resultatet til den positive kontrollen er positivt og inhibitorkontrollen må ha thresholdverdi ≤ 36 (Laude et al., 2016)

Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) har benyttet seg av egenlagde reagenser til PCR-reaksjonen. Fordeler med dette er at da vet laboratoriepersonellet hva alle reagenser inneholder slik at det er enkelt å tilpasse de ulike parametrene i analysen. Det blir også lettere å gjøre feilsøking. Bakdeler med å lage reagenser selv er at det er arbeidskrevende, og krever ressurser som kan veies opp mot prisen av kommersielle reagenser. Det er også større risiko for menneskelige feil, i form av for eksempel pipetteringsfeil, som kan påvirke analysen.

Kommersielle reagenser kommer ofte med gode bruksanvisninger slik at reagenset tilpasses metoden like lett som egenlagde reagenser. Det er raskt å sette opp analysen dersom de kommersielle reagensene fungerer godt. En annen fordel med kommersielle reagenser er at det ofte finnes artikler som beskriver andre laboratoriers erfaringer med dem. Dette gir også mulighet for å utveksle og sammenligne erfaringer ved bruk av reagensene med andre brukere.

Metoden beskrevet av Lalonde et al. (2013) har ikke oppgitt reagensene som er benyttet for PCR-metoden.

PCR-betingelser

Metoden beskrevet av Laude et al. (2016) har ikke oppgitt PCR-betingelser. Metodene beskrevet av Shin et al. (2018) og Lalonde et al. (2013) har oppgitt PCR-betingelsene som er vist i tabell 2. Til tross for ulike PCR-betingelser, tar analysene totalt like lang tid.

Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) starter med en inkubering på 15 min, mens metoden beskrevet av Lalonde et al. (2013) har en inkubering på 2 min. Dette er litt kort. Som nevnt i innledningen er det vanlig å ha litt lengre inkubering i begynnelsen for å være sikker på at det opprinnelige ekstraherte DNA blir denaturert. Metoden beskrevet av Lalonde et al. (2013) får likevel oppformert DNA ved bruk av korte inkuberingen. Kort inkubering kan dermed være en god løsning for å spare tid for analysen.

Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) er en to-trinns PCR, mens metoden beskrevet av Lalonde et al. (2013) er en tre-trinns PCR. Som vist i tabell 2, har to-trinns PCR-metoden hybridisering og polymerisering i ett trinn ved 60 °C. Enzymet DNA-polymerase vil ha halvparten av maksimal effekt ved denne temperaturen. Tre-trinns PCR-metoden har polymerisering ved 72°C, som er nær den optimale temperaturen for enzymet. Grunnen til at de velger så forskjellige PCR-betingelser kan være at metodene har ulike formål med analysen. Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) er kvalitativ, mens metoden beskrevet av Lalonde et al. (2013) er kvantitativ.

Deteksjon av PCR-produkt

Som vist i tabell 2 har metodene beskrevet av Laude et al. (2016) og Shin et al. (2018) benyttet prober til deteksjon av amplifiseringen.

Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) har benyttet egendesignede prober. Probene er designet med Geneious version R8 software. Selskapet Macrogen Inc. syntetiserte probene og primerne som er benyttet i denne metoden (Shin et al., 2018). Metoden beskrevet av Laude et al. (2016) har brukt kommersielle prober som følger med i kittet G-DiaParaTrio. For begge de publiserte metodene beskrives gode resultater med bruk av sine respektive prober. Metodene blir omtalt som enkle og raske screeninganalyser for påvisning av patogent agens ((Shin et. al, 2018) og (Laude et al., 2016)).

Metoden beskrevet av Lalonde et al. (2013) har benyttet smeltekurveanalyse for deteksjon. Av artikkelen kommer det frem at smeltekurve er et billigere alternativ enn prober, og at det er enklere å utvikle. En bakdel med smeltekurveanalyse er at det ved differensiering av *Cryptosporidium spp*. kan være behov for utstyr og software med mulighet for høy-oppløselig smeltekurveanalyse eller sekvensering for å bekrefte resultatene (Lalonde et al., 2013).

3.2 Dupleks Real-time PCR-metoder

To dupleks real-time PCR-metoder ble funnet i litteraturstudien. Primere som er benyttet for metodene beskrevet av Mary et al. (2013) og Hadfield et al. (2011) er vedlagt i tabell B, vedlegg 2. Analysebetingelsene for PCR-metodene er presentert i tabell 3.

Både metoden beskrevet av Mary et al. (2013) og metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) påviser *Cryptosporidium spp.* I tillegg differensieres *Cryptosporidium parvum* og *Cryptosporidium hominis*. Dette vil si at det ved påvisning av slekten *Cryptosporidium spp.* kan bestemmes om det er *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* eller en annen art innen slekten, som er årsak til cryptosporidiose.

Tabell 3: Analysebetingelser for to publiserte dupleks real-time PCR-metoder som påviser *Cryptosporidium spp*, og differensierer *Cryptosporidium parvum* og *Cryptosporidium hominis*, i human fæces.

Parasitt	Målgen	PCR-reagens	Produsent	PCR betingelser						Deteksjon av PCR-produkt	Referanse
				Inkubering	I	II	III	Antall sykluser	Tid totalt		
Cryptosporidium spp. *C.parvum/C. hominis*	18S rRNA	-	-	94°C, 10 min	94°C, 10 sek	54°C, 30 sek	72°C, 10 sek	45	48 min	TaqMan Probe FAM/BHQ	Mary et al. (2013)
Cryptosporidium spp. *C.parvum* og *C.hominis*	***C. spp.*** 18S rRNA ***C. parvum*** LIB13-locus ***C. hominis*** LIB13-locus	TaqMan environmental master mix 2.0	Applied Biosystems	95°C, 10 min	95°C, 15 sek	60°C, 1 min		55	79 min	TaqMan Probe VIC/NFQ	Hadfield et al. (2011)

I: denaturering, II: hybridisering, III: polymerisering, sammen utgjør de èn syklus. I rutene med - foreligger det ikke informasjon om faktoren.

PCR- reagens

Metoden beskrevet av Mary et al. (2013) oppgir ikke PCR-reagens som er benyttet. Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) oppgir at det er brukt reagenset TaqMan environmental master mix 2.0, som vist i tabell 3. Dette er et kit med reagenser laget for real-time PCR, med mulighet for kvalitativ deteksjon. Kittet inneholder Taq DNA polymerase, deoksynukleotider, ROX™ referansefargestoff og optimalisert bufferløsning. Kittet inkluderer ikke primere, prober og vann. Det kan dermed tilpasses flere ulike PCR-analyser. Kittet beskrives av produsenten som godt egnet for analyser med utfordrende prøvemateriale (*Protocol: TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 Protocol (English)*, u.å.).

PCR-betingelser

Variasjon i PCR-betingelser for de to dupleks real-time PCR-metodene beskrevet av Mary et al. (2013) og Hadfield et al. (2011) er vist i tabell 3.

Metoden beskrevet av Mary et al. (2013) er en kvantitativ tre-trinns PCR som tar 48 minutter. Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) er en kvalitativ to-trinns PCR som tar 79 minutter. Det observeres samme tendens som hos de multiplekse metodene beskrevet av Shin et al. (2018) og Lalonde et al. (2013). Vi antar dermed at det er en sammenheng mellom kvalitativ metode og to-trinns PCR, samt kvantitativ metode og tre-trinns PCR.

Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) tar lengre tid enn metoden beskrevet av Mary et al. (2013). Dette er fordi førstnevnte har flere sykluser. Dette kan skyldes at Taq polymerase har halvert aktivitet ved 60°C.

Deteksjon av PCR-produkt

Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) benytter proben TaqMan Probe MGB VIC/NFQ til deteksjon av amplifiseringen, se tabell 3. Proben er produsert av ThermoFisher Scientific. VIC er fluoroforen og NFQ er quencheren. NFQ står for nofluorescent quencher, det betyr at den ikke sender ut fluorescens. Proben har også en MGB-del. MGB står for middel groove binding og er lagt til for å heve smeltepunktet. Dette gjør binding mellom templat og proben lettere fordi proben kan være kortere og fremdeles ha nokså høyt smeltepunkt. Den kortere sekvensen gjør at fluorofor og quencher kommer nærmere hverandre, slik at hemmingen av fluorescens blir mer effektiv. Dette hindrer bakgrunnsstøy og øker sensitivitet og presisjon (*TaqMan™ MGB Probe*, u.å.).

Metoden beskrevet av Mary et al. (2013) bruker TaqMan Probe MGB FAM/BHQ, produsert av Sigma-Aldrich. Her benyttes FAM som fluorofor. Denne proben har også en MGB del som er beskrevet i forrige avsnitt. BHQ står for black hole quencher. Det er en quencher som absorberer fluorescens og sender ut varme. Dette gir lav fluorescensstøy og fører til høyere signal-støy ratio. Dette gir bedre sensitivitet enn prober som sender ut igjen fluorescensen. BHQ absorberer over det visuelle spektrumet og kan derfor brukes sammen med ulike fargestoff/fluoroforer. Dermed er den godt egnet til multipleks PCR (*Black Hole Quencher*®, u.å.).

BHQ og NFQ er to quenchere som fungerer på samme måte. NFQ fungerer over et bredt spekter i likhet med BHQ og er dermed også godt egnet til multipleks PCR. Forskjellen er at de er laget av ulike produsenter.

3.3 Nested PCR-metoder

Tre nested PCR-metoder ble funnet i litteraturstudien. Primere som er benyttet for metodene beskrevet av Das et al. (2020), Vejdani et al. (2014) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011) er vedlagt i tabell C, vedlegg 3. PCR-betingelsene for metodene er presentert i tabell 4. Siden nested PCR består av to individuelle amplifiseringer, er raden for hver metode delt i to i tabellen. For ordens skyld blir de to amplifiseringene kalt PCR-1 og PCR-2 i diskusjonen. Den øverste inndelingen representerer betingelsene for PCR-1. Det er den amplifiseringen som gjennomføres først med ekstrahert DNA som templat. Den andre inndelingen representerer betingelser for PCR-2 der amplikon fra PCR-1 er templat.

De tre publiserte nested PCR-metodene påviser *Cryptosporidium spp.* i human fæces. I kombinasjon av RFLP kan også *Cryptosporidium parvum* i prøven påvises.

Tabell 4: Analysebetingelser for tre publiserte nested PCR-metoder som påviser *Cryptosporidium spp*. i human fæces.

Parasitt	Mål-gen	PCR-reagens	PCR betingelser							Deteksjon av PCR produkt	Referanse
			Inkubering	I	II	III	Antall sykluser	Ekstensjon steg	Tid totalt		
Cryptosporidium spp. *(Cryptosporidium parvum)*	18S rRNA	DreamTaq master mix (2X), produsert av ThermoFischer SCIENTIFIC	94°C, 5 min	94°C, 1 min	49,5°C, 1 min	72°C, 1 min	35	72°C, 10 min	3,6 timer	Gelelektroforese etterfulgt av RFLP	Das et al. (2020)
			94°C, 3 min	94°C, 45 sek	56°C, 45 sek	72°C, 1 min	35	72°C, 7 min			
Cryptosporidium spp. *(Cryptosporidium parvum)*	18S rRNA	◦10x PCR buffer ◦dNTP ◦Primere, ◦Taq DNA polymerase	94˚C, 3 min	94˚C, 45 sek	55˚C, 45 min	72˚C, 1 min	30	72°C, 10 min	46 timer	Gelelektroforese etterfulgt av RFLP	Vejdani et al. (2014)
			94˚C, 3 min	94˚C, 45 sek	55˚C, 45 min	72˚C, 1 min	30	72°C, 7 min			
Cryptosporidium spp.	18S rRNA	-	94°C, 5 min	94°C, 1 min	60°C, 1.30 min	72°C, 2 min	35	72°C, 10 min	5,6 timer	Gelelektroforese	Bairami Kuzehkanan et al. (2011)
			94°C, 5 min	94°C, 1 min	60°C, 1.30 min	72°C, 2 min	35				

I: denaturering, II: hybridisering, III: polymerisering, sammen utgjør de èn syklus. I rutene med - foreligger det ikke informasjon om faktoren. Den øverste inndelingen under «PCR-betingelser» gjelder for PCR-1, mens den andre inndelingen representerer betingelser for PCR-2. Tiden for analysen i kolonnen «tid totalt» er regnet ut med inkubasjon, sykluser og extension PCR-1 og PCR-2 sammenlagt for hver metode.

PCR- reagens

Variasjon i PCR-reagensene for metodene beskrevet av Das et al. (2020), Vejdani et al. (2014) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011) er vist i tabell 4.

Metoden beskrevet av Das et al. (2020) benytter det kommersielle PCR-reagenset DreamTaq mastermix, produsert av ThermoFischer SCIENTIFIC. Dette reagenset er ferdiglaget fra produsenten, og inneholder DreamTaq DNA Polymerase, optimalisert DreamTaq-buffer, $MgCl_2$ og dNTP (*DreamTaq PCR Master Mix (2X)*, u.å.).

Metoden beskrevet av Vejdani et al. (2014) benytter egenlagde PCR-reagenser.

Bruk av ferdiglaget kommersielt reagens i metoden beskrevet av Das et al. (2020) sparer tid og reduserer faren for pipetteringsfeil ved tillaging av reagens. For metoden beskrevet av Vejdani et al. (2014) er denne faren for feil til stede.

Metoden beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011) har ikke oppgitt PCR-reagenser.

PCR-betingelser

Variasjon i PCR-betingelsene for nested PCR-metodene beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011), Vejdani et al. (2014) og Das et al. (2020) er vist i tabell 4.

Ett sett primere til PCR-1 og ett sett til PCR-2, kan medføre ulike tilpasninger til hver av de to PCR-ene som utgjør en nested PCR. Metodene beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011) og Vejdani et al. (2014) benytter samme betingelser til PCR-1 og PCR-2 i syklusene. Metoden beskrevet av Das et al. (2020) har kortere inkubering, denaturering og hybridisering i PCR-2 enn i PCR-1. Dette kan skyldes at det i PCR-2 er en kortere DNA-sekvens som skal amplifiseres.

Et ekstensjonssteg gir PCR-reaksjonen ekstra tid slik at templat kopieres fullstendig. Metodene beskrevet av Das et al. (2020) og Vejdani et al. (2014) har begge ekstensjonssteg på 10 min etter PCR-1 og på 7 min etter PCR-2. Metoden beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011) har ikke ekstensjonssteg etter PCR-1, men har et ekstenssjonssteg på 10 minutter etter PCR-2. Ekstensjonssteget er viktigst å ha med etter PCR-2, fordi det er etter denne PCR-en at man har fått amplifisert det endelige PCR produktet.

Hybridiseringstrinnet for metoden beskrevet av Vejdani et al. (2014) skiller seg ut. Metoden har et hybridiseringstrinn på 45 minutter. Dette er veldig lenge. Teoretisk er det ingen grunn til at hybridisering skal ta så lang tid. Metoden beskrevet av Vejdani et al. (2014)

har primere som ligner primerne metodene beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011) og Das et al. (2020) har brukt - se tabell C, vedlegg 3. Det er derfor grunn til å stille spørsmål om dette kan være en skrivefeil i den publiserte artikkelen som beskriver metoden, og at det egentlig skal stå 45 sekunder. PCR-betingelsene beskrevet i metoden Vejdani et al. (2014) ansees derfor som usikre.

Deteksjon av PCR-produkt

Nested PCR-metodene beskrevet av Das et al. (2020), Vejdani et al. (2014) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011) har benyttet seg av gelelektroforese for å påvise PCR-produktet. Dette er vist i tabell 4.

Videre har metodene beskrevet av Das et al. (2020) og Vejdani et al. (2014) gjort RFLP-analyse av PCR-produktet. Målet med RFLP er å genotype *Cryptosporidium spp*. Dermed kan prøver som er positive for *Cryptosporidium parvum* skilles fra prøvene som er positive for *Cryptosporidium hominis* eller en annen art innen *Cryptosporidium spp*.

Metoden beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011) benytter ikke RFLP og påviser dermed bare *Cryptosporidium spp*.

Fordeler med RFLP er at det er en rimelig metode som er lett og designe. I tillegg krever den ikke tilgang til dyre instrumenter. Ulemper med denne metoden er at den krever relativt mye manuelt arbeid for den som utfører metoden, at den tar lang tid fra analysen starter til den er ferdig. RFLP er ikke egnet for store mengder prøver (Berg, 2012).

3.4 Valideringsparametre for de ulike PCR-metodene

For at en PCR-metode skal gi korrekte resultater er det viktig at den har god sensitivitet og spesifisitet. Metodens deteksjonsgrense, repeterbarhet og reproduserbarhet spiller også en viktig rolle i vurderingen av den analytiske kvaliteten av analysen.

En oversikt over valideringsparametre for ulike PCR-metoder for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces er vist i tabell 5.

Tabell 5: Valideringsparametre for ulike publiserte PCR-metoder for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

Metode	Parasitt	Deteksjonsgrense [Oocyter/g fæces]	Sensitivitet [%]	Spesifisitet [%]	Repeterbarhet [%]	Reproduserbarhet [%]	Referanse
Multipleks Real-time	*Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* m.fl	-	96,0*	100,0	-	-	Laude et al. (2016)
Multipleks Real-time	*Cryptosporidium parvum* m. fl	1000	99,8**	100,0	-	-	Shin et al. (2018)
Multipleks Real-time	*Cryptosporidium parvum* m.fl.	-	-	-	-	-	Lalonde et al., 2013)
Dupleks Real-time	*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*	300	-	-	-	-	(Mary et al., 2013)
Dupleks Real-time	*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*	200	100,0*	99,1	97,0	100,0	(Hadfield et al., 2011)
Nested	*Cryptosporidium spp*.	-	-	-	-	-	(Das et al., 2020)
Nested	*Cryptosporidium spp*.	-	-	-	-	90,9	(Vejdani et al., 2014)
Nested	*Cryptosporidium spp*.	-	100,0*	100,0	-	-	(Bairami Kuzehkanan et al., 2011)

Kommentar: I rutene med - foreligger det ikke informasjon om faktoren. Sensitivitetsverdier markert med * er beregnet ved bruk av en gullstandard for påvisning av *Cryptosporidium* i human fæces. Verdier markert med ** er beregnet ved å bruke prøver med kjent mengde oocyster.

Deteksjonsgrense

Tabell 5 viser at dupleks real-time PCR-metodene beskrevet av Mary et al. (2013) og Hadfield et al. (2011) har lavere deteksjonsgrense for *Cryptosporidium parvum* enn multipleks real-time PCR-metoden beskrevet av Shin et al. (2018). 200 oocyster/g fæces er ekvivalent med 2 oocyster per PCR (Hadfield et al., 2011). Det vil si at dupleks real-time PCR-metodene beskrevet av Mary et al. (2013) og Hadfield et al. (2011) kan påvise prøver med kun 2-3 oocyster, mot 10 oocyster for deteksjon av *Cryptosporidium parvum* med multipleks real-time PCR-metoden beskrevet av Shin et al. (2018). Dupleks real-time PCR-metodene vil dermed kunne gi bedre utslag på prøver med lavere konsentrasjoner. Dette gir bedre analytisk sensitivitet.

Sensitivitet

Den kliniske sensitiviteten til de ulike PCR-metodene, se tabell 5, er beregnet på ulike måter, og vil dermed være vanskelige å sammenligne.

Multipleks real-time PCR-metoden beskrevet av Laude et al. (2016) og nested PCR-metoden beskrevet av Bairami Kuzehkanan et al. (2011) har beregnet sensitiviteten ved å sammenligne metodene med mikroskopering som gullstandard. Sensitivitet på henholdsvis 96% og 100% antyder at metodene har minst like god sensitivitet som gullstandarden.

Dupleks real-time PCR-metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) har benyttet seg av nested PCR som gullstandard. Sensitivitet på 100% viser at real-time PCR-metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) er like sensitiv som nested PCR-metoden som er brukt som gullstandard.

For multipleks real-time PCR-metoden beskrevet av Shin et al. (2018) er sensitiviteten beregnet ut fra prøver med kjent mengde oocyster. En sensitivitet på 99,8% tilsier at metoden med stor sannsynlighet vil gi korrekte positive utslag på *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

Spesifisitet

Metodene beskrevet av Laude et al. (2016), Shin et al. (2018), Hadfield et al. (2011) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011) har diagnostisk spesifisitet på 99-100%, se tabell 5. Dette antyder at PCR-metodene har svært god evne til å ikke gi falske positive svar, og dermed er spesifikke for *Cryptosporidium spp.* og *Cryptosporidium parvum*.

Repeterbarhet og reproduserbarhet

Som vist i tabell 5 har dupleks real-time PCR-metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) repeterbarhet på 97% og reproduserbarhet på 100%. Nested PCR-metoden beskrevet av Vejdani et al. (2014) har reproduserbarhet på 90,9%. Siden metodene ikke har oppgitt hvilke presisjonskrav som benyttes, har vi ikke grunnlag for å vurdere metodenes repeterbarhet og reproduserbarhet.

3.5 Forslag til en supplementær PCR-metode

Det er ønskelig at en supplementær PCR-metode skal påvise *Cryptosporidium parvum* i human fæces. Det er ikke nødvendig med en multipleks eller dupleks PCR-metode. Den supplementære metoden skal kunne bekrefte positive og usikre funn av *Cryptosporidium parvum* fra en kommersiell screeningmetode benyttet i medisinske laboratorier. En kvalitativ PCR-metode er godt egnet til dette formålet. Det er en fordel at den supplementære metoden er en rask og enkel metode som ikke krever lang tid og mye manuelt arbeid.

I litteraturstudien kommer det frem at nested PCR og real-time PCR er PCR-metoder som i dag benyttes ved medisinske laboratorier for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. Ved påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces er det ikke noe problem med dårlig sensitivitet og spesifisitet ved bruk av real-time PCR sammenlignet med nested PCR. Siden god sensitivitet og spesifisitet er den eneste fordelen med nested PCR, og den tar betydelig lengre tid enn real-time, ser vi ingen grunn til å velge den over real-time PCR. Real-time PCR har vist seg å være en rask PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum*.

Metodene som ble undersøkt i litteraturstudien benytter prober, smeltekurveanalyse eller gelelektroforese for å detektere/visualisere PCR-produktet. Smeltekurveanalyse kan ha behov for utstyr og software med mulighet for høy-oppløselig smeltekurveanalyse eller sekvensering for å bekrefte resultater av *Cryptosporidium spp*., og derfor velges dette bort. Gelelektroforese kan være et billigere alternativ enn prober for å visualisere PCR-produktet. I metodene inkludert i litteraturstudien ble det brukt gelelektroforese i kombinasjon med RFLP for å påvise *Cryptosporidium parvum.* Å gjennomføre PCR, gelelektroforese og RFLP er svært tidkrevende, og det medfører en del manuelt arbeid.

For den supplementære PCR-metoden faller valget dermed på en kvalitativ real-time-PCR ved bruk av TaqMan MGB probe for å visualisere PCR-produktet.

Ekstrahering

I litteraturstudien kommer det frem at multipleks real-time PCR-metodene beskrevet av Shin et al. (2018), Lalonde et al. (2013), og nested PCR-metodene beskrevet av Vejdani et al. (2014) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011) benytter seg av det kommersielle reagenskittet QIAamp® Stool Mini Kit, produsert av Qiagen, til ekstraheringen. Kittet benyttes for å isolere DNA fra ferske eller fryste fæces-prøver. Kittet inneholder QIAamp Mini Spin kolonner, QIAGEN Proteinase K, InhibitEX Buffer, vaske- og elueringsbuffer, og samlerør.

QIAamp® Stool Mini Kit er godt egnet til ekstraksjon av DNA fra fæcesprøver. Ekstraheringen er en prosess som kun tar omtrent 25 minutter fra ferdig prøve til rent DNA, og krever lite manuell prøvehåndtering. (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit - QIAGEN Online Shop*, u.å.). Derfor foreslås dette kittet til ekstraheringsprosessen for den supplementære PCR-metoden.

PCR-betingelser og reagenser

Metoden beskrevet av Hadfield et. al (2011) har spesifisert at det er LIB13-locus på 18S rRNA-genet som detekteres for påvisning av *Cryptosporidium parvum*. Dette genet har vist seg å være sensitivt for påvisning av *Cryptosporidium parvum*.

Fra vedlegg 2 fremkommer det at det benyttes Forward primer 5'-TCC TTG AAA TGA ATA TTT GTG ACT CG-3' og Reverse primer 5'-TTA ATG TGG TAG TTG CGG TTG AAC-3' ved bruk av denne metoden. Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) har som vist i tabell 5 sensitivitet på 100% og spesifisitet på 99,1% for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. Det foreslås bruk av de samme primerne som benyttes i metoden beskrevet av Hadfield et. al (2011) for den supplementære metoden. Metoden beskrevet av Hadfield et. al (2011) benytter TaqMan MGB VIC/NFQ probe med sekvens 5'-TAT CTC TTC GTA GCG GCG TA-3'. Denne proben passer med de foreslåtte primerne (Hadfield et al., 2011). Det foreslås bruk av denne proben, sammen med de foreslåtte primerne, i den supplementære metoden.

For PCR-reagens foreslås bruk av det kommersielle reagenskittet TaqMan environmental master mix 2.0, produsert av Applied Biosystems. Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) benytter dette reagenskitet. Reagensene i kittet er laget for real-time PCR, med mulighet for kvalitativ deteksjon (*Protocol: TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 Protocol (English)*, u.å.).

Det er observert en sammenheng mellom kvalitative metoder og to-trinns PCR blant de publiserte metodebeskrivelsene som er undersøkt i litteraturstudien. Derfor foreslås det bruk av to-trinns PCR for kvalitativ påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. Metoden beskrevet av Hadfield et. al (2011) bruker følgende PCR-betingelser: inkubering (95°C, 10 min), etterfulgt av 55 sykluser med denaturering (95°C, 15 sek), hybridisering og polymerisering (60°C, 1 min). Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) er også en to-trinns PCR, som tar kortere tid enn metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011), blant annet fordi den kun har 40 sykluser. Metoden beskrevet av Shin et al. (2018) bruker COWP som målgen, i motsetning til 18S rRNA som er målgenet for den foreslåtte supplementære PCR-metoden.

Derfor velges ikke PCR-betingelsene for metoden beskrevet av Shin et al. (2018) som PCR-betingelser for den supplementære PCR-metoden.

En oversikt over analysebetingelsene for forslaget til oppsett av den supplementære metoden er vist i tabell 6. Her er målgen, ekstraksjonsreagenser, PCR-reagenser, PCR-betingelser og deteksjon av PCR-produktet presentert.

Tabell 6: Analysebetingelser for et forslag til en kvalitativ real-time PCR-metode for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

Parasitt	Målgen	Ekstraherings-reagens	Produsent	PCR-reagens	Produsent	PCR-betingelser						Deteksjon av PCR-produkt	Referanse
						Inkubering	I	II	III	Antall sykluser	Tid totalt		
Cryptosporidium parvum	18S rRNA	QIAamp® Stool Mini Kit	Qiagen	TaqMan environmental master mix 2.0	Applied Biosystems	95°C, 10 min	95°C, 15 sek	60°C, 1 min		55	79 min	TaqMan MGB VIC/NFQ probe	Hadfield et al. (2011)

I: denaturering, II: hybridisering, III: polymerisering, sammen utgjør de èn syklus.

Validering

For å validere den supplementære kvalitative real-time PCR-metoden vil vi se på analytisk sensitivitet (deteksjonsgrense), klinisk sensitivitet, diagnostisk spesifisitet, riktighet, repeterbarhet og reproduserbarhet.

Til valideringen vil vi benytte standarder med kjent DNA-konsentrasjon for å undersøke både metodens deteksjonsgrense og den kliniske sensitiviteten. For å finne deteksjonsgrensen vil vi sette opp en fortynningsrekke av standardene i området rundt den antatte deteksjonsgrensen, slik det er beskrevet i innledningen. Sensitiviteten bestemmes ved å regne ut PPV basert på analyseresultater ved å analysere kjente positive og kjente negative prøver. Beregningsformel 1 i innledningen benyttes til denne utregningen.

Metodens diagnostiske spesifisitet undersøkes både in silico og praktisk. Først vil vi gjøre et BLAST-søk for å finne sekvenslikheten mellom primerne og proben som benyttes i metoden og målsekvensen som detekteres. Praktisk vil vi undersøke kryssreaksjoner ved å analysere DNA-prøver fra mikrober i normalfloraen i tarmen til mennesker. Vi vil i tillegg analysere DNA-prøver fra *Cryptosporidium hominis*, og andre arter innen *Cryptosporidium spp*. Gjennom disse undersøkelsene vil vi avklare om metoden gir kryssreaksjoner og falske positive resultater.

Vi vil videre undersøke metodens riktighet ved å se på hvor mange tilfeldige feil vi får ved å bruke metoden. Her vil vi sammenligne resultatene vi får på standarder, med fasitverdiene til standardene. Deretter vil vi regne ut %BIAS som beskrevet i innledningen.

Til slutt vil vi sjekke metodens presisjon. Dette gjøres ved å teste metodens repeterbarhet og reproduserbarhet som beskrevet i innledningen.

Metodens sensitivitet og spesifisitet bør ligge opp mot 100% for å sikre at metoden gir korrekte positive utslag for *Cryptosporidium parvum*. Deteksjonsgrensen bør være så lav som mulig, helst ned mot 200 oocyster/g fæces, slik at fæcesprøver med liten mengde oocyster blir fanget opp av metoden. Også repeterbarheten og reproduserbarheten bør ligge på ca 100% for å sikre korrekte prøveresultater ved hver analysering. Kravet for %BIAS kan variere fra laboratorium til laboratorium, og vil settes ut fra laboratoriets krav til riktighet.

4. Konklusjon

For påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces benyttes nested PCR og real-time PCR. Real-time PCR til påvisning av *Cryptosporidium parvum* er ofte multipleks eller dupleks. De vanligste målgenene er COWP og 18S rRNA for påvisning av *Cryptosporidium parvum* ved bruk av PCR.

Ekstraksjonsreagenset benyttet i metodene beskrevet av Shin et al. (2018), Lalonde et al. (2013), Vejdani et al. (2014) og Bairami Kuzehkanan et al. (2011) er QIAamp® Stool Mini Kit (Qiagen). PCR-metodene benytter ulike reagenser til selve PCR-analysen. PCR-metodene beskrevet av Shin et al. (2018) og Vejdani et al. (2014) benytter egenlagde reagenser. Metodene beskrevet av Hadfield et al. (2011) og Das et al. (2020) benytter Mastermix produsert av henholdsvis Applied Biosystems og ThermoFischer SCIENTIFIC. Metoden beskrevet av Laude et al. (2016) benytter et reagenskit produsert av Diagende Diagnostics.

Kvantitative analyser bruker ofte tre-trinns PCR. Tre-trinns real-time PCR-metodene som er undersøkt har inkubering (94-98°C, 2-10 min) etterfulgt av 40-45 sykluser med denaturering (94-98°C, 10-30 sek), hybridisering (54-65°C, 30 sek) og polymerisering (72°C, 10-30 sek) ((Lalonde et al., 2013) og (Mary et al., 2013)). Amplifisering av DNA tar 48-62 min for disse metodene.

Kvalitative analyser bruker ofte to-trinns PCR. To-trinns real-time PCR-metodene som er undersøkt har inkubering (95°C, 10-15 min), etterfulgt av 40-55 sykluser med denaturering (95°C, 10-15 sek) og hybridisering og polymerisering (60°C, 1 min) ((Shin et al., 2018) og (Hadfield et al., 2011)). Amplifisering av DNA tar 62-79 min for disse metodene.

For nested PCR-metodene gjøres tre-trinns PCR i to steg; PCR-1 og PCR-2. For både PCR-1 og PCR-2 har metodene inkubering (94°C, 3-5 min for PCR-1 og PCR-2), etterfulgt av 30-35 sykluser med denaturering (94°C, 1 min for PCR-1 og PCR-2), hybridisering (PCR-1: 49,5-60°C, 1-1,3 min. PCR-2: 56-60°C, 45 sek – 1,3 min) og polymerisering (72°C, 1-2 min for PCR-1 og PCR-2). Felles for nested PCR-metodene er at de avsluttes med et ekstra ekstensjonssteg ved 72°C (PCR-1: 10 min, PCR-2: 7-10 min) ((Das et al., 2020) og (Bairami Kuzehkanan et al., 2011)). Amplifisering av DNA tar 3,6-5,6 timer for disse metodene.

PCR-metodene har oppgitt sensitivitet (96-100%), og spesifisitet (99,1-100%) for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces. ((Laude et al., 2016), (Shin et al., 2018), (Hadfield et al., 2011) og (Bairami Kuzehkanan et al., 2011)). Deteksjonsgrensen varierer fra 200-1000 oocyster/g fæces ((Shin et al., 2018), (Mary et al., 2013) og (Hadfield et

al., 2011)). Resultatene på valideringsparametrene for disse PCR-metodene antyder at metodene egner seg godt til å påvise *Cryptosporidium parvum* i human fæces.

Basert på resultatene fra litteraturstudien foreslår vi en kvalitativ real-time PCR-metode med 18S rRNA som målgen for påvisning av *Cryptosporidium parvum* i human fæces som supplementær metode til screeninganalyse. Metoden beskrevet av Hadfield et al. (2011) er forenelig med dette. Den har følgende PCR-betingelser: inkubering (95°C, 10 min), etterfulgt av 55 sykluser denaturering (95°C, 15 sek), hybridisering og polymerisering (60°C, 1 min). Reagensene som foreslås er QIAamp® Stool Mini Kit (Qiagen) til ekstrahering, og TaqMan environmental mastermix 2.0 (Applied Biosystems) til PCR. Til deteksjon av PCR-produktet foreslår vi bruk av TaqMan MGB VIC/NFQ probe. Ved validering av denne metoden er det nødvendig å undersøke metodens sensitivitet, spesifisitet, deteksjonsgrense, repeterbarhet, reproduserbarhet og riktighet.

5. Referanser

Andreas Christensen, Øyvind Kommedal, Garth Tylden, & Rikard Rykkvin (Red.). (2018). STRATEGIMØTE 2017 Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder. *Folkehelseinstituttet*, 35.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *5*(2), 209–219. https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209

Berg, H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis—Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. I S. Magdeldin (Red.), *Gel Electrophoresis—Principles and Basics*. InTech. https://doi.org/10.5772/37724

Black Hole Quencher®. (u.å.). Sigma-Aldrich. Hentet 14. mai 2020, fra https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/black-hole-quenchers.html

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. (u.å.). Hentet 13. mai 2020, fra https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Brukerhåndbok i mikrobiologi. (u.å.). Hentet 14. mai 2020, fra https://www.prosedyrer.no/index.php?action=showtopic&topic=d8bnXRY3&highlight=true

Burd, E. M. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(3), 550–576. https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09

Carl A. Burtis, David E. Bruns. (2015). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (7. utg.). Elsevier Saunders.

Cryptosporidiose. (u.å.). Folkehelseinstituttet. Hentet 10. mars 2020, fra https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/kryptosporidiose---veileder-for-hel/

Cryptosporidiosis- ClinicalKey. (u.å.). Hentet 6. april 2020, fra https://www.clinicalkey.com/#!/content/clinical_overview/67-s2.0-eb36e17e-8c90-4677-801d-92c0a60c06d9?scrollTo=%23diagnostic-procedures-heading-19

Dagny Haug Dorenberg, Dag Hvidsten, Øyvind Kommedal, & Pål A. Jenum (Red.). (2017). STRATEGIMØTE Oktober 2016 Kvalitetskontroll av infeksjonsserologiske metoder. *Folkehelseinstituttet*, 59.

diagnostics, D. (u.å.). *Diagenode diagnostics: Profiling the infectious diseases*. Diagenode Diagnostics. Hentet 12. mai 2020, fra https://www.diagenodediagnostics.com/

Grønmo, S. (2020). Kvalitativ metode. I *Store norske leksikon*. http://snl.no/kvalitativ_metode

Innis, M. A., Gelfand, D. H., & Sninsky, J. J. (1995). *PCR Strategies*. Elsevier.

januar 2010, T. D. nasjonale forskningsetiske komiteene S. oppdatert: 15. (u.å.). *3. Utvalgsstrategi*. Etikkom. Hentet 19. april 2020, fra http://www.etikkom.no/forskningsetiske-retningslinjer/Medisin-og-helse/Kvalitativ-forskning/3-Utvalgsstrategi/

Jennings, L., Van Deerlin, V. M., Gulley, M. L., & College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. (2009). Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *133*(5), 743–755. https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.5.743

Jothikumar, N., da Silva, A. J., Moura, I., Qvarnstrom, Y., & Hill, V. R. (2008). Detection and differentiation of Cryptosporidium hominis and Cryptosporidium parvum by dual TaqMan assays. *Journal of Medical Microbiology*, *57*(Pt 9), 1099–1105. https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001461-0

Khurana, S., & Chaudhary, P. (2018). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Tropical Parasitology*, *8*(1), 2. https://doi.org/10.4103/tp.TP_34_17

Lalonde, L. F., Reyes, J., & Gajadhar, A. A. (2013). Application of a qPCR Assay with Melting Curve Analysis for Detection and Differentiation of Protozoan Oocysts in Human Fecal Samples from Dominican Republic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *89*(5), 892–898. https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0106

Laude, A., Valot, S., Desoubeaux, G., Argy, N., Nourrisson, C., Pomares, C., Machouart, M., Le Govic, Y., Dalle, F., Botterel, F., Bourgeois, N., Cateau, E., Leterrier, M., Le Pape, P., & Morio, F. (2016). Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of Giardia intestinalis, Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis and Entamoeba histolytica from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *22*(2), 190.e1-190.e8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.019

Malt, U., & Stoltenberg, C. (2020). Sensitivitet – test. I *Store norske leksikon*. http://snl.no/sensitivitet_-_test

Mary, C., Chapey, E., Dutoit, E., Guyot, K., Hasseine, L., Jeddi, F., Menotti, J., Paraud, C., Pomares, C., Rabodonirina, M., Rieux, A., & Derouin, F. (2013). Multicentric Evaluation of a New Real-Time PCR Assay for Quantification of Cryptosporidium spp. And Identification of Cryptosporidium parvum and

Cryptosporidium hominis. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(8), 2556–2563. https://doi.org/10.1128/JCM.03458-12

NA Dok. nr. 48a Klinisk kjemi—PDF Gratis nedlasting. (u.å.). Hentet 19. mars 2020, fra https://docplayer.me/67979761-Na-dok-nr-48a-klinisk-kjemi.html

Nils Olav Sjøberg. (2006). *Molekylær genetikk* (4.utg). Vett og Viten.

Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll. (2002). *Validering / verifisering av klinisk kjemiske analyser. Klinisk nytte - praktisk egnethet - analytisk kvalitet.* NKK. http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf

Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra Sekhar, G., & Thomas, R. (2008). Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology*, *56*(1), 45–50.

Protocol: TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 Protocol (English). (u.å.). Hentet 14. mai 2020, fra https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fcms_079133.pdf&title=UHJvdG9jb2w6IFRhcU1hbiZyZWc7IEVudmlyb25tZW50YWwgTWFzdGVyIE1peCAyLjAgUHJvdG9jb2wgKEVuZ2xpc2ggKQ==

QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit—QIAGEN Online Shop. (u.å.). Hentet 7. mai 2020, fra https://www.qiagen.com/no/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-fast-dna-stool-mini-kit/?cmpid=PC_QF_genomic-dna_0220_SEA_GA_stool-kit-qiaamp&kwid=qiaamp%20stool%20mini%20kit&gclid=CjwKCAjw4871BRAjEiwAbxXi27E2_JuXagtojvHX2SdbkaJfxR8a85lEwAovaWAjkGZ5gTcVgdArZBoCXMgQAvD_BwE&clear=true#resources

Restriction Fragment Length Polymorphism—An overview | ScienceDirect Topics. (u.å.). Hentet 9. mai 2020, fra https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/restriction-fragment-length-polymorphism

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, *245*(2), 154–160. https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916

Shin, J.-H., Lee, S.-E., Kim, T. S., Ma, D.-W., Cho, S.-H., Chai, J.-Y., & Shin, E.-H. (2018). Development of Molecular Diagnosis Using Multiplex Real-Time PCR and T4 Phage Internal Control to Simultaneously

Detect *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Cyclospora cayetanensis* from Human Stool Samples. *The Korean Journal of Parasitology*, *56*(5), 419–427. https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.5.419

TaqMan™ MGB Probe. (u.å.). Hentet 14. mai 2020, fra http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316033

Verweij, J. J., Blangé, R. A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E. A. T., Rooyen, M. A. A. van, Lieshout, L. van, & Polderman, A. M. (2004). Simultaneous Detection of Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, and Cryptosporidium parvum in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(3), 1220–1223. https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1220-1223.2004

Vedlegg

Vedlegg 1

Tabell A: Målgen med Genbank-nummer, og primere for tre multipleks real-time PCR-metoder for påvisning av *Cryptosporidium parvum* med flere parasitter i human fæces.

Parasitter	Målgen	GB-nummer	F-primer (5'→3')	R-primer (5'→3')	Referanse
Giardia intestinalis, *Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis* og *Entamoeba histolytica*	18S rRNA	-	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A	Laude et al. (2016)
Cryptosporidium parvum, *Giardia lamblia* og *Cyclospora cayetanensis*	COWP	AB089292	CAA GGC CTC CAA TGT ATA CAA AC	CGA TTG CTT GGA CTG AAA TAC AG	Shin et al. (2018)
Cryptosporidium parvum, *C. cayetanensis*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*, *Cystoisospora belli*, *Sarcocystis cruzi*, m.fl.	18S rRNA	-	Universal blanding med syv primere		Lalonde et al. (2013)

Kommentar: GB-nummer står for GenBank accession number, et nummer som kan søkes opp i 3 ulike databaser for å finne målgenet. Målgenet gjelder kun for Cryptosporidium parvum, målgenene for de andre parasittene er ikke tatt med her. F-primer: forward primer, R-primer: reverse primer.

Vedlegg 2

Tabell B: Målgen med Genbank-nummer, og primere for to dupleks real-time PCR-metoder for påvisning av *Cryptosporidium spp.* og differensiering mellom *Cryptosporidium parvum* og *Cryptosporidium hominis* i human fæces.

Parasitt	Målgen	GB-nummer	F-primer (5'→3')	R-primer (5'→3')	Referanse
Cryptosporidium spp	18S rRNA	EU675853.1	CAT GGA TAA CCG TGG TAA T	TAC CCT ACC GTC TAA AGC TG	Mary et al. (2013)
Cryptosporidium parvum					
Cryptosporidium hominis					
Cryptosporidium spp	18S rRNA	AF164102	GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT ACA GG	CTG CTT TAA GCA CTC TAA TTT TCT CAA AG	Hadfield et al. (2011)
Cryptosporidium parvum	LIB13-locus	B78618	TCC TTG AAA TGA ATA TTT GTG ACT CG	TTA ATG TGG TAG TTG CGG TTG AAC	
Cryptosporidium hominis	LIB13-locus	AF190627		AAA TGT GGT AGT TGC GGT TGA AA	

Kommentar: GB-nummer står for GenBank accession number, et nummer som kan søkes opp i 3 ulike databaser for å finne målgenet for PCR-metodene. F-primer: forward primer, R-primer: reverse primer.

Vedlegg 3

Tabell C: Målgen med Genbank-nummer, og primære og sekundære primere for tre nested PCR-metoder for påvisning av *Cryptosporidium spp.* i human fæces.

Parasitt	Målgen	GB-nummer	F-primer (5'→3')		R-primer (5'→3')		Referanse
			Primær	Sekundær	Primær	Sekundær	
Cryptosporidium spp.	18S rRNA	-	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA	AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC	Das et al. (2020)
Cryptosporidium spp.	18S rRNA	-	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA	AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A	Vejdani et al. (2014)
Cryptosporidium spp.	18S rRNA	GQ259149.1	GGT GAC TCA TAA TAA CTT TAC GG	TAA ACG GTA GGG TAT TGG CCT	ACG CTA TTG GAG CTG GAA TTA C	CAG ACT TGC CCT CCA ATT GAT A	Bairami Kuzehkanan et al. (2011)

Kommentar: GB-nummer står for GenBank accession number, et nummer som kan søkes opp i 3 ulike databaser for å finne målgenet som detekteres i PCR-metoden. F-primer: forward primer, R-primer: reverse primer.

NTNU

Kunnskap for en bedre verden